



# 无特定病原体金定鸭微卫星 DNA 遗传多样性分析

赵丽丽<sup>#</sup>, 陆涛峰<sup>#</sup>, 张晓萍, 牛银杰, 陈洪岩<sup>\*</sup>

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室, 哈尔滨 150001)

**【摘要】** 目的 利用微卫星标记对无特定病原体金定鸭群进行遗传多样性分析。方法 采用微卫星标记, 对 SPF 金定鸭种群中 71 个个体进行遗传多样性分析。结果 SPF 金定鸭种群中 17 个位点上共检测到 119 个等位基因, 每个微卫星上等位基因数介于 3 ~ 13; 该 SPF 金定鸭群体中有 13 个位点 ( $PIC > 0.5$ ) 呈现出高度多态, 平均杂合度为  $(0.5816 \pm 0.0142)$ , 其他位点均呈现出中度多态。仅有 5 个位点处于 Hardy-Weinberg 平衡状态, 其余 12 个位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 达到极显著水平 ( $P < 0.01$ )。结论 该 SPF 金定鸭群体内均存在丰富的遗传多样性, 满足建立封闭群的遗传特征, 可以利用该群体继续开展无特定病原体金定鸭封闭群的建立。

**【关键词】** SPF 金定鸭; 遗传多样性; 微卫星标记

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)03-0299-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.016

## Analysis of the DNA genetic diversity in SPF Jinding duck population

ZHAO Li-li, LU Tao-feng, ZHANG Xiao-ping, NIU Yin-jie, CHEN Hong-yan<sup>\*</sup>

(State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute,  
Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), Harbin 150001, China)

**【Abstract】 Objective** To analyze the DNA genetic diversity in SPF Jinding duck population using microsatellite markers. **Methods** The DNA genetic diversity in 71 SPF Jinding ducks were analyzed by microsatellite markers. **Results** A total of 152 alleles were detected at 17 microsatellite loci, and the numbers of alleles at each locus varied from 3 to 13. Thirteen microsatellite loci showed a high level of average PIC values ( $PIC > 0.5$ ), the heterozygosity ( $H$ ) was  $0.5816 \pm 0.0142$ . Other loci showed a middle level of the average PIC values. Only 5 microsatellite loci were in Hardy-Weinberg equilibrium, although 12 microsatellite loci were not in ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** The results revealed that the genetic variabilities in the SPF Jinding duck population are rich, and this population meets to the genetic characteristics of the closed colony animals, so it can be used to establish the closed colony of SPF Jinding duck.

**【Key words】** Jinding duck population; Genetic diversity; Microsatellite DNA

Corresponding author: CHEN Hong-yan, E-mail: chenhongyan@caas.cn.

金定鸭是我国著名的蛋鸭地方品种, 因其产蛋量高、体型小、饲料利用率高、杂交利用效果明显、适应性强等优点而驰名中外<sup>[1-2]</sup>。哈尔滨兽医研究所实验动物中心从国家水禽种质资源基因库江苏省丰达水禽育种场引进祖代金定鸭种卵, 从孵化开始在屏障环境下进行病原微生物的净化。自 1 日龄起直至淘汰, 全部生命周期都饲养于隔离器中, 已经排除

了高致病性禽流感病毒、鸡新城疫病毒、禽腺病毒 III 群、番鸭细小病毒、禽减蛋综合征、鹅细小病毒、鸭瘟病毒、I 型鸭肝炎病毒、鸭圆环病毒和鸭坦布苏病毒等十种病原体, 初步培育出无特定病原体金定鸭 FO 代核心群。为了了解该群的遗传多样性状况, 以便采取更有效的保种措施及更好地开发利用, 本研究采用微卫星 DNA 技术, 选用 17 个极其高度多态且

[基金项目] 中国农业科学院创新工程项目(2016350)。

[作者简介] 赵丽丽(1983-), 女, 博士, 助理研究员。研究方向: 兽医微生物和免疫学。E-mail: zhaolili213@163.com; 陆涛峰(1982-), 男, 博士, 助理研究员。研究方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: taofenglu@126.com。#为共同第一作者。

[通讯作者] 陈洪岩(1963-), 男, 研究员。研究方向: 实验动物学。E-mail: chenhongyan@caas.cn.

