

畜禽微卫星多态性的银染法显色

张细权 刘敬顺 吴显华

(华南农业大学动物科学系, 广州 510642)

摘要 为了确定一种安全、有效而快速的显示畜禽微卫星多态性的染色方法, 以广东地方鸡种及优质黄羽肉鸡品系种鸡基因组 DNA 为材料, 用 5 对微卫星引物进行 PCR 扩增, 并将扩增产物置于变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离, 通过对比溴化乙锭染色和银染法显色确定理想显色法, 结果认为银染法是一种可行、安全的理想方法。

关键词 微卫星多态性; 银染法

中图分类号 S 813. 2

1989 年, 几个实验室同时发现了真核生物基因组中存在一类特殊的重复 DNA 序列, 其典型的重复单位仅为 1~6 个核苷酸, 重复次数 10~20 次, 这种简单的重复称为微卫星(microsatellite)。由于微卫星具有高度多态性、多等位基因、等显性遗传、丰富而广泛分布于整个基因组等特点, 它已被广泛应用于畜禽基因定位(Steffen et al, 1993; Ron et al, 1994)、连锁分析(Marklund et al, 1994; Ron et al, 1993)、亲子鉴定(Usha et al, 1995; Talbot et al, 1996; Glowatzki—Mullis et al, 1995)和群体遗传研究(Dietz, 1993)。

微卫星多态性的检测一般需经过如下步骤: 先筛选阳性克隆, 找出微卫星并测序, 再根据测序结果设计引物, 然后进行 PCR 扩增。扩增产物经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 最后显色。显色方法用得最多的是放射自显影, 也有用荧光染料标记显影的方法。这两种显色方法虽很有效, 但较烦琐, 放射自显影法还受同位素照射的危险。为了建立一种安全、快速而有效的方法, 本试验根据文献报道, 探索用银染法显示畜禽微卫星多态性。

1 材料与方法

1.1 DNA 样本制备

翅静脉抽取广东地方鸡种及黄羽肉鸡品系共 289 羽成鸡的血样, 每羽抽 0.5 mL, EDTA 抗凝, 按孟安明等(1993)抽提 DNA。得到的 DNA 液稀释成 10~50 ng/ μ L 的浓度, 置 4℃冰箱中备用。

1.2 PCR 扩增

按 Crooijmans 等(1993)报道的序列合成 5 对微卫星引物 MCW—001、MCW—002、MCW—003、MCW—004 和 MCW—005, 除 dNTP 浓度全部改为 200 μ mol/L 外, 其余条件均按 Crooijmans 等(1993)介绍的方法。

1.3 变性电泳

根据萨姆布鲁克(1993)、黄晓明等(1995)及毛新等(1995), 采用 8%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 PCR 扩增产物。

1.4 显色方法

电泳结束后, 分别采用两种方法显色。第一种方法是用溴化乙锭(EB)溶液染色, 其操作如下: 用 $0.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 浓度的 EB 溶液染色 30 min, 然后置于紫外检测仪上观察结果。第二种方法是银染法, 其操作步骤如下: (1)电泳凝胶剥离后转移至一塑料盒中, 加 10%醋酸固定 20 min, 用蒸馏水洗 3 次以去除尿素; (2)在 $0.1\%\text{AgNO}_3-0.046\%$ 甲醛溶液中孵育 30 min, 用蒸馏水浸泡 10~20 s; (3)换上预冷至 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 $3\%\text{Na}_2\text{CO}_3-0.046\%$ 甲醛溶液显影, 约 10 min 后凝胶上出现清晰的褐色条带, 此时用 10%醋酸液固定, 然后在日光观片灯下观察, 记录结果。

2 结果

2.1 EB 染色效果

染色结束后观察结果, 仅能观察到极弱的 EB 着色带。通过延长染色时间、加大 EB 浓度以及增加加样量等方法, 仍不能清晰地在紫外透射检测仪上检测到电泳区带。

2.2 银染区带的显示

电泳后的凝胶在显色时扩增产物着色深浅是变化的。以 $3\%\text{Na}_2\text{CO}_3-0.046\%$ 甲醛溶液浸泡约 10 min 后, DNA 区带着色逐渐由浅变深, 达到最深时应立即用 10%醋酸固定可令着色保持较长时间, 否则褐色区带会很快褪去, 造成观察困难。图 1 是微卫星 MCW-001 和 MCW-004 多态性银染法显色的电泳图。

