

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.00521

丝羽乌骨鸡微卫星标记多重 PCR 体系的建立与初步应用

孟祥军^{1,2}, 朱庆¹, 张明亚³, 李亮¹, 刘益平¹

1. 四川农业大学动物科技学院, 雅安 625014;
2. 杭州市余杭区畜牧兽医局, 余杭 311100;
3. 杭州汇诚生命科学研究有限公司, 萧山 311251

摘要: 采用多重 PCR 的方法, 对其反应条件进行优化, 以获得用于丝羽乌骨鸡遗传分析的稳定 PCR 体系。18 个微卫星标记共获得 5 个扩增效果理想的组合, 其中 3 个为四重 PCR, 2 个为三重 PCR。将扩增产物进一步合并为 3 组, 用 ABI 3100-Avant 遗传分析仪检测。实验结果表明, 所选用的微卫星标记表现出丰富的多态性, 可成功地应用于丝羽乌骨鸡的遗传分析。

关键词: 丝羽乌骨鸡; 微卫星标记; 多重 PCR

Establishment and preliminary application of multiplex PCR for detecting the microsatellite markers in silkies

MENG Xiang-Jun^{1,2}, ZHU Qing¹, ZHANG Ming-Ya³, LI Liang¹, LIU Yi-Ping¹

1. College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;
2. Yuhang District Animal Husbandry and Veterinary Bureau, Yuhang 311100, China;
3. Hangzhou Alltrust Life Science Research Co., Ltd., Xiaoshan 311251, China

Abstract: In order to obtain the stable PCR combinations for silkies genetic analysis, multiplex PCR was used and its reaction condition was optimized. Five combinations of multiplex PCR with good effects were obtained from eighteen microsatellite markers. Three of them were quadruplex-PCRs, and two were triplex-PCRs. The products of multiplex PCR were further combined into three sets for the electrophoresis on ABI 3100-Avant Genetic Analyzer. The results suggested that the eighteen microsatellite markers could be successfully applied to the silkies genetic analysis.

Keywords: silkies; microsatellite markers; multiplex PCR

多重PCR(Multiplex PCR)又称复合PCR, 它是在同一PCR体系内用多种引物对同一模板同时进行扩增, 1 次反应就可以获得多个基因产物, 之后 1 次电泳即可检测到多个基因的基因型。该技术具有方便、快捷、节约等优点, 自Chamberlian等^[1]用多重PCR检测杜氏肌肉营养不良症基因以来, 已被成功

地应用于生命科学研究的许多领域。

鸡的基因组大小有 3 800 cM 左右^[2], 要建立一个用于基因组扫描的初级连锁图谱(标记间距 10~20 cM), 需要 200 多个微卫星基因座标记, 再考虑到样本大小, 那么仅凭单一PCR, 这是一项繁冗的工作。然而, 利用多重PCR方法, 不仅可以减轻实验

收稿日期: 2007-09-28; 修回日期: 2008-01-18

基金项目: 四川省畜禽育种攻关项目(编号: 01NG002-06)资助[Supported by Animal and Poultry Breeding Key Project in Sichuan Province(No.01NG002-06)]

作者简介: 孟祥军(1978-), 男, 山东诸城人, 硕士, 专业方向: 动物遗传育种。Tel: 0571-86224731; E-mail: mxj0719@163.com

通讯作者: 朱庆(1959-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动物遗传育种。E-mail: zhuqing5959@163.com

室工作量,而且可以降低实验成本、加速实验进程[3~5],因此这项技术在鸡的基因组研究中有着广泛的应用[5~7]。

本文通过对多重 PCR 引物组合的优化,旨在获得可用于丝羽乌骨鸡基因组研究的稳定 PCR 体系,为下一步增大个体数量进行遗传连锁图谱构建及 QTL 定位奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验用鸡来自成都黄忠种鸡场丝羽乌骨鸡 BM(白羽母系)、BF(白羽父系)两个蛋用新品系,每个品系各有 30 个家系(均按照 1♂×9 组群建立家系),

