

文章编号: 1003-8701(2008)03-0037-04

5 个群体微卫星 DNA 多态性的研究

李向阳¹, 胡成华², 赵玉民², 张嘉保^{3*}, 张国梁²

(1. 内蒙古民族大学成人教育学院, 内蒙 通辽 028042; 2. 吉林省农业科学院畜牧分院, 吉林 公主岭 136100;
3. 吉林大学实验动物中心, 长春 130062)

摘 要: 选用草原红牛 30 头、蒙古牛 10 头、夏洛来牛 10 头、利木赞牛 6 头和西门塔尔牛 10 头组成的试验牛群体共计 66 头, 经过牛血液或肝脏基因组 DNA 的提取、8 对微卫星引物的 PCR 扩增、扩增产物的聚丙烯酰胺电泳分型、分析各位点等位基因及全部个体的标记基因型、PPAP3.0 和 SPSS10.0 软件计算基因频率、多态信息含量(PIC)和杂合度、遗传距离等步骤从分子水平上分析了在 8 个位点的遗传多态性。结果表明, 微卫星位点 IDVGA2、IDVGA46、TGLA44、BM1824、ETH225、BM2113、IDVGA44、IDVGA55 扩增出的条带数分别为 6、6、6、5、4、2、6、4 条, 平均条带数分别为 4.4、4、4.2、3.6、3.4、2、4.8、3.2 条, 平均 PIC/H 分别为 0.683 1/0.733 7、0.596 3/0.660 2、0.646 2/0.700 1、0.558 1/0.630 2、0.552 9/0.615 8、0.371 1/0.417 4、0.683 1/0.728 4、0.543 1/0.615 3, 均属于高度多态性位点。用于群体遗传标记的研究是较理想的。

关键词: 5 个群体; 微卫星 DNA; 多态性

中图分类号: S823.2

文献标识码: A

Studies on Polymorphism of Micro-satellite DNA in Five Cattle Groups

LI Xiang-yang¹, HU Cheng-hua², ZHAO Yu-min², Zhang Jia-Bao³, ZHANG Guo-liang²

(1. Inner Mongolia National University, Tongliao 028042; 2. Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, Gongzhuling 136100; 3. Jilin University, Changchun 130062 China)

Abstract: In this study, a group of Charolais, Limousin, Simmental, Steppe Red Cattle, Mongolian Cattle was chosen and its population genetic polymorphism was analyzed in the level of molecule by the process of genome DNA extraction from blood, PCR amplification of 8 primers, fragment typing with polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), allele and genotype analysis of every locus by UVIBAND system, calculation of allele frequencies, Polymorphism information content (PIC) and Heterozygosity by PPAP3.0 and SPSS10.0. The results showed that the number of alleles in IDVGA2, IDVGA46, TGLA44, BM1824, ETH225, BM2113, IDVGA44, IDVGA55 was 6, 6, 6, 5, 4, 2, 6, 4, and the polymorphism information content (PIC) and H was 0.6831/0.7337, 0.5963/0.6602, 0.6462/0.7001, 0.5581/0.6302, 0.5529/0.6158, 0.3711/0.4174, 0.6831/0.7284, 0.5431/0.6153. All of them were high polymorphic loci. So they were ideal loci in the study of looking for genetic markers related to the production performance.

Key words: Five groups; Micro-satellite DNA; Polymorphism

微卫星 DNA 是短的、串联的简单序列重复

(Simple Sequence Repeat, 简称 SSR)^[1], 它的组成基元为 1~6 个核苷酸, 例如(CA)_n、(CGA)_n 和(GACG)_n 等, 由于这些序列广泛存在于真核细胞的基因组中, 且由于串联重复的数目是可变的而呈现高度的多态性^[2], 以及在单个微卫星位点上可作共显性的等位基因分析, 杂合子比例高、信息含量大, 以及其保守性等特点, 使其引物可在不同实验室交流, 并适合自动化操作等优点, 近年来微卫星标记

收稿日期: 2007-12-25

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目, 课题编号为 2001AA243051

作者简介: 李向阳(1972-), 男, 讲师, 硕士, 研究方向: 分子遗传与动物育种。

通讯作者: 张嘉保(1963-), 博士, 教授, 博士生导师 zjb515@163.com
张国梁(1967-), 男, 研究员, 硕士, zgl7777777@163.com

