

利用微卫星标记分析鸵鸟遗传多样性*

王咏絮,任战军*,王乐,王洪亮

(西北农林科技大学 动物科技学院,陕西杨凌 712100)

摘要: 随机采取无直接亲缘关系的 68 只鸵鸟血样,采用微卫星标记技术对鸵鸟 20 个微卫星座位进行遗传多样性检测。结果表明,有 3 个座位(CAU13、CAU36、CAU46)没有多态性,其他 17 个座位(LEI0094、CAU5、CAU7、CAU8、CAU11、CAU14、CAU15、CAU16、CAU17、CAU22、CAU23、CAU24、CAU32、CAU34、CAU42、CAU43 和 CAU57)共检测到 142 个等位基因,平均每个座位上等位基因数为 8.3529 ± 1.2803 ,平均期望杂合度及多态信息含量分别为 0.8468 ± 0.1368 和 0.8213 ± 0.0321 。鸵鸟群体内存在丰富的遗传变异,遗传多样性较高。

关键词: 鸵鸟;微卫星标记;遗传多样性;多态信息含量

中图分类号:S839

文献标识码:A

文章编号:1004-1389(2010)03-0036-04

Genetic Diversity in the Population of Ostrich Analyzed by Microsatellite Markers

WANG Yongxu, REN Zhanjun*, WANG Le and WANG Hongliang

(College of Animal Science & Technology, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract: In order to study ostrich's genetic characteristics on the molecular level, 68 individuals without direct relationship were picked out according to the random sampling method. The genetic diversity was analyzed using 20 microsatellite markers. The results showed that a total of 142 alleles were detected in 17 microsatellite loci (LEI0094, CAU5, CAU7, CAU8, CAU11, CAU14, CAU15, CAU16, CAU17, CAU22, CAU23, CAU24, CAU32, CAU34, CAU42, CAU43 and CAU57), excepting 3 non-polymorphic microsatellite loci (CAU13, CAU36, CAU46), the number of alleles per locus was 8.3529 ± 1.2803 , the average expected heterozygosity and the average value of polymorphism information content (PIC) were 0.8468 ± 0.1368 and 0.8213 ± 0.0321 respectively. These results indicated that there were abundant genetic variations in this ostrich group, the genetic diversity was very high.

Key words: Ostrich; Microsatellite marker; Genetic diversity; Polymorphism information content

M. Kawka 等^[1-3]采用 DNA 指纹和微卫星技术对波兰 3 个鸵鸟种群进行遗传分析,认为黑颈鸵鸟具有较高的变异潜力,红颈鸵鸟和蓝颈鸵鸟具有最大的遗传相似度,红颈鸵鸟和黑颈鸵鸟具有最大的遗传距离;Kimwele C. N. 等^[4]利用微卫星标记分析鸵鸟巢居家系内部亲缘关系,发现同巢孵化的雌性鸵鸟间的亲缘关系与鸵鸟总群体

平均水平相比没有明显的不同,但其显著低于鸡的同巢孵化的亲缘关系;霍金龙等^[5]采用随机扩增多态性标记技术对澳洲鸵鸟进行了遗传变异分析,结果表明澳洲鸵鸟有丰富的遗传多样性;常展伟^[6]采用 RAPD 指纹方法标记鸡、鸭、鸵鸟基因组,发现同种禽类具有共同指纹特征和物种内的相似性。施彦仲^[7]采用随机扩增多态性 DNA 技

* 收稿日期:2009-04-01 修回日期:2009-10-20

基金项目:陕西省农业攻关项目(2005K01-G7-02)。

作者简介:王咏絮(1983-),女,河北石家庄人,硕士研究生,研究方向为动物资源利用与保护。E-mail: yongxuwang@sina.com

* 通讯作者:任战军(1966-),男,陕西淳化人,副教授,硕士生导师,主要从事经济动物学等方面的教学和科研工作。

术(RAPD)和RAMPO技术(是一种结合了RAPD指纹与微卫星重复序列探针杂交的技术)^[8]分析鸵鸟的RAPD及RAMPO指纹,结果发现鸵鸟与鸡有一定的同源性。这些远远不能反映鸵鸟遗传资源现状。采用微卫星标记技术对鸵鸟的遗传多样性进行检测和分析,从分子水平进一步研究鸵鸟的遗传变异,探索其起源进化并正确评估其遗传多样性,为今后选育和保种提供依据和资料。

