

崔爱缺, 宫映颀, 章秀林, 等. 实验用鸡的遗传检测方法的初步建立[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(8): 23-30.

Cui AQ, Gong YD, Zhang XL, et al. Establishment of a genetic monitoring method for laboratory chickens [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(8): 23-30.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.08.004

实验用鸡的遗传检测方法的初步建立

崔爱缺^{1#}, 宫映颀^{1#}, 章秀林¹, 何洋¹, 张玮¹, 韩凌霞², 陈继兰³,
李长龙¹, 陈洪岩^{2*}, 陈振文^{1*}

(1.首都医科大学基础医学院, 北京 100069; 2.中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 哈尔滨 150069;
3.中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

【摘要】 目的 建立实验用鸡微卫星 DNA 遗传检测方法。方法 通过文献检索分析初步筛选出 72 个微卫星位点, 利用 PCR 和 STR 扫描确定扩增效果好、稳定性强的位点。初步确定适合封闭群和单倍型实验用鸡遗传检测的位点组合, 并在 3 个封闭群实验用鸡和 3 个单倍型实验用鸡的群体进行应用。结果 初步确定适用于封闭群实验用鸡遗传检测的 28 个微卫星位点组合和适用于单倍型实验用鸡遗传检测的 14 个微卫星位点组合。结论 初步建立了实验用鸡的遗传检测方法。

【关键词】 实验用鸡; 遗传检测方法; 微卫星; 封闭群; 单倍型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019)08-0023-08

Establishment of a genetic monitoring method for laboratory chickens

CUI Aique^{1#}, GONG Yidi^{1#}, ZHANG Xiulin¹, HE Yang¹, ZHANG Wei¹, HAN Lingxia², CHEN Jilan³,
LI Changlong¹, CHEN Hongyan^{2*}, CHEN Zhenwen^{1*}

(1.Capital Medical University School of Basic Medical Sciences, Beijing 100069, China.

2. Harbin Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150069.

3. Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193)

【Abstract】 Objective To establish a genetic monitoring method for laboratory chickens. **Methods** Seventy-two microsatellite loci were chosen from the literature. PCR and short tandem repeat (STR) scanning techniques were used to identify the loci with good amplification effects and stability. The loci suitable for genetic monitoring of closed-colony and haplotype laboratory chickens were preliminarily established. This genetic monitoring method was applied in three closed laboratory chicken colonies and three haplotype laboratory chickens. **Results** We preliminarily determined 28 microsatellite loci for genetic monitoring of closed-colony laboratory chickens and 14 microsatellite loci for genetic testing of haplotype laboratory chickens. **Conclusions** A genetic monitoring method for laboratory chickens is preliminary established.

【Keywords】 laboratory chicken; genetic monitoring method; microsatellite; closed colony; haplotype colony

【基金项目】北京市重点专项课题(D181100000518002);国家自然科学基金(31572348, 31572341, 31772545);黑龙江省自然科学基金重点项目(ZD2016006)。

【作者简介】崔爱缺(1999—),女,本科生,研究方向:医学遗传学。E-mail: 18233058801@163.com

宫映颀(1998—),女,本科生,研究方向:医学遗传学。E-mail: gongyd1998@163.com #共同第一作者

【通信作者】陈洪岩(1963—),男,博士,研究员,主要从事农业实验动物资源建设与应用。E-mail: chenhongyan@caas.cn

陈振文(1959—),男,博士,教授,主要从事实验动物资源开发及遗传与发育研究。E-mail: czwen@ccmu.edu.cn

* 共同通信作者

在禽类实验动物中,鸡在生命科学研究和医药产业中应用最为广泛。目前,北京 SPF 鸡胚的年产量约 840 万枚,非免疫鸡胚也超过 24 万枚。实验动物遗传质量控制是科学研究结果可靠性和准确性的重要保障,也是相关生物制品质量的重要保证。从遗传学方面来说,目前我国的实验用鸡有封闭群和主要组织相容性复合体(MHC)单倍型两种遗传特征^[1-2]。封闭群是一个远交群体,繁育过程中应保持基因异质性和多态性,繁殖方法应避免近交系数随繁殖代数增加而过快上升。单倍型实验用鸡主要关注的是个别或部分基因的同质性,繁殖方法采用全同胞或半同胞的繁殖方式。遗传特性和繁殖方式决定了不同群体的遗传质量要求^[3]。

