

内(如家系)针对某些性状若干世代的选择,以达到改良被选性状的目的。有关多世代选择最早的报道是源于1965年在法国开始的一个试验:采用候选基因法,梅山合成系初产猪AA和BB基因型间的差异是2.3头,差异产生的生理原因尚未探明,很多学者参照Rothschild的方法对ESR和FSH β 基因在产仔性状上的影响开展了相关研究^[8-9]。

4.3 阶段性成果的取得

5世代后备母猪第1胎窝总产仔数为(10.94 $\pm$ 0.11)头,进展为9.73%;窝产活仔数为(10.66 $\pm$ 0.12)头,进展为13.23%;初生窝重为(12.98 $\pm$ 0.13)kg,进展为28.13%;21日龄窝重为(54.31 $\pm$ 0.89)kg,进展为18.04%。说明对高产仔大白猪母系2个核心群几个世代的选育,已经取得了一定的进展。

参考文献:

- [1] 彭中镇,曹胜炎,杨兴柱,等.猪的遗传改良[M].北京:农业出版社,1994.
- [2] WEI M, HAMV E. Effect of estrogen receptor(ESR) locus litter size

of pigs: proceedings of international conference on animal biotechnology [M]. Beijing: International Academic Publishers, 1997.

- [3] 赵要风,李宁,肖璐,等.猪FSH β 亚基因结构区逆转座子插入突变及其与猪产仔数关系的研究[J].中国科学:C辑,1999,29(1):81-86.
- [4] 李凤娥,熊远著.卵泡刺激素基因研究概况[J].猪与禽,2001(1):35-37.
- [5] 萨姆布鲁克J,弗里奇E F,曼尼阿蒂斯T.分子克隆[M].金冬雁,黎孟枫,译.2版.北京:科学出版社,1998.
- [6] SHORT T H, ROTHCHLID M F, SOUTHWOOD O I, et al. Effect of the estrogen receptor locus on reproduction and production traits in four commercial pig lines[J]. Anim Sci, 1997, 75: 3138-3142.
- [7] 颜华,王立贤,王立刚,等.六个候选基因多态性与母猪繁殖性状关联分析[J].农业生物技术学报,2009,17(2):249-255.
- [8] 张淑君,熊远著,邓昌彦,等.卵泡刺激素受体基因作为产仔数候选基因的研究[J].华中农业大学学报,2002,21(6):506-508.
- [9] AITOMAKI K. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene cause heredity hypergonadotropic ovarian failure [J]. Cell, 1995, 82: 959-968.

(015)

利用DNA池对3个山羊品种CXCL10基因多态性的研究

陈 志 李敬瑞 刘若余 张依裕 罗卫星 蔡惠芬

(贵州大学 动物科学学院高原山地动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室 贵阳 550025)

中图分类号:S813.3

文献标识码:B

文章编号:1004-7034(2012)01-0044-03

关键词:DNA池;CXCL10基因;单核苷酸多态性(SNPs)

摘 要:为了研究3个山羊品种(黔北麻羊、内蒙古绒山羊、关东奶山羊)CXCL10基因多态性,试验采用构建DNA池并直接对其测序的方法进行分析。结果表明:快速筛查到2个与繁殖性能相关的单核苷酸多态性(T-131-C, G-661-A)。进一步利用测序图中的SNP等位基因峰高的比值估算各山羊品种等位基因的频率。

CXCL10又称干扰素诱导蛋白(IP-10),是CXC趋化因子家族成员,是指在外源性(脂多糖等)和内源性炎性因子(白介素、干扰素 α 、干扰素 γ 等)刺激下,由成纤维细胞、内皮细胞、树突状细胞、脂肪细

胞^[1-2]等多种细胞分泌、表达的细胞因子。根据国内外的研究表明,CXCL10趋化因子与繁殖性状相关。DNA池技术是近几年才开始探讨试用的方法,最早报道见于1989年,20世纪90年代中期研究较多^[3]。DNA池技术是指提取具有某一共同特征群体的部分个体DNA后,经过定量稀释成一定浓度后,按比例或等量混合构成一个池。这种混合DNA样品的某些多态位点经PCR扩增后,其产物经过琼脂糖凝胶电泳或聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)结合测序等方法,绘制等位基因型(AIPs)并估算等位基因频率等,确定该位点某一等位基因与有关性状的相关性。

1 材料

收稿日期:2011-05-23;修回日期:2011-06-19

基金项目:贵州省农业科技攻关项目(黔科合NY字(2008)3044)

作者简介:陈 志(1987-),男,硕士研究生,chenzhijerom@163.com.

通信作者:罗卫星(1958-),男,副教授,本科,ef.wxluo@gzu.edu.cn.

