

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2010.00242

沼泽型水牛 Y 染色体微卫星标记的筛选与多态性检测

张晓明, 乐祥鹏, 张春梅, 蓝贤勇, 陈宏, 雷初朝

西北农林科技大学动物科技学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 杨凌 712100

摘要: 为了研究水牛 Y 染色体的遗传多样性, 文章以滇东南水牛 3 个地方群体——红河(HH)、西双版纳(BN)和普洱(PR)共 31 头公牛为研究对象, 选取 14 个家牛 Y 染色体特异性微卫星标记, 以检测这些标记在水牛 Y 染色体遗传多样性研究中的可行性。结果表明, 3 个标记(INRA008、UMN0103 和 UMN0504)只有 1 个等位基因, 表现为单态; 3 个标记(UMN1113、UMN0304 和 BC1.2)均为 3 个等位基因, 但呈单态; 3 个标记(UMN0920、UMN0307 和 UMN3008)呈现无规律的梯状条带, 所以这 9 个标记都不适用于水牛的 Y 染色体遗传多样性研究; 只有 5 个标记(INRA124、INRA189、BM861、PBR1F1 和 UMN2001)具有多态性, 表明适用于水牛的 Y 染色体遗传多样性研究。这 5 个多态性 Y 染色体特异微卫星标记在滇东南水牛群体中的平均等位基因数(Na)为 2.8000, 平均期望杂合度(He)为 0.3998, 基因多样性(GD)为 0.4144, 多态信息含量(PIC)为 0.3245, Shannon 信息熵(SI)为 0.5849, 表明滇东南水牛群体的 Y 染色体具有中等遗传多态性。

关键词: 水牛; Y 染色体微卫星标记; 遗传多样性

Screening and polymorphism of Y chromosome microsatellite markers in swamp buffalo

ZHANG Xiao-Ming, YUE Xiang-Peng, ZHANG Chun-Mei, LAN Xian-Yong,
CHEN Hong, LEI Chu-Zhao

Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University,
Yangling 712100, China

Abstract: To understand the genetic diversity of buffalo Y chromosome, 14 microsatellite markers specific for cattle Y chromosomes were used to analyze 31 male buffaloes of three populations (i.e., HH, BN, and PR) originating from south-eastern Yunnan Province, P. R. China. The aim of this study was to examine the practicability of cattle Y chromosome-specific microsatellite markers in studying genetic diversity of buffalo Y chromosome. Three markers (INRA008, UMN0103, and UMN0504) produced single allele, and three (UMN1113, UMN0304, and BC1.2) produced three alleles. But these markers were all monomorphic. Another three markers (UMN0920, UMN0307, and UMN3008) amplified irregular ladder-like bands. These markers were not suitable for investigating the swamp buffalo Y chromosome genetic diversity. The remaining five microsatellites (INRA124, INRA189, BM861, PBR1F1, and UMN2001) were polymorphic, which can be used to study the swamp buffalo Y chromosome genetic diversity. The mean number of alleles (Na), expected heterozygosity (He), genetic diversity (GD), polymorphism information content (PIC), and Shannon's information index (SI) across these five polymorphic loci in the buffalo population samples studied were 2.8000, 0.3998, 0.4144, 0.3245, and 0.5849, respectively, demonstrating a moderate degree of polymorphism in the Y chromosome of the buffalo population.

Keywords: swamp buffalo; Y chromosome microsatellite; genetic diversity

收稿日期: 2009-08-31; 修回日期: 2009-12-03

基金项目: 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(编号: NCET-07-0699)资助

作者简介: 张晓明(1984-), 男, 硕士研究生, 专业方向: 动物遗传学。Tel: 15829050074; E-mail: aqkaqssaq24670@21cn.com

通讯作者: 雷初朝(1968-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动物遗传资源学。E-mail: leichuzhao1118@126.com

