

庞有志, 白俊艳, 张小辉, 等. 北京白羽鹌鹑微卫星多态性分析[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(5): 1110-1114.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.05.026

## 北京白羽鹌鹑微卫星多态性分析

庞有志, 白俊艳, 张小辉, 赵淑娟, 吴胜军, 于美琴, 许华伟  
(河南科技大学动物科技学院, 河南 洛阳 471003)

**摘要:** 为了从分子水平上揭示北京白羽鹌鹑群体的遗传结构, 为北京白羽鹌鹑遗传资源的评价、保护和利用提供新的依据, 采用 PCR 扩增、聚丙烯酰胺凝胶电泳等方法对北京白羽鹌鹑群体 9 个微卫星标记( *GUJ0023*、*GUJ0028*、*GUJ0029*、*GUJ0057*、*GUJ0059*、*GUJ0063*、*GUJ0077*、*GUJ0083*、*GUJ0097*) 的遗传多样性进行分析。结果表明, 9 个微卫星标记共检测出 43 个等位基因, 平均每个标记检测到 4.777 8 个等位基因。平均杂合度为 0.704 6, 平均多态信息含量( *PIC*) 为 0.658 7, 平均有效等位基因数为 3.613 5。除 *GUJ0063* ( *PIC* = 0.463 9) 在北京白羽鹌鹑群体中为中度多态性标记外, 其余 8 个微卫星基因座均为高度多态性标记, 可以作为北京白羽鹌鹑群体遗传多样性分析的有效遗传标记。微卫星基因座 *GUJ0023* 和 *GUJ0029* 在白羽鹌鹑群体中的  $\chi^2$  值小于  $\chi^2_{0.01}$ , 符合哈迪-温伯格定律, 其余微卫星基因座均偏离哈迪-温伯格平衡定律, 这种遗传不平衡可能与近年来人们对北京白羽鹌鹑进行小群体保种有关。

**关键词:** 北京白羽鹌鹑; 微卫星; 遗传多样性

**中图分类号:** S839      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-4440(2015)05-1110-05

## Polymorphism analysis of microsatellite marker of Beijing white-feather quail

PANG You-zhi, BAI Jun-yan, ZHANG Xiao-hui, ZHAO Shu-juan, WU Sheng-jun, YU Mei-qin, XU Hua-wei  
(College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

**Abstract:** To reveal the genetic structure of Beijing white-feather quail at molecular level and to provide new evidence for the evaluation, protection and utilization of genetic resources of Beijing white-feather quail, the genetic diversity of Beijing white-feather quail population was analyzed with 9 microsatellite markers using PCR amplification, polyacrylamide gel electrophoresis. Totally 43 alleles were detected in 9 microsatellite markers *GUJ0023*, *GUJ0028*, *GUJ0029*, *GUJ0057*, *GUJ0059*, *GUJ0063*, *GUJ0077*, *GUJ0083*, *GUJ0097*, 4.777 8 for each marker on average. The average heterozygosity is 0.704 6, the average polymorphism information content ( *PIC*) is 0.658 7 and the average effective allele is 3.613 5. Except for marker *GUJ0063* ( *PIC* = 0.463 9) which was moderately polymorphic, the other 8 microsatellite markers showed high polymorphism which could serve as the effective genetic markers to analyze the genetic diversity of Beijing white-feather quail. Only *GUJ0023* and *GUJ0029* achieved the genetic distribution satisfying Hardy-Weinberg law in the white-feather quail population, while the rest markers significantly deviated from the Hardy-Weinberg balance (  $P < 0.01$ ). The genetic disequilibrium might be associated with the small group conservation of Beijing white-feather quail in recent years.

