

荷斯坦牛 12 个 STR 基因座遗传多态性研究

鲁玉霞^{1,2}, 王洪梅¹, 安利国², 李建斌¹, 李秋玲¹, 仲跻峰¹

(1. 山东省农业科学院 奶牛研究中心, 山东 济南 250100; 2. 山东师范大学 生命科学学院, 山东 济南 250014)

摘要: 选用牛的 12 个 STR 基因座, 利用 PCR 和电泳银染技术对来自不同牛场的 100 头荷斯坦牛进行遗传多态性检测。结果表明, 12 个 STR 基因座的杂合度、多态信息含量、有效等位基因数的均值为 0.871 1, 0.857 4, 8.166 6, 这些基因座的遗传杂合度及多态信息含量高, 均为高度多态位点, 适用于动物的遗传分析和个体鉴定。

关键词: 杂合度; 多态信息含量; 有效等位基因数

中图分类号: Q953⁺.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2008)05-0040-04

Study on the Genetic Polymorphism of 12 STR Loci in Holstein

LU Yu-xia^{1,2}, WANG Hong-mei¹, AN Li-guo², LI Jian-bin¹, LI Qiu-ling¹, ZHONG Ji-feng¹

(1. Dairy Cattle Research Center, Shandong Academy of Agriculture Science, Jinan 250100, China;

2. College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China)

Abstract: 12 STR loci were employed to test the genetic polymorphism of Holstein with a sample of 100 cattle from different farms by PCR and Electrophoresis-Argentation. The result showed that the mean of the heterozygosity, the polymorphic information content and the effective number of alleles of the 12 STR are respectively 0.871 1, 0.857 4 and 8.166 6, both the value of the heterozygosity and the polymorphic information content are higher so all of the 12 STR loci are high polymorphism and they can be used to the genetic analysis and individual identification in animal.

Key words: Heterozygosity; Polymorphic information content; The effective number of alleles

微卫星 DNA (Microsatellite DNA), 又称短串联重复序列 (Short tandem repeats, STR) 或简单序列重复 (Simple repeat sequences, SRS; Simple sequence of repeats, SSR), 是以 1~6 bp 的短核苷酸为基本单位, 首尾相连组成的串联重复序列。大多数重复单位是二核苷酸, 也有少量含有 1, 3~6 个核苷酸的重复单位, 重复次数一般在 5~60 次, 片段长度通常在 400 bp 以下^[1]。

微卫星的多态性是由于重复次数的不同及重复程度的不完全而造成的, 另外有研究证明二核苷酸重复的多态性要高于三核苷酸^[2]。一般认为微卫星突变产生的原因是 DNA 复制和修复过程中碱基的滑动、错配^[3]或减数分裂过程中姊妹染色单体的不均等交换^[4], 突变模式反映着物种的进化历史, 某物种内或物种间蕴藏着该物种基因组中最为古老、保守的序列, 能提供丰富的突变信息和等位基因位点,

因此, 根据微卫星多态性提供较高的多态信息含量和杂合度, 为群体遗传结构、家畜品种的鉴定、基因作图、群体分化及法医鉴定等领域广泛应用^[5-7]。

为进一步了解荷斯坦牛群的群体遗传结构, 以期对现在和今后的育种工作有所指导或参考, 本试验选择了牛的 12 个 STR 基因座 (ETH10, ETH225, INRA023, INRA063, BM1818, BM1824, LSTS006, CSSM66, HEL9, TCLA53, INRA037, TCLA126), 利用 PCR 和电泳银染技术结合 GIS 软件对结果进行了分析, 检测了这 12 个 STR 基因座的遗传多态性。

1 材料和方法

1.1 试验材料

从天津及山东济南、泰安等规模化牛场采集 100 头荷斯坦牛的血液, 颈静脉采血, 3.8% 的柠檬酸钠抗凝, -20℃ 保存备用。根据系谱资料记录, 上

收稿日期: 2008-06-28

基金项目: 国家“863”计划项目 (2006AA10Z1D9; 2007AA10Z169); 山东省农业科学院高新技术创新基金项目 (2006YCX028)

