

文章编号: 1007-7847(2000) 03-0250-05

# PCR-RFLP 和测交方法对进口祖代蛋鸡 异性个体间的遗传同质性检测\*

肖兵南, 燕海峰, 吴晓林

(湖南省畜牧兽医研究所, 中国湖南 长沙 410131)

**摘要:** 对进口 X 祖代鸡 B 系和 D 系共 143 羽异性公鸡的 K 座位羽速型作了 K 座位隐性测交, 杂合子占 41.96%, 慢羽纯合子占 35.66%, 另有 9 羽和 2 羽公鸡分别因后裔数少于 7 羽或是后裔快慢羽鸡比例严重偏离 1:1 而被判为无效。对 8 羽进口祖代 D 系异性公鸡的 PCR-RFLP 分析的结果表明, 6 羽公鸡为 K 座位显性纯合子(仅检测到 1 450 bp DNA 片段), 2 羽为杂合子(检测到 1 450 bp、1 068 bp 和 382 bp 共 3 条带)。通过 K 座位的检测, 降低了进口祖代鸡中的非同质个体比例, 提高了复制育种的鸡群整齐程度以及父母代种鸡按羽速型自别雌雄的正确率, 是一个实用有效的方法。全面的遗传质量监测还应考虑到更多的基因座位乃至对整个基因组的遗传监测。

**关键词:** 遗传监测; 蛋鸡; 隐性测交; PCR-RFLP; 羽速基因

中图分类号: Q3; Q953

文献标识码: A

## Detection of Homogeneity between Imported Grant Parent Layers Using Recessive Backcross and PCR-RFLP Techniques

XIAO Bing-nan, YAN Hai-feng, WU Xiao-lin

(Hunan Institute of Animal and Veterinary Science, Changsha 410131, Hunan, China)

**Abstract:** A total of 143 cocks in lines B and D from an imported grant parent breeding stock was genotyped by recessive backcross. The result indicated that heterozygotes ( $Kk^+$ ) and dominant homozygotes (KK) made up 41.96% and 35.66% respectively in this population. PCR-RFLP detection showed that 6 cocks of 8 imported line D were dominant homozygotes, which were characterized by the intact PCR fragment of 1 450 bp after digestion with *Hae* . However, 3 fragments (1 450 bp, 1 068 bp and 382 bp) were discovered in the rest two cocks, suggesting that they were heterozygous at locus K. Increased homogeneity at locus K were associated with improved homogeneity in progeny

\* 收稿日期: 2000-06-30

基金项目: 湖南省科委攻关计划与湖南省自然科学基金资助项目(91-07-001)

作者简介: 肖兵南(1949-), 男, 湖南人, 湖南省畜牧兽医研究所研究员, 从事畜牧兽医研究; 燕海峰(1968-), 男, 湖南人, 助理研究员, E-mail: hfk1ag@public.cs.hn.cn; 吴晓林(1964-), 男, 湖南人, 副研究员, 博士。

derived from so called "copy breeding" of imported lines, and improved rate of feathering sexing in parental stocks. It was also suggested that multi-loci, or even the whole genome, should be involved for a systematic genetic evaluation in a more complicated situation.

**Key words:** genetic evaluation; layers; recessive backcross; PCR-RFLP; feathering alleles

以复制外来家禽为手段的育种具有时间省、花费少、起点高、成效大等特点,近10年来已成为我国家禽育种的热点<sup>[1]</sup>. 该方法多以利用外来祖代鸡中性别误鉴定个体(下称异性个体)为育种素材,然后自繁扩群,复制出与外来鸡外观与性能相似的群体,或培育出与外来鸡性能相当的新群体.

外来鸡复制育种的效果取决于两个主要的因素,一是异性个体的遗传同质性,即异性个体是否为该系的同质个体(混杂于该群体中的非同质个体称异质个体). 显然,如果异性个体属主要位点异质个体,则自繁必然导致性状的分离和群体的分化,从而使复制工作失败. 二是复制群体由于遗传抽样可能较大程度的偏离原模板群体<sup>[2]</sup>.

工业品系杂交的肉鸡和蛋鸡基本采用三元或四系杂交. 以蛋鸡繁育体系为例,祖代鸡通过翻肛鉴定性别,父母代鸡则以羽速(快慢羽)区分公母,而商品代鸡则以羽色自别雌雄. 从分子水平检验祖代鸡的异性个体是同质个体还是异质个体,关键在于找出某个种质遗传标记. 从蛋鸡繁育体系设计特点不难发现,最简单的标记就是羽速基因( $K/k^+$ ).

