

4个绵羊品种的遗传多样性分析^{*}

雷承志¹, 姚毅¹, 陈玉林¹, 尹君亮², 刘福元²

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 新疆农垦科学院 畜牧兽医研究所, 新疆 石河子 832000)

[摘 要] 采用5个微卫星位点对4个绵羊品种(小尾寒羊、多浪羊、新疆细毛羊、阿勒泰羊)的遗传多样性进行了分析。结果表明, 5个微卫星位点在4个绵羊品种中的平均等位基因数分别为7, 6, 4, 6和6个; 多态信息含量分别为0.774 7, 0.761 6, 0.720 3和0.703 2; 有效等位基因数分别为4.978 5, 4.835 6, 4.182 2和3.935 0; 杂合度分别为0.814 4, 0.806 2, 0.719 7和0.716 7; 信息熵分别为1.701 1, 1.699 3, 1.554 1和1.509 8。

[关键词] 绵羊; 微卫星; 遗传多态性

[中图分类号] S827.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)12-0016-05

微卫星(microsatellite)一般由2~6个碱基组成核心序列, 重复10~20次左右, 首尾相接组成短串联序列重复(Short tandem repeat, STR), 又称为简单序列重复(Simple sequence repeat, SSR)。微卫星普遍存在于真核生物的基因组中, 平均每10 kb就出现一个。微卫星标记由于具有数量多、分布广、共显性遗传、多态性丰富及检测快速方便等优点, 目前已广泛应用在各种动植物基因作图、群体遗传变异分布、群体起源系统、亲子鉴定和QTL的检测与定位等研究中^[1]。

DNA是生物遗传信息的载体, 其标记的多态性和范围是其他任何一种形式的标记不可比拟的, 为摸清4个绵羊品种的品质特性, 为选育工作提供科学依据, 在DNA水平上检测群体的遗传多样性显得尤为重要。近年来, 国内学者在DNA水平对绵羊作

了大量研究^[2-4], 本文旨在利用微卫星技术对4个绵羊品种(小尾寒羊、阿勒泰羊、新疆细毛羊和多浪羊)的遗传多样性进行检测, 以期对绵羊遗传资源保存和开发利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 绵羊血液 从新疆生产建设兵团农八师北野种羊场, 采集61只小尾寒羊(XW)母羊, 31只多浪羊(DL)母羊, 58只新疆细毛羊(XM)母羊, 30只阿勒泰羊(ALT)母羊的血样用肝素钠抗凝, -20℃冷冻保存备用。

1.1.2 引物合成 5对特异微卫星引物由上海生物工程技术有限公司合成, 详细资料见表1。

表1 5对微卫星引物概况

Table 1 Survey of five pairs of micro-satellites locis

引物 Loci	序列 Sequence	退火温度/ Annealing temperature	来源 Source	片段长度/bp Range of allele size
OarA E101	F: 5' TTCTTATAGATGCACTCAAGCTAGG-3' R: 5' TAAGAAATATATTTGAAAAAACTGTA TCTCCC-3'	64.0	绵羊 Sheep	91~135
OarHH35	F: 5' AATTGCA TTCA GTA TCTTTAAACA TCTGGC-3' R: 5' ATGAAAATATAAA GA GAA TGAACCAACCGG-3'	62.0	绵羊 Sheep	102~148
OarHH55	F: 5' GTTATTTCCA TATCTTTTCCTCCA TCA TAA GC-3' R: 5' CCACACA GAGCAACTAAAA CCCA GC3'	63.5	绵羊 Sheep	117~155
BM 1329	F: 5' TTGTTTA GGCAA GTCCAAA GTC-3' R: 5' AACACCGCA GCTTCA TCC-3'	63.0	牛 Cattle	170~220
BM 143	F: 5' ACCTGGGAA GCCTCCA TATC3' R: 5' CTGCA GGCA GATTCTTTA TCG-3'	62.0	牛 Cattle	96~120