水牛分为非洲水牛属和亚洲水牛属, 其中非洲水牛还没有被驯化; 亚洲水牛包含 1 个驯化种和 4 个野生种, 目前世界上的家养水牛都来自于亚洲水牛。家养水牛包括江河型水牛和沼泽型水牛 2 类, 中国水牛属于沼泽型水牛。据联合国粮食与农业组织(2007)统计^[1], 全世界水牛存栏量为 1.74 亿头, 绝大多数分布在亚洲(96.9%), 其中印度、巴基斯坦和中国是 3 个主要的水牛饲养大国, 分别饲养水牛 9 800 万头、2 630 万头和 2 275 万头, 占世界总头数的 56.3%、15.1% 和 13.1%。尽管中国拥有丰富的水牛遗传资源, 位居世界第三位^[1], 然而, 以往对中国水牛 DNA 水平遗传多样性的研究相对较少。目前关于中国水牛起源进化的研究成果主要来自于以线粒体 DNA(mtDNA)为载体的母系起源研究和常染色体多态性研究。Lei 等^[2]通过分析中国水牛 6 个群体的 mtDNA D-loop 区全序列, 首次揭示中国水牛有两大母系起源(支系 A 和支系 B), 经过进一步检测中国水牛 7 个群体的 mtDNA D-loop 区全序列, Lei 等^[3]发现中国水牛的 A 支系发生了大的群体扩张, 并指出支系 A 和支系 B 的分化时间为 18 000 年前。结合印度、巴西、意大利和东南亚水牛的序列进一步分析, 提出沼泽型水牛和江河型水牛分别在中国和印度次大陆独立驯化, 并从这两个地方扩张到整个东南亚大陆, 东南亚是两种水牛类型的混合栖息地的观点。张毅^[4]用联合国粮农组织(FAO)和国际动物遗传学会(ISAG)联合推荐的用于家养水牛遗传多样性研究的 30 个常染色体微卫星标记^[5]检测了 20 个中国水牛群体的遗传多态性, 发现其中 27 个微卫星标记具有丰富的多态性, 根据各群体多态性分布的特点, 将中国水牛划分为长江中上游型、长江下游型、华南型和西南型 4 个类型。

目前, 已经发现多达 38 个家牛 Y 染色体微卫星标记^[6], 但家养水牛 Y 染色体微卫星标记还没有被筛选与研究, 关于中国水牛 Y 染色体微卫星遗传多态性及其父系起源模式研究还未见报道。本研究以滇东南水牛 3 个地方群体共 31 头公牛为研究对象, 利用筛选的 14 个家牛 Y 染色体特异性微卫星标记检测其在水牛 Y 染色体微卫星多态性研究中的可行性, 以期为中国水牛 Y 染色体的遗传多样性乃至父系起源模式提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 样本

为保证样本间无亲缘关系, 本研究在云南省红河州(HH)、西双版纳州(BN)和普洱市(PR)分别采集了滇东南水牛 5 份、9 份和 17 份共 31 份公牛血样, 采样时确保是本地纯种水牛, 每个个体颈静脉采血 10 mL, 低温条件下带回实验室保存备用。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取

基因组 DNA 的提取采用常规的酚-氯仿抽提法。

1.2.2 Y 染色体微卫星标记的选择和引物合成

本研究选用近几年报道中有多态性的 14 个家牛 Y 染色体特异性微卫星标记(IRNA124、IRNA189、BM861、IRNA008、UMN0304、UMN1113、PBR1F1、BC1.2、UMN2001、UMN0920、UMN0307、UMN3008、UMN0103 和 UMN0504)^[6, 7], 其引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成, 各标记的相关信息见表 1。

