

利用多重荧光 PCR 分析秦川牛遗传多样性

王均辉¹, 咎林森^{1*}, 张桂香², 王志刚², 齐国强¹, 韩旭^{2†}

(1. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西杨凌 712100; 2. 全国畜牧总站畜禽牧草种质资源保存利用中心, 北京 100094)

摘要 [目的]分析秦川牛的遗传多样性, 加强对该品种资源的保护。[方法]利用 15 个微卫星座位, 运用多重荧光 PCR 技术对 59 头秦川牛个体的基因组 DNA 进行扩增, 通过等位基因频率、多态信息含量、基因杂合度和有效等位基因数分析秦川牛品种的遗传多样性。[结果]结果表明: 在 15 个座位的等位基因数为 5~18 个, 平均等位基因数为 10.3 个; 各座位上的杂合度都较高, 平均杂合度为 0.795 9; 平均有效等位基因数为 5.306 6; 15 个座位中多态信息含量为 0.644 1~0.864 9, 均为高度多态。[结论]通过荧光标记可用于牛品种遗传多样性的分析, 并可为进一步 QTL 定位和标记辅助选择研究提供参考。

关键词 多重荧光 PCR; 秦川牛; 遗传多样性

中图分类号 S823 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)20-06051-02

Analysis of Genetic Diversity of Qinchuan Cattle by Multiplex Fluorescent PCR

WANG Jun-hui et al (College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract [Objective] The aim was to study the genetic diversity of Qinchuan cattle in order to strengthen its protection. [Method] The genetic diversity of 15 microsatellite loci was analyzed using multiplex fluorescent PCR in 59 Qinchuan cattle. And allele frequency, polymorphism information content (PIC), heterozygosity (H) and number of effective alleles (Ne) were calculated. [Result] The results showed that the allele numbers of the overall 15 microsatellite loci of Qinchuan cattle were from 5 to 18 with average allele of 10.3. The heterozygosity of all microsatellite loci were from 0.698 6 to 0.876 3 and the mean heterozygosity were 0.795 9. The number of effective alleles was from 3.317 8 to 8.084 5, with average effective allele of 5.306 6. The PIC of 15 microsatellite loci were highly polymorphic from 0.644 1 to 0.864 9. [Conclusion] Microsatellite markers were effective markers for analysis of genetic diversity and phylogenesis relationship among cattle breeds. The results were reference to study QTL and marker assistant selection.

Key words Multiplex fluorescent PCR; Qinchuan cattle; Genetic diversity

秦川牛是我国五大黄牛品种之一, 是著名的役肉兼用品种, 毛紫红色, 体格高大, 肌肉丰满, 具有适应性好, 性情温顺, 屠宰率高及肉质细腻等特点^[1], 受到国内外消费者的欢迎。但由于生长发育缓慢, 同时, 随着国外品种的不断引进, 对秦川牛进行大范围持续杂交改良, 使秦川牛面临保种乃至灭绝的威胁。为了能充分利用这一宝贵资源, 实现畜牧业持续、稳定、高效地发展, 满足人类社会对畜禽产品种类、质量的更高需求, 加强对秦川牛品种资源的保护和有效、合理、持续利用具有重要意义。

多重 PCR (Multiply PCR) 是在同一反应体系中同时扩增 2 个或 2 个以上基因座位的 PCR 反应, 该技术已广泛应用于基因组结构与功能基因、数量性状基因座 (QTL) 的定位以及分子遗传标记检测等研究领域^[2-4]。微卫星标记的分析一般采用聚丙烯酰胺电泳结合银染进行基因分型, 其易受电压、电泳胶和试验者等诸多因素影响, 无法精确地、大规模、自动化检测, 而荧光标记多重 PCR 技术的应用, 使得该技术的规模化和自动化的精确检测成为现实。笔者选用 15 对微卫星标记, 运用多重 PCR 技术分析秦川牛的遗传多样性, 通过荧光标记准确地检测多态性, 为秦川牛的遗传特性研究提供了更准确的数据, 为牛连锁图谱的分析及重要经济数量性状的定位研究提供了基础。

1 材料与方法

1.1 材料 试验样本选用陕西省良种繁育中心的秦川牛 59 头, 三代以内没有亲缘关系, 公牛不少于 15 头。采用前

腔静脉采血, 每头牛采血 10 ml。新鲜血液用 1:1 的裂解液 (100 mmol/L Tris·HCl, 100 mmol/L EDTA, 2% SDS) 裂解, 常温下即可运输, -20℃长期保存。