1 材料与方法

1.1 材料

参试鸵鸟来自陕西英考鸵鸟股份有限公司,共68只(♂:21,♀:47)。颈静脉采取没有直接亲缘关系的鸵鸟^[9]血样,每只采血5 mL,加肝素抗凝,存放于-80℃冰箱长期保存。

1.2 全血中基因组DNA的提取

参考文献^[10],取50 μL全血加入裂解液[1 mol/L Tris·Cl(pH8.0),0.5 mol/L EDTA,5 mol/L NaCl,10% SDS]600 μL,37℃水浴1 h,加蛋白酶K至终浓度100 ng/mL,颠倒混匀后56℃水浴消化12 h。加酚、氯仿和异戊醇[V(酚):V(氯仿):V(异戊醇)=25:24:1]600 μL于试管中,冰浴摇匀20 min,然后12 000 r/min离心10 min,取上清,如此抽提两遍,再加与上清等体积的氯仿和异戊醇[V(氯仿):V(异戊醇)=24:1]抽提一遍,离心取上清,加两倍体积无水乙醇沉淀DNA,用70%乙醇洗两遍,自然晾干,加适量纯水溶解。经紫外琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度双重检测其纯度和质量浓度后,稀释成50 ng/μL,作为PCR扩增的模板。

1.3 微卫星多态性检测

1.3.1 微卫星引物 从GenBank DNA序列库中的鸵鸟微卫星序列中选取19条,选自鸡的有20条微卫星序列^[11-12],作为对照设计引物,由上海生物工程技术有限公司合成,经筛选有20个(鸵鸟19个,鸡1个)微卫星座位扩增经琼脂糖凝胶电泳检测出目的条带,可用作多态性分析,它们分别是:LEI0094、CAU5、CAU7、CAU8、CAU11、CAU13、CAU14、CAU15、CAU16、CAU17、CAU22、CAU23、CAU24、CAU32、CAU34、CAU36、CAU42、CAU43、CAU46和CAU57。

1.3.2 PCR反应体系及条件 PCR反应体系为

25 μL,含模板DNA 50 ng,加10 μL天根生化科技有限公司出产的2×Taq PCR Master Mix, Taq酶1.25 U,引物0.1~1 μmol/L,按各引物条件于PTC-200型梯度PCR仪(Bio-Rad公司产品)上进行扩增。PCR反应条件为95℃预变性5 min,94℃变性30 s,50℃复性45 s,72℃延伸30 s,循环34次,最后72℃延伸10 min,-20℃保存。

1.3.3 PCR产物电泳检测 PCR产物先进行2%的琼脂糖凝胶电泳,经检测扩增产物符合目的片段范围后,再进行12%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,取PCR产物3 μL上样,分子量Marker为PBR322 DNA/MspI(天根生化科技有限公司产品),在150V电压下电泳8~12 h,银染显色用凝胶成像系统(Bio-Rad公司产品)照相,保留图像和凝胶,待做多态性分析。

1.4 数据统计分析

利用与凝胶成像系统配套的Quantity One软件结合人工进行评估,首先确定扩增片段的大小,判断并统计个体基因型,等位基因数目。然后,用PopGen32软件(version 1.31)^[13]计算微卫星座位的有效等位基因数、等位基因频率和期望杂合度,计算公式参考Nei(1987)Molecular Evolutionary Genetics,并根据Botstein等的公式^[13]利用Picalc软件计算多态信息含量。

