

猪的基因图谱及数量性状位点定位*

苏玉虹 熊远著

(华中农业大学畜牧兽医学院 武汉 430070)

摘要:在人类基因组计划的带动下,猪的遗传连锁图谱和细胞遗传学图谱有了较大的进步。利用目前猪基因组图谱的研究成果,通过基因组扫描法和候选基因法,可以对猪重要经济性状的主效基因位点进行区域定位,进而图位克隆,找到主效基因,为现代遗传育种奠定理论基础。

关键词:猪;基因图谱;数量性状位点

中图分类号:Q953.3 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2001)01-55-04

Genome Map in the Pig and Quantitative Trait Loci Mapping

SU Yu-Hong XIONG Yuan-Zhu

(Huazhong Agricultural University Wuhan 430070, China)

Abstract: The progress in human genome research and DNA marker technology have led to a great improvement in the swine genetic linkage map and cytogenetic map. Genome scanning and candidate genes were two methods in localization of important quantitative trait loci (QTL) in swine. After the localization of QTL, major genes affecting economic traits should be acquired by positional cloning and utilized as marker-assisted selection in swine breeding.

Key words: Swine; Genome map; Quantitative trait loci

在数量遗传学理论指导下,家畜的遗传改良工作取得很大的成就。家畜的绝大多数性状属于数量性状,是由多基因决定,其中存在主效基因(major gene,遗传效应大于一个表型标准差的基因)。经典育种程序是整基因组杂交,独立分配和重组来产生有利重组体,并从许多分离群体中将其鉴定出来。许多情况下,无法区别影响重要性状的各个基因座位,在育种中不能单独操纵它们,限制了遗传改良的效率。现代遗传改良计划一般是针对现有品种的一个或多个有缺陷的性状,因此需要鉴别与缺陷性状的理想表现型有关的等位基因,并将这些基因导入该品种中。数量性状基因的难以寻踪也给其基因克隆及其在遗传工程计划中的利用造成巨大问题^[1]。随着人类及小鼠基因组的深入研究,带动了家畜基因组的研究和利用,从而可以找到与数量性状位点(quantitative trait loci, QTL)连锁的标记DNA或位点本身,估计各个位点对表型的贡献值及相互关系,进而对位点进行克隆和测序,识别和鉴定特定

功能的基因。通过基因型的识别,直接选择和影响个体的基因组,排除或尽量降低环境的影响,达到高产和优质。

1 猪的基因组图谱

基因组图谱是将基因在染色体上的分布状态、排列顺序等综合一起而绘成。基因组研究应包括:遗传图谱、物理图谱、转录图谱及基因的识别与鉴定。最终弄清整个基因组结构和功能。自90年代家畜基因定位计划实施以来,已建立了牛、猪、羊、马等动物基本的基因组图谱。猪的基因组图谱研究远不如人和小鼠的图谱,根据制作方法大体分为遗传图谱和物理图谱,少

* 国家“973”(G2000016105)资助项目;

第一作者介绍 苏玉虹,女,34岁,副教授,博士;研究方向:动物遗传育种;E-mail:hzaswin@public.wh.hb.cn

收稿日期:1999-07-14,修回日期:2000-09-13

数基因已明确染色体上的位置, DNA 序列和表达序列标签(expressed sequence tag, EST)。现已知猪的遗传图谱上已有大约 1 800 个基因和标记位点, 物理图谱上有 600 多个基因和标记^[2]。

1.1 遗传连锁图谱(genetic map) 即通过遗传重组所得到的基因线性排列图。它是基因组研究的基础, 反映了遗传标记与少数功能基因之间的相对关系。主要是利用基因多态性位点和多态性遗传标记(微卫星 SSR, 限制性片段长度多态性 RFLP, 小卫星和单核苷酸多态性 SNP 等), 对参考家系进行遗传连锁分析而获得。遗传连锁群中 DNA 标记的数量、分布状态和杂合度会影响遗传图谱的应用。遗传标记间的距离用厘摩(cM)表示, 1 cM 即 1% 摩尔根(M)。M 是遗传重组率(交换率) r 的函数, 1 cM 所含的 DNA 分子序列长度随物种及染色体部位等而异, 平均而言, 人类的 1 cM 约为 100×10^4 碱基对(bp), 小鼠约为 180×10^4 bp。M 是加性的, r 是非加性的(重组频率介于 0 到 0.5 之间。当 r 为 0 时, 表示两基因位于染色体上的同一位置; 当 r 为 0.5 时, 表示两基因互不连锁), 遗传试验测定的是 r , 而构建图谱要用 M, 因而 M 和 r 经常要互相转换。其转换公式有二种, 其中 Kasambi 公式在遗传学研究中应用得比较广泛^[3]。