1.2.3 水牛 Y 染色体特异微卫星标记的 PCR 扩增与多态性分析

14 个标记的 PCR 扩增总体积均为 12.5 μ L/个体, PCR 扩增程序为常规程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 复性 60 s(复性温度见表 1), 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 充分延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 扩增产物通过 30%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离带型: 将 30%丙烯酰胺 20 mL、10 \times TBE 6 mL、纯水 34 mL、10%过硫酸铵(APS)400 μ L 和 TEMED 100 μ L 在烧杯中混匀, 灌入事先准备好的电泳槽玻璃板中, 温室下聚合 1 h 后固定在电泳槽点样; 用 120 V 恒压预电泳 10 min 后 80 V 恒压电泳过夜; 把凝胶从玻璃板取出, 用 1% 硝酸银 500 mL 染色, 2% 氢氧化钠 250 mL 和甲醛 1 mL 显色, 用 Discovery Series Quantity One Software Version 4.3.1 软件(Bio-Rad Laboratories Inc)进行片段大小统计和基因型分析。等位基因数(N_a), 有效等位基因数(N_e), 期望杂合度(H_e)和 Shannon 指数(S_I)用 Popgene3.2 软件^[8]计算, 多态信息含量(PIC)用 Cervus version 2.0^[9]软件计算, 利用 Fstat2.9.2^[10]计算各标记的基因多样性(GD)。

表 1 家牛与水牛 14 个 Y 染色体特异性微卫星标记的信息

标记	序列(5'→3')	等位基因数(个)		等位基因大小(bp)		复性温度 ^a (°C)	参考文献 ^b
		家牛	水牛	家牛	水牛		
IRNA124	GATCTTTGCAACTGGTTTG AGGACACAGGTCTGACAATG	12	4	58~67 126~190	47~65	56	[7]
IRNA189	TTTTGTTCCTCGTGCTGAG GAACCTCGTCTCCTGTAGCC	7	2	43~44 148~156	40,45	54	[7]
BM861	TTGAGCCACCTGGAAGC CAAGCGTTGGTTCAGATG	6	2	135~192	37,42	56	[7]
IRNA008	GAGCCTGTGTGTATACAC GGCACTTTCCTCTCCTGTCGCG	10	1	115~153	115	55	[11]
UMN0304	TGATATTCACAAGGCCGCTG GGCTGTGGTATACATGGAG	>10	3	210~232	202~245	55	[7]
UMN1113	ACAGCACTTCTTAACAAAGC TAGCCACACATCATGTTC	7	3	124~140	145~170	58	[7]
PBR1F1	GGTAAACACAACCTCAAGTGC CTTAAGTGAATTAGGAGTGG	— ^c	2	—	100,104	53	[6]
BC1.2	ATCAGTGCAGGGACCGAGATG AAGCAGCCGATAAACACTCCTT	1	3	250	200~361	56	[12]
UMN2001	TCAGGCAAGACTACTGGAGC TACCCTGGCGATTCTGCAA	2	4	131,134	131~245	54	[7]
UMN0920	GTTGAGGACTCTTGCATCTG CACAGGCCTAGAAGATTGAG	>16	—	254~290	—	61	[7]
UMN0307	GATACAGCTGAGTGACTAAC GTGCAGACATCTGAGCTGTG	12	—	101~162	—	58	[7]
UMN3008	TTGTGGAGGACTATTCATGG TCTGGACTCGACAGGACACC	>16	—	172~214	—	56	[7]
UMN0103	ACACAGAGTATTCACCTGAG ATTACCTGGGTCAAAGCAC	7	1	124~136	121	60	[7]
UMN0504	AGGCCATCTGCATAGTGAAG TGCTGGACTGCTCATCTCTG	4	1	106~144	113	56	[7]

注: ^a 水牛数据; ^b 家牛文献数据; ^c 没有扩增产物或未见报道。

2 结果与分析

2.1 滇东南水牛 Y 染色体微卫星标记的等位基因和基因型

本研究检测了滇东南水牛 31 头公牛的 14 个来源于家牛 Y 染色体的上特异性微卫星标记的遗传多态性,发现 3 个 Y 染色体微卫星标记 UMN0307(图 1I)、UMN0920 和 UMN3008 呈梯状条带,表明不能用于水牛 Y 染色体遗传多态性研究,在后续分析中剔除。其他 11 个标记都能扩增出良好的结果,其中 INRA124 和 UMN2001 为等位基因数最多的标记,分别检测到 4 个等位基因;标记 INRA008、UMN0504(图 1F 与 G)和 UMN0103 只有 1 个等位基因,表现为单态;标记 BC1.2(图 1H)、UMN0304 和 UMN1113 虽有 3 个等位基因,但没有表现多态性,仍呈单态。在 14 个标记中,5 个标记 INRA124、INRA189、BM861、PBR1F1 和 UMN2001 具有多态性(图 1A-E,表 1),均为 3 种

