

微卫星标记OarFCB304和MCM53在3个绵羊品种中的遗传多态性

李勤勤¹, 张英杰², 刘月琴², 周占琴¹, 孙洪新³, 蒲跃进¹

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

2 河北农业大学 动物科技学院, 河北 保定 071000;

3 河北省畜牧兽医研究所, 河北 保定 071000)

[摘要] 利用两个微卫星标记OarFCB304和MCM53对陶赛特、德克赛尔和萨福克3个绵羊品种的等位基因频率、群体多态信息含量、有效等位基因数和杂合度进行了检测。结果表明,微卫星位点OarFCB304和MCM53在3个绵羊品种中均具有高度多态性,可以用于绵羊遗传多样性的评估;位点OarFCB304比MCM53变异大;从不同品种来看,陶赛特绵羊的遗传变异程度较大,而德克赛尔羊的遗传变异程度相对较小。

[关键词] 微卫星标记; 绵羊; 遗传多态性

[中图分类号] S826; S813.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)02-0038-05

Studies on genetic polymorphism using microsatellite markers OarFCB304 and MCM53 in three sheep breeds

LI Qin-qin¹, ZHANG Ying-jie², LIU Yue-qin², ZHOU Zhan-qin¹, SUN Hong-xin³, PU Yue-jin¹

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

2 College of Animal Science and Technology, Hebei Agriculture University, Baoding, Hebei 071000, China;

3 Institute of Animal Science and Veterinary Medicine of Hebei Province, Baoding, Hebei 071000, China)

Abstract: Gene frequency, polymorphism information contents, number of effective alleles and heterozygosity were studied in Suffolk, Dorset and Texel sheep using microsatellite markers OarFCB304 and MCM53. The results indicated that there are genetic polymorphisms at microsatellite OarFCB304 and MCM53 in three sheep breeds. Microsatellite OarFCB304 and MCM53 can be used for genetic polymorphism evaluation in sheep breeds; the variation at microsatellite OarFCB304 is higher than that at microsatellite MCM53. In three sheep breeds, the variability of Dorset is the highest, and that of Texel sheep the lowest.

Key words: microsatellite marker; sheep; genetic polymorphism

微卫星DNA (Microsatellite DNA) 又称短串联重复序列 (short tandem repeat, STR), 以2~6 bp的短核苷酸为基本单位, 呈串联重复状分布于生物体整个基因组中, 具有分布广泛、多态性丰富、易于检测、进化所受选择压力小等特点, 在度量品种遗传多样性、估测品种间遗传距离及构建系统发生树等

方面具有巨大优势, 被认为是各类遗传标记中最有价值的一种^[1-3]。肉羊生产在我国畜牧业中是一个弱项, 近年来, 我国从国外引进了许多优良肉用绵羊, 用来杂交改良本地羊, 取得了一定成绩。了解引进肉用绵羊品种的遗传多样性及其遗传关系, 对于品种起源进化研究、种质资源保护以及科学开发利用均

收稿日期: 2006-01-16

基金项目: 国家科技攻关项目(2002, 22Y-2)

作者简介: 李勤勤(1980-), 女, 陕西户县人, 在读硕士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究。E-mail: dyxabcd@tom.com

通讯作者: 张英杰(1964-), 男, 河北黄骅人, 研究员, 博士, 主要从事动物遗传育种及营养研究。E-mail: Zhangyingjie66@126.com

具有重要的指导意义。为此,本研究选择与繁殖力有关的微卫星位点OarFCB 304 和MCM 53 作为试验位点,分析其在陶赛特(Dorset)、德克赛尔(Texel)和萨福克(Suffolk)3个引进肉用绵羊品种中的遗传多态性及遗传变异情况,以期对3个肉用绵羊品种资源的深入研究、保存和利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 绵羊血样 在河北唐县种羊场随机采取陶赛特、德克赛尔和萨福克3个绵羊品种血样各42份。所采血样加EDTA抗凝剂后, -20℃保存。