作者简介: 鲁玉霞 (1975-), 女, 山东青州人, 硕士, 主要从事动物遗传研究。

通讯作者: 仲跻峰 (1964-), 男, 江苏淮安人, 研究员, 博士, 主要从事动物繁育研究。

述牛群均在 3 代以内无血缘关系,其中公牛 20 头。

1.1.1 引物设计 引物设计见表 1,其中 ETH225 和 INRA023 的引物采用 Primer 5.0 软件设计,其他 10 对引物均为联合国粮农组织 (FAO) 和国际动物遗传学会 (ISAG) 的推荐引物^[8],由上海生工生物工程有限公司合成。

1.1.2 基因组 DNA 提取 采用酚-氯仿法从冷冻的抗凝血液样本中提取基因组 DNA,详细操作步骤见参考文献[9]。

1.1.3 PCR 扩增 25 μ L 的体系,10 \times Buffer 2.5 μ L、25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L、10 mmol/L dNTP 0.3 μ L、*Taq* DNA 聚合酶 1 U、10 μ mol/L 引物各 1.0 μ L、模板 DNA 80 ng。PCR 程序为:94 预变性 4 min;94 变性 30 s,54~58 退火 25 s,72 延伸 25 s,共 35 个循环,最后 72 延伸 5 min,降温至 4 结束。

1.1.4 PCR 产物的检测 PCR 产物用 12 % 的聚丙烯酰胺凝胶电泳,室温,150 V 电泳 3 h。电泳结束后,硝酸银染色^[10],首先 10 % 乙醇固定 20 min,1 % 硝酸氧化 2~3 min,然后 0.1 % 硝酸银染色 30 min,去离子水洗胶 3 次,2 % 碳酸钠 (含 0.4 % 的甲醛) 显色至适度,4 % 的冰乙酸终止显色,去离子水漂洗后拍照。

1.1.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳图片信息采集与数据处理 用凝胶成像系统对图片进行分析,通过 GIS 软件检测微卫星等位基因大小。采用 EXCEL,SAS 等软件对试验数据进行统计学分析处理。

1.2 统计分析

计算等位基因的大小及频率,多态信息含量、遗传杂合度和有效等位基因数使用 POPGEN32 软件。

表 1 STR 基因座及其引物序列

Tab.1 STR locus and their primer sequences

基因座 Locus	染色体 Chromosome	引物序列 Primer sequences	退火温度/ Annealing temperature
ETH10	5	5'- GTTCA GGA CTG C C C T G C T A A C A -3 5'- C C T C C A G C C C A C T T T C T C T C T C -3	58
ETH225	9	5'- T C A C C T T G C C A C T A T T T C C T -3 5'- C A G C C A G C T G C T A C T A G A G A G -3	54
INRA023	3	5'- T A C C T C C T C T A A T C C C T A A A C T T G -3 5'- T T A T T C C C C T T C C T T C T G C T -3	56
INRA063	18	5'- A T T T G C A C A A G C T A A A T C T A A C C -3 5'- A A A C C A C A G A A A T G C T T G G A A G -3	56
BM1818	23	5'- A G C T G G G A A T A T A A C C A A A G G -3 5'- A G T G C T T T C A A G G I C C A T G C -3	57
BM1824	1	5'- G A G C A A G G T G T T T T T C C A A T C -3 5'- C A T T C T C C A A C T G C T T C C T T G -3	57
ILSTS006	7	5'- T G I C T G I A T T T C T G C T G T G G -3 5'- A C A C G G A A G C G A T C T A A A C G -3	55
CSSM66	14	5'- A C A C A A A T C C T T T C T G C C A G C T G A -3 5'- A A T T T A A T G C A C T G A G G A G C T T G G -3	58
HBL9	8	5'- C C C A T T C A G I C T T C A G A G G T -3 5'- C A C A T C C A T G T T C T C A C C A C -3	55
TGLA53	16	5'- G C T T T C A G A A A T A G T T T G C A T T C A -3 5'- A T C T T C A C A T G A T A T T A C A G C A G A -3	56
INRA037	10	5'- G A T C C T G C T T A T A T T T A A C C A C -3 5'- A A A A T T C C A T G G A G A G A G A A A C -3	57
TGLA126	20	5'- C T A A T T T A G A A T G A G A G A G C T T C T -3 5'- T T G G I C T C T A T I C T C T G A A T A T T C C -3	55