微卫星 DNA(microsatellite DNA)又称短串联重复(short tandem repeats, STR),其包括核心序列和侧翼序列两部分,核心序列是以 1~6 个碱基为单位的 DNA 重复序列,重复次数一般不超过 60 次^[4-5]。微卫星具有信息含量高、基因组分布广泛、高度多态性、测定简单快捷等特点,已经成为应用范围最广的分子标记^[6-7]。目前我国已经建立封闭群 BWEL 鸡的微卫星 DNA 的遗传检测方法以及 MHC 鸡的测序检测方法^[3,8]。我国鸡的品种非常丰富,应用于科学研究和生物制品生产检定的品种也很丰富^[9]。本研究采用不同遗传背景的多种实验用鸡,研究探索实验用鸡微卫星 DNA 遗传检测方法,将为实验用鸡遗传质量控制以及其他鸡品种的遗传结果分析提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验采用 3 个封闭群实验用鸡和 3 个单倍型鸡群体。封闭群 BWEL-SPF 鸡,样本 40 个,37 周龄,其中 6 ♂ 34 ♀,来自白来航鸡血统[SCXK(黑)2017-005],目前已封闭饲养 20 世代;封闭群 BM 鸡样本 40 个,14 周龄,其中 6 ♂ 34 ♀,来自白来航鸡血统[SCXK(黑)2017-005];封闭群北京油鸡样本 46 个;MHC 单倍型鸡选育自第 13 代 BWEL 鸡群,根据 MHC 核心基因连续选育单倍体型,已采用半同胞兄妹交配方式繁殖至第 8 代,本次检测抽取了 G1 单倍型鸡样本 5 个,53 周龄,其中 1 ♂ 4 ♀;G2 单倍型鸡样本 5 个,93 周龄,其中 1 ♂ 4 ♀;G7 单倍型鸡样本 5 个,82 周龄,其中 1 ♂ 4 ♀。北京油鸡样本来源于中国农业科学院北京畜牧兽医研究所,其余群体

的血液样本来源于中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心暨国家禽类实验动物资源库。所有实验做到实验动物 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

PCR 扩增仪(ALS1296 型,美国 Bio-Rad 公司)。电泳仪(PCR-30 型,美国 Bio-Rad 公司)。血液基因组 DNA 提取试剂盒(Cat.#DP318-03)购于天根生化科技(北京)有限公司,蛋白酶 K 购于北京索莱宝科技有限公司;Taq DNA 聚合酶、dNTP 购于大连宝生物工程公司;微卫星引物、荧光标记微卫星引物由北京天一辉远生物科技有限公司合成。STR 扫描由北京天一辉远生物科技有限公司完成。

1.3 实验方法

1.3.1 选取微卫星位点

通过文献检索和遗传信息分析,筛选染色体均匀分布均匀、扩增效果好、多态性好、等位基因明确位点^[10-12],用于下一步的实验筛选。

1.3.2 鸡血液样本 DNA 的提取

使用血液基因组 DNA 提取试剂盒(TIANamp Blood DNA Kit)进行北京油鸡血液样本 DNA 的提取,采用紫外分光光度计和 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的浓度和纯度,所有 DNA 浓度均稀释为 50 ng/μL 放置 -20℃ 保存。

1.3.3 PCR 反应条件优化和琼脂糖凝胶电泳初筛

每个微卫星位点引物合成后进行 PCR 扩增,PCR 反应体系为 20 μL,10× buffer 2 μL,上下游引物(100 pM)各 1 μL,4× dNTP (100 μmol/L) 1 μL, Taq DNA 聚合酶 1 U 1 μL,基因组 DNA(50 ng/μL) 1 μL,纯水(ddH₂O) 15 μL,扩增时进行温度梯度扩增,扩增条件:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s;适宜退火温度 30 s;72℃ 延伸 30 s;35 个循环;72℃ 继续延伸 7 min;扩增产物 4℃ 保存。取扩增产物 5 μL 与 1 μL 的 6×loading buffer 混合后置于 2% 的琼脂糖凝胶电泳中,120 V,60 min,拍照成像。根据电泳图,挑选出扩增效率高、特异性好的位点保留,并记录条带最清晰时对应的最适温度。

1.3.4 荧光标记与 STR 扫描

用 FAM、HEX、TAMAR3 种荧光标记分别标记初步筛选位点的上游引物 5' 端。用标记好的荧光引物对 3 个封闭群鸡和 3 个单倍型鸡的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,将扩增好的 PCR 产物送往北京天一辉远生物科技有限公司进行 STR 扫描。

1.3.5 统计分析 STR 扫描结果

将最终的扫描结果导入 Gene Marker V2. 2. 0 软件,对于出现的典型波形进行分析与归类:样本基因型若为纯合,则只有一个主波;样本若为杂和基因型,则有两个或以上主波。