1.1.2 主要试剂 Taq DNA聚合酶、PCR Buffer、MgCl₂ 均购自上海生物工程有限公司; dNTP 由大连宝生物工程有限公司提供; 琼脂糖、OXO D 进口分装; 蛋白酶K、饱和酚、Tris 和Maker 购自保定海泰克生物技术有限公司。

1.1.3 引物的设计与合成 根据相关文献选择与繁殖性状相关的微卫星位点OarFCB 304^[4] 和MCM 53^[5]用于试验。微卫星位点MCM 53引物序列用Primer 5.0软件设计,预期扩增片断长度约为210 bp。PCR引物由大连宝生物工程有限公司合成,其序列为OarFCB 304 (156~210 bp):

P1 5'-CCC TAG GAG CTT TCA ATA AAG AAT CGG-3';

P2 5'-CGC TGC TGT CAA CTG GGT CAG GG-3'。

MCM 53 (205~251 bp):

P1 5'-GCA GCA GAT GGG CTA AGC AG-3';

P2 5'-ATG GCA ATC CAC TCC AGT AAG G-3'。

1.2 绵羊血液DNA的提取与检测

参照Sambrook等^[6]的方法提取。按沉淀块大小加适量TE溶解24 h(4℃)后,用10 g/L琼脂糖凝胶电泳法检测所提取DNA的质量,合格样品分装, -20℃保存备用。

1.3 绵羊血液DNA的PCR扩增

1.3.1 MCM 53位点的PCR扩增 PCR反应体系为20 μL,其中ddH₂O 9.9 μL, Buffer 2.0 μL, dNTP 1.6 μL (2.5 mmol/L), Mg²⁺ 2.0 μL (25 mmol/L), 引物 2.0 μL (10 pmol/L), Taq酶 2.0 μL (1.0 u/uL), DNA模板 0.5 μL (100 ng/μL)。PCR反应程序为: 95℃ 变性 3 min, 60℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1

min; 95℃ 变性 50 s, 60℃ 退火 50 s, 72℃ 延伸 1 min, 30个循环; 最后 72℃ 延伸 5 min, 4℃ 保存备用。

1.3.2 OarFCB 304位点的PCR扩增 PCR扩增反应体系为20 μL,其中ddH₂O 8.7 μL, Buffer 2.0 μL, dNTP 1.6 μL (2.5 mmol/L), Mg²⁺ 2.0 μL (25 mmol/L), 上下游引物 2.8 μL (10 pmol/L), Taq酶 2.5 μL (1.0 u/μL), DNA模板 0.5 μL (100 ng/μL)。PCR反应程序为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 63℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 30个循环; 最后 72℃ 延伸 5 min, 4℃ 保存。

1.4 绵羊血液DNA扩增产物的电泳及染色

将扩增产物用120 g/L的聚丙烯酰胺凝胶电泳,再用银染法进行定影、显影。银染过程为: 蒸馏水洗3遍,体积分数10%的乙醇固定10~15 min, 蒸馏水冲洗3遍; 体积分数1%的硝酸染3 min, 蒸馏水冲洗3遍; 2 g/L的硝酸银染10~15 min, 蒸馏水冲洗2遍; 30 g/L的碳酸钠显色,最后用体积分数10%的乙酸停止显色,凝胶成像仪拍照。

1.5 试验数据的统计分析

用GENEPOP 32软件计算各位点的平均杂合度(H)、有效等位基因数(N_e)和等位基因频率。用Microsoft Excel计算多态性信息含量(PI_C)。

1.5.1 PI_C的计算

$$PI_C = 1 - \left[\sum_{i=1}^n P_i^2 \right] - \left[\sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2 \right]$$