基因型,多态标记占总标记的 35.7%。

2.2 滇东南水牛 Y 染色体微卫星标记的遗传多样性

滇东南水牛各群体在 5 个 Y 染色体特异微卫星多态性标记的等位基因分布见表 2。表 3 列出了滇东南水牛在 5 个多态性标记上的遗传多样性指标。5 个多态性 Y 染色体特异微卫星标记在滇东南水牛 31 头公牛中共检测到 14 个等位基因,平均每个标记的有效等位基因数为 1.7558 个。杂合度(H)和多态信息含量(PIC)是度量群体遗传变异程度较合适的参数,滇东南水牛在标记 INRA124 的 PIC 值大于 0.5,表明该标记为高度多态标记;3 个标记(INRA189、PBR1F1 和 UMN2001)的 PIC 值介于 0.25~0.5 之间,为中度多态标记。而标记 INRA008、UMN1113、UMN0304、BC1.2、UMN0103 和 UMN0504 呈单态,无多态性。期望杂合度(He)值同样是标记 INRA124 最高,这与群体 PIC 值的结果一致。

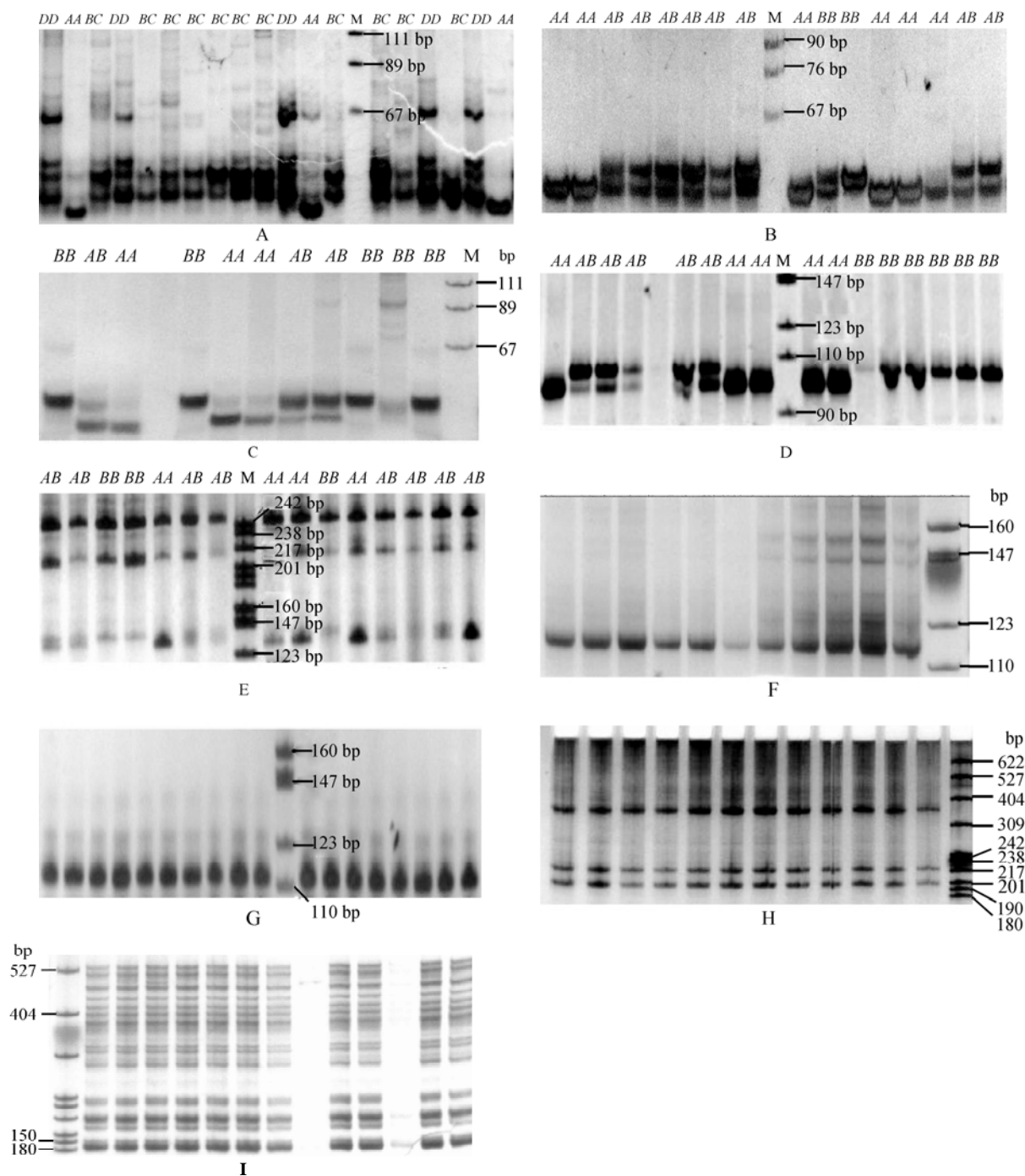


图1 水牛 Y 染色体微卫星标记的扩增效果

A: INRA124 标记; B: INRA189 标记; C: BM861 标记; D: PBR1F1 标记; E: UMN2001 标记; F: INRA008 标记; G: UMN0504 标记; H: BC1.2 标记; I: UMN0307 标记。M: pBR322 DNA/*Msp* I Marker。

3 讨论

起初牛基因组数据库中仅收藏了35个Y染色体标记, 其中在6个基因和29个DNA序列片段中([Http://locus.jouy.inra.fr/cgi-bin/bosmap/intro.pl](http://locus.jouy.inra.fr/cgi-bin/bosmap/intro.pl)), 只有5个微卫星标记定位于牛Y染色体的PAR(拟常染

