

4 个微卫星标记在波尔山羊中的遗传多态性研究

朱广琴,史开志,宋宇轩,程雪妮,王建刚,曹斌云

(西北农林科技大学 动物科技学院,陕西 杨凌 712100)

[摘要] 根据比较基因组学方法,利用绵羊 6 号染色体上与主效多胎基因(Fec^B)紧密连锁的 4 个微卫星标记 OarAE101、OarHH55、BM1329 和 BMS2508,对波尔山羊进行了等位基因频率、多态信息含量、有效等位基因数和杂合度的遗传检测。结果表明,4 个微卫星位点在波尔山羊上多态性丰富;OarAE101 基因座的多态信息含量(PIC)、有效等位基因数(N_e)、平均杂合度(He)分别为 0.847 4、6.553 1 和 0.862 8;OarHH55 基因座分别为 0.767 6、4.302 9 和 0.796 8;BM1329 基因座分别为 0.841 4、6.305 2 和 0.857 6;BMS2508 基因座分别为 0.783 1、4.610 4 和 0.809 6。4 个微卫星位点均为高度多态位点,可用于波尔山羊遗传多态性评估和多胎性状研究。

[关键词] 微卫星标记;波尔山羊;遗传多态性

[中图分类号] S827.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)08-0015-04

Studies on genetic polymorphism at four microsatellite loci in Boer goats

ZHU Guang-qin, SHI Kai-zhi, SONG Yu-xuan, CHEN G Xue-ni,

WANG Jian-gang, CAO Bin-yun

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

Abstract: According to comparative genomics, the four microsatellite loci including OarAE101, OarHH55, BM1329 and BMS2508 that were linked to the fecundity gene Fec^B in the sheep chromosome 6 were selected to obtain molecular markers in goat. The frequency of allele, polymorphism information content (PIC), number of effective alleles (N_e) and heterozygosity (He) of corresponding microsatellite loci in Boer goat were detected. The results indicated that there were genetic polymorphisms at these four microsatellite loci. PIC, N_e , and He at OarAE101 was 0.847 4, 6.553 1, 0.862 8, respectively; PIC, N_e , and He at OarHH55 was 0.767 6, 4.302 9, 0.796 8, respectively; PIC, N_e , He at BM1329 was 0.841 4, 6.305 2, 0.857 6, respectively; the PIC, N_e , He at BMS2508 was 0.783 1, 4.610 4, 0.809 6, respectively in Boer goats. The four microsatellite loci were height polymorphic loci which could be used for genetic polymorphism evaluation and study of the fecundity trait in Boer goats.

Key words: microsatellite markers; boer goat; genetic polymorphism

微卫星又称简单重复序列、短串联重复序列和简单序列长度多态性^[1]。微卫星多态性是减数分裂过程中由于不等交换造成的,其具有保守性,核心序

列为 2~6 bp,重复约 10~20 次,呈共显性遗传^[2]。微卫星标记在基因组中数量多、分布广、多态性丰富,适于自动化、半自动化检测,在育种工作中应用

*收稿日期] 2006-06-15

[基金项目] 国家“863”高技术研究发展计划项目(2002AA242051);西北农林科技大学校青年科研专项(04ZM004)

[作者简介] 朱广琴(1982-),女,河北唐山人,在读硕士,主要从事动物遗传育种与繁殖研究。

[通讯作者] 曹斌云(1955-),男,陕西周至人,教授,博士生导师,主要从事动物生殖生理与调控技术研究。

广泛^[3]。目前,已在猪、马、牛、绵羊、鸡等动物基因组中筛选出大量的微卫星标记^[4-6]。Piper 等^[7]在研究 Booroola 羊时提出其常染色体上存在多胎性主效基因的假设,后被证实并命名为 Fec^B 基因,并且定位于 6 号染色体上^[8]。从 20 世纪 80 年代后期开始,国内外研究人员在各种羊上寻找 Fec^B 基因位点。Montgomer 等^[9]在 12 个绵羊家系中,首先发现 Fec^B 基因与微卫星标记 OarAE101 主 OarHH55 紧密连锁;以后陆续在绵羊中发现更多此类与 Fec^B 基因紧密连锁的微卫星标记^[10],但对山羊的研究还相对较少。波尔山羊系从南非引进的优秀肉用山羊品种,提高其繁殖率对生产优质羔羊肉具有重要意义。本研究选择位于绵羊 6 号染色体上与 Fec^B 紧密连锁的 4 个微卫星标记 OarAE101、OarHH55、BM1329 和 BMS2508,作为探索波尔山羊多胎性基因的微卫星候选标记,利用比较基因组学方法,研究了这 4 个微卫星在波尔山羊群体中的多态性,以期