式中: P_i, P_j 分别为某一位点第 i, j 个等位基因频率; n 为等位基因数。

1.5.2 等位基因数(N_a)、N_e的计算 根据PCR产物电泳图,使用凝胶成像系统统计N_a。

$$N_e = 1 / \sum_{i=1}^n (P_i)^2$$

式中: P_i 为某一位点第 i 个等位基因的频率, n 为等位基因数。

1.5.3 H的计算

$$H = \sum_{j=1}^r h_j / r, \quad h_j = 1 - \sum_{i=1}^n (P_i)^2$$

式中: h_j 为第 j 位点的杂合度, r 为位点个数, P_i 为某一位点上第 i 个等位基因的频率, n 为某一位点的等位基因数。

2 结果与分析

2.1 3个绵羊品种血液DNA OarFCB 304 和MCM 53 PCR扩增结果

结果显示,3个绵羊品种在微卫星MCM 53位点

检测出9个等位基因(图1);在微卫星OarFCB 304位点检测出16个等位基因(图2)。

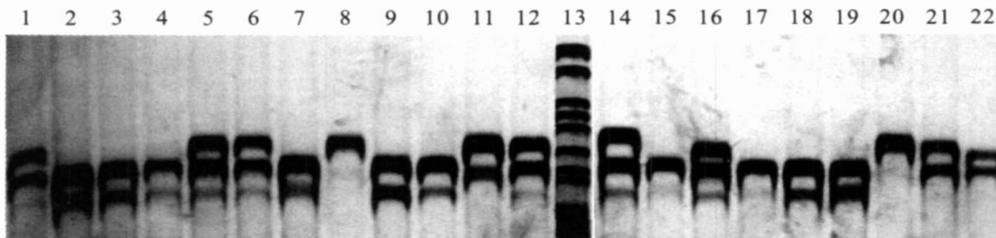


图1 绵羊血液DNA的MCM 53 PCR产物电泳结果(部分结果)

13 PBR322M SP I, 从上到下各条带长度依次为147, 160, 180, 190, 201, 217, 238, 242和309 bp; 1, 16 217/237; 2, 3, 9, 10, 18, 19 235/243; 4, 7, 15, 17. 235/235; 5, 6, 12 207/235; 8, 20 207/207; 11. 205/237; 14 209/235; 21. 215/241; 22 217/241

Fig 1 Band patterns of PCR product of MCM 53 microsatellite locus

13 PBR322M SP I, the length of the lane is 147, 160, 180, 190, 201, 217, 238, 242 and 309 bp; 1, 16 217/237; 2, 3, 9, 10, 18, 19 235/243; 4, 7, 15, 17. 235/235; 5, 6, 12 207/235; 8, 20 207/207; 11. 205/237; 14 209/235; 21. 215/241; 22 217/241

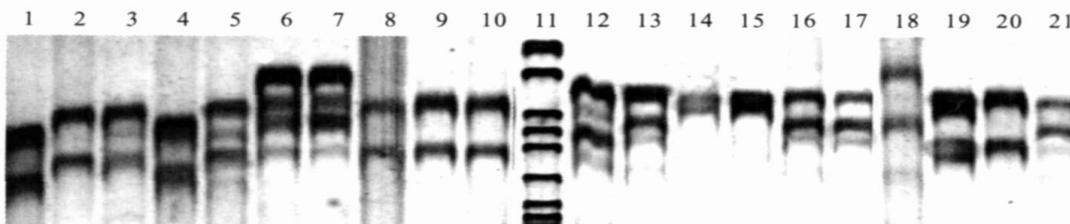


图2 绵羊血液DNA的OarFCB 304 PCR产物电泳结果(部分结果)

11. PBR322M sp I, 从上到下各条带长度依次为147, 160, 180, 190, 201, 217, 238和242 bp; 1. 186/210; 2, 3 178/204; 4 184/206; 5 178/202; 6, 7, 18 156/184; 8, 9, 10, 19, 20 170/198; 12 164/188; 13 164/184; 14, 15 170/170; 16, 17. 170/186; 21. 172/188

Fig 2 Band patterns of PCR product of OarFCB 304 microsatellite locus

11. PBR322M sp I, the length of the lane is 147, 160, 180, 190, 201, 217, 238 and 242 bp; 1. 186/210; 2, 3 178/204; 4 184/206; 5 178/202; 6, 7, 18 156/184; 8, 9, 10, 19, 20 170/198; 12 164/188; 13 164/184; 14, 15 170/170; 16, 17. 170/186; 21. 172/188