1.4 统计学方法

利用 Gene Marker V2. 2. 0 软件读出 6 个群体样本在每个微卫星位点的扩增片段大小,并将每个位点的等位基因按照扩增片段由小到大的顺序分别标记为 A、B、C、D 等,将其基因型按照 AA、AB 等格式输入 popgene 3. 2 软件进行分析,得到在每个微卫星位点上的观测等位基因数、有效等位基因数、香隆指数和有效杂合度等信息^[13]。利用 PIC 计算程序软件计算多个位点的多态信息含量,将从 popgene 3. 2 软件中得到的每个位点的等位基因数以及等位基因在群体中的频率输入记事本中,建立一个扩展名为 dat 的文本文件,将该文件导入 PIC 计算程序软件中可得到位点 PIC 值。

2 结果

2.1 微卫星位点的 PCR 初步筛选

通过文献检索和基因信息分析,共计获得 72 个微卫星位点。在琼脂糖凝胶电泳中出现特异性的条带共计 58 个位点,其条带范围为 50~350 bp。封闭群位点初筛最终选出多态性较好的 37 个微卫星位点。在单倍型中选出单态性好的 32 个微卫星位点。以 LEI0094 位点为例,结果如图 1 所示,LEI0094 位点在封闭群中呈现多态,在单倍型群体中为单态出现。

2.2 STR 分析

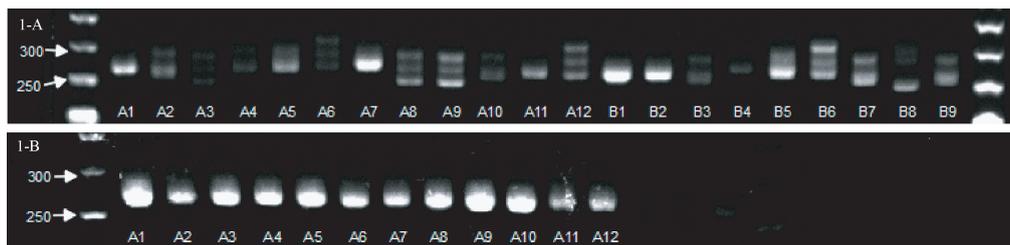
将琼脂糖凝胶电泳初筛获得位点进行 STR 扫描,并且将最终的扫描结果导入 Gene Marker 软件,读出并记录波峰处的扩增产物的长度。排除等位

基因较少、波峰形状异常的位点后,最后确定用于封闭群遗传检测位点 28 个,用于单倍型遗传检测的位点 14 个,其中共用位点 13 个。其中 GGVTIC 位点为共用位点,其在封闭群中为多态,存在 122 bp、140 bp 和 146 bp 的片段;在单倍型三个群体中均呈现为单态,但是在三个群体间存在差异,在 G1 群体中为 150 bp 的片段,在 G2 群体中为 142 bp 的片段,在 G7 群体中为 146 bp 的片段,结果如图 2 所示。位点 ADL0292 在 G1、G2 群体中为单一峰,分别呈现 128 bp 和 124 bp 的片段,在 G7 群体中存在明显双峰,呈现 120 bp 和 126 bp 的片段。所有微卫星 DNA 位点信息见表 1。

2.3 群体遗传分析

2.3.1 群体位点分析

将从 STR 中得到实验用鸡的位点信息输入 popgene 3. 2 后分析得到实验用鸡样品在封闭群和单倍型的 29 个位点上的观测等位基因数、有效等位基因数、有效杂合度及香隆指数。在封闭群中,28 个微卫星位点均表现出高度多态性,平均观测等位基因数为 7. 9643 个,其中 LEI0141 位点和 LEI0094 位点最高为 16 个,GGVITHIG * 位点和 GGNCAMZO 位点最低为 2 个;平均有效等位基因数为 4. 9459 个,其中 LEI0141 位点最高为 9. 3284 个,GGVITHIG * 位点最低为 1. 8349 个;平均香隆指数为 1. 667,其中 LEI0141 位点最高为 2. 4409,GGVITHIG * 位点最低为 0. 6474,表明在封闭群中,筛选位点的遗传多样性较好,且各位点的遗传多样性差别较大;平均有效杂合度为 0. 563,MCW0347 位点最高为 0. 833,ADL0201 位点最低为 0. 2183,表明群体中杂合度差异大,多数位点存在两个及两个以上等位基因。具体信息见表 2。



注:图 1-A:位点 LEI0094 在北京油鸡样本的琼脂糖凝胶电泳结果;图 1-B:位点 LEI0094 在 G1 样本的琼脂糖凝胶电泳结果。

图 1 实验用鸡微卫星 DNA 位点 LEI0094 的琼脂糖凝胶电泳结果

Note. Figure 1A, LEI0094 in closed group of III. Figure 1B, LEI0094 in inbred line G1.

