

绵羊 EST-SSR 分子标记的鉴定及特异性分析

马小梅, 宋亚倩, 罗瑞明*

(宁夏大学食品与葡萄酒学院 银川 750021)

摘要 通过 SSR Finder 软件及 MISA 技术从 NCBI 系统中的绵羊表达序列标签(EST)数据库中筛查 SSR 位点,利用 Primer 3.0 设计绵羊 EST-SSR 荧光引物,对宁夏滩羊肉、新疆细毛羊肉和藏绵羊肉进行区分。以 3 种绵羊的肝脏 DNA 为模板,对设计的 EST-SSR 引物进行 PCR 扩增并使用毛细管电泳检测 SSR 分型。结果显示,通过 EST-SSR 标记设计的荧光引物 p2105.1:248-559、p2025.1:896-1059 和 p2104.1:704-1015 在宁夏滩羊肉、新疆细毛羊肉和藏绵羊肉中具有良好特异性,可实现 3 个绵羊品种的区分。通过 EST-SSR 标记技术可准确判断 3 个纯种绵羊肉的品种,这对绵羊遗传资源的开发利用、品种鉴别以及丰富分子标记类型具有重要的意义。

关键词 绵羊; EST-SSR; 引物设计; 特异性分析

文章编号 1009-7848(2023)02-0330-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.02.032

中国的绵羊饲养历史悠久,绵羊存栏数、品种遗传资源较多。据《国家畜禽遗传资源品种名录(2021 年版)》统计,我国绵羊品种或遗传资源共有 89 个,其中包括 44 个地方绵羊品种,32 个培育绵羊品种,13 个引进绵羊品种。整体上来说,中国的绵羊主要有藏系绵羊、蒙古系绵羊以及哈萨克系绵羊^[1]。藏绵羊作为我国西北地区特有的羊种,主要分布在西藏、青海、四川、甘肃等地区,由于常年生活在平均海拔 3 000 m 以上的高寒、低氧地区,造就了藏绵羊耐寒、耐粗饲、抗病等优点^[2]。滩羊是宁夏特色优势畜种,是一种极其珍贵的动物资源,特定的自然生态环境赋予了滩羊肉鲜香、细嫩,不膻、不腥等优良品质^[3-4]。新疆细毛羊属毛、肉兼用细毛羊,产于新疆巩乃斯种羊场,是新中国成立以来育成的第一个毛、肉兼用细毛羊品种^[5]。

滩羊(Tan sheep)系蒙古羊的一个分支,属于短脂尾绵羊,是中国珍贵的绵羊品种。其肉质细嫩鲜美,营养丰富,风味独特且含脂率低,不膻不腥,是公认的优质羊肉之一。与其它羊肉相比,滩羊肉具有独特风味与口感;且营养成分结构明显优于其它品种羊肉。

近年来,以其它品种羊肉冒充滩羊肉的现象

屡屡发生。这不仅侵犯了消费者权益,更阻碍了滩羊肉产业的稳定健康发展。研发快速、准确鉴别滩羊及其它品种绵羊肉的分子标记技术,是滩羊产业发展亟需解决的技术问题。

表达序列标签(Expressed sequence tags, EST)是分子标记的重要工具,基于 EST 序列开发的 SSR 称为表达序列标签 SSR(EST-SSR)。EST-SSR 作为表达基因的一部分,不仅可以对功能基因进行定位^[6-7],而且可以将不同种群或同一种群基因的遗传多态性检测出来,甚至能够在近源物种中实现跨种扩增^[8]。迄今为止,虽然已有很多从植物的 EST 数据库中筛选微卫星标记的报道,如葡萄^[9]、茄子^[10]、芦笋^[11]、胡萝卜^[12]、小麦^[13]和松树^[14]等,但是基于 EST-SSR 标记方法对于动物物种的研究较少,目前仅发现在鲤鱼、草鱼、黄鳝、鲑鱼、牛、虾等和昆虫的报道。

本文旨在利用现有绵羊 EST 数据库资源开发 EST-SSR 标记,并对开发的 EST-SSR 的分布情况、碱基组成、碱基类型等方面进行生物信息分析。采用 PCR 技术和毛细管电泳技术,筛选出对宁夏滩羊、新疆细毛羊和藏绵羊有效区分的特异性引物。科学、准确地判断不同绵羊肉的品种,对于不同绵羊的种质资源保护以及科学开发利用均具有重要指导意义。

收稿日期: 2022-02-03

基金项目: 宁夏回族自治区创新平台专项(2019DPC05011)

第一作者: 马小梅,女,硕士生

通信作者: 罗瑞明 E-mail: ruimingluo.nx@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

试验所用纯种宁夏滩羊的肝脏来自大夏牧场(宁夏盐池县),纯种藏绵羊和纯种新疆细毛羊的肝脏来自天祝藏族自治县鑫荣盛生态养殖有限公司(甘肃省武威市)。

Taq Plus DNA 聚合酶、10X PCR 缓冲液(含 Mg^{2+})、dNTP(10 mmol/L)、引物、DNA 快速抽提试剂盒,生工生物;6×DNA 负载染料、DNA 阶梯混合、POP-7™ 聚合物、二甲酰胺,Thermo Fisher 公司。

1.2 仪器与设备

PCR 仪、测序仪,美国 ABI 公司;凝胶成像仪,上海复日科技有限公司;BP 系列精密单道可调移液器,加拿大 BBI 公司;UV-Vis Spectrophotometer,Merinton 公司;TLTERTEK BERTHOLD 微量核酸蛋白浓度测定仪,美国 Bio-Rad 公司。

1.3 方法

1.3.1 样品制备 采用典型集群的简单随机抽样方法进行采样,采样过程中注意避免采集杂交群体及外源性污染。其中宁夏滩羊、藏绵羊和新疆细毛羊各 20 只,分别多点取样,每只绵羊肝脏样本为 25 g,采样完成后将样本分装标记,共计 60 个样本。