[收稿日期] 2006-06-18

[基金项目] 农业部农业结构调整重大项目(05-07-03B); 新疆生产建设兵团博士基金项目(04BSZJ-8)

[作者简介] 雷承志(1980-), 男, 山西交城人, 在读硕士, 主要从事动物遗传资源研究。

[通讯作者] 陈玉林(1964-), 男, 河南鄢陵人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物遗传资源研究。E-mail: myxy11@263.net

1.2 绵羊基因组DNA的提取

用氯仿抽提法提取基因组DNA,溶于超纯水中,4℃保存。

1.3 绵羊基因组DNA的PCR扩增

PCR反应体系为: Taq DNA聚合酶(0.5 U/μL) 1.0 μL, 10×PCR缓冲液1.2 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 0.75 μL, 上下游引物(20 pmol/L)各1.0 μL, 超纯水4.55 μL, DNA模板(100 ng/μL) 1.0 μL。PCR扩增程序为: 95℃预变性2 min; 95℃变性30 s, 退火(温度根据所选的引物而定)30 s, 72℃延伸45 s, 34个循环; 72℃延伸10 min, 产物4℃保存。

1.4 PCR产物的电泳检测和绵羊基因型的判定

PCR反应结束后,用浓度为80 g/L的聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后用硝酸银染色法显色,用德国Kondak公司的凝胶成像系统携带的1D Image Analysis Software Version 3.0软件计算微卫星等位基因大小。

1.5 统计指标

1.5.1 基因频率和基因型频率的计算 基因型频率指一个群体中某一性状的各种基因型之间的比率。设某一基因位点有A和B两个等位基因,基因频率分别为 p 和 q ,则

