肉鸽品系的随机扩增多态性DNA(RAPD)分析*

韩占兵[1], 李婉平[2]
(1 郑州牧业工程高等专科学校, 河南 郑州 450008; 2 甘肃农业大学 动物科技学院, 甘肃 兰州 730070)

[摘 要] 通过引物筛选, 用随机引物OPA 01, OPA 04, OPA 12 和OPA 15 对不同来源的 4 个肉鸽品系进行随机扩增多态性DNA (RAPD)分析。结果显示, 肉鸽各品系内的遗传变异系数均较大, Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ和Ⅳ系分别达到了 0.660, 0.600, 0.460 和 0.600。品系间遗传距离以Ⅰ和Ⅲ系间最大, 达 0.535; Ⅱ和Ⅳ系间最小, 为 0.241。RAPD 分析表明, 各品系纯度较低, 今后应加强肉鸽品系的选优提纯工作。

[关键词] RAPD 标记; 肉鸽; 变异系数; 遗传距离
[中图分类号] S836.2 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2003)06-0113-04

在畜禽育种实践中, 育种工作者力图通过遗传标记来分析畜禽群体间的遗传距离和群内的变异大小, 从本质上揭示群体间、群体内的遗传关系。限制性片段长度多态性(RFLP)、DNA 指纹图等分子遗传标记在畜禽的遗传育种中都有广泛的应用。1990 年, Williams 和Welsh 等[1,2]分别提出了一种新的DNA 水平的遗传标记, 即随机扩增多态性DNA (RAPD)。RAPD 技术是建立在聚合酶链反应基础之上的一种基因组DNA 分析方法, 它不需要预先知道基因组DNA 的任何信息, 只是利用随机短引物(一般为 10 bp)与基因组DNA 多个位点结合, 然后扩增出大量长度不等的DNA 片段, 电泳分离后获得多态性信息用于遗传分析。RAPD 技术与RFLP、DNA 指纹图相比, 具有快速、经济、技术要求低、多态性好等特点, 一出现就很快地被应用于动物、植物及微生物等诸多领域的研究。Smith 等[3]用RAPD 技术研究 4 个不同鸡种和 2 个火鸡种种内的遗传多态性和种间的遗传关系, 计算了群体内的平均共有带频率(BSF), 很好地反映了群体的育种历史; 王金玉等[4]对高应激和低应激两个鹌鹑品系进行RAPD 分析, 40 个引物中的 35 个至少能得到 1 个多态性片段; 曾福玲等[5]用 5 个随机引物, 分析了 25 个鸡品种(系)的随机扩增多态性DNA, 构建了品种亲缘关系树状图, 真实地反映了其育种历史; 周怀军等[6]利用RAPD 技术对 4 个地方鸡种和 1 个引进鸡种进行了群体遗传结构分析, 5 个经筛选出的引物在各鸡种均具有特异性条带, 品种间的相似指数, 以狼山鸡与萧山鸡间最高, 固始鸡与引进鸡种最低。由此可见, RAPD 技术在分析种、特别是种以下的遗传关系上, 具有广泛的应用前景。本研究试图通过对肉鸽品系的RAPD 分析, 为肉鸽品系的选优提纯工作提供参考。

1 材料与方法

1.1 肉 鸽

样本群体来源于兰州白云肉鸽养殖公司, 在 1989～1993 年引进 4 个不同来源的美国白羽王鸽肉鸽群, 经过选育初步定为 4 个品系, 分别计为Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ和Ⅳ系。本试验在每系中随机抽样 10 只, 公母各半。另取家鸽 1 只, 用于引物筛选。

1.2 随机引物及试剂盒

随机引物及 PCR 反应试剂盒(*Taq* 酶为 Promage 公司产品)购自北京同正生物技术发展公司。

1.3 DNA 的提取

采用高盐法提取全基因组DNA。鸽子翅下静脉采血 0.5 mL, 加入禽血裂解液 5 mL, 摇匀, 4 ℃保存备用。取 100 μL 裂解血样于 1.5 mL Eppendorf 管中, 加入 300 μL TE 溶液及适量蛋白酶 K (20 g/L)消化, 然后用高盐法提取基因组DNA。提取的DNA 溶于 TE 溶液中, 4 ℃保存。

