论著

文章编号:1000-5404(2005)17-1778-04

南江黄羊基因组DNA的AFLP和RAPD研究

苟本富,魏 泓 (第三军医大学实验动物中心,重庆 400038)

提 要:目的 研究南江黄羊遗传多态性和探讨AFLP标记在山羊遗传多态性方面应用的可行性。**方法** 应用RAPD和AFLP两种方法对15只南江黄羊个体基因组DNA进行了分析,并比较两种方法的检测效果。**结果** RAPD标记检测得到的群体遗传相似系数和多态位点比率分别为0.942和26.98%;AFLP标记检测得到的群体遗传相似系数和多态位点比率分别为0.874和31.4%。**结论** AFLP方法和RAPD均适合于品系内个体间的遗传检测,并且为准确评价南江黄羊的遗传稳定性提供了相关的参数。

关键词: 南江黄羊;AFLP;RAPD;遗传多态性

中图法分类号: Q503; S813.1; S826 **文献标识码:** A

Comparative study of genetic polymorphism from Nanjiang yellow goats by AFLP and RAPD

GOU Ben-fu, WEI Hong (Laboratory Animal Center, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the genetic polymorphism of Nanjiang yellow goat and to investigate the feasibility of this research by AFLP. Methods The genomic DNAs of 15 goats were analyzed with RAPD and AFLP molecule marking techniques. The effects of the two methods were compared. Results The rates of the polymorphic loci and the genetic similar index of population by RAPD marker were 26.98% and 0.942 respectively, and that by 31.4% AFLP and 0.874 respectively. Conclusion AFLP and RAPD technique are effective methods in genetic polymorphism monitoring of Nanjiang yellow goats, and supply useful parameter with appraise genetic stability.

Key words: Nanjiang yellow goat; AFLP; RAPD; genetic polymorphism

南江黄羊是我国采用人工方法培育而成的第一个肉用山羊新品种[1],皮毛黄色、体格高大、生长发育快、适应性强、产肉性能良好,于1995年10月由农业部邀请国内同行专家组成南江黄羊新品种审定委员会在南江进行现场审定和1996年11月由国家畜禽遗传资源管理委员会派专家组现场复审检测,并一致认定南江黄羊具备肉用山羊培育品种的条件,是我国肉用性能最好的新品种[2]。目前全国各地纷纷引进用于改良本地山羊的肉用性能[2~4],而王维春等[4]认为杂交改良效果主要与各山羊品种的纯合度和遗传距离远近有关。因此从分子水平上对其遗传多态性进行研究就具有十分重要的理论和实践意义。

近年来,分子标记技术在遗传和物理图谱的构建[5]、基因的定位和克隆[6]、动植物及微生物遗传多样性研究[7,8]、数量性状位点的遗传分析、物种起源、微生物分型与鉴定、抗性育种、动物近交系选育[9]、疾病诊断[10]、生态分析[11]等遗传分析的各个领域扮演着重要的角色。不同分子标记技术的原理和检测手段不同,所揭示的DNA水平上的遗传变异也各不相同,稳定性和重复性也不一样,各种标记所揭示的遗传信息量也有很大差异。随机扩增多态DNA(random amplified polymorphism DNA, RAPD)和扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)是目前应用较普遍的两种分子标记技术,尤其是AFLP能反映生物基因组的细微变化,适合所有生物基因组的检测,但用AFLP技术对山羊基因组DNA的遗传检测方面的报道不多。因此本研究利用AFLP和RAPD技术对南江黄羊基因组DNA的遗传多态性进行了对

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070120),国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目,G2000016016)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30070120) and the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Project, G2000016016)

作者简介: 苟本富(1968-),男,重庆市人,硕士,讲师,主要从事应用分子生物学方面的研究,现在渝西学院生命科学系。电话:(023)49910971,E-mail: goubenfu2032@sina.com

通讯作者: 魏 泓,E-mail:Weihong@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2004-10-12;**修回日期:** 2005-02-23

比研究,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应用的可行性和有效性,比较两种标记手段对山羊遗传多态性的检测效果,评价南江黄羊的遗传稳定性,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

