

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2010.00148

利用混合样本池法对鸡显性白羽基因 *PMEL17* 突变位点的检测

刘文博, 陈思睿, 郑江霞, 徐桂云, 李俊英, 曲鲁江, 杨宁

中国农业大学动物科技学院, 北京 100193

摘要: 显性白羽基因座是影响鸡羽色形成的重要基因座位之一, 该基因座上的显性等位基因 *I* 会抑制黑色素合成, 从而使携带该基因的个体全身羽毛呈现白色。目前已确认鸡显性白羽基因座编码 *PMEL17* 蛋白: 是一种黑素细胞特异性蛋白, 在黑素细胞的分化与成熟中起到重要作用, 并证明 *PMEL17* 基因的突变与显性白羽的形成有关。文章利用混合样本池建立了一种低成本、高效率, 并能在大规模群体中检测 *PMEL17* 基因突变的方法, 称为 PCR 产物混合样本池法。该方法的基本步骤如下: 首先, 提取个体基因组 DNA, 并设计相关引物对每一个体单独进行 PCR 扩增; 其次, 将 PCR 产物等比例混合, 10 个样品混在一个池中; 然后, 将 PCR 产物混合池样品于非变性聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳; 最后, 待电泳结束后进行银染, 根据凝胶上所显条带判定是否存在突变体。此外, 文章还将这种方法与传统基因组 DNA 混合样本池法进行了比较试验, 并利用该方法对试验鸡群显性白羽基因 *PMEL17* 突变进行检测, 证实该方法具有较高准确度。

关键词: 显性白羽; *PMEL17*; 混合样本池法; 凝胶电泳

Detection of chicken dominant white gene *PMEL17* mutation site by a pooling method

LIU Wen-Bo, CHEN Si-Rui, ZHENG Jiang-Xia, XU Gui-Yun, LI Jun-Ying,
QU Lu-Jiang, YANG Ning

College of Animal Science & Technology, China Agricultural University, Beijing 100193, China

Abstract: Dominant white locus is one of the major loci affecting feather color in the domestic chicken and its dominant allele *I* can inhibit the synthesis of the melanin. Therefore, the homozygotes (*I/I*) or heterozygotes (*I/i*) show a white phenotype. It has been confirmed that the Dominant white locus encodes *PMEL17* protein which is a specific protein and plays a key role in the development of melanocytes, thus *PMEL17* gene is identified as a positional candidate gene for the dominant white phenotype in chicken. In our present study, we created an economic and efficient pooling method for detecting *PMEL17* mutations in large populations, known as PCR product pooling method, and the steps are as follows: firstly, *PMEL17* segments containing the mutation site from individual genomic DNA samples were amplified by PCR; secondly, 10 PCR products were mixed in a pool, and then the pooled PCR samples were separated on non-denatured PAGE gels; and finally, the mutation profile of *PMEL17* in certain populations were analyzed. In addition, a comparative study between the

收稿日期: 2009-08-13; 修回日期: 2009-12-10

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(编号: 2006AA10A121)和国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(编号: 2006CB102102)资助

作者简介: 刘文博(1982-), 男, 博士研究生, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: lwbatcau@gmail.com

通讯作者: 杨宁(1964-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动物遗传育种。E-mail: nyang@cau.edu.cn

genomic DNA pooling and the PCR product pooling method was performed, and the mutation of *PMEL17* was also analyzed in our experimental population. In conclusion, the PCR product pooling method proved to be appropriate power to test gene mutations.

Keywords: dominant white; *PMEL17*; pooling method; electrophoresis

显性白羽基因座是影响鸡羽色的一个重要基因座位, 该基因座位上的显性等位基因 *I* 对色素沉着, 尤其是真黑色素的合成有抑制作用^[1]。目前在该基因座共发现 4 种等位基因: *I* (显性白羽), *I***S* (*Smoky*, 烟灰色羽色), *I***D* (*Dun*, 暗褐色羽色), *i* (野生型)。相关研究表明, 鸡 *PMEL17* 基因编码区的插入或缺失突变与这些等位基因形成有关^[2]。鸡 *PMEL17* 基因包括 12 个外显子, 全长约 4.0 kb, 共编码约 788 个氨基酸 (GenBank 登录号: AY636127.1)。该基因编码一种黑素细胞特异性蛋白, 这种存在于前黑素体基质中的蛋白对黑色素聚积以及黑素细胞的正常发育起着重要作用^[3]。Kerje 等^[2]对红色原鸡、白来航等不同品种鸡 *PMEL17* 基因序列的分析中, 发现其第 10 外显子上的 9 bp 插入突变是显性白羽性状形成的主要原因, 所对应的等位基因为 *I*, 而隐性等位基因 *i* 不含该突变。