**Key words:** Beijing white-feather quail;  
microsatellite marker; genetic diversity

收稿日期: 2015-02-27

基金项目: 河南省重点科技攻关项目 (082102130002)

作者简介: 庞有志 (1963-), 男, 河南新蔡人, 博士, 教授, 主要从事动物遗传育种研究。(E-mail) pyzh2006@126.com

微卫星 (Microsatellite) 又称简单重复序列, 是

一种以 2~6 bp 核苷酸为基本单位,呈串联重复随机分布于原核和真核生物基因组中的高度重复序列<sup>[1-4]</sup>。微卫星标记具有多态性丰富且在基因组中分布均匀、检测方便和共显性遗传等优点。在鹌鹑遗传育种方面微卫星标记主要应用于遗传图谱的构建<sup>[5]</sup>、鹌鹑功能基因和 QTL 定位<sup>[6]</sup>、遗传多样性分析<sup>[7]</sup>等方面。北京白羽鹌鹑是朝鲜鹌鹑的一个突变系,是中国自行培育的高产蛋用品系,因其白羽性状具有性连锁遗传的特点,该品系作为配套系的父本,与朝鲜鹌鹑、中国黄羽鹌鹑广泛用于自别雌雄配套系生产<sup>[8]</sup>。本研究利用 9 对微卫星标记对北京白羽鹌鹑群体进行多态性检测,旨在为北京白羽鹌鹑的遗传资源的评价、保护和利

用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 样品采集 在河南科技大学试验牧场,随机抽取 80 只北京白羽鹌鹑,每只心脏采血 2 ml,血样采用柠檬酸葡萄糖(ACD)抗凝,血液:ACD 为 6:1 (体积比)。 $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存备用。

1.1.2 引物的选择及合成 从国内外文献上筛选多态性比较高且每个基因座至少有 4 个等位基因的微卫星基因座,确定了 9 个微卫星基因座作为本次研究的遗传标记(表 1)。引物序列送上海生工生物工程有限公司合成。

表 1 9 个微卫星基因座的相关信息

Table 1 Information for 9 microsatellite loci

微卫星 基因座	重复序列	引物序列 (5'→3')	退火温度 ( $^{\circ}\text{C}$ )	登录号	位置
GUJ0023	(CA)7TA(CA)11	GAGAGGTACAGCAACACTTTTCGTTTCTTTCTGGAGTGTCT	55	AB035833	CJA14
GUJ0028	(CA)9	TGAACAAAGCAGAAAGGAGCCCTTACCTACATGAAACGTC	55	AB035838	QL08
GUJ0029	(CA)11CT(CA)2	GAGCATTTTCTAGTCTGTCTCATACACAGGCTAAGGAAACC	55	AB035839	CJA06
GUJ0057	(CA)12	GGAATGGAAAATATGAGAGCCAGGTGTTAAAGTCCAATGT	60	AB063125	QL03
GUJ0059	(CA)10	GACAAAGTTACAGCTAGGACTAGGTGCGAAAATCTCTGAC	50	AB063127	CJA05
GUJ0063	(CA)7CT(CA)2CT(CA)7	GCTCAGGTTCTCAGCTGATGGGGAGAGATCAAGGGAACAG	55	AB063131	CJA02
GUJ0077	(CA)8	TATAAGATGGGGAGTGGCAGATTTTGCTGACCCCTTCTG	56	AB063145	CJA01
GUJ0083	(CA)11	CCATCTCTGTGCCTTTCCAAGCTGAAAACATTGGGCGTAG	58	AB063151	QL10
GUJ0097	(CA)14	GGATGCTCAGTGTGAAAAGGAGCAAGAGGTGAGTGTTTC	58	AB063165	CJA14

### 1.2 方法

1.2.1 PCR 反应条件 PCR 反应体系总体积为 12.50  $\mu\text{l}$ ,其中 ddH<sub>2</sub>O 8.65  $\mu\text{l}$ ,10 $\times$ Buffer 1.25  $\mu\text{l}$ ,Mg<sup>2+</sup>(25 mmol/L) 0.75  $\mu\text{l}$ ,DNA 模板 0.50  $\mu\text{l}$ ,上、下游引物各 0.50  $\mu\text{l}$  (10 mmol/L),dNTPs 0.25  $\mu\text{l}$ ,Taq 酶 0.10  $\mu\text{l}$ 。PCR 扩增反应程序:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 45 s,根据表 1 的退火温度退火 60 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 60 s,30 次循环;最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 12 min,4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