南江黄羊血样采自重庆市酉阳县各个不同的南江黄羊饲养场。

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,*Pst* Ⅰ内切酶、*Taq* Ⅰ内切酶、T_4-DNA 连接酶、测序胶银染试剂为 Premaga 公司产品,聚丙烯酰胺、双叉丙烯酰胺、尿素、TEMED、过硫酸铵为上海基康公司产品。RAPD 引物为 Operon Biotechnologies 公司产品。PCR 仪为 Gene Amp PCR system 2400 型。AFLP 人工接头与引物均由均由上海基康公司合成,将合成的两条互补的单链寡聚核苷酸稀释为 200 μg/ ml,于 37 ℃退火 10 min 后冷却至室温,4 ℃保存备用。该接头包括核心序列及酶特定序列两部分。*Pst*Ⅰ接头 :5′-GACGT-GACGGCCGTCATGCA-3′,3′-GCACTGCCGGCAGT-5′; *Taq*Ⅰ接头:5′-GACGATGAGTCCTGAG- 3′,3′-TACTCAGGACTCGC-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,本研究共使用 25 对双酶切引物,引物编号和序列见表 1。

表 1　双酶切 AFLP 引物序列

Tab 1　Primer sequences by double enzyme AFLP

Primer	Sequence
Pre-amplification primmer	
*Pst*I0	5′-GACGGCCGTCATGCAGa-3′
*Taq*I0	5′-GATGAGTCCTGAGCGAa-3′
Selective amplification primmer	
*Pst*I1	5′-GACGGCCGTCATGCAGagc-3′
*Pst*I2	5′-GACGGCCGTCATGCAGacc-3′
*Pst*I3	5′-GACGGCCGTCATGCAGact-3′
*Pst*I4	5′-GACGGCCGTCATGCAGaca-3′
*Pst*I5	5′-GACGGCCGTCATGCAGatg-3′
*Taq*I1	5′-GATGAGTCCTGAGCGAacg-3′
*Taq*I2	5′-GATGAGTCCTGAGCGAatg-3′
*Taq*I3	5′-GATGAGTCCTGAGCGAaga-3′
*Taq*I4	5′-GATGAGTCCTGAGCGAagc-3′
*Taq*I5	5′-GATGAGTCCTGAGCGAatc-3′

1.3　方法

1.3.1　DNA 的提取　　取南江黄羊 15 头,前腔静脉取血,按照 Sambrook 等[12] 的方法制备基因组 DNA。

1.3.2　RAPD 分析　　RAPD 反应在 Gene Amp PCR system 2400 型 PCR 仪上进行。反应体系为:基因组 DNA20 ng,10 × beffer 2.5 μl,Mg^{2+} 2.0 mmol/L,dNTP 0.4 mmol/L,引物 20 ng,*Taq* 酶 1.5 U,加灭菌双蒸水至 25 μl,反应条件为:94 ℃预变性 3 min;94 ℃变性 1 min,38 ℃复性 1 min,72 ℃延伸 1.5 min,共 40 个循环;72 ℃延伸 8 min。

扩增产物用含 EB(0.5 μg/ml)的 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离,紫外检测仪上观察,拍照。

1.3.3　AFLP 分析

1.3.3.1　DNA 限制酶切和连接　　基因组 DNA 经 *Pst* Ⅰ、*Taq* Ⅰ两种限制性内切酶酶切。20 μl 的反应体系中,含基因组 DNA 0.2 μg,*Taq* Ⅰ内切酶 5U,10 × buffer 2 μl,65 ℃反应 2 h,加 5U*Pst* Ⅰ内切酶,37 ℃反应 2 h,70 ℃ 10 min,4 ℃保存。连接:酶切产物与接头在 T_4DNA 连接酶作用下连接。20 μl 反应体系中,包括 10 × buffer 2 μl,酶切产物 5 μl,T_4 DNA 连接酶 5U,*Taq* Ⅰ接头 5 pmol/L,Pst Ⅰ接头 2 pmol/L,22 ℃ 3 h,70 ℃ 10 min,4 ℃保存备用。