表 1 4 个微卫星位点的引物序列、登录号和退火温度

Table 1 Primer sequence, accession of GenBank and annealing temperature of four microsatelote loci

微卫星位点 Loci	引物序列 Primer Sequences	登录号 Accession of GenBank	退火温度/ Annealing temperature
OarAE101	F:5'-TTCTTATAGATGCACTCAAAGCTAGG-3 R:5'-TAAGAAA TATA TTTGAAAAA GTGTA TCTCCC-3	L13692	63
OarHH55	F:5'-GTTA TTCCATA TTCTTTCCTCCA TCA TAA GC-3 R:5'-CCACACA GACAACTAAAACCCA GC-3	L13693	64
BMS1329	F:5'-TTGTTA GGCAA GTCCAAA GTC-3 R:5'-AACAAACGCA GCTTCA TCC-3	G18422	62
BMS2508	F:5'-TTTCTGGGTTTACAAAA TGCTC-3 R:5'-TTTCTTAGGGAGTGTGATTC-3	AF394450	54

注:F 为上游引物,R 为下游引物。

Note:F means upper primer;R means lower primer.

1.4 波尔山羊血液 DNA 的 PCR 扩增

PCR 扩增体系总体积为 12 μL ,其中 ddH_2O 6.5 μL ,10 \times Buffer (内含 25 mmol/L Mg^{2+}) 1.5 μL ,DNA 模板 1 μL ,上、下游引物各 (10 pmol/ μL) 0.5 μL ,dNTPs (2.5 mmol/L) 1 μL ,*Taq* 酶 (0.5 U/ μL) 1 μL 。PCR 扩增反应程序为:95 预变性 4 min;94 30 s,54~64 (具体依引物而定)退火 60 s,72 延伸 90 s,35 个循环;72 充分延伸 10 min;4 保存。

1.5 波尔山羊血液 DNA PCR 扩增产物的电泳与染色

PCR 扩增产物中加入 2.5 μL 溴酚兰电泳加样缓冲液,混合离心后取 5 μL 用 20 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增片段长度、纯度与亮度。达到要求者做聚丙烯酰胺凝胶电泳并进行银染。

标记研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

波尔山羊血样 104 头份,采自陕西省麟游县种羊场,ACD 抗凝;全血基因组 DNA 提取试剂盒、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs 和 10 \times Buffer (内含 25 mmol/L Mg^{2+}) 购自北京鼎国生物技术有限公司;上下游引物、10 \times TBE 缓冲液和 PBR322DNA/MS-PI Markers 均为华美生物工程公司产品。

1.2 波尔山羊血液 DNA 提取

用全血基因组 DNA 提取试剂盒提取波尔山羊血样 DNA,提取方法按产品使用说明进行。

1.3 波尔山羊微卫星标记的选择

根据比较基因组的方法,选择与绵羊多胎性状相关的微卫星标记 OarAE101^[9]、OarHH55^[9]、BM1329^[10]和 BMS2508^[10]为波尔山羊遗传多态性分析位点,各微卫星位点上、下游引物序列见表 1。

1.6 结果统计与分析

用聚类分析软件(中国农科院家禽研究所)分析计算每个位点的多态信息含量、有效等位基因数和群体杂合度。

1.6.1 多态信息含量(PIC) PIC 按下式计算

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2 P_i P_j$$

式中: P_i 、 P_j 分别为群体中第 i 、 j 个等位基因频率, n 为等位基因数。

1.6.2 有效等位基因数(Ne) Ne 的计算公式为:

$$Ne = 1 / \sum_{i=1}^n P_i^2$$

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。

1.6.3 平均杂合度(He)的计算 群体内某一位

点的杂合度 (h) 为: $h = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$ 。则平均杂合度 (He) 的计算公式为:

$$He = \sum_{j=1}^r h_j / r。$$

式中: 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, h_j 为第 j 位点的杂合度, r 为位点个数。

