

利用微卫星标记对种公牛进行个体识别鉴定

李倩倩^① 李莲^① 李慧^② 蒋小强^① 陆汉希^② 王根林^{①*}

① 南京农业大学动物科技学院 南京 210095; ② 农业部牛冷冻精液质量监督检验测试中心 南京 210095

摘要: 利用 17 个微卫星标记及其荧光标记引物扩增短片段串联重复序列 (STR), 并通过全自动基因分析仪检测基因型, 识别和鉴定了中国荷斯坦种公牛 (*Bos taurus*) 的冷冻精液。只允许 1 个位点有错配作为判别标准, 对牛冷冻精液进行个体识别鉴定。结果表明, 实验采用的 17 个微卫星座位的遗传多样性均较高, 累积个体识别能力达 99.99%, 累积偶合率是 9.74×10^{-10} , 17 个微卫星位点适用于牛的个体识别鉴定。

关键词: 种公牛; 微卫星; 个体识别

中图分类号: Q953 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2013)03-371-06

Individual Identification of Bulls Based on Microsatellite Markers

LI Qian-Qian^① LI Lian^① LI Hui^② JIANG Xiao-Qiang^① LU Han-Xi^② WANG Gen-Lin^{①*}

① *College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095;*

② *Bovine Frozen Semen Quality Supervision Testing Centre, Agricultural Ministry of China, Nanjing 210095, China*

Abstract: Short tandem repeat (STR) was amplified with fluorescence labeled primers of 17 microsatellite loci and Genetic Analyzer (ABI 3130xl) was used to separate and analyze the genotypes of the amplified products. The individual identification of Bulls (*Bos taurus*) was conducted with the standard that only one locus mismatch was permitted. The results showed that all the 17 microsatellite loci had high genetic polymorphisms, the probability of matching was 9.74×10^{-10} , and the cumulate discrimination power was 99.99%. This study suggests that the 17 microsatellites may be used in the bull individual identification.

Key words: Bull (*Bos taurus*); Microsatellite; Individual identification

随着我国畜牧业集约化的发展, 以及冷冻精液和人工授精技术的日益普及, 优良种公牛 (*Bos taurus*) 精液在生产中起着举足轻重的作用。对优良种公牛进行个体识别, 以及对牛冷冻精液的检测是保证育种工作进展的关键。然而在种公牛冷冻精液生产和质量检测实践中, 易发生冷冻精液细管标号模糊、漏标、同一头牛多种编号等现象。因此, 对于种公牛每一批次的冷冻精液都需要进行 DNA 分析, 检测与其血液样品的遗传一致性, 从而避免冻精个体编号信息错误。

微卫星, 又称短片段串联重复序列 (short tandem repeats, STR), 均匀分布于真核生物基因组中, 具有高度遗传多态性, 遵循孟德尔遗传

规律 (张云武等 2001), 在牛亲缘鉴定中被广泛接受和应用 (田菲等 2008)。近年来, 国内外关于微卫星标记应用于牛亲缘关系鉴定的研究比较多 (Ron et al. 2003, 宋玲等 2011, 杨超等 2011), 他们分别利用不同数量的 STR 位点, 探索了适用于牛亲缘鉴定的微卫星标记, 目前, 亲缘关系检测技术及微卫星等位基因分型的方法

基金项目 “十二五”国家科技计划课题 (No. 2011BAD28B02, 2012BAD12B10) 和江苏省农业三新工程课题 (No. SX2011-189, SXGC[2012]394)

* 通讯作者, E-mail: glwang@njau.edu.cn;

第一作者介绍 李倩倩, 女, 硕士研究生; 研究方向: 动物生殖生理及调控; E-mail: 2010105037@njau.edu.cn。

收稿日期: 2012-10-16, 修回日期: 2013-01-05

都没有实现标准化,且在实践中的应用也不多。本实验采用 17 个微卫星基因座,检测了 18 头种公牛的冷冻精液与其血液样品的遗传一致性,探讨了适用于中国荷斯坦种公牛 (*Bos taurus*) 的微卫星标记,建立了简单实用的牛个体识别检测技术,以用于人工授精种公牛的精液身份识别,为牛的选种、选配提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 实验样本 从某公牛站选取 18 头荷斯坦种公牛,颈静脉采血 10 ml/头, -20℃ 冰箱中保存备用。同时从农业部牛冷冻精液质量监督检

