



DB11/T828.3 - 2011 中 12 号染色体标记筛选及适用性评价研究

魏 杰, 王 洪, 于鹏丽, 岳秉飞*

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

【摘要】 目的 对北京小型猪遗传质量控制地方标准 DB11/T828.3 - 2011 中空缺的 12 号染色体标记进行筛选, 并通过比较不同标记对同种群的遗传评价对地标的适用性进行分析。**方法** 结合文献报道, 选取 12 号染色体上的 4 对微卫星标记, 利用 2 个中国农大小型猪群体进行筛选; 选取高度多态的 12 号染色体标记合并标准方法的 18 对染色体标记, 形成全染色体法, 通过不同方法对同批次群体的遗传质量评价进行比较分析。所得结果均使用 Popgen32 软件处理分析。**结果** 筛选到的 4 对 12 号染色体标记 PIC 值均大于 0.5, 为高度多态; 现行标准在染色体覆盖率、扩增稳定性、结果评价三项指标结果分别为 94.7%、96.0%、农大 I 系不合格而农大 III 系合格, 增加 12 号染色体后评价的三项指标的结果分别为 100%、96.6% 和两群体均合格。**结论** 本研究筛选的 4 对 12 号染色体标记具有高度多态性, 为完善 DB11/T828.3 - 2011 提供数据支撑。

【关键词】 DB11/T828.3 - 2011; 12 号染色体; 多态性; 适用性; 遗传质量

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 07-0059-05

doi: 10.3969.j.issn.1671-7856.2017.07.011

Screening of the makers of chromosome 12 and evaluate the applicability of Beijing local standard DB11/T828.3 - 2011

WEI Jie, WANG Hong, YU Peng-li, YUE Bing-fei*

(National Institutes for Food And Drug Control, Beijing 100050, China)

【Abstract】 Objective To screen the markers of chromosome 12, which is vacant in the Beijing local standard DB11/T828.3 - 2011 for genetic quality control of miniature pigs in Beijing, and to study the applicability of the local standard by comparison of two different methods for evaluation of the genetic quality of the same population. **Methods** According to the literature, we selected four pairs of microsatellite markers of chromosome 12 and studied the polymorphism through monitoring the genetic quality of two populations of China Agricultural University miniature pigs. We screened the highly polymorphic markers of chromosome 12, combined them with the microsatellite primers of the standard 18 pairs of chromosomes to establish the whole chromosome method. We compared and analyzed the applicability of the local standard DB11/T828.3 - 2011 through monitoring the genetic quality of the same population of miniature pigs with different method. The data were processed and analyzed using software Popgen32. **Results** All the screened four pairs of microsatellite markers of chromosome 12 were highly polymorphic (PIC > 0.5). The local standard showed a chromosome coverage of 94.7%, stability of amplification of 96.0%, and certified that the China Agricultural University miniature pig III was

[基金项目] 中国食品药品检定研究院中青年基金(2014C4)。

[作者简介] 魏杰(1982-), 女, 助理研究员, 硕士。研究方向: 免疫遗传检测。Email: jane3040320@163.com

[通讯作者] 岳秉飞(1960-), 男, 研究员, 博士。研究方向: 动物遗传学。Email: y6784@126.com

qualified, while the China Agricultural University miniature pig I was not qualified. When the markers of chromosome 12 were added, the whole chromosome method showed result of 100% chromosome coverage and 96.6% amplification stability, both of the two populations of pigs were certified as qualified. **Conclusions** The four screened markers of chromosome 12 are all highly polymorphic, and provide a support for supplement of the local standard DB11/T828.3 - 2011.

