

利用微卫星标记对3个绵羊品种肉用性状多态性的研究

林建坤, 张兴国 (山东畜牧兽医职业学院畜牧系, 山东潍坊261061)

摘要 [目的] 研究3个绵羊品种肉用性状的多态性。[方法] 利用微卫星标记技术研究新疆地区无角陶塞特、萨福克与中国美利奴绵羊群体的遗传多态性, 并对所列举微卫星位点的多态性进行统计分析。[结果] 所测3个绵羊群体的基因频率分布不均匀, 其有效等位基因数在12~15, 不同等位基因间片段大小的差异不等。3个品种绵羊群体的变异程度很高, 各绵羊品种的杂合度为0.8214~0.9252。所选4个微卫星座位均表现出了高度多态性, 多态信息含量(PIC)为0.7923~0.9167, 是普遍适合于绵羊肉用生产性状的多态标记。[结论] 该研究为进一步寻找与生产性能相关的遗传标记提供了理论依据。

关键词 绵羊; 微卫星标记技术; 杂合度; 遗传多态性

中图分类号 S826 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)17-07903-01

Study on Polymorphism of Mutton Performance Traits in 3 Sheep Varieties by Microsatellite Markers

LIN Jian-kun et al (Animal Husbandry Department in Shandong Vocational Animal Husbandry and Veterinary College, Weifang, Shandong 261061)

Abstract [Objective] The aim was to study the polymorphism of mutton performance traits in 3 sheep varieties. [Method] The genetic polymorphism of 3 sheep populations of poll dorset sheep and Suffolk sheep from Xinjiang and merino sheep from China were studied by microsatellite marker technology and the polymorphism of the listed microsatellite loci were studied through statistic analysis. [Result] The gene frequency distribution of the 3 detected sheep populations were not even, the effective number of alleles was between 12 and 15 and the difference on fragment length among different alleles was not same. The variation degree of 3 varieties sheep populations was high and the heterozygosity of each sheep variety was 0.8214-0.9252. Four selected microsatellite loci all showed high polymorphism and the polymorphism information content (PIC) was 0.7923-0.9167, which was the polymorphism marker generally suitable for mutton performance traits. [Conclusion] The research provided the theoretical basis for further searching for genetic marker related with production performance.

Key words Sheep; Microsatellite marker technology; Heterozygosity; Genetic polymorphism

在绵羊育种中, 由于后臀过度发育绵羊或具有双肌臀绵羊瘦肉量多、屠体等级高等特点, 所以多年来许多学者对绵羊后臀性状的形态学及其遗传学机制进行了深入研究^[1-4]。笔者利用微卫星标记技术研究新疆地区无角陶塞特、萨福克与中国美利奴肉用绵羊群体的遗传多态性, 并对所列举微卫星位点的多态性进行统计分析, 旨在为进一步寻找与生产性能相关的遗传标记提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试羊。由新疆建设兵团新湖种羊场提供的供试羊群体中随机抽样, 分别采集了无角陶赛特(61头)、萨福克(38头)和中国美利奴(62只)的新鲜耳组织样, -20℃冷冻保存。

1.1.2 主要试剂。PCR反应试剂盒, 蛋白酶K, RNAase, 苯酚, Tris, EDTA, DNAMarker, TEMED, 过硫酸铵, 丙烯酰胺, 硝酸银, 引物等。

1.1.3 主要仪器。iCycler PCR仪, YJ875超净操作台, UV紫外分光光度计, DYY12电脑三恒多用电泳仪, DYY垂直电泳槽, TYB脱色摇床, AB204N型电子天平, 3K30高速冷冻离心机和113小型台式离心机, GelKoc2000™凝胶自动成像系统。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA的提取。用酚氯仿抽提法提取基因组, 溶于TE中, 于4℃保存。

1.2.2 引物的筛选与合成。从GenBank中查阅相关资料, 参考其研究结果, 选出位于18号染色体上的4个与绵羊肉用生产性能相关的微卫星位点。查出相应的微卫星引物序列, 资料参考文献, 引物交由上海生工生物工程公司合成。

