

AFLP 标记在小香羊遗传多态性检测中的应用*

苟本富^{①②} 叶华虎^③ 魏泓^{③**} 邹国林^{①**}

(①武汉大学生命科学院 武汉 430072; ②渝西学院生命科学系 重庆 402168;

③第三军医大学实验动物中心 重庆 400038)

摘要: 研究了 AFLP 标记在研究小香羊遗传多态性方面应用的可行性和该山羊个体基因组 DNA 的 AFLP 扩增结果。实验应用 10 条 AFLP 引物,用 *Pst* I 酶切,对 15 只小香羊基因组 DNA 进行 AFLP 反应,共获得 113 个 AFLP 标记,单引物获得的标记数在 2~19 之间,小香羊群体相似系数 AFLP 研究结果为 0.913 (0.814~0.980)。该研究为评价小香羊的遗传稳定性提供了相关的参数,准确评价尚待和其它品种对比研究后确定。

关键词: 小香羊;遗传多态性;遗传相似系数;AFLP

中图分类号: Q953 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2003)05-45-05

Application of AFLP in Genetic Polymorphism Monitoring of Miniature Xiang Goats

GOU Ben-Fu^{①②} YE Hua-Hu^③ WEI Hong^③ ZOU Guo-Lin^①

(① College of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072;

② School of Life Science, Western Chongqing College, Chongqing 402168;

③ Laboratory Animal Center, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: The AFLP markers were applied to detect genetic polymorphic loci in miniature Xiang goats. Ten AFLP primers were used, and genomic DNA from 15 goats were analyzed. A total of 113 AFLP markers were obtained, and the marker numbers of individual primer were between 2 to 19. The results indicate that the AFLP marker is suitable for analyzing genetic polymorphism in goat and that (2) the similarity index of population in miniature Xiang goats was 0.913 (0.814 to 0.980).

Key words: Miniature Xiang goat; Genetic polymorphism; Genetic similarity coefficient; AFLP (amplified fragment length polymorphism)

山羊是一种适应性强、分布广且品种资源十分丰富的家畜,其品种遗传资源是人类赖以生存的宝贵基因库之一,是山羊育种不可缺少的重要的遗传材料。小香羊^[1,2]产于贵州省偏远的侗族聚居地,以个体小、膻味轻、肉质细嫩,烹饪加工后香气逼人而得名,该种群是经过长期的地理隔离和近亲繁殖形成的优良地方山羊群体,是较为理想的实验用羊资源。目前我国科技工作者在分子水平对其研究不多,相关资

料较少,仅见简承松等^[3]和杨家大等^[4]的报道。为了更好地对其进行保护和开发利用,从分子水平上对其遗传多态性进行研究就具有十分重

* 国家自然科学基金资助项目(No.30070120);

** 通讯作者;

第一作者介绍 苟本富,34岁,男,讲师,硕士;研究方向:应用分子生物学;现在渝西学院生命科学系;E-mail: goubenfu2032@sina.com。

收稿日期:2002-11-30,修回日期:2003-07-05

要的理论和实践意义。

AFLP (amplified fragment length polymorphism) 技术^[5-7]是 20 世纪 90 年代发展起来的一项新技术, 由于该方法除具有其它 DNA 分子标记的特点外, 还具有带纹丰富、用样量少、灵敏度高、快速高效、稳定性好等优点, 已迅速渗透到遗传分析的各个领域^[8-15], 但还未见到用 AFLP 技术对山羊基因组 DNA 的遗传检测方面的报道。因此作者利用 AFLP 技术对小香羊基因组 DNA 的遗传多态性进行了检测研究, 并对该品系山羊的群体遗传结构进行了分析, 旨在探讨 AFLP 标记在研究山羊遗传多态性方面的应用, 评价小香羊的遗传稳定性, 为我国地方山羊品种的遗传分化研究以及合理利用和保护提供新的科学方法和研究手段。