1.2 微卫星引物 该试验是根据联合国粮农组织 (FAO) 和国际动物遗传学会 (ISAG) 联合推荐的引物, 选取了其中 15 对微卫星引物, 上游引物 5' 端标记 Pet、Vic、Ned 或者 6fam 荧光, 内标标记 Liz 荧光。引物由美国应用生物系统公司 (ABI) 合成。

1.3 试验方法

1.3.1 基因组 DNA 的提取。 采用常规酚-氯仿抽提法从血液中提取基因组 DNA, 参照《现代分子生物学实验技术》, 稍加修改。

1.3.2 PCR 反应条件。 PCR 反应体系包括: 基因组 DNA 约 (25 ng/μl) 2 μl, 10×buffer 1.5 μl, Mg²⁺ (25 mmol/L) 1.0~1.5 μl, dNTP (25 mmol/L) 0.2 μl, 引物 2 pmol/μl, Taq 酶 (5 U/μl) 0.3 μl, 加超纯水至反应体系 15 μl。PCR 扩增程序: 95℃预变性 4 min; 94℃变性 1 min, 50℃~60.5℃复性 1 min, 72℃延伸 1 min, 35~40 个循环; 72℃延伸 40~60 min, 4℃保存。

1.3.3 PCR 产物检测。 先用浓度 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 检测扩增效果, 将效果好的 PCR 扩增产物用 ABI3100-Avant 全自动遗传分析仪进行毛细管电泳检测, 用仪器自带软件 GenMapper Version 3.2 分析微卫星基因型。

1.4 数据统计分析 由于微卫星呈共显性遗传, 通过其表现型可直接反映基因型, 利用 GENEPOP Version 3.2 软件计算等位基因频率。计算杂合度 (Heterozygosity, H)^[5]、多态信息含量 (Polymorphism Information Content, PIC) 和有效等位基因数 (the Number of Effective Alleles, Ne)^[6]。

2 结果与分析

2.1 多重 PCR 产物电泳结果 所选用的 15 对微卫星引物对所有的试验个体进行扩增, 优化组成 8 个多重荧光 PCR

基金项目 国家“863”计划项目“秦川牛肉肉质性状相关功能基因鉴定” (2006AA10Z1A1), 陕西省重大科技专项“肉牛、奶牛优质高效养殖关键技术研究示范” (2006KZ07-G1) 及西北农林科技大学拔尖人才支持计划资助。

作者简介 王均辉 (1980-), 男, 陕西扶风人, 硕士研究生, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖。* 通讯作者, 教授。

收稿日期 2007-04-04

组合(表1),电泳结果均表现出明显的多态性,随机抽取表现多态性部分样本进行重复试验表明,微卫星的扩增结果稳定,能够完全重复。

表1 多重荧光PCR反应的参数

ABI检测组合	扩增组合	座位	染色片段范围/bp	引物添加量/ μ l	退火温度/ $^{\circ}$ C	循环数/次	荧光标记	
A	1	BM1818	23 248-278	1.2	54.3	40	Vic	
		INRA005	12 135-149	1.5	54.3	40	Ned	
	2	TGLA227	18 75-105	2.0	54.3	40	Pet	
		HEL13	11 178-200	2.5	51.0	40	Pet	
	3	ILSTS034	5 130-144	1.5	51.0	40	Vic	
		MM12	9 105-145	1.1	56.0	40	6fam	
	4	INRA032	11 160-204	1.0	50.0	40	Vic	
		ETH185	17 214-246	1.1	60.5	40	6fam	
	B	6	BM1824	1 176-197	1.5	57.0	35	6fam
			TGLA122	21 136-184	1.0	57.0	35	Net
TGLA126		20 115-131	2.0	57.0	35	Vic		
7		HEL5	21 145-171	1.5	53.0	35	Vic	
		SPS115	15 234-258	1.5	55.0	35	Vic	
8		TGLA53	16 143-191	2.0	55.0	35	Pet	