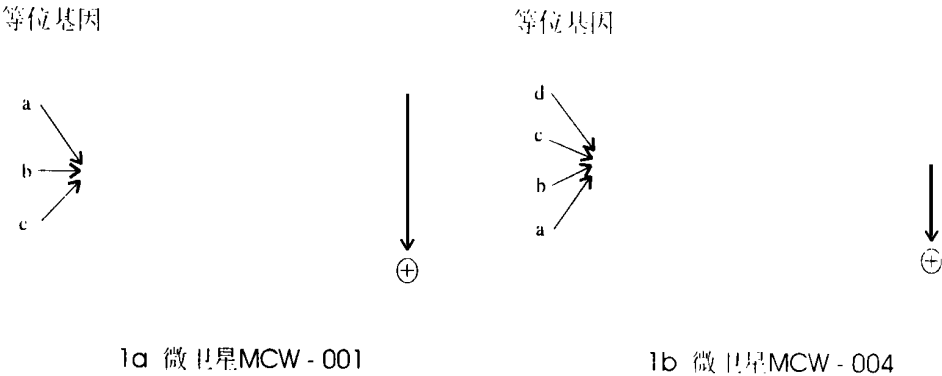


图 1 银染法显示的微卫星多态性

2.3 对广东地方鸡种、黄羽肉鸡品系微卫星多态性银染法检测的结果

PCR 扩增后, 先用 Agarose 凝胶电泳检测有无扩增产物, 发现 5 个微卫星中, MCW-003 未能扩增出产物。对存在扩增产物的另外 4 个微卫星作变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 银染显色结果显示, MCW-001、MCW-002、MCW-004 和 MCW-005 分别有 3、3、5 和 4 个等位基因, 它们的座位杂合性各为 0.129、0.038、0.691 和 0.729。这些结果跟 Crooijmans 等 (1993)略有差异, 原因可能是所用家鸡的纯度较高所致 (张细权等, 1996)。

表 1 微卫星多态性及其基因频率

微卫星	引物序列	等位基因	基因频率
MCW-001	ACTGTCACAGTGGGGTCATG GACA ACACGTCCTGTGTCACATGCCTGT	a	0.046
		b	0.021
		c	0.933
MCW-002	TCCAGAGCA GTTGCTCCACATTC GCAAGTTAGTTATTGTAGG GGCTC	a	0.016
		b	0.003
		c	0.981
MCW-004	GGATTA CAGCACCTGAA GCCACTAG AAACCAGCCATGGGTGCAGATTGG	a	0.407
		b	0.217
		c	0.305
		d	0.062
		e	0.010
MCW-005	ACCTCCTGCTGGCAAATAAATTGC TCACTTTAGCTCCATCAGGATTCA	a	0.490
		b	0.409
		c	0.080
		d	0.021

3 讨论

微卫星的 PCR 扩增产物在变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 其显色方法有几种, 即同位素放射自显影法、荧光染料标记法、溴化乙锭显色法和银染法。采用 γ ³² P 和 ³⁵ S 同位素放射自显影是目前最常用的方法 (Crooijmans et al, 1993; Marklund et al, 1994; Robic et al, 1995; Usha et al, 1995; Redaelli et al, 1996; Talbot et al, 1996), 荧光染料标记法用得不多 (Glowatzki—Mullis et al, 1995), EB 染色法在扩增产物片段长度较大时也常常采用, 银染法则用得极少。

上述方法各有优缺点。同位素放射自显影法灵敏性高, 非常可靠有效, 因而常常被采用。但此法涉及到同位素操作, 危险, 同时操作过程也较烦琐, 须经过同位素标记、凝胶转移、自显影等步骤。荧光染料标记法虽无危险, 但灵敏度稍差, 其操作同样烦琐。EB 显色灵敏度最差, 往往要求较多的产物量, 而在微卫星 PCR 扩增及聚丙烯酰胺凝胶电泳中这点却不易做到, EB 还具有致癌性。银染法的灵敏度要比 EB 高得多, 且无毒, 操作也较简便, 但此法着色后不易固定, 给观察结果造成一定困难 (萨姆布鲁克等, 1993; 卢圣栋, 1993)。