相同的环境条件下单笼饲养,专人管理并作相应记录。

1.2 基因组 DNA 的准备

用含肝素钠的注射器于鸡翅静脉采血 1.5 mL,转移到已灭菌的 2 mL Eppendorf 管中,−70 保存。传统酚-氯仿法抽提 DNA,琼脂糖凝胶电泳后确定各 DNA 样品的稀释倍数。取少量原液分装,稀释到 50 ng/μL,4 冰箱保存备用,其余的−20 保存。

1.3 微卫星标记的选择

参照已发表的 3 个鸡参考群的连锁图谱,在 Z 及 1 号染色体上选取 20 个微卫星标记[8],委托上海生工生物工程技术有限公司合成,上游引物用两种荧光染料 6-FAM、HEX 进行修饰(表 1)。

表 1 20 个微卫星标记的位点信息

Table 1 Locus information of 20 microsatellite markers

基因座 Locus	上/下游引物 Primer pairs(5' 3')	染色体 Chromosome	片段大小 Length(bp)	复性温度 Temperature()	Mg ²⁺ 浓度 Concentration(mmol /L)	荧光修饰 Fluorescence modified
MCW0294	ACTGAACAGAAACAGTCTTCC CTTCTCTAGATGTCCACTACC	Z	306–317	55	1.5	5'-6FAM
MCW0101	GTTTGTGTTGCATCTGTAGTCTG CCATATTCTGTTAGAAAGTAGAG	1	273–279	55	1.5	5'-6FAM
MCW0181	GATCTCCAGAGGTCCTTTCC GTGATGTTGAACACTGCAGTC	1	249–255	55	1.5	5'-6FAM
MCW0289E	TAGTGCAGAAAGACAAGGCAG GATCCTTCCTCCTTCACTGG	1	217–234	55	1.5	5'-6FAM
MCW0068	CCTCACTGTGTAGTGTGGTAGTCA GAGAAGCTTGAACCTACCAGTCTT	1	171–193	55	1.5	5'-6FAM
MCW0168	GATCAGATTTATTTCCCTCA CTGATTTCTAGAGCTGACTGA	1	115–121	55	1.5	5'-6FAM
LEI 0134	ACATTCAAGCCCTGACTCAGC AATTCCTGCACGTCCAGCTG	1	294–298	55	1.5	5'-6FAM
MCW0112	ATCTCTCTGCCCATGTTTCAG GATCACTAAGGTCCCTTCAA	1	263–277	55	1.5	5'-6FAM
MCW0313	GATCTGCTGGCAAACCTTT TCTCTCAGCCTCATAAACTAG	1	226–252	55	1.5	5'-6FAM
MCW0154	GATCTGTTTTATCACACACAC CCAATTCCTTTGTTATCAGGC	Z	171–193	55	1.5	5'-6FAM
MCW0036	CCTCATGTGAAGCATCTTTTCATA TGCTTCAGTAGGACTGTGATAC	1	141–153	55	1.5	5'-6FAM
MCW0254	GAACCAATGAAAGCGAGATGC GTGTTCAAAATGCTGAGAAGTG	1	115–121	55	1.5	5'-6FAM
LEI 0106	AAACCTTCAAATGGTTAAAATGC GTCAGCATGACAGCAGCTGAG	1	289–300	55	1.5	5'-HEX
MCW0200	GAGACATTGCAAATACTCAGC TAGTCAGGGAGTTCAGGAAGG	1	241–263	55	1.5	5'-HEX
MCW0331	CAGAGCAGCTGGAGATGTAAAG AGAGGGTAAGAAATCTGCTG	Z	216–222	55	1.5	5'-HEX