验测试中心(南京)采集对应牛的冻精。

1.2 基因组 DNA 准备 采用苯酚-氯仿法分别提取血液和精液的基因组 DNA,提取的 DNA 首先经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测合格,然后用生物分光光度计将其浓度调整为 100 mg/L 左右,进行 PCR 扩增。

1.3 微卫星标记的选择 引物序列参考联合国粮农组织 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) 和国际动物遗传学会 (The International Society of Animal Genetic, ISAG) 的推荐引物,选择了 17 个微卫星标记,标记的信息见表 1。

表 1 用于遗传标记的微卫星引物

Table 1 The objective STR and their primer sequences

基因座 Loci	染色体 Chromosome	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')	退火温(℃) Temperature	片段长度 Size (bp)
<i>CSRM60</i>	10	F: AAGATGTGATCCAAGAGAGAGGA R: AGGACCAGATCGTGAAGGCATG	62	79 ~ 115
<i>BM1824</i>	1	F: GAGCAAGGTGTTTTTCCAATC R: CATTCTCCAACCTGCTTCCTG	62	176 ~ 197
<i>ETH10</i>	5	F: GTTCAGGACTGGCCCTGCTAACA R: CCTCCAGCCCACTTTCTTCTC	62	207 ~ 231
<i>SPS115</i>	15	F: AAAGTGACACAACAGCTTCTCCAG R: AACGAGTGTCTAGTTTGCTGTG	62	234 ~ 258
<i>BM2113</i>	2	F: ATGGTGCTGCCTTCTACCAA R: TCCCAGATCAATCCAAGAGG	60	122 ~ 168
<i>ETH225</i>	9	F: GATCACCTTGCCACTATTTCCCT R: ACATGACAGCCAGCTGCTACT	60	131 ~ 159
<i>ILSTS006</i>	7	F: TGTCTGATTTCTGCTGTGG R: ACACGGAAGCGATCTAAACG	60	277 ~ 309
<i>BM1818</i>	23	F: AGCTGGGAATATAACCAAAGG R: AGTGCTTTCAAGGTCCATGC	57	248 ~ 278
<i>TGLA53</i>	16	F: GCTTTCAGAAATAGTTTGCAATCA R: ATCTTCACATGATATTACAGCAGA	60	143 ~ 191
<i>INRA023</i>	3	F: GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC R: TAACTACAGGGTGTAGATGAAC	60	195 ~ 225
<i>TGLA122</i>	21	F: CCCTCCTCCAGGTAATCAGC R: AATCACATGCCAAATAAGTACATAC	56	136 ~ 184
<i>TGLA126</i>	20	F: CTAATTTAGAATGAGAGAGGCTTCT R: TTGGTCTCTATTCTCTGAATATTCC	53	115 ~ 131
<i>ETH3</i>	19	F: GAACCTGCCTCTCTGCATTGG R: ACTCTGCCTGTGGCCAAGTAGG	59	103 ~ 148
<i>MCM158</i>	Y	F: TTCCTCTGAGTCTCTGACAC R: CCGAGATTGAAATGTAATGAG	56	112 ~ 148
<i>MAF45</i>	Y	F: ATTGACACTTCAGTAAGTTA R: CAGACACAACCTGAGCAACTAGC	56	122 ~ 142
<i>UMN0108</i>	Y	F: GATCCATCCACATTGCTCCA R: CCAAGCGTCCATCAATTTAC	64	158 ~ 209
<i>UMN0929</i>	Y	F: ACCAGCTGATACACAAGTGC R: GGTGAGAAATGAAACAGAG	58	174 ~ 196

