

文章编号: 1003- 8701(2008)05- 0044- 05

# 草原红牛微卫星标记的研究

李向阳<sup>1</sup>, 张国梁<sup>2\*</sup>, 胡成华<sup>2</sup>, 赵玉民<sup>2</sup>, 张嘉保<sup>3\*</sup>

(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 头作为试验牛群体, 经过牛血液基因组 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、计算机凝胶成像分析系统分析各位点等位基因及全部个体的标记基因型、PPAP3.0 软件计算基因频率、多态信息含量(PIC)和杂合度等步骤从分子水平上分析了草原红牛在 8 个位点的遗传多态性。结果表明, IDVGA2、IDVGA46、TGLA44、BM1824、ETH225、BM2113、IDVGA44 和 IDVGA55 等位基因数分别为 6、6、6、4、4、2、6 和 4, 多态信息含量分别为 0.722 3、0.749 3、0.671 3、0.584 9、0.671 5、0.508 9、0.761 2 和 0.596 5, 这 8 个位点均为高度多态位点。8 个位点作为遗传标记应用于草原红牛遗传育种研究是可行的。

**关键词:** 草原红牛; 微卫星; 标记

中图分类号: S823.2

文献标识码: A

## Studies on Polymorphism of Microsatellite Marker in Steppe Red Cattle Population

LI Xiang- Yang<sup>1</sup>, ZHANG Guo- liang<sup>2</sup>, HU Cheng- hua<sup>2</sup>, ZHAO Yu- min<sup>2</sup>, ZHANG Jia- Bao<sup>3</sup>

(1. Inner Mongolia National University, Tongliao 028042;

2. Branch of Animal Husbandry, Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, Gongzhuling 136100

3. JiLin University, Changchun 130062, China)

**Abstract:** In this study, a group of 30 Steppe Red Cattle (SRC) individuals 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. The results showed that the number of alleles in IDVGA2, IDVGA46, TGLA44, BM1824, ETH225, BM2113, IDVGA44 and IDVGA55 was 5, 4, 3 and 4, and the polymorphism information content (PIC) was 0.5420, 0.6736, 0.5218 and 0.5750, respectively. These loci were high polymorphic loci. The number of alleles in BM2113, BM1824, IDVGA55 and TGLA44 was 6, 6, 6, 4, 4, 2, 6 and 4, and PIC was 0.7223, 0.7493, 0.6713, 0.5849, 0.6715, 0.5089, 0.7612 and 0.5965, respectively. They were high polymorphic loci. As genetic marker, the 8 loci can be used in the study of genetics and breeding of Grassland Red Cattle.

**Key words:** Steppe Red Cattle; Microsatellite; Marker

收稿日期: 2008- 04- 25

基金项目: 国家 863 项目(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, 男, 博士, 教授, E- mail: zjb515@163.com

张国梁, 男, 研究员, E- mail: zgl777777@163.com

草原红牛是我国建国后培育的第一个乳肉兼用型品种, 具有生长发育快、生产性能高、适应北方寒冷地区气候条件、耐粗饲、抗逆性强、遗传力稳定、肉质鲜嫩、风味独特和泌乳性能强等优良特性。草原红牛是发展我国特色牛肉产业, 增强牛肉及相关产品的国际竞争力, 发展我国肉牛产业的

品牌优势所在。

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)<sub>n</sub>、(CGA)<sub>n</sub>、(GACG)<sub>n</sub> 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, 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。因此, 利用微卫星标记技术研究草原红牛遗传多态性, 为其育种及肉用性能改良提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验牛样品: 本试验选用草原红牛(30 头)血液或肝脏采自吉林省农业科学院畜牧分院, EDTA 抗凝, -20 保存备用。

主要试剂: Taq DNA 聚合酶、8 对微卫星引

物、4 × d NTP、PCR Buffer(含 Mg<sup>2+</sup>)、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、溴化乙啶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。

主要仪器: 高速冷冻离心机、核酸测序电泳仪、DYY-3 型电泳仪、UV-254 暗箱式紫外透射仪、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

基因组 DNA 的提取参照《分子克隆实验指南》第二版[2], 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[3], 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 <sup>2+</sup> 浓度	退火温度
IDVGA2 (D2S7)	GTAGACAAGGAAGCCGCTGAGG GAGAAAAGCCAAGACGCCAGACC	2q45	0.75	60
IDVGA46 (D19S18)	AAATCCTTTCAAGTATGTTTTCA ACTCACTCCAGTATTCTTGCTG	19q16	1.5	50
TGLA44 (D2S3)	AACTGTATATTGAGAGCCTACCATG CACACCTTAGCGACTAAACCCACCA	2q	1.5	60
BM1824 (DI S34)	GTTCAGGACTGGCCCTGCTAAACA CCTCCAGCCACTTTCTCTTCTC	5q	1.5	59
ETH225 (D9S1)	GATCACCTTGCCACTATTTCTC ACATGACAGCCAGCTGCTACT	9q	1.5	68
BM2113 (D2S26)	GCTGCCCTTCTACCAAATAACC 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 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。

