

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00285

微卫星在种公牛个体识别与亲缘鉴定方面的应用

王静¹, 刘丑生², 张利平³, 王志刚², 于福清², 张桂香², 孙秀柱², 韩旭², 魏玉春⁴

1. 兰州职业技术学院, 兰州 730070;
2. 农业部全国畜牧总站畜禽牧草种质资源保存利用中心, 北京 100193;
3. 甘肃农业大学动物科学技术学院, 兰州 730070;
4. 西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100

摘要: 采用美国 ABI 公司牛亲子鉴定试剂盒(Bovine Paternity PCR Typing Kit, 包括 11 个常染色体)和 3 个自选的 Y 染色体微卫星座位, 检测我国部分种公牛站肉用种公牛 14 个微卫星座位的多态性分布, 评估其遗传多样性, 并探讨其用于个体识别与亲缘鉴定的可行性。结果表明: 种公牛在 14 个微卫星座位中遗传多样性均较高, 其中 *MCM158* 座位的平均多态信息含量最高达到 0.888, *ETH10* 座位的最低, 为 0.482。单个座位的个体识别能力在 0.715~0.968 之间, 累积个体识别能力为 99.99%, 累计非父排除率达到 99.99%, 表明采用的 14 个位点适用于个体识别和亲缘鉴定。

关键词: 种公牛; 微卫星; 个体识别; 亲缘鉴定

Individual identification and paternity testing of bulls using microsatellite

WANG Jing¹, LIU Chou-Sheng², ZHANG Li-Ping³, WANG Zhi-Gang², YU Fu-Qing², ZHANG Gui-Xiang², SONG Xiu-Zhu², HAN Xu², WEI Yu-Chun⁴

1. Lanzhou Vocational Technology College, Lanzhou 730070, China;
2. National Center of Preservation and Utilization of Genetic Resources of Domestic Animals and Forage, National Animal Husbandry and Veterinary Service, Beijing 100193, China;
3. College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;
4. College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture & Forestry, Yangling 712100, China

Abstract: The polymorphism distributions of 14 microsatellite loci were detected using the Bovine Paternity PCR Typing Kit (including 11 X-STR) and 3 selected Y-STR microsatellite DNA markers. The genetic diversity were evaluated, and the feasibility of the application to individual identification and paternity testing were discussed. The results showed that all the 14 microsatellite loci had genetic polymorphisms in bulls, and the polymorphism information content (*PIC*) in loci *MCM158* was the biggest (0.888), while the *ETH10* was the lowest (0.482). Power of discrimination (*DP*) value of the 14 STR loci ranged from 0.715 to 0.968. The Cumulate DP (*CDP*) was 99.99%, and the Cumulate PE (*CPE*) also reached 99.99%. These results indicate that the 14 microsatellites can be applied to the individual identification.

Keywords: bull; microsatellite; individual identification; paternity testing

收稿日期: 2008-03-28; 修回日期: 2008-08-23

基金项目: 农业部畜禽牧草品种资源保护项目(编号: 农财发[2007]43 号)资助

作者简介: 王静(1982-), 女, 硕士, 研究方向: 分子生物学。Tel: 0931-7837683; E-mail: jwang_423@126.com

通讯作者: 刘丑生(1964-), 男, 研究员, 研究方向: 动物遗传资源保护。E-mail: liuchousheng@sina.com

随着我国畜牧业集约化的发展,优良种公牛在畜牧业生产中起着日益重要的作用。种公牛个体识别和亲缘关系的检测是保证养牛业育种工作顺利进行的前提和基础。然而在种公牛冷冻精液生产和质量检测实践中,易发生冷冻精液细管号码脱落、标签混淆等现象;个别商贩甚至有意将精液标签搞混,以次充好。因此,基于个体识别和亲缘关系上的精液检测技术的发展将对维护我国种公牛冻精市场的秩序提供理论依据和技术支持。微卫星,又称短片串联重复序列(Short tandem repeats, STR),广泛存在于DNA编码区和非编码区,具有高度遗传多态性,遵循孟德尔遗传规律^[1]。1996年意大利农业部立法开始用微卫星标记检测种公畜血液和精液的DNA序列是否一致^[2]。同年世界动物遗传协会建议了一套由9个微卫星标记组成的3个多重PCR反应体系作为牛谱系检测的标准方法^[3]。目前国内外均有对牛微卫星标记进行亲缘鉴定的报道^[4,5],但在个体识别方面在国内还很少见^[6]。