理论上, 任何性状的基因座位均可以在遗传图谱中找到与之相连锁的 DNA 标记。在已定位猪基因图谱中, 遗传图谱上的座位约占 3/4, 超过 1 500 个^[4], DNA 标记间的平均距离大约是 2.0~2.5 cM, 基因组性别平均遗传总长度是 2 300 cM, 远低于以前估计的 3 000 cM。

构建遗传图谱多采用家系分析定位。它包含性连锁, 基因-染色体连锁, 基因-基因连锁以及连锁不平衡分析定位, 这些方法多是依赖于在家畜中自然发生的特定的连锁。根据遗传作图的需要, 可以有目的地组建参考家系。即根据遗传材料之间的多态性, 选择亲缘关系远而多态性高的品种作为亲本, 使 F_1 具高杂合度, F_1 横交获得 F_2 , 或 F_1 回交获得 BC_1 , 得到大量遗传标记处于分离状态的分离群体。无论多态性丰富或不丰富的基因或标记均可进行连锁分析^[5]。在猪基因定位计划中, 欧洲 PiGMaP、美国 USDA-MARC、瑞典的 Scandinavia 等构建猪遗传图的组织, 均有自己独特的参考家系并各自构建了猪的遗传连锁图谱^[6~8]。不同研究小组所用标记和参考家系不同, 导致图谱差异很大。从 1994 年开始, PiGMaP、USDA-MARC 和 Scandinavia 分别对其它研究组的部分标记在自己参考家系中进行重复定位, 并对图谱进行了整合。虽然不同作图组织

的大多数标记在染色体上的位置和顺序是一致的, 但在图距长度和某些位点的顺序仍存在差异。

1.2 物理图谱(physical map) 即用遗传重组以外的基因定位方法所得到的基因线性排列图。它是以已定位的 DNA 序列标签位点(sequence-tagged sites, STS)为路标, 以 DNA 的实际长度 bp、kb、mb 为图距的基因图谱, 显示染色体上基因的绝对位置关系, 图谱上的距离反映 DNA 的碱基数。染色体图谱(或称细胞遗传学图谱)是精度低的物理图谱, 直接表明染色体标本上基因的位置, 用染色体带型表示。一般以生命机能不可缺少的、变异少的有功能基因为对象形成的图谱^[9]。猪物理图谱的研究旨在将被克隆基因或 DNA 标记精确地定位于染色体上, 对于位置克隆经济性状基因和研究物种进化起着十分关键的作用^[4]。制作物理图谱多采用原位杂交、体细胞杂交和 DNA 序列比较定位等方法。

1.2.1 染色体原位杂交(*in situ* hybridization, ISH)

原位杂交是家畜中应用最广泛的基因区域定位方法。利用带放射性或非放射性标记的探针, 如克隆的基因或标记, 或特异的 mRNA, 与载玻片上染色体 DNA 杂交即可定位。非放射性原位杂交中以荧光原位杂交(FISH)应用最广泛。随着 PCR 技术的广泛应用, 衍生了二种新的原位杂交法——直接原位单拷贝 PCR(DISC-PCR)和染色体引物原位标记(PRINS)技术。李宁等应用荧光原位杂交的技术, 将猪的肌红蛋白基因定位于 5 号染色体短臂 1 区 5 带至末端^[10]。染色体原位杂交具有简便、直观的优点, 已在猪的基因作图中显示其优越性, 未来将会得到更大的加强。

1.2.2 体细胞杂交(somatic cell hybridization) 亲缘关系较远的动物或植物组织融合后, 常会出现染色体丢失现象, 往往是某一方染色体容易丢失, 仅保留一条或几条染色体。如人-鼠杂种细胞, 猪-鼠杂种细胞, 常专一性丢失人或猪染色体。通过检测某一表型特点在各杂种细胞出现与否可将其基因定位于特定染色体上, 这种定位方法叫体细胞杂交法。通常要构建克隆分布板(clone panel), 即一套杂种细胞克隆(如猪/鼠)。它由若干杂种细胞克隆构成, 每个细胞克隆都包含各自不同的猪染色体或片段的组合模式。若对某表型进行定位, 可分析细胞克隆有关产物的有无, 确定所在的染色体或片段; 若对基因或标记进行物理定位, 用探针与不同的杂种细胞克隆杂交, 或用引物对其扩增, 就可定位。体细胞杂交的缺点是显而易见的, 只能对基因进行粗略的定位, 不知道与其它基因或标记间的物理关系。但可以发现新的基因或标记的粗略位置, 也可