作为比较理想的分子标记广泛应用于遗传图谱的构建、居群遗传学以及系统发育的研究之中。它以高度的多态性信息量和 PCR 技术的方便性使其表现出更大优势^[3]。

应用微卫星标记技术对草原红牛(SRC)、蒙古牛(MG)、夏洛来牛(CH)、利木赞牛(LM)和西门塔尔牛(SM)等 5 个品种总计 66 个个体的遗传结构与遗传变异进行研究。结果表明,所采用的 8 对微卫星位点均可获得清晰的扩增产物,产生多态性较丰富的片段,不同位点所扩增出的条带数目、片段大小不同,同一条位点在不同品种之间也有较大差异。摸索了适合于动物基因组的 PCR 指纹技术的反应条件,确立了本次实验的最佳反应体系。遗传距离指数的计算结果及由此所绘制的亲缘关系树状聚类图均表明了群体间及个体间亲缘关系的远近程度。实验采用了 DNA 池的多重 PCR 扩增技术,DNA 池作为模板较个体 DNA 模板所得到的结果信息量更丰富,方法更简便。本研究利用微卫星标记技术研究 5 个品种遗传多态性,旨在进一步为提高品种选育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验牛样品

本实验用草原红牛(30 头)血液或肝脏采自吉林省农业科学院畜牧分院;蒙古牛(10 头)肝脏采自内蒙古通辽畜牧兽医研究所;夏洛来牛(10 头)、

利木赞牛(6 头)和西门塔尔牛(10 头)3 个品种血液均采自长春市华春肉种牛繁育中心。

1.1.2 主要试剂

Taq DNA 聚合酶、8 对微卫星引物、4 × dNTP、PCR Buffer (含 Mg²⁺)、琼脂糖、蛋白酶 K、RNA 酶、Tris 饱和酚、EDTA、分子标量标记物 Market、亲水硅烷、疏水硅烷、N,N'- 亚甲双丙烯酰胺、TEMED、尿素、过硫酸铵、丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、乙二氨四乙酸 SDS、溴化乙锭等购自北京赛百盛基因技术有限公司、TaKaRa 宝生物工程有限公司。

1.1.3 主要仪器

PCR 仪、高速冷冻离心机、高速台式离心机、核酸测序电泳仪、DYY-3 型电泳仪、UV-254 暗箱式紫外透射仪、ZF 型紫外透射反射分析仪、凝胶自动成像系统、DNA counter、HZQ- C 空气浴振荡器。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取

参照《分子克隆实验指南》第二版^[4],采用常规酚、氯仿抽提方法进行,略有改进。

1.2.2 引物的筛选与合成

引物序列通过 Genbank 查得。选用的 8 对微卫星引物由北京赛百盛基因技术有限公司和北京鼎国生物技术发展中心公司合成。引物设计遵循 PCR 引物设计原则^[4],所用软件为 Primer premier 5.0(PREMIER Biosoft International)。8 对微卫星位点的引物序列及 PCR 扩增反应条件见表 1。

表 1 8 对微卫星引物的特性及 PCR 反应条件

微卫星(D 号码)	引物序列 (5'→3')	染色体位置	Mg ²⁺ 浓度	退火温度
IDVGA2 (D2S7)	GTAGACAAGGAAGCCGCTGAGG GAGAAAAGCCAAGAGCCAGACC	2q45	0.75	60
IDVGA46 (D19S18)	AAATCCTTTCAAGTATGTTTTCA ACTCACTCCAGTATTCTTGCTCG	19q16	1.5	50
TGLA44 (D2S3)	AACTGTATATTGAGAGCCTACCATG CACACCTTAGCGACTAAACCA	2q	1.5	60
BM1824 (DI S34)	GTTCAGGACTGGCCCTGCTAAACA CCTCCAGCCACTTTCTCTTCTC	5q	1.5	59
ETH225 (D9S1)	GATCACCTTGCCACTATTTCCT ACATGACAGCCAGCTGCTACT	9q	1.5	68
BM2113 (D2S26)	GCTGCCTTCTACCAAATACCC CTTCCTGAGAGAAGCAACACC	2q	1.5	58
IDVGA44	GGGAGAATGGATGGAACCAAAT TTCGAAGACGGGCAGACAGG	19q22	1.0	60
IDVGA55 (D18S16)	GTGACTGTATTTGTGAACACCTA TCTAAAACGGAGGCAGAGATG	18q24	0.75	50