【Key words】 Local standard DB11/T828.3 - 2011; Chromosome 12; Polymorphism; Applicability; Genetic quality

实验用小型猪由于体型小、易饲养、生理解剖与人高度相似等特性,其研发与应用已受到广泛关注^[1-3]。特别是随着器官移植与人源化研究的不断深入,小型猪资源更成为了人类健康的希望之光^[4,5]。

我国小型猪资源丰富。长期以来,人们对不同品种品系小型猪在种质资源、遗传结构、生物学特性及应用进行了相关研究,但对资源的标准化尤其是遗传质量标准化研究尚在起步^[6]。实验动物的遗传质量对医学生物学研究的准确性、重复性及科学性有着至关重要的影响,而遗传质量监测又是评价和保证动物资源质量的必要措施。基于此,北京地区在 2011 年出台了实验用小型猪遗传质量控制地方标准(北京市地方标准公告 2011 年标字第 7 号,总第 109 号),并在 2012 年正式实施^[7]。

在标准的研究过程中,研究样本来自广西巴马小型猪、贵州小型猪、藏香猪和长春“军牧 1 号”;而作为北京地标,对于北京地区的小型猪遗传质量监测是否适用尚有待研究^[6,8]。2013 年,中国食品药品检定研究院应用 DB11/T828.3 - 2011 号标准对房山小型猪群体进行检测时,发现了该地标中存在着 12 号染色体标记缺失等问题,而因此导致的对遗传概貌反映不够全面,是否影响遗传质量评价也未可知^[8]。为此,本研究利用北京地区两个农大小型猪群体进行 12 号染色体微卫星标记筛选,并通过筛选到的高度多态位点与原标准中的 25 对微卫星标记形成全染色体标记法,比较其与标准方法在质量评价中的应用,为地标的不断完善和小型猪的标准化进程提供技术资料。

1 材料和方法

1.1 样本

按照 DB11/T828.3 - 2011 的要求,取封闭繁育 4 代以上、不同窝别的农大 I 系和农大 III 系小型猪样本,每品系 15 头,雌 7 头雄 8 头。样品由北京市琉璃河科兴实验动物养殖中心提供【SCXK(京)

2012 - 0005】。

1.2 样本 DNA 的制备^[8]

用改良酚-氯仿抽提法从血样中提取基因组 DNA,1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,并用紫外分光光度计测定 DNA 的浓度及纯度, -20℃ 冻存备用。

1.3 引物^[7]

本研究所用 25 对引物均按照北京市地方标准对封闭群实验用小型猪的规定,序列详见 DB11/T828.3 - 2011 附录 B。12 号染色体的 4 对引物标记 S1060、SW168、SW467、SW2494,序列详见美国农业部官网数据库(<http://www.marc.usda.gov/genome>)。所有引物均由北京擎科新业生物技术有限公司合成。

1.4 主要试剂仪器、PCR 扩增程序及结果处理均同已发文献^[9]

1.5 结果评价

12 号染色体标记筛选中,当标记的平均多态信息含量(polymorphism information content, PIC) 大于 0.25,即中度多态,可作为备选标记与原标准方法形成新的全染色体标记检测法。否则需要重新筛选,直到筛选到中度多态以上的标记。

DB11/T828.3 - 2011 中的 25 对微卫星标记为标准方法。利用标准方法和全染色体标记法共同评价相同群体,通过两者在遗传质量评价中的差异比较分析标准方法的适用性。其中,对群体遗传质量的评价,仍参照平均杂合度及卡方检验指标^[7]。即当平均杂合度在 0.5 ~ 0.7,且期望杂合度与观测杂合度经卡方检验无明显差异,可判定为合格的封闭群实验用小型猪群体,否则判为不合格。

2 结果

2.1 12 号染色体微卫星标记的筛选

利用农大 I 系、农大 III 系小型猪群体的 DNA 进行标记筛选,通过等位基因频率计算 PIC 数据。结果显示,4 对标记均有 PIC > 0.25。结果详见表 1。

2.2 全染色体标记法的建立及对两群体小型猪的遗传质量评价

新筛选到的 4 对 12 号染色体标记均为高度多态位点,合并地标中其余 18 对染色体的 25 对标记,共 29 对微卫星标记形成覆盖 19 对染色体的全染色体法。利用新建方法对农大 I 系、农大 III 系小型猪

群体进行测定,两群体的平均杂合度分别为 0.6062 和 0.6821,卡方检验 P 值分别为 0.1390 和 0.7339 (均大于 0.05)。即通过全染色体标记法检测,两群体均为合格的封闭群小型猪群体。具体遗传参数详见表 2、表 3。