1 材料与方 法

1.1 羊血的来源 小香羊血样以随机采样的方式采自贵州省榕江县塔石乡饲养小香羊的不同的农户。

1.2 仪器和试剂 10 × buffer、*Taq* 酶、 Mg^{2+} 均为 Sangon 公司产品, dNTP 为德国 BM 公司产品, T_4 -DNA 酶、*Pst* I 和 *Taq* I 为美国 Premaga 公司产品, AFLP 接头与引物均由上海基康公司合成, 接头序列如下: 5'-GACGTGACGGCCGTCATGCA-3', 3'-GCACTG-CCGGCAGT-5'。根据接头序列设计出相应的 AFLP 引物, 引物表现为 3'-端具有 3 个选择碱基, 引物编号和序列见表 1。

1.3 方 法

1.3.1 DNA 的提取 随机抽取小香羊 15 头, 前腔静脉取血, 按照萨姆布鲁克等^[16]的方法制备基因组 DNA。

1.3.2 AFLP 模板制备 基因组 DNA 的酶切和接头的连接在同一反应中进行: 20 μ l 的反应体系中, 含基因组 DNA 0.2 μ g, 接头 0.2 μ g, *Pst* I 酶 20 U, T_4 DNA 连接酶 2 U, 1 mmol/L ATP。37℃反应 1 h、20℃反应 1 h 为 1 循环, 共 5 次, 接 70℃灭活 10 min 后, 用灭菌双蒸水将反应液稀释到 100 μ l, 置 4℃备用。

表 1 AFLP 引物编号、序列及扩增小香羊的遗传多样性参数

引物	序列	GC 含量 (%)	扩增带数	N_p 多态位点数	$P(\%)$ 多态位点比率
1	GACGGCCGTCATGCAGagg	68	3~10	2	28.6
2	GACGGCCGTCATGCAGace	68	5~12	3	33.3
3	GACGGCCGTCATGCAGeag	68	6~13	4	44.4
4	GACGGCCGTCATGCAGaca	63	2~9	3	37.5
5	GACGGCCGTCATGCAGega	68	3~11	2	25.0
6	GACGGCCGTCATGCAGgat	63	7~19	6	42.9
7	GACGGCCGTCATGCAGgct	68	5~11	3	37.5
8	GACGGCCGTCATGCAGgac	68	4~8	2	33.3
9	GACGGCCGTCATGCAGgtc	68	7~14	4	36.4
10	GACGGCCGTCATGCAGtct	63	3~8	2	33.3

1.3.3 PCR 反应 25 μ l 的反应体系中含有 10 × buffer 2.5 μ l, Mg^{2+} 1.5 mmol/L, dNTP 200 μ mol/L, 引物 100 ng, 模板 10 ng, *Taq* 酶 1 U。反应条件为 94℃变性 0.5 min, 60℃退火 1 min, 72℃延伸 1.5 min, 35 个循环后接 10 min 延伸。扩增产物用含 EB(0.5 μ g/ml) 的 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 紫外检测仪上观察, 拍照。

1.4 遗传多样性的评价

1.4.1 相似系数和遗传距离 统计各样品的 AFLP 标记数, 以“1, 0”分别表示扩增带的有无, 仅计算清晰和稳定的条带, 任意两个体遗传相似系数 (F) 亦即遗传相似度 (genetic similarity) 根据 Nei 等^[17]公式 $F = 2N_{xy}/(N_x + N_y)$ 进行计算, 其中 N_{xy} 为个体 X 和个体 Y 共有片段数, N_x 为 X 个体所扩增片段总数, N_y 为 y 个体所扩增片段总数。 F 值越大, 遗传变异程度越小, 因此任意两个体间的遗传距离 (L) 可以根据两个体间的相似系数 (F) 来计算, 即 $L = 1 - F$ 。根据遗传相似系数和遗传距离可以反映个体间的亲缘关系的远近和遗传变异的大小。