Figure 1 Results of agarose gel electrophoresis of microsatellite DNA locus LEI0094 in the experimental chickens

表 1 用于实验用鸡遗传检测的 29 个微卫星位点

Table 1 Number of alleles, optimal amplification conditions and fragment length of 29 alleles for the experimental chickens

位点 Loci	引物序列(5'-3') Primer sequence	退火温度(°C) Temperature	等位基因数 Allele number	等位基因范围 Allele range	适用群体 Applicable groups
MCW0029	GTGGACACCCATTTGTAACCTATG CATGCAATTCAGGACCGTGCA	63.8	6	161~168	封闭群
GGNCAMZO	GTCACTAGGTTAGCAGCATG GCTGGATACAGACCTCGATT	56.0	8	189~210	封闭群 单倍型
ADL0293	GTAATCTAGAAACCCCATCT ACATACCGCAGTCTTTGTTTC	53.9	4	118~180	封闭群
ADL0317	AGTTGGTTTCAGCCATCCAT CCCAGAGCACACTGTCAGT	58.5	3	138~220	封闭群
GGAVIR	AGAGATGGTGCACGCAACCT CGAGCACTTCTGGCAGAGA	60.7	12	122~174	封闭群 单倍型
GCT0016	TCCAAGTTCTCCAGTTC GGCATAAGGATAGCAACAG	52.2	6	119~151	封闭群
ADL0304	GGGGAGGAACTCTGGAATG CCTCATGCTTCGTGCTTTTT	53.9	3	126~154	封闭群
MCW0063	GGCTCCAAAAGCTTGTCTTAGCT GAAAACCAGTAAAGCTTCTTAC	53.9	9	153~205	封闭群 单倍型
ADL185	CATGGCAGCTGACTCCAGAT AGCGTTACCTGTTCGTTTTGC	58.5	7	138~263	封闭群 单倍型
GGMYC	CGAGGCGCTCTGCCAGTTTA TGGGGACCTCTGGCTCTGAC	62.4	6	117~145	封闭群 单倍型
LEI0094	GATTCACCACTATGAGCTGC TCTCACACTGTAACACAGTGC	53.9	7	146~260	封闭群 单倍型
LEI0074	GACCTGGTCTGACATGGGTG GTTTGCTGATTAGCCATCGCG	58.5	5	241~271	封闭群
ADL328	CACCCATAGCTGTGACTTTG AAAACCGGAATGTCTAACTG	53.9	6	128~157	封闭群
GGVITC	AGCCATCATTACAGGCATCT GATGTCCTGAGTGATGCTCA	58.5	6	117~152	封闭群 单倍型
GGANTECI	GCGGGCCGTTATCAGAGCA AGTGCAGGGCCCTCCTGGT	65.0	5	137~154	封闭群
LEI0094*	CAGGATGGCTGTTATGCTTCCA CACAGTGCAGAGTGGTGCCA	56.0	7	144~174	封闭群
MCW0330	TGGACCTCATCACTCTGACAG AATGTTCTCATAGAGTTCTCTGC	58.5	9	234~246	封闭群
LEI0141	CGCATTGATGCATAACACATG AAGGCAAACCTCAGCTGGAACG	52.2	10	236~332	封闭群
ADL0292	CCAAATCAGGCAAAACTTCT AAATGGCCTAAGGATGAGGA	58.5	9	120~159	封闭群 单倍型
GGVITHG*	GGCAGTTTCTAATGCCTGA CCCATCGTTTCAACTGTATG	56.0	6	121~162	封闭群 单倍型
MCW0087	ATTTCTGCAGCCAACCTGGAG CTCAGGCAGTTCTCAAGACA	58.5	7	248~336	封闭群
MCW0347	GCTTCCAGATGAGCTCCATGG CACAGCGCTGCAGCAACTG	52.0	10	147~171	封闭群
ADL176	TTGTGGAATTCTGGTGGTAGC TTCTCCCGTAACTCGTCA	58.5	5	136~206	封闭群
ADL166	TGCCAGCCGTAATCATAGG AAGCACACGACCCAATCTA	58.5	14	142~153	封闭群 单倍型
MCW0014	AAAATATTGGCTCTAGGAACTGTC ACCGGAAATGAAGGTAAGACTAGC	58.5	11	118~149	封闭群 单倍型
GGCYMA*	AGCGAGGCGCTCTGCCGAGTT GGGCACCTCTGGCTCTGACC	64.6	17	137~164	封闭群 单倍型