2.2 OarFCB 304 在3个绵羊品种中的等位基因频率

对126只绵羊OarFCB 304位点进行测定,在3个绵羊品种中共发现16个等位基因,其变异范围在

160~210 bp,且等位基因频率表现出明显差异,其中184 bp等位基因频率最高(0.2857),与164, 170, 172, 198 bp为各品种所共有; 178, 194, 206和210 bp等位基因仅在德克赛尔绵羊中出现(表1)。

表1 微卫星位点OarFCB 304在3个绵羊品种中的等位基因频率

Table 1 Allele frequency of OarFCB 304 loci microsatellite in three sheep populations

等位基因/bp A llele	品种 B reed			等位基因/bp A llele	品种 B reed		
	萨福克 Suffolk	陶赛特 Dorset	德克赛尔 Texel		萨福克 Suffolk	陶赛特 Dorset	德克赛尔 Texel
160	0.0227	0.0000	0.0179	186	0.1818	0.0417	0.0000
164	0.0227	0.0208	0.0893	188	0.0000	0.1667	0.0000
170	0.1591	0.1250	0.1786	192	0.0000	0.0417	0.0000
172	0.2500	0.1042	0.0893	194	0.0000	0.0000	0.0179
174	0.0000	0.2083	0.0000	198	0.1136	0.1042	0.0893
176	0.0227	0.0000	0.0179	202	0.0455	0.0000	0.0000
178	0.0000	0.0000	0.0179	206	0.0000	0.0000	0.0179
184	0.1818	0.1875	0.2857	210	0.0000	0.0000	0.1786

2.3 MCM 53 在3个绵羊品种中的等位基因频率

在MCM 53位点共发现了9个等位基因,变异范围为205~243 bp,其中209 bp等位基因频率最高(0.3333),与205, 243 bp为3个品种所共有; 207 bp等位基因仅见于萨福克绵羊中, 241 bp等位基因仅

见于陶赛特绵羊中(表2)。

由此可见,微卫星位点OarFCB 304和MCM 53在3个绵羊品种中的等位基因频率分布是不均匀的,每个座位都有一个或几个等位基因频率较高,各位点的基因频率表现出不同程度的差异,显示出各

品种的特异性。因此,OarFCB 304 和MCM 53 可以用于绵羊遗传多样性分析。

表2 微卫星位点MCM 53 在3个绵羊品种中的等位基因频率

Table 2 Allele frequency of OarFCB 304 locus microsatellite in three sheep populations

等位基因/bp A llele	品种 Breed			等位基因/bp A llele	品种 Breed		
	萨福克 Suffolk	陶赛特 Dorset	德克赛尔 Texel		萨福克 Suffolk	陶赛特 Dorset	德克赛尔 Texel
205	0.0833	0.0435	0.1111	235	0.0000	0.0435	0.1111
207	0.1111	0.0000	0.0000	237	0.0000	0.1304	0.2222
209	0.2778	0.2609	0.3333	241	0.0000	0.2174	0.0000
215	0.1111	0.1739	0.0000	243	0.2778	0.1304	0.1852
217	0.1389	0.0000	0.0370				

2.4 微卫星位点OarFCB 304 和MCM 53 在3个绵羊品种中的遗传指标

由表3可知,OarFCB 304 位点在萨福克、陶赛特和德克塞尔中的PIC 依次为0.8074, 0.8350和0.8075;MCM 53 位点依次为0.7652, 0.7914和0.7467。根据Vaiman 等^[7]确定位点多态性的标准

(PIC> 0.5 为高度多态位点, 0.5> PIC> 0.25 为中度多态位点, PIC< 0.25 为低度多态位点), 3个绵羊品种在2个位点上均高度多态。此外,在遗传连锁分析时,根据Hearne 等^[8]判断分子标记的标准(多态性信息含量大于0.7的微卫星,是较理想的选择标记),本研究的2个位点是较理想的分子标记。

表3 3个绵羊品种在2个微卫星位点上的遗传变异参数

Table 3 Estimators of genetic variability of three sheep breeds at 2 microsatellite loci

