

藏山羊 RAPD 及 RFLP 标记的初步研究

秦国庆 常 洪 陈国宏

李建凡

(西北农业大学动物科学系,陕西杨凌 712100)

(中国农业科学院畜牧研究所,北京 100094)

摘 要 利用简单随机抽样获得亚东山羊($n=6$)、高原型藏山羊($n=15$)样本,以吕梁山羊为对照进行基因组 DNA RAPD 及 RFLP 标记的分析。结果表明,序列为 5'-TGGTG-CACTC-3' 的随机引物可以作为区分亚东山羊与高原型藏山羊的标记引物, S 及 MAPD 在某种程度上揭示了类群间遗传相似性, EcoRI、HaeIII 单酶切, EcoRI/HindIII 双酶切亚东山羊和高原型藏山羊基因组 DNA 分别产生可观察的 RFLP 条带。

关键词 藏山羊, 基因组 DNA, RAPD, RFLP 遗传标记

中图分类号 S827.2

RFLP 及 RAPD 标记已被广泛应用于基因定位、连锁分析、疾病诊断、亲缘系统等研究领域, 研究对象已涵盖猪、马、牛、绵羊、家鸡、鸽子、鱼、鹌鹑、家兔、家犬等畜禽种类^[1], 但未见有关山羊基因组分子标记的研究报道。藏山羊是世栖青藏高原的古老山羊品种, 其高原型和山谷型两个生态类型间体型外貌、生产性能等出现较大的分化, 但在形态学、蛋白质水平上未能鉴别出区分两个生态类型的遗传标记。本文籍 RAPD 与 RFLP 技术, 以吕梁山羊为对照, 分析两类群在分子水平上的遗传差异, 为山羊基因组研究积累珍贵的资料。

1 材料与方法

1.1 材料

藏山羊高原型血液样本来自西藏拉萨市郊和那曲县, 亚东山羊(山地型)样本来自西藏亚东县, 吕梁山羊 DNA 样品为中国农业科学院畜牧研究所生物工程室自备。限制性内切酶购自 GIBCO/BRL, Promega 和华美生物工程公司, Taq DNA 聚合物, dNTPs 购自鼎国生物工程公司, 所用 21 条随机引物购自北京赛百盛生物工程公司。

1.2 方法

山羊基因组 DNA 的提取、所用试剂的配制及操作方法见文献[2,3]。PCR 体系总体积 25 μ L, 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 2 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 36 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 循环 35 次。

1.3 资料统计

1.3.1 相似性指数(S)

$$S = 2N_{ab} / (N_a + N_b)$$

收稿日期 1997-08-03

课题来源 国家自然科学基金及校青年基金资助项目的一部分

作者简介 秦国庆,男,1966年生,讲师,博士

式中, N_{ab} 为个体 DNA a 和 b 共有带的数目, N_a 、 N_b 分别为个体 a 和 b 具有的 DNA 总带数。

1.3.2 平均百分差异的均值(MAPD)

$$\text{MAPD} = 1/R \sum_{i=1}^R 1/C \sum_{j=1}^C N/(N_a + N_b) \times 100\%$$

式中, N 是对于同一引物个体 a 和 b 不同带的数目, N_a 、 N_b 分别为个体 a 或 b 具有的扩增总带数, C 为种间个体两两配对比较的次数, R 为所用引物的数目。

2 结果与分析

2.1 每一引物产生的多态片段

以 21 个随机引物对 3 个类群山羊个体基因组 DNA 进行 RAPD 分析, 结果除 7 个引物没有扩增条带产生外, 其余 14 个引物均出现扩增 DNA 条带。这 14 个引物中有 2 个表现为单态, 12 个表现有多态, 其扩增的条数带在 2~8 条(图 1), 扩增片段的碱基数在 5 800 bp 以下。

为鉴别类群间的遗传差异, 分别以亚东山羊为山谷型的代表类群, 以拉萨、那曲山羊为高原型的代表类群, 吕梁山羊为对照。序列为 5'-TGCTGCACTC-3' 的第 14 号引物的 RAPD 结果(图 2) 提供了重要信息, 亚东山羊每一个体基因组 DNA 扩增出现 3 条带, 而高原型、吕梁山羊则无扩增条带出现。第 14 号引物可以作为区分亚东山羊与高原型藏山羊的标记引物, 其扩增产生的 3 条小于 3 530 bp 的 DNA 条带可以作为其间的分子标记。

