

利用微卫星标记对蒙古马和纯血马遗传多样性的研究

李金莲, 芒 来*, 石有斐

(内蒙古农业大学动物科学与医学学院, 呼和浩特 010018)

摘 要: 通过 13 个微卫星座位对蒙古马和纯血马两大品种的 60 匹马进行了遗传检测。用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 PCR 扩增产物, 并用银染法显色。通过软件计算了各微卫星座位的等位基因频率、有效等位基因数 (Ne)、多态信息含量 (PIC) 和杂合度 (H)。结果 13 个座位中 UCDEQ440 变异最大, TKY16 变异最小; 纯血马的 Ne、PIC 和 H 的平均值均稍高于蒙古马; 总群体的平均遗传分化系数是 0.042 9。这些研究将为今后我国培育优良品种马提供思路。

关键词: 蒙古马; 纯血马; 微卫星; 遗传多样性

中图分类号: S821.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)01-0006-04

微卫星 (Microsatellite) 是一类散在分布于整个基因组中的短串联重复序列, 又称简单重复序列 (Simple Sequence Repeats, SSRs), 其核心序列是 2~6bp 的短核苷酸重复 10~20 次左右, 并与两侧的侧翼序列构成了微卫星座位。微卫星具有数量多, 分布广, 多态性丰富, 呈共显性遗传以及检测快速方便等优点。微卫星技术已在许多家畜上应用, 但在马上应用较少, 特别是在蒙古马和纯血马的遗传多样性研究方面, 国内外还未见报道。场地速度赛马业目前在我国还处于起步阶段。蒙古马是我国优良的地方品种, 是我国独特的马遗传资源, 具有抗病性强、耐力好和易合群等特点; 纯血马是引进品种, 具有体格高大、健壮和速度快等优点。因此, 本文旨在通过 13 个微卫星座位来分析这 2 个品种的遗传多样性, 为今后我国场地速度赛马业的发展提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样本的采集和基因组 DNA 的提取

采集了有完整系谱资料的 2 个品种马的血液样品: 30 匹蒙古马血样 (采自内蒙古自治区锡盟东乌

旗牧民马场), 30 匹纯血马血样 (采自内蒙古自治区赛马场马术队), 均用 ACD 抗凝, -70℃ 保存。

基因组 DNA 的提取参考《分子克隆实验指南》^[1]。

1.2 PCR 引物的选择及 PCR 反应条件的确定

根据 Barker^[2] 微卫星选择标准, 及相关文献所提供马的微卫星引物序列^[3~7], 由北京赛百盛公司合成的 13 对微卫星引物序列见表 1。

Ex Taq DNA 聚合酶购自大连宝生物公司。PCR 反应总体系为 12 μL, 其中包括 *Ex Taq* DNA 聚合酶 6 μL、混合引物 (10 pmol/μL) 1~1.2 μL、DNA 模板 1 μL (约 60 ng)、加灭菌水至 12 μL。PCR 反应程序为: 95℃ 预变性 5 min, 34 个循环 (94℃ 变性 30 s, 50~60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s), 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。引物不同 PCR 反应条件略有差别。

1.3 凝胶电泳及微卫星基因型判定

用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 PCR 扩增产物, 并用硝酸银染色法显色。以 pUC19 DNA / *MspI* (*HpaII*) Marker 为分子量标记, 采用数码凝胶成像系统的 UVIPhotoMW 软件判定各微卫星座位的基因型。

1.4 统计指标

计算微卫星座位的等位基因频率 (Allele frequency)、多态信息含量 (Polymorphism information contents, PIC)、有效等位基因数 (Effective number of alleles, Ne)、杂合度 (Heterozygosity, H) 和遗传分化系数 (Coefficient of gene differentiation, G_{ST})。

收稿日期: 2003-11-05

基金项目: 国家教育部科学技术研究重点项目 (01018)

作者简介: 李金莲 (1979), 女, 蒙古族, 黑龙江龙江县人, 博士生, 主要从事分子遗传学与马科学研究。E-mail: lijilian1979@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 芒 来 (1963), 男, 蒙古族, 内蒙古自治区锡盟镶黄旗人, 农学博士, 兽医学博士, 教授, 博导, 研究方向: 分子数量遗传学与马科学。Tel: 0471-4308299, E-mail: mongolhu@hotmail.com