表 1 12 号染色体微卫星位点 PIC 数据表
Tab. 1 Polymorphism information content (PIC) of microsatellite loci in chromosome 12

位点 Locus	多态信息含量 (PIC)	
	农大 I 系 China Agricultural University miniature pig I	农大 III 系 China Agricultural University miniature pig III
S1060	0.7434	0.7526
SW168	0.5569	0.7106
SW467	0.6214	0.6127
SW2494	0.5194	0.5419

表 2 农大 I 系小型猪群体遗传参数表(全染色体法)
Tab. 2 Genetic parameters of China Agricultural University miniature pig I (whole chromosome method)

位点 Locus	等位基因 Allele	有效等位基因 Effective allele	观测杂合度 Observed heterozygosity	期望杂合度 Expected heterozygosity	平均杂合度 Average heterozygosity	多态信息含量 PIC	多态度 Degree of PIC
S1060	7.0000	4.4118	0.7333	0.8000	0.7733	0.7434	高 High
SW168	4.0000	2.6946	0.8667	0.6506	0.6289	0.5569	高 High
SW467	5.0000	3.0000	0.3333	0.6897	0.6667	0.6214	高 High
SW2494	3.0000	2.4064	0.7333	0.6046	0.5844	0.5194	高 High
SW974	3.0000	1.2262	0.1333	0.1908	0.1844	0.6233	高 High
S0091	6.0000	5.1724	0.8000	0.8345	0.8067	0.6773	高 High
SW0240	4.0000	2.0179	0.2667	0.5218	0.5044	0.5280	高 High
SW1066	3.0000	2.0179	0.6667	0.5218	0.5044	0.7620	高 High
SW1089	4.0000	1.5254	0.3333	0.3563	0.3444	0.7060	高 High
S0005	2.0000	1.1421	0.0000	0.1287	0.1244	0.3226	中 Medium
SW1057	4.0000	2.4324	0.3333	0.6092	0.5889	0.6691	高 High
SW632	4.0000	1.7647	0.4667	0.4483	0.4333	0.8064	高 High
OPN	7.0000	3.6000	0.6000	0.7471	0.7222	0.5384	高 High
SW29	6.0000	3.0405	0.5333	0.6943	0.6711	0.6518	高 High
SW911	5.0000	2.7607	0.6667	0.6598	0.6378	0.6649	高 High
SW511	6.0000	3.1915	0.6667	0.7103	0.6867	0.7239	高 High
SWr158	7.0000	4.6392	0.5333	0.8115	0.7844	0.7245	高 High
SW951	4.0000	3.3835	0.7333	0.7287	0.7044	0.7533	高 High
SW271	4.0000	2.5714	0.8000	0.6322	0.6111	0.7033	高 High
S0386	6.0000	4.7872	0.2667	0.8184	0.7911	0.7034	高 High
S0068	6.0000	2.9221	0.7333	0.6805	0.6578	0.4416	中 Medium
SWr1008	11.000	5.8442	0.5333	0.8575	0.8289	0.7564	高 High
S0007	4.0000	2.4590	0.8000	0.6138	0.5933	0.7237	高 High
SW857	5.0000	3.1915	0.6000	0.7103	0.6867	0.7736	高 High
SW81	7.0000	2.9221	0.6000	0.6805	0.6578	0.5973	高 High
SWr1120	4.0000	2.3684	0.5333	0.5977	0.5778	0.5650	高 High
S0062	5.0000	2.0362	0.5333	0.5264	0.5089	0.2816	中 Medium
S0218	5.0000	3.4351	0.3333	0.7333	0.7089	0.5283	高 High
Mean	5.0357	2.9630	0.5405	0.6271	0.6062	0.6310	/
St. Dev	1.7947	1.1593	0.2195	0.1764	0.1705	0.1313	/

表 3 农大 III 系小型猪群体遗传参数表(全染色体法)

Tab. 3 Genetic parameters of the China Agricultural University miniature pig III (whole chromosome method)