2 结果与分析

2.1 微卫星扩增结果及多态性

20个微卫星座位除CAU13、CAU36、CAU46外,其他17个均呈现多态性(部分结果见图1~3)。平均每个座位等位基因数为8.3529±1.2803;CAU24等位基因最少,有6个;具有7个等位基因的座位有5个;具有8个等位基因的座位有5个;具有9个等位基因的座位的有3个;CAU14等位基因最多,有13个。各微卫星座位片段范围及等位基因数、有效等位基因数结果见表1。

2.2 杂合度和多态信息含量

由表1可见,所检测17个微卫星座位的期望杂合度在0.7974~0.8935,平均为0.8468±0.1368;多态信息含量(PIC)在0.7665~0.8758,平均为0.8213±0.0321,其中CAU7和CAU32杂合度最高,LEI0094杂合度最低,CAU32多态信息含量最高,LEI0094多态信息含

量最低。

每个座位的等位基因数越多,其群体多态性就越丰富。从表 1 来看,鸵鸟各微卫星座位平均等位基因低于 $11.60 \pm 5.82^{[1-3]}$,高于 $7.13 \pm 1.95^{[15]}$ 。这可能与鸵鸟种类、选择的微卫星座位和扩增条件有关。

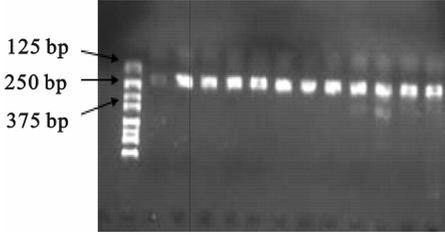


图 1 微卫星CAU8 的 PCR 产物琼脂糖检测结果

Fig. 1 PCR products of microsatellite CAU8 in agarose gel

群体平均期望杂合度越高,反映群体的遗传一致性就越低,其遗传多样性就越丰富。从期望杂合度来看,20 个微卫星座位有 17 个座位杂合度 >0.5 ,均在 0.7 以上,群体平均期望杂合度高

于 $0.6790 \pm 0.046^{[1-3]}$ 。

多态信息含量(PIC)用来表示微卫星 DNA 变异程度的一个指标,反映微卫星多态性的高低。当某座位的 $PIC > 0.5$ 时,说明该基因座位为高度多态性基因座,可提供较多信息;当 $0.25 < PIC < 0.5$ 时,为中度多态基因座位,能够提供较合理的信息;当 $PIC < 0.25$ 时,为低度多态基因座位,可提供的信息较少。本研究的 20 个微卫星座位中 17 个座位 $PIC > 0.5$,在 0.75 以上,属于高度多态。

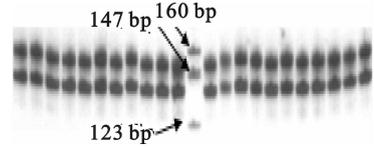


图 2 微卫星CAU13 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳结果(左起 47~68 号个体)

Fig. 2 PCR products of microsatellite CAU13 in nondenaturing polyacrylamide gel (Left No. 47~68)

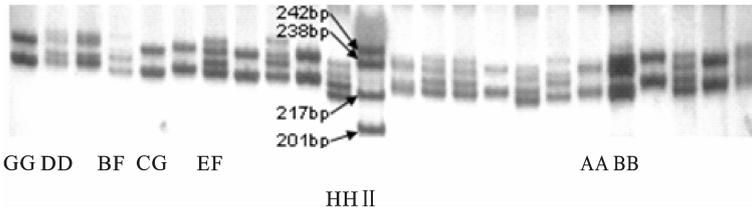


图 3 微卫星CAU43 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳结果(左起 1~23 号个体)

Fig. 3 PCR products of microsatellite CAU43 in nondenaturing polyacrylamide gel (Left No. 47~68)

表 1 各座位的等位基因大小、等位基因数、有效等位基因数、杂合度和多态信息含量

Table 1 Length of alleles(La), number of alleles(Na), number of effective allele(Ne), exp. Heterozygosity (He) and polymorphism information content (PIC) at each locus