1.4 微卫星标记判型 荧光引物 PCR 扩增体系为 25 μ l,其中 DNA 模板 100 ~ 200 ng,引物终浓度为 1 pmol/L。扩增的条件为,94 $^{\circ}$ C 变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 40 s,57 ~ 62 $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 后延伸 10 min。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳检测,PCR 产物、去离子甲酰胺和 TAMRA 内标按 0.5:10:0.5 比例混合,95 $^{\circ}$ C 变性 5 min,ABI 3130xl 自动测序仪测序分型,用 CERVUS 3.0 软件完成基因型判定。

1.5 统计分析 对冻精和血样 DNA 进行基因型的对比分析,假设有 2 个位点及以上位点有差异,则判定冻精不是来自种公牛自身。群体内遗传多态性分析,依据 ABI 3130xl 自动遗传分析仪结果,采用 CERVUS3.0 计算等位基因数 (alleles, A)、观察杂合度 (observed heterozygosity, H_o)、期望杂合度 (expected heterozygosity, H_e)、多态信息含量 (polymorphism information content, PIC)、偶合率 (probability of matching, PM)、个体识别力 (discrimination power, DP)、累积个体识别力 (cumulate discrimination power, CDP)。

杂合度 (H) 使用公式 $H = 2n(1 - \sum_{i=1}^n P_i^2)/(2n - 1)$ 进行计算,式中, P_i 为某个微卫星标记位点第 i 个基因型的频率, n 为个体数。

多态信息含量 (PIC) 使用公式 $PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2 P_i P_j$ 进行计算, P_i 和 P_j 分别为第 i 个和 j 等位基因在群体中的频率, n 为等位基因个数。

偶合概率 (PM) 是指群体中随机抽取 2 个无关个体,在特定位点二者的基因型纯粹由于机会一致的几率,匹配概率为各基因型的平方和。计算公式为: $PM = \sum_{i=1}^m P_i^2$, 式中, P_i 表示某一基因座位第 i 个基因型的频率, m 代表这一座位上的等位基因型数。

个体识别力 (DP) 采用公式 $DP = 1 - \sum_{i=1}^m P_i^2$ 计算,式中, P_i 表示某一基因座位第 i 个

基因型的频率, m 代表这一座位上的等位基因型数。

累积个体识别力 (CDP) 采用公式 $CDP = 1 - \sum_{i=1}^m (1 - DP_i)$ 计算,式中, DP_i 和 m 分别为个体识别力和等位基因型数。

2 结果与分析

2.1 微卫星基因座等位基因频率分布 本实验分析了 18 份冻精和 18 头种公牛血样的基因型,各引物在个体中均检测出目的条带。17 个座位均表现出一定的多态性,17 个微卫星座位共检测到 109 个等位基因,平均每个座位为 6.47 个, $TGLA122$ 和 $MCM158$ 座位的等位基因数最多,有 9 个, $BM1818$ 座位的等位基因数最少,只有 4 个。

2.2 17 个微卫星基因座位的遗传多态性分析

表 2 计算了 17 个微卫星座位上的等位基因频率统计结果,及各基因座的期望杂合度、观察杂合度、及多态信息含量。17 个微卫星座位中 $TGLA122$ 座位的多态性最高,为 0.807 8, $BM1818$ 座位的多态信息含量最低,为 0.504 4。平均多态信息含量为 0.691 5,说明中国荷斯坦种公牛遗传多样性相对丰富,具有一定的选择潜力。各位点期望杂合度的变化范围是 0.591 5 ~ 0.944 4,观察杂合度的变化范围是 0.388 9 ~ 0.944 4。

2.3 各位点对个体识别的评价 根据 17 个微卫星位点等位基因的频率,计算各位点的个体识别能力及累计个体识别能力(表 2)。17 个微卫星位点的个体识别能力在 0.747 4 ~ 0.932 6 之间,其中, $TGLA53$ 位点的个体识别能力最强,为 0.932 6; $BM1818$ 位点个体识别能力最小,只有 0.747 4。由此可见, $TGLA53$ 位点在种公牛个体识别中的作用最大, $BM1818$ 在种公牛个体识别中的作用最小。对单个微卫星位点来说,其遗传标记的多态性越高,个体识别能力越强,反之则个体识别能力差。通过 CERVUS 3.0 软件分析,17 个位点的累计个体识别能力为 99.99%。