$$p = (2X + Y)/2N \quad q = (2Z + Y)/2N$$

式中, X 为具有AA基因型的个体数, Z 为具有BB基因型的个体数, Y 为具有AB基因型的个体数, N 为总个体数。

基因型频率=基因型个体数/测定群体总数

1.5.2 基因纯合度(j)和杂合度(He)的计算

$$j = \sum_{i=1}^m p_i^2, He = 1 - \sum_{i=1}^m p_i^2$$

式中, m 为某位点的等位基因数; p_i 为某位点第 i 个等位基因的频率。

1.5.3 多态信息含量(PI)的计算 一个标记在群体中的PI值是根据其位点等位基因的频率来计算的^[5]。

$$PI = 1 - \sum_{i=1}^m p_i^2 - \sum_{j=1}^{m-1} \sum_{i=1}^m 2p_i^2 p_j^2$$

式中, p_i 和 p_j 分别为第 i 和第 j 个等位基因在群体中的频率; m 为等位基因数。

2 结果与分析

2.1 绵羊微卫星标记目的片段扩增结果

多浪羊OarA E101位点的扩增图谱见图1。由图1可知,扩增效果较好,不同多浪羊个体扩增的条带清晰明亮,PCR产物的特异性好,扩增效率高,能满足实验的要求,

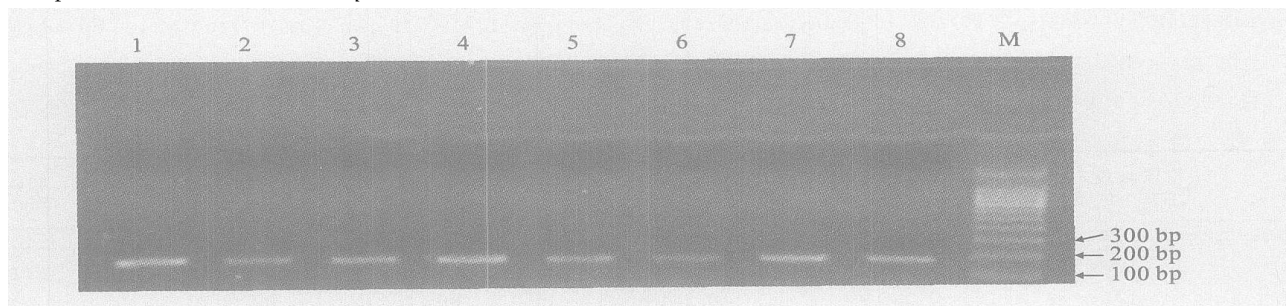


图1 多浪羊OarA E101位点扩增产物电泳图谱

1~8泳道为不同羊个体扩增产物电泳条带;M: 100 bp DNA marker

Fig. 1 Pattern of PCR product of OarA E101 loci in the DL

1-8 Individual PCR product; M: 100 bp DNA Marker

2.2 绵羊微卫星标记DNA多态性检测结果

多浪羊OarA E101位点的PCR产物进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后,银染结果见图2。由图2可知,目的条带清晰,可以进行带型判定。

本研究中,OarA E101位点检测出9个等位基因,即97~133 bp;OarHH 35位点检测出9个等位基因,即104~146 bp;OarHH 55位点检测出6个等位基因,即119~151 bp;BM 1329位点检测出6个等位基因,即178~210 bp;BM 143位点检测出6个等位

基因,即104~124 bp。

2.3 4个绵羊品种的遗传多态性

由表2可知,对于OarA E101位点,109 bp等位基因的频率最高为0.294 4,为4个群体共有;97 bp等位基因的频率最低为0.005 6,只在小尾寒羊中检测到;103 bp等位基因的频率只在新疆细毛羊和阿勒泰羊中检测到。对于OarHH 35位点,118 bp等位基因的频率最高为0.261 1,146,136,124,118,114,108和104 bp等位基因为4个群体共有;128 bp等

位基因的频率最低为0.005 6, 同样只在小尾寒羊中检测到。对于OarHH 55 位点, 133 bp 等位基因的频率最高为0.394 5, 6 个等位基因在 4 个群体中均存在。对于BM 1329 位点, 204 bp 等位基因的频率最高为0.277 8, 为 4 个群体共有, 198 bp 等位基因的频率为0.041 7, 只在小尾寒羊和多浪羊中检测到。对于BM 143 位点, 104 bp 等位基因的频率最高为0.277 8, 为各群体共有, 120 bp 等位基因的频率为0.119 4, 在新疆细毛羊中没有检测到。

根据Montgomery 等^[6-7]报道, 这 4 个绵羊品种

的繁殖力由高到低的顺序为: 小尾寒羊> 多浪羊> 新疆细毛羊> 阿勒泰羊。由表2 可见,OarA E101 位点的97 bp 和OarHH 35 位点的128 bp, 只在小尾寒羊中检测到; OarA E101 位点的107 bp、BM 1329 位点的198 bp 和BM 143 位点的124 bp, 只在小尾寒羊和多浪羊中检测到; 而OarA E101 位点的103 bp 只在新疆细毛羊和阿勒泰羊中检测到。这些特有的等位基因是否可作为绵羊繁殖力高低的分子标记, 值得通过扩大样本数量和遗传连锁分析进一步研究。