63只黔北麻羊血样,采自贵州省习水县温水镇目里村黔北麻羊保护区;37只内蒙古绒山羊,采自内蒙古阿拉善盟;50只关中奶山羊,采自陕西省富平县。采集颈静脉血8 mL,装在真空采血管中。快速振荡混匀,放入冰盒中带回实验室,于-40℃冰箱保存,备用。

DNA提取试剂盒、2×Taq PCR Master Mix试剂,均购自天根生化科技(北京)有限公司。

2 方法

2.1 基因组DNA提取

采用DNA提取试剂盒提取基因组DNA,从同一品种山羊DNA样品中各取5 μL混合,构建品种DNA池。

2.2 引物设计和PCR反应

到目前为止没有山羊CXCL10基因的全序列,故采用与之同源性较高的牛全序列设计引物。根据NCBI上牛的CXCL10基因组序列(GenBank登录号为NM_001046551)用Primer Premier 5.0软件设计引物,扩增该基因目的序列,引物由上海英俊生物技术有限公司合成,引物序列见表1。

表1 引物序列、退火温度及目的片段长度

引物	目的片段长度/bp	退火温度/℃	引物序列
c-1	815	54	F 5'-TTGAAACAAAGGAGGGAGAG-3' R 5'-AGCAGAGGACATTAGCACAG-3'
c-2	1 169	54	F 5'-GGTGTCTCTTGTGTTGGTAT-3' R 5'-TTCTTTGGCTGTGGATTCTC-3'

利用构建的DNA池进行PCR反应。反应体系(50 μL):基因组DNA 4 μL,10 pmol/μL上、下游引物各3 μL,2×Taq PCR Master Mix试剂25 μL,三蒸水15 μL。PCR扩增体系:94℃预变性4 min;94℃变性60 s,54℃退火60 s,72℃延伸70 s,共35个循环;72℃延伸10 min。PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳。

2.3 测序和Blast分析

将特异性好、产量高的PCR产物委托北京诺赛基因组研究中心有限公司进行纯化测序(双向测序)利用DNASTar统计软件对测序结果进行Blast分析确定单核苷酸多态性(SNPs)。

2.4 测序图峰高测量及等位基因频率估算

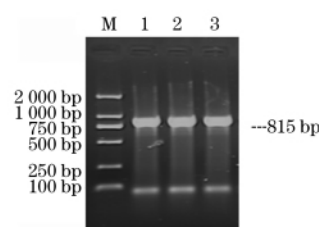
利用测序图看图软件Chromas.exe和MwSnap中的标尺,测量各SNP等位基因相应的峰高。理论上SNP可以为二、三、四等位基因,但实际上在人中一般为二等位基因^[4],因此采用峰高比值估算等位基因频率具有普遍的适用性^[5],根据以下公式估算基因频率: $f_i = h_i / (h_1 + h_2)$ ($i = 1, 2$),其中 f_i 为SNP

位点某等位基因的频率, h_1 和 h_2 分别为测序图上该SNP等位基因1、2峰的高度。

3 结果与分析

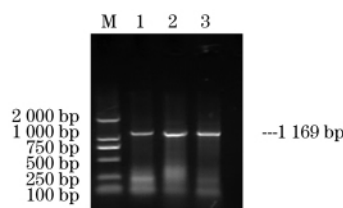
3.1 PCR扩增结果

PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测,分别在815 bp和1 169 bp处出现1条清晰的DNA条带,与预期片段大小一致(见图1、图2)。



M. DL-2 000 Marker; 1. 黔北麻羊 CXCL10 基因扩增结果;
2. 内蒙古绒山羊 CXCL10 基因扩增结果; 3. 关中奶山羊 CXCL10 基因扩增结果。

图1 CXCL10 基因第1条引物PCR扩增结果



M. DL-2 000 Marker; 1. 黔北麻羊 CXCL10 基因扩增结果;
2. 内蒙古绒山羊 CXCL10 基因扩增结果; 3. 关中奶山羊 CXCL10 基因扩增结果。

图2 CXCL10 基因第2条引物PCR扩增结果

3.2 测序结果分析

以黔北麻羊、内蒙古绒山羊、关中奶山羊3个品种DNA池为原料,利用试验自行设计的引物经过PCR反应后测序,用Seqman软件分析,发现2个SNPs:第1内含子131 bp处胸腺嘧啶(T)→胞嘧啶(C)的碱基转换(见图3)和第4外显子661 bp处腺嘌呤(A)→鸟嘌呤(G)的碱基转换(见图4),导致该基因编码的蛋白质氨基酸由苏氨酸(Thr)转变为丙氨酸(Ala)。