#### 1.2.6 微卫星标记的统计量分析

利用 PPAP3.0 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。

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。

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)。

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

其中  $P_i$  和  $P_j$  为第  $i$  和第  $j$  个等位基因。

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(unweighted 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”<sup>[4]</sup>, 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<sup>[5]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因组 DNA 提取结果

对采集的牛血液或肝脏, 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 19 kb 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(图 1)。

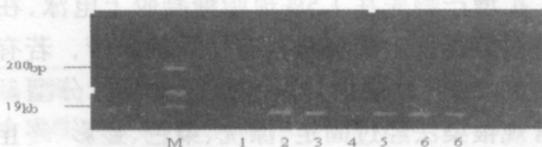


图 1 DNA 提取结果

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

#### 2.2.1 扩增产物琼脂糖电泳检测结果

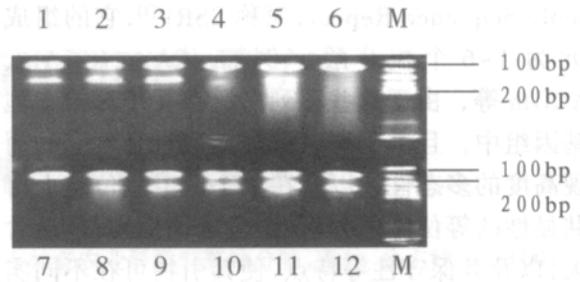


图 2 草原红牛扩增产物在 1.5%琼脂糖凝胶电泳图谱  
1~12 号为草原红牛, M 为分子量标记物

图 2 是部分 PCR 产物 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测图片。结果显示 PCR 扩增产物大小和质量均符合要求, 可以进一步用 8%聚丙烯酰胺凝胶分析牛个体的标记基因型。

#### 2.2.2 扩增产物聚丙烯酰胺电泳检测结果

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, 以 TGLA44 电泳图为例来说明(图 3)。

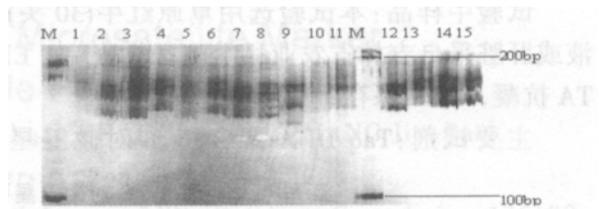


图 3 TGLA44 部分扩增图谱

1~15 为草原红牛, M 为标记物(SD002)

#### 2.2.3 统计分析结果

##### 2.2.3.1 基因频率、多态信息含量(PIC)、杂合度(H)分析

根据电泳图谱统计各位点的等位基因数、基因型, 用 PPAP 软件计算各位点各等位基因频率、平均多态信息含量和杂合度(表 2 和表 3)。

##### 2.2.3.2 草原红牛 30 个个体亲缘关系树状聚类图

运用 SPSS10.0 软件中的聚类分析, 按照组内距离法(within group)、最近邻法(nearest neighbor)、最远邻法(furthest neighbor)3 种聚类方法, 绘制了 30 个个体亲缘关系树状聚类图(图 4~6)。通过对 3 个树状聚类图的分析比较, 其结果与 30 头草原红牛的实际亲缘关系相符。

### 2.3 微卫星位点多态性

#### 2.3.1 微卫星位点等位基因及基因型

由表 2 分析可见, 草原红牛 8 对微卫星位点

等位基因数为 2~6 个, IDVGA2、IDVGA46、TGLA44 和 IDVGA44 最多均为 6 个, BM2113 位点最少仅有 2 个。各位点等位基因变异范围为: IDVGA2, 205~215 bp、IDVGA46, 203~249 bp、

TGLA44, 203~213 bp、BM1824, 207~215 bp、ETH225, 141~147 bp、BM2113, 128~130 bp、IDVGA44, 211~221 bp、IDVGA55, 207~213 bp。