本文利用美国ABI公司Bovine Paternity PCR Typing Kit(包含11个常染色体微卫星座位),并结合3个自选的Y染色体微卫星座位,检测我国主要种公牛站肉用种公牛14个微卫星座位的多态性分布,探讨其用于个体识别与亲缘鉴定等领域的可行性,以期形成一个标准体系,为后期建立我国种公牛基因数据库提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验样本

在我国主要种公牛站分别随机选取肉用种公牛100头(全为引入品种,其中80头利木赞,夏洛莱20头)作为实验样本。每头牛用真空采血管从颈静脉采血10 mL/头左右,运回实验室后置于-20℃冰箱中保存备用。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA准备

提取的基因组DNA首先经1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测合格,然后用生物分光光度计将其浓度调整为100 ng/μL左右后即可进行PCR扩增。

1.2.2 引物选择

11对常染色体采用牛亲子鉴定试剂盒(Bovine

Paternity PCR Typing Kit,购自于美国ABI公司)。并根据参考文献[7,8]选取MCM158、MAF45、UMN0108 3对Y染色体微卫星引物,共计14个微卫星位点。其中Y染色体上游引物5'端标记TET或6FAM荧光,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2.3 PCR扩增

常染色体的扩增体系,采用复合扩增体系,依据牛亲子鉴定试剂盒(Bovine Paternity PCR Typing Kit,购自于美国ABI公司)说明进行。Y染色体微卫星位点PCR扩增体系为25 μL,其中模板DNA约100 ng,0.15~0.30 μmol/L的引物,1 U的Taq酶,0.2 mmol/L的dNTPs,1~1.5 mmol/L的MgCl₂和1×PCR buffer。PCR扩增循环程序为:95℃预变性4 min;94℃变性45 s,56~65℃复性45 s,72℃延伸1 min,共扩增30~35个循环,最后72℃延伸40 min,4℃结束。

1.2.4 PCR产物检测

PCR扩增产物先用8%聚丙烯酰胺凝胶检测,银染之后,选择目的条带染色结果清晰的PCR产物加样到ABI3100-Avant全自动遗传分析仪中,牛亲子鉴定试剂盒扩增的产物直接用ABI3100-Avant全自动遗传分析仪中,进行毛细管电泳检测其遗传多态性。加样时每个上样孔中都加入分子量内标LIZ500,使判型更加精细、准确。微卫星基因型用仪器自带软件Gene-Mapper Version 3.2进行分析。

1.2.5 统计分析

群体内遗传多态性分析,依据ABI3100-Avant全自动遗传分析仪结果,采用GENEPOP Version 3.4计算等位基因频率、等位基因数(A)、杂合度观测值(H_o)和期望值(H_e)^[9]。参照文献[10]计算多态信息含量(PIC)。用PowerStats V1.2(Promega Corporation, U.S.A.)计算个体识别能力(DP)和偶合机率(PM)^[11],Cervus 2.0计算非父排除率(PE)^[12]。

2 结果与分析

2.1 微卫星DNA多态性的检测

本实验一共分析了100头种公牛个体基因型,各个引物在个体中均检测出目的条带。其中常染色

体上 11 个座位(图 1)和 Y 染色体上 3 个座位(图 2), 并均表现出一定的多态性。14 个微卫星座位在种公牛中共检测到 137 个等位基因, 平均每个座位为 9.8 个。*TGLA122* 座位的等位基因数最多, 达到 19 个, *BM1824* 座位的等位基因数最少, 只有 5 个。

2.2 14 个微卫星基因座位的遗传多态性分析

根据 14 个微卫星座位上的等位基因频率统计结果, 计算了各基因座的多态信息含量、杂合度(表 1)。从表 1 中可以看出在 14 个微卫星座位中 *MCM158* 座位的平均多态信息含量最高达到 0.888, *ETH10* 座位的最低, 为 0.482。平均多态信息含量为 0.735, 说明中国肉用种公牛具有一定的选择潜力, 遗传多样性相对丰富。另外, 从表 1 还可以看出各位点的杂合度都较高。观测值杂合度(H_o)和期望值杂合度(H_e)