2 结果与分析

2.1 STR 的多态性

12 个 STR 基因座共检测到 116 个等位基因, HBL9, ILSTS006 和 TGLA53 等 3 个基因座均有 12 个等位基因, INRA037, ETH225, INRA023 及 CSSM66 等 4 个基因座各有 8 个等位基因, 平均等位基因数为 9.666 7 个 (表 2); 等位基因频率见图 1。根据 Botstein 对多态信息含量的分类标准: $PIC > 0.5$ 为高度多态性位点, $0.5 > PIC > 0.25$ 为中度多态性位点,

$PIC < 0.25$ 为低度多态性位点^[11], 12 个 STR 基因座的 PIC 值均在 0.78 以上, 其中 HBL9 的 PIC 高达 0.898 5, 均值为 0.857 4, 为高度多态性位点, 表现出较为丰富的信息含量。

2.2 基因座遗传多态性分析

STR 基因座的多态信息含量、基因杂合度及有效等位基因数见表 3。12 个 STR 的平均基因杂合度、有效等位基因数分别为 0.871 1, 8.166 6, 而 HBL9 的有效等位基因数值最高为 10.665 9。

表 2 等位基因大小及多态信息含量

Tab. 2 Allele size and polymorphic information content(PIC)		
基因座 Locus	等位基因大小/ bp Allele size	多态信息含量 Polymorphic information content
INRA037	126 128 130 132 138 140 142 144	0.784 8
ETH225	132 138 140 144 148 156 160 162	0.849 6
INRA023	227 233 237 243 249 255 259 263	0.803 6
INRA063	183 187 191 203 211 215 217 219 221	0.847 6
ETH10	211 215 217 219 225 237 241 245 247	0.870 9
TGLA126	116 118 120 122 124 130 132 134 136	0.860 8
HEL9	138 142 144 146 148 150 152 156 158 166 168 172	0.898 5
ILSTS006	311 315 323 335 339 343 345 349 353 357 363 367	0.892 5
TGLA53	159 161 163 165 169 171 185 191 193 195 199 201	0.891 0
CSSM66	175 179 183 189 193 213 215 219	0.820 3
BM1824	182 190 192 196 202 204 212 214 216 218 222	0.883 8
BM1818	237 245 247 261 269 273 287 297 307 311	0.886 1
平均值 Mean		0.857 4

