

用 RAPD 方法分析六个品种猪的亲缘关系

刘德武 杨关福 李加琪

(华南农业大学动物科学系, 广州 510642)

摘要 用 140 个 10 碱基随机引物对外来猪种杜洛克猪、斯格猪、长白猪、大约克夏猪及地方猪种蓝塘猪、大花白猪的基因组 DNA 进行 RAPD 分析, 其中 23 个引物无扩增产物, 66 个引物的扩增产物表现为多态, 51 个引物的扩增产物表现为单态, 扩增产物的电泳条带数在 1~11 条之间, 平均为 4.2 条。从相似系数及聚类分析结果可以看出, 斯格猪与长白猪、蓝塘猪与大花白猪的相似系数较高, 亲缘关系也较近, 而 2 个地方猪种与 4 个外来猪种之间则相应地较低、较远; 在 4 个外来猪种中, 除杜洛克猪外, 另 3 个外来猪种又因曾直接或间接地引用过中国地方猪种作为育种素材, 因而表现出与地方猪种相对较近的亲缘关系。

关键词 RAPD; 猪; 相似系数; 亲缘关系

中图分类号 S 828.2

随机扩增多态性 DNA (Random amplified polymorphic DNA, RAPD) 技术是 90 年代由两个实验室 (Williams et al, 1990; Welsh et al, 1990) 同时建立起来的一种新的揭示基因组 DNA 多态性的方法, 它是建立在多聚酶链反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 基础之上, 不象限制性片段长度多态性 (Restriction fragment length polymorphism, RFLPs) 那样需进行 Southern 印迹、探针标记和杂交, 无需预先知道引物和模板的 DNA 序列, 对任何无生物学研究基础的物种均可采用, 且操作简单、快捷, 有望程序化, 因此非常适用于大批量样品的群体遗传研究 (严华军等, 1996)。该方法自 1990 年建立以来已被广泛地用于多态性分析 (孙传清等, 1995; Amau, 1994)、遗传图谱的构建 (Amornrat, 1995)、筛选鉴定与目标基因紧密连锁的 RAPD 标记、遗传家系分析 (Demeke et al, 1992; Kresovich et al, 1992; Susan et al, 1993) 以及品种 (系) 的亲缘关系鉴定、抗病基因研究 (Martin et al, 1991; Stammers et al, 1995) 等。本文用 RAPD 方法对广东省大型集约化猪场常用品种杜洛克猪、大约克夏猪、长白猪、斯格猪及地方猪种蓝塘猪、大花白猪的基因组 DNA 差异进行分析, 探讨 6 个品种猪间的亲缘关系。为进一步开展配合力测定、品种间的杂交利用等提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试猪群及血样采集

实验所用杜洛克猪、长白猪、大约克夏猪、斯格猪及蓝塘猪、大花白猪的血液样品均采自广东省大型猪场。在健康猪群中随机取样 (每群分别采集 20 个样品), 公母各半。大猪从耳静脉、小猪从前腔静脉采血 3~5 mL, 加适量 2% EDTA 抗凝, 混匀后 4℃ 冰箱保存。

1.2 基因组 DNA 抽提及模板的制备

参照吴冠芸等 (1988) 方法, 用抗凝血 10 000 r/min 离心 10 min, 去上清, 而后加 0.4% KCl

低渗, 0.85% NaCl 洗涤, 再用 $1\times$ TES, 蛋白酶 K (10 mg/mL), 20% SDS, 50℃水浴过夜(消化), 最后用 Tris 饱和酚、氯仿/异戊醇(23:1)抽提, 冰冷无水乙醇沉淀 DNA, 75%乙醇洗涤烘干后加适量 TE, 55℃水浴过夜溶解, 取出后于超低温冰箱保存。

取 DNA 样品 3 μ L, 加 2 μ L 溴酚蓝指示剂溶液混匀, 点样于 1%琼脂糖凝胶(内加 0.5 μ g/mL EB)中。用 $1\times$ TAE 缓冲液电泳, 3~4 V/cm, 20 min, 在紫外光检测仪中检测 DNA 样品纯度。用紫外分光光度计测定 DNA 样品浓度(萨姆布鲁克等, 1993), 决定样品的稀释倍数, 使终浓度为 25 ng/ μ L。实验用模板为混合 DNA, 即每群 20 个个体等量取样混合, 4℃冰箱保存。