(续表 1)

位点 Loci	引物序列(5'-3') Primer sequence	退火温度(°C) Temperature	等位基因数 Allele number	等位基因范围 Allele range	适用群体 Applicable groups
ADL0201	GCTGAGGATTCAGATAAGAC AATGGCYGACGTTTCACAGC	58.5	5	151~179	封闭群
MCW0402	ACTGTGCCTAGGACTAGCTG CCTAAGTCTGGGCTCTTCTG	56.0	7	177~203	封闭群 单倍型
STMSGGHU2-1A	CTTAATATGTGTGAGGTGGC GTTCTCACAATTGCATTAGC	53.9	3	158~165	封闭群 单倍型

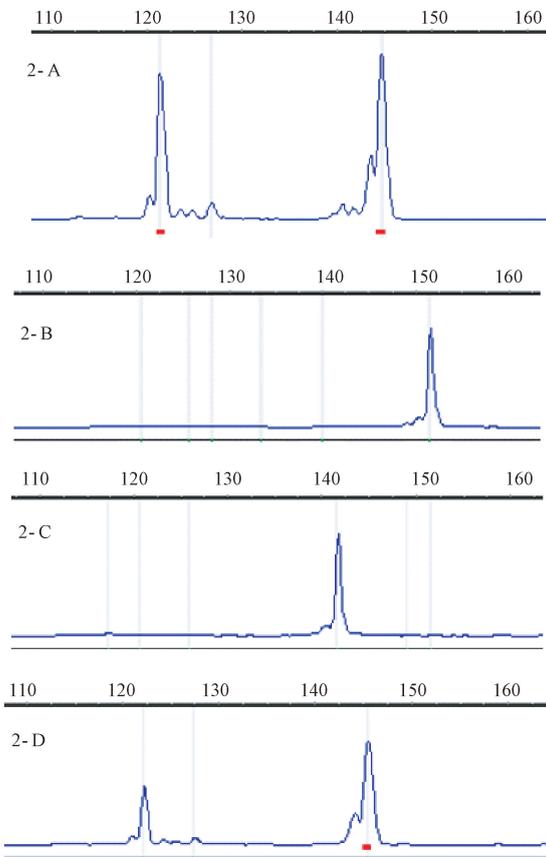
表 2 封闭群实验用鸡样品的观测等位基因数、有效等位基因数、有效杂合度、PIC 和香隆指数

Table 2 Number of alleles, effective alleles, effective heterozygosity, PIC and Shannon's index of the closed colony chicken samples

位点 Loci	观测等位基因数 Observed number of alleles	有效等位基因数 Effective number of alleles	香隆指数 Shannon's Information index	有效杂合度 Effective heterozygosity	多态信息含量 PIC
MCW0029	6	3.3433	1.4375	0.5387	0.6612
GGNCAMZO	2	1.8989	0.6663	0.3267	0.3613
ADL0293	6	2.3513	1.1781	0.2454	0.5384
ADL0317	5	2.8421	1.2401	0.3506	0.5999
GGAVIR	8	4.3708	1.6538	0.6796	0.7372
ADL0201	8	2.8967	1.4103	0.2183	0.6176
GCT0016	9	5.5046	1.9086	0.4304	0.7963
ADL0304	8	4.5696	1.6827	0.5247	0.7484
MCW0402	8	5.6471	1.9011	0.2743	0.8016
MCW0063	11	7.3114	2.1532	0.6498	0.8494
ADL185	10	7.4667	2.1307	0.7239	0.8518
GGMYC	4	3.169	1.2351	0.6333	0.6245
LEI0094	16	7.5985	2.3493	0.7817	0.8566
LEI0074	4	3.1589	1.2088	0.6713	0.6193
ADL328	11	8.0431	2.1908	0.5515	0.8628
GGVITC	4	2.7273	1.1343	0.5733	0.5645
GGANTECL	12	7.2321	2.1626	0.5488	0.8471
LEI0094*	10	6.6437	2.0452	0.707	0.8326
MCW0330	7	3.698	1.5486	0.6034	0.6941
LEI0141	16	9.3284	2.4409	0.8147	0.8837
ADL0292	8	3.7439	1.5179	0.7035	0.6918
GGVITHG*	2	1.8349	0.6474	0.3333	0.3515
MCW0087	8	6	1.8962	0.535	0.8118
MCW0347	10	8.1013	2.1749	0.833	0.8638
ADL176	5	3.5556	1.3917	0.5267	0.6702
ADL166	6	4.4816	1.5725	0.6578	0.7416
MCW0014	10	4.2038	1.7792	0.5579	0.7397
GGCYMA*	9	6.7635	2.0186	0.7684	0.8348
Mean	7.9643	4.9459	1.667	0.563	0.7162