色体区)区段^[6, 7]。随着分子生物技术的不断发展, 大量家牛Y染色体特异性微卫星标记被发现, 并广泛用于家牛遗传起源和驯化迁移模式的研究。本文筛选的14个家牛Y染色体微卫星标记在家牛的Y染色体研究中均具有不同程度的遗传多态性^[7, 11, 12]。

表 2 滇东南水牛各群体在 5 个多态性 Y 染色体微卫星标记的等位基因分布

群体	样本数	INRA124				INRA189		BM861		PBR1F1		UMN2001			
		等位基因大小(bp)				等位基因大小(bp)		等位基因大小(bp)		等位基因大小(bp)		等位基因大小(bp)			
		47	51	61	65	40	44	38	42	100	104	130	134	206	245
HH	5	—	2	2	1	4	1	1	4	4	1	2	3	—	—
BN	9	—	3	2	4	6	3	7	2	6	3	4	2	2	1
PR	17	3	3	5	6	9	8	8	9	15	2	7	3	5	2

注: HH: 红河; BN: 西双版纳; PR: 普洱。

表 3 滇东南水牛 5 个多态性 Y 染色体微卫星标记的遗传多样性指标

标记	等位基因数 (<i>Na</i>)	有效等位基因数 (<i>Ne</i>)	基因多样性 (<i>GD</i>)	多态信息含量 (<i>PIC</i>)	Shannon 指标 (<i>SI</i>)	期望杂合度 (<i>He</i>)
INRA124	4	2.3410	0.6100	0.4812	0.9706	0.5728
INRA189	2	1.8445	0.4720	0.3530	0.6504	0.4579
BM861	2	1.2119	0.1800	0.1596	0.3179	0.1748
PBR1F1	2	1.4539	0.3230	0.2634	0.4913	0.3122
UMN2001	4	1.9278	0.4870	0.3655	0.6743	0.4813
平均	2.8000	1.7558	0.4144	0.3245	0.5849	0.3998