1.2.3 PCR 扩增程序

94 的预变性 5 min→94 变性 30 s→退火 45 s→72 延伸 45 s,35 个循环,反应结束后 72 延伸 10 min。

1.2.4 PCR 产物的检测及电泳分型

扩增产物先在 1.5%琼脂糖凝胶上电泳,在紫外透射分析仪上观察是否有所需的条带,若有继续转到 8%变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分型。采用常规银染法经过固定、漂洗、染色、显影、终止及清洗等步骤进行染色,得到 DNA 指纹图谱。

1.2.5 微卫星标记的统计量分析

利用 PPA3.0 软件包(郭政, 李霞主编. 哈尔滨医科大学), 计算各群体平均多态信息含量、平均杂合度(H); 各群体之间遗传距离, 并作出遗传聚类图, 根据公式计算各位点有效等位基因数。

1.2.5.1 杂合度(H)

用于衡量微卫星标记的信息含量。一般来讲, 群体进化时间越长, 群体基因杂合度就越大, 因此群体的分化位置应该与基因杂合度一致。

$$\sum_{i=1}^m P_i=1 \quad H=1-\sum_{i=1}^m P_i^2$$

其中 m 为等位基因数, P_i^2 为基因频率。

1.2.5.2 多态信息量(PIC)

它表示的是一个后代所获得某个等位标记来自于他父亲的同一个等位标记可能性(概率)。

$$PIC=1-\sum_{i=1}^m P_i^2-\sum_{i=1}^{m-1}\sum_{j=i+1}^m (P_iP_j)^2$$

其中 P_i 和 P_j 为第 i 和第 j 个等位基因。

1.2.5.3 应用 SPSS10.0 统计软件系统聚类分析方法

采用平均非加权成组配对法 UPGMA (un-weighted pair group method arithmetic averages) 进行聚类分析, 绘制出 5 个品种间树状图。

1.3 结果判读

根据聚丙烯酰胺凝胶上 DNA 泳动距离进行结果判读。如果条带泳动距离一致, 即表现为单态性, 若有差异即为多态性。统计 5 个品种在研究位点上表现出多态性带的数目, 扩增结果按 Lynch 氏法计算相似系数并分析其相似性 $F=2N_{ab}/(N_a+N_b)$, 其中, N_{ab} 为两个品系相同谱带数, N_a 、 N_b 为二者分别扩增结果, 若无扩增结果记为“0”^[5], 扩增带是 1 条为纯合子, 扩增带是 2 条则为杂合子, 并确定个体基因型^[6]。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 提取结果

对采集的牛血样或肝脏, 用常规的酚 / 氯仿

抽提法提取基因组 DNA。经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, DNA 分子量在 19kb 左右, 且亮度较大, 说明提取的 DNA 在纯度、浓度、大小上质量都较高, 见图 1。

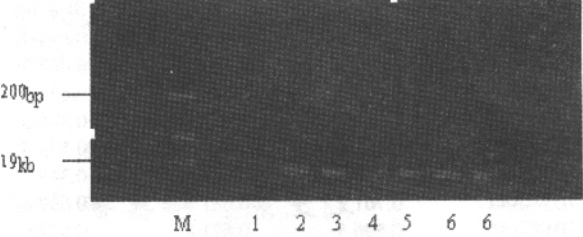


图 1 DNA 提取结果

1 空白;2 夏洛来牛;3 西门塔尔牛;4 蒙古牛;5 利木赞牛;6 草原红牛;M 标记物

2.2 8 对微卫星引物扩增结果

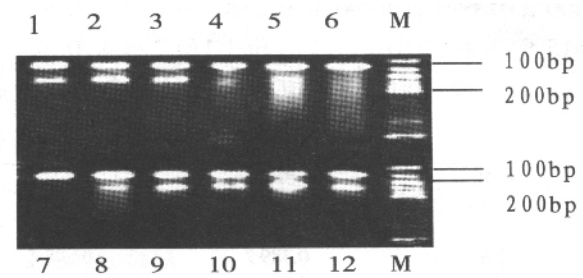


图 2 草原红牛扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳图谱
1-12 号为草原红牛, M 为分子量标记物