座位 Locus	等位基因大小/bp La	等位基因数 Na	有效等位基因数 Ne	期望杂合度 He	多态信息含量 PIC
LEI0094	92~104	7	4.7967	0.7974	0.7665
CAU5	156~172	7	5.7192	0.8313	0.8037
CAU7	189~211	11	8.6016	0.8935	0.8725
CAU8	213~233	8	6.4694	0.8522	0.8274
CAU11	104~134	8	5.5157	0.8250	0.7980
CAU14	140~176	13	7.4334	0.8721	0.8546
CAU15	181~195	7	6.0134	0.8400	0.8125
CAU16	173~201	7	5.2736	0.8166	0.7844
CAU17	158~180	9	7.5679	0.8743	0.8536
CAU22	142~154	7	5.0752	0.8090	0.7755
CAU23	167~185	8	5.0347	0.8079	0.7803
CAU24	130~142	6	5.2464	0.8163	0.7823
CAU32	177~205	10	8.8366	0.8935	0.8758
CAU34	194~208	8	6.6307	0.8556	0.8309
CAU42	188~204	9	8.0839	0.8828	0.8631
CAU43	218~234	9	8.1700	0.8847	0.8650
CAU57	204~222	8	6.1070	0.8434	0.8154
平均数 Mean	—	8.3529 ± 1.2803	—	0.8468 ± 0.1368	0.8213 ± 0.0321

3 讨论

DeGortari 等^[16]选用奶牛的微卫星引物在鸡基因组中扩增,发现 56% 的引物可在鸡基因组扩增出特异性产物,其中 42% 的扩增产物表现出多态性。本试验采用鸡的微卫星引物扩增鸵鸟基因组,也获得了 1 个特异性产物,证明微卫星标记的保守性,但从引物来源方面来说,选择鸡的微卫星用于扩增鸵鸟的基因组,成功率低。本研究选用的鸡微卫星引物扩增出多态成功率仅为 25%;周霞^[17]的成功率也只有 20%,她对扩增出多态的片段进行测序比较,发现这些片段与鸡相应部位没有同源序列(CA)_n,说明鸟类在进化过程中由于地理隔离等因素造成许多重复的 DNA 序列内部发生碱基突变、遗传漂变或丢失,因而相同引物在两个物种中的扩增产物同源性较低^[17-18]。鸵鸟与其他家禽遗传关系较远,可借鉴的遗传信息较少,建议用构建基因文库的方法在鸵鸟上寻找更多的微卫星座位用于遗传多样性研究。

本试验发现 CAU13、CAU36、CAU46 三个座位无多态性,这与汤波^[14]的结果不同,可能与无效等位基因或影子带有关。由引物结合部位发生点突变导致的不能扩增出的等位基因称为无效等位基因^[19-20],它会导致群体中的纯合子明显过剩从而影响对等位基因统计的准确性。有人^[21-23]认为无效等位基因产生的原因与扩增条件(主要是温度的影响)和引物设计有关。影子带是由微卫星的一条特异扩增带和一条非特异扩增带错配形成的异源双链,通常它的位置是固定的,即与其正常的特异扩增条带之间的距离是一定的,其产生原因有报道^[24]认为是由于温度不准确和 DNA 聚合酶质量不高或失效导致了复制滑动,形成了非特异性扩增带。

参考文献:

[1] M Kawka J O, Horbanczuk, Sacharczuk M. Genetic characteristics of the ostrich population using molecular methods [J]. Poultry Science, 2007, 86(2): 277-281.

[2] Sacharczuk M, Horbanczuk J O, Jaszczak K. Dizygosity and monozygosity in two pairs of ostrich twins (*Struthio camelus* var. *domesticus*) as confirmed by DNA fingerprinting [J]. Anim Sci Pap Rep, 2001, 19: 241-244.