1.3 RAPD-PCR 扩增及产物检测

PCR 扩增: 参照朱平(1992)、萨姆布鲁克等(1993)方法, 用 140 个 10 碱基随机引物(购自美国 OPERON 生物工程公司, 编号为: E01-20, F 01-20, G 01-20, H01-20, I01-20, J01-20, L01-20)分别对 6 个品种猪的混合 DNA 进行 PCR 扩增。PCR 扩增每管总反应液为 25 μ L, 其组成为 $10\times$ PCR 缓冲液 2.5 μ L, dNTP (2 mmol/L) 1.25 μ L, $MgCl_2$ (5 mmol/L) 2.5 μ L, 引物 (5 pmol/ μ L) 1 μ L, TaqDNA 聚合酶 1 U (视活性变化可适当增减), 模板 DNA 4 μ L, 无菌双蒸水补充至总体积为 25 μ L, 最后以适量液体石膜油覆盖液面, 以防止反应过程水份蒸发。反应程序为: 94℃ 45 s, 36℃ 60 s, 72℃ 120 s, 38 个循环, 最后于 72℃后延伸 10 min。

产物检测: 取 PCR 扩增产物 20 μ L, 加溴酚蓝指示剂 3 μ L 混匀, 点样于 2%琼脂糖凝胶板(含 0.5 μ g/mL EB)的加样孔中, 用 $1\times$ TAE 电泳缓冲液, 电压 3~4 V/cm, 电泳 2.5~3 h, 结果于紫外光检测仪中观察、拍照并作好记录。

1.4 数据统计及聚类分析

相似系数(S)和距离系数(d)的计算(Wetton et al, 1987; Jeffreys et al, 1987; Dunnington et al, 1990):

$$S = 2Nab / (Na + Nb)$$

其中 Nab 是混合 DNA 样品 a 和 b 的扩增产物所共有的条带数目, Na 是混合 DNA 样品 a 的扩增产物的总带数, Nb 是混合 DNA 样品 b 的扩增产物的总带数。共有带是指在电泳凝胶中的位置相同、强度较一致的带。 S 值表示两个群体间的亲缘关系远近, S 值越大, 表明亲缘关系越近, 反之则越远。

$$d = 1 - S$$

d 值表示两个群体间的遗传距离远近, d 值越大, 则表示亲缘关系越远。

应用 SAS 统计软件对 d 值进行类平均法系统聚类分析, 得出 6 个品种猪的聚类分析图。

2 结果与分析

用 140 个 10 碱基随机引物对 6 个品种猪的混合 DNA 进行 PCR 扩增, 结果经电泳分离。有 117 个引物得到了清晰的 DNA 扩增图谱, 其中 66 个引物的扩增产物表现为多态(占 47%), 51 个引物的扩增产物表现为单态(占 36.5%)。扩增产物的电泳条带数在 1~11 条之间, 平均为 4.2 条。在 66 个多态引物中, 斯格猪与长白猪有特异性带区别的引物有 8 个, 蓝塘猪与大花白猪有特异性带区别的引物有 6 个, 地方猪种与外来猪种有特异性带区别的引物有 19 个, 这说明斯格猪与长白猪、蓝塘猪与大花白猪间均有很高的同源性, 而地方猪种与外来猪种间同源性则相对较低。

对 66 个扩增产物表现为多态的引物的 DNA 指纹图谱进行统计分析, 计算 6 个品种间共有带数目及相似系数(表 1)。结果显示: 蓝塘猪与大花白猪的相似系数最高(0.965 9), 因为这是两个广东省地方猪种, 有相似的社会地理环境和育成历史(张仲葛等, 1986); 斯格猪与长白猪的相似系数也较高(0.951 0), 说明它们的亲缘关系很近, 这也与事实相符, 因为斯格猪是在比利时长白、英系长白、荷系长白、丹系长白等长白猪种的基础上合成的(郭传甲, 1992; 张仲葛等, 1990); 在 4 个外来猪种中, 除了杜洛克猪与广东省两地方猪种亲缘关系相对较远外, 其它 3 个外来猪种都曾直接或间接地用过广东地方猪种作为育种素材(张仲葛等, 1986; 胡今尧等, 1982), 因而表现出与两地方猪种相对较近的关系。

用距离系数(表 2)对 6 个品种猪进行类平均法系统聚类, 得到聚类图(图 1)。由图 1 可见, 在 0.034 1 水平时, 蓝塘猪与大花白猪首先聚为一类, 此后斯格猪与长白猪很快聚为一类(0.049 0), 在 0.073 4 水平时, 斯格猪、长白猪、大约克夏猪聚为一类, 至 0.106 6 水平时, 4 个外来猪种聚为一类, 说明我国地方猪种与外来猪种间存在明显的差异, 这也基本反映了 6 个品种猪间的亲缘关系, 说明混合 DNA 的 RAPD 技术可以作为鉴定品种或群体亲缘关系的有效方法。