筛选 14 个家牛 Y 染色体特异区的微卫星标记用于水牛的分析, 其中 3 个标记(UMN0920、UMN0307 和 UMN3008)扩增出了无规律性的梯状条带, 可能是因为这些标记在中国水牛 Y 染色体上存在着大量多重拷贝的缘故, 说明这 3 个标记不能应用于中国水牛 Y 染色体遗传多态性研究, 该结果与在非洲野水牛研究中得到的结果一致^[14]。标记 INRA008、UMN0304 和 UMN1113 在非洲野水牛中表现了丰富的多态性^[13, 14], 本文却发现其无多态性, 可能与本研究使用的样本数大小有关, 也可能与中国水牛的遗传特性有关。而本文中具有丰富的多态性的标记 INRA124、BM861 和 UMN2001 在非洲野水牛中却未发现多态性^[13, 14], 这说明中国水牛与非洲野水牛的 Y 染色体具有明显的遗传差异。标记 UMN0103 和 UMN0504 在中国水牛中呈单态, 这与非洲野水牛中的检测结果一致^[14], 表明不宜用于水牛 Y 染色体多态性研究。对于标记 INRA189, Edwards 等^[8]在沼泽型水牛中检测到的等位基因为 88 bp、90 bp 和 98 bp; Liu 等^[7]在家牛上检测到该标记的等位基因在 43~44 bp 和 148~156 bp 范围; Van Hooft 等^[14]在非洲野水牛上检测到该标记的等位基因在 147~162 bp 之间; 而本研究在滇东南水牛上检测到的等位基因为 40 bp 和 45 bp。由于 Edwards 等^[11]所用的沼泽型水牛来自地中海地区, 说明地中海沼泽型水牛与中国沼泽型水牛的种质特性有较大差异。通过比较这些差异, 本研究揭示 Y 染色体特异微卫星标记 INRA189 可以作为区分中国沼泽

型水牛、非洲野水牛及地中海沼泽型水牛的有效遗传标记。标记 PBR1F1 和 BC1.2 在本研究中首次应用于水牛遗传多样性研究, 发现标记 BC1.2 有 3 个等位基因, 但呈单态, 标记 PBR1F1 具有丰富多态性; 在家牛上 BC1.2 检测出了大小为 250 bp 的等位基因, 呈单态^[15]; 标记 PBR1F1 自发现其为家牛 Y 染色体上靠近拟常染色体区(PAR)的 Y 染色体特异区标记^[6]以来, 还未见其应用于牛遗传多样性研究的报道。5 个标记(INRA124、INRA189、BM861、PBR1F1 和 UMN2001)在中国水牛具有多态性, 说明适合应用于水牛 Y 染色体遗传多态性研究。本研究的结果为中国水牛 Y 染色体遗传多样性乃至父系起源模式研究提供了科学依据。

参考文献(References):

[1] FAO 《生产年鉴 2007》. [Http://www.fao.org/](http://www.fao.org/).
[2] Lei CZ, Zhang W, Chen H, Lu F, Ge QL, Liu RY, Dang RH, Yao YY, Yao LB, Lu ZF, Zhao ZL. Two maternal lineages revealed by mtDNA D-loop sequences in Chinese native water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Asian-Austral J Anim Sci*, 2007, 20(4): 471–476.
[3] Lei CZ, Zhang W, Chen H, Lu F, Liu RY, Yang XY, Zhang HC, Liu ZG, Yao LB, Lu ZF, Zhao ZL. Independent maternal origin of Chinese swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). *Anim Genet*, 2007, 38(2): 97–102.
[4] 张毅. 中国水牛分子遗传多样性及其起源分化的研究