K 座位检测的经典方法就是隐性测交,但需要较长的时间和较多的费用. 在分子水平上,Smith 和 Levin 通过 RFLP 方法来分析基因组 DNA,检测 K 位点的基因型<sup>[3]</sup>. Iraqi 和 Smith 成功地将聚合酶链式反应(PCR)应用于白来航鸡 K 位点杂合子的鉴别<sup>[4]</sup>.

## 1 材料与方法

### 1.1 测试鸡

K 座位隐性测交试验选自浙江省杭州市某鸡场进口 X 祖代鸡. 测定了 1989~1994 年间进口祖代 B 系和 D 系异性公鸡共 143 羽的 K 座位羽速型. PCR-RFLP 分析试验鸡选自湖南省长沙市某祖代鸡场. 测定了 D 系异性公鸡 8 羽.

### 1.2 血样采集与 DNA 提取

测试鸡于上午翼静脉采血 1 mL,肝素抗凝, -20 °C 保存备用. 取 50  $\mu$ L 全血,加入 1 mL 含 400  $\mu$ g 蛋白酶 K 的消化缓冲液(10 mmol/L, Tris-HCl, pH-8.0, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA). 混合液用等体积的苯酚-氯仿(1:1)提取 2 次. 2 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA. 最后将 DNA 溶解于无菌超纯水,浓度调整到 50 mg/L.

### 1.3 PCR-RFLP 分析

引物: 5' AATGGTACTACAGAGAAGGTAGGAATATC 3' (primer 9)

5' GTAAGACTAACACAGTATTCTCGAGT 3' (primer 23)

以上引物由 Sangong Co. Ltd. 合成.

PCR 反应: 采用 MJ Research PTC-100 可编程热控器进行. 总反应体积 25  $\mu$ L, 其中包括: 100 ng 基因组 DNA, 100  $\mu$ mol/L dNTP, 2.0 U Taq DNA 聚合物酶, 5 mmol/L, Tris-HCl (pH 8.3), 以及反应缓冲液(50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>). 最后覆盖一层植物油. 混合液置 PTC-100 于 94 °C 预变性 5 min, 然后进行 32 个反应循环(94 °C 变性 1 min,

56 退火 1.5 min, 72 链延伸 2 min), 最后于 72 链延伸 15 min.

RFLP 反应: 取 10  $\mu\text{L}$  上述 PCR 反应液, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检查有无扩增产物. 然后取 15  $\mu\text{L}$  上述 PCR 产物于 37  $^{\circ}\text{C}$  *Hae* 酶切 1 h. 酶切产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测. 琼脂糖凝胶电泳: 1.5% 琼脂糖凝胶, 1  $\times$  TBE 电泳缓冲液(50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 0.001% 明胶). 电泳电压为每厘米 3~4 V, 溴化乙锭染色, 最后用 Bio Rad 提供的分子成相系统成相和分析.

#### 1.4 K 座位隐性测交

隐性测交检测 K 位点基因型方法如下:

K k <sup>+</sup> 或 KK ( )	×	k <sup>+</sup> w
未知基因型		快羽
后代		
K k <sup>+</sup> ( ):		Kk <sup>+</sup> k <sup>+</sup> k <sup>+</sup> Kw k <sup>+</sup> w
		1 1 1 1
KK ( ):		Kk <sup>+</sup> Kw
		1 1

即将待测个体与隐性纯合子交配, 凡后裔中出现了快羽鸡者(快慢羽后裔比例约为 1/2) 可判为杂合子(Kk<sup>+</sup>), 而无快羽后裔者可判为慢羽纯合子(KK). 为了保证统计推断有 99% 以上的概率保障, 要求每只公鸡的后裔至少要有 7 个后裔出壳方判为有效(  $(1/2)^7 = 0.0078 < 1\%$  ).

## 2 结果与分析

### 2.1 K 座位隐性测交结果

从 1989~1994 年共检出 B 系和 D 系的异性个体 143 羽, 经 K 位点隐性测交, 检出杂合子(K/k<sup>+</sup>) 共 60 羽, 占 41.96%, 慢羽纯合子 51 羽, 占 35.66%, 9 羽公鸡的后裔数少于 7 羽被判为无效, 另有 3 羽的后裔快慢羽比例严重偏离 1/2, 判为可疑. 此三例可能是由于 K 基因自然突变到 k<sup>+</sup> 所致(突变率估计为  $4.3 \times 10^{-4}$ ), 当然也不能排除后裔出壳时混杂的可能性.

### 2.2 PCR-RFLP 检测结果

引物 9 和引物 23 从公鸡基因组 DNA 中扩出 1450 bp 片段, 但快羽公鸡的该扩增片段中存在 1 个 *Hae* 酶切位点(慢羽鸡无此酶切位点), 因此快羽扩增片段经 *Hae* 酶切后成为 2 个片段(382 bp 和 1068 bp). 对于杂合子 Kk<sup>+</sup>, 则酶切后出现 3 个片段(1450 bp, 1068 bp 和 382 bp 片段).