1.2.2 扩增产物的检测及聚丙烯酰胺凝胶电泳 扩增产物用 1.0 $\times$ TBE 电泳缓冲液配制成的 1% 琼脂糖凝胶进行检测。以 DNA marker I 作对照,在紫外透射分析仪上观察,选择特异性条带明亮而且杂带很少的样品,进行 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,120 V 电泳 2 h

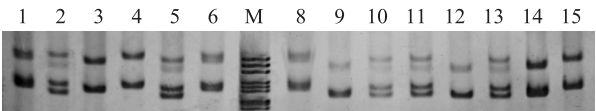
左右,硝酸银染色后用成像仪拍照保存并分析。根据标准 pBR322DNA/MspI Marker,检测等位基因片段大小,确定各微卫星基因座全部个体的基因型。

1.2.3 统计分析 通过分子生物学软件 POPGENE (Version1.32) 分析每个基因座的多态信息含量 (PIC)、有效等位基因数 ( $N_e$ )、杂合度 ( $H$ )。

## 2 结果

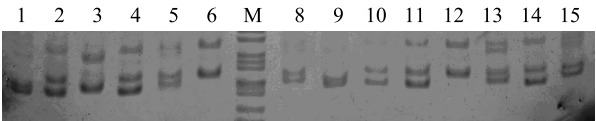
### 2.1 微卫星基因座聚丙烯酰胺凝胶电泳检测结果

9 个微卫星基因座在北京白羽鹌鹑群体中均具有明显的多态性,其中微卫星基因座 GUJ0028 和 GUJ0029 电泳图结果见图 1、图 2。从图 1、图 2 可以看出微卫星基因座 GUJ0028 和 GUJ0029 具有丰富的多态性。



1、4、15: 基因型 185/185; 2、5、10、11、13: 基因型 185/175; 3、6、8、14: 基因型 180/180; 9、12: 基因型 175/175。

图 1 微卫星基因座 *GUJ0028* 的 PCR 产物电泳图  
Fig. 1 Banding patterns of PCR product of *GUJ0028* microsatellite



1、5、9: 基因型 160/165; 2: 基因型 147/160; 3: 基因型 150/150; 4: 基因型 147/165; 6: 基因型 165/165; 8: 基因型 165/175; 10、11、14: 基因型 160/175; 12: 基因型 175/175; 13、15: 基因型 170/175。

图 2 微卫星基因座 *GUJ0029* 的 PCR 产物电泳图  
Fig. 2 Banding patterns of PCR product of *GUJ0029* microsatellite

2.2 微卫星等位基因数及基因频率

9 个微卫星基因座在北京白羽鹌鹑群体中共检测到 43 个等位基因, 平均等位基因数为 4.777 8 (表 2)。其中 *GUJ0023*、*GUJ0029*、*GUJ0077* 均检测到 6 个等位基因, 基因片段分别为 219 ~ 244 bp、147 ~ 175 bp、260 ~ 285 bp; *GUJ0028*、*GUJ0057*、*GUJ0097* 均检测到 5 个等位基因, 基因片段分别为 160 ~ 185 bp、147 ~ 170 bp、130 ~ 170 bp; *GUJ083* 检测到 4 个等位基因, 基因片段为 130 ~ 155 bp; *GUJ059* 和 *GUJ0063* 均检测到 3 个等位基因, 基因片段分别为 240 ~ 246 bp、242 ~ 246 bp。