1.4 PCR 反应条件及程序

PCR 反应器型号为 Thinker series Ⅱ, 反应总体积为 25 μL。其中含 20～50 ng 模板DNA, 1.5 U *Taq* 酶, 0.2 μmol/L 引物, 200 μmol/L dNTPs, 10

* [收稿日期] 2002-11-11
[基金项目] 甘肃省教育厅项目"肉鸽商品杂交试验"(942-03)
[作者简介] 韩占兵(1971-), 男, 山西右玉人, 讲师, 硕士, 主要从事家禽生产的研究。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

μmol/L Tris HCl(pH8.3), 50 μmol/L KCl, 2.0 mmol/L MgCl₂。反应混合液移入 500 μL Eppendorf 管中,然后加入等体积石蜡油。反应程序为: 94 ℃预变性 5 min; 然后 94 ℃ 1 min, 36 ℃ 1 min, 72 ℃ 2 min, 循环 45 次; 最后 72 ℃延伸 3 min。

1.5 扩增产物检测

扩增产物用含溴化乙锭(5 mmol/L)的质量分数 1.5%琼脂糖检测,分子质量标记为 PBR322/BstN I。

1.6 引物筛选

为了筛选到具有较高多态性的遗传标记,选择具有一定遗传距离的肉鸽和家鸽各 1 只,进行引物筛选。

1.7 肉鸽 RAPD 标记资料统计分析方法

依据欧氏距离法计算群体内的遗传变异系数和品系间的遗传距离,并绘出遗传关系树状图。

①带频率。按下式计算:

$$f = \sum_{i=1}^{n} f_i / n$$

式中, f 为带频率; f_i 为第 i 个个体的带系数,有带为 1,无带为 0; n 为统计个体数。

②平均带频率。按下式计算:

$$F = \sum_{i=1}^{N} f_i / N$$

式中, F 为平均带频率; f_i 为第 i 条带的带频率; N 为统计带数。

③群体内的遗传变异性。按下式计算:

$$K = 1 - F$$

式中, K 为群体内的遗传变异性; F 为群体的平均带频率。

④肉鸽品系间的遗传距离(欧氏距离)。按下式计算:

$$D_{ij} = [\sum_{k=1}^{m} (X_{ik} - X_{jk})^2]^{1/2}$$

式中, D_{ij} 表示第 i 和 j 个品系间的欧氏遗传距离; k 为某一位点; m 为位点数; X_{ik} 为第 i 个品系第 k 个位点的带型; X_{jk} 为第 j 个品系第 k 个位点的带型。

2 结果与分析

2.1 引物筛选

试验结果(表 1)表明,20 个引物共产生 39 条带,其中 4 个引物(20%)产生了具有多态性的带。在 39 条带中,10 条带(25.6%)具有品种特异性,29 条带(74.4%)是公共带。多态性引物筛选结果显示,引物 OPA 01, OPA 04, OPA 12, OPA 15 在肉鸽和家鸽间产生了具有品种特异性的条带,这 4 个引物在鸽子 RAPD 分析上多态性高,可用于肉鸽 RAPD 标记制作。

表 1 引物筛选结果

Table 1 Results of primers screening 条

RAPD 引物 RAPD primer	序列(5′to 3′) Nucleotide sequence (5′to 3′)	肉鸽特异带 Special bands of meat pigeon	家鸽特异带 Special bands of house pigeon	公共带 Shareing bands	合计 Total bands number
OPA 01	CAGGCCCTTC	2	1	0	3
OPA 02	TGCCGAGCTG	0	0	2	2
OPA 03	AGTCAGCCAC	0	0	3	3
OPA 04	AATCGGGCTG	0	1	1	2
OPA 05	AGGGGTCTTG	0	0	2	2
OPA 06	GGTCCCTGAC	0	0	0	0
OPA 07	GAAACGGGTG	0	0	1	1
OPA 08	GTGACGTAGG	0	0	2	2
OPA 09	GGGTAACGCC	0	0	1	1
OPA 10	GTGATCGCAG	0	0	0	0
OPA 11	CAATCGCCGT	0	0	0	0
OPA 12	TCGGCGATAG	1	3	0	4
OPA 13	CAGCACCCAC	0	0	4	4
OPA 14	TCTGTGCTGG	0	0	1	1
OPA 15	TTCCGAACCC	1	2	1	4
OPA 16	AGCCAGCGAA	0	0	3	3
OPA 17	GACCGACCGT	0	0	2	2
OPA 18	AGGTGACCGT	0	0	4	4
OPA 19	CAAACGTCGG	0	0	0	0
OPA 20	GTTGCGATCC	0	0	1	1