1.2.3 PCR反应条件。PCR反应采用试剂盒优化, 体系为15 μl: TaqE 0.3 μl, 10×buffer 1.5 μl, dNTP(含2.5 mmol/L Mg²⁺) 1.2 μl, 引物(10 mmol/L)各0.75 μl, 模板DNA(100 ng/μl) 1.2 μl, ddH₂O 9.3 μl。扩增程序为: 94℃, 4 min; 94℃, 30 s, 引物退火温度, 30 s, 72℃, 30 s, 35个循环; 72℃, 4 min; 4℃保存备用。

1.2.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳。用10%非变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳, 采用快速银染法显色^[5-6], 照相, 图片保存。直接用GelKoc2000™凝胶自动成像系统所附带的软件进行等位基因分型, 并计算微卫星等位基因大小。

1.3 统计分析 分别对微卫星标记的等位基因频率、群体杂合度、多态信息含量、有效等位基因数计算。

2 结果与分析

2.1 基因组DNA提取结果 提取基因组DNA经琼脂糖凝胶电泳检测, 亮度较大, 说明提取的DNA在纯度、浓度上质量都较高。

2.2 微卫星引物扩增结果

2.2.1 扩增产物琼脂糖电泳检测结果。首先将PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测, 条带亮度较好, 显示PCR扩增产物大小和质量均符合要求, 可以进一步用10%聚丙烯酰胺凝胶分析绵羊个体的标记基因型。

2.2.2 扩增产物聚丙烯酰胺电泳检测结果。对4个微卫星位点的PCR产物进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 得到PCR产物电泳检测结果。

2.2.3 等位基因数、等位基因频率和遗传参数。微卫星MCMB8在陶赛特羊、萨福克羊和中国美利奴羊3个群体中共发现有13个等位基因, 等位基因范围在135~155 bp; 微卫星BM413共发现12个等位基因, 等位基因范围在177~201 bp; 微卫星MCMA26共发现13个等位基因, 等位基因范围在184~215 bp; 微卫星BP33共发现15个等位基因, 等位基因范

作者简介 林建坤(1963-), 男, 山东潍坊人, 硕士, 副教授, 从事动物遗传育种研究。

收稿日期 2009-04-24

(下转第7911页)

后均长出白色湿润菌落;每板挑取10个较大的菌落分别重悬后滴于SD/ glucose(-UL)和SD/ galactose(-UL)平板上,37℃继续培养7d后各组SD/ glucose(-UL)平板上均无菌落长出,第1组和第4组SD/ galactose(-UL)平板培养基上长出菌落,第2组和第3组SD/ galactose(-UL)培养基上无菌落长出(表1)。说明诱饵质粒无自激活作用,且该诱饵质粒可在宿主细胞质中定位。

表1 诱饵自激活情况及定位情况检验结果

Table 1 The test results of the self-excitation and orientation of baits

组别 Group	共转化质粒组合 Co-transformation plasmid combination	SD (- UL) /	SD (- UL) /
		23 glucose	37 glucose galactose
第1组 The first group	pSosMAFB和pMyrMAFB	+	-
第2组 The second group	pSosMAFB和pMyr	+	-
第3组 The third group	pSos-prp(105-125 缺失) 和pMyr	+	-
第4组 The fourth group	pSos-prp(105-125 缺失) 和pMyrSB	+	+

注:“+”代表生长良好,“-”代表不生长。

Note:“+”stands for good growth and“-”stands for no growth.

3 讨论

该研究在Cyto Trap 酵母双杂交系统中应用了温度敏感

(上接第7903页)

围在252~295 bp,基因频率分布不均匀。根据4个微卫星座位各等位基因的基因频率计算了h、E和PIC(表1)。

表1 4个微卫星座位在3个绵羊品种中的杂合度、多态信息含量和有效等位基因数

Table 1 Heterozygosity, polymorphism information content and effective number of alleles of 4 microsatellite loci in 3 sheep breeds

座位 Loci	品种 Variety	杂合度 (h)	有效基因数 (E)	多态信息含量 (HQ)
MCM8	陶赛特	0.889 8	9.07	0.875 4
	萨福克	0.891 3	9.20	0.880 9
	中国美利奴	0.832 8	5.98	0.823 1
BM413	陶赛特	0.891 1	9.18	0.881 8
	萨福克	0.830 2	5.89	0.811 7
	中国美利奴	0.845 2	6.43	0.830 1
MCMA26	陶赛特	0.925 2	13.37	0.916 7
	萨福克	0.821 4	5.60	0.796 3
	中国美利奴	0.887 6	8.89	0.874 3
BP33	陶赛特	0.910 6	11.19	0.900 2
	萨福克	0.857 0	6.99	0.840 8
	中国美利奴	0.855 4	6.91	0.842 8