微卫星位点 *GUJ0023*、*GUJ0028*、*GUJ0029*、*GUJ0057*、*GUJ0059*、*GUJ0063*、*GUJ0077*、*GUJ0083* 和 *GUJ0097* 在北京白羽鹌鹑群体中分别有 15、12、15、13、9、4、14、9、17 种基因型。*GUJ0023*、*GUJ0028*、*GUJ0029*、*GUJ0057*、*GUJ0059*、*GUJ0063*、*GUJ0077*、*GUJ0083* 和 *GUJ0097* 优势基因分别为 240、170、175、160、246、244、280、147、155, 优势基因型分别为 242/238、185/170、175/160、162/162、246/246、244/244、280/280、147/147、155/155。

表 2 9 个微卫星的等位基因大小和频率

Table 2 Allele size and frequencies of 9 microsatellite loci

微卫星基因座	等位基因大小与频率	等位基因					
		A	B	C	D	E	F
<i>GUJ0023</i>	大小 (bp)	219	230	238	242	240	244
	频率	0.150 0	0.075 0	0.233 3	0.225 0	0.283 3	0.033 4
<i>GUJ0028</i>	大小 (bp)	160	170	175	180	185	
	频率	0.250 0	0.286 8	0.088 2	0.213 2	0.161 8	
<i>GUJ0029</i>	大小 (bp)	147	150	160	165	170	175
	频率	0.063 8	0.127 7	0.287 2	0.138 3	0.053 2	0.329 8
<i>GUJ0057</i>	大小 (bp)	145	147	155	160	162	170
	频率	0	0.153 8	0.096 2	0.352 6	0.326 9	0.070 5
<i>GUJ0059</i>	大小 (bp)	230	238	240	242	246	
	频率	0	0	0.086 7	0.146 7	0.273 3	
<i>GUJ0063</i>	大小 (bp)	242	244	246			
	频率	0.238 8	0.634 3	0.126 9			
<i>GUJ0077</i>	大小 (bp)	260	265	270	275	280	285
	频率	0.225 0	0	0.200 0	0.133 3	0.325 0	0.116 7
<i>GUJ0083</i>	大小 (bp)	130	140 (B)	147	155		
	频率	0.025 6	0.166 7	0.423 1	0.384 6		
<i>GUJ0097</i>	大小 (bp)	130	147	155	160	170	
	频率	0.111 9	0.231 3	0.477 6	0.111 9	0.067 3	

### 2.3 微卫星基因座的基因杂合度和多态信息含量

由表 3 可以看出,在北京白羽鹌鹑群体中微卫星基因座 *GUJ0023* 多态信息含量、有效等位基因数和杂合度均为最高,分别为 0.751 9、4.659 8 和 0.785 4。9 个微卫星在北京白羽鹌鹑群体中平均多

态信息含量、有效等位基因数、杂合度分别为 0.658 7、3.613 5、0.704 6。*GUJ0023* 和 *GUJ0029* 在白羽鹌鹑群体中的  $\chi^2$  值小于  $\chi^2_{0.01}$ ,符合哈迪-温伯格定律,其余均偏离哈迪-温伯格平衡定律。

表 3 9 个微卫星的等位基因数、多态信息含量、有效等位基因数、杂合度

Table 3 Number of alleles, polymorphism information content (PIC), effective alleles and heterozygosity of 9 microsatellite loci

基因座	等位基因数	多态信息含量	有效等位基因数	杂合度	$\chi^2$ 值
<i>GUJ0023</i>	6	0.751 9	4.659 8	0.785 4	33.81
<i>GUJ0028</i>	5	0.739 1	4.460 3	0.775 8	93.44
<i>GUJ0029</i>	6	0.733 1	4.280 8	0.766 4	28.34
<i>GUJ0057</i>	5	0.686 1	3.716 1	0.730 9	72.57
<i>GUJ0059</i>	4	0.597 8	2.881 0	0.652 9	124.86
<i>GUJ0063</i>	3	0.463 9	2.103 0	0.524 5	67.59
<i>GUJ0077</i>	5	0.736 4	4.393 7	0.772 4	142.74
<i>GUJ0083</i>	4	0.573 0	2.813 7	0.644 6	73.84
<i>GUJ0097</i>	5	0.647 2	3.213 4	0.688 8	38.37

