

SSR 在猪个体识别及肉产品溯源中的应用

吴 潇^{1,3}, 宿学峰^{1,2}, 唐雪明^{*1,3}

(1. 上海市农业科学院 生物技术研究所, 上海 201106; 2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 3. 上海市农业遗传育种重点实验室, 上海 201106)

摘要: DNA 溯源技术是根据动物个体之间遗传物质 DNA 序列的差异而进行个体识别并追溯到原产地的一种溯源技术。在试验群体中(11 个品种, 192 个体)检测了 24 个 SSR 标记的遗传多样性, 通过杂合度和多态信息含量计算筛选出 11 个 SSR 标记可用于猪肉产品的 DNA 溯源。在此基础上进一步在屠宰场采样进行了溯源模拟实验, 结果表明筛选的 11 个 SSR 标记能区分 100 个个体, 10 份组织样品的 SSR 标记基因型是一一对应的, 并且和 43 号个体基因型匹配。研究表明 SSR 标记可以用于猪个体识别和猪肉产品的溯源。

关键词: DNA 溯源技术; SSR 标记; 个体识别; 猪肉产品溯源

中图分类号: Q 819 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2014)06—0624—09

Application of Microsatellite Markers in Pig Individual Identified and Pork Traceability

WU Xiao^{1,3}, SU Xuefeng^{1,2}, TANG Xueming^{*1,3}

(1. Biotechnology Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Shanghai 201106, China)

Abstract: DNA traceability technology is based on DNA sequence different between individuals for individual identification and trace-back technology. Genetic diversity of 24 microsatellite markers were examined in the test groups (11 species, 192 individuals). 11 microsatellite markers were screened for pork traceability by heterozygosity and polymorphism information content. The further slaughterhouse traceability experiment was carried out and the results show that 11 microsatellite markers could distinguish 100 individuals. 10 collected tissue samples showed the same genotypes and belonged to No. 43 individual. This study has shown that microsatellite markers could be used for individual identification and pork traceability.

Keywords: DNA traceability technology, microsatellite markers, individual identification, pork traceability

收稿日期: 2013-10-28

基金项目: 上海市级农业系统青年人才成长计划项目(沪农青字 2014 第 1-20 号); 上海市科委食品安全公共服务平台专项。

作者简介: 吴 潇(1978—), 女, 湖北黄冈人, 农学博士, 副研究员, 主要从事分子生物学和食品安全研究。E-mail: qwuxiao@126.com

* 通信作者: 唐雪明(1970—), 男, 湖南道县人, 工学博士, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事转基因生物安全和食用农产品安全检测与评价技术研究。E-mail: xueming70@gmail.com

民以食为天,随着生活水平和保健意识的提高,人们越来越注重食品安全。食品安全问题不仅受到公众普遍关注,而且已成为影响我国农业和食品产业国际竞争力的重要因素^[1]。随着科学技术的发展,食品供应链中的环节和因素不断增加。从农场、牧场的原料生产到食品企业的加工、包装、储藏、运输和销售,食品不安全因素贯穿于食品供应的全过程,各大类食品均存在安全隐患,重大食品安全事故屡有发生^[2]。因此实现对肉制品的可追溯管理,需从原材料的产地,到产品的加工,直到终端消费者,包括养殖、运输、屠宰、分割、销售等各个环节。通过建立完整的溯源体系,能够为消费者提供准确而详细的有关产品的信息,有利于生产经营者及时发现各环节中存在的不安全隐患,更为重要的是,可大大加强政府部门对肉制品质量安全的监管。

溯源技术有标签溯源技术、同位素溯源技术、矿物元素指纹溯源技术、有机物溯源技术、虹膜特征技术和 DNA 溯源技术等。DNA 溯源技术源于 DNA 的遗传与变异,每个个体拥有独一无二的 DNA 序列,使得通过分子生物学方法所显示出来的 DNA 图谱也同样独一无二,于是可以把 DNA 作为像指纹那样的独特特征来识别不同的个体。DNA 溯源技术因为其易分型、重复性好、检测手段简单快捷、成本低廉等而成为目前国际上被公认为最具发展潜力和应用价值的快速溯源技术。发达国家早在 2000 年初就建立了基于 DNA 溯源技术的肉产品追溯系统,甚至将可追溯作为肉产品上市销售的必需条件。我国一直以来采用的是物理溯源方法,DNA 溯源技术刚刚起步,早日将 DNA 溯源技术用于我国肉产品追溯系统具有重要的意义。

DNA 溯源技术需要借助分子标记体现个体基因组序列的特异性,微卫星标记(SSR 标记)是 DNA 溯源技术常用的分子标记之一^[3]。作者首先对已有的微卫星标记进行筛选,然后利用所筛选的微卫星标记对猪个体进行识别和溯源研究,对基于微卫星标记的肉产品 DNA 溯源技术进行了初步探索。

1 材料与方法

1.1 材料

试验群体的样品取自上海市崇明富农猪场,其中包括:肚皮大申(DPDS)20 头;长申(CS)20 头;皮特兰(P)22 头;肚申(DuS)22 头;大申(DS)23 头;申