本试验分别用 EB 法和银染法对变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后的微卫星进行显色, 结果 EB 法无法显示微卫星多态性。银染法则能够成功地显示微卫星多态性, 而银染法易褪色的问题可通过以 10% 醋酸固定的方法解决。上述结果跟黄晓明等 (1995) 报道的相一致。在本试验进行过程中, 国外 Comincini 等 (1995) 也报道了用银染法检测牛微卫星多态性的方法。

参 考 文 献

毛 新, 黄胜生, 牟庶华, 等. 1995. 非同位素 PCR—SSCP 方法的初步临床应用. 遗传, 17(4): 4~7
卢圣栋. 1993. 现代分子生物学实验技术. 北京: 高等教育出版社, 359~360

- 张细权, 杨关福, 施振旦, 等. 1996. 用微卫星多态性研究家鸡品种的遗传结构及亲缘关系. *Animal Biotechnology Bulletin*, 5(Suppl): 54~59
- 孟安明, 齐顺章. 1993. 用四个探针产生的家禽 DNA 指纹图. *生物化学与生物物理进展* 20(2): 139~142
- 黄晓明, 胡向阳, 宗 卉, 等. 1995. 二核苷酸重复多态性非同位素检测及其在基因诊断中的应用. *遗传学报*, 22(2): 81~85
- 萨姆布鲁克 J, 弗时奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 1993. 分子克隆实验指南. 金冬雁等译. 北京: 科学出版社, 304~342
- Comincini S, Zhang Y, Ferretti L, et al. 1995. *J Anim Breed Genet*, 112: 415~420
- Crooijmans R P M A, van Kampen A J A, van der Poel J J, et al. 1993. Highly polymorphic microsatellite markers in poultry. *Anim Genet*, 24: 441~443
- Dietz A B, Womack J E, Swarbrick P A, et al. 1993. Assignment of five polymorphic ovine microsatellites to bovine syntenic groups. *Anim Genet*, 24: 433~436
- Glowatzki M, Mullis M L, Gaillard C, Wigger G, et al. 1995. Microsatellite-based parentage control in cattle. *Anim Genet*, 26: 7~12
- Marklund S, Ellegren H, Eriksson S, et al. 1994. Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. *Anim Genet*, 25: 19~23
- Redaelli L, Zhang Y, Castiglioni B, et al. 1996. Characterization and mapping of three bovine polymorphic microsatellite loci. *Anim Genet*, 27: 121
- Robic A, Parron JL, Yerle M, et al. 1995. Pig microsatellite isolated from cosmids revealing polymorphism and localized on chromosome. *Anim Genet*, 26: 1~6
- Ron M, Band M, Wyler A, et al. 1993. Unequivocal determination of sire allele origin for mutiallelic microsatellites when only the sire and progeny are genotyped. *Anim Genet*, 24: 171~176
- Ron M, Band M, y anai A, et al. 1994. Mapping quantitative trait loci with DNA microsatellite in a commercial dairy cattle. *Anim Genet*, 25: 259~264
- Steffen P, Eggen A, Dietz A B, et al. 1993. Isolation and mapping of polymorphic minisatellites in cattle. *Anim Genet*, 24: 121~124
- Talbot J, Haigh J, Plante Y. 1996. A parentage evaluation test in North American Elk (Wapiti) using microsatellites of ovine and bovine origin. *Anim Genet*, 27: 117~119
- Usha A P, Simpson S P, Williams J L. 1995. Probability of random sire exclusion using microsatellite markers for parentage verification. *Anim Genet*, 26: 155~161

SILVER STAINING METHOD FOR MICROSATELLITE POLYMORPHISM OF THE DOMESTIC ANIMALS

Zhang Xiquan Liu Jingshun Wu Xianhua

(Dept. Anim. Sci., South China Agric. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

For the purpose of founding the staining methods for revealing microsatellite polymorphism of domestic animals, PCR amplification was carried out with 5 pairs of microsatellite primers using genomic DNA of native chicken breeds as templates. Amplified products were separated by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. Comparing EB staining with silver staining, it was thought that silver staining was an available and safety method.

Key words microsatellite polymorphism; silver staining