1.4.2 多态位点的比率 P $P = (k/n) \times 100\%$, k 为多态位点数, n 为检测位点总数。

2 结 果

2.1 基因组 DNA 的扩增结果 研究中所用的 10 条 AFLP 引物都扩增出清晰的条带, 每条引

物扩增带的数目在 2~19 条之间不等,共扩增出 113 条带,即检测了 15 只羊的 113 个位点。

每条引物的扩增结果在 15 只羊间都表现出不同程度的个体间多态性(如图 1)。

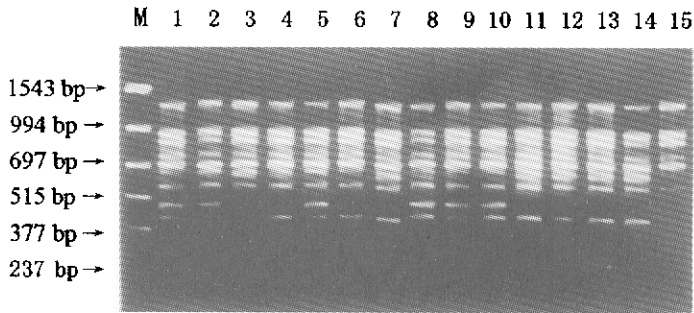


图 1 6 号引物扩增 15 只羊的结果

1~15. 分别代表 15 只羊个体;M. 为分子量标准(PCR Marker)

2.2 多态位点数及多态位点的比率 从表 1 可以看出,不同引物扩增的多态性位点数与多态性位点数的比率不同。在所检测的 113 个位点中,31 个位点具多态性,多态性位点百分率为 27.4%,其中引物 3 检测的多态位点百分率最高,达 44.4%,引物 5 所检测多态位点百分率最低,为 25.0%。

2.3 群体内的相似系数和个体间的遗传距离 小香羊群体内的相似系数位于 0.814~0.980

之间,平均为 0.913(表 2)。就单个引物来讲,个体间的相似系数位于 0.796~0.985 之间,其中引物 3 的扩增结果(0.796)在小香羊个体间的相似系数最小,引物 5 的扩增结果(0.985)在 15 只小香羊个体间的相似系数最大。根据 15 只羊间的相似系数,可得到相互间的遗传距离(表 2),在小香羊的 15 只个体中,彼此间的遗传距离最大为 0.186,最小为 0.020。

表 2 个体间的片段相似性和遗传距离

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1		0.94	0.95	0.85	0.96	0.97	0.93	0.90	0.89	0.95	0.92	0.87	0.86	0.94	0.89
2	0.06		0.94	0.87	0.90	0.85	0.87	0.94	0.86	0.89	0.84	0.86	0.88	0.84	0.88
3	0.05	0.06		0.98	0.95	0.90	0.92	0.96	0.93	0.86	0.95	0.91	0.90	0.92	0.87
4	0.15	0.13	0.02		0.87	0.81	0.82	0.85	0.88	0.87	0.81	0.88	0.93	0.88	0.90
5	0.04	0.10	0.05	0.13		0.93	0.90	0.91	0.94	0.97	0.88	0.94	0.89	0.95	0.86
6	0.03	0.15	0.10	0.19	0.07		0.95	0.87	0.88	0.90	0.93	0.82	0.91	0.85	0.84
7	0.07	0.13	0.08	0.18	0.10	0.05		0.91	0.87	0.93	0.91	0.89	0.85	0.86	0.90
8	0.10	0.06	0.04	0.15	0.09	0.13	0.09		0.82	0.85	0.89	0.84	0.87	0.82	0.84
9	0.11	0.14	0.07	0.12	0.06	0.12	0.13	0.18		0.93	0.92	0.96	0.84	0.87	0.92
10	0.05	0.11	0.14	0.13	0.03	0.10	0.07	0.15	0.07		0.89	0.88	0.92	0.93	0.88
11	0.08	0.16	0.05	0.19	0.12	0.07	0.09	0.11	0.08	0.11		0.90	0.97	0.91	0.93
12	0.13	0.14	0.09	0.12	0.06	0.18	0.11	0.16	0.04	0.12	0.10		0.94	0.88	0.91
13	0.14	0.12	0.10	0.07	0.11	0.09	0.15	0.13	0.16	0.08	0.03	0.06		0.90	0.84
14	0.06	0.16	0.08	0.12	0.05	0.15	0.14	0.18	0.13	0.07	0.09	0.12	0.10		0.94
15	0.11	0.12	0.13	0.10	0.14	0.16	0.10	0.16	0.08	0.12	0.07	0.09	0.16	0.06	