农(SN)20 头;肚皮申(DPS)8 头;皮申(PS)10 头;皮大申(PDS)18 头;长大申(CDS)22 头;杜大申(DDS)7 头。

溯源模拟试验的样品采自上海复兴屠宰场,随机采集 100 头猪个体的耳组织样品和其中一头猪个体的肝脏样品、胃部样品、心脏样品、小肠样品、大肠样品、尾巴样品、前肢肉样、后肢肉样、腹部肉样和背脊肉样。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 采用酚/氯仿抽提法提取 DNA,并稀释到 25 ng/μL,-20 ℃保存。提取方法参考《分子克隆实验指南》。

1.2.2 微卫星标记引物及检测 从 GenBank 中查阅相关资料,参考其研究结果,并根据相关文献报道,选择了 24 对微卫星引物^[4-18],由上海生物工程公司合成,其特征及反应条件见表 1 所示。

PCR 产物经质量分数 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶分离微卫星等位基因,银染法显色,然后将胶放在 X 光软片观察灯上拍照。

1.2.3 微卫星标记的筛选及个体识别 根据电泳图片记录个体的基因型,然后计算有效等位基因数、杂合度和多态信息含量。

有效等位基因数: N_e 是基因一致度的倒数,反映了等位基因间的相互影响,也可作为群体遗传变异的一个测度^[9]。有效等位基因数按式(1)计算:

$$N_e = 1 / \sum_{i=1}^n P_i^2 \quad (1)$$

式(1)中, i 为位点数; P_i 为等位基因频率; n 为等位基因数;杂合度 H 即基因多样性,群体的杂合度表示某位点为杂合子的概率。根据 Nei 氏公式^[10]计算杂合度:

$$H = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 \quad (2)$$

式(2)中, P_i 为 i 位点的等位基因频率; n 为等位基因数;多态信息含量 PIC:最初用于连锁分析时对标记基因多态性的估计,现常用来表示微卫星多态性高低的程度。根据 Botstein 公式^[18]计算多态信息含量:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2 \quad (3)$$

式(3)中, P_i, P_j 分别为群体中第 i, j 个等位基因频

表 1 选取的 24 个微卫星标记及其引物序列

Table 1 Selected 24 microsatellite markers and their primer sequences

微卫星标记	引物序列	等位基因数目	产物长度/bp	退火温度/℃
IGF1	F : GCTTGATGGACCATGTTG R : CACTTGAGGGGCAAATGATT	4	197~237	58
SW1515	F : CTCGGTTTCCATTTGTGG R : GATCCCTGCCCCAACAC	5	115~150	60
SW2525	F : CCACTGGTCACCATTACGC R : CCTGCAGAGGCACAGTTTG	6	154~180	58
S0107	F:CAAGGATGCCTGTAAGTGGTGCAG R:TCCTTAAGGCCTCGTAGGATCTGT	6	168~220	58
MN006	F: CAAAAGTCCTAGGTGCTTATC R: CTCTCATTGAGAGATAGAGGC	3	160~217	60
SW240	F: AGAAATTAGTGCCTCAAATTGG R: AAACCATTAGTCCCTAGCAAA	4	91~114	58
SW2448	F:CTCAGGGACTTATCCTCAGTGG R:GAGGTGGGATTTGGTCCAG	4	182~223	60
CGA	F:GAACTTTCATCCCTAAGGTCGT R:ATAGACATTATGTCCGTTGCTGAT	4	258~310	55
SW256	F: ACAAAGCTTTTGGAGAACTCG R: TAGCATAGGAACAGGTGCAGC	4	92~118	58
S0155	F:TGTCTCTGTTTCTCCTCTGTTTG R:AAAGTGGAAAGAGTCAATGGCTAT	3	148~164	58
S0005	F : CCCTCCTGGTAACTA R : GCATCCTGATTCTGGGTA	4	208~240	51
SW2459	F :ATGGCCCTGCTCAGACAG R:ATTTCCCTTCCTTTTCAGC	4	145~168	57
S0222	F :ACCTACACAATTCCTTGTGGGA R: GCCACAGTGTGCGCATAAA	3	180~238	58
SW458	F :TTATGGTTTCCTTTGCTGTGC R:CCGTTTACTGCAGGGTAACC	5	116~125	62
S0223	F : GCCTGAGAAATTCATATGC R : TTTAATCCTCACAACAACCCTG	4	124~146	60
S0068	F :AGTGGTCTCTCTCCCTCTTGCT R :CCTTCAACCTTTGAGCAAGAAC	4	216~260	62
SW951	F: TTTCACAACTCTGGCACCAG; R: GATCGTGCCCAAATGGAC	6	123~133	60.5
SW857	F:TCAGAGGTCAGTTACAGAAGACC; R: GATCCTCCTCCAAATCCCAT	10	144~168	57.5
SW24	F: CTTTGGGTGGAGTGTGTGC; R:ATCCAAATGCTGCAAGCG	6	98~114	59
SW632	F:TGGCTTGAAAGATTTCCCAA R:GGAGTCAGTACTTTGGCA	9	148~173	54
S0225	F:GCTAATGCCAGAGAAATGCAGA R:CAGGTGGAAGAATGGAATGAA	9	169~190	56
SW919	F:TCCAAAGTCATGAAGATTTATTC R:TCACAGACCTAAATGTAAGAGCT	9	106~136	56
SW81	F:GATCTGGTCTGCACAGGG R:GGGGCTCTCAGGAAGGAG	8	128~144	60
SW787	F:CTGGAGCAGGAGAAAGTAAGTTC R:GGACAGTTACAGACAGAAGAAGG	9	142~164	60

