

豫西脂尾羊微卫星 DNA 多态性研究

白俊艳 庞有志 赵淑娟 雷雪芹 李广录 李 魏

(河南科技大学 动物科技学院 河南 洛阳 471003)

中图分类号: S813.9

文献标识码: B

文章编号: 1004-7034(2012)01-0047-02

关键词: 豫西脂尾羊; 微卫星位点; 遗传多样性

摘 要: 为了分析 5 个微卫星位点 BL1038、BM757、BM4621、OarFCB304、OarFCB48 在豫西脂尾羊群体中的多态性, 试验采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳方法检测其多态性。结果表明: 在豫西脂尾羊群体中共发现 5 个微卫星位点有 60 个等位基因, 有效等位基因(Ne) 在 6.010 3 ~ 10.846 8 之间, 平均 Ne 为 8.430 3, OarFCB48 的 Ne 最高为 10.846 8; 5 个微卫星位点的平均杂合度(H) 为 0.876 7, OarFCB48 的 H 最高为 0.907 8。微卫星位点 OarFCB48 的多态信息含量(PIC) 最高为 0.902 1, BM757 的 PIC 最低为 0.817 5, 平均 PIC 为 0.866 5。说明豫西脂尾羊群体属于 PIC 较高的遗传群体。

豫西脂尾羊是一个古老的地方品种, 属皮肉兼用型, 1986 年被收录于《河南省地方优良畜禽品种志》。产区优越的自然环境和丰厚的饲草资源为豫西脂尾羊的养殖提供了得天独厚的条件。长期人工、自然的选育使豫西脂尾羊具有耐粗饲、抗病性强、易育肥、肉质鲜美、色正味佳等特点^[1]。豫西脂尾羊胴体丰满、肉质细嫩、脂肪分布均匀, 1 岁以上的平均屠宰率为 50.5%, 平均净肉率为 41.1%。豫西脂尾羊每年剪毛 2~3 次, 一般在 5 月上、中旬和 9 月中、下旬进行, 每只公羊年产毛量为 2.0 kg, 母羊年产毛量为 1.4 kg, 毛质细密, 质量好; 繁殖率高、性成熟早, 母羊多为 1 年 1 胎, 也有 1 年 2 胎。研究对豫西脂尾羊微卫星位点的多态性进行研究, 为豫西脂尾羊品种资源的保护及合理利用提供理论依据, 为豫西脂尾羊的选育和利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 血液采集与 DNA 提取

由河南省洛阳市偃师市五龙村提供的豫西脂尾羊 40 只, 采集羊只颈静脉血液 10 mL, 采用 ACD 抗凝(1:6), -20℃ 保存。基因组 DNA 提取按照全血 DNA 试剂盒(型号为 SK1262)(上海生工生物工程技术服务有限公司生产)说明书进行, 提取后的 DNA 于 -20℃ 保存, 备用。

1.2 微卫星位点的选择

采用 FAO 推荐微卫星引物, 共 5 对(见表 1), 在

GenBank 上查得, 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

表 1 引物的选择与合成

位点	引物序列	退火温度/℃
BM757	Forward Primer 5'-TGGAACAATGTAAACCTGGG-3'	58
	Reverse Primer 5'-TTGAGCCACCAAGGAACC-3'	
BL1038	Forward Primer 5'-GGCAAGCTAGACTCAGACACG-3'	60
	Reverse Primer 5'-GCAAAAGTCTAGGTGAAATGCC-3'	
OarFCB304	Forward Primer 5'-CCCTAGGAGCTTTCAATAAGAATCGG-3'	56
	Reverse Primer 5'-CGCTGCTGTCAACTGGCTCAGG-3'	
BM4621	Forward Primer 5'-CAAAATGACTTATCCTTGGCTG-3'	58
	Reverse Primer 5'-TGTAACATCTGGGCTGCATC-3'	
OarFCB48	Forward Primer 5'-GACTCTAGAGGATCGCAAAGAACCAG-3'	58
	Reverse Primer 5'-GAGTACTACAAGGATGACAAGAGGCAC-3'	