本研究通过 PCR-RFLP 检测了 8 羽某蛋鸡进口祖代 D 系异性公鸡, 结果 6 羽公鸡仅检出有 1450 bp 产物, 为 K 座位显性纯合子(为本系异性公鸡), 2 羽公鸡 K 座位检测到 3 个长度不同的片段, 为混杂的异性公鸡(杂合子), 应予以淘汰.

### 2.3 K 座位检测提高鸡群的遗传同质性效果

通过 K 座位遗传检测淘汰杂合子后, 使育种鸡群数量性状(开产日龄和 60 周龄产蛋量)的离散程度(变异系数)降低, 鸡群的遗传同质性提高(见表 1). K 位点遗传监测提高 ONBS 育种鸡群遗传同质性的效果还受其它位点的影响, 如鸡群中混杂了 K 座位同基因型但遗传基础不同(如低产品系)的个体. 因此, 提高鸡群的遗传同质性还应考虑到对其它遗传标记的监测.

表 1 K 位点隐性测交提高鸡群遗传同质性的效果(变异系数, %)

Table 1 Effect of improving homogeneity at locus K by means of recessive backcross  
(Variation coefficients, %)

K 座位检测 Status of locus K	相同遗传基础 From similar origins		不同遗传基础 From different origins	
	开产日龄 Onset of lay	W 60 产蛋量 Egg production up to week 60	开产日龄 Onset of lay	W 60 产蛋量 Egg production up to week 60
KK, Kk <sup>+</sup> (混杂, Mixed)	4.36	17.45	6.19	23.88
KK (纯合, KK only) 降低	3.96	9.50	5.28	19.62
Percent of decrease of homogeneity	9.17	45.59	14.94	17.83

### 3 讨论与结论

1) 进口祖代雏鸡中出现异性个体并非都是性别鉴定(翻肛)失误所致。由于通过翻肛的方法来鉴定性别的正确率不可能等于 100%, 总存在着漏/误鉴别的个体, 因此, 国外育种公司从保护本公司的利益出发, 往往将同日龄的异性个体混杂于鸡群中, 以误导用户, 使之不能轻易获得该公司的育种成果。为此, 首先要干扰的可能是羽速基因, 如将 AB 公鸡(Kk<sup>+</sup>)、CD 公鸡(Kk<sup>+</sup>)或其它来源的公鸡刮冠后混于同日龄的 B 系或 D 系雏鸡中。如用户用异性个体自繁扩群, 那么首先就会造成祖代鸡 K 座位的分离现象, 按羽速鉴别雌雄的正确性大大降低, 从而得不到应有的育种效果。

2) 本研究表明, K 位点检测可以作为进口祖代蛋鸡遗传同质性监测手段之一。通过 K 座位检测淘汰杂合子后, 降低了不同代次或遗传基础的异质个体的比例, 不仅保证了父母代种鸡按羽速鉴别雌雄的正确率, 而且还使群体若干数量性状的表型变异(方差)降低, 从而提高了鸡群整齐度(遗传同质性)。

3) K 位点隐性测交鉴别羽速基因杂合型的方法虽然看似简单易行, 但需要将公鸡培育到性成熟方能检测, 培育的费用很大, 检验时间长(从准备配种到雏鸡出壳鉴定至少需 1~2 个月), 而且具体隐性测交工作和系谱孵化往往非常麻烦。此外, 隐性测交的结论依然有一定的概率风险。目前改进的方法有二: 一是 RFLP 的方法, 它虽然有不少优点, 但工作量大, 且需大量采样检测; 二是 PCR 的方法, 该方法为 K 位点遗传监测提供了一个非常理想的方法。快羽鸡的染色体 K 座位上包含一个有 *Hae* 酶切位点的 U<sub>Rb</sub> 序列, 慢羽则相应为一个没有 *Hae* 限制性内切酶切位点的 U<sub>Ra</sub> 序列。用 PCR 方法可以将此同源序列扩增, 然后用 *Hae* 消化, 通过电泳后凡慢羽公鸡仅有 1 450 bp 片段带, 快羽公鸡则有 1 068 bp 和 382 bp 两条带, 而杂合子(Kk<sup>+</sup>)则具有上述的三条带。

4) K 位点基因型监测作为异性个体遗传同质性的检测是一种有效的, 但不是唯一的方法。不能排除在 B、D 系慢羽纯合子(KK)中有掺杂同羽速型但遗传基础不同的鸡(如低产鸡)的可能性。在此情形下, 仅检测 K 位点的遗传构成的效果往往是有限的, 必须同时考虑到更多的基因座位, 乃至对于覆盖整个基因全面遗传监测。