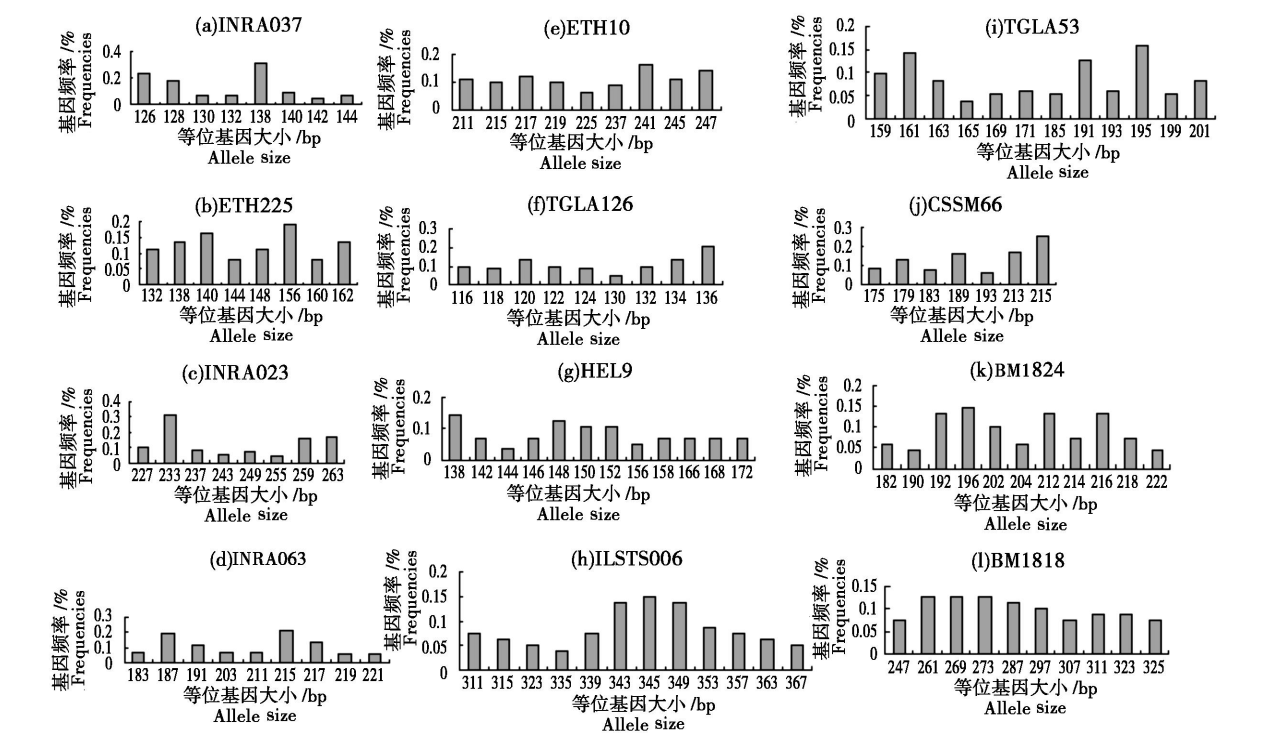


图 1 12 个 STR 座位等位基因频率分布的柱形图

Fig. 1 Histogram of the allele frequency of 12 STR loci

表 3 12 个 STR 基因座的基因杂合度及有效等位基因数

Tab. 3 The heterozygosity and the effective number of alleles of the 12 STR loci					
基因座 Locus	基因杂合度 H	有效等位 基因数 Ne	基因座 Locus	基因杂合度 H	有效等位 基因数 Ne
INRA037	0.809 4	5.244 9	HEL9	0.906 3	10.665 9
ETH225	0.864 9	7.400 0	ILSTS006	0.900 9	10.094 2
INRA023	0.824 1	5.685 1	TGLA53	0.899 7	9.962 1
INRA063	0.862 6	7.274 2	CSSM66	0.839 5	6.230 5
ETH10	0.882 8	8.530 7	BM1824	0.893 6	9.396 2
TGLA126	0.873 9	7.929 3	BM1818	0.895 7	9.585 6

3 讨论

PCR 的特异性与重复性是影响 STR 体外扩增效率与准确性的关键因素。PCR 反应体系中 Mg^{2+} 、

模板 DNA、引物的浓度均影响 PCR 扩增的特异性， Mg^{2+} 或引物的浓度过高，则出现非特异性扩增，过低则影响扩增效率，由于反应中引物间的结合和引物与基因组 DNA 的结合是竞争性的，适量增加 DNA

的量将增加引物与 DNA 的结合, 利于提高扩增效率。微卫星标记的扩增产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 采用银染法显示条带。该方法安全可靠、无辐射、检测灵敏度高, 是一种较好的显色方法。但贾名威等^[12]的研究发现, 同一 STR 座位的片段长度出现奇、偶数相间的结果, 可能为重复单位是奇数或由于读数误差所致。另外, 由于凝胶两侧的样品易受电压影响, 会出现条带滞后现象及“微笑”效应^[13,14], 采取凝胶的两侧 2~3 个点样孔加非检测样品或不加检测样品的方法, 可避免此情况的发生。尽管这种常规检测方法的误差较大, 但因成本低、操作简捷、结果分析简便等特点, 仍是大多数中、小型试验室较常用的方法。李荣岭等^[15]应用荧光标记引物扩增 STR, 通过全自动基因分析仪检测基因型, 这种高通量检测方法准确、可靠, 但检测费用昂贵。