续表

基因座 Locus	上/下游引物 Primer pairs(5' 3')	染色体 Chromosome	片段大小 Length(bp)	复性温度 Temperature(℃)	Mg ²⁺ 浓度 Concentration(mmol/L)	荧光修饰 Fluorescence modified
MCW0258	TTCTTAGTCCTTGCCAGAGGC CTGCAGGAGGATGTGTCCTAG	Z	141–162	55	1.5	5'-HEX
MCW0177	TTAAAACTGTGTCCATGTAAGC GTAGAAACATGAACACTCTACC	1	293–316	55	1.5	5'-HEX
LEI 0146	TCAAGCCACCAAAGTGCTTGG GATCACTCTGCTCATAGCAGT	1	258–276	55	1.5	5'-HEX
MCW0208	TGACACCCAGATGCAGCAATC TACATGACTGAGAGGCTGGTG	1	228–239	55	1.5	5'-HEX
MCW0128	CACATCCTTCTTAGCAGTCAC CTGATGAAAAATTGTCCAAGTAG	Z	170–176	55	1.5	5'-HEX

1.4 多重 PCR 扩增

1.4.1 PCR 条件的摸索

首先选取几个 DNA 模板进行单一标记 PCR, 以摸索反应体系内各试剂的添加量, PCR 程序: 95℃ 预变性 10 min (94℃ 变性 45 s, 55℃ 复性 1 min 30 s, 72℃ 延伸 1 min)共 35 个循环 72℃ 延伸 10 min 4℃ 保存。

将单一标记 PCR 产物用 1.5%琼脂糖凝胶电泳, 选取能看到条带的产物, 用 ABI 3100-Avant 遗传分析仪检测, 根据波峰图形、信号强度等来确定各上样成分的最佳用量。最终确定的单一标记 PCR 体系内各试剂添加量见表 2。

表 2 单一标记 PCR 体系

Table 2 Components of single PCR system (20 μL)

试 剂 Reagent	体 积 Volume (μL)	备 注 Notes
10 × PCR buffer	2.0	Mg ²⁺ free
dNTP Mix	1.6	2.5 mmol/L
Mg ²⁺	1.2	25 mmol/L
Forward primer	1.0	0.033 μg/μL
Reverse primer	1.0	0.033 μg/μL
Taq polymerase	0.2	5 U/μL
DNA 模板	2.0	50 ng/μL
水	11.0	灭菌超纯水

1.4.2 多重 PCR 的优化组合

根据单一标记 PCR 结果并结合引物 5' 端荧光差异、片段长度不重叠以及尽量避免引物间配对的原则, 将几个不同的引物组合在一起, 对 DNA 模板进行多重扩增。通过调整反应体系内各引物的组合、各反应试剂添加量等, 对多重 PCR 体系进行优化。

按照优化后的引物组合对全部 DNA 模板进行多重 PCR 扩增, 程序与单一标记 PCR 完全相同, 但各反应试剂添加量随不同组合而变化(表 3)。

表 3 多重 PCR 体系(20 μL)

Table 3 Components of multiplex PCR system (20 μL)

试 剂 Reagent	体 积 Volume (μL)	备 注 Notes
10 × PCR buffer	2.0	Mg ²⁺ free
dNTP Mix	1.6	2.5 mol/μL
Mg ²⁺	1.2	25 mmol/L
Primer F (1~5 组)	2.6/2.4/1.5/2.2/1.6	0.033 μg/μL
Primer R (1~5 组)	2.6/2.4/1.5/2.2/1.6	0.033 μg/μL
Taq polymerase	0.2	5 U/μL
DNA 模板	2.0	50 ng/μL
水 (1~5 组)	7.8/8.2/10.0/8.6/9.8	灭菌超纯水

1.5 多重 PCR 产物的检测

在 ABI3100-Avant 遗传分析仪上完成多重 PCR 产物的电泳检测, 操作步骤严格按照使用说明。在做检测时, 根据引物 5' 端荧光差异、片段长度不重叠以及尽量避免引物间配对的原则, 将每个 DNA 模板的 5 组多重 PCR 产物重新分成 3 个组合。考虑到检测的灵敏度问题(即不同位点的电泳图象必须清晰可读, 信号强度能够进行数据分析), 通过反复实验, 将分子量标准 GS-500、去离子甲酰胺上样液 Hidi、多重 PCR 扩增产物的用量调整为: 0.6 μL、11.4 μL、3 μL, 总体积 15 μL。