以验证染色体原位杂交的结果。Gerbens 等人应用猪-鼠细胞杂交克隆板,用猪特异序列 PCR 方法将心脏脂肪酸结合蛋白(H-FABP)定位于 6 号染色体,脂肪组织脂肪酸结合蛋白(A-FABP)定位于 4 号染色体^[11,12]。

1.2.3 比较定位 DNA 序列(comparative genomics)

即通过比较基因组分析来定位新的基因。作为哺乳类动物来说,它们均来自共同的祖先,经过几百万年的进化仍然保留基因组某些相同的片段。1996 年国际上成立了第一个比较基因组工作组^[13]。对基因组进行比较时,常以人类和小鼠的基因图谱为中心,运用常规的分子细胞遗传学方法,或者是用可能有的基因图谱数据来进行比较。到目前为止人和小鼠的图谱是(而且还将是)哺乳类中研究最充分、基因数和标记数最多的图谱。而参与其它哺乳类图谱研究的实验室和科研资金的投入相对而言要少得多^[14],但是其基因作图可以利用这两种图谱巨大的信息资源。为了寻找控制家畜动物的候选基因,可以采取不同的水平来比较定位,即粗略的染色体定位到图谱定位^[15]。最近几年常用的方法叫动物荧光原位杂交(Zoo-FISH)或杂交物种的染色体绘画(cross species chromosome painting)^[16]。

Zoo-FISH 常用人染色体特异文库(chromosome-specific libraries, CSLs)做探针来探索其它物种中同源片段。用这种方法可知猪的 7 号和 1 号染色体与人的 6 号有较大的同源片断,与人 14、15 号有连续保守的同线性^[14]。用比较基因图谱,有目的地寻找已知的其它物种特定染色体片断上的候选基因,协助去克隆 QTL。Lyons 和 Lee 等运用人和猪间保守的 CATS(comparative anchor tagged sequence)引物对猪的染色体进行扩增和测序,结果显示可以在猪上定位同一基因并且和人的基因顺序高度同源^[17,18]。

1.3 图谱的整合 遗传、物理和细胞遗传学图谱分别是用不同的方法构建的,只有当它们结合在一起时才能最有效地发挥作用。由于染色体不同区域螺旋化程度的差异使得遗传距离和物理距离的转换存在很多问题。序列标记位点(STS)是一种被广泛用于连接遗传和物理图谱的标记,它是基因组 DNA 序列的一个片段,仅在基因组中出现一次。包含多态性简单序列重复(polymorphic simple sequence repeats)的 STS 是遗传连锁图谱的极好标记;而来自基因序列的 STS,如 ESTs,则是在物理图谱上定位基因的快速途径。STS 作为关键性的标记,用于构建各种哺乳动物图谱,包括遗传连锁图谱、缺失图谱(deletion map)、YAC 克隆图谱(YAC clone map)和放射性杂交图谱(radiation hybrid map)^[19]。猪的综合基因组图谱已经构建,是由 South-

ern 杂交、遗传连锁图谱、细胞遗传学图谱和物理图谱综合而成^[6-8]。

1.4 遗传标记(genetic markers) 遗传标记是由遗传控制,用作遗传分析的表型差异。包括形态学标记、细胞遗传学标记、生物化学和免疫学标记等。把 DNA 片段作为一种遗传标记称为分子标记。分子标记由于其优点而被广泛应用^[20]。用于构建基因组图谱的遗传标记可分为二类。I 型标记主要是 RFLP,由编码基因和结构基因位点组成。位点变异小,是进化保守基因序列。用原位杂交可进行细胞遗传学定位。通过分子遗传分析技术(RFLP,测序等)检测出的 DNA 变异可为体细胞遗传学提供有用的种间变异,或用于比较做图。II 型标记主要由高度变异的重复序列构成,用来标记 DNA 的基因(结构基因)位置(相对关系),散布在基因非编码区。II 型标记在物种内有信息,物种间意义不大。需要通过群体的杂交,然后分析 2~3 个世代中这些 DNA 重复片段的传递行为,即由标记的传递规律来确定与它们伴生的结构基因间的相对位置关系。目前使用最广泛的是微卫星标记^[21]。

