

# 猪 PAC 克隆的微卫星 DNA 分离研究

高 军<sup>1</sup>, 任 军<sup>1</sup>, 陈克飞<sup>1</sup>, 黄路生<sup>1</sup>, Bertram Brenig<sup>2</sup>

(1. 江西农业大学江西省动物生物技术重点实验室, 南昌 330045;

2. 德国哥廷根大学兽医研究所, 哥廷根 37073)

**摘要:**利用(CA)<sub>8</sub>核心序列,设计锚定引物,采用直接测序法,从单个猪 PAC 克隆中分离到一个新微卫星 DNA。根据该微卫星 DNA 的侧翼序列,设计了专一引物,在 8 个猪种 40 个个体中检测到 3 个等位基因,片段长度分别为 305 bp、307 bp 和 309 bp。3 种等位基因纯合子个体的 PCR 产物序列分析表明,这 3 种等位基因分别有 12、13 和 14 次 CA 双核苷酸重复。

**关键词:**猪; PAC 克隆; 微卫星 DNA

中图分类号: Q75

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2003)06-0660-03

## Studies of Microsatellite Isolation from Porcine PAC Clone

GAO Jun<sup>1</sup>, REN Jun<sup>1</sup>, CHEN Ke-Fei<sup>1</sup>, HUANG Lu-Sheng<sup>1</sup>, Bertram BRENIG<sup>2</sup>

(1. Jiangxi Provincial Key Laboratory for Animal Biotechnology, JAU, Nanchang, 330045, China;

2. Institute of Veterinary Medicine, University of Goettingen, Goettingen, 37073, Germany)

**Abstract:** A novel microsatellite DNA was isolated from a single porcine PAC clone by sequencing the PAC clone directly with (CA)<sub>n</sub> repeat motif anchored primer. The specific primer pairs flanking the (CA)<sub>n</sub> repeat region were used to amplify the genomic DNA of 40 individuals from 8 pig breeds, which detected three alleles with the fragment length of 305 bp, 307 bp and 309 bp. The PCR product sequencing results of homozygous animals representing three alleles revealed that those three alleles contained 12, 13 and 14 CA dinucleotide repeats respectively.

**Key words:** pig; PAC clone; microsatellite DNA

微卫星 DNA (microsatellite DNA), 又称简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR) 或短串联重复序列 (short tandem repeat, STR), 是一种以 2~6 个短核苷酸为基本单位的高度重复序列, 广泛存在于真核生物基因组中<sup>[1]</sup>。以微卫星 DNA 两侧特异性序列设计专一引物, 通过 PCR 技术可以检测不同个体间因核心序列的重复次数不同而产生 DNA 多态性。

微卫星 DNA 丰度高, 分布广, 多态信息含量丰富, 稳定性好, 且分析技术易于自动化, 为家养动物遗传分析提供了新的途径和手段, 在构建遗传连锁图谱、定位数量性状基因座 (QTL)、评估遗传多样

性、预测杂种优势、亲缘关系鉴定等方面得到广泛应用。不过, 传统的微卫星分离法一般须进行基因文库构建、分子杂交、筛选阳性克隆和 DNA 序列分析等, 较繁琐费时, 成本高。本文尝试利用 (CA)<sub>8</sub> 双核苷酸核心重复序列设计锚定引物, 采用直接测序法, 从猪 PAC (P1-derived artificial chromosome) 克隆中分离新微卫星 DNA。

## 1 材料与 方法

### 1.1 实验材料

单个猪 PAC 克隆 (238E2) 选自德国哥廷根大

收稿日期: 2002-10-08; 修回日期: 2003-05-13

基金项目: 国家自然科学基金“江西地方猪 16 个候选基因分子变异与种质资源评估研究”资助 (30060058)

作者简介: 高 军 (1969-), 女, 副教授, 动物遗传学专业。Tel: 0791-3805967

通讯作者: 任 军 (1974-), 男, 博士, 讲师, 动物分子遗传学专业。E-mail: renjunxau@hotmail.com

学兽医研究所构建的猪 PAC 文库<sup>[2]</sup>;长白猪、大白猪、皮特兰猪、汉普夏猪、野猪、哥廷根小型猪、Bunte Bentheimer 猪和 Schwabisch-Hallisches 猪等 8 个猪品种 40 个个体(5 头/品种)用于微卫星 DNA 多态性的检测。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 PAC 克隆 DNA 的提取