表 1 6 个品种间共有带数目及相似系数¹⁾

品种	杜洛克猪	斯格猪	长白猪	大约克夏猪	蓝塘猪	大花白猪
1	(257)	0.920 8	0.898 7	0.879 7	0.811 8	0.795 2
2	250	(286)	0.951 0	0.924 9	0.831 2	0.827 1
3	244	272	(286)	0.928 3	0.831 2	0.823 3
4	245	271	272	(300)	0.828 2	0.827 8
5	207	224	224	229	(253)	0.965 9
6	200	220	219	226	241	(246)

1) 1~6 数字分别代表 6 个品种猪, 1 为杜洛克猪, 2 为斯格猪, 3 为长白猪, 4 为大约克夏猪, 5 为蓝塘猪, 6 为大花白猪, 对角线括号内数字为各品种 66 个多态引物 DNA 扩增图谱中出现的条带总数; 左下表为两两品种间共有带数目, 右上表为两两品种间相似系数

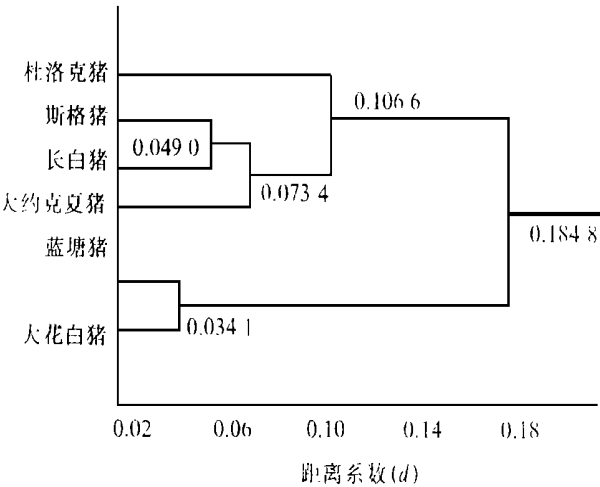


图 1 根据 DNA RAPD 分析的 d 值所作的类平均法聚类图

表 2 品种间距离系数(d)¹⁾

品种	1 杜洛克猪	2 斯格猪	3 长白猪	4 大约克夏猪	5 蓝塘猪
2	0.079 2				
3	0.101 3	0.049 0			
4	0.120 3	0.075 1	0.071 7		
5	0.188 2	0.168 8	0.168 8	0.171 8	
6	0.204 8	0.172 9	0.176 7	0.172 2	0.034 1

1) 1~6 数字分别代表 6 个品种猪, 1 为杜洛克猪, 2 为斯格猪, 3 为长白猪, 4 为大约克夏猪, 5 为蓝塘猪, 6 为大花白猪。

3 讨论

据报道(Williams et al, 1990; 陈洪等, 1996), RAPD 方法因退火温度较低易导致引物与模板的错配而致使产物可信度降低; 另外 RAPD 结果易受其它许多因素影响, 如 TaqDNA 聚合酶活性、MgCl₂ 浓度、引物种类和用量以及模板 DNA 的浓度和质量等(陈建莉等, 1996), 因而其稳定性一直受到怀疑。但是也有许多人的研究(吕雪梅等, 1996; 单卫星等, 1995)表明, RAPD 方法的稳定性可以通过人为控制而获得满意效果, 该方法因有许多其它方法所不可比拟的优点而得到推广。作者认为, 只要严格控制好反应条件, 其重复性还是相当可靠的。用 RAPD 方法进行品种间亲缘关系的研究, 方法简便、快捷, 尤其 PCR 反应要的模板量较少, 能快地利用大量的随机引物对基因组 DNA 进行广泛的比较研究。秦树臻(1995)的研究也有同样结论。本实验所用的 140 个引物除 23 个无产物或带型不清未计外, 平均每个引物产生了 4.2 条, 又因在 RAPD 方法中产生的一个条带可代表基因组中的一个位点, 即本实验共检测了基因组上近 500 个位点, 这种效率是其它方法所不可比的。但是混合 DNA 的 RAPD 分析有突出群体的共性而掩盖群体内个体间差异的特点, 它因无法反映群体内部的变化情况, 故当要准确了解群体间相互关系时, 应尽量扩大样本含量, 使样本尽量包含群体中全部不同类型的个体, 从而使结果更接近实际情况。至于多少样本最为适宜, 杨宁等(1994)曾作过不同样本数对分析结果影响的比较研究, 认为 10~15 个个体已基本可以反映群体的遗传信息。但本实验认为, 进行混合 DNA 的 RAPD 分析时增加样本数量也不会增加许多工作, 因此为确保准确性, 应尽可能增加样本数量。

参 考 文 献

吕雪梅, 杨关福, 张细权, 等. 1996. 以 RAPD 标记分析广东四个鸡品种的亲缘关系. *Animal Biotechnology Bulletin*, 5(Suppl.): 63~66