混合样本池法 (又称 DNA pooling 法) 是随着基因诊断技术的发展而建立起来的一种快速高效的基因型判定方法。混合样本池法最初主要应用于各种遗传疾病的基因型诊断, 后来逐渐应用到基因定位及连锁分析中^[4,5]。对大规模群体进行特定基因的基因型判定时, 如果对每只个体分别进行判定无疑会耗费大量成本, 混合样本池法可以很好地解决这个问题。这种方法是个体基因组 DNA 经稀释后, 按照一定比例混合在一起, 然后利用混合后的样本即混合样本池为模板进行相关基因 PCR 扩增, 并通过电泳或其他基因判定方法进行基因型分析、突变检测、连锁分析或基因定位等^[5]。混合样本池中的每一个池可以包含多个个体的基因组 DNA, 因此, 可以一次获得大量的基因信息, 在提高检测强度的基础上, 还能降低相应成本。Lipkin 等^[6]运用该方法, 对抗马立克病的鸡和易感鸡进行了相关研究, 找到了与抗马立克病有关的 QTL 位点。

本研究尝试建立一种基于样本混合池法的高效、低成本并能在大规模群体中判定鸡 *PMEL17* 基

因型的相关检测手段, 并利用此方法对不同品种鸡的 *PMEL17* 基因突变位点进行检测, 从而对该方法的准确度、精确性以及适用性进行评定。

1 材料和方法

1.1 实验动物

显性白羽来航 (白色片状羽) 200 只, 隐性白洛克 (白色片状羽) 10 只; 丝羽乌骨鸡 (白色丝状羽)、东乡绿壳蛋鸡 (白色或黑色片状羽)、寿光鸡 (黑色片状羽)、北京油鸡 (黄色片状羽) 每个群体选取 50 只, 公母各 25 只。

1.2 方法

1.2.1 血样采集及 DNA 提取

每只鸡翅下静脉采血 1~1.5 mL, 置于盛有 0.3 mL 抗凝剂 (ACD) 的离心管中, 混匀后放于 -20℃ 低温保存。采用普通酚仿萃取法提取鸡血液组织中的 DNA。

1.2.2 引物设计

鸡 *PMEL17* 基因第 10 外显子 9 bp 插入突变与显性白羽形成有关, 根据 GenBank 上公布的该基因序列 (GenBank 登录号: AY636127.1), 针对该突变位点, 设计如下引物: 上游 5'-AGGCACGCTGCTGAACCTCACG-3', 下游 5'-AGAGAAGGGGAGCGTTAATTCA-3'。

1.2.3 PCR 扩增体系和条件

PCR 扩增体系: 15 μ L 反应体系中含有 50~100 ng 基因组, 0.5 U 10 \times PCR buffer (含 20 mmol/L MgCl₂), 0.2 mmol/L dNTP, 上下游引物各 0.3 nmol, 0.5 U 的 *Taq* 酶。反应程序: 预变性 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 65℃ 复性 30 s, 72℃ 30 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶检测扩增效果。

1.2.4 混合样本池的构建

本研究构建了两种不同的混合样本池: 基因组

DNA 样本混合池和 PCR 产物混合样本池。前者用紫外分光光度计对每个 DNA 样本浓度测量 2 次, 取平均值记录, 然后将 DNA 样本稀释至终浓度 50 ng/ μ L, 每个样本取 5 μ L, 10 个样本构成一个混合池, 再以混合池为模板进行 PCR 扩增。后者是先以个体基因组 DNA 为模板分别进行 PCR 扩增, 然后每个 PCR 产物取 2 μ L, 每 10 个样本建成一个混合池。

1.2.5 电泳检测

PCR产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测, 确定为阳性后取 5 μ L在 16%非变性聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳。1 份的PCR产物加入 3 份上样缓冲液。180 V 电压, 室温下电泳 10 h, 按Qu等^[7]的方法进行银染。

2 结果与分析

2.1 两种混合样本池法检测效能比较

经典遗传学研究表明, 白来航在显性白羽基因座基因型为 I/-, 隐性白洛克在该基因座位的基因型为 i/i^[4], 那么两种鸡的 *PMEL17* 基因突变状况不同:

白来航在该基因第 10 外显子存在 9 bp插入突变, 而隐性不存在该突变^[2]。因此, 本研究将白来航和隐性白基因组DNA按不同比例混合构成基因组DNA样本混合池(表 1), 再以混合样本池为模板进行PCR; 或将以个体基因组DNA为模板进行PCR扩增后的产物按不同比例混合构成PCR产物混合样本池 (表 2), 其中将隐性白作为相对于白来航的隐性突变个体, 不同混合池分别模拟实际情况下在含有 10 个样本的混合池中存在 1 个突变样本、2 个突变样本直至 5 个突变样本, 用来比较两种混合样本池法对插入缺失突变的检测效能(图 1)。结果表明: 在相同实验条件下, PCR产物混合样本池法的检测精度要好于DNA样本混合池法, 前者可以从仅含有 1 个突变样本的 10 样本混合池中检测出该突变样本, 后者只有当突变样本数大于 3 时才能检测到突变样本。

2.2 不同品种鸡 *PMEL17* 基因突变位点检测

利用 PCR 产物混合样本池法对商品白来航蛋鸡显性白羽基因座纯合状况进行了检测(图 2A)。如图所示: 所有白来航 PCR 产物混合样本池检测条带均

表 1 基因组 DNA 混合池各样本的混合比例

	混合池 1(μ L)	混合池 2(μ L)	混合池 3(μ L)	混合池 4(μ L)	混合池 5(μ L)
隐性白基因组 DNA(50 ng/ μ L)	5	10	15	20	25
白来航基因组 DNA(50 ng/ μ L)	45	40	35	30	25
混合比例	1: 9	2: 8	3: 7	4: 6	5: 5
总体积(μ L)	50	50	50	50	50

表 2 PCR 产物混合池各样本的混合比例

	混合池 1(μ L)	混合池 2(μ L)	混合池 3(μ L)	混合池 4(μ L)	混合池 5(μ L)
隐性白 PCR 产物	2	4	6	8	10
白来航 PCR 产物	18	16	14	12	10
混合比例	1: 9	2: 8	3: 7	4: 6	5: 5
总体积(μ L)	20	20	20	20	20

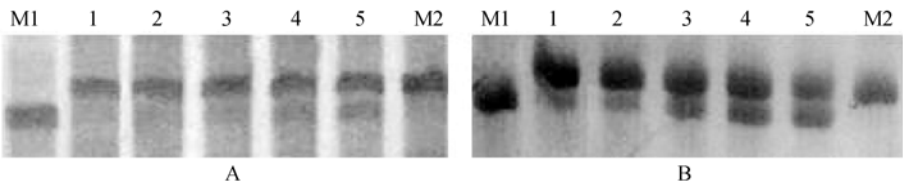


图 1 两种混合池法电泳检测

A: 以基因组 DNA 混合池为模板的 *PMEL17* 基因的 PCR 扩增产物电泳结果; B: 以个体基因组 DNA 与模板的 *PMEL17* 基因的 PCR 扩增产物混合池电泳结果。M1 代表隐性白 *PMEL17* 基因 PCR 扩增产物, 片段大小 205 bp; M2 代表白来航 *PMEL17* 基因 PCR 扩增产物, 片段大小 214 bp; 标号 1~5 分别表示表 1 及表 2 中的混合池 1 至 5。