率, n 为等位基因数。

根据引物效率、电泳分辨率、杂合度和多态信息含量来筛选微卫星标记。

1.2.4 溯源模拟试验 采自上海复兴屠宰场的 100 头猪个体的耳组织样品,按照 1—100 依次编号,将其中一头猪个体的组织样分别编号为:L(肝脏样品)、S(胃部样品)、H(心脏样品)、I(小肠样品)、K(肾脏)、T(尾巴样品)、F(前肢肉样)、H(后肢肉样)、A(腹部肉样)和 B(背脊肉样)。对于每一份样品,检测上步筛选的所有微卫星标记的基因型,耳组织样品的基因型代表个体的基因型,组织样品的基因型代表分割肉的基因型。对于每一个微卫星标记,记录 100 个个体和 10 个组织样品的基因型,逐一比较各个微卫星位点的 10 个组织样品的基因型,再和 100 个个体的基因型进行比较。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 提取结果

基因组 DNA 的提取结果见图 1。

2.2 微卫星标记的筛选

作者查阅大量文献,根据文献报道,在已发表的微卫星标记中选择杂合度和多态性高的微卫星标记进行实验,初步选择了 24 个微卫星标记(见表 1)。分别使用 24 对微卫星标记的引物进行扩增,并进行 PCR 条件的优化,剔除了 6 个扩增效果不好的微卫星标记。在试验群体中检测了余下的 18 个微卫星标记,根据检测结果,剔除了 7 个多态性不好的微卫星标记(见表 2)。

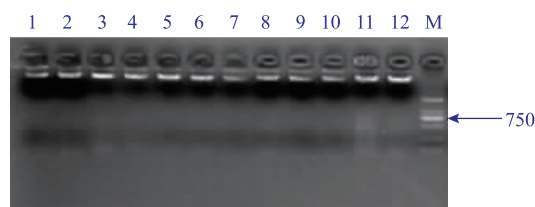


图 1 基因组 DNA 电泳结果

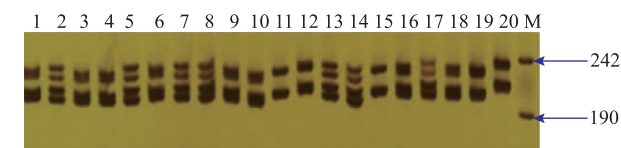
Fig. 1 Electropherogram results of Genomic DNA

表 2 11 个微卫星位点在猪群中的等位基因数、杂合度和多态信息含量

Table 2 Number of alleles, mean heterozygosity and PIC for 11 microsatellites in the nuclear group of pig group