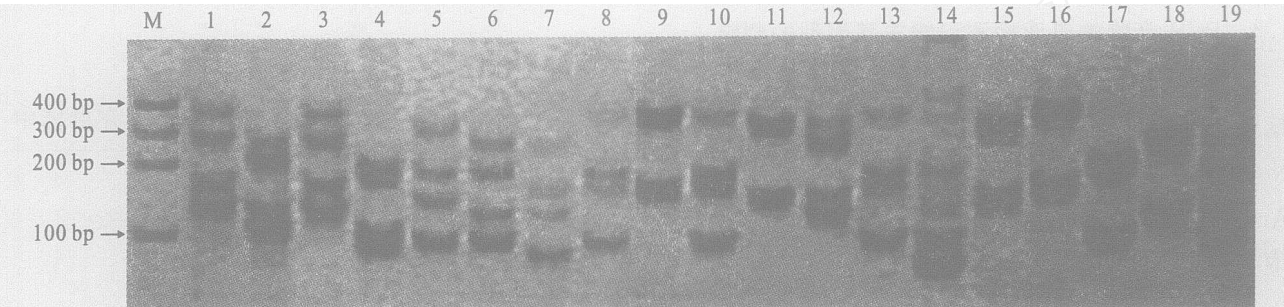


图2 多浪羊OarA E101 位点的PAGE 电泳图谱

1, 3 泳道基因型为109/121; 2, 19 泳道基因型为107/109; 4, 8, 10, 13, 17 泳道基因型为97/97; 5, 6, 7 泳道基因型为97/107; 9, 11, 15 泳道基因型为109/133; 12 泳道基因型为97/121; 14 泳道基因型为97/107; 16 泳道基因型为109/133; 18 泳道基因型为113/127; 19 泳道基因型为107/109; M. 100 bp ladder 的M marker

Fig 2 PAGE pattern of OarA E101 loci in the DL

1, 3 genotypes 109/121; 2, 19 genotypes 107/109; 4, 8, 10, 13, 17 genotypes 97/97; 5, 6, 7 genotypes 97/107; 9, 11, 15 genotypes 109/133; 12 genotypes 97/121; 14 genotypes 97/107; 16 genotypes 109/133; 18 genotypes 113/127; 19 genotypes 107/109; M 100 bp ladder marker

表2 5 个微卫星位点在 4 个绵羊群体的等位基因频率

Table 2 Allele frequencies of five microsatellites loci in four populations

位点 Loci	片段长度/bp Fragment size	XW	DL	XM	AL T	加权值 Weight
OarA E101	133	0.106 5	0.145 2	0.025 8	0.033 3	0.075 0
	127	0.065 6	0.064 5	0.025 8	0.066 7	0.052 8
	121	0.286 9	0.241 9	0.189 7	0.200 0	0.233 3
	117	0.049 2	0.129 0	0.250 0	0.150 0	0.144 4
	113	0.180 3	0.145 2	0.112 1	0.183 4	0.152 8
	109	0.262 3	0.241 9	0.362 1	0.283 3	0.294 4
	107	0.032 8	0.032 3	—	—	0.016 7
	103	—	—	0.034 5	0.083 3	0.025 0
	97	0.016 4	—	—	—	0.005 6
OarHH 35	146	0.065 6	0.016 1	0.008 6	0.016 7	0.030 6
	136	0.041	0.096 6	0.086 2	0.116 7	0.077 8
	128	0.016 4	—	—	—	0.005 6
	124	0.180 3	0.145 2	0.224 1	0.216 7	0.194 4
	122	0.016 4	—	0.017 2	—	0.011 1
	118	0.262 3	0.306 5	0.232 8	0.266 7	0.261 1
	114	0.008 2	0.032 3	0.043 1	0.016 7	0.025 0
	108	0.204 9	0.145 2	0.319 0	0.333 2	0.252 8
	104	0.204 9	0.258 1	0.069 0	0.033 3	0.141 6

续表 2 Continued of Table 2

位点 Loci	片段长度/bp Fragment size	XW	DL	XM	AL T	加权值 Weight
OarHH55	151	0.065 6	0.096 8	0.060 3	0.066 7	0.069 4
	149	0.155 7	0.096 8	0.137 9	0.150 0	0.138 9
	145	0.098 4	0.145 2	0.181 0	0.166 7	0.144 5
	135	0.106 6	0.096 8	0.094 8	0.083 3	0.097 2
	133	0.385 2	0.371 0	0.405 3	0.416 6	0.394 5
	119	0.188 5	0.193 4	0.120 7	0.116 7	0.155 5
BM 1329	210	0.163 9	0.177 4	0.189 7	0.200 0	0.180 6
	204	0.262 3	0.225 8	0.310 3	0.300 0	0.277 8
	198	0.073 8	0.096 8	—	—	0.041 7
	188	0.024 6	0.032 3	0.043 1	0.033 3	0.033 3
	182	0.163 9	0.177 4	0.362 1	0.350 0	0.261 1
	178	0.311 5	0.290 3	0.094 8	0.116 7	0.205 5
BM 143	124	0.147 5	0.145 3	—	—	0.075 0
	120	0.204 9	0.241 9	—	0.050 0	0.119 4
	116	0.114 8	0.129 0	0.129 3	0.150 0	0.127 8
	112	0.106 6	0.129 0	0.198 2	0.216 7	0.158 3
	108	0.278 7	0.241 9	0.232 8	0.183 3	0.241 7
	104	0.147 5	0.112 9	0.439 7	0.400 0	0.277 8