分布在不同连锁群上的微卫星标记,结合 PCR 和毛细管电泳技术,从分子水平对该群无特定病原体金定鸭的遗传多样性进行了研究,以期获得该群体的遗传学参数,为 SPF 金定鸭封闭群的培育提供基础数据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

本试验共采集了中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心保存的无特定病原体金定鸭 71 只,61 周龄【SCXK(黑)2011-007】,翅静脉采血。所有动物经过高致病性禽流感病毒、鸡新城疫病毒、禽淋巴白血病毒、番鸭细小病毒、禽减蛋综合征、

鹅细小病毒、鸭瘟病毒、I 型鸭肝炎病毒、鸭圆环病毒和鸭坦布苏病毒等十种病原体检测,均呈阴性,微生物检测内容在本文中并没有涉及。

#### 1.1.2 PCR 相关试剂

TaqDNA 聚合酶、dNTPs 及 100 bp DNA ladder 均购自大连宝生物有限公司。

#### 1.1.3 微卫星引物

参照文献报道,选择了 17 对微卫星标记用于鸭的遗传多样性分析<sup>[3,5,8]</sup>。为了实现微卫星多态性的荧光半自动检测,对引物进行了荧光修饰,本研究选择了适用于 ABI3130XL 下光栅 CCD 荧光检测系统的三种荧光集团,即 FAM(蓝色)、HEX(绿色)和 LIZ(橙色),其中 LIZ 为分子量内标。所用引物和组合见表 1。

表 1 17 个鸭微卫星位点的相关信息

Tab.1 The information of 17 microsatellite loci in the ducks

微卫星标记名称 Name of microsatellite loci	引物序列(5' - 3') Sequences of primers(5' - 3')	片段范围/bp Fragment size	荧光标记 Fluorescence labeling	退火温度/°C Annealing temperature
CAUD004	TCCACTTGGTAGACCTTGAG TGGGATTCAGTGAAGAAGCCT	202 - 222	HEX	62
CAUD011	TGCTATCCACCAATAAGTG CAAAGTTAGCTGGTATCTGC	129 - 142	HEX	52
CAUD013	ACAATAGATTCCAGATGCTGAA ATGTCTGAGTCTCGGAGC	87 - 105	6FAM	58
CAUD023	CACATTAACACATTTTCGGTCT CAGCCAAAGAGTTCAACAGG	164 - 167	6FAM	52
CAUD026	ACGTCACATCACCCACAG CTTTGCCTCTGGTGAGTTC	142 - 152	6FAM	61
CAUD035	GTGCCTAACCTGATGGATG CTTATCAGATGGGGCTCGGA	221 - 239	6FAM	63
CAUD032	GAAACCAACTGAAAACGGGC CCTCCTGCGTCCCAATAAG	118 - 126	6FAM	58
CAUD027	AGAAGGCAGGCAAATCAGAG TCCACTCATAAAAACCCACA	112 - 122	HEX	64
APH08	AAAGCCCTGTGAAGCGAGCTA TGTCGTGCATCTGGGTGTGT	176 - 187	HEX	53
APH13	CAACGAGTGACAATGATAAAA CAATGATCTCACTCCAATAG	243 - 255	HEX	56
APH18	TTCTGGCCTGATAGGTATGAG GAATTGGGTGGTTCATACTGT	149 - 153	6FAM	58
APH20	ACCAGCCTAGCAAGCACTGT GAGGCTTTAGGAGAGATTGAAAA	166 - 172	HEX	58
APH25	CCGTCAGACTGTAGGGAAGG AAAGCTCCACAGAGGCAAAG	102 - 114	6FAM	59
APH09	GGATGTTGCCCCACATATTT TTGCCTTGTTTATGAGCCATTA	104 - 130	6FAM	58
APH21	CTTAAAGCAAAGCGCACGTC AGATGCCCAAAGTCTGTGGT	132 - 139	6FAM	59
APH22	GTTATCTCCACTGCACAGG CGACAGGAGCAAGCTGGAG	148 - 158	6FAM	58
APH15	CCGTCAGACTGTAGGGAAGG AAAGCTCCACAGAGGCAAAG	174 - 180	6FAM	60

## 1.2 方法

1.2.1 血液基因组 DNA 的提取采用常规的酚氯仿抽提法

### 1.2.2 PCR 扩增

PCR 总反应体积为 25  $\mu\text{L}$ , 其中 10  $\times$  PCR buffer、dNTP、Taq 酶按照不同试剂盒的推荐量加入, 上下游引物 (100 pmol/ $\mu\text{L}$ ) 各 1  $\mu\text{L}$ , 基因组 DNA: 1  $\mu\text{L}$ , 用纯水 (ddH<sub>2</sub>O) 补足体系到 25  $\mu\text{L}$ 。

PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性, 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$  变性, 40 s; 退火温度 (各位点退火温度参见表 B), 40 s; 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸, 40 s; 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$  继续延伸 5 min; 扩增产物 4 $^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.2.3 PCR 产物的检测

PCR 产物, 经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳以及凝胶成像系统拍照检测扩增结果。

### 1.2.4 扩增产物的 STR 扫描

扩增产物经过琼脂糖凝胶电泳检测确保扩增出目的片断后, 选择分别以 FAM、HEX、TAMRA 标记的三个位点的扩增产物, 以 1:1.5:1.5 体积比混合, 取 1  $\mu\text{L}$  上样进行 STR 扫描。荧光引物合成和 STR 扫描均由金唯智公司完成。

### 1.2.5 数据分析

本研究中采用 Excel Microsatellite Toolkit (version 3.1) 软件计算群体内各位点的等位基因数 (Na) 和多态信息含量 (PIC)、群体的期望杂合度 (He) 和观察杂合度 (Ho); 利用 GENEPOP version 3.4 软件进行 Hardy-Weinberg 平衡检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 等位基因及基因频率

该金定鸭群体在 17 个微卫星位点上的等位基因及等位基因频率情况如表 2 所示。结果表明, 金定鸭群体在 17 个位点上共检测到 119 个等位基因, 所有位点中等位基因数最多的为 13 个, 最少的为 3 个。大部分位点上检测到的等位基因数都接近于文献报道<sup>[5,10]</sup>。每个位点上存在一个或极少数优势等位基因, 这些优势等位基因可能是品种间或种内较为保守的等位基因, 同时在部分位点也存在一些低频率的等位基因, 依据文献报道<sup>[3,5,8]</sup>我们选取的微卫星全部为二核苷酸重复序列, 但在许多位点上检测到了单碱基的差异, 说明在这些位点的侧翼序列中可能存在着一一定程度的单核苷酸多态性。

### 2.2 杂合度、多态信息含量及有效等位基因数

17 个微卫星位点在金定鸭群体中的多态信息含量 (PIC)、群体的期望杂合度 (He) 和观察杂合度 (Ho) 见表 3。结果表明, 该金定鸭群体中有 13 个位点 (PIC > 0.5) 呈现出高度多态, 平均杂合度为 (0.5816  $\pm$  0.0142), 其他位点均呈现出中度多态。上述信息均表明群体内遗传多样性较高, 各位点多态性较好, 遗传多样性水平基本相当。依据 Botstein 等首先提出的衡量基因变异程度高低的多态信息含量 (PIC) 指标, 表明所选位点具有较高的多态性, 适于鸭的遗传学分析。

### 2.3 Hardy-Weinberg 平衡

使用 GENEPOP 软件对金定鸭群体中 17 个微卫星位点的 Hardy-Weinberg 平衡状态进行检验, 统计结果如表 4 所示。结果显示, 仅有 5 个位点处于 Hardy-Weinberg 平衡状态, 其余 12 个位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 达到极显著水平 ( $P < 0.01$ ), 表明该群体在培育过程中受到明显的选择效应, 与该群体的遗传背景相符合。

综上所述, 该 SPF 金定鸭群体在所选的 17 个微卫星位点上表现出较高的多态性, 表明这些位点能用于封闭群金定鸭遗传质量评价。同时, 该群体在一些位点上表现出偏离哈代-温伯格平衡的现象, 表明该群体在培育过程中受到了人工选择的压力, 这也与该群体的遗传背景相一致。因此, 该群体经过基于微卫星标记的遗传质量检测, 表明该群体符合封闭群的遗传特征, 可以利用该群体继续开展无特定病原体金定鸭封闭群的建立。

## 3 讨论

微卫星 DNA (microsatellite) 是上世纪 80 年代末发展起来的一种新型遗传标记。由于其具有在基因组中分布广泛、多态性高、易于检测、共显性遗传等优点, 因此在评价遗传多样性、构建遗传连锁图谱、绘制系统发生树、疾病诊断和亲子鉴定方面显示出巨大优势, 并在动植物的遗传研究中得到了广泛应用<sup>[7,8]</sup>, 同时也被作为一种重要、成熟的遗传学检测工具广泛应用于各类实验动物遗传质量检测研究中<sup>[9,10]</sup>。目前, 微卫星 DNA 扩增产物的电泳分型方法有琼脂糖电泳、聚丙烯酰胺电泳和毛细管电泳等。毛细管电泳技术是将荧光标记的 PCR 产物和标准分子量样品 (内参) 在同一毛细管中进行电泳, DNA 分析仪将结果自动记录在计算机上, 利用片段分析