微卫星 标记	DPDS			CS			P			DuS			DS			SN		
	Ne	H	PIC	Ne	H	PIC	Ne	H	PIC	Ne	H	PIC	Ne	H	PIC	Ne	H	PIC
IGF1	3.544 8	0.717 9	0.668 8	3.138 3	0.681 4	0.622 4	2.475 5	0.596 0	0.529 4	1.851 0	0.459 7	0.389 5	3.151 0	0.682 6	0.633 6	1.995 0	0.498 8	0.431 7
SW1515	3.129 5	0.680 5	0.623 0	3.598 8	0.722 1	0.676 2	2.256 5	0.556 8	0.463 1	3.239 6	0.691 3	0.636 6	2.540 5	0.606 4	0.525 9	2.099 7	0.523 8	0.413 4
SW2525	2.424 2	0.587 5	0.500 9	3.901 9	0.743 7	0.708 5	3.457 4	0.710 8	0.666 3	3.994 5	0.749 7	0.702 7	3.889 4	0.742 9	0.700 1	2.640 3	0.621 3	0.548 6
S0107	4.838 7	0.793 3	0.762 3	5.367 9	0.813 7	0.787 0	5.276 0	0.810 5	0.782 5	4.518 9	0.778 7	0.742 2	3.611 0	0.723 1	0.674 3	3.461 3	0.711 1	0.657 5
MN006	2.000 0	0.500 0	0.375 0	2.550 2	0.607 9	0.525 7	2.677 7	0.626 6	0.547 3	2.730 4	0.633 8	0.555 9	2.655 7	0.623 5	0.543 6	2.777 8	0.640 0	0.563 2
SW240	2.507 8	0.601 3	0.524 6	2.826 9	0.646 3	0.573 6	2.987 7	0.665 3	0.591 2	2.960 5	0.662 2	0.601 7	2.466 2	0.594 5	0.509 3	3.041 8	0.671 3	0.611 1
SW2448	3.448 3	0.710 0	0.656 9	3.960 4	0.747 5	0.700 3	2.396 5	0.582 7	0.493 9	3.967 3	0.747 9	0.700 8	3.933 1	0.745 7	0.698 3	3.448 3	0.710 0	0.656 9
S0155	2.572 3	0.611 3	0.542 6	2.088 8	0.521 3	0.409 0	2.906 9	0.656 0	0.581 3	2.366 7	0.577 5	0.509 3	2.393 7	0.582 2	0.515 3	2.247 2	0.555 0	0.491 0
CGA	2.888 1	0.653 8	0.580 3	1.225 1	0.183 8	0.173 6	2.251 1	0.555 8	0.476 2	1.529 1	0.346 0	0.319 0	2.217 9	0.549 1	0.456 5	2.219 5	0.180 0	0.363 8
SW256	3.319 5	0.698 8	0.647 4	2.492 2	0.598 8	0.514 5	2.742 2	0.635 3	0.560 3	2.688 8	0.628 1	0.562 8	3.215 9	0.689 0	0.630 7	2.197 8	0.545 0	0.441 5
S0005	3.568 7	0.719 8	0.666 4	3.812 2	0.737 7	0.689 3	2.299 2	0.565 1	0.481 9	2.855 5	0.649 8	0.587 8	3.139 3	0.681 5	0.622 5	2.697 8	0.629 3	0.556 1
IGF1	1.910 4	0.476 6	0.427 5	1.503 8	0.335 0	0.302 9	1.709 8	0.415 1	0.389 7	2.004 1	0.501 0	0.443 6	1.555 6	0.357 2	0.325 4	2.258 1	0.520 1	0.469 5
SW1515	3.000 0	0.666 7	0.592 6	3.346 2	0.701 2	0.643 4	3.160 9	0.683 6	0.624 2	3.156 4	0.683 2	0.631 7	3.122 0	0.679 7	0.621 6	2.968 2	0.654 1	0.586 5
SW2525	2.000 0	0.500 0	0.375 0	3.846 2	0.740 0	0.695 3	2.817 7	0.645 1	0.581 6	4.839 7	0.793 4	0.762 1	2.882 3	0.653 1	0.579 8	3.335 8	0.680 7	0.620 1
S0107	3.920 1	0.744 9	0.697 4	3.368 4	0.703 1	0.643 6	4.869 6	0.794 6	0.761 7	4.149 2	0.759 0	0.720 6	3.834 4	0.739 2	0.690 3	4.292 3	0.761 0	0.719 9
MN006	2.635 1	0.620 5	0.540 0	2.000 0	0.500 0	0.375 0	2.498 0	0.599 7	0.513 9	2.629 7	0.619 7	0.539 1	2.700 7	0.629 7	0.551 1	2.532 3	0.600 1	0.511 8
SW240	3.282 1	0.695 3	0.635 7	2.816 9	0.645 0	0.587 0	3.975 4	0.748 5	0.701 4	2.645 1	0.621 9	0.559 3	2.177 8	0.540 8	0.452 9	2.880 7	0.644 8	0.577 1
SW2448	4.000 0	0.750 0	0.703 1	3.846 2	0.740 0	0.691 8	3.811 5	0.737 6	0.689 1	3.967 3	0.747 9	0.700 8	3.379 7	0.704 1	0.649 9	3.650 8	0.720 3	0.667 4
S0155	2.666 7	0.625 0	0.554 7	1.801 8	0.445 0	0.381 0	2.829 6	0.646 6	0.571 3	2.081 6	0.519 6	0.456 9	1.324 4	0.245 0	0.215 0	2.298 2	0.544 0	0.475 2
CGA	1.882 4	0.468 8	0.358 9	1.851 9	0.460 0	0.410 2	2.793 0	0.642 0	0.567 6	1.879 7	0.468 0	0.405 0	2.084 9	0.520 4	0.463 7	2.074 8	0.457 1	0.397 7
SW256	2.461 5	0.593 8	0.511 2	3.225 8	0.690 0	0.639 8	2.623 4	0.618 8	0.546 2	2.942 2	0.660 1	0.592 3	1.960 0	0.489 8	0.369 9	2.715 4	0.622 5	0.547 0
S0005	2.272 7	0.560 0	0.499 2	2.284 7	0.562 3	0.519 1	2.722 9	0.632 7	0.564 7	2.425 4	0.587 7	0.498 6	3.000 0	0.666 7	0.592 6	2.825 3	0.635 7	0.570 7

微卫星座位 SW2448 扩增产物聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱见图 2, 在座位 SW2448 上检测出 4 个等位基因, 等位基因按片段大小用 A、B、C、D 表示。

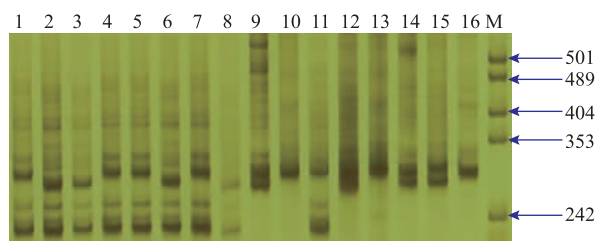


泳道 1、2、5、6、7、8、12、13、17、20: AC 基因型; 泳道 3、4、9、10、11、14、15、16、18、19: BD 基因型; 泳道 M: pUC18 DNA/Msp I Marker。

图 2 SW2448 微卫星基因座电泳结果

Fig. 2 Electropherogram results of microsatellite SW2448

微卫星座位 CGA 扩增产物聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱见图 3, 在座位 CGA 上检测出 4 个等位基因, 等位基因按片段大小用 A、B、C、D 表示。

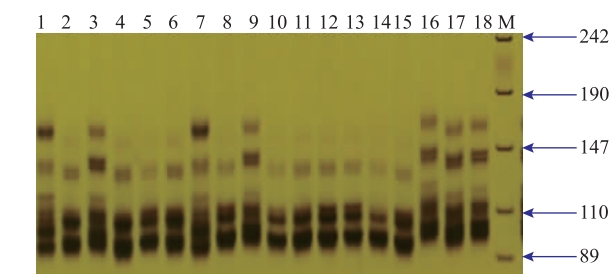


泳道 1、4、5、7、11: AC 基因型; 泳道 2、3、6: BC 基因型; 泳道 9、12、14、15: AB 基因型; 泳道 10、13、16: AA 基因型; 泳道 8: BB 基因型; 泳道 M: pUC18 DNA/Msp I Marker。