2.4 4 个绵羊群体的遗传变异

衡量群体遗传变异的指标目前主要有基因杂合度、多态信息含量和有效等位基因数。由表 3 可知, 在 4 个品种组成的大群体中, 5 个微卫星位点的多态信息含量大小顺序为: OarA E101> OarHH35> OarHH55> BM 143> BM 1329; 有效等位基因数的大小顺序为 OarA E101> OarHH35> BM 143> OarHH55> BM 1329; 杂合度大小顺序为: OarA E101> OarHH35> BM 1392> OarHH55> BM 143; 信息熵的大小顺序为: OarA E101> OarHH35> OarHH55> BM 1329> BM 143。从这些

数据可看出, 有效等位基因数多的品种, 其杂合度和多态信息含量也高。同时还发现, 4 个绵羊品种在 5 个微卫星位点的 PIC 皆大于 0.7, 在遗传连锁分析中, PIC 大于 0.7 的微卫星 DNA 是最理想的选择标记^[8], 因为在这种情况下, 双亲在该位点通常是杂合的, 在其后代中可以清楚地观察到等位基因的分离。但是, 由于本试验分析样本量较少, 不能排除 4 个绵羊品种在 5 个微卫星位点还存在新的等位基因和新的基因型, 因此这 5 个微卫星位点是否可以作为连锁分析的候选遗传标记, 有待于进一步深入研究。

表 3 5 个微卫星位点在绵羊群体中的多态信息含量、有效等位基因数、杂合度和信息熵

Table 3 PIC number of effective alleles, Heterozygosity and Shannon's information index of 5 micro-satellite sites in 4 sheep breeds

位点 Loci	多态信息含量 PIC	有效等位基因数 Number of effective alleles	杂合度 Heterozygosity	信息熵 Shannon's information index
OarA E101	0.772 8	4.957 4	0.805 6	1.729 4
OarHH35	0.749 6	4.630 9	0.792 2	1.675 1
OarHH55	0.732 4	4.217 9	0.772 1	1.610 9
BM 1329	0.715 8	4.153 5	0.774 4	1.550 8
BM 143	0.728 9	4.454 2	0.765 6	1.513 9

表 4 4 个绵羊群体的平均遗传多态性

Table 4 Average genetic polymorphisms in four sheep populations

品种 Breed	多态信息含量 PIC	有效等位基因数 Number of effective alleles	杂合度 Heterozygosity	信息熵, Shannon's information index	平均等位基因数 Mean number of alleles
XW	0.774 7	4.978 5	0.814 4	1.701 1	7
DL	0.761 6	4.835 6	0.806 2	1.699 3	6.4
XM	0.720 3	4.182 2	0.719 7	1.554 1	6
ALT	0.703 2	3.935 0	0.716 7	1.509 8	6

表 4 列出了 4 个绵羊品种的平均遗传多态性。由表 4 可知, 4 个绵羊群体中小尾寒羊的遗传变异最

大,阿勒泰羊最小,表明小尾寒羊蕴含着极其丰富的遗传信息,在今后的育种实践中具有较高的利用价值。此外,小尾寒羊和多浪羊的平均等位基因数均较多,分别为7和6.4,这可能与这两个品种选育程度较低、遗传变异较大有关。