[3] Ward W K, McPartlan H C, Matthees M E, et al. Ostrich microsatellite polymorphism at the VIAS-OS4, VIAS-OS8, VIAS-OS14, VIAS-OS22 and VIAS-OS29 loci [J]. Anim Genet, 1998, 29: 331.

[4] Kimwele C N, Graves J A. A molecular genetic analysis of

the communal nesting of the ostrich (*Struthio camelus*) [J]. Molecular Ecology, 2003, 12: 229-36.

[5] 霍金龙, 苗永旺, 霍海龙, 等. 澳洲鸵鸟的随机扩增多态 DNA 研究 [J]. 西南农业学报, 2008, 21(1): 208-212.

[6] 常展伟. 鸵鸟基因组 DNA RAPD 指纹多态性研究及应用 [D]. 洛阳: 河南农业大学, 2008.

[7] 施彦仲. 鸵鸟 DNA 指纹的建立及分析 [D]. 台湾台中: 国立中兴大学, 1991.

[8] Soumaya Rhouma, Sonia Dakhlaoui-Dkhil, Ali Ould Mohamed Salem. Genetic diversity and phylogenetic relationships in date-palms (*Phoenix dactylifera* L.) as assessed by random amplified microsatellite polymorphism markers (RAMPOs) [J]. Scientia Horticulturae, 2008, 117(1): 53-57.

[9] 邓铸疆, 任战军, 王洪亮, 等. 种用鸵鸟体质量体尺与生产性能的相关及回归分析 [J]. 西北农业学报, 2009, 18(1): 45-47.

[10] 刘长国. 家禽血样固定及其 DNA 的提取 [J]. 西北农业学报, 2003, 12(3): 33-35.

[11] Groenen M A M, Cheng H H, Bumstead N. A consensus linkage map of the chicken genome [J]. Genome Research, 2000, 10: 137-147.

[12] 包文斌, 束婧婷, 孟春玲, 等. 安徽两个地方鸡品种遗传多样性的微卫星 DNA 分析 [J]. 安徽农业大学学报, 2007, 34(3): 379-383.

[13] Yeh F C, Yang R C. POPGENE Version 1. 31. Microsoft Window based Free-ware for Population Genetic Analysis [M]. University of Alberta and Center for International Forestry Research, 1999.

[14] 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.

[15] 汤波. 鸵鸟微卫星 DNA 的克隆、筛选与特性分析 [D]. 北京: 中国农业大学, 2002.

[16] DeGortari M J, Freking B K, Kappes S M, et al. Extensive genomic conservation of cattle microsatellite heterozygosity in sheep [J]. Animal Genetics, 1997, 28: 274-290.

[17] 周霞. 随机扩增多态 DNA 标记和微卫星标记在鸵鸟育种中的应用 [D]. 北京: 中国农业大学, 2001.

[18] Eden F C, Hendrick J P, Gottlieb S S. Homology of single copy and repeated sequence in chicken, duck, Japanese quail, and ostrich DNA [J]. Biochemistry, 1987, 17(24): 5113-5121.

[19] Paetkau. The molecular basis and evolutionary history of a microsatellite null allele in bears [J]. Mol Ecol, 1995, 4: 519-520.

[20] Ardren. Inheritance of 12 microsatellite loci in *oncorhynchus mykiss* [J]. Hered, 1999, 90(5): 529-536.

[21] Ishibashi. Null microsatellite alleles due to nucleotide sequence variation in the greysided vole *Clethrionomys rufocanus* [J]. Mol Ecol, 1996, 5: 589-590.

[22] Jones. The molecular basis of a microsatellite null allele from the white sands pupfish [J]. Hered, 1998, 89(4): 339-342.

[23] Ede. Mutations in the sequence flanking the microsatellite at the PAP8 loci prevent the amplification of some alleles [J]. Animal gene, 1995, 26: 43-44.

[24] 王吉振, 王爱国, 储明星, 等. 二核苷酸微卫星 PCR 扩增的影子带及其来源 [J]. 畜牧兽医学报, 2007, 38(3): 241-246.