3 讨论与结论

有效等位基因数是衡量群体遗传变异的一个指标。不同品种在同一微卫星座位上等位基因数目和频率的差异体现出其遗传上的差异。该研究所测3个绵羊群体的有效等位基因数在12~15个,不同等位基因间片段大小差异不

型酵母菌cdc25H,1328位氨基酸残基发生碱基突变,阻止了cdc25H在37℃条件下生长,而允许其在25℃条件下生长;Sos蛋白可弥补该缺陷,当带有Sos载体的诱饵质粒与带有pMyr载体的猎物质粒相互作用时,酵母菌cdc25H在37℃半乳糖培养基上分裂生长。但在酵母双杂交系统中,常出现2种蛋白没有发生作用的假阳性结果,为了排除假阳性结果出现,该研究进行了诱饵质粒的表型自激活检测及定位情况检验。结果表明,pSos-prp(105-125 缺失)诱饵质粒与pMyr空质粒共转化酵母后,cdc25H不能在37℃半乳糖培养基上分裂生长,说明pSos-prp(105-125 缺失)诱饵质粒无自激活作用。

该研究成功构建了pSos-prp(105-125 缺失)诱饵质粒,并通过试验证明了该诱饵质粒无自激活作用。为应用Cyto Trap 酵母双杂交系统筛选与pSos-prp(105-125 缺失)相互作用的蛋白奠定了基础。

参考文献

- [1] 梁洁. 朊蛋白M. 西安: 第四军医大学出版社,2006:35-39.
- [2] BUELER H, AGUZZI A, SAILER A, et al. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie[J]. Cell, 1993, 73:1339-1347.
- [3] BUELER H, HESCHER M, LANG Y, et al. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein[J]. Nature, 1992, 356:577-582.
- [4] PRUSINER S B, HADLOW W J, EKLUND C M, et al. Sedimentation properties of the scrapie agent[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1977, 74:4656-4660.
- [5] 赵德明. 动物传染性海绵状脑病M. 北京: 中国农业出版社,2005:64-66.
- [6] STAHL N, BALDWIN MA, HEAKER R, et al. Glycosylated phospholipid anchors of the scrapie and cellular prion protein[J]. Biochemistry, 1992, 31:5043-5053.

等,说明群体遗传变异较大。遗传杂合度反映了各群体在基因座位上的遗传变异。平均基因杂合度的大小近似地反映出遗传结构变异程度的高低,杂合度越高,表明群体的遗传多样性越高。该研究各绵羊品种杂合度为0.8214~0.9252,说明该3个品种绵羊群体的变异程度很高。多态信息含量是衡量片段多态性的较好的指标。Botstein等提出了衡量基因变异程度高低的的多态信息含量指标:当PIC>0.50时,该基因座位为高度多态基因座位;当PIC在0.25~0.50时,为中度多态基因座位;当PIC<0.25时,则为低度多态基因座位。该研究的4个微卫星座位均表现出了高度多态性,PIC从0.7963~0.9167,说明该试验所选4个微卫星为高度多态,是普遍适合于绵羊肉用生产性状的多态标记。

参考文献

- [1] 吕慎金, 马月辉. 微卫星标记对绵山羊品种资源的评价[J]. 黑龙江畜牧兽医,2002(10):10-12.
- [2] 刘伟敏,熊远著,蒋思文,等. 微卫星标记及在家畜遗传育种研究中的应用[J]. 湖北农业科学,2000(2):55-58.
- [3] TAUTZ D. Hyper variability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers[J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17(16):6463-6467.
- [4] FREKING B A, KEELEJ W, BEATTIE C W, et al. Evaluation of the ovine callipyge locus: I. Relative chromosomal position and gene action[J]. J Anim Sci, 1998, 76:2062-2071.
- [5] FREKING B A, KEELEJ W, BEATTIE C W, et al. Evaluation of the ovine callipyge locus: II. Genotypic effects on growth, slaughter, and carcass traits[J]. J Anim Sci, 1998, 76:2549-2559.
- [6] SHAY T L, BERGHMANS S, SEGERS K, et al. Fine mapping and construction of a bovine contig spanning the ovine callipyge locus[J]. Mammal Genome, 2001, 12:141-149.