的变化范围分别为 0.84~0.52 和 0.90~0.52。

2.3 各位点对个体识别及亲缘鉴定的评价

根据各微卫星位点等位基因的频率计算出各位点的个体识别能力和 14 个位点的累计个体识别能力, 计算结果见表 1。从表中可知 14 个微卫星位点的个体识别能力在 0.715~0.968 之间, 其中 *MCM158* 位点个体识别能力最强为 0.968, 而 *ETH10* 位点的个体识别能力最小, 只有 0.715。由此可见 *MCM158* 在种公牛个体识别中的作用最大, *ETH10* 在种公牛个体识别中的作用最小, 这也应证了遗传标记的多态性越高, 个体识别能力越强, 反之则个体识别能力差。14 个位点的累计个体识别能力为 99.99%, 偶合机率(PM) 10^{-14} 。

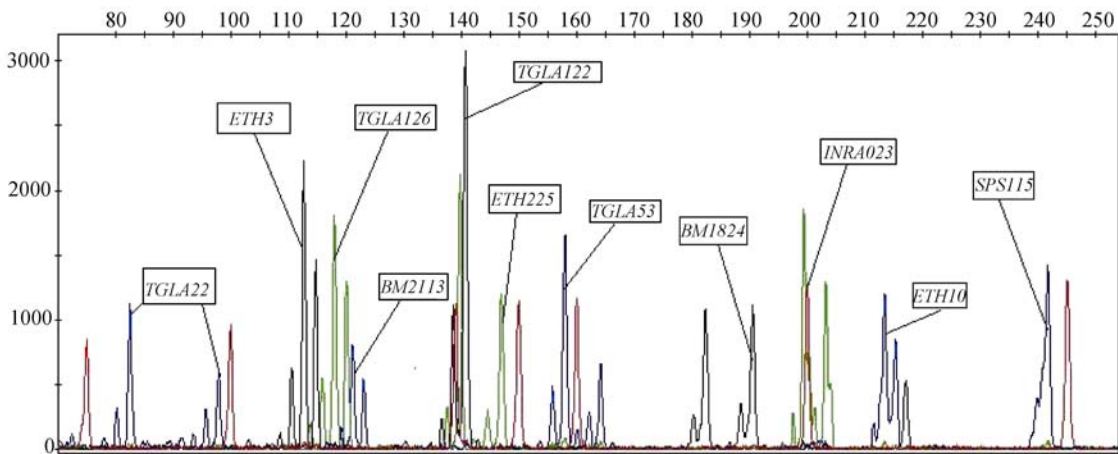


图 1 常染色体上 11 个座位毛细管电泳检测图
红色波峰为内标(Marker)。X 轴表示片段大小, Y 轴表示相对荧光强度。

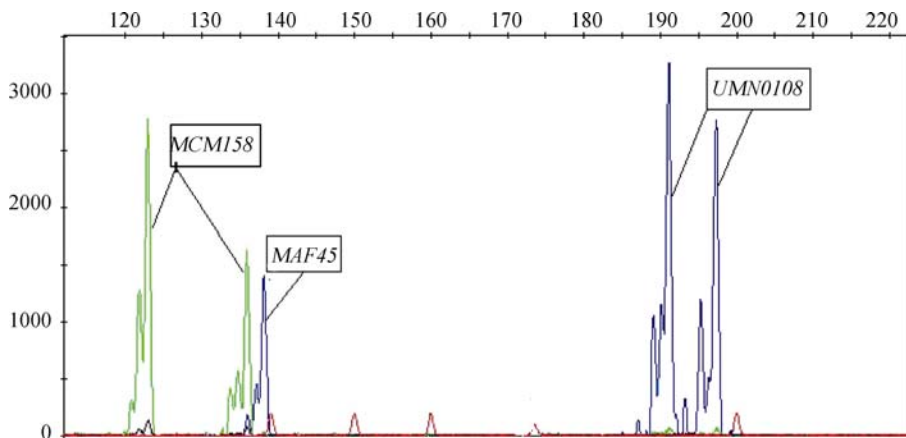


图 2 Y 染色体上 3 个座位毛细管电泳检测图
红色波峰为内标(Marker)。X 轴表示片段大小, Y 轴表示相对荧光强度。

表 1 14 个微卫星座位上的信息

座位	等位基因数	多态信息含量(PIC)	期望杂合度(H_e)	观察杂合度(H_o)	个体鉴别力(DP)	非父排除率(PE)
BM1824	5	0.727	0.77	0.75	0.903	0.516
BM2113	7	0.770	0.79	0.79	0.917	0.589
ETH3	7	0.672	0.71	0.73	0.875	0.470
ETH10	7	0.482	0.52	0.52	0.715	0.206
ETH225	7	0.739	0.78	0.77	0.903	0.540
INRA023	11	0.798	0.82	0.77	0.942	0.540
MAF45	9	0.667	0.69	0.64	0.880	0.347
MCM158	18	0.888	0.90	0.84	0.968	0.667
TGLA53	12	0.852	0.87	0.73	0.956	0.470
TGLA122	19	0.778	0.80	0.85	0.911	0.694
TGLA126	5	0.556	0.62	0.58	0.807	0.262
TGLA22	11	0.823	0.84	0.81	0.945	0.614
UMN0108	11	0.808	0.83	0.63	0.941	0.329
SPS115	8	0.736	0.77	0.68	0.894	0.405
平均数	9.8	0.735	0.76	0.72	0.897	0.475