多态信息含量和遗传杂合度是表示 STR 遗传变异程度的两个指标, 有效等位基因数等于基因纯合度的倒数, 是衡量群体变异程度的又一个指标。等位基因在群体中分布得越均匀, 有效等位基因数越接近实际检测到的等位基因数。将表 2 和表 3 比较发现, 有效等位基因数均少于试验中得到的实际等位基因数, 本试验所分析的 12 个 STR 座位, 多态信息含量的数值与遗传杂合度的数值体现了较好的一致性。多态信息含量范围是 0.784 8~0.898 5。12 个 STR 座位的 PIC 均大于 0.5, 表现为高度多态性位点。在遗传连锁分析中, PIC 值大于 0.7 的微卫星位点为最理想的选择标记, 因为在这种情况下, 双亲在该位点通常是杂合的, 在其后代中可以清楚地观察到等位基因的分离。王均辉等^[16]研究的秦川牛的平均 PIC 为 0.768 6, 平均杂合度为 0.795 9, 王敏强等^[17]研究的鲁西黄牛、渤海黑牛及秦川牛的平均 PIC 分别为: 0.797, 0.798, 0.795, 平均杂合度分别为: 0.820, 0.821, 0.819。由此可见, 本试验所分析的 12 个 STR 可作为进一步连锁分析的候选遗传标记和进行个体鉴定。

STR 目前被广泛地用于畜禽数量性状位点的定位, 这些研究需要测定上百个 STR, 才能覆盖绝大部分基因组。对于一般实验室来说, 无论是工作量还是研究经费都是很难承担的。因此, 在设计本试验时, 尽量选用已发表的与奶牛生产性能相关的 STR 标记, 以便从尽可能合适的范围内, 找到与荷斯坦牛生产性能相关的 STR 标记。

参考文献:

- [1] 吕德坚, 陆惠玲. DNA 亲权鉴定[M]. 广州: 暨南大学出版社, 2005: 36 - 48.
- [2] Muralidhar Metta I, Srirama Kaninakudru, Narasimharao Gudiseva, *et al.* Genetic characterization of the Indian cattle breeds, Ongole and Deoni (*Bos indicus*), using microsatellite markers: a preliminary study [J]. BMC Genetics, 2004, 5: 16 - 20.
- [3] Levinson G, Gutman G A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution [J]. Mol Biol Evol, 1987, 4: 203 - 221.
- [4] Walsh P S, Metzger D A, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material [J]. Biotechniques, 1991, 10: 506 - 518.
- [5] 储明星, 王吉振, 王爱国, 等. 小尾寒羊 4 个微卫星座位的克隆及序列分析[J]. 遗传学报, 2002, 29(5): 402 - 405.
- [6] Wiener P, Burton D, Williams J L. Breed relationships and definition in British Cattle: a genetic analysis[J]. Heredity, 2004, 93: 597 - 602.
- [7] Eveline Mengwi Ibeagha-Awemu, Oliver Carl Jann, Christina Weimann, *et al.* Genetic diversity, introgression and relationships among West/ Central African cattle breeds[J]. Genet Sel Evol, 2004, 36: 673 - 690.
- [8] CaDBase Genetic Diversity in Cattle[EB/OL]. <http://www.projects.roslin.ac.uk/cdiv/markers.html>.
- [9] 萨姆布鲁克 J, 弗时奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 全冬雁, 等译. 北京: 科学出版社, 1988: 465 - 467.
- [10] 李西平, 钱新华, 姚英民. DNA 聚丙烯酰胺凝胶电泳银染方法的选择[J]. 第一军医大学学报, 2004, 24(9): 1072 - 1074.
- [11] 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(3): 314 - 331.
- [12] 贾名威, 杨利国, 管峰, 等. 奶牛和肉牛 6 个 STR 基因座遗传多态性研究[J]. 遗传, 2004, 26(3): 309 - 314.
- [13] 吕海航, 郑国萍. 微卫星电泳及银染检测中的常见问题分析及对策[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2006(4): 65 - 67.
- [14] 曲鲁江, 李显耀, 杜志强, 等. 微卫星 PCR 产物变性与非变性 PAGE 银染检测方法的比较[J]. 遗传, 2004, 26(4): 522 - 524.
- [15] 李荣岭, 张桂香, 王志刚, 等. 微卫星标记对 12 个中外牛品种群体遗传结构的研究[J]. 遗传, 2007, 29(12): 1463 - 1470.
- [16] 王均辉, 咎林森, 张桂香, 等. 利用多重荧光 PCR 分析秦川牛遗传多样性[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(20): 6051 - 6053.
- [17] 王敏强, 李萍莉, 陈礼学, 等. 用 20 个微卫星标记研究鲁西黄牛和渤海黑牛的遗传多样性[J]. 河北农业大学学报, 2006, 29(6): 76 - 81.