研究结果表明,哺乳动物中 I 型位点仅占基因组 10% 左右,其余均为 II 型位点。将 II 型标记位点和其所标记的重要经济性状在遗传图上结合定位,可进行标记辅助选择,及发现结构基因和功能基因。

2 基因图谱的利用——QTL 定位

动物遗传育种集中研究的领域是基因组学(genetics)和胚胎学。现有的各种分子克隆方法对家畜 QTL 的研究有很大的局限性,定位克隆技术(positional cloning)或称为以图谱为基础的基因克隆(map-based gene cloning),在分离未知产物的基因方面有着更为广阔的前景。其前提是 QTL 定位,然后以紧密连锁的分子标记为起点,通过染色体步行,逐渐向目标基因靠近,最终克隆基因。QTL 定位包括两种主要的方法。

2.1 候选基因法(candidate gene) 基于生理生化和免疫学、内分泌学的证据,确定某些功能基因可能会引起某一性状的变异,这些基因即作为候选基因。在资源家系中对候选基因的多态性进行分型,并进一步确定对表型性状的作用。也可以应用其它物种中已发现的基因作为猪的候选基因。在对猪的研究中,用候选基因的方法,确定了雌激素受体基因[ESR]是影响猪繁殖性状的主效基因^[22]; 兰尼定受体基因[Hal]是影响猪应激敏感综合症的主效基因^[23]。Gerbens 等将 A-FABP 作为猪肌肉脂肪的候选基因,发现在杜洛克猪群中 A-FABP 和肌肉脂肪呈显著相关^[12]。

候选基因法的关键是准确地选择基因。随着基因位点的功能和表达知识的增加,可以确认候选基因的能力也在增加。在检测 QTL 过程中将会越来越多地包含候选基因。即使不先确定候选基因,连锁遗传的最终目的是发现控制数量性状的真正位点^[24]。

2.2 基因组扫描法(genome scanning) 确定 QTL 更系统的方法是基因组扫描,它可以确定作用于重要经济性状的所有主效位点,甚至是中等作用的位点。

已构建的猪基因图谱使得对整个基因组扫描成为可能。常规的方法是对具不同性状的品系、品种甚至物种进行杂交,然后确定影响父母代不同的染色体区域,这样能够最大限度地利用和发现主要 QTL。QTL 扫描需要二个条件,一是从充分大的群体中获得表型数据,另一方面需要覆盖全基因组,间隔 20~30 cM 的标记基因型。一旦 QTL 区域被确定,需进一步缩小 QTL 定位区域。从短期效应来说,和 QTL 紧密连锁的遗传标记可以在育种选择计划中加以运用,更快和更准确地提高与目的 QTL 紧密相连的等位基因频率。从长期效应来说,可用于位置克隆和基因分析。目前应用 DNA 标记(尤其是微卫星)进行 QTL 定位研究比较多,如 de Koning 等采用 123 个微卫星标记对梅山猪与荷兰猪杂交所产生的 F2 代进行全基因组扫描,发现背膘厚度和 7、2、1 和 6 号染色体有关,而肌肉脂肪(IMF)基因可能和 2、4、6 和 7 号染色体相关^[25]。

3 讨论

猪的基因定位工作已取得巨大成就,猪基因图谱的饱和度日趋增加,足以进行各类 QTL 及其标记的定位研究工作。但若用于标记辅助选择(MAS)和定位克隆 QTL,则很多部位的标记间隔仍过大,难以完成上述任务。由于构建遗传图所需参考家系投资大,多态信息含量低,遗传图距精度往往只能达到 1 cM,所以需要采用其它途径,如单精子分型(single sperm typing)技术^[26]使图距达 0.1 cM 甚至更小。猪的 QTL 定位是一块待开垦的土地,也是快速改良并育成理想猪种的最有效途径,国家之间,各育种公司之间竞争非常激烈。应该看到的是,虽然我国有丰富的猪种资源,猪的遗传育种研究已经达到或接近世界前沿,但资源家系的构建和维持以及 QTL 定位需要庞大资金的投入。因此,要改良我国的猪品种,满足人们对猪肉生产的需要,迫切希望全社会予以重视,增强研究工作的发展后劲。

参 考 文 献

[1] 徐云碧,朱立煌主编. 分子数量遗传学. 北京:中国农业

出版社,1994. 190~206.