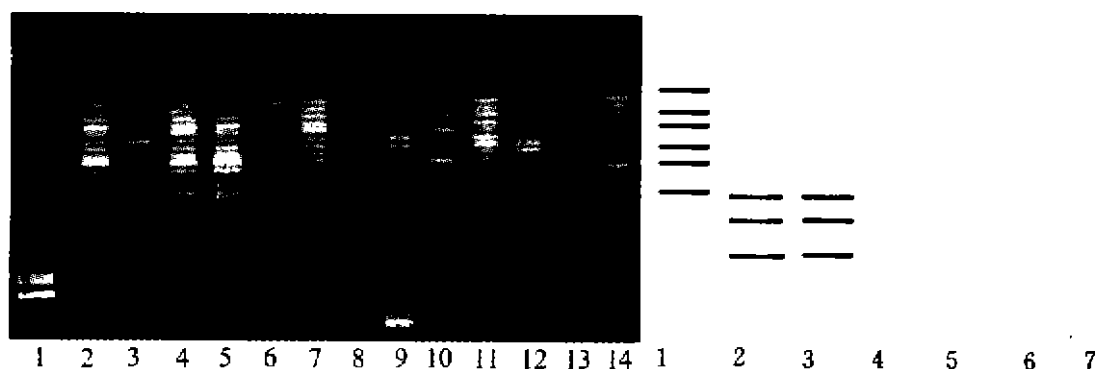


图 1 藏山羊基因组 DNA RAPD 图谱

第 1 泳道: EcoR I Marker

第 2~7 泳道: 第 15 个引物的扩增图谱

第 9~14 泳道: 第 21 个引物的扩增图谱

图 2 第 14 号引物产生的 RAPD 条带

第 1 泳道: EcoR I Marker

第 2, 3 泳道: 亚东山羊的 RAPD 条带

第 4~7 泳道: 高原型藏山羊样本

2.2 相似性指数及平均百分差异

筛选出扩增片段数在 4 个以上的引物用于 S 及 MAPD 值的计算。用第 15, 16, 17, 19, 21 号引物产生的共 100 条带估计 S (表 1) 及 MAPD。从表 1 中可以看出, 亚东山羊与吕梁山羊的 S 值最低, 与高原型的 S 值居中; 而高原型与吕梁山羊的 S 值最高, 达 0.663, 比亚东山羊与高原型的 S 值高出 40.47%, 说明高原型与吕梁山羊的遗传相似性大于亚

东山羊与高原型。3个类群的 MAPD 值以亚东山羊与高原型最大(52.80%),亚东山羊与吕梁山羊居中(36.80%),高原型与吕梁山羊最小(33.70%)。由此看出,亚东山羊与高原型的遗传差异较大,这与3类群S值所揭示的趋势一致。并为藏山羊山谷型中亚东山羊独立的起源系统提供了分子水平的遗传学证据。

表1 类群间相似性指数

类群	亚东山羊	高原型	吕梁山羊
亚东山羊	1.000		
高原型	0.472	1.000	
吕梁山羊	0.368	0.663	1.000

2.3 藏山羊 RFLP 标记

用 EcoR I, Hind III, Hae III, Bgl I, Xho I, Xba I, Pst I, Sma I, Mlu I, Sac I, Sal I, Pvu I, BamH I, Msp I, Hinf I 等 15 种内切酶对山羊基因组 DNA 进行单酶完全酶切,发现 15 种内切酶中,仅有 EcoR I 酶切产生可观察的 2 条 RFLP 条带,Hae III 酶切出现 1 条带,并且 RFLP 条带无类群和个体差别。其余 13 种内切酶均未出现 RFLP 条带。初步认为,在所试验的 3 个山羊类群基因组 DNA 链上可能存在 EcoR I, Hae III 酶的切点。

用 EcoR I /Hind III, Hae III /BamH I, Hinf I /Pst I 对个体基因组 DNA 进行双酶切,发现 EcoR I /Hind III 双酶切出现特异的 RFLP 条带,亚东山羊个体 DNA 酶切产生约 3 530 bp 1 条带,而高原型个体出现碱基数约为 3 530,5 000 bp 两条带,条带在同一类群不同个体间无差异。