注:Vic为绿色荧光标记,Pet为红色荧光标记,Ned为黑色荧光标记,6fam为蓝色荧光标记。

表2

各微卫星座位的等位基因数和等位基因及频率

微卫星座位	等位基因数	等位基因及频率																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
BM1818	8	254	256	258	260	262	264	268	272										
		0.034	0.093	0.203	0.203	0.322	0.127	0.008	0.008										
ETH185	11	217	219	221	223	227	229	231	233	235	237	239							
		0.034	0.008	0.076	0.110	0.110	0.051	0.195	0.178	0.119	0.076	0.042							
HEL13	9	179	185	187	189	191	193	195	197	201									
		0.009	0.250	0.009	0.121	0.069	0.095	0.414	0.017	0.017									
ILSTS034	16	138	140	142	144	146	148	150	152	154	156	162	164	166	168	170	172		
		0.008	0.068	0.119	0.017	0.051	0.017	0.051	0.017	0.136	0.017	0.051	0.153	0.025	0.017	0.025	0.229		
ILSTS054	8	126	128	130	132	134	136	138	142										
		0.144	0.008	0.220	0.025	0.093	0.153	0.119	0.237										
INRA005	12	126	128	130	134	136	138	140	142	144	146	148	150						
		0.017	0.008	0.017	0.051	0.186	0.203	0.398	0.025	0.008	0.051	0.017	0.017						
INRA032	8	158	172	174	176	178	180	182	184										
		0.088	0.009	0.070	0.412	0.289	0.009	0.079	0.044										
MM12	11	102	104	106	108	110	112	114	116	118	122	124							
		0.017	0.051	0.008	0.034	0.178	0.119	0.322	0.127	0.008	0.008	0.127							
TGLA227	14	73	75	81	85	87	89	91	93	95	97	99	101	103	105				
		0.008	0.008	0.144	0.305	0.093	0.025	0.059	0.068	0.042	0.042	0.051	0.110	0.034	0.008				
BM1824	5	176	178	180	182	188													
		0.017	0.280	0.229	0.407	0.068													
HEL5	10	145	147	149	151	153	159	161	163	165	169								
		0.017	0.008	0.229	0.093	0.297	0.008	0.068	0.220	0.042	0.017								
SPS115	7	242	244	246	248	250	254	256											
		0.297	0.059	0.119	0.076	0.288	0.153	0.008											
TGLA122	11	138	140	142	144	148	150	152	158	160	162	168							
		0.042	0.186	0.025	0.068	0.305	0.110	0.034	0.178	0.017	0.017	0.017							
TGLA126	6	116	118	120	122	124	126												
		0.407	0.254	0.017	0.068	0.178	0.076												
TGLA53	18	147	153	157	159	161	163	165	167	169	171	173	175	177	179	181	183	185	187
		0.018	0.009	0.036	0.255	0.018	0.018	0.009	0.136	0.100	0.045	0.009	0.027	0.036	0.027	0.173	0.064	0.009	0.009

因数体现了较高的一致性。

3 讨论

微卫星标记核心序列重复数的差异形成了微卫星的高度多态性。一般情况下,微卫星标记核心序列的重复数越多,其变异就越大,该位点的等位基因数也就越多,对于相同重复单位的微卫星标记来说,家禽的重复数比哺乳动物要少^[9]。家禽微卫星标记位点的等位基因数一般为2~20个,大多为5~8个,该试验结果所选的微卫星标记的等位基因数在5~18个,最少5个,最多18个,平均为10.3个,适用于遗传分析。

多态信息含量(PIC)是衡量等位基因片段多态性的理

想指标。Botstein等首先提出了衡量基因变异程度的多态信息含量指标^[9]。当 $PIC > 0.5$ 时,该座位为高度多态; $0.25 < PIC < 0.5$ 时,该座位为中度多态位点; $PIC < 0.25$ 时,为低度多态位点。该研究结果表明,所选用的15个微卫星座位的PIC值为0.644 1~0.864 9,均大于0.5,全部是高度多态,可以作为有效的遗传标记用于秦川牛的遗传多样性分析。很多研究者认为在遗传连锁分析中,PIC值大于0.7的微卫星标记为最理想的选择标记^[10-13]。该试验选取的15个微卫星标记,只有INRA032, BM1824和TGLA126的PIC值略小于0.7,其余都大于0.7,可以作为理想的标记用于进一步的QTL定位研究。基因杂合度(H)反映群体在各位点上的遗传变异,一

2.2 微卫星座位的等位基因分布 表2表明,15个微卫星座位的平均等位基因数为10.3个;TGLA53等位基因数最高,为18个;BM1824最低,为5个。这说明15个微卫星座位的遗传变异都较大,TGLA53遗传变异最大,BM1824最小。HEL13位点在195 bp的等位基因频率最高,达到0.414;等位基因频率最小的为0.008。