1.3.2 DNA 提取 采用动物基因组 DNA 快速抽提试剂盒^[15]提取 DNA,通过核酸蛋白浓度测定仪和 1%琼脂糖凝胶电泳评估 DNA 质量。加入 50~100 μ L 的 TE 缓冲液溶解 DNA 沉淀,-20 $^{\circ}$ C 保存 DNA 样品。

1.3.3 绵羊 EST-SSR 的查找与筛选 根据 NCBI 系统中的绵羊 EST 数据库,应用 SSR Finder 软件在线查 EST-SSR 位点,查找中使用的标准是^[16]:单、二、三、四及五核苷酸的重复次数分别为 7,7,6,5,4;同时包括复合型微卫星序列。此外,引物序列含量一般表现为上、下游引物的含量不能相差太大^[17]。

1.3.4 EST-SSR 引物设计合成 使用 Primer 3.0 进行引物设计^[18],原则如下:引物长度控制在 18~24 bp 之间;GC 含量在 40%~60%;溶解温度(T_m)控制在 50~65 $^{\circ}$ C;产物的长度控制在 100~350 bp 之间^[19];两条引物的长度差别不应该太大^[20]。引物之间尽量避免发夹结构或二聚体;引物之间应是

低互补性 or 无互补性^[21]。随机筛选出 100 条 EST-SSR 引物,以 3 个绵羊的肝脏 DNA 为模板进行 PCR 扩增。

1.3.5 EST-SSR 扩增和毛细管电泳 PCR 反应体系和反应条件分别见表 1 和表 2。

表 1 聚合酶链式反应体系

Table 1 PCR reaction system

组分	含量	体积/ μ L
模板 DNA	20~50 ng/ μ L	1
引物 F	10 μ mol/L	1
引物 R	10 mmol/L	1
dNTP (mix)	10 μ mol/L	1
Taq 缓冲液(添加 $MgCl_2$)	10 X	0.2
Taq 酶	5 U/ μ L	0.5
ddH ₂ O		25

表 2 聚合酶链式反应条件

Table 2 The programs of PCR

程序	反应温度/ $^{\circ}$ C	反应时间	循环数
预变性	95	3 min	10
变性	94	30 s	
退火	60	30 s	
延伸	72	30 s	
变性	94	30 s	35
退火	55	30 s	
延伸	72	30 s	
修复延伸	72	5~8 min	

对获得的 EST-SSR 引物进行荧光标记和 PCR 扩增,扩增产物经毛细管电泳检测和 STR 分型。使用基因组分析仪分析数据,导出每对引物的峰图文件,筛选出有一定多态性且有明显特征峰的微卫星标记引物^[22]。

1.3.6 特异性引物的有效性与适用性检验 对筛选出的特异性引物进行有效性与适用性验证。选用 3 个纯种绵羊品种各 5 只,分别对其肝脏与肌肉进行多点采样,每个样本 25 g,采后将不同品种分装标记,共计 30 个样本。宁夏滩羊、新疆细毛羊和藏绵羊的肝脏及肌肉分别标记为 L1-5、L6-10、L11-15 和 M1-5、M6-10 以及 M11-15。提取 3 个绵羊品种的不同部位 DNA,用特异性引物进行 PCR 扩增和毛细管电泳分析。

2 结果与分析

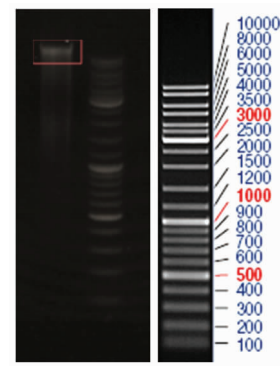
2.1 DNA 质量评估

A260/A280 用于评估核酸样品的纯度^[23];纯净的样品比值应大于 1.80^[24]。试验中样本所提取的全基因组 DNA 的质量浓度为(128.4±0.01)ng/μL, 总量为 50 μL, 样本 A260/A280 比值为 1.84±0.01, 且凝胶电泳条带清晰无拖尾(图 1), 表明 DNA 质量良好。

2.2 EST-SSR 位点分布结果

使用 MISA 检测序列中的 EST-SSR 位点, 结果得出: 共计 3 193 个有效 EST-SSR 位点序列, 长度为 150~3 628 bp 不等。通过表 3 得出单、二、三、四、五核苷酸和复合 SSR 重复序列个数和占比分别为 834 (26.12%), 14 (0.44%), 7 (0.22%), 1 (0.03%), 3 (0.09%) 个和 2 334 (73.10%) 个, 结果说明绵羊 EST-SSR 的优势基序重复类型是复合碱基; 然而相比其它重复类型, 单核苷酸占比相对较高。

由图 2 可得, c 和 c* 类型即复合 SSR 的占比最高。观察分析 2 334 个复合 SSR 重复序列发现, 复合 SSR 重复序列具有更大的 SSR 长度^[25], 而且种类丰富, 要远远高于非复合 SSR。主要组合形式包括 (CC)₆(C)₁₂*、(A)₁₂(AA)₆*、(C)₁₂(CC)₆*、(AA)₆(A)₁₂* 和 (A)₁₃(AA)₆* 等。此结果进一步验证了在 EST-SSR 位点重复类型规律上, 多数物种中还是以复合 SSR 类型为主^[22], 且不同的搜索



注: 图中点样顺序依次为: MIX-sheep、Marker。

图 1 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig.1 The electrophoresis results of DNA

表 3 绵羊基因组 EST-SSR 重复单元分布特征

Table 3 Distribution characteristics of EST-SSR repeat units in sheep genome

SSR 类型	数量/个	所占比例%
单核苷酸	834	26.12
二核苷酸	14	0.44
三核苷酸	7	0.22
四核苷酸	1	0.03
五核苷酸	3	0.09
复合核苷酸	2 334	73.10