2 结果与分析

2.1 多重 PCR 体系的构建

经过多次引物组合、反应条件的摸索, 最后从

表 4 筛选出的 18 个微卫星标记

Table 4 The selected 18 microsatellite markers

引物组合 Primer combination	基因座 Locus			
1	MCW0294 (0.8)	MCW0289E (0.3)	MCW0068 (0.8)	MCW0168 (0.7)
2	LEI 0134 (0.6)	MCW0313 (0.8)	MCW0154 (0.5)	MCW0254 (0.5)
3	LEI 0106 (0.4)	MCW0331 (0.5)	MCW0258 (0.6)	
4	MCW0177 (0.7)	LEI 0146 (0.6)	MCW0208 (0.5)	MCW0128 (0.4)
5	MCW0112 (0.6)	MCW0036 (0.5)	MCW0200 (0.5)	

注: 括号内为多重 PCR 时每个引物每次添加量, 单位 μL 。

Note: The number in parentheses means the primers volume used each time, unit μL .

20 个微卫星标记中选用 18 个, 构建成 5 个扩增效果理想的组合, 其中 3 个为四重 PCR, 2 个为三重 PCR。

2.2 多重 PCR 产物电泳检测结果

由于微卫星标记的等位基因遵循孟德尔遗传规律, 呈等显性遗传, 即如果个体基因座中某位点核心序列重复数相等, 则该个体在此位点的基因型是纯合子, 相反是杂合子, 对于每个个体而言, 每个标记只有一个或两个等位基因。反映在微卫星扩增产物的电泳图谱上, 就是对于每个个体而言, 每个标记只有一个或两个峰值, 一个峰值表示为纯合子, 两个峰值表示为杂合子。如有多个峰值, 则需要经过综合分析, 将不需要的峰值去掉。

例如, BM 品系 830 号个体检测结果见图 1。其中标记 MCW0177 出现了 3 个峰值, 即表示该标记有 3 个等位基因, 这就需要根据 DNA 片段长度变异范围和峰形特征来确定等位基因, 即综合考虑该个体中由其他标记得出的等位基因情况, 并结合各等位基因的峰值高低、波峰形状、出现频率进行取舍(原则上应选取那些峰值高、峰形一致、出现频率高的等位基因)。为防止错判, 须反复进行比较, 对于似是而非的结果, 须重新电泳, 然后再进行基因型分析。本例中, 经过综合分析, MCW0177 的等位基因片段大小为 289 bp、297 bp。

利用筛选出的多重 PCR 体系, 检测发现丝羽乌骨鸡个体在 18 个微卫星位点上表现出丰富的遗传多样性, 总计检测到 134 个等位基因, 每个标记座位平均等位基因数为 7.444, 平均预期杂合度为 0.7301, 平均观测杂合度为 0.3962, 平均多态信息含量为 0.669^[8], 表明所建立的多重 PCR 体系能够用于丝羽乌骨鸡或其它品种鸡群微卫星标记的快速扩增, 进而进行 QTL 定位或其它遗传分析。

3 讨论

3.1 多重 PCR 组合的优化

采用多重 PCR 进行标记位点的检测, 需满足如下条件: (1) 所有位点必须同时得到扩增, 即所有引物对的复性温度必须相近; (2) 在同一反应体系中, 引物对之间不能有相互作用(即出现配对现象, 形成引物寡聚体); (3) 同种荧光染料标记的不同位点, 其扩增片段不能相互重叠; (4) 不同位点的电泳图象必须清晰可读, 信号强度能够进行数据分析^[9]。由于选用引物时就考虑过片段长度不重叠、退火温度和反应循环次数相同或相近等因素, 故减少了本次实验中多重 PCR 优化组合的工作量。