2.3 各基因座的多态信息含量、杂合度和有效等位基因数

表3表明,15个微卫星座位的平均多态信息含量、平均杂合度和平均有效等位基因数分别为0.768 6,0.795 9和5.306 6,这略低于王敏强等报道的鲁西黄牛、渤海黑牛和秦川牛平均多态信息含量(0.797,0.798和0.795)、平均杂合度(0.820,0.821和0.819)和有效等位基因数6.163,6.354和6.285^[7]。ILSTS034位点的多态信息含量、杂合度和有效等位基因数均最大,分别达到0.864 9,0.876 3和8.084 5;而BM1824位点的都最小,分别为0.644 1,0.698 6和3.317 8。结果表明,所选择的微卫星位点在该试验材料中表现出良好的多态性,而且多态信息含量、杂合度的大小与有效等位基

表 3 15 个微卫星座位的多态信息含量 (PIC)、杂合度 (H) 和有效等位基因数 (Ne)

微卫星座位	多态信息含量 (PIC)	杂合度 (H)	有效等位基因数 (Ne)
BM1818	0.757 3	0.787 8	4.713 3
ETH185	0.862 1	0.874 8	7.986 8
HEL13	0.701 3	0.736 9	3.801 4
ILSTS034	0.864 9	0.876 3	8.084 5
ILSTS054	0.804 9	0.827 8	5.806 8
INRA005	0.728 4	0.758 7	4.143 9
INRA032	0.686 5	0.725 8	3.646 3
MM12	0.791 9	0.814 0	5.375 6
TGLA227	0.835 9	0.849 3	6.635 0
BM1824	0.644 1	0.698 6	3.317 8
HEL5	0.766 2	0.795 2	4.883 0
SPS115	0.749 9	0.782 0	4.586 2
TGLA122	0.798 0	0.819 6	5.542 0
TGLA126	0.685 9	0.727 5	3.669 2
TGLA53	0.852 4	0.865 0	7.407 5
平均值	0.768 6	0.795 9	5.306 6

般认为它是度量群体遗传变异的一个合适参数^[14]。该试验结果表明,15 个微卫星位点的杂合度范围是 0.876 3~0.698 6,各位点的杂合度都较高,说明 15 个微卫星位点在秦川牛群体中的遗传变异较大,群体近交程度较小,遗传多样性较丰富。

参考文献

- [1] 马捷琼,刘继民,陈宏.我国珍贵的黄牛品种-秦川牛的开发利用和保护现状[J].生物学教学,2006,11(31):2-3.
 [2] PONCE MR,ROBLES P,MICOL J L. Highthrough put genetic

mapping in *Arabidopsis thaliana*[J]. Mol Gen Genet,1999,261:08-415.

- [3] ROSENFELD S I,JAYKUS L A. A multiplex reverse transcription polymerase chain reaction method for the detection of food borne viruses[J]. J Food Prot,1999,62:1210-1214.
 [4] 邹浪萍,杨燕,褚嘉祐.多重 PCR 检测 CSFIPO,TPOX 和 THOI 基因座在中国汉族中的多态性[J].遗传学报,1998,25(3):199-204.
 [5] 储明星,程金华.微卫星标记 OARAE101 和 BM1329 在 5 个绵羊品种中的初步研究[J].遗传学报,2001,28(6):510-517
 [6] 欧阳叙向,施启顺,邓灶福,等.微卫星标记 OarAE101 和 BM143 在 4 个山羊品种中的研究[J].畜牧兽医学报,2006,37(7):640-645.
 [7] 王敏强,李萍莉,陈礼学,等.用 20 个微卫星标记研究鲁西黄牛和渤海黑牛的遗传多样性[J].河北农业大学学报,2006,29(6):76-81.
 [8] 何平.真核生物中的微卫星及其应用[J].遗传,1998,20(4):42-47.
 [9] BOSTEIN D,WHITE R L,SKOLNICK M,et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. Am J Hum Genet,1983,32:314-331.
 [10] 冯登祯,刘红霞.DNA 分子遗传标记技术及其研究进展[J].宁夏农学院学报,2001,22(3):80-83.
 [11] 黄银花,胡晓湘,邓学梅.利用多重 PCR 进行鸡全基因组扫描[J].自然科学进展,2001,11(9):950-953.
 [12] VAN KAAM. Whole Genome scan in chickens for quantitative trait loci affecting growth and feed efficiency[J]. Poultry Science,1999,78:15-23.
 [13] SEWALEM D M,MORRICE A,LAW D,et al. Mapping of quantitative trait loci for body weight at three,six,and nine weeks of age in a broiler layer cross [J]. Poultry Science,2002,81:1775-1781.
 [14] 屠云洁,陈宽维,沈见成,等.利用微卫星标记分析四川 8 个地方鸡品种遗传多样性[J].遗传,2005,27(5):724-728.