2.2.1 扩增产物琼脂糖电泳检测结果

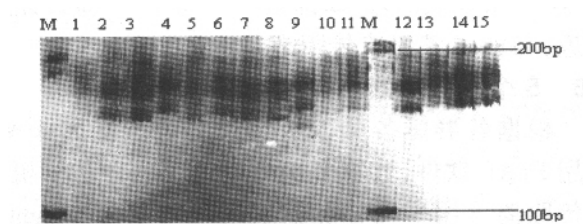


图 3 TGLA44 部分扩增图谱

1 - 15 为草原红牛, M 为标记物(SD002)

2.2.2 扩增产物聚丙烯酰胺电泳检测结果

8 对微卫星位点的 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, 这里仅以 TGLA44 电泳图为例来说明(图 3)。

2.3 微卫星位点等位基因数及其大小

表 2 微卫星位点 IDVGA2 的等位基因大小(bp)及频率

品种	样本数 N	等位基因大小					
		205bp (A)	207bp (B)	209bp (C)	211bp (D)	213bp (E)	215bp (F)
草原红牛	30	0.038 5	0.192 3	0.307 7	0.307 7	0.076 9	0.076 9
蒙古牛	10	0.437 5	0.312 5	0.125 0	0.125 0	0.000 0	0.000 0
夏洛来牛	10	0.187 5	0.250 0	0.250 0	0.312 5	0.000 0	0.000 0
利木赞牛	6	0.250 0	0.000 0	0.250 0	0.250 0	0.000 0	0.250 0
西门塔尔	10	0.333 3	0.000 0	0.166 7	0.250 0	0.250 0	0.000 0
Total	66	0.185 4	0.172 6	0.244 6	0.266 7	0.037 8	0.057 6

由表 2 可知, 在微卫星位点 IDVGA2 共检测到 6 个等位基因, 大小变异范围 205~215bp, 等位基因 D(211bp)频率最高。草原红牛等位基因最多为 6 个。

2.4 8 对微卫星位点的多态信息含量和群体杂合度

由表 3 可知, 微卫星位点 IDVGA2、IDVGA46、

表 3 8 对微卫星位点在 5 个品种牛群体中的遗传特性

位 点	草原红牛(PIC)	蒙古牛(PIC)	夏洛来(PIC)	利木赞(PIC)	西门塔尔(PIC)	平均(PIC)	杂合度 H(j)
IDVGA2	0.722 3	0.623 7	0.694 3	0.703 1	0.687 4	0.686 1	0.733 7
IDVGA46	0.749 3	0.605 0	0.667 5	0.375 0	0.584 9	0.596 3	0.660 2
TGLA44	0.671 3	0.685 4	0.671 3	0.667 5	0.535 5	0.646 2	0.700 1
BM1824	0.584 9	0.675 6	0.375 0	0.554 7	0.600 3	0.558 1	0.630 2
ETH225	0.671 5	0.581 5	0.535 5	0.671 3	0.304 7	0.552 9	0.615 8
BM2113	0.508 9	0.457 0	0.345 7	0.304 7	0.239 2	0.371 1	0.417 4
IDVGA44	0.761 2	0.681 6	0.699 6	0.554 7	0.718 6	0.683 1	0.728 4
IDVGA55	0.596 5	0.621 8	0.547 8	0.395 0	0.554 7	0.543 1	0.615 3
均值	0.658 2	0.616 5	0.567 1	0.528 3	0.528 2		
各位点杂合度 H(j)	0.695 3	0.667 0	0.638 2	0.602 0	0.585 8		

TGLA44、BM1824、ETH225、BM2113、IDVGA44、IDVGA55 平均 PIC/H 分别为 0.6831/0.7337、0.596 3/0.660 2、0.646 2/0.700 1、0.558 1/0.630 2、0.552 9/0.615 8、0.371 1/0.417 4、0.683 1/0.728 4、0.543 1/0.615 3, 因此 IDVGA2 的 PIC 和 H 都是最高。草原红

牛、蒙古牛、夏洛来牛、利木赞牛、西门塔尔牛的均值 PIC/H 分别为 0.658 2/0.695 3、0.616 5/0.667 0、0.567 1/0.638 2、0.528 3/0.602 0、0.528 2/0.585 8, 因此草原红牛均值 PIC 和 H 都是最高。