累积	—	—	—	—	0.9999	0.9999

本实验在亲缘鉴定方面对所选微卫星座位的非父排除概率进行了计算, 结果见表 1。可知 14 个微卫星的单个位点排除率在 0.206~0.694 之间, 其中 TGLA122 位点的非父排除率最高为 0.694, ETH10 位点的非父排除率最低, 只有 0.206。14 对微卫星座位的累计非父排除率达到 99.99%, 满足法医学要求。

3 讨论

3.1 我国种公牛群体内遗传变异

多态信息含量(PIC)是衡量标记多态性较好的指标。Botstein等^[10]提出了衡量基因变异程度高低的多态信息含量指标: 当 $PIC>0.5$ 时, 为高度多态位点; 当 $0.25<PIC<0.5$ 时, 为中度多态性位点; $PIC<0.25$ 时, 为低度多态位点。本实验所选的 14 个微卫星除一个座位(ETH10)外其余都为高度多态位点。此外, 遗传杂合度是度量群体遗传变异的一个较合适的参数。本研究结果表明: 平均观察杂合度为 0.72, 这与 Takezaki等^[13]认为微卫星计算出的杂合度范围为 0.3~0.8 吻合。说明大部分所研究的种公牛的遗传多样性较高, 具有一定的选择潜力。

3.2 种公牛用微卫星位点进行个体识别和亲缘鉴定的可行性分析

我们根据所得到的等位基因片段采用法医上个

体识别判断的标准进行个体识别与亲缘鉴定。研究表明 14 对微卫星引物的个体识别能力在 0.715~0.968 之间, 累积个体识别能力为 99.99%, 没有亲缘关系的个体的基因型完全一致的概率小于 10^{-14} 。法医上判断标准为两样品的基因型完全一致时, 偶合机率(PM) 10^{-9} 时可作出“认定”的结论, 则为同一个体或同卵双生^[14]。同时由于牛多为单胎, 自然条件下很少有双胞胎, 所以此方法能够达到法医学个体识别的要求。管峰等^[6]通过分析 2 份冷冻精液样本和 4 头可疑种公牛血样的 4 个微卫星位点得到的累计个体识别率为 99.99%, 结果与此相符。

利木赞与夏洛来均原产于法国, 是举世闻名的大型肉牛品种, 受到国际市场的广泛欢迎, 在世界许多国家均有分布。我国从 20 世纪 60 年代开始就数次从法国引入利木赞及夏洛来牛, 集中在我国东北、华北及西北部分地区, 用这两个品种改良当地黄牛, 取得了明显效果。表现为杂交后代体格明显加大, 增长速度加快, 杂种优势明显。在我国, 利木赞与夏洛来常被作为经济杂交的父本或轮回杂交的亲本, 易发生因系谱记录错误而产生误配, 而进一步导致近交系数的升高。因此, 对其进行准确的亲缘鉴定是保障育种顺利实施的关键。本实验对所选微卫星位点的非父排除概率进行了计算, 14 个微卫星的单个位点排除率在 0.206~0.694 之间, 其累计非