表 1 13 对微卫星引物序列
Table 1 Primer sequences of 13 microsatellite DNA

微卫星座位 Microsatellite loci	正向引物(5' → 3') Forward primer sequence	反向引物(5' → 3') Reverse primer sequence
TKY16	GGTTATGGTTTGGTATCTGTC	AAAACAATGGCTTCCTGGTCA
TKY21	AGGTGAACCCAGAGAGTCC	AGTGAGGCCTCGGTTGGGAG
LEX064	ACCCTTCCGCAGACAA	CACATCAGAGCCCATCTTCTC
HTG20	CTGGTTTACCTTCCTACAG	CCAATGGTTCTCTGAGAAG
HTG21	ATTACTTCCTCCAGGTATCTCAG	AGGCAGGGCTGGGAGACGT
HTG28	AATCAACTAATATTAGGCCTCCT	GAATACAGTTCTAGGGGCGT
UM002	AGTGGCAGCATAAAGATA	TTTTGGTCCTTGTAGGAG
UM012	GGAATTTAGACTATGACTGAGG	GCCACCTGAACACTTTTAC
UM016	TTCTCCACTATCTCTCCCTC	GCAAAAATGCACAGCCTC
UM018	AGATAGGGAAAGAACGAAG	GGTTAGTGTTCGGATTAGG
UCDEQ440	TGTTCGGACAGTGTGGAT	GCAGGGTATGTGTGTGCT
UCDEQ465	AACCAGTCCCTACATAGAAC	CTCACAACCAAGCATACA
UCDEQ482	CACAGCCCTGACCACTGA	CCAAAACAGCCCTGGACT

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 提取

从冻血中提取的基因组 DNA 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, EB 染色后在紫外灯下观察, 将其纯度达到 PCR 扩增要求的基因组 DNA 置 -20 °C 保存备用。

2.2 微卫星 DNA 的 PCR 扩增

微卫星座位 UM002 的电泳结果见图 1。

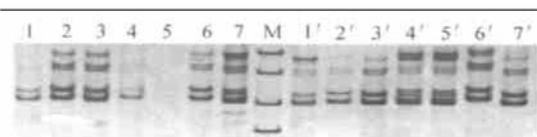


图 1 UM002 座位在蒙古马和纯血马中的部分电泳结果

Fig. 1 The part results of PCR of UM002 loci in Mongolian horses and Thoroughbred horses
1~7 为蒙古马样品; 1'~7' 为纯血马样品
1~7. Mongolia horses samples;
1'~7'. Thoroughbred horses samples;
M. pUC19 DNA / MspI (HpaII) Marker

2.3 微卫星 DNA 的多态性

2.3.1 蒙古马和纯血马 2 个品种内的遗传变异 2 个品种中的不同个体在每个座位上所检测到的等位基因及根据 GENGPOP 软件所得出的等位基因频

率以及 PIC 和 GDA 软件为基础, 得到群体内的 N_e 、PIC 和 H , 结果见表 2。就各座位来说, UCDEQ440 的 N_e 、PIC 和 H 这 3 项数据在 2 个品种马中都最高, 而 TKY16 的 3 项数据却最低, 说明在 13 个座位中 UCDEQ440 变异最大, TKY16 变异最小; 从品种来看, 纯血马的 N_e 、PIC 和 H 平均值均稍高于蒙古马, 由此说明蒙古马相对纯血马来说更纯一些。

2.3.2 蒙古马和纯血马 2 个品种间的遗传变异由 DISPAN 软件计算所得到的总群体杂合度 (Total heterozygosity, H_T)、亚群体杂合度 (Average heterozygosity within each population, H_s) 和遗传分化系数 (Coefficient of gene differentiation, G_{ST}) 值见表 3。这 3 项指标是反映群体间遗传变异的测度^[8]。总群体杂合度可分为亚群体杂合度和亚群体间杂合度, 从表 3 中可以看出 UM012 的 H_T (0.841 0) 值最大, 说明所研究的蒙古马和纯血马这 2 个品种作为一个群体在该座位的杂合度最大。13 个座位的 H_T 值有 2 个大于 0.8, 9 个大于 0.7, 12 个大于 0.6, 只有 1 个稍小于 0.6。说明 2 个马品种遗传多样性比较丰富。UM016 的 G_{ST} (0.107 6) 的估测值最大, 该值表明 UM016 在 2 个不同品种的基因分化占总群体杂合度的 10.76%, 也就是说 2 个不同品种间在该座位的基因变异为 10.76%。总群体的平均 G_{ST} 值是 4.29%, 说明品种间变异占总群体变异的 4.29%。

表 2 13 个微卫星座位在 2 个品种中的有效等位基因数(Ne)、多态信息含量(PIC)、杂合度(H)

