

洪山鸡 20 个微卫星座位的 DNA 多态性分析

邓呈逊¹, 黄建武², 龚炎长^{2*} (1. 合肥学院生物与环境工程系, 安徽合肥 230601; 2. 华中农业大学动物科技学院, 湖北武汉 430070)

摘要 [目的]对洪山鸡进行 20 个微卫星座位的多态性分析,为对其有效保护和开发利用提供科学依据。[方法]利用聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳技术,对随机抽取的 50 只洪山鸡进行 20 个微卫星标记的多态性检测。[结果]在 20 个微卫星座位中共检出 176 个等位基因,平均每对引物可检出 8.8 个等位基因,基因频率在 0.011 1~0.555 6 间分布,平均有效等位基因数为 5.755 5,平均杂合度为 0.791 3,平均多态信息含量为 0.781 9。[结论]该研究表明被检测的洪山鸡群遗传变异大,具有丰富的遗传多样性。
关键词 洪山鸡;微卫星;遗传多样性
中图分类号 S831 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)08-03334-02

DNA Polymorphism Analysis of 20 Microsatellite Loci in Hongshan Chicken
DENG Cheng-xun et al (Department of Biology and Environment Engineering, Hefei University, Hefei, Anhui 230601)
Abstract [Objective] The aim was to analyze the DNA polymorphism of 20 microsatellite loci in Hongshan chicken, and to provide a scientific basis for the effective protection and utilization. [Method] Polymorphism of 20 microsatellite markers was detected in a random sample of 50 Hongshan chicken by using vertical polyacrylamide gel electrophoresis. [Result] 176 alleles in the 20 microsatellite loci and 8.8 alleles per primer were detected averagely. Gene frequency was found distributed in the 0.011 1-0.555 6. The average effective number of alleles was 5.755 5. The average heterozygosity was 0.791 3. The average polymorphism information content was 0.781 9. [Conclusion] The study showed that the detected Hongshan chicken population had high genetic variation, and had abundant genetic diversity.
Key words Hongshan chicken; Microsatellite; Genetic diversity

畜禽遗传资源及多样性是保障畜禽业可持续发展的种质基础,也是满足未来市场变化需求的重要基因库,而世界畜禽遗传资源正日益减少^[1]。因此为对我国畜禽遗传资源提出科学的保护及开发利用措施,对地方畜禽品种资源及遗传信息多样性进行系统的研究势在必行。张细权等^[2]、Zhou 等^[3]、曲鲁江等^[4]运用微卫星标记对不同鸡品种群体进行了遗传多样性分析。联合国粮农组织(Food and Agriculture Organization, FAO)推出的 MoDAD(the Measurement of Domestic Animal Diversity, 家养动物多样性测定)计划,是一套对畜禽遗传多样性进行分子评估的方法,其本质即微卫星标记在分子遗传多样性检测中的应用。

洪山鸡是湖北省优良的地方鸡种之一,也是名贵的“三黄鸡”品种之一,为肉蛋兼用型,具肉嫩、味鲜、皮薄、易肥育、杂交效果好等特点。自 1962 年起,洪山鸡被湖北省外贸组织育肥出口销售,1972 年在中国出口商品交易会上展出,受到外商的欢迎。该研究利用聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳技术对洪山鸡 20 个微卫星位点的遗传变异进行检测,从而对洪山鸡遗传资源及多样性现状进行分析与评价,旨在为该品种保种、遗传改良、开发利用等措施的提出提供科学的分子理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 自湖北随州曾都区洪山鸡原种厂采鸡血样 50 份,翅静脉采血。常规苯酚-氯仿抽提法提取 DNA 样品。
1.2 引物选用和 PCR 反应 参考 AVIANDIV PROJECT 推荐的微卫星位点,从中选取多态性好的 20 个微卫星座位。PCR 反应总体系为 20 μl,其中 dNTPs 终浓度为 0.2 mmol/L,