- [2] Rothschild, M. F. Identification of quantitative trait loci and interesting candidate genes in the pig: progress and prospects. *Proceeding of 6th World Congress Genetic Applied in Livestock Production*, 1998, **26**:403~409.
- [3] Rothchild, M. F., A. Ruvinsky eds. The Genetics of the Pig. CAB International, 1998, Volume 4:273~279.
- [4] Visscher, P. M., C. S. Haley. Strategies for marker-assisted selection in pig breeding programmes. *Proceeding of 6th World Congress Genetic Applied in Livestock Production*, 1998, **23**:503~510.
- [5] White, R., L. M. Bishop, J. Barker *et al.* Construction of linkage maps with DNA markers for human chromosomes. *Nature*, 1985, **313**:101~105.
- [6] Rohrer, G. A., J. A. Leeson, Z. Hu *et al.* A comprehensive map of the porcine genome. *Genome Research*, 1996, **6**:371~391.
- [7] Archibald, A. L., C. S. Haley, J. F. Brown *et al.* The PiGMap consortium linkage map of the pig (*Sus scrofa*). *Mammalian Genome*, 1995, **6**:157~175.
- [8] Marklund, L., M. J. Moller, B. Hoyheim *et al.* A comprehensive linkage map of the pig based on a wild pig-Large White intercross. *Animal Genetics*, 1996, **27**: 155~169.
- [9] 三上仁志(齐景文译). 猪染色体解析研究现状和展望. 国外畜牧科技, 1998, **25**:30~31.
- [10] 李宁,吴常信. 定位猪肌红蛋白于染色体 5p15-pter. 遗传学报, 1998, **25**:120~122.
- [11] Gerbens, F., G. Rettenberger, J. A. Lenstra *et al.* Characterization, chromosomal localization, and genetic variation of the porcine heart fatty acid-binding protein gene. *Mammalian Genome*, 1997, **8**:328~332.
- [12] Gerbens, F., A. Jansen, A. J. van Erp *et al.* The adipocyte fatty acid-binding protein locus: characterization and association with intramuscular fat content in pig. *Mammalian Genome*, 1998, **9**: 1022~1026.
- [13] Comparative genome organization. First international workshop on comparative genome organization. *Mammalian Genome*, 1996, **7**: 717~734.
- [14] Chowdhary, B. P., T. Raudsepp, L. Fronicke *et al.* Emerging patterns of comparative genome organization in some mammalian species as revealed by Zoo-FISH. *Genome Research*, 1998, **8**:577~589.
- [15] Georges, M., L. Andersson. Livestock genomics comes of age. *Genome Research*, 1996, **6**:907~921.
- [16] Scherthan, H., T. Cremer, U. Arnason *et al.* Comparative chromosome painting discloses homo-logous segments

- in distantly related mammals. *Nature Genet*, 1994, **6**: 342~347.
- [17] Lyons, L. A., T. F. Laughlin, N. G. Copeland *et al.* Comparative anchor tagged sequences (CATS) for integrative mapping of mammalian genomes. *Nature Genet*, 1997, **15**:47~56.
- [18] Lee, J. H., Y. Chen, L. A. Lyons *et al.* Use of comparative anchor tagged sequences(CATS) makers from human chromosomes 20 and 22 in pig gene mapping. *Proceeding of 6th World Congress Genetic Applied in Livestock Production*, 1998, **26**:475~477.
- [19] Birren, B., E. D. Green, S. Klapholz *et al.* eds. *Genome Analysis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999. Volume 4:187~189.
- [20] 吴桢芳,熊远著,邓昌彦. 猪 HSL 基因 PCR-RFLP 多态性研究. 华中农业大学学报, 2000, **19**:10~22.
- [21] 吴登俊,马丁. 费尔斯特. 家畜基因组遗传多态标记——微卫星标记研究进展(上). 国外畜牧科技, 1999, **26**(1): 33~35.
- [22] Rothschild, M., C. Jacobson, D. Vaske *et al.* The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, **93**:201~205.
- [23] Fujli, J., K. Otsu, F. Zorzto *et al.* Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Scinece*, 1991, **253**:448~451.
- [24] Templeton, A. R. Linkage mapping versus the candidate gene approach. *Proceeding of 6th World Congress Genetic Applied in Livestock Production*, 1998, **26**:175~182.
- [25] de Koning, D. S., L. L. G. Janss, J. A. M. van Arendonk *et al.* Detection of quantitative trait loci for backfat thickness and intramuscular fat content in pigs (*Sus scrofa*). *Genetics*, 1999, **152**:1 679~1 690.
- [26] 赵书红,李奎,臧福云等. 猪单个精子单倍型分析方法研究. 遗传学报, 1999, **26**:35~40.