1.3.3.2　预扩增　　25 μl 反应体系中含 10 × buffer 2.5 μl,Pst Ⅰ预扩增引物 5 pmol,*Taq* Ⅰ预扩增引物 5pmol,连接产物 1 μl,*Taq*DNA 聚合酶 1 U,dNTP 200 μmol/L,反应条件为 94 ℃ 3 min;94 ℃ 30s,56 ℃ 1 min,72 ℃ 1.5 min,20 个循环后 72 ℃ 10 min。预扩增产物稀释 100 倍,4 ℃保存备用。

1.3.3.3　选择性扩增　　25 μl 反应体系中含 10 × buffer 2.5 μl,Mg^{2+} 1.5 mmol/L,*Pst* Ⅰ引物 5 pmol/L,*Taq* Ⅰ引物 5 pmol/L,预扩增稀释产物 1 μl,*Taq* DNA 聚合酶 1 U,dNTP 200 μmol/L,反应条件为 94 ℃ 30 s,65 ℃ 30 s(每循环递减 0.7 ℃),72 ℃ 1 min,13 个循环后接 94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,23 个循环。72 ℃ 10 min,4 ℃保存备用。

1.3.3.4　电泳分析　　扩增产物经含溴乙啶的 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳证实是否有产物,然后进行 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。

1.3.4　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[13] 公式 $F = 2Nxy/(Nx + Ny)$ 进行计算,其中 Nxy 为个体 X 和个体 Y 共有片段数,Nx 为 X 个体所扩增片段总数,Ny 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(D)可以根据两个体间的相似系数(F)来计算,即 $D = 1 - F$。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。

1.3.5　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

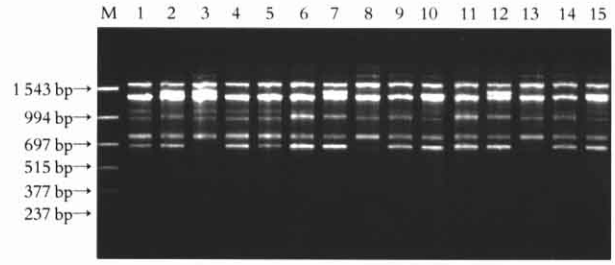
2.1　RAPD 分析结果

在所用的 40 条引物中,有 35 条引物扩增出了清晰可辨的条带,其中 26 条引物表现出多态性,多态频率为 9.85% ~ 65.3%,35 个引物共扩出 378 条带,其中多态带 102 条,占总扩增片段的 26.98%,群体内的相似系数为 0.798 ~ 0.983,平均为 0.942,个体间的遗传距离位于 0.017 ~ 0.202,平均为 0.058,图 1 为引物 AB2-02 扩增产物的电泳带结果。

2.2　AFLP 分析结果

研究中所用的每条 AFLP 引物都扩增出清晰的条带(图 2),数目为 3 ~ 17 条,共扩增出 108 条带,即检测了 15 只羊的

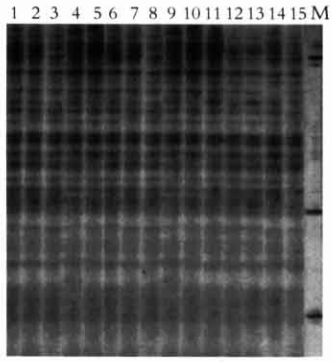
108个位点,34个位点具多态性,多态性位点百分率为31.4%。群体内的相似系数位于0.754~0.962,平均为0.874,根据15只羊间的相似系数,可得到相互间的遗传距离为0.038~0.246,平均为0.126。



1-15: Fifteen tested goats; M: Molecular marker

图1 引物AB2-02扩增15只羊的RAPD产物的电泳结果

Fig 1 DNA banding patterns of 15 goats with AFLP using primer AB2-02



1-15: Fifteen tested goats; M: Molecular marker

图2 双酶切引物P2T3 AFLP分析结果

Fig 2 Double enzyme AFLP analysis of primer P2T3

3 讨论

本研究拟用AFLP和RAPD标记,从DNA水平对南江黄羊的遗传多样性进行分析,得出相关的遗传多样性参数,为准确评价南江黄羊的遗传稳定性提供参考。仅见曹少先等[14]报道过,但曹少先等是用于检测山羊品种之间的遗传差异,而本研究用AFLP和RAPD方法检测品种内个体间的遗传差异也取得了良好的效果。