2.2 肉鸽的 RAPD 分析

用 4 个随机引物对肉鸽进行 RAPD 分析,扩增片段长度为 400(OPA 15)～1 900 bp (OPA 04),共产生了 19 条带,平均每个引物产生 4.8 条。其中 17 条(89%)具有多态性,2 条(11%)为各品系间稳定存在的公共带。肉鸽的 RAPD 标记见图 1。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

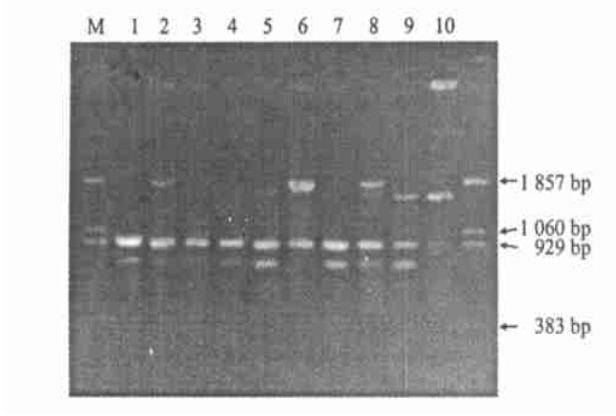

图 1　肉鸽的随机扩增多态性DNA 标记(引物为O PA 04)
M. 分子质量标记; 1～5. Ⅲ系 5 个样品扩增产物;
6～10. Ⅳ系 5 个样品扩增产物

Fig. 1　Random amplified polymorphic
DNA markers of meat pigeons
M. PBR322/BstN IM arkers; 1～5. Individual Bands of
strain Ⅲ; 6～10. Individual Bands of strain Ⅳ

2.3　肉鸽品系间的遗传距离和群内遗传变异

肉鸽品系间的遗传距离和群内遗传变异系数的计算结果列于表 2。

表 2　肉鸽品系间的遗传距离和群内遗传变异系数

Table 2　Genetic distance between strains and genetic coefficients of variability of each strain

品系 Strain	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ
Ⅰ	0.660	0.387	0.535	0.485
Ⅱ		0.600	0.436	0.241
Ⅲ			0.460	0.387
Ⅳ				0.600

注: 矩阵的上三角为品系间的遗传距离, 对角线为系内的遗传变异系数。

Note: The numbers of matrix's top triangle are genetic distances between strains, and the numbers of diagonal line are genetic coefficients of variability of each strain.

由表 2 可以看出, 肉鸽群体内的遗传变异较大, Ⅰ, Ⅱ, Ⅳ组群体内的遗传变异系数均在 0.60 以上, 说明其杂合度仍很高。Ⅲ组杂合度相对小于其他 3 组, 变异系数为 0.46。4 个品系间遗传距离都不大, Ⅰ, Ⅲ系间最大, 为 0.535; Ⅱ, Ⅳ系间最小, 为 0.241。

3　讨　论

1) RA PD 标记的特点是多态性强, 分析简便、快速, 条带分辨率高, 但 RA PD 易受反应条件的影响, 在试验中可能会出现一些假带, 干扰条带模式的判读。在实际操作中, 可以通过控制试验条件, 排除掉一些弱带和不稳定带, 使试验结果更准确。只要试验环境条件稳定, 结果具有重复性。RA PD 标记作为一种相对真实可靠的标记, 可通过 Southern 杂交得到证实[5]。

2) 本次试验对家鸽中肉鸽类型的不同品系进行了 RA PD 分析, 4 个引物共产生 19 条带(长度为 400～1 900 bp), 平均每个引物扩增出 4.8 条, 条带数量较少, 这是因为 4 个肉鸽品系同属于一个品种。而李拥军等[7]用筛选出的 10 个引物对丹顶鹤和灰鹤进行 RA PD 分析, 共产生 134 个条带(长度为 310～2 100 bp), 平均每个引物扩增出 13.4 条, 条带较多的原因是由于丹顶鹤和灰鹤属于不同的种, 导致种特异条带较多。利用 RA PD 技术进行群体遗传分析, 最好先进行多态性引物筛选, 这样可以大大减少工作量和操作的盲目性。