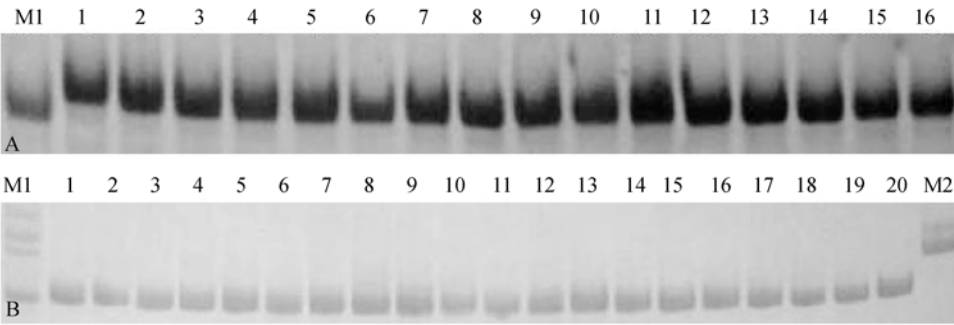


图 2 不同品种鸡 *PMEL17* 基因突变位点的判定
A: 白来航 *PMEL17* 基因突变位点的判定; B: 4 个地方品种鸡 *PMEL17* 基因突变位点的判定。M1: 隐性白 *PMEL17* 基因 PCR 扩增产物, 片段大小 205 bp; M2: 白来航 *PMEL17* 基因 PCR 扩增产物, 片段大小 214 bp; 其余标号均代表所检测的 PCR 产物混合样本池, 其中 A 图泳道 1~16 均代表白来航 PCR 产物混合样本池; B 图泳道 1~4 代表隐性白 PCR 产物混合样本池, 泳道 5~8 代表北京油鸡 PCR 产物混合样本池, 泳道 9~12 代表寿光鸡 PCR 产物混合样本池, 泳道 13~16 代表丝羽乌骨鸡 PCR 产物混合样本池, 泳道 17~18 代表东乡绿壳蛋鸡(黑羽)PCR 产物混合样本池, 泳道 19~20 代表东乡绿壳蛋鸡(白羽)PCR 产物混合样本池。

为 214 bp, 而隐性白 PCR 扩增产物检测条带为 205 bp, 结果表明, 在本实验所检测的白来航群体中, 显性白羽相关基因 *PMEL17* 第十外显子均存在 9 bp 插入突变, 因此, 可以证实在本实验群体中白来航的显性白羽基因座已纯合。

利用 PCR 产物混合样本池法对 4 个中国地方品种鸡 *PMEL17* 基因的突变状况进行了检测(图 2B)。如图所示: 所有 4 个中国地方品种鸡 PCR 产物混合样本池检测条带均为 205 bp, 隐性白 PCR 扩增产物检测条带也为 205 bp, 结果表明本实验所涉及的 4 个中国地方品种均不存在突变的 *PMEL17* 基因, 结合经典遗传学理论, 认为这些品种在 *I* 基因座均为隐性纯合子 *i/i*(表 3)。

表 3 不同品种鸡 *PMEL17* 基因突变情况与基因型

品种	<i>PMEL17</i> 基因第 10 外显子 9 bp 插入突变情况(有/无)	显性白羽基 因座基因型
白来航	有	<i>I/I</i>
隐性白	无	<i>i/i</i>
北京油鸡	无	<i>i/i</i>
寿光鸡	无	<i>i/i</i>
东乡绿壳蛋鸡 (黑羽)	无	<i>i/i</i>
东乡绿壳蛋鸡 (白羽)	无	<i>i/i</i>
丝羽乌骨鸡	无	<i>i/i</i>

3 讨论

3.1 不同品种鸡 *PMEL17* 基因的突变状况

商品白来航蛋鸡显性白羽基因座不存在杂合子,

显性纯合子为其主要基因型。白来航经长期选育, 其纯系个体中许多基因位点已基本纯合, 因此可推断白来航的显性白羽基因座不存在隐性等位基因, 或杂合子频率很低, 很难在有限群体含量的鸡群中检测到。

寿光鸡、北京油鸡、黑羽东乡绿壳蛋鸡均为有色羽品种, 其色素合成没有受到抑制, 这与它们 *PMEL17* 基因是隐性纯合子的结果符合。丝羽乌骨鸡和白羽东乡绿壳蛋鸡的白羽形成可能与 *TYR* 或 *SLC45A2* 等其他羽色基因的突变有关^[8,9], 而非 *PMEL17* 基因突变所致。

3.2 混合样本池法的检测效能

本实验中利用基因组DNA混合池做模板进行 PCR 扩增后电泳检测与分别利用个体基因组DNA做模板进行 PCR 扩增再混样后电泳检测的结果比较发现: 利用 PCR 产物混合池法检测基因突变的检测精度要好于基因组DNA混合池法, 尤其在隐性突变样本含量较低时, PCR 产物混合池法的检测优势更为明显。主要原因可能是: (1) 在隐性突变样本含量低的基因组DNA混合池中, 显性突变样本含量要明显高于隐性突变样本含量, 在 PCR 扩增中会由于 DNA 模板浓度不同造成扩增效率不同, 含量较少的模板可能得不到扩增或扩增效率极低, 故从凝胶电泳上无法判断出隐性突变。(2) 本实验采用的普通凝胶电泳及银染方法的检测精度有一定局限^[7,10,11], 不能分辨出低拷贝数的 PCR 产物。因此, 以基因组DNA混合池为模板的 PCR 产物中拷贝数低的样本检测不