软件进行图像收集和分析,精确计算出微卫星等位基因片段的大小。毛细管电泳检测 PCR 产物具有微量、高度自动化、结果更加准确等明显优势,是微卫星检测的发展方向。

表 2 17 个鸭微卫星位点等位基因数及等位基因频率

Tab.2 Allele size and corresponding frequencies at 17 microsatellite loci in the ducks

基因座 Loci	等位基因数 Number of alleles	等位基 因频率 Allele frequency	基因座 Loci	等位基因数 Number of alleles	等位基 因频率 Allele frequency	基因座 Loci	等位基因数 Number of alleles	等位基 因频率 Allele frequency	
APH08	100	1.41	APH22	150	0.70	CAUD026	167	1.41	
	105	20.42		152	10.56		168	33.80	
	106	0.70		158	88.73		169	12.68	
	107	24.65		APH25	167		1.41	170	0.70
	109	0.70			168		59.15	171	0.70
	110	2.11			169		19.72	172	0.70
	111	42.25			170		6.34	195	2.11
	APH09	101		5.63	171		6.34	203	14.08
105		14.08	172	3.52	204	4.93			
107		27.46	CAUD004	173	3.52	209	6.34		
109		1.41		195	3.52	210	12.68		
124		51.41		203	25.35	211	5.63		
APH13	176	7.04	204	9.86	CAUD027	222	4.23		
	178	69.01	209	12.68		145	7.75		
	179	14.79	210	26.06		150	22.54		
	APH15	166	1.41	211		11.27	151	18.31	
		168	76.06	222		11.27	152	1.41	
169		2.82	CAUD011	132	2.11	155	2.11		
170		11.97		133	0.70	203	14.08		
171	0.70	135		40.14	204	4.93			
172	7.04	138		4.23	209	6.34			
APH18	243	4.23	143	1.41	210	12.68			
	244	1.41	145	7.75	211	5.63			
	250	13.38	150	22.54	222	4.23			
	CAUD013	251	36.62	151	19.72	132	2.11		
		252	44.37	152	1.41	133	0.70		
APH20		145	8.45	135	40.14	135	40.14		
	150	41.55	138	4.23	138	4.23			
	151	38.73	143	1.41	143	1.41			
	152	11.27	151	1.41	145	7.75			
APH21	132	2.11	152	10.56	150	22.54			
	133	0.70	158	39.44	151	19.72			
	CAUD023	135	59.15	CAUD035	164	65.49	152	1.41	
		138	18.31		166	16.20	222	14.79	
		143	4.93		172	3.52	230	47.89	
		150	0.70		183	13.38	231	9.86	
CAUD032		151	14.08		184	0.70	232	2.11	
		186	0.70		186	0.70	233	6.34	
						237	16.20		
						239	2.82		

本研究利用毛细管电泳技术,建立了 SPF 金定鸭群体遗传质量研究的方法,该方法包含了 17 个鸭微卫星位点。通过对 SPF 金定鸭种群中 71 个个体的遗传多样性分析,共检测到 119 个等位基因,每个

微卫星座位上等位基因数介于 3 ~ 13 个之间,大部分位点上检测到的等位基因数都接近于文献报道<sup>[2,11,12]</sup>。该 SPF 金定鸭群体中有 13 个位点 (PIC > 0.5) 呈现出高度多态,平均杂合度为 (0.5816 ±

0.0142),其他位点均呈现出中度多态,仅有 5 个位点处于 Hardy-Weinberg 平衡状态,其余 12 个位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡,达到极显著水平 ( $P < 0.01$ )。结果表明,该 SPF 金定鸭群体在所选的 17 个微卫星位点上表现出较高的多态性,说明这些位点能用于封闭群金定鸭遗传质量评价。同时,该群体在一些位点上表现出偏离哈代-温伯格平衡的现象,表明该群体在培育过程中受到了人工选择的压力,这也与该群体的遗传背景相一致。