图 3 CGA 微卫星基因座电泳结果

Fig. 3 Electropherogram results of microsatellite CGA

微卫星座位 SW256 扩增产物聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱见图 4, 在座位 SW256 上检测出 4 个等位基因, 等位基因按片段大小用 A、B、C、D 表示。

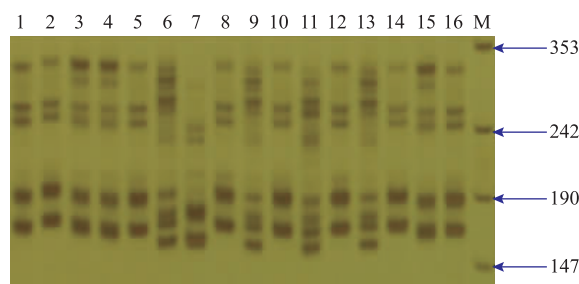


泳道 2、4、5、6、8、10、11、12、13、14、15: BD 基因型; 泳道 9、16、18: CC 基因型; 泳道 1、3、7、17: CD 基因型; 泳道 M: pUC18 DNA/Msp I Marker。

图 4 SW256 微卫星基因座电泳结果

Fig. 4 Electropherogram results of microsatellite SW256

微卫星座位 S0155 扩增产物聚丙烯酰胺凝胶电泳部分图谱见图 5, 在座位 S0155 上检测出 3 个等位基因, 等位基因按片段大小用 A、B、C 表示。

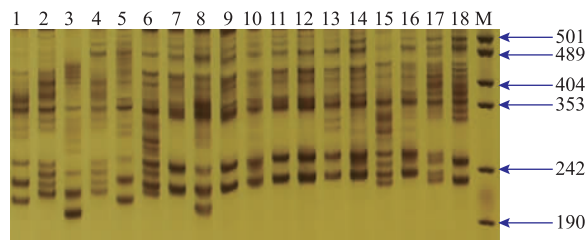


泳道 2、8、10、12、14: AA 基因型; 泳道 1、3、4、5、15、16: BB 基因型; 泳道 6、7、9、13: AC 基因型; 泳道 11: BC 基因型; 泳道 M: pUC18 DNA/Msp I Marker。

图 5 S0155 微卫星基因座电泳结果

Fig. 5 Electropherogram results of microsatellite S0155

微卫星座位 S0005 扩增产物聚丙烯酰胺凝胶电泳部分图谱见图 6, 在座位 S0005 上检测出 4 个等位基因, 等位基因按片段大小用 A、B、C、D 表示。



泳道 10、11、12、13、14、16: AA 基因型; 泳道 6、7、9、18: BB 基因型; 泳道 2、4、15、17: AB 基因型; 泳道 1、5: AC 基因型; 泳道 3、8: BD 基因型; 泳道 M: pUC18 DNA/Msp I Marker。

图 6 S0005 微卫星基因座电泳结果

Fig. 6 Electropherogram results of microsatellite S0005

2.3 溯源模拟试验

为了验证筛选的微卫星标记用于猪肉产品溯源的可行性, 作者进行了溯源模拟试验。在上海复兴屠宰场随机采取了 100 头猪的耳组织样, 代表 100 个个体, 然后集中采集了其中一头猪的 10 个不同组织器官的组织样品, 代表市场出售的分割肉。先在 100 个个体中检测了 11 个微卫星的基因型, 统计分析结果显示这 11 个微卫星标记能有效区分这 100 个个体。作者同时检测了采集的 10 份组织样品, 每份样品产生的带型及对应的基因型是一致的, 即 10 个样品 11 个微卫星标记的基因型是一致

的,证实这些样品是来自同一个个体;随后,将样品的 11 个微卫星标记的基因型和 100 个个体的基因型进行比较分析,发现和 43 号猪个体的基因型是匹配的,这说明这样品来自 43 号个体。

3 讨论

肉类食品安全问题关系到消费者的健康与生命安全,世界上许多国家和地区都已积极发展并建立肉类食品的追溯系统,试图从源头上控制并消除食品安全隐患。传统的标签溯源技术存在标签丢失、记录出错、标记图案模糊不清,以及标签容易人为改换等缺点,并且在动物被屠宰分割后溯源难以继续追踪下去。针对这一问题,研究者根据个体 DNA 特异性而且无组织差异性建立了 DNA 溯源技术,使得追溯不受动物分割的限制。因此越来越多的国家将 DNA 溯源技术应用到肉产品的溯源系统中。

中国是畜产品生产大国,加入 WTO 后,我国畜产品在国际贸易中面临更加激烈的竞争,而食品安全问题往往是引发国际贸易中非贸易性技术壁垒的导火线。随着我国对外贸易日益频繁,畜产品安全问题已经成为影响畜产品竞争力的关键因素。我国在畜禽养殖、疫病防治、屠宰加工、产品贮运和销售等环节存在诸多问题,与国外先进的管理水平相比还有相当大的差距。在这种情况下,肉产品的追溯系统能起到一定的监管作用,有利于生产经营者发现食品安全隐患后迅速确定肉产品的来源及去向,及时召回受污染产品,把好畜产品的质量关,从而增强我国畜产品的国际竞争力。