1.3 PCR 反应条件与反应体系

PCR 扩增程序: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 56~60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 30 个循环; 72℃ 延伸 7 min, 4℃ 保存。PCR 扩增反应体系(15 μL): 10× Buffer 1.5 μL, 4× 2.5 mmol/L dNTP 1.2 μL, 10 μmol/μL 正、反向引物各 0.3 μL, 100 ng/μL 模板 DNA 1.0 μL, 5 U/μL Taq 聚合酶 0.3 μL, 双蒸水 10.4 μL。

1.4 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

将 PCR 产物在 10% 非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 稳压 150~180 V, 电泳 6~8 h, 电泳结束后进行固定、硝酸银染色、显影等, 然后用凝胶成像系统拍照。

1.5 统计分析

采用 Excel 计算等位基因频率、等位基因长度的

收稿日期: 2011-05-06; 修回日期: 2011-06-03

基金项目: 河南省科技攻关项目(0624230021); 河南科技大学博士科研启动基金项目(09001094)

作者简介: 白俊艳(1975-), 女(蒙古族), 副教授, 博士, jun-yanbai@163.com.

范围。采用 Dispan 软件计算多态信息含量(PIC)、平均杂合度(H)、有效等位基因数(Ne)。

2 结果(见表 2、表 3)与分析

表 2 微卫星位点的等位基因长度及频率

序号	BL1038		BM757		BM4621		OarFCB304		OarFCB48	
	长度/bp	频率	长度/bp	频率	长度/bp	频率	长度/bp	频率	长度/bp	频率
1	101	0.144 8	155	0.033 3	93	0.017 9	140	0.021 3	127	0.045 8
2	125	0.085 9	170	0.050 0	104	0.071 4	146	0.035 6	131	0.054 2
3	127	0.083 6	177	0.066 7	107	0.053 6	155	0.098 9	136	0.053 6
4	131	0.128 2	188	0.033 3	109	0.187 5	159	0.073 7	142	0.098 7
5	135	0.082 8	191	0.050 0	111	0.096 2	164	0.198 8	150	0.067 4
6	140	0.087 8	203	0.050 0	115	0.107 1	172	0.088 9	153	0.134 7
7	148	0.123 9	211	0.133 3	117	0.187 5	182	0.109 8	159	0.098 8
8	150	0.083 8	213	0.016 7	119	0.026 8	188	0.187 8	162	0.134 6
9	164	0.075 7	217	0.216 7	121	0.098 2	191	0.076 9	169	0.095 1
10	167	0.065 2	222	0.283 3	125	0.080 4	194	0.069 8	175	0.058 9
11	172	0.025 8	232	0.066 7	130	0.062 5	204	0.038 7	180	0.063 7
12	192	0.012 5			134	0.010 9	215	0.021 1	186	0.045 9
13									197	0.048 6

由表 2 可知: 采用 5 对微卫星引物对小尾寒羊基因组 DNA 进行扩增, 在微卫星位点 BL1038、BM757、BM4621、OarFCB304、OarFCB48 中均发现多态性, 共检测到 60 个等位基因, 平均每对微卫星位点含 12 个等位基因。在豫西脂尾羊群体中检测到 OarFCB48 的等位基因数最多为 13 个, 片段长度范围为 127 ~ 197 bp, BL1038、BM757、BM4621、OarFCB304 的片段长度范围分别为 101 ~ 192 bp、155 ~ 232 bp、93 ~ 134 bp、140 ~ 215 bp。等位基因在各位点的分布是不均匀的, 在同一个微卫星位点上同一群体内, 等位基因数和等位基因频率也不同。

表 3 微卫星位点的 PIC、H 和 Ne

位点	PIC	H	Ne
BL1038	0.885 6	0.893 1	9.355 4
BM757	0.817 5	0.833 6	6.010 3
BM4621	0.864 6	0.874 7	7.982 3
OarFCB304	0.862 5	0.874 3	7.956 8
OarFCB48	0.902 1	0.907 8	10.846 8
平均	0.866 5	0.876 7	8.430 3