## 3 讨论

有效等位基因数是纯合度的倒数,反映微卫星位点上所有等位基因之间的相互影响程度。有效等位基因数越接近所检测到的等位基因的绝对数,表明等位基因在群体中分布越均匀。本研究中 9 个微卫星标记在北京白羽鹌鹑群体中有效等位基因数最小为 2.103 0,最大达 4.659 8,反映出 9 个微卫星标记的等位基因在群体中分布不均匀。

多态信息含量 (PIC) 是衡量等位基因片段多态性的理想指标,当  $PIC \geq 0.50$  时表明该基因座为高度多态基因座,  $0.25 \leq PIC < 0.50$  时表明该基因座为中度多态基因座,  $PIC < 0.25$  时表明该基因座为低度多态基因座<sup>[9]</sup>。本研究中除了 *GUJ063* ( $PIC = 0.463 9$ ) 在北京白羽鹌鹑群体中为中度多态性基因座外,其余 8 个微卫星基因座均为高度多态基因座,表明这 8 个微卫星标记均可以作为北京白羽鹌鹑群体的有效遗传标记进行遗传多样性分析。

遗传杂合度表示在微卫星基因座上杂合子个体占群体的比例,它反映微卫星基因座在群体中的遗传变异程度。杂合度越高,表明群体内遗传多样性就越高,遗传变异程度就越大,反之则群体内遗传变异程度就小。吴胜军等<sup>[10]</sup>用同样的 9 个微卫星标

记研究了朝鲜鹌鹑群体的遗传多样性,其平均杂合度为 0.709 6,平均多态信息含量为 0.663 9,而本研究中北京白羽鹌鹑的平均杂合度和多态信息含量分别为 0.704 6 和 0.658 7,可以看出北京白羽鹌鹑的变异程度略低于朝鲜鹌鹑,这可能与北京白羽鹌鹑所受到较高的选择强度有关。北京白羽鹌鹑由朝鲜鹌鹑分化而来,培育至今已有 20 余年,比较两者优势基因即可以看出两群体分化的差异,在所研究的 9 个微卫星基因座中,北京白羽鹌鹑在 *GUJ0023*、*GUJ0028*、*GUJ0029*、*GUJ0057*、*GUJ0059*、*GUJ0063*、*GUJ0077*、*GUJ0083* 和 *GUJ0097* 基因座优势基因分别为 240、170、175、160、246、244、280、147、155;而朝鲜鹌鹑除 *GUJ0063* 和 *GUJ0083* 两个基因座与北京白羽鹌鹑具有相同的优势基因外,其他 7 个微卫星基因座优势基因都发生了变化,这提示我们北京白羽鹌鹑从朝鲜鹌鹑分离纯化后发生了一些群体变化,而且这种变化在 Bai 等<sup>[11]</sup>对朝鲜鹌鹑的另一种羽色突变系—中国黄羽鹌鹑的研究中也得到反映。另外,孟庆美等<sup>[12]</sup>报道了朝鲜鹌鹑群体中 12 个微卫星的多态性,本研究检测的 9 个微卫星中有 5 个 (*GUJ0023*、*GUJ0057*、*GUJ0059*、*GUJ0063* 和 *GUJ0097*) 与其基因座相同,但检测到的基因数不同,其中有 3 个标记 (*GUJ0057*、*GUJ0063* 和

GUJ0097) 的等位基因数少于其研究结果, 而另 2 个基因座等位基因数多于其研究结果。Farrag 等<sup>[13]</sup>研究的 13 个微卫星在 3 个日本鹌鹑品系中的平均杂合度为 0.609 0, Hossein 等<sup>[14]</sup>研究的 12 个微卫星在日本鹌鹑 4 个品系中的平均杂合度为 0.434 3 左右, 而本研究的 9 个微卫星在北京白羽鹌鹑群体中平均杂合度为 0.704 6, 表明北京白羽鹌鹑群体的遗传变异程度明显高于日本鹌鹑。