3.3 测序峰高比值估算SNPs等位基因频率估算结果

分别测量3个山羊品种中1个SNPs等位基因相应的高峰,根据公式估算T-131-C和G-661-A的频率,见表2。

4 讨论

黔北麻羊是贵州优良的地方山羊品种,主产于贵州北部的习水县和仁怀市,分布于赤水市西南部、遵义县西北部,邻近的桐梓县和金沙县也有少量分布,

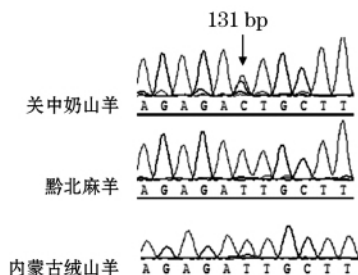


图3 CXCL10 基因在第1内含子131 bp处发生突变

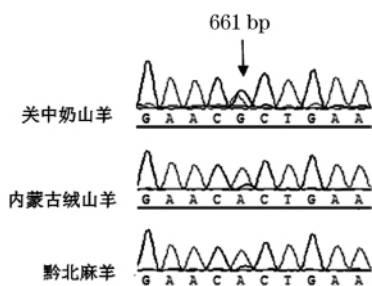


图4 CXCL10 基因在第4外显子661 bp处发生突变

表2 3个山羊品种的SNPs等位基因频率估算结果

品种	T-131-C处等位基因频率		G-661-A处等位基因频率	
	T-131	C-131	G-661	A-661
黔北麻羊	1	0	1	0
内蒙古绒山羊	1	0	1	0
关中奶山羊	0.386	0.614	0.597	0.403

是产区劳动人民长期选育和自然选择的产物,对当地的自然生态条件具有良好的适应性。黔北麻羊具有适应性强、耐粗饲、繁殖率高、产肉性能良好、膻味轻、肉质鲜美可口、板皮品质优良等特点^[6]。关中奶山羊是我国培育的优良奶山羊品种,它由沙能羊和陕西本地山羊杂交选育而成,主要分布在关中川原地区。因其抗病力强、耐粗饲、易于饲养管理、产奶性能稳定、产奶量高,是山区农民以草换肉、发家致富重要的山羊品种资源^[7]。内蒙古绒山羊是我国优秀的绒山羊品种,其以绒毛品质好、产量高,在动物生产中享有重要地位^[8]。研究以有明显差异的山羊品种为材料,利用DNA池和测序技术,成功地在CXCL10基因编码序列中找出可能与繁殖相关的2个SNPs(T-131-C, G-661-A)。第1内含子131 bp处T→C

的碱基转换和第4外显子661 bp处A→G的碱基转换,导致该基因编码的蛋白质氨基酸由苏氨酸(Thr)转变为丙氨酸(Ala),并估算了其SNPs的等位基因频率。

研究利用DNA池技术快速、有效地筛查到可能的关键SNPs,并通过估算基因频率初步了解SNPs在不同群体中的分布情况以及预测SNPs可能的效用价值^[9]。随着人类基因组计划的不断进行,应用DNA池进行大规模基因组分析,特别是功能基因的相关分析,是快速筛查和初步诊断相关基因的有效方法,同时这种方法也可用于致病基因的筛查等。但DNA池技术也存在其他方面的不足:利用这种方法进行基因频率估算也存在一定偏差,同时PCR扩增产物(特别是二核苷酸重复序列)会出现优先扩增和差异扩增现象。针对这些缺点有学者提出若干解决方法,如估算的准确性在很大程度上依赖于DNA池构建过程中DNA定量的精确性,如果测定DNA浓度的仪器越精密,那么估算的频率也就越准确。再者通过与自动化热启动,可提高产物的产量和特异性。相信随着基因技术的不断完善,DNA池技术的应用将会更广泛。

参考文献:

- [1] HERDER C, HAUNER H, KEMPF K et al. Constitutive and regulated expression and secretion of interferon- γ -inducible protein 10 (IP-10/CXCL10) in human adipocytes [J]. *Int J Obes*, 2007, 31(3): 403-410.
- [2] 段波峰, 郑维. CXCL10/CXCR3与乳腺癌关系的研究进展[J]. *医学临床研究*, 2010, 27(8): 1490-1492.
- [3] 董大跃, 伍新尧. 混合DNA样品池应用的研究[J]. *国外医学: 临床生物化学与检验学分册*, 2000, 21(2): 59-61.
- [4] BROOKES A J. The essence of SNPs [J]. *Gene*, 1999, 234: 177-186.
- [5] SHIFMAN S, PISANTE-SHALOM A, YAKIR B et al. Quantitative technologies for allele frequency estimation of SNPs in DNA pools [J]. *Mol Cell Probes*, 2002, 16: 429-434.
- [6] 贵州省畜禽品种志编辑委员会. 贵州省畜禽品种志[M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 1993.
- [7] 邓书湛, 刘若余. 关中奶山羊线粒体Cytb基因遗传多样性研究[J]. *现代农业科技: 动物科学*, 2010(2): 326-327.
- [8] 李长青, 尹俊, 李玉荣, 等. 内蒙古绒山羊与辽宁绒山羊毛囊周期性变化的研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(7): 674-679.
- [9] BANSAL A, VanDEN B D, KAMMERER S et al. Association testing by DNA pooling: an effective initial screen [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2002, 99(26): 16871-16874.

(015)