Table 2 The numbers of effective alleles, polymorphism information contents and heterozygosity of 13 microsatellite

loci in two breeds									
座位	指标	蒙古马	纯血马	平均值	座位	指标	蒙古马	纯血马	平均值
Loci	Index	Mongolia	Thoroughbred	Mean	Loci	Index	Mongolia	Thoroughbred	Mean
TKY16	Ne	1.587 9	1.764 7	1.676 3	TKY21	Ne	1.578 9	1.875 0	1.727 0
	PIC	0.589 1	0.585 4	0.587 2		PIC	0.525 8	0.737 0	0.631 4
	H	0.366 7	0.433 3	0.400 0		H	0.366 7	0.466 7	0.416 7
LEX064	Ne	1.875 0	1.764 7	1.819 9	HTG20	Ne	2.307 7	2.307 7	2.307 7
	PIC	0.756 1	0.606 1	0.681 1		PIC	0.647 7	0.806 4	0.727 1
	H	0.466 6	0.433 3	0.449 9		H	0.433 3	0.433 3	0.433 3
HTG21	Ne	2.307 7	2.307 7	2.307 7	HTG28	Ne	1.764 7	2.500 0	2.132 3
	PIC	0.635 0	0.806 4	0.720 7		PIC	0.545 2	0.525 8	0.535 5
	H	0.566 7	0.566 7	0.566 7		H	0.433 3	0.600 0	0.516 7
UM002	Ne	1.764 7	2.727 3	2.246 0	UM012	Ne	2.142 9	1.875 0	2.009 0
	PIC	0.738 2	0.589 6	0.663 9		PIC	0.620 9	0.764 6	0.692 8
	H	0.433 3	0.633 3	0.533 3		H	0.533 3	0.466 7	0.500 0
UM016	Ne	1.875 0	1.875 0	1.875 0	UM018	Ne	2.307 7	2.000 0	2.153 9
	PIC	0.666 8	0.590 3	0.628 6		PIC	0.737 2	0.709 1	0.723 1
	H	0.466 7	0.466 7	0.466 7		H	0.566 7	0.500 0	0.533 4
UCDEQ440	Ne	3.000 0	3.000 0	3.000 0	UCDEQ465	Ne	2.307 7	2.500 0	2.403 9
	PIC	0.637 1	0.595 6	0.616 4		PIC	0.646 8	0.666 9	0.656 9
	H	0.666 7	0.666 7	0.666 7		H	0.566 7	0.600 0	0.583 3
UCDEQ482	Ne	2.000 0	2.727 3	2.363 6	Mean	Ne	2.020 6	2.248 0	2.134 3
	PIC	0.652 9	0.726 2	0.689 6		PIC	0.646 1	0.662 4	0.654 2
	H	0.500 0	0.633 3	0.566 7		H	0.482 1	0.548 7	0.515 4

表 3 13 个微卫星座位在 2 个品种中的总群体杂合度(H_T)、亚群体杂合度(H_S)和遗传分化系数(G_{ST})Table 3 Total heterozygosity(H_T), average heterozygosity within each population(H_S) and coefficient of gene differentiation (G_{ST}) of 13 microsatellite loci in two breeds

座位	总群体杂合度	亚群体杂合度	遗传分化系数
Loci	H_T	H_S	G_{ST}
TKY16	0.665 6	0.643 9	0.032 5
TKY21	0.701 0	0.667 8	0.047 3
LEX064	0.745 4	0.728 4	0.022 9
HTG20	0.791 5	0.719 0	0.091 7
HTG21	0.775 0	0.754 9	0.026 0
HTG28	0.591 6	0.587 3	0.007 3
UM002	0.656 9	0.654 1	0.004 3
UM012	0.841 0	0.780 1	0.072 4
UM016	0.744 2	0.664 1	0.107 6
UM018	0.801 4	0.749 3	0.065 0
UCDEQ440	0.667 3	0.664 9	0.003 6
UCDEQ465	0.715 4	0.701 3	0.019 7
UCDEQ482	0.749 8	0.725 9	0.031 9
Mean	0.726 6	0.695 5	0.042 9

3 讨论

3.1 关于 2 个品种内的遗传变异

多态信息含量(PIC)和杂合度(H)都是群体内

遗传变异的测度。PIC和H数值越大,说明群体内基因一致性越差,变异性也越大,选择的潜力也大;反之,PIC和H数值越小,说明群体变异越小,选择的潜力也小。从表2可以看出,纯血马的PIC和H的平均值都稍高于蒙古马,这说明蒙古马相对纯血马来更纯一些。这可以从2个品种的育成历史角度来解释,本试验的蒙古马来自内蒙古的东乌旗草原上,由于蒙古高原自古就是世界上马匹最早驯化地之一,2001年统计报道内蒙古约有纯蒙古马(未掺入外血)108万匹^[9]因此本试验中所选的蒙古马是纯合度很高,没有导入外血,自群繁育的地方品种;本试验所研究的纯血马产地多数来自英国,一部分来自法国、美国等一些发达国家。纯血马原产地是英国,其他国家的纯血马都是以英纯血马为基础培育而成,经过几个世纪的不断选育,纯血马也几乎成为纯合度较高的纯血马。