3 讨 论

3.1 RAPD 及 RFLP 标记的可靠性

RAPD 所揭示的分子水平的遗传变异是碱基变化的结果。RAPD 建立在 PCR 基础上,具 PCR 所固有的缺陷,产生非基因组 DNA 扩增的假带,所有的扩增产物不一定是引物与模板 DNA 完全配对的结果,相同迁移率的 RAPD 片段并不一定只代表一个位点,复制过程中多聚酶的滑动,扩增片段含较高多态的重复序列,试验条件的微小差异等都会扭曲 RAPD 用于亲缘关系、分类及连锁分析的结果。核 DNA 不同于 mtDNA,多数研究者认为^[4],基因组 DNA 链上编码基因具有相当高的保守性,酶切片段只有与特定的 DNA 探针结合,才能观察到 RFLPs 酶切图谱,但也有不与 DNA 探针结合得到连续不重复 RFLP 图谱的报道^[5]。如果内切酶的种类适当,基因组 DNA 的片段较短,单酶或双酶切可能会出现连续不重复的 RFLP 图谱。鉴于上述,本研究仅是对山羊基因组分子标记的初步探讨。

3.2 关于亚东山羊的起源系统

复杂的自然和社会条件的差异对藏山羊的品种进化产生了较为深刻的影响,分化为高原型和山谷型两个生态类群^[6]。亚东山羊属山谷型之列,但又是山谷型中的特殊类群,呈典型的野生型毛色,貌似东南亚山羊。亚东是喜马拉雅山南麓的边境重镇,历史上曾是边民贸易的商埠口岸,可能与东南亚山羊有过基因交流,亚东山羊可能不是藏山羊山谷型

的分支,而是分布在西藏境内喜马拉雅山南麓的南亚山羊的分支。从生化遗传标记、RAPD 标记及遗传共适应 3 个层次的系统研究证实亚东山羊与高原型藏山羊之间的遗传差异^[7],为亚东山羊属南亚山羊分支提供了试验依据。

因近年来亚东山羊数量急剧下降,试验中所用样本数少,其结果仍需完善。应进一步扩大样本规模,辅之以细胞学遗传标记、历史考证等研究方法,确立亚东山羊的系统地位。同时,考察樟木、墨脱、察隅、门隅及珞瑜地区山谷型藏山羊的群体遗传结构,并与亚东山羊、高原型藏山羊类群进行比较研究,进一步明确两个生态类群间差异的遗传学实质,为其遗传资源利用提供科学依据。

致谢:试验样本采集得到拉萨市、亚东县畜牧局及西北农业大学驻西藏江孜农业科技综合试验示范区 6 位老师的大力支持和协助,谨致谢忱。

参 考 文 献

- 1 Buikam P J et al. DNA fingerprinting in domestic animals. *Electrophoresis*, 1991, 12: 169~174
- 2 J. 萨姆布鲁克等著,金冬雁等译. 分子克隆实验指南. 北京:科学出版社,1986
- 3 卢圣栋主编. 现代分子生物学实验技术. 北京:高等教育出版社,1993
- 4 Brown W M, Evolution of animal mtDNA. In: Brow W M ed. *Evolution of genes and proteins*. Sinaure sanderland, 1983: 62~68
- 5 曹红鹤, Mukherjee T K, Koh C L. 限制性内切酶片段长度多态性在几个绵羊品种中的研究. *畜牧兽医学报*, 1994, 25(5): 406~471
- 6 欧阳熙, 王 杰, 王 勇等. 藏山羊的生态地理分布及其生态类型. *西南民族学院学报(自然科学版)*, 1995, 21(3): 264~271
- 7 秦国庆. 藏山羊遗传标记及其遗传共适应性的研究[博士学位论文]. 陕西杨凌:西北农业大学, 1997

RAPD and RFLP Markers of Tibetan Goat

Qin Guoqing¹ Chang Hong¹ Cheng Guohong¹ Li Jianfan²

(¹ Department of Animal Science, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100)

(² Institute of Animal Science, CAAS, Beijing 100094)

Abstract Compared with Luliang Goat ($n=8$), Yadong ($n=6$) and plateau type goats ($n=15$) samples were collected with simple random sampling. The genomic DNA were determined by RAPD and RFLP. The result indicated that the 14th primer could be confirmed as a marked primer to discern Yadong and plateau type goats. The genetic variation between populations was promulgated by similarity index and MAPD to some extent. Respectively, 2 and 1 RFLP bands were detected with EcoR I and Hae III single-cutting, 1 and 2 bands with EcoR I /Hind III double-cutting.

Key words Tibetan goat, genomic DNA, RAPD, RFLP