标准和数据库的完整性都会对 EST-SSR 的出现频率产生影响^[26-27]。

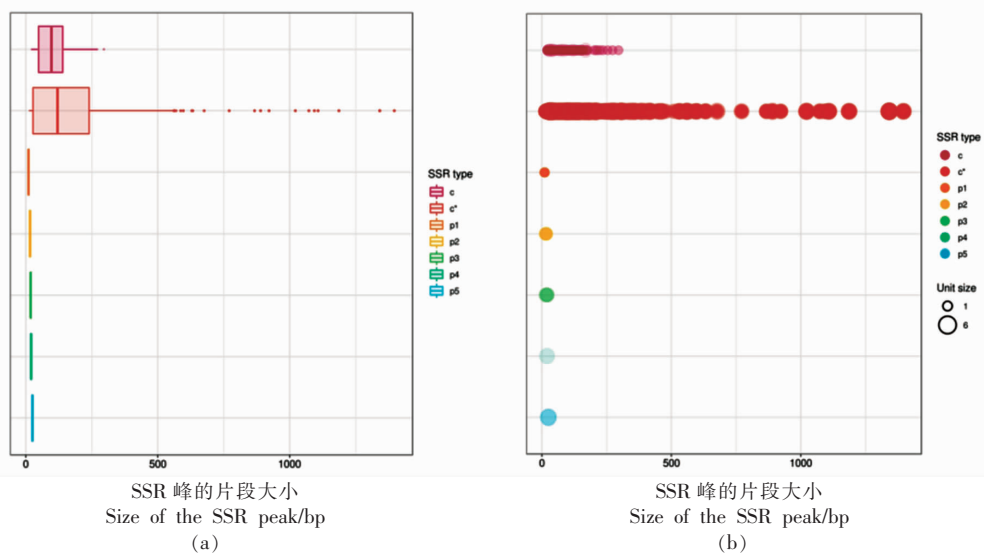


图 2 绵羊基因组 EST-SSR 重复单元分布图

Fig.2 Distribution map of the EST-SSR repeat units in the sheep genome

2.3 3 种绵羊 EST-SSR 引物的筛选

经 PCR 扩增及毛细管电泳检测结果发现,50

对引物中,只有 4 对 EST-SSR 引物成功扩增出稳定条带,4 对引物详细信息见表 4。

表 4 EST-SSR 引物信息

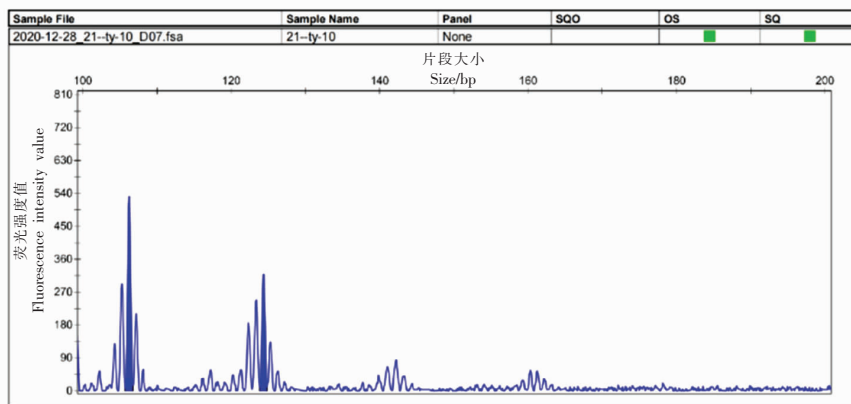
Table 4 Primer information for EST-SSR

引物编号	引物序列	产物大小/bp	退火温度/°C
p2105.1:248-559	F: CCCTGATTCTAGTGCCAAA R: GCAGAGGATGGGCTGTTTA	108	60.066
p2104.1:704-1015	F:GCCGGTTAAGAAACTCACCA R:GTTCAGGTGCCCTTTGTTGT	106	60.012
p2025.1:896-1059	F:ACCAACCACITTTATCCCCC R:ACCCCTTGTCTCTTTTGG	111	60.332
p2092.1:682-993	F:TGTGTAATACTTGCTATCATGAGTTTT R:ACAACGACGTCCACAGAACA	181	60.428

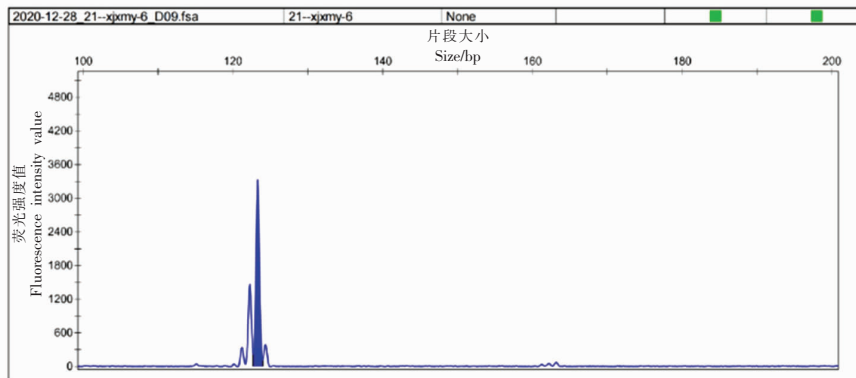
2.4 3 种绵羊 EST-SSR 引物的特异性分析

通过对 3 个品种绵羊的 50 个 EST-SSR 引物的峰图进行分析,有 3 对引物能够产生高度特异性扩增片段,可以用于区分 3 个绵羊肉品种。图 3、图 4、图 5 分别是使用引物 p2105.1:248-559、p2025.1:896-1059 和 p2104.1:704-1015 的宁夏滩羊、新疆细毛羊和藏绵羊的毛细管电泳结果。