组合优化的过程中, 为了避免不必要的浪费, 首先要做单一标记 PCR 并用琼脂糖电泳检测, 只有看到条带的才上 ABI 3100-Avant 遗传分析仪检测。另外, 为防止在多重 PCR 产物的基因分型中某些位点的信号峰过高或过低, 要根据第一次多重 PCR 的电泳图象, 适当增减每种引物的添加量, 即将每一组的所有引物在同一 PCR 中共同扩增随后根据电泳图象、基因分型数据进行调整: (1) 如果几个微卫星的曲线形状正常、高度相同或相近, 表明实验成功, 可以进行批量测定。(2) 如果几个微卫星的曲线形状正常、但高度上有差异, 只需要调整引物的添加量再次进行实验。调整原则为将曲线高度最高的微卫星引物添加量减少, 将曲线高度最低的微卫星引物添加量增加, 直至最佳的曲线高度出现为止。(3) 如果某些引物即便增加浓度仍不能得到有效扩增, 或扩增信号过强, 造成背景干扰, 则将其从引物组合中删除。

本次实验中, 有两个微卫星标记 MCW0101、MCW0181 即使大量增加浓度, 也始终无法合并到

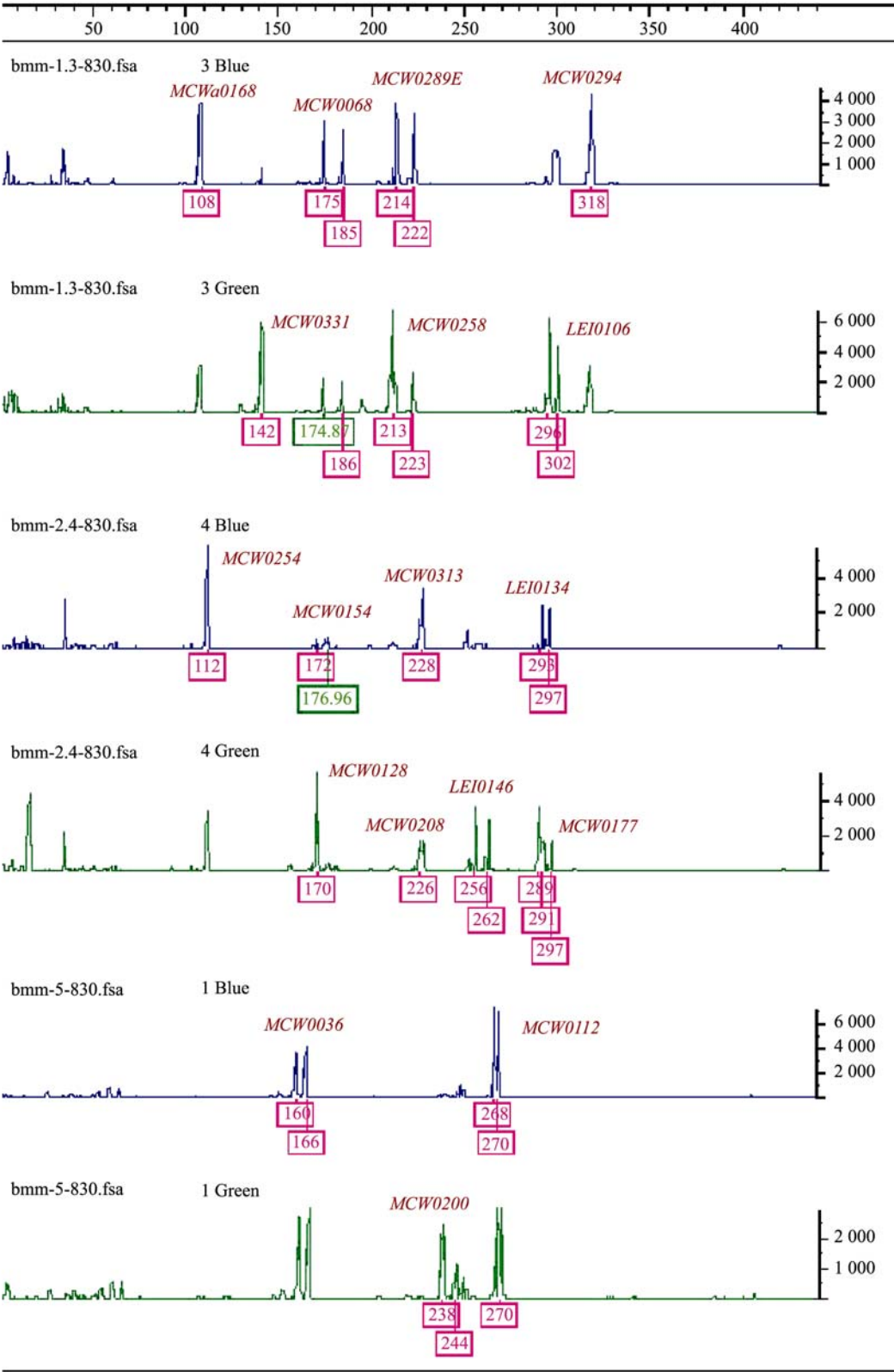


图 1 BM 品系 830 号个体微卫星标记的全自动检测及分型结果
Fig. 1 Result of full-automate genescan and genotyping of microsatellite markers in 830