2.3.2 微卫星位点的群体杂合度、多态信息含量

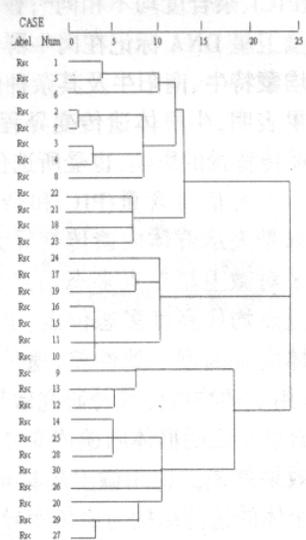
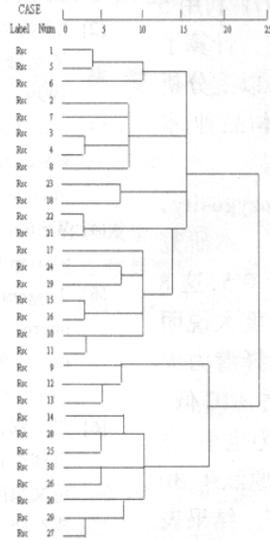
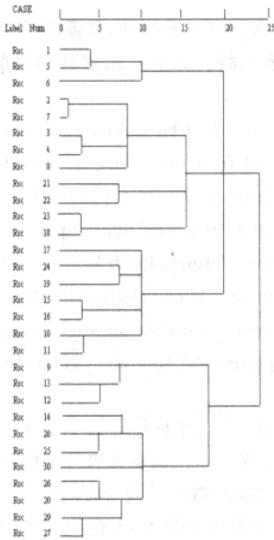


图 4 30 个个体间的亲缘关系树状图 (组内距离法) 图 5 30 个个体间的亲缘关系树状图 (最近邻法) 图 6 30 个个体间的亲缘关系树状图 (最远邻法)

表 2 草原红牛 8 个微卫星位点等位基因大小及频率

微卫星位点		等位基因					
		A	B	C	D	E	F
IDVGA2	大小	205 bp	207 bp	209 bp	211 bp	213 bp	215 bp
	频率	0.038 5	0.192 3	0.307 7	0.307 7	0.076 9	0.076 9
IDVGA46	大小	203 bp	205 bp	207 bp	211 bp	245 bp	249
	频率	0.285 7	0.214 3	0.035 7	0.142 9	0.071 4	0.250 0
TGLA44	大小	203 bp	205 bp	207 bp	209 bp	211 bp	213 bp
	频率	0.071 4	0.428 6	0.035 7	0.250 0	0.178 6	0.035 7
BM1824	大小	207 bp	209 bp	211 bp	213 bp	215 bp	
	频率	0.500 0	0.142 9	0.071 4	0.285 7	0.000 0	
ETH225	大小	141 bp	143 bp	145 bp	147 bp		
	频率	0.366 7	0.266 7	0.133 3	0.233 3		
BM2113	大小	128 bp	130 bp				
	频率	0.512 8	0.487 2				
IDVGA44	大小	211 bp	213 bp	215 bp	217 bp	219 bp	221 bp
	频率	0.357 1	0.142 9	0.142 9	0.142 9	0.107 1	0.107 1
IDVGA55	大小	207 bp	209 bp	211 bp	213 bp		
	频率	0.233 3	0.200 0	0.066 7	0.500 0		

表 3 8 个微卫星位点在草原红牛中的遗传特性

微卫星位点	多态信息含量	杂合度	微卫星位点	多态信息含量	杂合度
IDVGA2	0.722 3	0.733 7	ETH225	0.671 5	0.615 8
IDVGA46	0.749 3	0.660 2	BM2113	0.508 9	0.417 4
TGLA44	0.671 3	0.700 1	IDVGA44	0.761 2	0.728 4
BM1824	0.584 9	0.630 2	IDVGA55	0.596 5	0.615 3
各位点均值	0.658 23	0.695 3			

表 3 列出了草原红牛 8 个微卫星位点的多态信息含量。IDVGA2、IDVGA46、TGLA44、BM1824、ETH225、BM2113、IDVGA44 和 IDVGA55 多态信息含量分别为 0.722 3、0.749 3、0.671 3、0.584 9、0.671 5、0.508 9、0.761 2 和 0.596 5, 这 8 个位点均为高度多态位点, 草原红牛在这 8 个微卫星位点

的变异较大。从 8 个位点的杂合度来看, IDVGA2 最高为 0.733 7, 说明这个位点的变异性最高; BM1824 最低为 0.417 4, 此位点的变异性较低。