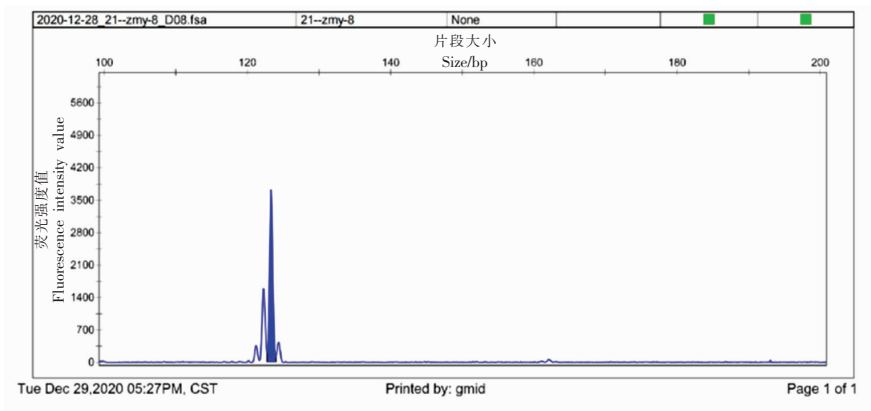
2.4.1 宁夏滩羊引物特异性分析 由图 3 可知,使用引物 p2105.1:248-559 的宁夏滩羊毛细管电泳结果有两个明显的特征峰,特征值大小为 106.27 bp 和 124.32 bp;而新疆细毛羊和藏绵羊均只有一个特征峰,特征数据大小分别为 123.28 bp 和 123.32 bp。由此可见:p2105.1:248-559 对宁夏滩羊源性肉特异性良好,可将滩羊与另外两绵羊



(a)滩羊



(b)新疆细绵羊



(c)藏绵羊

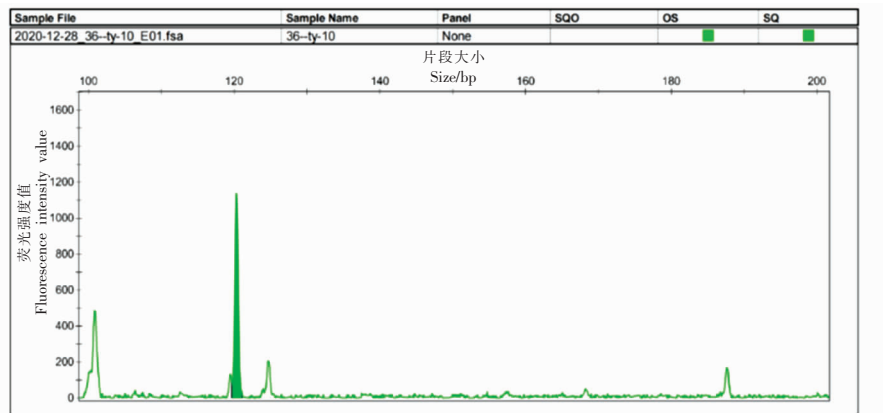
图3 绵羊基因组 p2105.1:248-559 位点 SSR 电泳图

Fig.3 The electrophoresis results of SSR of p2105.1:248-559 site of sheep genomic

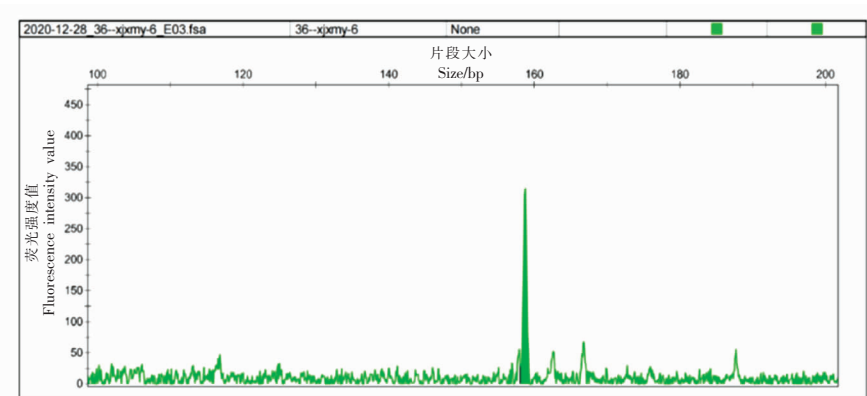
品种进行区分。

2.4.2 新疆细毛羊引物特异性分析 由图4可知,使用引物 p2025.1:896-1059 的新疆细毛羊的特征值大小为 158.77 bp;宁夏滩羊的特征数据大

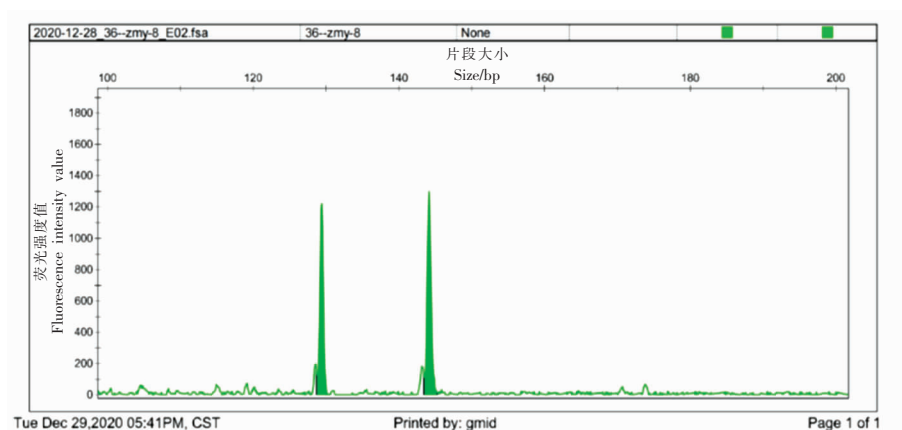
小为 120.27 bp;藏绵羊的特征数据大小为 129.42 bp 和 124.13 bp。由此可见:p2025.1:896-1059 可将新疆细毛羊与宁夏滩羊和藏绵羊进行区分。