位点 Locus	等位基因 Allele	有效等位基因 Effective allele	观测杂合度 Observed heterozygosity	期望杂合度 Expected heterozygosity	平均杂合度 Average heterozygosity	多态 信息含量 PIC	多态度 Degree of PIC
S1060	8.0000	4.5918	0.8667	0.8092	0.7822	0.7526	高 High
SW168	5.0000	4.0179	0.6667	0.7770	0.7511	0.7106	高 High
SW467	4.0000	3.1034	0.2000	0.7011	0.6778	0.6127	高 High
SW2494	3.0000	2.6316	0.8000	0.6414	0.6200	0.5419	高 High
SW974	7.0000	2.9221	0.3333	0.6805	0.6578	0.6233	高 High
S0091	6.0000	4.5000	0.8667	0.8046	0.7778	0.7433	高 High
SW0240	5.0000	2.4862	0.5333	0.6184	0.5978	0.5661	高 High
SW1066	5.0000	3.9823	0.9333	0.7747	0.7489	0.7043	高 High
SW1089	6.0000	2.4725	0.6000	0.6161	0.5956	0.5625	高 High
S0005	5.0000	2.0642	0.6667	0.5333	0.5156	0.4792	中 Medium
SW1057	7.0000	4.1284	0.7333	0.7839	0.7578	0.7183	高 High
SW632	5.0000	3.8462	0.8667	0.7655	0.7400	0.7014	高 High
OPN	6.0000	3.4351	0.4000	0.7333	0.7089	0.6622	高 High
SW29	8.0000	4.4118	0.6667	0.8000	0.7733	0.7488	高 High
SW911	4.0000	3.0612	0.4000	0.6966	0.6733	0.6076	高 High
SW511	6.0000	4.3269	0.6667	0.7954	0.7689	0.7363	高 High
SWr158	4.0000	3.4351	0.4667	0.7333	0.7089	0.6556	高 High
SW951	5.0000	4.2056	0.8000	0.7885	0.7622	0.7203	高 High
SW271	6.0000	2.1327	0.6000	0.5494	0.5311	0.5089	高 High
S0386	6.0000	4.5455	0.4000	0.8069	0.7800	0.7478	高 High
S0068	6.0000	1.9397	0.4667	0.5011	0.4844	0.4591	中 Medium
SWr1008	9.0000	4.7872	0.6667	0.8184	0.7911	0.7674	高 High
S0007	8.0000	5.5556	0.7333	0.8483	0.8200	0.7966	高 High
SW857	7.0000	3.9474	0.8000	0.7724	0.7467	0.7090	高 High
SW81	7.0000	4.4118	0.5333	0.8000	0.7733	0.7427	高 High
SWr1120	3.0000	1.7442	0.2667	0.4414	0.4267	0.3878	中 Medium
S0062	3.0000	2.1127	0.2000	0.5448	0.5267	0.4668	中 Medium
S0218	4.0000	2.5140	0.4667	0.6230	0.6022	0.5504	高 High
Mean	5.6429	3.4755	0.5929	0.7057	0.6821	0.6423	/
St. Dev	1.6151	1.0379	0.2095	0.1124	0.1086	0.1120	/

表 4 标准方法与全染色体法的比较

Tab. 4 Comparison of the standard method with whole chromosome method

项目 Item	标准方法 Standard method	全染色体法 Whole chromosome method
染色体覆盖率 Chromosome coverage	94.7% (18/19)	100% (19/19)
扩增稳定性 Stability of amplification	96.0% (24/25) (SWr312 位点标记未扩增) (except for SWr312)	96.6% (28/29) (SWr312 位点标记位点未扩增) (except for SWr312)
多态性 PIC	高度多态 High polymorphism	高度多态 High polymorphism
结果判定 Results	农大 I 系不合格, 农大 III 系合格 China Agricultural University miniature pig I is unqualified; China Agricultural University miniature pig III is qualified	农大 I 系、农大 III 系均合格 China Agricultural University miniature pig I and III are both qualified

2.3 标准方法对相同两群体的遗传质量评价及与全染色体法的比较^[9]