3) RA PD 技术在群体遗传学上具有特殊的应用, 利用该技术可有效地测定畜禽群体间的遗传距离及群体内的变异程度, 真实地反映育种历史。毛国祥等[8]对隆昌鹅、太湖鹅和新太湖鹅进行了基因组 RA PD 分析, 结果表明 3 种鹅都有特异性条带, 扩增 DNA 条带都表现出多态性; 相似系数分析表明, 隆昌鹅和太湖鹅的相似系数最低, 为 21.99%, 这一结果真实地反应了品种间的差距。周霞等[9]利用 RA PD 技术分析了我国养殖的 3 个主要鸵鸟品种(蓝颈鸵鸟、澳洲灰和非洲黑)的遗传变异情况, 结果表明, 3 种鸵鸟的品种内和品种间均显示出低水平的变异, 该结果较好地说明了 3 个品种的育种改良过程。RA PD 标记应用于鸽子的研究以前未有报道, 本研究结果表明, RA PD 技术对揭示肉鸽群体内、群体间的遗传关系是可行的, 只要筛选到合适的引物, 即可很好地进行群体遗传分析。

4) 本次试验表明, 4 个肉鸽品系群体内的遗传变异系数普遍较大, 说明各系的杂合度较高, 具有较大的选择潜力, 这与实际育种事实相符。4 个品系同属白王鸽品种, 虽来源于不同地区, 但选育时间不长, 基因频率差异小, 所以遗传距离不大。今后应加强对肉鸽品系的选优提纯工作, 以缩短世代间隔, 加快育种进程, 培育向不同方向发展的、各具某一突出生产性能的肉鸽品系。利用 RA PD 技术进行肉鸽辅助育种、测定品系间遗传距离和品系选育遗传纯度、预测杂种优势是可行的。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[参考文献]

[1] Williams J G, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18: 6531- 6535.

[2] Welsh J, McClelland M. Fingerprting genomes Using PCR with arbitrary primers[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18: 7213- 7218.

[3] Smith E J, Jones C P, Bartlett J, et al. Use of randomly amplified polymorphic DNA markers for the genetic analysis of relatedness and diversity in chickens and turkeys[J]. Poultry Science, 1996, 75: 579- 584.

[4] 王金玉, 龚允陈, 戴国俊. 鹌鹑高低应激品系的RAPD 标记研究[J]. 畜牧兽医学报, 1999, 30(4): 330- 335.

[5] 曾福玲, 李 宁, 师 宁, 等. 鸡品种(系)的随机扩增多态性DNA 指纹分析[A]. 杨茂成. 第八次全国动物遗传育种学术讨论会论文集[C]. 北京: 中国农业科技出版社, 1995. 41- 46.

[6] 周怀军, 陈宽维, 张学余, 等. RAPD 技术对地方鸡种群体遗传结构的分析[J]. 中国家禽, 1997, 19(5): 7- 9.

[7] 李拥军, 赵万里, 丁家桐, 等. 丹顶鹤、灰鹤RAPD 图谱的比较[J]. 江苏农业研究, 1999, 20(4): 43- 46.

[8] 毛国祥, 赵万里. 随机扩增多态DNA (RAPD)技术在鹅育种上的应用[J]. 中国家禽, 2001, 23(8): 47- 49.

[9] 周 霞, 李 宁, 张 劳, 等. 利用RAPD 标记分析鸵鸟种群的遗传变异[J]. 遗传, 2001, 23(5): 420- 422.

Study on RAPD of meat pigeon strains

HAN Zhan-bing[1], LI Wan-ping[2]

(1 *Zhengzhou Animal Husbandry and Engineering College, Zhengzhou, Henan* 450008, *China*;
2 *College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu* 730070, *China*)

Abstract: Four random primers (OPA 01, OPA 04, OPA 12 and OPA 15) were used in RAPD analysis of meat pigeons which came from different resources and were divided into four strains (Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ and Ⅳ). The results showed that, genetic coefficients of variability of Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ and Ⅳ strains were 0.66, 0.60, 0.46 and 0.60, respectively, heterozygous level of all strains were very high. Genetic distance between Ⅰ and Ⅲ was the largest, 0.535, compared with that between Ⅱ and Ⅳ, only 0.241, which was the smallest one.

Key words: RAPD; meat pigeon; coefficients of variability; genetic distance

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net