表 2 17 个微卫星座位的信息

Table 2 Seventeen microsatellites loci information

座位 Loci	等位基因数 Alleles	多态信息含量 PIC Polymorphism information content	期望杂合度 H_e Expected heterozygosity	观察杂合度 H_o Observed heterozygosity	个体识别力 DP Discrimination power
CSRM60	7	0.702 0	0.748 0	0.666 7	0.895 5
BM1824	5	0.588 1	0.666 7	0.655 7	0.816 6
ETH10	5	0.555 9	0.628 7	0.805 6	0.791 5
SPS115	7	0.716 2	0.755 9	0.777 8	0.905 9
BM2113	7	0.664 0	0.703 8	0.750 0	0.876 4
ETH225	8	0.658 0	0.714 4	0.916 7	0.866 2
ILSTS006	5	0.706 6	0.760 6	0.777 8	0.894 1
BM1818	4	0.504 4	0.591 5	0.388 9	0.747 4
TGLA53	6	0.775 2	0.815 7	0.888 9	0.932 6
INRA023	6	0.692 5	0.744 9	0.888 9	0.887 5
TGLA122	9	0.807 8	0.838 0	0.722 2	0.951 2
TGLA126	6	0.660 9	0.716 4	0.944 4	0.868 2
ETH3	8	0.823 9	0.944 4	0.854 5	0.956 5
MCM158	9	0.749 0	0.788 3	0.750 0	0.887 6
MAF45	6	0.740 3	0.786 0	0.666 7	0.914 6
UMN0108	6	0.693 0	0.745 7	0.777 8	0.887 6
UMN0929	6	0.717 8	0.765 6	0.722 2	0.902 7
平均数 Average	6.47	0.691 5	0.742 0	0.762 1	
累积个体识别力 Accumulate DP					0.999 9

2.4 鉴定结果 微卫星 PCR 过程中易发生滑动,导致扩增序列缩短 1~2 个重复单位,称此片段为影子带。此外,杂合子还经常出现等位基因差异扩增,即较小的等位基因优先扩增,引起片段较长的等位基因电泳检测峰值要低(初芹等 2011)。在测序过程中也可能因为人为原因,出现杂峰。因此,微卫星判型时需综合多个个体信息,排除杂峰的干扰。

当候选父亲与子代之间存在至少 2 个位点或至少 10% 的基因型不一样时,就可以排除亲子之间的亲缘关系(Weller et al. 2004)。当判型错误率在 3%~4%,允许有 2 个位点发生错配时,具有较高的正确认定率(Vandeputte et al. 2006)。在亲子鉴定实验中,突变和基因型判型错误是减弱排除法鉴定效力的主要因素。在本次实验中,影响个体识别的主要因素是判型错误。在基于排除法的个体识别鉴定中,允许配对个体之间有 1 个位点存在差异,对个体识别鉴定的成功率尤为关键。

本实验假设有 2 个及 2 个以上的位点基因型不同,则判定精液与牛个体不匹配。在用软件分析时设定只允许出现 1 个错配,因此软件只显示了基因型匹配的牛号。由表 3 可以看出本次实验的 18 头公牛的精液以及 18 头公牛的血样,其中有 17 份精液和 17 份血样的基因型是匹配的,1 份精液不是来自这 18 头测定血样基因型的公牛,错配位点大于 2 个,故在结果中没有显示。推测原因,可能是生产冻精时牛号标记错误或是精液被污染。

3 讨论

基于 PCR 的 STR 分型技术微卫星标记具有高度的灵敏性和可靠性、样品用量少以及快速、稳定等优点,是目前国内外权威机构进行亲子鉴定最常用的方法之一(张阮章等 2002)。微卫星标记方法对于大批量亲子鉴定检测具有快速、准确和经济的优点,对于未来国内发展大规模养殖和繁育具有很重要的意义(钟美明 2010)。