1~15, 分别代表 15 只羊个体; 对角线以上为片段相似性, 对角线以下为遗传距离

3 讨 论

3.1 AFLP 方法研究山羊遗传关系的有效性

本研究拟用 AFLP 标记,从 DNA 水平对小香羊的遗传多样性进行分析,得出相关的遗传多样性参数,为准确评价小香羊的遗传稳定性提供参考。本研究标记多态频率为 27.4%,DNA 指纹相似系数为 0.913,而王志勇^[18]等人对中国沿海真鲷群体的遗传变异研究得出的遗传相似系数为 0.820 0~0.842 5,吴丰春^[13]等人对贵州小香猪基因组 DNA 的 AFLP 检测中得出的遗传相似系数为 0.760~0.967 之间,平均为 0.866。本研究得出的遗传相似系数相对较高,而相似系数(F)是评价遗传变异程度的可靠参数, F 值越大,个体间的血缘关系越近,遗传变异越小,说明 AFLP 技术用于山羊 DNA 遗传多样性的研究具有较高的灵敏度。本研究标记适宜于小香羊基因组 DNA 的遗传检测,尤其是对近交程度较高、遗传背景差异较小的群体。这种高效的遗传检测技术必将对动物的遗传检测起到积极的推动作用。AFLP 技术自创建以来,在广泛应用的基础上不断改进。本研究所采用的 AFLP 技术在 Zabeau 和 Vos^[5]等创建的技术上进行了简化,经典的 AFLP 法需经过双酶切和两次选择性扩增,而本实验采用单酶切,同时酶切和连接在同一反应体系中进行,只进行一轮 PCR 扩增,扩增产物经含溴化乙锭的琼脂糖凝胶电泳检测而不是经放射性标记后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,因而本实验更加快捷、方便。陈洪^[12]和吴丰春^[13]及 Picardeau^[19]等都分别证明单酶切法同样可以得到可靠的检测结果。

3.2 多态性 AFLP 引物的应用分析

本研究所用的 10 条引物都是在以多个品系羊的 DNA 库进行品系间 AFLP 研究的基础上,从 40 条引物中筛选出的具有品系间多态性的引物。但是,在实际研究中发现,即使在品系间具有多态性的引物,应用于品系内个体不一定具多态性;在品系间无多态性的引物,应用于品系内个体不一定无多态性。因为个体 DNA 在 DNA

库中所占的比例少,因此在扩增时多态性片段与引物结合的几率小,甚至不能被结合,致使产物少,或无扩增产物;而个体 DNA 扩增时,引物与多态性片段结合的几率大,多态性片段就被扩增出来。这可能也是个体 DNA 产生的带多于 DNA 库产生的带的原因之一。故在对引物筛选时,仅对 DNA 库扩增是不够的,应同时辅之以个体 DNA 检测。