微卫星标记是第二代分子标记,具有多态性高、共显性遗传和高分辨率等特点,目前已成为检测种群遗传多样性的有效分子标记^[19-20],大量用于猪的遗传学分析中。本研究中根据文献报道,作者检索出大量的微卫星标记。微卫星的多态性水平常用遗传杂合度和多态信息含量来表示,杂合度大、多态信息含量高,说明群体内基因型一致性差、遗传变异大、适合用于个体识别,微卫星标记的基因杂合度值在 0.3~0.8 之间比较好^[21]。多态信息含量表示微卫星多态性的高低^[22],当 $PIC > 0.5$ 时,该基因座位为高度多态基因座位;当 $PIC = 0.25 \sim 0.5$ 时,为中度多态基因座位;当 $PIC < 0.25$ 时,则为低度多态基因座位^[23]。作者根据文献报道的微卫星标记的杂合度和多态信息含量,选择了 24 个高多态信息含量

的微卫星标记,杂合度均 ≥ 0.3 。

由于猪品种的遗传差异性,微卫星标记在不同的群体中的多态性是有差异的,为了进一步证实初步筛选的微卫星标记能否用于本研究所针对的猪群,作者在试验群体中检测了微卫星标记的杂合度和多态信息含量。经过检测分析,保留了 11 个微卫星标记,除了 CGA 标记和 S0155 标记,其余的微卫星标记在 11 个猪品种或品系中的杂合度均大于 0.3,最高为 0.813 7;多态信息含量均高于 0.3,最高为 0.787 0。CGA 标记在 CS 和 SN 中的杂合度比较低,在 CS 中多态信息也只有 0.2 不到,但是平均杂合度为 0.457 1,平均多态信息含量为 0.397 7;S0155 标记 DDS 中的杂合度和多态信息含量都 ≤ 0.3 ,但是平均杂合度为 0.544 0,平均多态信息含量为 0.475 2。这两个微卫星标记在个别品系中出现低杂合度和多态信息含量有可能跟检测的样本数有关,但是考虑到平均杂合度和多态信息含量都高于 0.3,作者还是保留了这两个微卫星标记。

为了检验这 11 个微卫星标记的溯源效果,随后进行了溯源模拟试验,统计分析结果显示这 11 个位微卫星标记能有效区分 100 个随机个体;同时采集的 10 个肌肉和内脏组织样的基因型是一致的,并通过基因型判断这些样品来自 43 号个体。

相比 SNP 标记,微卫星标记的等位基因众多,多态丰富。Rohrer^[25]进行微卫星标记和 SNP 标记的比较,研究分析了 60 个 SNPs 标记和 10 个微卫星标记的溯源效果,发现两组标记的个体识别能力接近。Schopen 等^[26]分别在禽类和牛中比较了 12 个家禽的微卫星标记和 29 个家禽 SNP 标记的溯源效果,以及 34 个牛的微卫星标记和 36 个牛的 SNP 标记的溯源效果。研究表明,每个微型卫星标记的信息容量至少相当于 3 个 SNPs 甚至更多 SNPs 提供的信息容量,也就是说少量的微卫星标记便能实现动物个体的识别和溯源。2008 年,Ricardo 等利用 10 个微卫星标记对牛肉产品进行追溯,150 个牛肉样品被 100%准确追踪到各自的供体^[27]。阮泓越等在 2010 年应用微卫星标记对 3 个国外引进猪品种(大白猪、长白猪和杜洛克猪)进行个体识别的研究,结果表明利用 14 个微卫星标记即可区分所有样本。阮泓越等进一步利用这些微卫星标记对屠宰场随机取样的 5 头猪进行从肉样到血液样品的溯源研究,结果表明同一头猪的肉样和血液样品的微卫星

座位是一一对应的^[28]。

4 结 语

作者的研究结果表明,11个微卫星标记完全可以准确进行个体识别和追溯,研究结果和前人的研

究结果一致。SSR标记等位基因数目较多,因此能提供丰富的序列信息。但也正因如此,使得SSR标记的带型复杂,给DNA指纹识别自动化和规模化带来一定困难^[30-31]。如果今后能在微卫星标记检测技术和带型分析方法上加以改进,微卫星标记一定能广泛地应用于动物个体识别和肉产品追溯中。

参考文献:

- [1] 吴潇,潘玉春,唐雪明.肉制品的DNA溯源技术[J].猪业科学,2009,26(3):105-106.
WU Xiao,PAN Yuming,TANG Xueming. DNA Tracing technology of meat products [J]. **Swine Industry Science**,2009,26(3):105-106.(in Chinese)
- [2] 杨天和,褚保金.“从农田到餐桌”食品安全全程控制技术体系研究[J].食品科学,2005,26(3):264-268.
YANG Tianhe,CHU Baojin. Study on control system of food safety from farm to table[J]. **Food Science**,2005,26(3):264-268.(in Chinese)
- [3] 吴潇,张小波,朱连龙,等.肉产品分子溯源标记的研究进展[J].食品科学,2010,31(7):308-311.
WU Xiao,ZHANG Xiaobo,ZHU Lianlong,et al. Research progress on molecular markers for meat products Traceability[J]. **Food Science**,2010,31(7):308-311.(in Chinese)
- [4] 黄敏瑞,孙俊丽,潘天彪,等.6个微卫星DNA标记在陆川猪群体中的遗传多样性分析[J].广西畜牧兽医,2008,24(2):67-69.
HUANG Minrui,SUN Junli,PAN Tianbiao,et al. Analysis of genetic diversity of 6 microsatellites in Lu Chuan pig [J]. **Guangxi Animal Science and Veterinary Medicine**,2008,24(2):67-69.(in Chinese)
- [5] 张桂香,王志刚,孙飞舟,等.56个中国地方猪种微卫星基因座的遗传多样性[J].遗传学报,2003,30(3):225-233.
ZHANG Guixiang,WANG Zhigang,SUN Feizhou,et al. Genetic diversity of microsatellite loci in fifty-six Chinese native pig breeds[J]. **Journal of Genetics and Genomics**,2003,30(3):225-233.(in Chinese)
- [6] 蒋隽,施启顺,柳小春,等.不同猪种肠毒素大肠杆菌(EPEC)F4受体微卫星标记遗传差异性研究[J].遗传,2004,26(2):160-162.
JIANG Juan,SHI Qishun,LIU Xiaochun,et al. The genetic variation of two microsatellite markers of escherichia coli F4 (K88) receptor in different swine breeds[J]. **Hereditas**,2004,26(2):160-162.(in Chinese)
- [7] 刘鑫,施启顺,柳小春,等.不同猪种肠毒素大肠杆菌(EPEC)F4受体的微卫星标记遗传效应分析[J].遗传,2006,28(8):945-948.
LIU Xin,SHI Qishun,LIU Xiaochun,et al. Analysis of effect of microsatellite markers on escherichia coli F4 (K88) receptor in different swine breeds[J]. **Hereditas**,2006,28(8):945-948.(in Chinese)
- [8] 杨彤彤,赵族,张婷婷,等.大约克和二花脸猪5个微卫星座位多态性分析[J].畜牧与兽医,2008(9):11.
YANG Tongtong,ZHAO Zu,ZHANG Tingting,et al. Polymorphism analysis of 5 seats of microsatellite about Large Yorkshire pig and Erhualian pig[J]. **Animal Husbandry & Veterinary Medicine**,2008(9):11.(in Chinese)
- [9] 牛荣,黄中波,商海涛,等.广西巴马小型猪21个微卫星座位的DNA多态性分析[J].中国兽医科技,2002,32(8):11-13.
NIU Rong,HUANG Zhongbo,SHANG Haitao,et al. Analysis of DNA polymorphism of 21 microsatellite loci from Bama Miniature pig breed in Guangxi of China[J]. **Chinese Journal Of Veterinary Science And Technology**,2002,32(8):11-13.(in Chinese)
- [10] 吴迪,张亚妮,周占琴,等.合作猪和迪庆猪的微卫星遗传多样性分析[J].甘肃农业大学学报,2004,39(2):106-109.
WU Di,ZHANG Yani,ZHOU Zhanqin,et al. Analysis of genetic diversity of microsatellite on Hezuo pig and Diqing pig[J].

- Journal of Gansu Agricultural University**, 2004, 39(2): 106–109. (in Chinese)
- [11] 郭宏宇,林家栋. 利用微卫星 DNA 标记分析贵州 3 个地方猪种的遗传多样性[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(8): 3453–3454.
GUO Hongyu, LIN Jiadong. Genetic diversity analysis of three guizhou local pig breeds using microsatellite DNA markers[J]. **Journal Of Anhui Agri Sci**, 2009, 37(8): 3453–3454. (in Chinese)
- [12] 吴晓林,李杓, Fredholm M. 连续近交下家猪微卫星基因组杂合度与经济性状的相关性研究[J]. 遗传学报, 2001, 28(1): 20–28.
WU XiaoLin, LI Xun, Merete Fredholm. Association of microsatellite genomic heterozygosity with inbred pig performance under successive inbreeding[J]. **Acta Genetica Sinica**, 2001, 28(1): 20–28. (in Chinese)
- [13] 徐玲玲,吴艳花,路静,等. 筛选适用于小型猪遗传检测的微卫星位点[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(2): 11–16.
XU Lingling, WU Yanhua, LU Jin, et al. Isolation of microsatellite loci for miniature pig genetic monitoring [J]. **Chinese Journal of Comparative Medicine**, 2009, 19(2): 11–16. (in Chinese)
- [14] 公维华,张宁波,程佳月,等. 小型猪微卫星标记多重 PCR 体系的建立与应用[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(2): 21–25.
GONG Weihua, ZHANG Ningbo, CHENG Jiayue, et al. Establishment of a microsatellite-labeling multiplex PCR system and its application in minipig[J]. **Chinese Journal of Comparative Medicine**, 2009, 19(2): 21–25. (in Chinese)
- [15] 曹果清,李步高,石建中,等. 应用 21 个微卫星标记监测马身猪遗传多样性变化趋势[J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(8): 932–938.
CAO Guoqing, LI Bugao, SHI Jianzhong, et al. Genetic monitoring on genetic diversity of mashen pig using 21 microsatellite markers[J]. **Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica**, 2010, 41(8): 932–938. (in Chinese)
- [16] 董新星,杨婷,屈再久,等. 云南高黎贡山猪微卫星 DNA 多态性分析[J]. 浙江畜牧兽医, 2010(1): 2.
DONG Xinxing, YANG Ting, QU Zaijiu, et al. Polymorphism analysis of microsatellite DNA for Gaoli Gongshan pig from Yunnan [J]. **Zhejiang Journal Animal Science and Veterinary Medicine**, 2010(1): 2. (in Chinese)
- [17] 蒋隽,刘小兰,马海明,等. 猪肠毒素大肠杆菌 F4 受体的微卫星标记筛选[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2010, 36(3): 321–325.
JIANG Juan, LIU Xiaolan, MA Haiming, et al. Screening of microsatellite markers on enterotoxigenic Escherichia coli F4 (K88) receptor in different swine breeds [J]. **Journal of Hunan Agricultural University: Natural Sciences Edition**, 2010, 36(3): 321–325. (in Chinese)
- [18] 霍金龙,霍海龙,苗永旺,等. 利用 76 个微卫星标记分析滇南小耳猪的遗传多样性[J]. 云南农业大学学报, 2008, 23(5): 638–643.
HUO Jinlong, HUO Hailong, MIAO Yongwang, et al. Analysis of the genetic diversity of Diannan small-ear pig using 76 microsatellite marker[J]. **Journal of Yunnan Agricultural University**, 2008, 23(5): 638–643. (in Chinese)
- [19] 薛辉,吴孝兵,晏鹏. 微卫星标记在分子生态学中的应用及其位点的分离策略[J]. 中国应用生态学报, 2005, 16(2): 385–389.
XUE Hui, WU Xiaobing, YAN Peng. Application of microsatellite DNA in molecular ecology and strategies for loci isolation[J]. **Chinese Journal of Applied Ecology**, 2005, 16(2): 385–389. (in Chinese)
- [20] 黄磊,王义权. 微卫星分子标记在濒危动物保护遗传学研究中的应用[J]. 生物多样性, 2004(5): 528–533.
HUANG Lei, WANG Yiquan. The application of microsatellite DNA markers in conservation genetics of endangered animals[J]. **Biodiversity Science**, 2004(5): 528–533. (in Chinese)
- [21] Takezaki N, Nei M. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA [J]. **Genetics**, 1996, 144(1): 389–399.
- [22] 贾斌,赵宗胜,李大全,等. 新疆 3 个地方品种绵羊微卫星遗传分析[J]. 石河子大学学报, 2005, 23(2): 194–199.
JIA Bin, ZHAO Zhongsheng, LI Daquan, et al. Microsatellite genetic analysis of three sheep breeds in Xinjiang [J]. **Journal of Shihezi University**, 2005, 23(2): 194–199. (in Chinese)