现有的引物组合中,其原因可能有:(1) 5'端荧光发生衰变,无法在 ABI-3100 上分辨出扩增产物;(2) 引物间出现了配对现象;(3) 建立的多重 PCR 体系不适合这些引物的扩增;(4) 引物合成时出现误差。

3.2 多重 PCR 产物的自动化检测

电泳是各种标记进行检测的基础,为了满足研究的需要,许多公司相继推出了一系列的DNA序列分析仪,推动了电泳技术的发展。而将多重PCR与全自动电泳技术结合,实验技术具有简单、快速、分辨率高等优点^[10]。

利用 ABI3100-Avant 遗传分析仪检测 PCR 产物,可以精确分辨相差仅为 1 bp 的 DNA 片段,避免了传统聚丙烯酰胺凝胶电泳中因多个泳道共用一个标记而造成的误差。利用检测得到的原始数据,建立基因型数据库,使用 Genescan3.1 软件分析数据,同时进行泳道校正、同一标准分子量内标(standard)校正和片段大小测量,增加了基因型数据的准确度。而使用 Genotyper3.7 软件进行基因型数字化判读准确而高效,能防止各种人为因素造成的误差。

由于 PCR 扩增过程中的不确定因素,电泳峰谱经常会出现一些“噪音”(stutter 和 shadow)峰,计算机在综合分析过程中会去掉这些峰,防止了聚丙烯酰胺凝胶电泳上读带时由于“影子带”而导致的误差,较好地保证了实验结果的准确性和精确度。

参考文献(References):