3.2 关于 2 个品种间的遗传变异

品种/群体间遗传分化系数(G_{ST})是亚群之间基因分化相对量的一个较好的量度。从遗传分化系数(G_{ST})值来看,总群体的平均 G_{ST} 值是4.29%,说明这2个马品种间的变异占总群体变异的4.29%,即这2个群体之间的基因交流较少,互相没有大的遗传漂

变。这也可从所选样品的来源得出此结论。因为本试验所选的纯血马来自内蒙古马术队,是多次参加大型比赛的赛马。而蒙古马则是来自封闭群体,主要役用。2个群体进行基因交流的可能性会很小,并且现在的生活环境距离很近,并有相似之处,所以4.29%的群体变异很有可能主要是由环境所致。

群体间遗传距离是遗传变异的尺度。由于本试验只涉及2个品种,无法画出聚类图,但通过软件得出2个品种的共祖(coancestry)距离为0.0623,共祖距离适用于群体由于漂移而引起的分歧^[8],所以本试验所得出的共祖距离值也可以说明2个品种间的遗传变异较小。

综上所述,利用13个微卫星座位分析蒙古马和纯血马的遗传多样性为今后我国赛马业的发展提供了理论依据。蒙古马在耐力和抗病性方面优于竞赛专用的纯血马,因此可以通过转基因等技术来弥补纯血马的不足,一方面可以使蒙古马的优点得以充分利用,另一方面为培育我国的纯血马品种提供思路。

参考文献:

- [1] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T, 著. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫, 侯云德, 等译. 第2版. 北京: 科学出版社, 1992. 463~481.
- [2] Barker J S F. A global protocol for determining genetic distance among domestic livestock breeds [J]. Proc. 5th WCGALP, 1994. 21: 501~508.
- [3] Kakoi H, Tozaki T, Hirota K, et al. Genetic polymorphisms of equine microsatellite loci: TKY16, TKY19 and TKY21[J]. Animal Genetics, 1999, 30: 68~69.
- [4] Coogle L, Bailey E. Equine dinucleotide repeat loci LEX064 through LEX070 [J]. Animal Genetics, 1999, 30: 71~72.
- [5] Lindgren G, Persson H, Ellegren H. Five equine dinucleotide microsatellite loci HTG17, HTG20, HTG21, HTG28 and HTG31 [J]. Animal Genetics, 1999, 30: 70~71.
- [6] Meyer A H, Valberg S J, Hillers K R, et al. Sixteen new polymorphic equine microsatellites [J]. Animal Genetics, 1997, 28: 69~70.
- [7] Eggleston-Stott M L, Del Valle A, Bautista M, et al. Twelve equine dinucleotide repeats at microsatellite loci UCDEQ304, UCDEQ380, UCDEQ387, UCDEQ411, UCDEQ439, UCDEQ440, UCDEQ455, UCDEQ457, UCDEQ464, UCDEQ465, UCDEQ482 and UCDEQ497 [J]. Animal Genetics, 1999, 30: 69~70.
- [8] 侯冠斌. 微卫星 DNA 技术评估绵羊品种的遗传多样性 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士论文, 2003.
- [9] 芒来, 孟青龙, 著. 马业科学 [M]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2003. 3~4.
- [10] 吴伟, 王栋, 曹红鹤. 微卫星 DNA 标记对5个中外黄牛品种/群体遗传结构的研究 [J]. 吉林农大学学报, 2000, 22(4): 5~10.
- [11] 储明星, 王吉振, 王爱国, 等. 小尾寒羊5个微卫星基因座遗传多态性研究 [J]. 遗传学报, 2002, 29(6): 502~506.

Evaluation of Genetic Diversity of Mongolian Horse and Thoroughbred Horse Using Microsatellite Markers

LI Jin-lian, MANG Lai*, SHI You-fei

(College of Animal Science and Veterinary, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China)

Abstract: 13 microsatellite loci were used to detect 60 horses of two horse breeds, namely mongolian and thoroughbred in this experiment. The PCR amplified products of microsatellite were detected by 8 percent non-denatured polyacrylamide gel electrophoresis and showing in silver staining protocol. Allele frequency, numbers of effective alleles (N_e), polymorphism information contents (PIC) and heterozygosity (H) for every microsatellite locus were calculated by softwares. The results were the greatest variation in UCDEQ440 and the lowest in TKY16 in 13 microsatellite loci; Mean numbers of N_e , PIC and H in thoroughbred horses were all higher a bit than in mongolian; Mean coefficient of gene differentiation (G_{ST}) of the whole breeds was 0.0429. These results could provide references in the future that breeding new excellent breeds in our country.

Key words: mongolian horse; thoroughbred horse; microsatellite; evaluation of genetic diversity

* Corresponding author