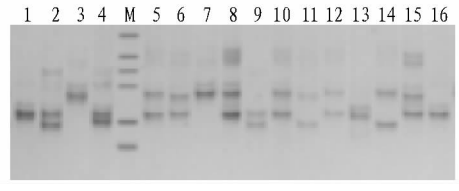
引物终浓度 1.5~2.0 μmol/L, *Taq* 聚合酶 1 U/μl, Mg^{2+} 1.25~1.50 mmol/L,模板 DNA 约 300~500 ng。PCR 扩增反应程序为:94℃预热 5 min;94℃变性 45 s,同微卫星座位,退火温度不一样,退火温度范围为 58~62℃,退火 45 s,72℃延伸 45 s,30 个循环;72℃延伸 5 min 4℃保存。PCR 产物用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染检测 用 8% 聚丙烯酰胺凝胶进行垂直电泳。在 PCR 产物中加入 1/6 体积上样缓冲液,用微量进样器取 4~8 μl 点样,分子量标记物为 pBR322DNA/*Msp* I。用银染法显示电泳结果后,利用 BIO-RAD 凝胶成像系统扫描保存,启动 BIO-RAD 凝胶成像系统自带软件 genedoc 计算各微卫星等位基因大小。

1.4 数据统计分析 用自编程序计算多态信息含量(Polymorphism Information Content, *PIC*), popgene 软件计算有效等位基因数(Effective number of alleles, *E*)、杂合度(Heterozygosity, *H*)。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增产物检测结果 PCR 扩增产物检测结果见图 1(所示为全部结果的一部分)。20 个微卫星位点均产生了清晰的、能够准确判断的扩增条带,且均表现出多态性,其扩增结果稳定,能够完全重复。



注: M·分子量标记 Marker (pBR322DNA/*Msp* I); 1~16 为样品号。

图 1 MCW0069 引物扩增洪山鸡 DNA 产物的聚丙烯酰胺电泳图谱(部分结果)

基金项目 国家自然科学基金(30671494)。
作者简介 邓呈逊(1979-),女,湖北荆州人,讲师,硕士,从事分子遗传、环境微生物方向的研究, E-mail: 478520742@qq.com。
* 通讯作者。
收稿日期 2013-03-14

2.2 洪山鸡 20 个微卫星位点的等位基因数目与频率 每个微卫星位点的等位基因数目呈现一定的差异,分布在 4 ~ 16 之间;共检测到 176 个等位基因,平均等位基因数为 8.8 个;基因频率在 0.011 1 ~ 0.555 6 之间分布。所有位点中 MCW0183 多态性最为丰富,检测出 16 个等位基因;MCW0037、ADL0278、MCW0067 位点都检测到 4 个等位基因,等位基因数最少。根据 Barker^[5] 微卫星标记的选择标准,一个微卫星位点至少应有 4 个等位基因方能较好用于遗传多样性的评估,因此,该研究使用的 20 个微卫星标记均具有较高的多态性,可用于对受测洪山鸡群的遗传多样性检测。

2.3 洪山鸡 20 个微卫星位点的基因杂合度、有效等位基因数、及多态信息含量 由表 1 可知:在被检测的 20 个微卫星座位中,有效等位基因数在 2.529 7 ~ 11.807 6 之间,平均有效等位基因数为 5.755 5;基因杂合度在 0.604 7 ~ 0.891 9 之间,平均杂合度为 0.791 3;多态信息含量分布区间为 0.580 2 ~ 0.899 5 之间,平均多态信息含量为 0.781 9。

表 1 洪山鸡 20 个微卫星位点的有效等位基因数 (*E*)、多态信息含量 (*PIC*) 及杂合度 (*H*) 值

位点	有效等位基 因数(<i>E</i>)	多态信息 含量(<i>PIC</i>)	杂合度 (<i>H</i>)
MCW0034	9.246 6	0.888 0	0.891 9
MCW0103	5.332 6	0.788 7	0.808 9
MCW0016	7.444 9	0.855 4	0.865 7
MCW0020	2.529 7	0.718 4	0.604 7
MCW0123	2.779 7	0.607 1	0.640 2
ADL0112	4.058 1	0.678 0	0.753 6
MCW0080	8.747 3	0.883 4	0.885 7
MCW0069	5.895 2	0.832 4	0.830 3
MCW0216	5.540 4	0.835 8	0.819 5
MCW0206	6.683 2	0.777 6	0.850 4
MCW0330	7.941 2	0.856 9	0.874 1
LEI0166	6.994 8	0.899 5	0.857 0
ADL0278	5.586 2	0.821 2	0.821 0
MCW0183	7.019 1	0.890 5	0.857 5
MCW0037	3.258 2	0.754 4	0.693 1
ADL0278	3.500 4	0.580 2	0.821 0
MCW0067	3.146 9	0.715 0	0.682 3
MCW0248	2.856 1	0.691 8	0.649 9
MCW0111	4.742 4	0.679 0	0.725 8
LEI0094	11.807 6	0.885 2	0.893 2