在 3 个单倍型群体中,14 个微卫星位点均表现出一致的单态性,平均观测等位基因数为 2.0714 个,STMSGGHU2-1A 位点最高为 3 个,其余位点均为 2 个,主要由于单倍型 3 个群体中位点一致性良好,但 3 个群体间存在差异;平均有效等位基因数为 1.6972 个,

STMSGGHU2-1A 位点最高为 2.1778 个,MCW0402 位点最低为 1.3243 个;平均香隆指数为 0.5995,STMSGGHU2-1A 位点最高为 0.876,MCW0402 位点最低为 0.4101,表明位点遗传多样性差,各位点遗传多样性相近;平均有效杂合度为 0.3794,STMSGGHU2-1A 位



注:图 2-A:位点 GGVITC 下封闭群动物中表现为多态,分别为 122 bp 和 146 bp;图 2-B:位点 GGVITC 下单倍型 G1 动物中表现为 150 bp 单态;图 2-C:位点 GGVITC 下单倍型 G2 动物中表现为 142 bp 单态;图 2-D:位点 GGVITC 下单倍型 G7 动物中表现为 146 bp 单态。

图 2 实验用鸡微卫星 DNA 位点 GGVITC 的 STR 扫描结果

Note. Figure 2A, The STR diagram corresponding to the sample of closed group under primer GGVITC shows heterozygote with two wave peaks of 122 bp and 146 bp, respectively. Figure 2B, The STR graph corresponding to the sample of haploid type under primer GGVITC shows homozygote with a wave peak of 150 bp. Figure 2C, The STR graph corresponding to the sample of haploid type under primer GGVITC shows homozygote with a wave peak of 142 bp. Figure 2D, The STR graph corresponding to the sample of haploid type under primer GGVITC shows homozygote with a wave peak of 146 bp.

Figure 2 Results of GGVITC scan of the experimental chekens

点最高为 0.4983, MCW04021 位点最低为 0.2317, 表明杂合度差异较小, 所选位点的遗传信息较为单一。具体信息见表 3。

2.3.2 群体遗传结构分析

在 3 个封闭群中, 北京油鸡平均观测等位基因数、平均有效等位基因数、平均香隆指数和平均有效杂合度均最高, 表明北京油鸡群体多样性最好。BM 种群中平均观测等位基因数、平均有效等位基

因数、平均香隆指数均最低, 平均有效杂合度与 BWEL 均为 0.5566。表明 BM 种群多样性最低(表 4)。

在单倍型群体中, 单倍型 G2、G7 平均观测等位基因数最高为 2 个, 单倍型 G1 最低为 1.8571 个, 三个群体内异质性较好, 但是群体间存在一定的差异, 主要受其繁殖方式(全同胞或半同胞)的影响。单倍型 G2 平均有效等位基因数最高为 1.7243 个, 单倍型 G1 最低为 1.6154 个。单倍型 G7 平均香隆指数最高为 0.5881, 单倍型 G1 最低为 0.5108。单倍型 G1、G2、G7 平均有效杂合度均为 0.3794。3 个群体的遗传杂合度很低且一致性好(表 5)。

3 讨论

3.1 研究方法与分型方法的选择

从 DNA 水平研究生物遗传多样性有多种研究方法, 微卫星 DNA、线粒体 DNA(mtDNA)、限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)、单链构象多态性(PCR-SSCP)和特定基因多态性等方法。赵献芝等^[14]采用将微卫星标记与荧光标记引物测序相结合的技术研究了重庆地方鸡品种的遗传多样; 武艳平等^[15]利用 mtDNA 的 D-loop 区来分析江西地鸡品种的群体结构、网络关系及系统进化情况; 周敏等^[16]采用此方法对 4 个鸡品种进行 VIPR-1 基因遗传多样性分析; 常国斌等^[17]运用该方法检测鸡 A-FABP 基因的 SNP 及后代分离群体不同基因型的时空表达规律。微卫星 DNA 具有多态性高、共显性遗传和高分辨率等特点, 且微卫星标记较之其他方法如 PCR-SSCP, 有着操作简单、分析程序简洁、研究所需 DNA 量较小等优势, 故而本研究选择采用微卫星 DNA 分子标记技术。