表 3 血样和冻精的基因型对比

Table 3 The genotype comparison of blood and semen

血样 DNA Blood ID	位点 Loci typed	精液 DNA Semen ID	位点数 Loci typed	匹配数 Matching loci	错配数 Mismatching loci	偶合率一 pID	偶合率二 pIDsib	匹配状态 Status
A1	17	J2	17	17	0	7.65×10^{-21}	1.52×10^{-7}	Exact match
A10	17	J7	17	17	0	1.96×10^{-20}	1.63×10^{-7}	Exact match
A12	17	J15	17	17	0	1.22×10^{-15}	1.43×10^{-6}	Exact match
A14	17	J12	17	16	1	0	0	Fuzzy match
A15	17	J11	17	17	0	9.55×10^{-20}	1.60×10^{-7}	Exact match
A16	17	J16	17	17	0	2.75×10^{-17}	5.43×10^{-7}	Exact match
A17	17	J8	17	17	0	1.98×10^{-19}	1.23×10^{-7}	Exact match
A18	17	J5	17	17	0	1.11×10^{-17}	5.30×10^{-7}	Exact match
A19	17	J4	17	17	0	1.85×10^{-17}	4.30×10^{-7}	Exact match
A2	17	J10	17	17	0	7.61×10^{-21}	9.64×10^{-8}	Exact match
A21	17	J19	17	16	1	0	0	Fuzzy match
A22	17	J18	17	16	1	0	0	Fuzzy match
A23	17	J17	17	16	1	0	0	Fuzzy match
A3	17	J9	17	17	0	3.27×10^{-18}	4.03×10^{-7}	Exact match
A4	17	J6	17	17	0	1.08×10^{-20}	1.60×10^{-7}	Exact match
A5	17	J1	17	17	0	2.67×10^{-21}	1.13×10^{-7}	Exact match
A8	17	J13	17	17	0	1.06×10^{-16}	1.07×10^{-6}	Exact match

偶合率一:若 2 基因型完全匹配,一个不相关个体有此基因型的概率;偶合率二:若 2 基因型完全匹配,一个近亲个体有此基因型的概率;Exact match:精确匹配;Fuzzy match:模糊匹配。

pID (personal identification data): If the two genotypes match exactly, this column contains the probability that a single unrelated individual has this genotype; pIDsib (personal identification data sib): If the two genotypes match exactly, this column contains the probability that a single full sibling has this genotype.

王静等(2009)采用美国 ABI 公司试剂盒中 11 个常染色体微卫星位点的复合扩增体系和 3 个 Y 染色体微卫星位点,评估了肉用种公牛的遗传多样性。但是目前用于种公牛个体识别试剂盒在中国还没有自主生产,现有的试剂盒价格相当昂贵,限制了这项个体识别与鉴定工作的开展(赖寿贵等 2012)。单核苷酸多态性标记(single nucleotide polymorphism, SNP)作为一种新兴的分子标记具有数量丰富、遗传稳定、判型错误率低、操作方便、检测自动化的优点,非常适合用于大规模群体的亲子鉴定。随着 SNP 检测成本的降低,在牛亲子鉴定中有取代微卫星标记之势(李东等 2011)。Heaton 等(2002)利用 32 个 SNP 标记实现了对美国安格斯牛群体的亲子鉴定,周磊等(2011)比较微卫星标记和单核苷酸多态标记对奶牛亲子鉴定的效率,单个微卫星标记的推断效率一般要高于单个 SNP 标记,但当 SNP 标记达到一定数目后,其推断效率能够达到甚至超过微卫星标记。

在对人类基因组的研究中,用于法医学个体识别的理想基因座的条件为,PCR 扩增产物片段长度应在 300 bp 以下,等位基因数在 8 ~ 10 个,杂合度在 0.7 以上,个体识别能力在 0.9 以上(胡娜等 2003)。本实验筛选的 17 个微卫星标记 PCR 扩增产物的片段长度在 79 ~ 309 bp 之间,基本符合等位基因数、杂合度、个体识别能力几方面的要求。BM1818 基因座由于等位基因分布相对集中,杂合度和个体识别能力相对较低,没能达到理想的 STR 基因座要求。出现这种现象的原因是,在应用微卫星位点进行个体识别分析时,需要较大数量的无相关个体。本实验的样本中有 17 份精液与血样之间存在亲缘关系,所以在进行基因座遗传多态性分析中,就可能出现等位基因频率分布过于集中,杂合度偏低的现象,对用于个体识别的基因座有影响。尹君等(2007)采用 8 个微卫星标记对东北马鹿(*Cervus elephus xanthopygus*)的个体识别分析时也出现部分基因座个体识别能