(a)滩羊



(b)新疆细绵羊



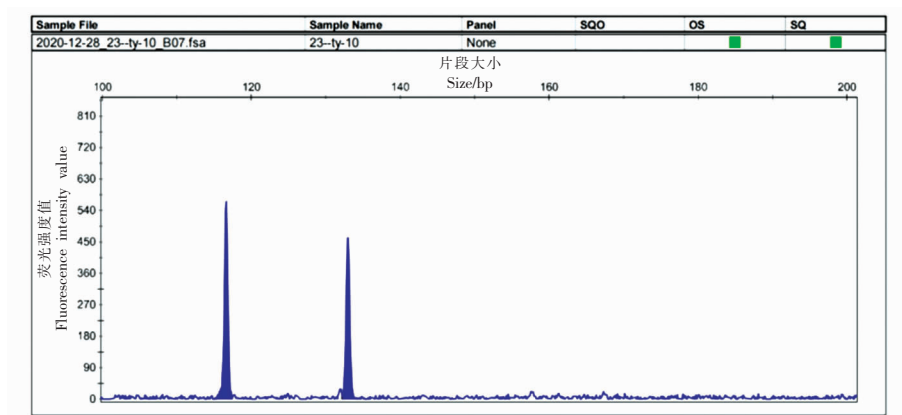
(c)藏绵羊

图 4 绵羊基因组 p2025.1:896-1059 位点 SSR 电泳图

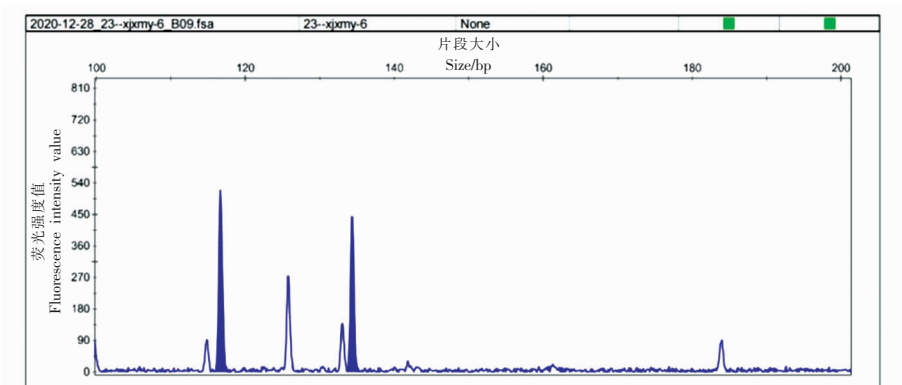
Fig.4 The electrophoresis results of SSR of p2025.1:896-1059 site of sheep genomic

2.4.3 藏绵羊引物特异性分析 由图 5 可知,使用引物 p2104.1:704-1015 的藏绵羊只有一个特征峰,特征值大小为 153.06 bp;对新疆细毛羊和宁夏滩羊均有二个特征峰,特征值大小分别为

116.64, 134.31 bp 和 116.63, 132.92 bp。由此可见:p2104.1:704-1015 对藏绵羊源性肉特异性良好,可以对藏绵羊与另外两绵羊进行区分。



(a)滩羊



(b)新疆细绵羊

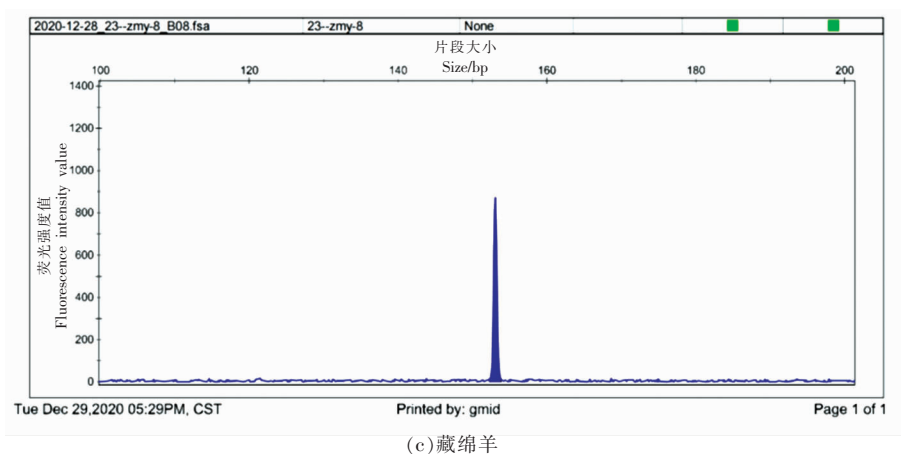


图5 绵羊基因组 p2104.1:704-1051 位点 SSR 电泳图

Fig.5 The electrophoresis results of SSR of p2104.1:704-1051 site of sheep genomic

2.5 特异性引物的有效性与适用性检验结果

2.5.1 DNA 质量评估 对3种绵羊的肝脏和肌肉DNA进行质量评估,结果显示:肌肉DNA的A260/A280比值为 1.80 ± 0.04 ,肝脏DNA的A260/A280比值为 1.82 ± 0.03 ,表明DNA质量好。所提取肌肉DNA的质量浓度为 (125.6 ± 0.02) ng/ μ L,总量50 μ L;肝脏DNA的质量浓度为 (128.9 ± 0.01) ng/ μ L,总量50 μ L。由此可知,在相同体积下,肝脏DNA的质量浓度更高。本试验结果与前人研究结果一致^[28-29]。

2.5.2 EST-SSR 3条引物的毛细管电泳检测结果

2.5.2.1 宁夏滩羊 将提取的宁夏滩羊、新疆细毛羊和藏绵羊肝脏DNA用引物 p2105.1:248-559 分别扩增后,进行毛细管电泳检测。结果显示,引物 p2105.1:248-559 对宁夏滩羊有两个特征峰,特征值均在106 bp和114 bp上下波动;对于藏绵羊和新疆细毛羊都只有一个特征峰,特征值在120 bp上下波动,充分说明引物 p2105.1:248-559 能够检测到其中L1~5,共5只绵羊为宁夏滩羊(表5)。将提取的宁夏滩羊、新疆细毛羊和藏绵羊肌肉DNA用引物 p2105.1:248-559 分别扩增并进行毛细管电泳检测,发现引物 p2105.1:248-559 同样对宁夏滩羊有两个特征峰,对于藏绵羊和新疆细毛羊都只有一个特征峰,且对于3种绵羊肉的肌肉鉴别结果的特征值合理,能够成功检测到其中M1~5,共5只绵羊为宁夏滩羊(表5);验证结果与试验前的形态学标记一致。