对于相同的材料,用不同的分子标记揭示的多态性也存在差异,分子标记的重复性一直是许多专家学者关心的问题,虽然AFLP和RAPD都是以PCR为基础的分子标记技术,但AFLP结合了RFLP和RAPD的优点,在酶切片段两段加接头,并利用与接头序列相配对的引物进行扩增,极大地提高了重复性。本研究曾对实验材料重复扩增6次,其电泳结果基本一致,表明AFLP重复性很高,这与Vos. P的结果是一致的。本研究中AFLP标记的多态频率为36.3%,DNA指纹相似系数为0.874,RAPD标记的多态频率为26.98%,DNA指纹相似系数为0.942,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,实验结果说明AFLP技术用于南江黄羊DNA遗传多样性的研究具有更高的灵敏度,具有更高的多态检出率。AFLP和RAPD标记均适宜于南江黄羊的遗传检测,这两种高效的分子标记技术必将对其遗传检测起到积极的推动作用,但是AFLP技术要求高、花费大,RAPD的操作简单、花费低,因而在实际工作中应根据研究目的和实验室条件选择合适的方法。

本研究所用的25对AFLP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100对引物组合中筛选出的具有品系间多态性的引物,40条RAPD引物是从110条引物中筛选出来的,但是,在实际研究中表明,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,个体DNA中的多态位点占得更少,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,DNA多态片段占的比率大,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。

本研究用AFLP标记技术检测显示:南江黄羊个体间相似系数为0.754~0.962,平均为0.874,遗传距离为0.038~0.246,吴丰春等[15]在贵州小香猪基因组DNA的AFLP检测研究中得到的相似系数为0.760~0.967,平均为0.866,本研究用RAPD标记发现:南江黄羊个体间相似系数在0.798~0.983,平均为0.942,遗传距离为0.017~0.202,而吴丰春等[16]在贵州小香猪群体遗传结构RAPD分析中得到的相似系数为0.830~0.980,平均为0.933,且贵州小香猪是由甘世祥教授利用原产地近交程度较高的基础群历经10余年作封闭培育、适度近交而建立的品系,这进一步说明南江黄羊的群体相似系数较高、遗传距离较小、因环境改变而发生的遗传变异小,能够很好地用于对各种地方品种的杂交改良。但在实际工作中,仍应当注意对南江黄羊进行保种,避免品种退化,避免影响改良效果。为此特建议有关方面

采用现代遗传育种原理与传统选育技相结合的方法，坚持选种选配制度，加强育种羊群的管理，以便保持南江黄羊较高的遗传相似系数，防止遗传退化，因为高的遗传相似系数对于一个物种的优良性状至关重要。