2 结果与分析

2.1 波尔山羊血液 DNA 4 个微卫星标记的扩增产物电泳结果

由图 1 ~ 4 可见, OarAE101、OarHH55、BM1329、BMS2508 4 个微卫星位点在波尔山羊中均存在丰富的多态性。

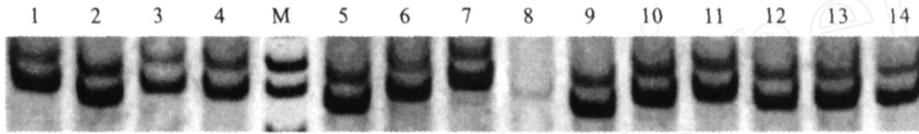


图 1 波尔山羊血液 DNA 在 OarAE101 位点部分扩增产物的电泳结果

1 ~ 14. 不同波尔山羊个体; M. Marker ,从上到下片段长度依次为 123 和 110 bp

Fig. 1 Partial results of electrophoresis of PCR products at microsatellite OarAE101 in Boer goat 1 ~ 14. Different Boer goat ;M. Marker ,fragments size are 123 and 110 bp up to down.

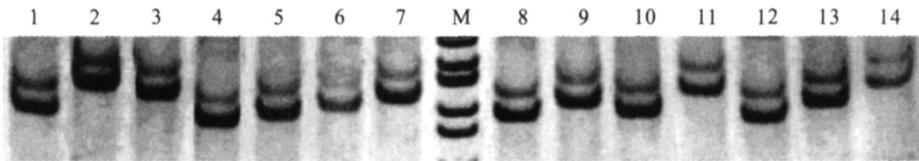


图 2 波尔山羊血液 DNA 在 OarHH55 位点部分扩增产物的电泳结果

1 ~ 14. 不同波尔山羊个体; M. Marker ,从上到下片段长度依次为 180 ,160 ,147 ,123 和 110 bp

Fig. 2 Partial results of electrophoresis of PCR products at microsatellite OarHH55 in Boer goat 1 ~ 14. Different Boer goat ;M. Marker ,fragments size are 180 ,160 ,147 ,123 and 110 bp up to down

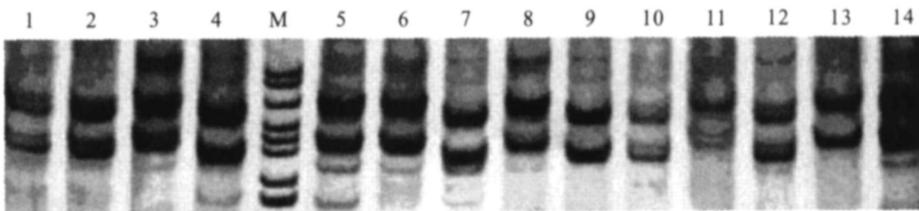


图 3 波尔山羊血液 DNA 在 BM1329 位点部分扩增产物的电泳结果

1 ~ 14. 不同波尔山羊个体; M. Marker ,从上到下片段长度依次为 242 ,238 ,217 ,201 ,190 ,180 ,160 和 147 bp

Fig. 3 Partial results of electrophoresis of PCR products at microsatellite BM1329 in Boer goat 1 ~ 14. Different Boer goat ;M. Marker ,fragments size are 242 ,238 ,217 ,201 ,190 ,180 ,160 and 147 bp up to down

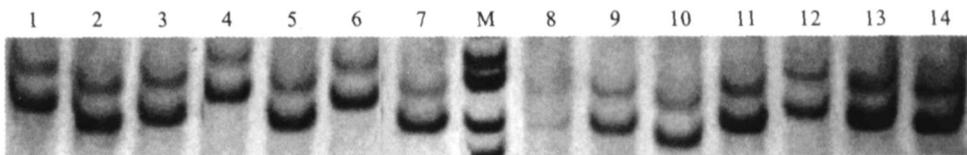


图 4 波尔山羊血液 DNA 在 BMS2508 位点部分扩增产物的电泳结果

1 ~ 14. 不同波尔山羊个体; M. Marker ,从上到下片段长度依次为 180 ,160 ,147 ,123 和 110 bp

Fig. 4 Partial results of electrophoresis of PCR products at microsatellite BMS2508 in Boer goat 1 ~ 14. Different Boer goat ;M. Marker ,fragments size are 160 ,147 ,123 and 110 bp up to down

2.2 波尔山羊在 4 个微卫星位点上的等位基因频率

用凝胶成像分析系统软件(南京大学的捷达凝

胶成像系统)分析计算各微卫星位点在波尔山羊中的等位基因数、等位基因大小及其频率,结果如表 2 所示。

表 2 波尔山羊在 4 个微卫星位点的等位基因片段大小及频率

Table 2 Allele fragment size and frequencies of 4 microsatellite loci in Boer goats