- [学位论文]. 中国农业大学, 2006.
- [5] Hoffmann I, Marsan PA, Barker JSF, Cothran EG, Hanotte O, Lenstra JA, Milan D, Weigend S, Simianer H. New MoDAD marker sets to be used in diversity studies for the major farm animal species: recommendations of a joint ISAG/FAO working group. In: Proc. 29th International Conference on Animal Genetics. Tokyo, Japan, 2004.
- [6] Liu WS, Mariani P, Beattie CW, Alexander LJ, Ponce de Leon FA. A radiation hybrid map for the bovine Y Chromosome. *Mamm Genome*, 2002, 13(6): 320–326.
- [7] Liu WS, Beattie CW, Ponce de Leon FA. Bovine Y chromosome microsatellite polymorphisms. *Cytogenet Genome Res*, 2003, 102 (1–4): 53–58.
- [8] Raymond M, Rousset F. GENEPOP (version 1.2): population genetic software for exact tests and ecumenicism. *J Hered*, 1995, 86(3): 248–249.
- [9] Goudet J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- [10] Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol Ecol*, 1998, 7(5): 639–655.
- [11] Edwards CJ, Gaillard C, Bradley DG, MacHugh DE. Y-specific microsatellite polymorphisms in a range of bovid species. *Anim Genet*, 2000, 31(2): 127–130.
- [12] Li MH, Zerabruk M, Vangen O, Olsaker I, Kantanen. Reduced genetic structure of north Ethiopian cattle revealed by Y-chromosome analysis. *Heredity*, 2007, 98 (4): 214–221.
- [13] Van Hooft WF, Groen AF, Prins HT. Phylogeography of the African buffalo based on mitochondrial and Y-chromosomal loci: Pleistocene origin and population expansion of the Cape buffalo subspecies. *Mol Ecol*, 2002, 11(2): 267–279.
- [14] Van Hooft P, Greyling BJ, Prins HHT, Getz WM, Jolles AF. Selection at the Y chromosome of the African buffalo driven by rainfall. 2007, 2(10): e1086–e1090.
- [15] Schwerin M, Gallagher DS, Miller JR, Thomsen PD. Mapping of repetitive bovine DNA sequences on cattle Y chromosome. *Cytogenet Cell Genet*, 1992, 61(3): 189–194.

•综合信息•

欢迎参加“2010 年 BIO-X 国际转化医学研讨会”

2010 年 BIO-X 国际转化医学研讨会”(2010 BIO-X International Translational Medicine Symposium, ITMS) 将于 2010 年 5 月 21~24 日在上海交大 BIO-X 中心成立 10 周年之际, 在上海交通大学浩然大厦举行。大会将请来多位国际知名专家学者, 为国内外致力于生物医学领域基础和临床工作工作者提供了一个学习、交流“相互转化”的大舞台, 大会组委会欢迎各路同道、同学踊跃参加。

大会主席: 贺林, 王岩

主办单位: 上海交通大学 BIO-X 中心; 中国人民解放军总医院

协办单位: 上海市医学遗传学会; 中华医学会医学遗传学分会; 遗传学报

会议议题: 药物基因组学与个体化治疗; 基因诊断和个体健康; 复杂疾病的遗传和环境机理; 产前基因诊断; 营养基因组学; 药物基因组学及药物开发研究; “转化医学”相关技术论坛。

已确定的讲演者: Alexander Steven Whitehead; David St clair; Dennis Lo; Douglas Levinson; Honghao Zhou; Joe Leigh Simpson; John N Weinstein; Lin He; Lun Yang; Michael C O'Donovan; Michel Eichelbaum; Paul B. Watkins; William Slikker, Jr; Wolfgang Sadec

会务组联系方式: 地址: 上海交通大学 BIO-X 中心上海市华山路 1954 号小白楼

电话: 021-62933338 8106; 传真: 021-32260640

邮箱: helin@bio-x.cn; 会议网址: <http://www.bio-x.cn/2010ITMS>