2.5.2.2 新疆细毛羊 将提取的新疆细毛羊、宁

夏滩羊和藏绵羊肝脏DNA用引物 p2025.1:896-1059 分别扩增后,进行毛细管电泳检测。结果显示,引物 p2025.1:896-1059 对新疆细毛羊的特征值在158 bp的范围内,对于宁夏滩羊的特征值在120.27 bp;藏绵羊的特征值在129 bp和124 bp范围内,特征值有明显差异,因此 p2025.1:896-1059 引物能够检测到其中L6~10,共5只绵羊为新疆细毛羊(表5)。将提取的宁夏滩羊、新疆细毛羊和藏绵羊肌肉DNA用引物 p2025.1:896-1059 分别扩增并进行毛细管电泳检测。结果发现,引物 p2025.1:896-1059 对于新疆细毛羊、宁夏滩羊和藏绵羊的肌肉DNA的特征值波动合理,说明 p2025.1:896-1059 荧光引物有良好的鉴别范围,能够检测到其中M6~10,共5只绵羊为新疆细毛羊(表5);试验结果与实验前的形态学标记结果一致。

2.5.2.3 藏绵羊 将提取的藏绵羊、宁夏滩羊和新疆细毛羊肝脏DNA用引物 p2104.1:704-1015 分别扩增后,进行毛细管电泳检测。毛细管电泳的峰图显示,引物 p2104.1:704-1015 对于藏绵羊只有一个特征峰,特征值均在153 bp的范围内上下波动;对于宁夏滩羊和新疆细毛羊都有两个特征峰,两个特征峰的特征值都在116 bp和132 bp范围内浮动,提示引物 p2104.1:704-1015 能够检测到其中L11~15,共5只绵羊为藏绵羊(表5)。将提取的宁夏滩羊、新疆细毛羊和藏绵羊肌肉DNA用引物 p2104.1:704-1015 分别扩增后,进行毛细管电泳检测,发现引物 p2104.1:704-1015 对于肌肉

样本的峰的数量和特征值均与肝脏样本一致,可以得出荧光引物 p2104.1:704-1015 能够检测到 M11~15 共 5 只绵羊为藏绵羊(表 5);此验证结果与试验前的形态学标记结果一致。

此验证结果表明通过 EST-SSR 方法获得的

荧光引物 p2105.1:248-559、p2025.1:896-105 和 p2104.1:704-1015 分别对宁夏滩羊、新疆细毛羊和藏绵羊特异性良好,可对 3 种绵羊肉品种进行区分。

表 5 EST-SSR 引物验证结果

Table 5 EST-SSR primer verification results

引物编号	样品编号	特征值/bp		
		宁夏滩羊	新疆细毛羊	藏绵羊
p2105.1:248-559	L1	106.27, 114.32	123.28	120.32
	L2	106.45, 114.22	123.37	123.31
	L3	106.34, 114.25	123.54	123.42
	L4	106.51, 114.08	121.79	123.81
	L5	106.53, 114.12	123.23	120.32
	M1	107.17, 114.36	122.88	122.91
	M2	108.13, 113.52	122.28	122.92
	M3	106.87, 114.19	123.81	123.07
	M4	108.79, 114.24	123.18	123.35
	M5	106.27, 114.32	124.09	123.26
p2025.1:896-1059	L6	119.45	157.97	130.21, 123.93
	L7	121.17	160.21	129.42, 124.13
	L8	118.27	159.64	128.99, 125.42
	L9	120.03	157.63	128.28, 123.47
	L10	115.22	159.88	127.47, 124.13
	M6	119.42	160.51	129.42, 126.09
	M7	121.23	159.62	130.41, 126.25
	M8	117.07	160.14	130.57, 124.65
	M9	119.01	158.55	129.81, 124.99
	M10	119.97	159.38	127.94, 125.03
p2104.1:704-1015	L11	116.59, 132.81	116.59;134.91	153.06
	L12	116.46, 132.96	115.71;135.13	152.97
	L13	116.49, 132.79	116.83;134.75	153.21
	L14	115.51, 131.95	116.57;134.94	153.14
	L15	116.68, 132.82	116.59;134.71	152.85
	M11	116.53, 132.75	117.86;135.03	153.01
	M12	115.65, 131.77	116.65;135.01	152.83
	M13	116.76, 131.95	116.96;134.64	153.29
	M14	117.83, 131.87	116.88;134.73	153.37
	M15	116.81, 132.71	116.73;134.84	152.88

3 结论

本文采用 Rapid Animal Genomic DNA Isolation Kit 试剂盒提取宁夏滩羊、新疆细毛羊和藏绵羊的肝脏 DNA,并以 EST 数据库为基础,通过 SSR Finder 软件及 MISA 技术检测序列中的

EST-SSR 位点。Fast QC 可视化 SSR 位点结果显示,共计 3 193 个有效 EST-SSR 位点序列,其中复合 SSR 重复序列(73.10%)>单核苷酸(26.12%)>二核苷酸(0.44%)>三核苷酸(0.22%)>五核苷酸(0.09%)>四核苷酸(0.03%),说明绵羊 EST-SSR

的优势序列重复类型为复合 SSR 重复序列。使用毛细管电泳检测 SSR 分型,发现引物 p2105.1:248-559、p2104.1:704-1015 和 p2104.1:704-1015 分别对 3 种绵羊肉特异性良好,能够实现对此 3 种绵羊肉的有效区分。将 EST-SSR 标记技术应用于宁夏滩羊肉、新疆细毛羊肉和藏绵羊肉的鉴别中,成功验证了 3 条引物的有效性与适用性,这对于地方绵羊品种遗传资源的开发利用、品种鉴别及丰富分子标记类型具有重要的意义。