2.5 5 个群体间的遗传距离

表 4 5 个品种牛群体间的遗传距离

群体	SRC	CH	LM	MG	SM
SRC	0.000 0	0.305 9	0.389 2	0.278 6	0.418 4
CH	0.305 9	0.000 0	0.245 6	0.422 2	0.407 9
LM	0.389 2	0.245 6	0.000 0	0.383 2	0.285 9
MG	0.278 6	0.422 2	0.383 2	0.000 0	0.234 8
SM	0.418 4	0.407 9	0.285 9	0.234 8	0.000 0

由表 4 可知, 草原红牛与蒙古牛、夏洛来、利木赞、西门塔尔的遗传距离分别为 0.278 6、0.305 9、0.389 2 和 0.418 4; 草原红牛与蒙古牛遗传距离最近, 与西门塔尔遗传距离最远。

2.6 5 个群体间的亲缘关系树状图

根据各群体各微卫星位点的等位基因频率, 利用 PPAP 软件, 计算各群体间的遗传距离。根据遗传距离应用平均非加权成组配对法(Unweighted Pair- Group Method using an Arithmetic average, UPGMA)作出亲缘关系聚类图。由图 4 可知, 草原红牛先和蒙古牛聚为一类, 再与夏洛来牛聚为一类, 然后再与利木赞牛聚为一类, 最后与西门塔尔牛聚为一类。

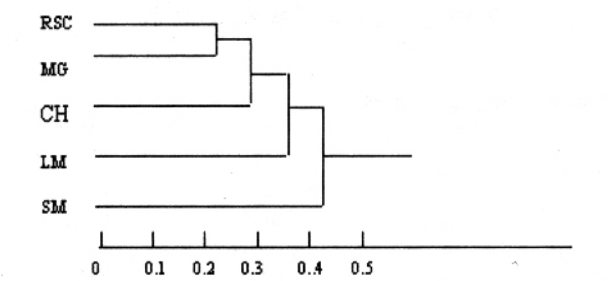


图 4 5 个品种牛群体间的 UPGMA 亲缘关系树状图

3 讨 论

3.1 5 个品种的遗传多样性

对于夏洛来牛、利木赞牛、西门塔尔牛等国外著名品种来说, 群体不断淘汰不利基因, 纯化有利基因, 使群体基因型趋于纯合; 并且在长期封闭繁育中没有外血导入, 从而导致遗传基因多样性的低水平。用多态信息含量(PIC)描述微卫星位点的变异程度, 当 $PIC > 0.5$ 时, 为高度多态; $0.25 < PIC < 0.5$ 时为中度多态; 而 $PIC < 0.25$ 时为低度多态。夏洛来牛、利木赞牛、西门塔尔牛群体 PIC 分别是 0.567 1、0.528 3、0.528 2, 而草原红牛、蒙古牛群体 PIC 则达到了 0.658 2、0.616 5, 高于国外的 3 个品种, 这表明中国地方牛的遗传多样性高于外来品种, 这说明微卫星位点的变异程度能反映品种间的特异性^[7]。由于实验和数据计算方法的不同, 其品种遗传多样性的大小有差异, 如有的实验样本为随机取样, 而有的实验所用样本均为利用原产地近交程度较高的基础群经过封闭或近交培育而建成的品系; 另外, 所选的微卫星位点数目不同是导致结果不同的另一重要原因。较高的遗传多样性表明这个品种有较强的环境适应能力和进化潜力, 因而可供育种的遗传素材(下转第 54 页)

京化工大学学报, 2004, 31(2): 24- 27 .

[11] 曹庆穗, 徐为民, 严建民, 等. 大蒜的功能成分及其保健功效[J]. 江苏农业科学, 2004(6): 134- 136 .

[12] Serge Ankri, David Mirelman, Antimicrobial properties of allicin from garlic, *Microbes and infection*, 1999, 2: 125- 129 .

[13] I. Arnault, T. Haffner, M.H. Sless, et al. Analytical method for appreciation of garlic therapeutic potential and for validation of a new formulation, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005, (37): 963- 970 .