位点 Loci	等位基因/ bp Alleles	频率 Frequency	位点 Loci	等位基因/ bp Alleles	频率 Frequency
OarAE101	106	0.105 0	BM1329	176	0.098 0
	108	0.175 0		180	0.104 0
	111	0.112 0		185	0.206 0
	114	0.205 0		192	0.092 0
	124	0.100 0		210	0.101 0
	126	0.100 0		215	0.203 0
	130	0.115 0		240	0.082 0
	134	0.088 0		248	0.114 0
BMS2508	113	0.040 0	OarHH55	120	0.103 0
	118	0.260 0		124	0.306 0
	122	0.160 0		130	0.201 0
	141	0.050 0		140	0.192 0
	148	0.250 0		150	0.098 0
	153	0.090 0		165	0.110 0
	160	0.150 0			

由表 2 可知,微卫星标记 OarAE101、Oar-HH55、BM1329 和 BMS2508 分别有 8, 6, 8 和 7 个等位基因,变异范围 OarAE101 为 106 ~ 134 bp、OarHH55 为 120 ~ 165 bp、BM1329 为 176 ~ 248 bp、BMS2508 为 113 ~ 160 bp。结果表明,4 个微卫星位点在波尔山羊中存在多态性,可用于波尔山羊遗传多样性评估。

2.3 波尔山羊 4 个微卫星位点的多态信息含量 (PIC)、有效等位基因数 (Ne) 和群体杂合度 (He)

由表 3 可以看出,4 个位点的 PIC、Ne、He 均表现为 OarAE101 > BM1329 > BMS2508 > Oar-HH55。这说明 4 个位点中 OarAE101 的遗传变异度最大,OarHH55 最小。

表 3 4 个微卫星位点在波尔山羊中的多态信息含量 (PIC)、有效等位基因数 (Ne) 和群体杂合度 (He)

Table 3 Polymorphism information content (PIC), number of effective alleles (Ne) and heterozygosity (He) of each microsatellite locus in Boer goats

位点 Loci	PIC	Ne	He
OarAE101	0.847 4	6.553 1	0.862 8
OarHH55	0.767 6	4.302 9	0.796 8
BM1329	0.841 4	6.305 2	0.857 6
BMS2508	0.783 1	4.610 4	0.809 6

3 讨 论

波尔山羊是近年来我国从南非等地大量引进的

世界著名肉用山羊品种,该品种繁殖率高,经常有多胎个体出现,山羊的多胎性对于生产优质羔羊肉具有重要的意义。但繁殖性状属低遗传力性状,通过常规选育改良进展缓慢。分子标记辅助选择为低遗传力性状的选择开辟了一条新的途径,可对家畜进行早期选择而且不受性别限制。有关家畜的多态性状在绵羊上研究较多,已经证明在绵羊 6 号染色体上存在多胎性主效基因 Fec^B ^[8],且与该基因紧密连锁的微卫星也得到了深入研究^[9-11]。考虑到绵羊与山羊的种属关系较近,本研究选用与绵羊多胎性主效基因 Fec^B 紧密连锁的 4 个微卫星位点,研究这 4 个微卫星标记在波尔山羊群体中的多态性。结果显示,4 个微卫星位点在波尔山羊中存在丰富的多态性,其中以 OarAE101 的多态性最为丰富 (PIC = 0.847 4),以 OarHH55 最低 (PIC = 0.767 6),但均远远大于 0.5,属于高度多态位点。此外,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(每个微卫星位点应有 4 个以上等位基因才能较好用于遗传多样性评估)判断,本研究中的 4 个微卫星位点等位基因均多于 4 个,因此 OarAE101、OarHH55、BM1329 和 BMS2508 均可用于波尔山羊遗传多样性评估。由于这些微卫星位点都与多胎性主效基因 Fec^B 紧密连锁,因此本研究为进一步研究这些位点与山羊产羔数的相关性奠定了理论基础。

(下转第 23 页)

会导致非特异性产物增加,且易形成引物二聚体。高浓度的 dNTP 满足了长片段扩增的需要,由于核苷酸能螯合 Mg^{2+} ,因此在试验中适当地提高 Mg^{2+} 浓度是必要的,而且被证明是有效的。PCR 产物的高保真度是制备病毒感染性全长 RNA 的重要条件^[13],对 3' 末端和 5' 末端非编码区的序列分析表明,本试验建立的 RT-PCR 反应具有很好的保真性。