到。如果采用荧光标记型引物及相应检测方法会保证基因组DNA混合池法的检测精度,但无疑会增加实验成本,与本实验的目的不相符合。

3.3 实验成本和工作量

采用个体基因组DNA单独PCR后再将PCR产物制成样本混合池的方法与利用基因组DNA混合池进行PCR扩增的方法相比工作量相当:(1)为保证PCR扩增效率,在将不同样本基因组DNA混合制成混合池之前要对所有样本DNA浓度进行测定,并作适当稀释以调节其浓度在同一水平^[5,12],在实验群体含量较大时,这部分实验工作量也会随之加大;因此,虽然采用个体基因组DNA单独进行PCR扩增会增加一定工作量,但却比前者减少了测定与调整样本DNA浓度的步骤。(2)本实验耗时最多的步骤是电泳及银染部分,在这一部分两种混合池方法都能有效降低工作量。此外,采用PCR产物混合池方法会增加PCR扩增部分的实验成本,但可在普通电泳条件下获得较好检测效果。采用基因组DNA混合池方法可减少一部分PCR扩增所需的实验成本,但在本研究条件下无法通过普通凝胶电泳获得理想的检测效果。

参考文献(References):

- [1] Smyth JR. Genetics of Plumage Skin and Pigmentation in Chickens. In: Crawford RD. Poultry Breeding and Genetics. Elsevier Science, NY, 1990.
- [2] Kerje S, Sharma P, Gunnarsson U, Kim H, Bagchi S, Fredriksson R, Schütz K, Jensen P, von Heijne G, Okimoto R, Andersson L. The Dominant white, Dun and Smoky color variants in chicken are associated with insertion/deletion polymorphisms in the *PMEL17* gene. *Genetics*, 2004, 168(3): 1507–1518. [\[DOI\]](#)
- [3] Berson JF, Harper DC, Tenza D, Raposo G, Marks MS. Pmel17 initiates premelanosome morphogenesis within multivesicular bodies. *Mol Biol Cell*, 2001, 12(11): 3451–3464.
- [4] Darvasi A, Soller M. Selective DNA pooling for determination of linkage between a molecular marker and a quantitative trait locus. *Genetics*, 1994, 138(4): 1365–1373.
- [5] 童大跃, 伍新尧. 混合DNA样品池扩增法及其应用. *生物技术通讯*, 1999, 10(3): 213–216.
- [6] Lipkin E, Fulton J, Cheng H, Yonash N, Soller M. Quantitative trait locus mapping in chickens by selective DNA pooling with dinucleotide microsatellite markers by using purified DNA and fresh or frozen red blood cells as applied to marker-assisted selection. *Poult Sci*, 2002, 81(3): 283–292.
- [7] Qu LJ, Li XY, Wu GQ, Yang N. Efficient and sensitive method of DNA silver staining in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 2005, 26(1): 99–101. [\[DOI\]](#)
- [8] Chang CM, Coville JL, Coquerelle G, Gourichon D, Oulmouden A, Tixier-Boichard M. Complete association between a retroviral insertion in the tyrosinase gene and the recessive white mutation in chickens. *BMC Genomics*, 2006, 7: 19. [\[DOI\]](#)
- [9] Gunnarsson U, Hellström AR, Tixier-Boichard M, Minvielle F, Bed'hom B, Ito S, Jensen P, Rattink A, Vereijken A, Andersson L. Mutations in *SLC45A2* cause plumage color variation in chicken and Japanese quail. *Genetics*, 2007, 175(2): 867–877. [\[DOI\]](#)
- [10] Fan E, Levin DB, Glickman BW, Logan DM. Limitations in the use of SSCP analysis. *Mutat Res*, 1993, 88(1): 85–92.
- [11] Han YC, Teng CZ, Hu ZL, Song YC. An optimal method of DNA silver staining in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 2008, 29(6): 1355–1358. [\[DOI\]](#)
- [12] Sham P, Bader JS, Craig I, O'Donovan M, Owen M. DNA Pooling: a tool for large-scale association studies. *Nat Rev Genet*, 2002, 3(11): 862–871. [\[DOI\]](#)