在微卫星多态性分析中, 分型方法主要包括琼脂糖凝胶电泳法、聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)-银染法、荧光标记引物测序法^[18]。琼脂糖凝胶电泳操作简便、快速, 但是分辨率不高; PAGE-银染法分辨率高, 操作繁琐, 受其他因素影响大, 而且在进行大批量样本和标记分型时工作量大; 荧光标记引物测序法, 可以克服肉眼分辨能力不客观等缺点, 得到更加清晰的图谱和准确的分析结果, 快捷准确, 真正实现了高通量与自动化的结合, 试验周期短, 结果理想。另外, 对于 MHC 单倍型鸡的判定还可以采用 PCR 结合直接测序法, 这种方法针对 MHC 核心区域的 2 个片段进行扩增并测序对比^[3], 适用

表 3 单倍型实验用鸡样品的观测等位基因数,有效等位基因数,有效杂合度和香隆指数

Table 3 Number of alleles, effective alleles, effective heterozygosity, PIC and Shannon's index of the haplotype chicken samples

位点 Loci	观测等位基因数 Observed number of alleles	有效等位基因数 Effective number of alleles	香隆指数 Shannon's Information index	有效杂合度 Effective heterozygosity	多态信息含量 PIC
GGNCAMZO	2	1.5077	0.5196	0.285	0.2801
GGAVIR	2	1.6897	0.5983	0.3917	0.3249
MCW0402	2	1.3243	0.4101	0.2317	0.2150
MCW0063	2	1.8491	0.6518	0.445	0.3537
ADL185	2	1.8491	0.6518	0.4333	0.3537
GGMYC	2	1.5077	0.5196	0.285	0.2801
LEI0094	2	1.9898	0.6906	0.4763	0.3737
GGVITC	2	1.6897	0.5983	0.38	0.3249
ADL0292	2	1.6897	0.5983	0.3917	0.3249
GGVITHG *	2	1.6897	0.5983	0.3917	0.3249
ADL166	2	1.6897	0.5983	0.3917	0.3249
MCW0014	2	1.5077	0.5196	0.3383	0.2801
GGCYMA *	2	1.6	0.5623	0.3717	0.3047
STMSGGHU2-1A	3	2.1778	0.876	0.4983	0.4528
Mean	2.0714	1.6972	0.5995	0.3794	0.3227

表 4 鸡封闭群群体的平均观测等位基因数、平均有效等位基因数、平均香隆指数、平均有效杂合度的比较

Table 4 Comparison of mean observed allele number, mean effective allele number, mean Shannon's index and mean effective heterozygosity among the closed colonies of chickens

位点 Loci	平均观测等位基因数 Observed number of alleles	平均有效等位基因数 Effective number of alleles	平均香隆指数 Shannon's Information index	平均有效杂合度 Effective heterozygosity
BWEL	5.2692	3.316	1.1402	0.5566
BM	4.2692	2.9941	1.0587	0.5566
北京油鸡	5.7143	3.8266	1.3372	0.563

表 5 单倍型鸡群体的平均观测等位基因数、平均有效等位基因数、平均香隆指数、平均有效杂合度的比较

Table 5 Comparison of mean observed allele number, mean effective allele number, mean Shannon's index and mean effective heterozygosity among the haplotype chickens

群体 Colonies	平均观测等位基因数 Observed number of alleles	平均有效等位基因数 Effective number of alleles	平均香隆指数 Shannon's Information index	平均有效杂合度 Effective heterozygosity
G1	1.8571	1.6154	0.5108	0.3794
G2	2	1.7243	0.5782	0.3794
G7	2	1.6773	0.5881	0.3794

于部分序列高度一致的群体,但此种方法对实验仪器设备要求较高。因此,分析对比各种分型方法的优缺点并结合本实验的实际情况,本实验选择荧光标记引物测序法。

3.2 杂合度与多态信息含量

杂合度是度量群体遗传变异的一个参数。张剑等^[19]利用 29 对微卫星标记对北京油鸡保种群 192 个个体进行了遗传多样性检测,发现 29 个微卫星中有 19 个位点呈高度多态,且平均期望杂合度为 0.59。本研究中,封闭鸡群的平均期望杂合度为 0.56,其中北京油鸡的平均期望杂合度为 0.5630,与张剑等人研究结果相似,这也进一步证明北京油鸡具有丰富的遗传多样性和较高的选择潜力,可能

是由于北京油鸡群体较大等原因导致。在本研究中 3 个单倍群体中平均有效杂合度均为 0.3794,表明单倍型实验用鸡群体一致较好。这由于长期的全同胞和半同胞繁殖的结果。