利用标准方法的 25 对标记对农大 I 系、农大 III 系相同群体样本进行测定结果已另文发表。测定结果为: 两群体的平均杂合度分别为 0.6759 和 0.6779, 卡方检验 P 值分别为 0.0022 和 0.7054。农大 I 系小型猪群体的观测杂合度与期望杂合度存在差异 ($P < 0.05$) 即通过标准法检测, 农大 III 系小型猪群体可判定为合格的封闭群小型猪群体, 农大 I 系不能判定为合格的封闭群小型猪群体。对两种方法进行比较分析, 发现两者在染色体覆盖率、扩增稳定性及结果评价上均存在差异, 结果详见表 4。

3 讨论与建议

3.1 筛选标记的多态性

多态信息含量 (PIC) 是用以反应基因座位多态性的指标^[10], 用来评价标记位点是否可提供足够的遗传信息。当 $PIC > 0.25$ 时, 为中度多态, 可提供较为合理的遗传信息; $PIC > 0.5$ 时, 可提供高度丰富的遗传信息; 而 $PIC < 0.25$ 时, 则提供的遗传信息较差。因此在标记的筛选中, 需要通过 PIC 值选择中高度多态性标记, 从而提供足够的遗传信息。

本研究中, 从数据库中选择的 4 对位点标记在国外猪种的研究中表现为中高度多态, 而对于北京地区的小型猪是否适用需要通过研究验证。为降低标记在地区间存在差异的影响与可能, 初步选择 4 对标记进行研究。结果 4 对标记在农大小型猪两个群体中均表现为高度多态, 可以用于遗传质量评价。

3.2 对 DB11/T828.3-2011 技术方法的适用性评价与建议

DB11/T828.3-2011 是国内第一部有具体技术方法的小型猪遗传质量控制地方标准; 同时作为北京地区第一批实验动物标准, 弥补了因无国家标准而无法在北京地区开展实验用小型猪行政许可管

理的空白。

地标中的 25 对微卫星标记分布于 19 对染色体中的 18 对上 (缺少 12 号染色体标记), 基础的染色体覆盖率为 94.74% (18/19), 反映的遗传概貌不够全面。因此在质量评价中就可能存在不够全面客观的情况。通过研究也发现, 标准方法和全染色体法在质量评价上出现了差异, 标准修订时应考虑增加 12 号染色体标记。在扩增稳定性上, 两种方法均存在 15 号染色体标记未能稳定扩增, 应当通过进一步研究确定是否为品系特征, 加强位点标记方法的研究, 进一步完善标准的技术方法, 使其反映的结果更为科学, 从而实现标准对资源应用的保障作用。

参考文献:

- [1] 袁进, 顾为望. 小型猪作为人类疾病动物模型在生物医学研究中的应用[J]. 动物医学进展, 2011, 32(2): 108-111.
- [2] 冯书堂, 李奎, 刘岚, 等. 小型猪近交系新品种的培育与开发利用[J]. 农业生物技术学报, 2015, 23(2): 274-280.
- [3] Ross JW, Fernandez de Castro JP, Zhao J, et al. Generation of an inbred miniature pig model of retinitis pigmentosa [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53(1): 501-507.
- [4] 刘广波. 异种移植相关的猪内源性逆转录病毒的调查和实验研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2012.
- [5] 潘登科, 冯冲, 王宁, 等. GalKO/hCD46 的人源化五指山小型猪[Z]. 2012 中国器官移植大会, 中国福建厦门, 2012.
- [6] 吴艳花, 徐玲玲, 杜小燕, 等. 封闭群实验用小型猪遗传标准的建立[J]. 实验动物科学, 2010, 27(6): 33-38.
- [7] DB11/T828.3-2011. 实验用小型猪 第 3 部分: 遗传质量控制[S].
- [8] 魏杰, 王洪, 李芳芳, 等. 房山封闭群小型猪微卫星位点的测定[J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(11): 7-12.
- [9] 魏杰, 巩薇, 王洪, 等. 北京中国农大小型猪三个亚系群体的遗传状况分析[J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(10): 50-55.
- [10] Kunieda T, Kobayashi E, Tachibana M, et al. Polymorphic microsatellite loci of the rat (*Rattus norvegicus*) [J]. Mamm Genome, 1992, 3(10): 564-567.

[修回日期]2016-12-30