JEV WHe 株全长 cDNA 的获得,为下一步全长 cDNA 克隆的构建、感染性 RNA 的体外制备、致病分子机理的研究及疫苗筛选奠定了基础;本试验建立的长链 RT-PCR 方法,对实现其他 RNA 病毒的长链扩增也有一定的借鉴意义。

[参考文献]

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京:科学出版社, 1997.
- [2] Wu S C, Lian W C, Hsu L C, et al. Japanese encephalitis virus antigenic variants with characteristic differences in neutralization resistance and mouse virulence[J]. Virus Reserch, 1997, 51:173-181.
- [3] 金奇. 医学分子病毒学[M]. 北京:科学出版社, 2001.
- [4] 方雨玲,姜天童,徐涤平,等. 武汉地区猪乙型脑炎病毒的分离鉴定及外源性污染检定[J]. 湖北畜牧兽医, 1995(2):1-4.
- [5] 乔宪凤,熊东海,郑新民,等. 猪乙脑病毒 WHe 株的 prM-E、NS1、NS2A 基因的克隆及序列测定[J]. 中国预防兽医学报, 2003, 25(3):191-194.
- [6] Jean C B, Anne L H. Infectious transcripts and cDNA clone of RNA viruses[J]. Virology, 1994, 198(2):415-426.
- [7] Gritsun T S, Gould E A. Development and analysis of a tick-borne encephalitis virus infectious clone using a novel and rapid strategy[J]. Virol Methods, 1998, 76(1-2):109-120.
- [8] 范宝昌,赵卫,胡志君,等. 应用长链 RT-PCR 法扩增我国登革 2、4 型病毒全长 cDNA[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2002, 22(5):485-488.
- [9] 迪芬巴赫 C W, 德维克斯勒 G S. PCR 技术实验指南[M]. 黄培堂, 俞炜源, 陈添弥, 等译. 北京:科学出版社, 1998.
- [10] Lindberge A M, Andersson A. Purification of full-length enterovirus cDNA by solid phase hybridisation capture facilitates amplification of complete genomes[J]. Virol Methods, 1999, 77:131-137.
- [11] Barnes W M. PCR amplification of up to 35 kb DNA with high fidelity and high yield from bacteriophage templates[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(6):2216-2220.
- [12] Ohler L, Rose E A. Optimization of long distance PCR using a transposon-based model system[J]. PCR Methods Appl, 1992, 2:51-59.
- [13] Zhang F Q, Huang Q S, Ma W Y, et al. Amplification and cloning of the full-length genome of Japanese encephalitis virus by a novel long RT-PCR protocol in a cosmid vector[J]. Journal of Virological Methods, 2001, 96:171-182.

(上接第 18 页)

[参考文献]

- [1] 李宁. 动物遗传学[M]. 北京:中国农业出版社, 2003.
- [2] 张艳,张树义. 微卫星方法简介[J]. 动物科学杂志, 1999, 34(2):42-45.
- [3] 张涛,陈玉林,张恩平. 南江黄羊 4 个微卫星位点遗传多态性研究[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(4):650-651.
- [4] 储明星,程金华,过纬,等. 微卫星标记 OarAE101, BM1309 在五个绵羊品种中的初步研究[J]. 遗传学报, 2002, 29(6):502-506.
- [5] 雷雪芹,陈宏,徐廷生,等. 小尾寒羊产羔性状的微卫星标记研究[J]. 畜牧兽医学报, 2003, 34(6):530-535.
- [6] 施启顺. 畜禽主基因研究进展[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版, 1999, 25(1):81-86.
- [7] Piper L R, Bindon B M. The Booroola Merino and the performance of medium non-Peppin crosses at Armidale [M]. Piper L R, Bindon B M, Nethery R D. The Booroola Merino. Australia: CSIRO, 1982:9-20.
- [8] Lord E A, Lumsden J M, Dodds K G, et al. The linkage map of sheep chromosome 6 compared with orthologous regions in other species[J]. Mammalian Genome, 1996, 7:373-376.
- [9] Montgomery G W, Crawford A M, Penty J M, et al. The ovine Booroola fecundity gene (Fec^B) is linked to markers from a region of human chromosome 4q[J]. Nature Genetics, 1993, 4:410-414.
- [10] 储明星. Booroola 羊 Fec^B 基因图谱研究进展[J]. 中国草食动物, 2001, 3(2):43-46.
- [11] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. Am J Hum Genet, 1980, 32:314-331.