- [1] Chamberlain JS, Gibbs RA, Rainer JE, Nguyen PN, Thomas C. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16(23): 11141-11156. [\[DOI\]](#)
- [2] Schmid M, Nanda I, Guttenbach M, Steinlein C, Hoehn M, Schartl M, Haaf T, Weigend S, Fries R, Buerstedde JM, Wimmers K, Burt DW, Smith J, A'Hara S, Law A, Griffin DK, Bumstead N, Kaufman J, Thomson PA, Burke T, Groenen MA, Crooijmans RP, Vignal A, Fillon V, Morisson M, Pitel F, Tixier-Boichard M, Ladjani-Mohammedi K, Hillel J, Maki-Tanila A, Cheng HH, Delany ME, Burnside J, Mizuno S. First report on chicken genes and chromosomes 2000. *Cytogenet Cell Genet*, 2000, 90(3-4): 169-218. [\[DOI\]](#)
- [3] XU Ning-Ying, FU Yan, Looft C, Reinsch N, Kalm E. Study on the selection of multiplex polymerase chain reaction. *Acta Veterinaria et Zootecnica Sinica*, 2001, 32 (2): 108-112.
徐宁迎, 傅衍, Looft C, Reinsch N, Kalm E. 多重聚合酶链反应筛选方法的研究. *畜牧兽医学报*, 2001, 32(2): 108-112.
- [4] GUO Xiao-Ling, XU Ning-Ying, LOOFT Christian, REINSCH Norbert, KALM Ernst. Amplification of pig microsatellite markers using multiplex PCR. *Hereditas (Beijing)*, 2004, 26(1): 40-44.
郭晓令, 徐宁迎, LOOFT Christian, REINSCH Norbert, KALM Ernst. 猪微卫星标记多重 PCR 扩增组合. *遗传*, 2004, 26(1): 40-44.
- [5] HUANG Yin-Hua, HU Xiao-Xiang, DENG Xue-Mei, XU Wei-Zhuo, LI Ning, FENG Ji-Dong, SUN Han, WU Chang-Xin. Chicken QTL mapping by multiplex PCR. *Progress in Natural Science*, 2002, 12(1): 73-76.
- [6] HUANG Yin-Hua, HU Xiao-Xiang, XU Wei-Zhuo, GAO Yu, FENG Ji-Dong, SUN Han, LI Ning. The factors affecting the efficiency of multiplex PCR. *Hereditas (Beijing)*, 2003, 25(1): 65-68.
黄银花, 胡晓湘, 徐慰倬, 高宇, 冯继东, 孙汉, 李宁. 影响多重 PCR 扩增效果的因素. *遗传*, 2003, 25(1): 65-68.
- [7] HU Xiao-Xiang, HUANG Yin-Hua, GAO Yu, DU Zhi-Qiang, FENG Ji-Dong, XU Wei-Zhuo, DENG Xue-Mei, ZHANG Ying, FAN Bao-Liang, ZHAO Zhi-Hui, LIU Zhao-Liang, YANG Ning, JIN Ning-Yi, WU Chang-Xin, LI Ning. Preliminary analysis on China agricultural university chicken resource population based on genomic scanning. *Acta Genetica Sinica*, 2003, 30(12): 1101-1106.
胡晓湘, 黄银花, 高宇, 杜志强, 冯继东, 徐慰倬, 邓学梅, 张莹, 樊宝良, 赵志辉, 刘兆良, 杨宁, 金宁一, 吴常信, 李宁. 对中国农业大学鸡资源群进行基因组扫描的初步分析. *遗传学报*, 2003, 30(12): 1101-1106.
- [8] ZHU Qing, ZHANG Yi-Zheng, MENG Xiang-Jun, LIU Yi-Ping. The population genetic structure analysis via microsatellite loci in new silkies laying breeds. *Hereditas (Beijing)*, 2006, 28(2): 139-147.
朱庆, 张义正, 孟祥军, 刘益平. 乌骨鸡蛋用系群体遗传结构的微卫星标记分析. *遗传*, 2006, 28(2): 139-147.
- [9] KUANG Shao-Qing, WANG Jian-Min, HUANG Wei, ZHANG Yu-Zhou, LU Lin, CHEN Zhu, JIN Li. Fluorescence-based semi-automated gene scan with microsatellite markers by multiplex PCR techniques. *Chinese Journal of Medical Genetics*, 1998, 15(2): 104-107.
况少青, 王建民, 黄薇, 张宇舟, 陆林, 陈竺, 金力. 应用多重 PCR 进行微卫星荧光标记-半自动基因组扫描. *中华医学遗传学杂志*, 1998, 15(2): 104-107.
- [10] ZHUANG Qi-Nan, ZHANG Jing, XIONG Xiao-Yan, ZHAO Yan, XU Shi-Jie, HUANG Wei. Efficient and accurate genome scan with microsatellite loci by capillary electrophoresis technology. *Chinese Journal of Medical Genetics*, 2002, 19(3): 253-256.
庄启南, 张静, 熊晓燕, 赵彦, 徐世杰, 黄薇. 应用毛细管电泳技术进行高效、准确的微卫星位点自动基因组扫描. *中华医学遗传学杂志*, 2002, 19(3): 253-256.