致谢: 湖南省ISA B380 蛋鸡祖代场孟千湖、罗柏林、周菊香、郭湘霞, 杭州市农科院沈乃民副研究员, 湖南省畜牧兽医研究所肖千钧副研究员和蒋隽助理研究员参加了部分研究工作, 在此一并致以衷心的感谢。

### 参考文献:

- [1] 吴晓林, 施启顺, 柳小春, 等. 开放核心群育种体系(ONBS) 培育蛋鸡工业化品系的育种模型[J]. 遗传 (WU X L, SHI Q S, LIU X C. The open nucleus breeding model for developing industrial layers. Hereditas), 1997, 19(Suppl): 63-66.
- [2] 吴晓林, 施启顺, 柳小春, 开放核心群育种体系(ONBS) 研究(I): ONBS 群体遗传学特征的计算机模拟[J]. 湖南农业大学学报(WU X L, SHI Q S, LIU X C. Studies on open nucleus breeding system (I): Population genetics of ONBS. A computer simulation [J]. J Hunan Agr Univ, 1997, 23(5): 450-454.
- [3] SMITH J, LEVIN I. Application of a locus specific DNA hybridization probe in the analysis of chickens[J]. Poultry Sci, 1991, 70(9): 1957-1964.
- [4] IRAQI F, SMITHE J. Determination of the zygosity of ev21-K in latefeathering male White Leghorns using the Polymerase Chain Reaction [J]. Poultry Sci, 1994, 73(7): 939-946.
- [5] 刘荣宗, 康孟松. 近交系试验动物遗传质量检测之遗传标记类型的探讨[J]. 遗传 (LIU R Z, KANG M S. A discussion on types of genetic markers applied in evaluation of homogeneity of inbred experimental animals [J]. Hereditas), 1995, 17 (Suppl): 60-62.
- [6] 柳小春, 吴晓林, 施启顺, 等. 开放核心群育种体系(ONBS) 研究 V. 家禽 ONBS 的育种效果: 血液遗传标记监测[J]. 湖南农业大学学报 (LIU X C, WU X L, SHI Q S, et al. Studies on open nucleus breeding system: V. Effects of poultry ONBS as evaluated by blood markers [J]. J Hunan Agr Univ), 1998, 24(1): 62-66.

### (上接 196 页)

1996年, 已在美国人类基因组计划中举足轻重的于军感到, 如果中国再不抓紧时间加入到这一竞争中, 有可能就会失去最后机会。不为自己的祖国做些什么, 将使他一生都不能原谅自己。但是那时的于军已出国十多年, 原来的老关系只剩下青年时期的同学或伙伴, 很难帮上大忙了, 而新的国内形势关系又摸着门道。于是于军找到了已回国创业两年的同学汪建。

汪建从此开始了在国内找资金、找理解的经历。但是他感到力量和人员的技术搭配还不够, 于是又千方百计联系到了欧洲的杨焕明和美国的刘斯奇。这4个人目前分别任中科院遗传所人类基因组计划的正副主任。他们的研究大方向虽然都是生物学, 但具体方向却都不同, 正好能够互相补充配合。

开始很难, 碰了许多壁, 因为中国当时知道人类基因组计划的人实在太少。中间几番挫折。

1998年, 不断在背后“连催带推”的于军对汪建说: 不能再等了, 国际人类基因组正在加快速度, 没有多少时间了, 这种起始性的研究说过去就过去了, 等人家一规模化起来, 我们就跟不上后面的工业化, 永远失去产业机会了。同年, 几个人终于将他们的实验室落户于中科院遗传所。中科院也为他们提供了启动资金, 但相对于花费巨大的人类基因组计划来说, 仍显不足。于是他们决定自己先掏腰包, 将计划启动。1999年中间那段时间, 在设备经费还没足额到位的情况下, 他们的小组向个人募集资金。全组大约100人, 居然募集到400余万元人民币。通过不断的联络和沟通, 由中科院院士强伯勤领导的国家人类基因组北方研究中心(北京)、中科院院士陈竺领导的国家人类基因组南方研究中心(上海)也加入到这一计划当中, 共同分担了巨大的测序任务和巨额的资金。1%终于被保质保时拿出, 并得到国际组织认可。

20年风云变幻, 一群颇具理想色彩的志同道合者就这样走到了一起。通过他们的执著与拼搏, 在今年6月26日美、英、日、法、德、中等六国联合宣布问世的人类基因组工作草图中, 完成了人类第3号染色体部分遗传密码的破译, 得到了国际同行的赞扬, 为祖国做出了贡献。