位点 Locus	遗传指标 Index of genetics	品种 Breeds			平均值 Mean
		萨福克 Suffolk	陶赛特 Dorset	德克赛尔 Texel	
OarFCB 304	PIC	0.8074	0.8350	0.8075	0.8166
	N _e	5.8667	6.7765	5.8507	6.6143
	H	0.8295	0.8524	0.8291	0.8370
	N _a	9	9	11	9.6667
MCM 53	PIC	0.7652	0.7914	0.7467	0.7669
	N _e	4.8722	5.4536	4.5280	4.9513
	H	0.7948	0.8166	0.7791	0.7980
	N _a	6	7	6	6.3333

多态性信息含量和杂合度均反映了群体的遗传变异大小。OarFCB 304 位点在萨福克、陶赛特和德克塞尔中的H 依次为: 0.8295, 0.8524, 0.8291; MCM 53 位点依次为: 0.7948, 0.8166, 0.7791。H 大说明群体内基因型一致性差,遗传变异大;反之,杂合度小说明群体内遗传变异较小。另外,OarFCB 304 位点的平均多态信息含量、平均有效等位基因数及平均杂合度(分别为0.8166, 6.6143, 0.8370)均高于MCM 53 位点(分别为0.7669, 4.9513, 0.7980),说明微卫星位点OarFCB 304 变异较大,MCM 53 位点变异较小。从不同品种来看,陶赛特羊的各项遗传指标均较高,德克赛尔羊均较低,说明陶赛特羊的遗传变异较大,而德克赛尔羊的遗传变异相对较小。

此外,有效等位基因数也是反映群体遗传变异大小的一个指标。等位基因数在群体中分布越均匀,有效等位基因数越接近检测的等位基因绝对数^[9]。由表3可知,MCM 53 位点上有效等位基因数接近实

际等位基因数,表明该位点各个等位基因在3个绵羊品种中分布较均匀;而OarFCB 304 位点上有效等位基因数与实际等位基因数相对较远,表明OarFCB 304 位点上等位基因分布差异较显著,该位点为品种检测提供的遗传信息量更大,更有利于对群体进行遗传变异分析。有效等位基因数也以另一种方式反映了遗传变异的大小,即有效等位基因数总小于所检测到的等位基因数的绝对数。本研究MCM 53 和OarFCB 304 2个位点在3个绵羊品种中的有效等位基因数均大于4,根据微卫星选择标准(有效等位基因数大于4的位点才能较好的用于群体遗传多样性的评估^[10])可知,这2个位点均可有效地应用于绵羊群体遗传标记的研究。

3 讨论

3.1 OarFCB 304 和MCM 53 微卫星位点在3个绵羊品种中的等位基因及其多态性

本试验选择与繁殖力相关的2个微卫星标记

OarFCB 304^[4]和M CM 53^[5]对萨福克、陶赛特和德克塞尔3个绵羊品种中的遗传多态性进行了检测,结果在3个绵羊品种中均检测到6个及以上的等位基因,与文献[11]的结果稍有不同,但大多数等位基因片段与报道吻合,差异可能由样本含量不同引起。Nei^[12]认为一个位点上发现的等位基因数目与样本数量有关,样本含量越大,所能发现的等位基因数目就越多,反之,样本含量越小,所能发现的等位基因数目就越少。因此,在微卫星标记很少的情况下,应尽可能扩大样本含量以保证结果的可靠性。本试验的样本数在40只以上,基本符合检测条件。

对于一个基因或位点,如果其频繁出现的等位基因频率不超过95%,则该基因或位点是多态的^[13]。泽格·欧特^[14]据此而将多态基因或位点定义为杂合度 $Q > 1$ 的基因或位点。本研究结果发现,微卫星位点OarFCB 304和M CM 53在萨福克、陶赛特和德克塞尔3个品种中存在高度多态性,可作为有效的遗传标记,用于绵羊品种之间遗传多样性和系统发生关系分析。