参 考 文 献

- [1] 罗荣松. 奶绵羊与蒙古羊全基因组选择信号和 DNA 甲基化差异研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2020. LUO R S. Differences in genomic selection signals and dnamethylation between dairy sheep and mongolian[D]. Hohhot: University of Inner Mongolia University, 2020.
- [2] 徐红艳. 复配香辛料精油处理对藏羊肉贮藏期内品质变化分析及货架期模型构建[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2020. XU H Y. Analysis of quality change in storage period and construction of shelf life model of mixed flavor essential oil treatment[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2020.
- [3] 王松磊, 吴龙国, 马天兰, 等. 高光谱技术的羊肉品种多波段识别研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2016, 36(9): 2937-2945. WANG S L, WU L G, MA T L, et al. Study on multiband identification of mutton varieties by hyperspectral technology [J]. Spectroscopy and spectral analysis, 2016, 36(9): 2937-2945.
- [4] 宋亚倩, 杨波, 罗瑞明, 等. 基于 SSR 标记技术对三种国产绵羊肉的品种鉴别分析[J/OL]. 食品科学, (2021-04-30)[2021-09-03]. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=DbNU1Fi_fRWiXWT4QnXl-sqfWsK_j-sGYiV9K_ZztJoD6u9e5NveRdbTdaBY3JwaY12V6XVsx1fxzhKOamW_EUCBBpy-QbIsdZlTkYpGRQtR4ArZvQqzIqq8zrN1SuvIafe-qWkb2_DI=&uniplatform=NZKPT&language=CHS&version=LYDG. SONG Y Q, YANG B, LUO R M, et al. Identification and analysis of three domestic sheep meat varieties based on SSR marker technology [J/OL]. Food Science, (2021-04-30)[2021-09-03]. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=DbNU1Fi_fRWiXWT4QnXl-sqfWsK_j-sGYiV9K_ZztJoD6u9e5NveRdbTdaBY3JwaY12V6XVsx1fxzhKOamW_EUCBBpy-QbIsdZlTkYpGRQtR4ArZvQqzIqq8zrN1SuvIafe-qWkb2_DI=&uniplatform=NZKPT&language=CHS&version=LYDG.
- [5] 闫香国, 马军德. 振兴以新疆细毛羊保种选育为纽带的细毛羊产业[J]. 农家参谋, 2021(14): 146-147. YAN X G, MA J D. Revitalization the fine wool sheep industry linked by the breeding of Xinjiang fine wool sheep[J]. Farmer Staff, 2021 (14): 146-147.
- [6] DABAB N L, ALSAMMAN M, ALADDIN H, et al. Functional description and development of polymorphic EST-SSR markers in bread wheat and their gene interactions network [J]. Gene Reports, 2020, 21: 100902.
- [7] JIANG Y M, XU S, WANG R, et al. Characterization, validation, and cross-species transferability of EST-SSR markers developed from lycoris aurea and their application in genetic evaluation of lycoris species[J]. BMC Plant Biology, 2020, 20(1): 522-522.
- [8] 甘宝江, 庞美霞, 俞小牧, 等. 基于 G-SSR 和 EST-SSR 标记的鲫 6 个群体遗传结构分析[J]. 水生生物学报, 2018, 42(3): 451-462. GAN B J, PANG M X, YU X M, et al. Genetic diversity and structure of crucian carp (*Carassius auratus*) based on G-SSR and EST-SSR markers [J]. Aquatic Biology Newspaper, 2018, 42 (3): 451-462.
- [9] 曾美娟, 刘建汀, 卓玲玲, 等. 茄子 EST-SSR 分子标记的鉴定及多态性分析[J]. 中国细胞生物学学报, 2020, 42(8): 1366-1373. ZENG M J, LIU J T, ZHUO L L, et al. Identification and polymorphism analysis of EST-SSR molecular markers in eggplant[J]. The Chinese Journal of Cell Biology, 2020, 42(8): 1366-1373.
- [10] 马文瑞. 基于 SSR 标记技术的酿酒葡萄品种 DNA 指纹图谱的研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2018. MA W R. DNA fingerprinting of wine grape varieties based on SSR labeling technology[D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2018.
- [11] 盛文涛, 邓建兰, 饶友生, 等. 基于 NCBI 数据库芦笋 EST-SSR 标记的开发[J]. 分子植物育种, 2019, 17(13): 4307-4313.