利用 QIAGEN Plasmid Purification Kit 试剂盒提取单个 PAC 克隆的 DNA。

### 1.2.2 微卫星 DNA 的序列测定

在(CA)<sub>8</sub> 重复序列的末端锚定单个核苷酸,设计 (CA)<sub>8</sub>A、(CA)<sub>8</sub>G、(CA)<sub>8</sub>T 3 种锚定引物,采用 ABI PRISM<sup>R</sup> DNA 测序试剂盒(DNA Sequencing Kit)对单个 PAC 克隆 DNA 直接测序;根据序列测定结果,利用 OSP 软件设计反向引物,对 PAC 克隆进行反向测序;将含有(CA)<sub>n</sub> 微卫星 DNA 的序列在 GeneBank 中进行 BLAST Search(<http://www.ncbi.nih.gov>)<sup>[3]</sup>,经验证为新微卫星 DNA 标记后,根据微卫星 DNA 的侧翼特异序列,利用 OSP 软件设计一对专一引物,其中单条引物经荧光标记后,用于微卫星 DNA 多态性的检测。

### 1.2.3 微卫星 DNA 的扩增与检测

利用 puReTaq Ready-To-Go PCR Beads(Amersham Bioscience),通过退火温度为 50℃~61℃ 的梯度 PCR 反应,优化专一引物的 PCR 反应条件;利用经优化的 PCR 反应条件,扩增 8 个猪种 40 个个体的基因组 DNA,PCR 反应程序为:92℃ 预变性 2min;92℃ 30s,59℃ 30s,72℃ 30s,34 个循环;92℃ 30s,59℃ 30s,72℃ 10min。PCR 反应在 Robertcy-cler PCR 仪(Stratagene)上进行。PCR 产物在 ABI 3100 遗传分析仪(Applied Biosystem)上经凝胶电泳分离后判定基因型,检测微卫星基因座的等位基因数(多态性)。

### 1.2.4 PCR 产物回收、克隆与测序

从 1.5% 琼脂糖凝胶中回收不同基因型纯合子个体的 PCR 产物,将其克隆至 pGEM-T 载体(Promega);采用 QIAprep Spin Miniprep Kit 试剂盒(QIAGEN)提取重组质粒 DNA,利用 M13 正向通用引物(5'-TGTAACGACGGCCAGT-3')和 ABI PRISM<sup>R</sup> DNA 测序试剂盒(BigDay<sup>TM</sup> Terminator DNA Sequencing Kit)测定 pGEM-T 载体中的插入 PCR 产物的序列,验证微卫星 DNA 的多态

性。所有的测序反应均在 ABI 3100 遗传分析仪(Applied Biosystem)上进行。

## 2 结 果

### 2.1 微卫星 DNA 的分离结果

(CA)<sub>8</sub>A、(CA)<sub>8</sub>G、(CA)<sub>8</sub>T 三种锚定引物中,(CA)<sub>8</sub>G 锚定引物获得了较好的测序结果,据此序列设计了反向引物(5' GAAGGGTAGGTTA-AAGG 3')对猪 PAC 克隆进行反向测序,测序结果中含有(CA)<sub>n</sub> 双核苷酸重复序列。BLAST Search 的结果显示,该序列与已知的猪基因组 DNA 序列的同源性极低(score 小于 40),是一新的猪微卫星 DNA 序列。根据(CA)<sub>n</sub> 两侧的特异序列,设计了一对专一引物,引物序列为:5' CAGGGGGTTAAAGAT-CAG 3'/ 5' GGGGCACATAAAAGGAAG 3'。梯度 PCR 反应的结果显示,退火温度为 58℃~59℃ 时,扩增效果最佳。

### 2.2 微卫星 DNA 的多态性检测结果

利用该微卫星 DNA 的专一引物,在 8 个猪种 40 个个体中检测到片段长度分别为 305bp、307bp 和 309bp 的 3 个等位基因,检测结果如表 1 所示。PCR 产物的序列测定结果显示,这 3 种等位基因分别含有 12、13 和 14 个 CA 双核苷酸重复序列。

## 3 讨 论

采用图位克隆(positional clone)等策略,分离、克隆和鉴定影响重要经济性状的功能基因是国际动物基因组计划的主要目标之一,这首先需要利用微卫星 DNA 等分子标记构建高精度的遗传连锁图谱。从 BAC 或 PAC 克隆中分离微卫星 DNA 标记,既可进一步增加遗传连锁图谱的标记密度,缩小图距间隔,又可作为一种序列标签位点(STS),为 BAC 或 PAC 克隆重叠群(contig)的构建提供信息。传统的微卫星分离须构建小片段基因组文库、利用重复序列探针杂交筛选阳性克隆及序列分析,其他微卫星分离法,诸如随机扩增微卫星 DNA 多态性(random amplified microsatellite DNA polymorphisms,RAMPs)、染色体显微切割法、采用引物延伸法或选择性杂交法构建微卫星 DNA 富集基因组文库法(microsatellite enriched library)、利用 AFLP 技术快速分离微卫星法等各有其优势,不过,这些方法都涉及基因组文库构建或探针杂交,较费