- [23] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. **American Journal of Human Genetics**, 1980, 32(3):314.
- [24] Herraes D L, Schafer H, Mosner J, et al. Comparison of microsatellite and single nucleotide polymorphism markers for the genetic analysis of a Galloway cattle population[J]. **Zeitschrift Fur Naturforschung C—Journal of Biosciences**, 2005, 60(7–8):637–643.
- [25] Rohrer G, Freking B, Nonneman D. Single nucleotide polymorphisms for pig identification and parentage exclusion [J]. **Animal Genetics**, 2007, 38(3):253–258.
- [26] Schopen G, Bovenhuis H, Visker M, et al. Comparison of information content for microsatellites and SNPs in poultry and cattle[J]. **Animal Genetics**, 2008, 39(4):451–453.
- [27] Felmer R, Sagredo B, Chávez R, et al. Implementation of a molecular system for traceability of beef based on microsatellite markers[J]. **Chilean Journal of Agricultural Research**, 2008, 68(4):342–351.
- [28] 阮泓越, 宛煜嵩, 贺辉群, 等. 14 个微卫星 DNA 标记在猪个体识别和溯源中的应用研究[J]. **农业生物技术学报**, 2010, 18(6):1129–1133.
- RUAN Hongyue, WAN Yusong, HE Huiqun, et al. An application research of fourteen microsatellite DNA markers in identification of individuals and traceability in pig [J]. **Journal of Agricultural Biotechnology**, 2010, 18 (6):1129–1133. (in Chinese)
- [29] Rodríguez-Ramírez R, Arana A, Alfonso L, et al. Molecular traceability of beef from synthetic Mexican bovine breeds[J]. **Genetics and Molecular Research**, 2011, 10(4):2358–2365.
- [30] Amorim A, Pereira L. Pros and cons in the use of SNPs in forensic kinship investigation: a comparative analysis with STRs[J]. **Forensic Science International**, 2005, 150(1):17–21.
- [31] Cunningham E, Meghen C. Biological identification systems: genetic markers[J]. **Revue Scientifique et Technique: International Office of Epizootics**, 2001, 20(2):491–499.

科技信息

欧盟食品安全局制定食品用酶安全性评估计划

据欧盟食品安全局(EFSA)消息,为帮助欧盟委员会制定允许使用的食品酶列表,欧盟食品安全局已完成食品酶的第一轮安全性评估。

欧盟食品安全局会同行业以及委员会进行讨论后预测,在未来的几年里,会有大约 300 项食品酶的申请需要进行安全性评估。

在 2009 年以前,欧盟尚未出台对非食品添加剂类食品用酶的统一管理规定。然而法国与丹麦两国要求欧盟对加工助剂类酶进行安全性评估,为此欧盟于 2009 年制定了食品用酶管理法案。

法案适用于食品生产、加工、制备、处理、包装与运输过程中所使用的酶,这包括作为加工助剂的食品酶,但不包括供人消费的食用酶,例如为营养目的所添加的酶。

[信息来源] 食品伙伴网. 欧盟食品安全局制定食品用酶安全性评估计划 [EB/OL]. (2014–5–19). <http://news.foodmate.net/2014/05/263723.html>.