$\chi^2$  检验结果表明, 本研究测定的 9 个微卫星基因座中除 GUJ0023 和 GUJ0029 外, 其余 7 个基因座在北京白羽鹌鹑群体中均极显著偏离遗传平衡 ( $P < 0.01$ )。遗传平衡与否与检测样本数有一定关系, 样本不够大时, 有些基因座就可能检测不到全部等位基因。Baker 等<sup>[15]</sup>指出, 在检测每个品种时, 为了避免出现误差, 样本数应达到 50 个。就本研究而言, 样本数 (80) 已经达到抽样要求, 表明遗传不平衡不是样本的原因, 很可能是北京白羽鹌鹑群体受到过度人工选择或近亲繁殖等因素的影响, 这可能与近年来对北京白羽鹌鹑进行小群体保种有关。

#### 参考文献:

- [1] TAUTA D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA marks[J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17: 6463-6471.
- [2] 刘龙腾, 贾春咏, 努尔力·阿不力孜, 等. 利用微卫星标记对绵羊进行亲子鉴定[J]. 江苏农业学报, 2014, 30(1): 135-139.
- [3] 吉挺, 沈芳, 孟祥金, 等. 太湖地区与皖南地区中华蜜蜂微卫星 DNA 遗传多样性分析[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(12): 21-25.
- [4] 李晓锋, 马月辉, 索效军, 等. 波尔山羊 10 个微卫星标记多态性分析[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(7): 23-26.
- [5] KAYANG B B, VIGNAL A, INOUE-MURAYAMA M, et al. A first-generation microsatellite linkage map of the Japanese quail [J]. Animal Genetics, 2004, 35: 195-200.
- [6] MIWA M, INOUE-MURAYAMA M, KAYANG B B, et al. Mapping of plumage colour and blood protein loci on the microsatellite linkage map of the Japanese quail [J]. Animal Genetics, 2005, 36: 396-400.
- [7] AMIRINIA C, EMRANI H, ARBABE M A R, et al. Evaluation of eight microsatellite loci polymorphism in four Japanese quail (*Coturnix japonica*) strain in iran [J]. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2007, 10(8): 1195-1199.
- [8] 庞有志. 蛋用鹌鹑自别雌雄配套技术研究与应用 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2009: 258-281.
- [9] BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. The American Journal of Human Genetics, 1980, 32: 314-331.
- [10] 吴胜军, 庞有志, 赵淑娟, 等. 朝鲜鹌鹑微卫星多态性分析 [J]. 河南农业科学, 2010(10): 112-115.
- [11] BAI J Y, PANG Y Z, WU S J, et al. Polymorphism analysis of chinese yellow quail using microsatellite markers [J]. The Journal of Animal & Plant Sciences, 2013, 23(4): 1072-1076.
- [12] 孟庆美, 孙永强, 李大全, 等. 朝鲜鹌鹑遗传多样性微卫星标记分析 [J]. 福建畜牧兽医, 2007, 29(1): 1-2.
- [13] FARRAG S A, TANATAROV A B, SOLTAN M E, et al. Microsatellite analysis of genetic diversity in three populations of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) from Kazakhstan [J]. Journal of Animal and Veterinary Advances, 2011, 10(18): 2376-2383.
- [14] HOSSEIN E, CYRUS A, MOHAMMAD A R. Genetic variation and bottleneck in Japanese quail (*Coturnix japonica*) strains using twelve microsatellite markers [J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(20): 4289-4295.
- [15] BAKER J S. Global protocol for determining genetics distance among domestic livestock breeds [J]. Appl Livest Prod, 1994, 21: 501-502.

(责任编辑: 张震林)