父排除率达到 99.99%, 满足法医学理论要求。但我们并没有采集特定(家系)的母牛做阳性对照, 实践中用于亲缘鉴定的准确性和可靠性, 需要采集更多的数据和特定(家系)的母牛做进一步研究, 本次 14 个微卫星位点在牛亲缘鉴定的理论可行性探讨, 为我们下一步的研究做了铺垫。比较Ellegren等^[15]的研究, 他们组合 5 个微卫星座位(每个座位有 6 个以上的等位基因)可使排除概率达到 98%, 使用 10 个这样的座位排除概率达到 99.99%。凌凤俊等^[16]建立了 6 个牛STR基因座组成STR扩增系统, 累计个体识别率大于 0.9999, 累计非父排除率为 0.9923。本实验的 14 个微卫星座位的平均等位基因数大于 9, 其累计非父排除率达到 99.99%。

我们采用美国 ABI 公司试剂盒 11 个常染色体微卫星位点的复合扩增体系, 自选 3 个 Y 染色体微卫星位点作为补充, 使用荧光自动化检测技术, 结果能准确、快速的得出。此方法适用于法医学个体识别, 可推广使用。并且随机选用的 100 头种公牛在 14 对微卫星位点上检测出的条带中没有两头是完全一样的。因此, 有望以此研究为基础, 进一步收集更多种公牛 DNA 进行遗传标记, 构建中国种公牛基因数据库。在亲缘鉴定方面, 对所选微卫星位点的非父排除概率进行了计算, 满足法医学理论要求。但用 SPSS13.0 软件进行聚类分析时, 结果与部分真实系谱记录不完全相符, 这可能需要进一步收集数据、开发理想的软件进行验证, 来准确将微卫星用于亲缘鉴定的实践中。

参考文献(References):

- [1] 程大霖. 个体识别和亲子鉴定理论与实践. 北京: 中国检察出版社, 2001, 24-27.
- [2] 侯荃蓀, Galli Andrea, 周瑞君. 意大利冷冻精液质量的官方监控. 中国奶牛, 2002, 3: 29-30.
- [3] 曹红鹤. 肉牛主要生产性状的生化 and 分子遗传标记的研究[学位论文]. 北京: 中国农业大学, 2000.
- [4] 贾名威, 杨利国, 管峰, 路汉希, 金穗华. 奶牛和肉牛 6 个 STR 基因座遗传多态性研究. 遗传, 2004, 26(3): 309-314.
- [5] Schnabel RD, Ward TJ, Derr JN. Validation of 15 microsatellites for parentage testing in North American bison, Bison bison and domestic cattle. *Anim Genet*, 2000, 31(6): 360-366.
- [6] 管峰, 杨利国, 艾君涛, 路汉希, 金穗华, 张淑二, 李加芳. STR 基因座在奶牛个体识别中的应用. 畜牧兽医科学, 2005, 21(2): 4-6.
- [7] Liu WS, Mariani P, Beattie CW. A radiation hybrid map for the bovine Y Chromosome. *Mammalian Genome*, 2002, 13(6): 320-326.
- [8] 张秀华, 吴登俊. 利用 SRY 基因和微卫星标记鉴定反刍动物性别. 遗传, 2006, 28(2): 133-139.
- [9] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 1978, 89(3): 583-590.
- [10] Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314-331.
- [11] Tereba A. Tools for analysis of population statistics, *Profiles DNA*, 1999, (2): 14-16.
- [12] Garber RA, Morris JW. General Equations for the Average Power of Exclusion for Genetic Systems of Nco-dominant Alleles in One-parent Cases of Disputed Parentage. In: Walker RH, Ed. Inclusion Probabilities in Parentage Testing, American Association of Blood Banks. Arlington, VA, USA, 1983, 277-280.
- [13] Takezaki N, Nei M. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics*, 1996, 144(1): 389-399.
- [14] 李孟华, 王海生, 赵书红, 刘榜, 陈世林, 李奎. DNA 分子标记在动物个体识别与亲权鉴定方面的应用. 生物技术通报, 2001, (5): 4-7.
- [15] Ellegren H, Johansson M, Sandberg K. Cloning of highly polymorphic microsatellite in the horse. *Anim Genetics*, 1992, (23): 133-142.
- [16] 凌凤俊, 郑秀芬, 叶健, 程建波, 吴微微, 李彩霞, 季安全, 姜成涛, 赵兴春, 徐秀兰, 葛芸英. 牛多态性 DNA 遗传标记系统的研究. 中国优生与遗传杂志, 2005, 13(9): 14-16.