由表 3 可知: 豫西脂尾羊群体中 5 个微卫星位点的 Ne 在 6.010 3 ~ 10.846 8 之间, 平均 Ne 为 8.430 3, 其中 OarFCB48 的 Ne 最高为 10.846 8。5 个微卫星位点的 H 在 0.833 6 ~ 0.907 8 之间, 平均 H 为 0.876 7, 其中 OarFCB48 的 H 最高为 0.907 8。微卫星位点 OarFCB48 的 PIC 最高为 0.902 1, BM757 的 PIC 最低为 0.817 5, 平均 PIC 为 0.866 5, 说明豫西脂尾羊群体属于 PIC 较高的遗传群体。

3 讨论

群体的杂合度, 既是群体杂合程度的度量单位, 又是被检测的遗传标记多态性的度量单位。作为分子标记多态性的一种度量, H 的高低代表了该分子标记多态性的高低, 群体的 H 越大表明用以检测该群体的分子标记的多态性越高, 群体的遗传变异就越丰富, 可选择范围就大。一般认为, 一个群体的 H 大于 0.5, 则遗传多样性比较丰富, 反之则说明该群体的遗传多样性较差。有试验对湖羊、同羊及长江三角洲白山羊 3 个地方绵羊品种进行分析, H 分别为 0.909 2、0.917 7、0.886 7^[2]。对云南地方绵羊品种遗传多样性的微卫星分析结果表明, 腾冲绵羊、昭通绵羊、迪庆绵羊、宁蒗黑绵羊的 H 分别为 0.822 6、0.850 5、0.845 7、0.839 6^[3]。研究利用 5 个微卫星位点获得豫西脂尾羊的 H 为 0.876 7, 说明还可以进一步地对豫西脂尾羊进行纯繁选育, 以提高群体整齐度。Ne 等于基因纯合度的倒数, 是衡量群体遗传变异的一个指标, 同时有效等位基因也反映了等位基因间的相互影响, 等位基因在群体中分布越均匀, Ne 就越接近等位基因的绝对数^[4]。在利用微卫星位点进行遗传距离分析时, 要求微卫星位点的等位基因数不少于 4 个, 少于 4 个或没有特异扩增条带的微卫星位点应该排除^[5]。研究表明 5 个微卫星位点中 OarFCB48 的等位基因最多为 13 个, BM757 的最少为 11 个, 这些微卫星位点均符合用于遗传距离分析的要求。PIC 是衡量微卫星位点多态性的指标, D. Botstein 等^[6]首先提出了衡量基因变异程度高低的 PIC 指标: PIC ≥ 0.50 的位点为高度多态位点, PIC ≤ 0.25 的位点为低度多态位点, 0.25 < PIC < 0.50 的位点为中度多态位点。研究所分析的 5 个微卫星位点, 平均 PIC 为 0.866 5, 最高的为 OarFCB48(0.902 1), 最低的为 BM757(0.817 5), 说明所选微卫星位点在试验群体中表现出较好的多态性。因此, 它们可以作为理想的分子标记, 用于山羊品种间遗传多样性和系统发生关系的分析。

参考文献:

- [1] 田亚磊, 高腾云, 陈碾管, 等. 豫西脂尾羊体尺与体重的相关性分析[J]. 江西农业学报, 2009, 21(5): 111 ~ 113.
- [2] 杨章平, 常洪, 孙伟. 7 个绵羊微卫星 DNA 标记在绵(山)羊种群中的多态性检测[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2004, 32(12): 69 ~ 74.
- [3] 陈红艳, 马月辉, 叶绍辉. 云南地方绵羊品种遗传多样性的微卫星分析[J]. 当代畜牧, 2007(1): 29 ~ 30.
- [4] 徐琳娜, 李国林, 郎侠, 等. 滩羊八个微卫星位点的遗传多样性分析[J]. 湖南农业科学, 2009(12): 4 ~ 7.
- [5] 王杰, 华太才让, 欧阳熙, 等. 藏山羊微卫星 DNA 多态性研究[J]. 西南民族大学学报, 2006, 32(3): 538 ~ 544.
- [6] BOTSTEIN 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, 1980, 32: 314 ~ 331. (015)