多态信息含量(PIC)是衡量基因变异程度高低的一个指标,多态信息含量越高,基因座所提供的遗传信息就越多^[20]。本研究中,封闭群 28 个微卫星座位中有 26 个位点处于高度多态,2 个位点为中度多态,无低度多态位点。28 个微卫星座位的平均 PIC 为 0.7162,能够为评价实验用鸡的遗传多样性提供充分的信息。在 3 个单倍型群体中,所采用的 14 个位点中 13 个位点均表现为单态,只有 1 个位点表现为多态,说明单倍型群体产期的近交繁育使

得其遗传背景高度一致化。但是 13 个呈现单态的位点在单倍型群体间也存在差异,表明不同单倍型群体间依然存在不同。

实验用鸡的遗传质量控制对生命科学研究和生物制品生产具有非常重要的意义。本研究中选择 3 个封闭群实验用鸡群体和 3 个单倍型鸡群体,通过 PCR、琼脂糖凝胶电泳法和 STR 方法筛选,初步建立封闭群和单倍型实验用鸡的微卫星 DNA 的遗传检测方法,并在 3 个封闭群和 3 个单倍型实验用鸡的群体中进行了应用。本研究建立的微卫星 DNA 检测方法适用于实验用鸡的遗传质量检测。

参考文献:

- [1] 南锡,夏长友,陈洪岩. SPF 种鸡群的培育 [J]. 实验动物科学与管理,2003,20(Z1): 145.
- [2] Gao C, Han L, Han J, et al. Establishment of six homozygous MHC-B haplotype populations associated with susceptibility to Marek ' s disease in Chinese specific pathogen-free BWEL chickens [J]. Infect Genet Evol, 2015, 29: 15-25.
- [3] 韩凌霞,孟兴,佟相慧,等. 实验动物 SPF 鸡质量控制标准介绍 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(3): 72-78.
- [4] Beckmann JS, Weber JL. Survey of human and rat microsatellites [J]. Genomics, 1992, 12(4): 627-631.
- [5] Weitzmann MN, Woodford KJ, Usdin K. The mouse Ms6-hm hypervariable microsatellite forms a hairpin and two unusual tetraplexes [J]. J Biol Chem, 1998, 273(46): 30742-30749.
- [6] 张艳,张树义. 微卫星方法简介 [J]. 动物学杂志, 1999, 34(2): 42-45.
- [7] Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers [J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17(16): 6463-6471.
- [8] 肖兵兵,韩凌霞,牛成明,等. 应用微卫星 DNA 标记对 BWEL-SPF 鸡种群的群体遗传学分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(9): 106-111.
- [9] 蔡秀萍,王杏龙. 我国地方鸡种遗传多样性研究进展 [J]. 广东农业科学.2005, (1): 95-98.
- [10] Khatib H, Genislav E, Crittenden LB, et al. Sequence-tagged microsatellite sites as markers in chicken reference and resource populations [J]. Anim Genet, 1993, 24(5): 355-362.
- [11] Seo JH, Lee JH, Kong HS. Assessment of genetic diversity and phylogenetic relationships of Korean native chicken breeds using microsatellite markers [J]. Asian-Australas J Anim Sci, 2017, 30(10): 1365-1371.
- [12] Rudresh BH, Murthy HN, Jayashankar MR. Microsatellite based genetic diversity study in indigenous chicken ecotypes of Karnataka [J]. Vet World, 2015, 8(8): 970-976.
- [13] 徐玲玲,吴艳花,路静,等. 筛选适用于小型猪遗传检测的微卫星位点 [J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(2): 11-16.
- [14] 赵献芝,王阳铭,李静,等. 重庆地方鸡微卫星遗传多样性研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2012, 55(6): 58-61.
- [15] 武艳平,霍俊宏,刘林秀,等. 江西地方鸡的系统进化及遗传多样性研究 [J]. 江西农业大学学报, 2011, 33(6): 1160-1163.
- [16] 周敏,刘满清,康乐,等. 4 个鸡品种 VIPR-1 基因遗传多样性分析 [J]. 广东农业科学, 2010, 37(10): 156-161.
- [17] 常国斌,周琼,栾德琴,等. 鸡 A-FABP 基因不同基因型遗传效应及初步验证 [J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(8): 1088-1094.
- [18] 赵献芝,王阳铭,李静,等. 微卫星 DNA 分型方法及比较 [J]. 上海畜牧兽医通讯, 2010, 5: 70-71.
- [19] 张剑,初芹,张尧,等. 利用微卫星标记分析北京油鸡遗传多样性的研究 [J]. 中国家禽, 2013, 36(7): 47-49.
- [20] Vanhala T, Tuiskula-Haavisto M, Elo K, et al. Evaluation of genetic variability and genetic distance between eight chicken lines using microsatellite markers [J]. Poul Sci, 1998, 77(6): 783-790.

[收稿日期] 2019-05-30