力偏低的现象。本实验所用的 17 个微卫星标记,其中 8 个标记属于国际动物遗传学学会 (ISAG) 规定的用于牛亲权鉴定的“国际标记组”,有 4 个位点选自 Y 染色体,累计个体识别能力达到 99.99%,平均观察杂合度为 0.762 1,能够进行个体识别分析。在本研究的基础上,可以增加无相关个体的数量,从而更准确地进行中国荷斯坦种公牛的个体识别鉴定。

参 考 文 献

- Heaton M P, Harhay G P, Bennett G L, et al. 2002. Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in US beef cattle. *Mammalian Genome*, 13(5): 272 - 281.
- Ron M, Domochofsky R, Golik M, et al. 2003. Analysis of vaginal swabs for paternity testing and marker-assisted selection in cattle. *Journal of Dairy Science*, 86(5): 1818 - 1820.
- Vandeputte M, Mauger S, Dupont-Nivet M, et al. 2006. An evaluation of allowing for mismatches as a way to manage genotyping errors in parentage assignment by exclusion. *Molecular Ecology Notes*, 6(1): 265 - 267.
- Weller J I, Feldmesser E, Golik M, et al. 2004. Factors affecting incorrect paternity assignment in the Israeli Holstein population. *Journal of Dairy Science*, 87(8): 2627 - 2640.
- 初芹, 张毅, 孙东晓, 等. 2011. 应用微卫星 DNA 标记分析荷斯坦母牛系谱可靠性及影响因素. *畜牧兽医学报*, 42(2): 163 - 168.
- 胡娜, 熊勇华, 许杨. 2003. PCR-STR 分型技术的研究发展. *国外医学遗传学分册*, 26(6): 319 - 324.
- 赖寿贵, 刘丑生, 何高明, 等. 2012. 种公牛个体识别与鉴定方法研究. *中国畜牧兽医*, 39(1): 159 - 163.
- 李东, 初芹, 王雅春. 2011. 单核苷酸多态性标记在牛亲子鉴定中的应用与展望. *中国畜牧杂志*, 2011, 47(7): 73 - 76.
- 宋玲, 贺建宁, 孙东晓, 等. 2011. 内蒙古地区西门塔尔牛亲子鉴定微卫星标记筛选. *中国畜牧杂志*, 2011, 47(13): 5 - 8.
- 田菲, 孙东晓, 张沅. 2008. 中国荷斯坦牛微卫星亲子鉴定体系的建立. *遗传学报*, 35(5): 279 - 284.
- 王静, 刘丑生, 张利平, 等. 2009. 微卫星在种公牛个体识别与亲缘鉴定方面的应用. *遗传*, 31(3): 285 - 295.
- 杨超, 张毅, 石万海, 等. 2011. 中国荷斯坦种公牛亲子鉴定及个体识别信息库的建立. *中国奶牛*, 2011(16): 1 - 4.
- 尹君, 张明海, 谢绪昌. 2007. STR 在野生东北马鹿个体识别中的应用. *野生动物*, 28(3): 42 - 44.
- 张阮章, 王沙燕, 戴勇, 等. 2002. 用 STR 位点进行亲子鉴定一例报告. *暨南大学学报: 自然科学与医学版*, 23(4): 74 - 75.
- 张云武, 张亚平. 2001. 微卫星及其应用. *动物学研究*, 22(4): 315 - 320.
- 钟美明. 2010. 利用 15 个微卫星位点对荷斯坦奶牛进行亲子鉴定. *山东畜牧兽医*, 31(4): 5 - 8.
- 周磊, 初芹, 刘林, 等. 2011. 利用微卫星和 SNP 标记信息进行奶牛亲子鉴定的模拟研究. *畜牧兽医学报*, 42(2): 169 - 176.