3 讨 论

8 对微卫星位点在草原红牛群体中所检测到的

等位基因数、多态信息含量(PIC)、杂合度是不同的,这与相关研究结果相一致。王栋等(2000)利用4种微卫星标记对5个牛品种进行遗传结构与遗传变异分析,也得到了不同位点的等位基因数、多态信息含量(PIC)、杂合度均不相同<sup>[6]</sup>;曹红鹤等(1997)<sup>[7]</sup>利用5种微卫星DNA标记在肉牛群体中的研究,计算了皮埃蒙特牛、南阳牛及其杂种的PIC值。以上分析结果表明,牛群体遗传变异程度既受群体(品种)本身遗传背景的影响,也受所选位点的影响。

多态信息含量(PIC)和杂合度(heterozygosity, H)都是表示群体内遗传变异大小的测度。本研究中8对微卫星位点多态信息含量均大于0.5,这8对位点均属高度多态位点。PIC高、杂合度大说明群体内基因型一致性差,遗传变异大,选择潜力大,应用于动物遗传育种研究效果就好;反之,PIC低、杂合度小说明群体内遗传变异小,选择潜力也小,应用效果就差。应用微卫星标记技术对草原红牛30个个体的遗传结构与遗传变异进行了研究。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。本研究所采用的

微卫星标记技术应用于草原红牛遗传育种研究是可行的。

参考文献:

- [1] Lowe AJ. Plant Genetic Resource Newsl, 2003 (107): 50-54.
- [2] 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 [M]. 第二版, 北京: 北京科学出版社, 1999, 188-197.
- [3] Van Lith HA, Van Zutphen LF. Characterization of rabbit DNA microsatellite extracted from the EMBL nucleotide sequence database. Amim. Genet. 1996, 27(6): 387-95.
- [4] Wetton J H. Demographic study of a wild house sparrow population by DNA fingerprinting. Nature, 1987(327): 147-149.
- [5] 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.
- [6] 王栋, 曹红鹤, 吴伟, 等. 微卫星标记对五个中外牛品种群体遗传结构的研究 [A]. 第七次全国畜禽遗传结构研讨会论文集[C]. 2000, 3: 170-174.
- [7] 曹红鹤, 王雅春, 陈幼春. 五种微卫星DNA标记在肉牛群体中的研究[J]. 中国农业科学, 1999, 32(1): 69-73.

(上接第29页)

通过大量田间试验得出,玉米施用磷肥最大效益与最高产量施用量同土壤有效磷测得值的函数模式分别为  $Y=100.16-1.2506X(R^{**}=-0.8002)$  和  $Y=117.47-1.2966X(R^{**}=-0.7642)$ 。依据上述两个方程,针对全省土壤有效磷含量状况,提出了玉米施用磷肥最大效益与最高产量的建议施磷( $P_2O_5$ )量。

通过全省土壤有效磷含量不同(2.1~81.2 mg/kg)的白浆土、黑土和淡黑钙土,74个玉米磷肥量级试验得出:74组玉米施用磷肥最大效益与最高产量用量及其变幅(0~109.5 kg/hm<sup>2</sup>与10.1~125 kg/hm<sup>2</sup>)。这74组磷肥最佳用量均随着供试土壤有效磷含量的升高成规律性降低。说明所取得的结果,具有较好的代表性、规律性与可靠性。

在74个磷肥量级的田间试验中,有68个试验所获得的磷肥最大效益与最高产量施磷( $P_2O_5$ )量,同磷肥推荐量之差仅仅为-11.4~16.8 kg/hm<sup>2</sup> (-14.7%~15.3%)与-11.2~17.5 kg/hm<sup>2</sup>

(-13.1%~13.9%)。可见,磷肥最大效益与最高产量用量同磷肥推荐量的吻合程度较好,吻合率已高达92%,准确程度远远超过目标产量法(50%~56%);其精度也远远超过目标产量法[-50%(诊断半量)~100%(诊断倍量)]。如此看来,应用土测值直接推荐磷肥最佳用量法是准确程度与精度较高,简便易行,覆盖范围较广的一种测土推荐施肥较好的方法。

参考文献:

- [1] 张大光,刘武仁,等.玉米测土施肥中几个重要参数及其应用的研究[J].吉林农业科学,1987(1):58-63.
- [2] 马惠杰,潘巨文,等.风沙土玉米氮磷化肥施用量及配方施肥有关参数的研究报告[J].吉林农业科学,1989(3):64-68.
- [3] 赵英淑.延边地区土壤有机质氮磷含量之间相关关系[J].吉林农业科学,1989(2):58-60.
- [4] 谢佳贵,王立春,等.优质玉米喜肥特性与施肥效益研究[J].玉米科学,2006,14(6):131-133.
- [5] 张宽,王秀芳.玉米吸肥能力与喜肥程度对化肥效应的影响及其分级[J].玉米科学,1999,7(1):65-71.