时繁琐,成本高<sup>[4]</sup>。采用锚定引物直接测序法从 PAC 或 BAC 克隆中分离微卫星,省去了文库构建或探针杂交等步骤,相对更为快捷、简便、经济。

微卫星 DNA 的核心序列中,以(CA)<sub>n</sub> 双碱基核苷酸重复最为常见,猪基因组中估计共有 6.5~10 万个,平均约 30~50kb 便分布一个<sup>[5]</sup>。猪 PAC 或 BAC 克隆的插入片段一般为 100~200kb,因而利用(CA)<sub>n</sub> 核心序列设计锚定引物,从猪 PAC 或 BAC 克隆中分离出新微卫星 DNA 的概率很大。除

(CA)<sub>n</sub> 核心序列外,(AG)<sub>n</sub>、(AGC)<sub>n</sub>、(AAAT)<sub>n</sub> 等微卫星核心序列在猪基因组中的出现频率较高,也可用于设计锚定引物分离微卫星 DNA。

本研究中用于新分离微卫星 DNA 多态性检测的猪种数及个体数有限,仅涉及 8 个猪种 40 个个体。通过检测更多的遗传背景差异悬殊的猪种和个体在此微卫星基因座上的遗传变异,可望发现新的等位基因,进一步丰富对此微卫星基因座遗传特性的认识。

表 1 新分离微卫星 DNA 的多态性检测结果

Table 1 Polymorphisms of the novel microsatellite DNA

品种 Breed	个体 No.	扩增片段 Amplified fragment	CA 重复次数 Number of CA repeat	品种 Breed	个体 No.	扩增片段 Amplified fragment	CA 重复次数 Number of CA repeat
野猪 Wild pig	1	305bp/305bp	12	皮特兰 Pietrain	1	305bp/307bp	12/13
	2	305bp/305bp	12		2	305bp/305bp	12
	3	305bp/305bp	12		3	307bp/307bp	13
	4	305bp/307bp	12/13		4	305bp/305bp	12
	5	305bp/305bp	12		5	307bp/307bp	13
大白猪 Large White	1	305bp/305bp	12	哥廷根 小型猪 Goettingen Minipig	1	305bp/305bp	12
	2	305bp/307bp	12/13		2	305bp/305bp	12
	3	305bp/305bp	12		3	305bp/305bp	12
	4	305bp/307bp	12/13		4	305bp/305bp	12
	5	305bp/305bp	12		5	305bp/305bp	12
长白猪 Landrace	1	305bp/307bp	12/13	Schwabisch -Hallisches	1	305bp/305bp	12
	2	305bp/305bp	12		2	309bp/309bp	14
	3	305bp/305bp	12		3	305bp/309bp	12/14
	4	305bp/307bp	12/13		4	305bp/305bp	12
	5	305bp/305bp	12		5	305bp/305bp	12
汉普夏 Hampshire	1	307bp/307bp	13	Bunte Bentheimer	1	307bp/307bp	13
	2	307bp/307bp	13		2	305bp/305bp	12
	3	307bp/307bp	13		3	305bp/305bp	12
	4	307bp/307bp	13		4	305bp/307bp	12/13
	5	307bp/307bp	13		5	305bp/305bp	12

## 参考文献 (References):

- [1] Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers[J]. Nucl Acid Res, 1989, 12: 427~438.
- [2] Al-Bayati H K, Duscher S, Kollers S, Rettenberger G, Fries R, Brenig B. Construction and characterization of a porcine P1-derived artificial chromosome (PAC) library covering 3.2 genome equivalents and cytogenetical assignment of six type I and type II loci[J]. Mammalian Genome, 1999, 10(6): 569~572.
- [3] Altschul S F, Madden T L, Schaffer A A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25: 3389~3402.
- [4] Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation: a review[J]. Molecular Ecology, 2002, 11: 1~16.
- [5] Wilke K, Jung M, Chen Y Z, Geldermann H. Porcine (GT)<sub>n</sub> sequences: structure and association with dispersed and tandem repeats[J]. Genomics, 1994, 21: 63~70.