(上接第 40 页)也较丰富。草原红牛是有计划地引入优秀国外品种与本地蒙古牛杂交而育成的培育品种, 通过有效的选择和淘汰, 在保持本地蒙古牛的优秀遗传物质基础上又吸收了国外品种的优秀基因, 从而造成了草原红牛有较高的遗传多样性。夏洛来牛、西门塔尔牛和利木赞牛属国外优秀品种, 经过长期近交和人工选育产生基因分离并使部分等位基因丢失, 座位多态性降低, 从而使多态信息含量降低。当位点不多、多态性不高时相应的样本群体需要较大的取样个体数目。由于长期的近交和人工选育产生近交分化, 群体中不断淘汰不利基因, 纯化有利基因, 使群体基因型趋于一致和纯合, 而导致了遗传基因多样性的低水平。

3.2 5 个群体间的亲缘关系分析

关于群体间遗传距离, 从遗传学观点来看, 遗传距离最适宜测度应是单位长度核苷酸或密码子的差数, Nei 提出了一个从大量位点基因频率数据估算每个位点平均密码子差数的统计方法。群体间遗传距离是测定不同群体亲缘关系的标准, 弄清群体间亲缘关系远近又对了解群体间的分化程度、利用杂种优势理论指导实际生产有着重要意义。本实验通过计算出 5 个品种牛间的遗传距离, 从表 4 可以看出, 草原红牛与蒙古牛间遗传距离最近, 仅有 0.278 6; 与夏洛来牛的遗传距离为 0.305 9; 与利木赞牛的遗传距离为 0.389 2; 与西门塔尔牛的遗传距离最大, 为 0.418 4。证实了草原红牛是由蒙古牛培育而成的, 故草原红牛先和蒙古牛聚为一类, 再与夏洛来聚为一类, 然后再与利木赞聚为一类, 最后与西门塔尔聚为一类。查阅历史文献可知, 以上结果与实际育种事实相符。草原红牛是由短角牛和蒙古牛培育而成的。夏洛来牛原产于法国中部、西部、东南部, 1850 年从英国引入白短角牛进行杂交。利木赞原产于法国中部, 1850 年开始培育。由于地理位置缘故, 夏洛来和利木赞二者亲缘较近。而西门塔尔牛原产于阿尔卑斯山区, 以瑞士西部居多。公元前 5 世纪, 瑞典向瑞士西方移民, 带来勾特牛, 经与当地牛杂交和

选育, 培育成现代品种, 由于离中国距离较远故与草原红牛遗传距离也最远。

4 结 论

本研究以草原红牛、蒙古牛、夏洛来牛、利木赞牛和西门塔尔牛等 5 个群体为研究对象, 经过牛血液或肝脏基因组 DNA 的提取、8 对微卫星引物的 PCR 扩增、扩增产物的聚丙烯酰胺电泳分型、PPAP3.0 和 SPSS10.0 软件分析等步骤分析了各位点等位基因大小、基因频率、标记基因型、多态信息含量和杂合度。结果表明: 8 个微卫星位点均属于高度多态性位点, 用于微卫星的遗传标记研究是较理想的; 草原红牛与西门塔尔牛之间遗传距离最大, 为 0.418 4; 与蒙古牛之间遗传距离最小, 为 0.278 6, 与夏洛来牛、利木赞牛遗传距离分别是 0.305 9 和 0.389 2。故草原红牛先和蒙古牛聚为一类, 再与夏洛来牛聚为一类, 然后再与利木赞牛聚为一类, 最后与西门塔尔牛聚为一类。

参考文献:

- [1] Botstein D, White R L, Skolnick M H, et al. Construction of a genetic linkage map on men using restriction fragment length polymorphisms *Am.J.Hum.Genet.*, 1980, (32): 314- 331 .
- [2] Valsangiacom, C.Baggi, F.GainV., et al. Use of amplified fragment length polymorphism in molecular typing of *Legionella pneumophila* and application to epidemiological studies *Clin. Microbiol.*, 1995, 33: 1717- 1719 .
- [3] 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]. 吉林农业大学学报, 2000(4): 5- 10 .
- [4] J.萨姆布鲁克, E F 佛里奇, 等著(美), 金冬燕, 黎孟枫, 等译. 《分子克隆实验指南》第二版. 北京: 科学出版社, 1999, 188- 197 .
- [5] Wetton J H. Demographic study of a wild house sparrow population by DNA fingerprinting. *Nature*, 1987, 327: 147- 149 .
- [6] Jongeneel, CV. A polymorphic microsatellite in the tumor necrosis factor alpha promoter identifies an allele unique to the NZW mouse strain. *Experimental Medicine*, 2003, 171(6): 2141- 2146 .
- [7] Van Zeveren A, Peelman L, Van de Weghe A, et al. A genetic study of four Belgian pig population by means of seven microsatellite loci. *J Anim Breed Gent*, 1995, 112(3): 191- 204 .