参考文献：

[1] 王维春，熊朝瑞，周光明. 南江黄羊肉用品种选育研究[J]. 四川畜牧兽医，2000，27（增刊）：40－42.
[2] 张红平，陈圣偶. 波尔山羊与南江黄羊杂交一代产肉性能和肌肉品质研究[J]. 四川农业大学学报，2000，18(1)：53－56.
[3] 王阳铭，王 晋，黄勇富，等. 南江黄羊与板角山羊的杂交效果[J]. 草食家畜，2000，(1)：20－21.
[4] 王维春，张国俊. 应用南江黄羊改良各地方山羊品种的效应[J]. 四川草原，2000，(4)：45－49.
[5] 陈 洪，朱立煌，李冬梅，等. 致病性念珠菌DNA的AFLP指纹图谱[J]. 科学通报，1996，41(10)：935－938.
[6] 陈万泉，漆小泉，R E Niks. 利用AFLP遗传连锁图定位大麦苗期对叶锈病的部分抗性基因[J]. 遗传学报，1999，26(6)：690－694.
[7] 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[J]. 生物技术，1999，9(5)：4－9.
[8] 王和勇，陈 敏，廖志华，等. RFLP、RAPD、AFLP分子标记及其在植物生物技术中的应用[J]. 生物学杂志，1999，16(4)：24－25，19.
[9] 吴丰春，魏 鸿. 应用AFLP技术对不同品系小鼠进行遗传检测的初步研究[J]. 第三军医大学学报，2001，23(6)：650－651.
[10] 梁智勇，史景权，魏 泓，等. 应用AFLP法检测小鼠黑色素瘤B16基因组的变异[J]. 第三军医大学学报，2001，23(6)：658－660.
[11] 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[J]. 中山大学学报(自然科学版)，2000，39(5)：120－122.
[12] 萨姆布鲁克 J，弗里奇 E F，曼尼阿蒂斯 T，著. 金冬雁，黎孟枫，张德政，等译. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 北京：科学技术出版社，1996. 436－466.
[13] Nei M，Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proc Nat Acad Sci U S A，1979，76(10)：5269－5273.
[14] 曹少先，杨利国，姜勋平，等. 波尔山羊和江苏本地山羊的AFLP和RAPD分析[J]. 中国农业科学，2002，35(10)：1291－1296.
[15] 吴丰春，魏 泓，甘世祥，等. 贵州小型香猪基因组DNA的AFLP检测研究[J]. 遗传，2001，23(5)：423－426.
[16] 吴丰春，魏 泓，甘世祥. 贵州小型香猪群体遗传结构的RAPD分析[J]. 第三军医大学学报，2000，22(12)：1162－1165.

（编辑 王 红）

文章编号：1000-5404(2005)17-1781-01

个案与短篇

新生儿单心房、单心室2例

Two cases report of single atrium and single ventricles in newborn

姜小华，龙 华 （重庆市涪陵中心医院儿科，涪陵 408300）

单心室畸形占全部先天性心脏病的1.5%～3%，男性多于女性，在新生儿先天性心脏病中约占4%[1]。而单心室同时合并单心房在临床上极为少见。我院新生儿发现2例，现报告如下。

1 临床资料

例1，患儿，女，因少吃伴腹胀于出生后12 h入院。患儿系第3胎第1产（前2胎系人流），38^{+2}周胎龄，因宫内窘迫而行剖宫产，生后1、5、10 min Apgar评分均为10分，羊水清亮、脐带、胎盘未见异常。否认母孕期有感冒史。出生后12 h患儿出现少吃，腹胀，无面色发绀，无发热。入院查体：T 36.7 ℃，P 137次/min，R 70次/min，呼吸急促，全身皮肤轻度黄染，双肺呼吸音粗，未闻及干湿罗音，心律齐，心音有力，心底部可听到响亮的收缩期杂音，腹不胀，左侧大腿可扪及硬肿，右侧踝关节呈马蹄内翻、原始反射可引出。入院后辅助检查：心脏彩超：心脏呈单心房、单心室一组瓣膜，单心室前后径26 mm，单心房前后径20 mm，房室间隔缺如，主动脉内径17 mm，肺动脉内径7 mm，呈平行走行，标准短轴（大动脉短轴）切面见主动脉在前，肺动脉在后，房室瓣可见1.2 cm^{2}返流束。胸片：双肺野清晰，纹理分布正常，双肺门不大，心影稍示增大，右心缘显示膨突，心胸比例0.67，左心缘未见异常。心电图：窦性心动过速。血糖：4.6 mmol/L。心肌酶谱：AST 127.7 U/L，LDH 110 U/L，HBDH 744.2 U/L，CK 569.6U/L，CK-MB 128 U/L。肾功：BUN 9.93 mmol/L，Cr 133 μmol/L，UA 533.9 μmol/L。血气分析：pH 7.397，Paco 2 4.07 kPa，Pao 2 7 kPa，HCO_3^- 18.8 mmol/L，Sao 2 87.5%。抗-CMV、抗-Tox、抗-RV、抗-HSV均阴性。入院诊断：先天性心脏病：单心房；单心室；肺动脉发育不良；新生儿硬肿症。入院后给予抗感染及对症、支持治疗。2 d后家长放弃治疗。

（下转1784页）

作者简介：姜小华（1968－），女，重庆市垫江县人，主治医师，主要从事新生儿方面的研究。电话：(023)72231504

收稿日期：2005-01-02；修回日期：2005-04-13