表 3 17 个鸭微卫星位点遗传变异参数

Tab.3 Genetic variations at 17 microsatellite loci in the ducks

基因座 Loci	群体的期望 杂合度 Expected heterozygosity	观察杂合度 Observed heterozygosities	多态信息含量 Polymorphism information content
APH08	0.717311	0.647887	0.666807
APH09	0.641594	0.633803	0.581301
APH13	0.491959	0.323944	0.454286
APH15	0.404056	0.380282	0.377503
APH18	0.653781	0.507042	0.583151
APH20	0.662172	0.295775	0.592729
APH21	0.597942	0.619718	0.552652
APH22	0.202877	0.225352	0.183798
APH25	0.604735	0.366197	0.564855
CAUD004	0.821197	0.070423	0.790759
CAUD011	0.74578	0.985915	0.703294
CAUD013	0.674258	1	0.610565
CAUD023	0.529318	0.295775	0.485519
CAUD026	0.82739	1	0.803725
CAUD027	0.867845	1	0.847042
CAUD032	0.74578	0.985915	0.703294
CAUD035	0.712616	0.549296	0.675964

表 4 17 个鸭微卫星位点的 Hardy-Weinberg 平衡状态

Tab.4 Hardy-Weinberg equilibrium test of 17 microsatellites in the ducks

locus	P-val	S. E.	Fis estimates	
			W&C	R&H
APH08	0.2305	0.0176	0.0974	0.117
APH09	0.9673	0.0022	0.0122	-0.0169
APH13	0	0	0.3431	0.1008
APH15	0.0176	0.0031	0.0592	0.1034
APH18	0	0	0.2257	0.2018
APH20	0	0	0.5551	0.3677
APH21	0.9748	0.0039	-0.0367	-0.0094
APH22	1	0	-0.1117	-0.0568
APH25	0	0	0.3962	0.1462
CAUD004	0	0	0.9148	0.9156
CAUD011	0	0	-0.325	-0.1098
CAUD013	0	0	-0.4882	-0.1367
CAUD023	0	0	0.443	0.1483
CAUD026	0	0	-0.2104	-0.0768
CAUD027	0	0	-0.1535	-0.0936
CAUD032	0	0	-0.325	-0.1098
CAUD035	0	0	0.2304	0.1657

综上所述,本研究对利用微卫星 DNA 标记对培育的无特定病原体金定鸭种群的遗传多样性进行了遗传质量检测,表明该群体符合封闭群的遗传特征,可以利用该群体继续开展无特定病原体金定鸭封闭群的建立。从而可以为后期实验动物无特定病原体金定鸭的培育的标准化、规模化和种子库的建立提供重要的遗传学数据和理论依据。

参 考 文 献

[1] 左正宏,陈奕欣,吕良炬. 金定鸭遗传多样性及分子标记的研究 [J]. 厦门大学学报, 2004, 43(2): 256 - 259.

[2] 苏瑛,陈国宏,龙瑞军,等. 绿头鸭与我国主要地方鸭品种遗传多样性研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2007, 38(9): 899 - 906.

[3] Maak S, Neumann K, Von Lengerken G, et al. First seven microsatellites developed for the Peking duck (*Anas platyrhynchos*) [J]. *Animal Genetics*, 2000, 31: 233

[4] Maak S, Wimmers K, Weigend S, et al. Isolation and characterization of 18 microsatellites in the Peking duck (*Anas platyrhynchos*) and their application in other waterfowl species [J]. *Mol Ecol Notes*, 2003, 3: 224 - 227.

[5] 柯柳玉. 利用微卫星标记分析 7 个鸭品种的遗传多样性 [D]. 福建农林大学, 2008.

[6] Huang YH, Haley CS, Wu F, et al. Genetic mapping of quantitative trait loci affecting carcass and meat quality traits in Beijing duck (*Anas platyrhynchos*) [J]. *Genetics*, 2001, 148: 349 - 360

[7] 张于光,李迪强,肖启明,等. 微卫星技术及在动物遗传多样性研究中的应用 [J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2001, 27(5): 410 - 414.

[8] 肖兵兵. 利用微卫星 DNA 技术对 SPF 种禽的分子遗传学研究 [D]. 中国农业科学院, 2008.

[9] 倪丽菊,赵丽亚,赵立虎,等. 利用多重荧光 STR 技术分析上海地区 7 品系常用近交系小鼠核心群的遗传特性 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(1): 72 - 79.

[10] 郑龙,李建辉,王俊霞,等. 微卫星 DNA 标记在近交系大鼠 HFJ 和 MIJ 遗传监测中的应用 [J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(2): 32 - 36.

[11] 袁青妍,陶争荣,李国勤,等. 绍兴鸭微卫星 DNA 遗传多样性分析 [J]. 华北农学报, 2010, 25(3): 73 - 75.

[12] 段修军,王丽华,龚道清,等. 利用微卫星标记检测金定鸭小群保种效果 [J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(9): 1159 - 1164.

[收稿日期] 2016-02-23