3.2 OarFCB 304和M CM 53微卫星标记在3个绵羊品种中的遗传多态性分析

微卫星标记遵循孟德尔遗传规律,呈共显性遗传,能够明显地区分纯合子和杂合子,因此在进行群体遗传变异分析时,显得更为重要。杂合度(H)和多态信息含量(PI)均是群体内遗传变异的测度,其值的高低反映了群体内个体的均匀度,若数值高,表明遗传变异大,反之则群体的遗传变异就小。李玉等^[11]利用5个微卫星标记研究了5个绵羊品种的遗传变异情况,结果表明5个绵羊的平均杂合度为 $0.7 \sim 0.8$;多态性信息含量为 $0.65 \sim 0.78$ 。王吉振等^[15]利用4个微卫星标记研究了7个绵羊群体(小尾寒羊、湖羊、乌珠穆沁羊、萨福克羊、陶赛特羊、夏洛来羊、陶赛特公羊 \times 小尾寒羊母羊 F_1 代杂种羊)的遗传多态性,结果发现7个绵羊品种的杂合度为 $0.429 \sim 0.675$,多态性信息含量为 $0.394 \sim 0.640$ 。本研究结果显示,萨福克、陶赛特和德克塞尔3个绵羊品种在M CM 53和OarFCB 304 2个微卫星上的平均多态性信息含量、平均杂合度均高于以上研究结果,也显著高于贾斌等^[16]对新疆8个绵羊品种的研究结果(H为 $0.622 \sim 0.4$)。这一方面与样本含量的大小、选择的微卫星标记极其数目有关,另一方面则表明这3个绵羊品种在长期的风土驯化过程中,适应了各自的生境,造就了丰富的遗传变异,具有较高的

遗传多态性。本研究结果可为今后肉用绵羊品种遗传变异分析提供基本的理论依据。

[参考文献]

- [1] Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers[J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17(16): 6463-6467.
- [2] Hamada H, Petrino M G, Kakunaga, et al A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes[J]. Proc Natl Sci U SA, 1982, 79(21): 6465-6469.
- [3] Takezaki N, Nei M. Genetic distance and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA [J]. Genetics, 1996, 144: 389-399.
- [4] 杨章平,常洪,孙伟,等 7个绵羊微卫星DNA标记在绵(山)羊群体中的多态性检测[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2004, 32(12): 69-74.
- [5] 尚友国,王建民. 羊微卫星标记的研究进展[J]. 草食家畜, 2004(2): 20-22.
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [7] Vaiman D, Mercier D, Moazami G, et al A set of 99 cattle microsatellite characterization system mapping and polymorphism [J]. Mammalian Genome, 1994, 5: 288-297.
- [8] Hearne C M, Ghosh S, Todd J A. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits[J]. Trends in Genetic, 1992, 8: 288-294.
- [9] 曹阳,金海国,姜成国,等 5个微卫星座位在肉牛群体中的遗传变异分析[J]. 吉林农业大学学报, 2003, 25(5): 563-567.
- [10] Baker J S F. A global for determining genetic distances among domestic livestock breeds[C]//Proceeding of the 5th World Congress on Genetic Applied to Livestock Production. Canada: Guelph Ontario, 1994: 50-58.
- [11] 李玉. 肉用绵羊群体遗传结构和变异的微卫星DNA多态性分析[EB/OL]. [2003-09-01][2005-11-14]. <http://ckrd168.cnki.net/Grid20/classical/singledbindex.aspx?D=9>
- [12] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individual[J]. Genetics, 1978, 89: 583-590.
- [13] 刘伟敏,熊远著,蒋思文. 9个猪微卫星标记在资源家系群体中的多态性检测[J]. 华中农业大学学报, 2000, 19(5): 475-477.
- [14] 泽格·欧特. 人类遗传连锁分析[M]. 杨达,译. 北京:北京农业大学出版社, 1995: 15-16.
- [15] 王吉振,储明星,王爱国,等. 用4个微卫星标记分析7个绵羊群体之间的遗传关系[J]. 遗传, 2004, 26(5): 637-643.
- [16] 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(3): 847-854.