3 讨 论

多态信息含量是衡量片段多态性的一个指标。根据Botstein^[9]等提出的衡量基因变异程度高低的多态信息含量(Polymorphism Information Content, PIC)指标,当 $PIC > 0.5$ 时,该基因座为高度多态基因座, $0.25 < PIC < 0.5$ 时为中度多态基因座, $PIC < 0.25$ 时为低度多态信息基因座。据此可知,本研究中5个微卫星位点均为高度多态位点。

根据全球家畜品种间遗传距离测定草案中提出的微卫星选择标准可知,每个微卫星位点至少应有4

个等位基因方能较好的应用于遗传多样评估^[9]。而本研究中的5个微卫星位点在4个品种中的等位基因数皆大于4个,表明这5个位点可用于绵羊群体遗传多态性评价。

微卫星的多态性能够反映物种中最原始、最保守的基因,其余的等位基因则是在进化过程中由等位基因中频率较高的基因突变形成的。据此,OarA E101基因座的109 bp等位基因、OarHH35基因座的118 bp等位基因、OarHH55基因座的133 bp等位基因、BM1329基因座的204 bp等位基因和BM143基因座的104 bp等位基因可能是这4个绵羊群体中相应微卫星位点最原始的等位基因。但这5个位点等位基因频率在多浪羊、新疆细毛羊和阿勒泰羊中相差不大,这是否是由于他们均属于新疆地方品种,还是由于地域差异造成的,有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] 张细全,李家琪,杨关福. 动物遗传标记[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1997.
- [2] 储明星,程金花,过 伟. 微卫星标记OarA E101和BM1329在五个绵羊品种中的初步研究[J]. 遗传学报, 2001, 28(6): 510-517.
- [3] 储明星,王吉振,王爱国,等. 小尾寒羊五个微卫星座位遗传多态性研究[J]. 遗传学报, 2002, 29(6): 502-506.
- [4] 贾 斌,陈 杰,赵茹茜,等. 新疆8个绵羊品种遗传多样性和系统发生关系的微卫星分析[J]. 遗传学报, 2003, 30(9): 847-854.
- [5] Nei L an B A, Leigh D A, Rapley. Microsatellite genome screening rapid non-denaturing and non-isotopic dinucleotide repeat analysis[J]. Biotechniques, 1994, 17(4): 708-712.
- [6] Montgomery G M, Crawford A M, Penty J M, et al. The ovine Booroola fecundity gene (*FecB*) is linked to markers from a region of human chromosome 4[J]. Nature Genetics, 1993, 4: 410-414.
- [7] Montgomery G M, Lord E A, Penty J M, et al. The Booroola fecundity gene (*FecB*) maps to sheep chromosome 6[J]. Genomics, 1994, 22: 148-153.
- [8] Barker J S F. A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds[C]//Proceedings of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Canada: Guelph Ontario, 1994, 21: 501-508.
- [9] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism's [J]. America Journal of Human Genetics, 1980, 32: 314-331.

Genetic diversity study of 4 sheep breeds

LEI Cheng-zhi¹, YAO Yi¹, CHEN Yu-lin¹, YIN Jun-liang², LIU Fu-yuan²

(1 College of Animal Science and technology of Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Xinjiang Academy of Agricultural Reclamation, Shihiezhi, Xinjiang 832000, China)

Abstract: The genetic polymorphisms of five microsatellite loci (OarA E101, OarHH35, OarHH55, BM1329 and BM143) were analyzed in four sheep breeds (Small Tail sheep, Duolang sheep, Chinese Merino and Ale tai sheep). The numbers of average alleles for OarA E101, OarHH35, OarHH55, BM1329 and BM143 were 7, 6.4, 6 and 6 in four sheep breeds respectively. The polymorphism information contents were 0.774 7, 0.761 6, 0.720 3 and 0.703 2, the number of effective alleles 4.978 5, 4.835 6, 4.182 2 and 3.935 0, the heterozygosity 0.814 4, 0.806 2, 0.719 7 and 0.716 7, the Shannon's information index were 1.701 1, 1.699 3, 1.554 1 and 1.509 8.

Key words: sheep; microsatellite; genetic polymorphism