- SHENG W T, DENG J L, RAO Y S, et al. Development of the asparagus EST-SSR markers based on the NCBI database[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17(13): 4307-4313.
- [12] 陈春艳, 马杰, 屈雯, 等. 基于转录组序列的胡萝卜 EST-SSR 标记开发及遗传多样性分析[J/OL]. *分子植物育种*, (2021-03-18)[2021-09-03]. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=DbNU1Fi_fRUCUXo31Os_YEhJzWtgGp7HB6QJyIOkWam09QVhjSyAxcyGtLX2AjrPR9IXABMMAI52MvAcWHGcJRyi0919A1hNTfojTmiBHa35RvulbYQET8DyMdONTfc9EXx-6b0Zqx8=&uniplatform=NZKPT&language=CHS&version=LYDG.
- CHEN C Y, MA J, QU W, et al. Development of carrot EST-SSR markers and genetic diversity analysis based on transcriptome sequence[J/OL]. *Molecular Plant Breeding*, (2021-03-18)[2021-09-03]. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=DbNU1Fi_fRUCUXo31Os_YEhJzWtgGp7HB6QJyIOkWam09QVhjSyAxcyGtLX2AjrPR9IXABMMAI52MvAcWHGcJRyi0919A1hNTfojTmiBHa35RvulbYQET8DyMdONTfc9EXx-6b0Zqx8=&uniplatform=NZKPT&language=CHS&version=LYDG.
- [13] 吕冰冰, 代畅, 彭正松, 等. 一组新的小麦 EST-SSR 标记开发及其在遗传图谱构建中的应用[J]. *华北农学报*, 2020, 35(4): 57-63.
- LÜ B B, DAI C, PENG Z S, et al. Development of a new set of wheat EST-SSR markers and their application in genetic map construction [J]. *North China Agricultural Journal*, 2020, 35(4): 57-63.
- [14] 杨雄, 杨宁, 袁启华, 等. 白皮松 EST-SSR 分子标记的开发及应用[J]. *北京林业大学学报*, 2021, 43(7): 1-11.
- YANG X, YANG N, YUAN Q H, et al. Development and application of molecular markers for EST-SSR[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2021, 43(7): 1-11.
- [15] 陈智武, 沈前程, 朱春红, 等. 鸡基因组 DNA 不同提取方法的比较[J]. *中国家禽*, 2017, 39(17): 64-66.
- CHEN Z W, SHEN Q C, ZHU C H, et al. Comparison of different extraction methods for chicken genomic DNA[J]. *Poultry in China*, 2017, 39(17): 64-66.
- [16] 闫秋良. 基于生物信息学方法从牛和绵羊表达序列标签中筛选 SSR 标记的初步研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007.
- YAN Q L. Preliminary study of screening SSR markers from cattle and sheep expressed sequence tags based on bioinformatics methods[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2007.
- [17] 王解香, 于凌云, 白俊杰, 等. 草鱼 EST-SSR 标记及 5 个不同地域群体的遗传结构分析[J]. *动物学杂志*, 2011, 46(5): 24-32.
- WANG X X, YU L Y, BAI J J, et al. Analysis of grass carp EST-SSR markers and the genetic structure of five different regional populations[J]. *Journal of Zoology*, 2011, 46(5): 24-32.
- [18] GAO J, CHENG A C, WANG M S. Bioinformatics analysis of the complete nucleotide sequence of the duck enteritis virus (dev) *Us2* gene[J]. *Advanced Materials Research*, 2012, 1611(424/425): 484-487.
- [19] 贾超峰, 马海涛, 姜海滨, 等. 许氏平鲷微卫星标记的开发及评价[J]. *上海海洋大学学报*, 2014, 23(3): 345-350.
- JIA C F, MA H T, JIANG H B, et al. Development and evaluation of microsatellite markers of Scorpene Xu[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2014, 23(3): 345-350.
- [20] 罗伟. 团头鲂 EST-SSR 的开发及在育种中的应用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
- LUO W. Development of EST-SSR and its application in breeding[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014.
- [21] QU C M, LIANG X F, HUANG W, et al. Isolation and characterization of twenty-nine novel EST-SSR markers in *Siniperca undulata* [J]. *Journal of Genetics*, 2016, 93(2): 116-120.
- [22] 张维伟, 梁业松, 何靖, 等. 雌核发育棕点石斑鱼 EST-SSR 的开发验证[J]. *海南大学学报 (自然科学版)*, 2019, 37(2): 140-147.
- ZHANG W W, LIANG Y S, HE J, et al. Development validation of EST-SSR[J]. *Journal of Hainan University (Natural Science Edition)*, 2019, 37(2): 140-147.
- [23] CUMMINGS M, KING H, HURST J, et al. Decreasing formalin concentration improves quality of DNA extracted from formalin-fixed paraffin-embedded tissue specimens without compromising tissue morphology or immunohistochemical staining[J]. *Journal of Clinical Pathology*, 2020, 73(8): 514-518.
- [24] DEAR J D, SYKES J E, BANNASCH D L. Quality

- of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded canine tissues[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2020, 32(4): 17-23.
- [25] SINGH H, DESHMUKH R K, SINGH A, et al. Highly variable SSR markers suitable for rice genotyping using agarose gels [J]. *Molecular Breeding*, 2010, 25(2): 359-364.
- [26] 卢玮筱, 陈永霞, 祁鹏志. 扁玉螺转录组 SSR 信息分析[J]. *浙江海洋大学学报 (自然科学版)*, 2018, 37(3): 215-220.
- LU W Q, CHEN Y X, QI P Z. SSR information analysis of the transcriptome [J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science Edition)*, 2018, 37(3): 215-220.
- [27] RAJEEV K, GRANER A, SORRELLS M E. Genic microsatellite markers in plants: Features and applications[J]. *Trends in Biotechnology*, 2005, 23(1): 48-55.
- [28] 李龙飞, 汉丽梅, 李一帆, 等. 不同部位取样对鸡基因组 DNA 提取的效果的影响[J]. *饲料工业*, 2016, 37(8): 55-57.
- LI L F, HAN L M, LI Y F, et al. Effect of different site sampling on the effect of chicken genomic DNA extraction[J]. *Feed Industry*, 2016, 37(8): 55-57.
- [29] 蔡振媛, 张同作, 连新明, 等. 一种提取动物基因组总 DNA 的野外样品保存方法[J]. *四川动物*, 2006(3): 473-477.
- CAI Z Y, ZHANG T Z, LIAN X M, et al. A method for field sample preservation of total DNA extracted from animal genomes[J]. *Sichuan Animals*, 2006(3): 473-477.

Identification and Specificity Analysis of EST-SSR Molecular Markers in Sheep

Ma Xiaomei, Song Yaqian, Luo Ruiming*

(School of Food and Wine, Ningxia University, Yinchuan 750021)

Abstract In this paper, SSR sites were screened from the sheep expression sequence tag in NCBI system (EST) database by SSR Finder software and MISA technology, and sheep EST-SSR fluorescent primers were designed using Primer 3.0 to differentiate the products of Ningxia Tan lamb, Xinjiang fine-wool sheep meat and Tibetan lamb. Experiments were PCR amplified using liver DNA from three sheep as templates for designed EST-SSR primers and detected SSR typing using capillary electrophoresis. The results showed that the fluorescent primers p2105.1:248-559, p2025.1:896-1059 and p2104.1:704-1015 designed by EST-SSR labeling showed good specificity in Ningxia Tan mutton, Xinjiang fine lamb and Tibetan mutton, indicating that the distinction of three sheep varieties was achieved. This study accurately judged the varieties of three pure-bred mutton through EST-SSR marker technology science, which was of important significance for the development and utilization of sheep genetic resources, variety identification and rich molecular marker types.

Keywords sheep; EST-SSR; primer design; specificity analysis