3.3 小香羊的遗传稳定性和保种

遗传相似系数越高,群体的表型性状就越一致,其遗传就越稳定,高的遗传相似系数对于一个物种的优良性状至关重要。小香羊的遗传相似系数为 0.814~0.980 之间,平均为 0.913,说明该群体内的遗传差异较小,具有一定的遗传稳定性,这主要是由于它们分布在交通落后的山区,与外界没有或很少发生基因交流、长期进行近亲繁殖,导致基因型纯合度提高,再加上当地群众定向选择和淘汰的结果。但杨家大等^[4]在乌羊和小香羊的 RAPD 分析中得到的遗传相似指数为 0.938 3~0.984 3,平均为 0.959 2。该研究用 AFLP 方法检测得到的遗传相似系数小于用 RAPD 方法检测得到的遗传相似系数,也就是说,用 AFLP 方法比用 RAPD 方法检测出的多态性更高,这种差异可能与 AFLP 技术检测的灵敏性更高有关。目前,小香羊群体小、数量少,因此在保种中应注意同开发利用相结合、通过品系繁育等途径,采用现代遗传育种原理与传统选育技术相结合的方法,坚持选种选配制度,加强育种羊群的管理,保持高的遗传相似系数。这对于把该羊种群培育成实验用羊品系具有十分重要的作用和意义。

参 考 文 献

- [1] 廖正录,潘成辉.黔东南小香羊资源调查报告.贵州畜牧兽医,1998,22(1):8~10.
- [2] 梁庭敏,杨昀.雷山小香羊适度混群繁殖的研究.中国养羊,1998,18(3):35~36.
- [3] 简承松,张亚平,李通权等.黔东南小香羊与贵州原产其它山羊品种的线粒体 DNA 多态性比较.西南农业学报,1999,12(4):86~91.
- [4] 杨家大,简承松,魏泓等.乌羊和小香羊的 RAPD 分析.

- 遗传, 2001, 23(6): 521 ~ 525.
- [5] Vos P, Hogers R, Bleeker M, *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23: 4 407 ~ 4 414.
- [6] 翁曼丽, 谢纬武, 伏健民. 新一代分子标记技术. 应用与环境生物学报, 1996(4): 424 ~ 429.
- [7] 翁跃进. AFLP——一种 DNA 分子标记新技术. 遗传, 1996, 18(6): 29 ~ 31.
- [8] 王峥峰, 张军丽, 王伯荪等. 荷木种群在不同群落中的分子生态研究. 中山大学学报, 2000, 39(5): 120 ~ 122.
- [9] 万春玲, 朱玉芳, 谭远德等. AFLP 标记在研究家蚕遗传多态性方面的应用. 生物技术, 1999, 9(5): 4 ~ 9.
- [10] 陈万泉, 漆小泉, Niks R E 等. 利用 AFLP 遗传连锁图定位大麦苗期对叶病的部分抗性基因. 遗传学报, 1999, 26(6): 690 ~ 694.
- [11] 何光华, 裴炎, 杨光伟等. 野败型杂交水稻恢复基因的 AFLP 标记研究. 遗传学报, 2000, 27(4): 48 ~ 52.
- [12] 陈洪, 朱立煌, 李冬梅. 致病性念珠菌 DNA 的 AFLP 指纹图谱. 科学通报, 1996(10): 935 ~ 938.
- [13] 吴丰春, 魏泓, 甘世权等. 贵州小香猪基因组 DNA 的 AFLP 检测研究. 遗传, 2001, 23(5): 423 ~ 426.
- [14] 梁智勇, 史景权, 魏泓等. 应用 AFLP 技术检测小鼠黑色素瘤 B16 基因组的遗传变异. 第三军医大学学报, 2001, 23(6): 658 ~ 660.
- [15] Knorr C, Cheng H H, Dodgson J B. Application of AFLP markers to genome mapping in poultry. *Anim Genet*, 1999, 30(1): 28 ~ 35.
- [16] 萨姆布鲁克, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T 著(金冬雁, 黎孟枫等译). 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社, 1996. 436 ~ 466.
- [17] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1979, 75: 213 ~ 219.
- [18] 王志勇, 王艺磊, 林利民等. 利用 AFLP 指纹技术研究中国沿海真鲷群体的遗传变异和趋异. 水产学报, 2001, 25(4): 289 ~ 293.
- [19] Picardeau M, Prod H G, Raskine L, *et al.* Genotypic characterization of five subspecies of *Mycobacterium kansasii*. *J Clin Microbiol*, 1997, 35(1): 25 ~ 32.