3 讨论

有效等位基因数反映了某座位各等位基因之间的相互

(上接第 3306 页)

4 小结

秦岭是华北、华中和青藏高原植物区系成分交汇的地区,是我国温带植物区系最丰富的地区之一,也是探索东亚植物区系地的起源与形成、演化与分化的重要地区^[1-2]。我国紫堇属近 360 种,南北各地均有分布,但以西南部最集中^[3-5]。《秦岭植物志》仅记载了 10 种紫堇^[6]。小花宽瓣黄堇的新发现不仅丰富了秦岭地区的多样性,而且为紫堇属植物的分布格局、地理变异研究提供了一定的资料。

参考文献

[1] 中国植被编辑委员会. 中国植被 [M]. 北京: 科学出版社, 1980: 844 -

影响。如果某座位各等位基因出现的频率相同,有效等位基因数会等于或接近实际观测数,但一般后者的值大于前者。该试验中 MCW0103、MCW0037、ADL0278、MCW0067 4 个位点的有效等位基因数基本接近实际等位基因数,表明这 4 个位点的各等位基因在洪山鸡中分布均匀。

杂合度是度量群体遗传变异的一个最适参数。杂合度越低,群体遗传多样性越差。在被检测的 20 个微卫星座位中,基因杂合度在 0.604 7 ~ 0.891 9 之间,平均杂合度为 0.791 3,表明被检测的洪山鸡群遗传多样性丰富,湖北随州曾都区洪山鸡原种厂保种措施得当。

多态信息含量 (*PIC*) 是衡量 DNA 片段多态性较好的指标^[6]。Bostein^[7] 等首先提出了用多态信息含量指标来衡量基因变异程度: *PIC* > 0.50 为高度多态位点, 0.25 < *PIC* < 0.50 为中度多态位点, *PIC* < 0.25 为低度多态位点。该研究多态信息含量在 0.580 2 ~ 0.899 5 之间分布,平均多态信息含量为 0.781 9,说明该试验选用的微卫星位点呈现出高度多态,这也与杂合度的研究结果较一致。故该研究所用的 20 个微卫星位点均具有高度多态性,可作为群体遗传多样性检测的分子标记。

参考文献

[1] 吴常信. 分子数量遗传学与动物育种 [J]. 遗传, 1997, 19(S1): 1 - 3.
[2] 张细权, 吕雪梅, 杨玉华, 等. 用微卫星多态性和 RAPD 分析广东地方鸡种的群体遗传变异 [J]. 遗传学报, 1998, 25(2): 112 - 119.
[3] ZHOU H, LAMONT S J. Genetic characterization of biodiversity in highly inbred chicken lines by microsatellite markers [J]. Anim Genet, 1999, 30(4): 256 - 264.
[4] 曲鲁江, 李显耀, 徐桂芳, 等. 利用微卫星标记分析中国地方鸡种的遗传多样性 [J]. 中国科学 (C 辑: 生命科学), 2006, 36(1): 17 - 26.
[5] BARKER J S F. A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds [C] // proceedings of the 5th world congress on genetics applied to livestock production. Canada: University of Guelph, 1994: 501 - 508.
[6] ZHANG C Z, LI J C, YANG Y, et al. Analysis on polymorphisms of *GHR* gene in improved hybrid yellow cattle groups from Liupan Mountain area in Ningxia [J]. Agricultural Science & Technology, 2011, 12(3): 413 - 416.
[7] BOSTEIN D. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. Am J Hum Genet, 1980, 32: 314 - 331.
[8] 张志涛, 李志峰, 金建梅. 微卫星 DNA 遗传标记的研究进展及应用 [J]. 畜牧与饲料科学, 2010, 31(9): 65 - 66.

847.
[2] 应俊生. 秦岭植物区系的性质、特点和起源 [J]. 植物分类学报, 1994, 32(2): 389 - 410.
[3] 吴征镒, 王璇, 苏志云. 中国植物志: 第 32 卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 96 - 481.
[4] ZHANG M L, SU Z Y, LIDÉN M. Papaveraceae [M] // WU Z Y, RAVEN P H, HONG D Y. Flora of China: Vol. 7. Beijing: Science Press, 2008: 295 - 428.
[5] 吴征镒, 王璇, 苏志云. 论紫堇属的系统演化与区系发生和区系分区的关系 [J]. 云南植物研究, 1996, 18(3): 241 - 267.
[6] 中国科学院西北植物研究所. 秦岭植物志 (第 2 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1976: 367 - 373.