朱平主编. 1992. PCR 基因扩增实验操作手册. 北京: 中国科学技术出版社, 1~230

孙传清, 毛 龙, 王振山, 等. 1995. 栽培稻和普通野生稻基因组的随机扩增多态性 DNA (RAPD) 初步分析. *中国水稻科学*, 9(1): 1~6

严华军, 吴乃虎. 1996. DNA 分子标记及其在植物遗传多样性研究中的应用. *生命科学*, 8(3): 32~36

杨 宁, 严华祥, 吴常信. 1995. 用 DNA 指纹估计遗传变异的抽样统计研究. *中国遗传育种研究——第八次全国遗传育种学术讨论会论文集*. 北京: 中国农业出版社, 291~294

吴冠芸, 王申五. 1988. 基因诊断. 北京: 人民卫生出版社, 131~144

张仲葛, 李炳坦, 陈效华. 1986. 中国猪品种志. 上海: 上海科学技术出版社, 1~16, 59~62, 86~89.

219 ~ 230

- 张仲葛主编. 1990. 中国实用养猪学. 郑州: 河南科学技术出版社, 37~46, 87~103
- 陈建莉, Richard R Wang C. 等. 1996. 用 Langdom 二体代换系统建立小麦染色体 RAPD 标记. 遗传学报, 23(1): 32~29
- 陈 洪, 杨靖, 薛宝雄, 等. 1994. RAPD 技术在异精激发方正银鲫比较研究中的应用. 科学通报, 9(7): 661~663
- 单卫星, 陈受宜, 吴立人, 等. 1995. 中国小麦条锈菌流行小种的 RAPD 分析. 中国农业科学, 28(5): 1~7
- 胡今尧主编. 1982. 猪的遗传育种. 长沙: 湖南科学技术出版社, 60~85
- 秦树臻. 1995. 应用随机扩增多态性 DNA 技术对不同品种家猪的 DNA 差异进行快速分析. 见: 佚名主编. 全国博士后科技成果展示及人才学术交流会议论文集. 北京: 学苑出版社, 1046~1051
- 郭传甲主编. 1992. 现代养猪. 北京: 中国农业出版社, 22~29
- 萨姆布鲁克 J, 弗时奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 1993. 分子克隆实验指南. 金冬雁等译. 北京: 科学技术出版社, 304~324, 672~683, 919~921, 932~934, 955~956
- Amau J. 1994. The use of RAPD markers in the genetic analysis of the plant pathogenic fungus *Cladosporium fulvum*. *Curr Genet*, 25: 438~444
- Amornrat P. 1995. Linkage map of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in the silkworm, *Bombyx mori*. *Genet Res. Camb*(66), 1~7
- Demeke T, Adarns R P, Chibbar R. 1992. Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA (RAPD): a case study in *Brassica*. *Theor Appl Genet*, 84: 990~994
- Dunnington E A, Plotsky Y, Haberland A, et al. 1990. DNA fingerprints of chickens selected for high and low body weight for 31 generations. *Animal Genetics* 21: 247~257
- Jeffrey A J, Morton D B. 1987. DNA fingerprints of dogs and cats. *Animal Genetics*, 18: 1~15
- Kresovich S, Williams J G K, McFerson J R, et al. 1992. Characterization of genetic identities and relationships of *Brassica oleracea* L. Via a random amplified polymorphic DNA assay. *Theor Appl Genet*, 85: 190~196
- Martin G B, Williams J G K, Tanksley S D. 1991. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. *Proc Natl Acad Sci*, 88: 9828~9832
- Stammers M, Harris J, Evans G M, et al. 1995. Use of random of PCR (RAPD) technology to analyse phylogenetic relationships in the *Lolium/Festuca* complex. *Heredity*, 74: 19~27
- Susan E W, Isaac P G, Slater R J. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. *Theor Appl Genet*, 86: 497~504
- Welsh J, McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*, 18(24): 7213~7218
- Wetton J H, Carter R E, Parkin D T, et al. 1987. Demographic study of a wild house sparrow population by DNA fingerprinting. *Nature*, 327: 147~148
- Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18: 6531~6535

(下转第 97 页)

COMPARISONS OF CALCULATION METHODS FOR GENETIC DISTANCE IN RAPD ANALYSIS

Lu Xuemei Yang Guanfu Zang Xiquan

(Dept. of Anim. Sci., South China Agric. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

In order to study population genetic variations with RAPD analysis more available, the genetic distances among 7 layer lines in Guangzhou Leghorn Company Ltd were calculated with Nei's equation, Rogers equation, Hedrick's equation and the equation developed by the authors based on RAPD analysis for 7 lines. It was concluded that Rogers genetic distance was more suitable to RAPD analysis data and that the authors genetic distance was correlated with the other genetic distances significantly, but had to be tested further.

Key words RAPD analysis; genetic distance

(上接第 89 页)

ANALYSIS OF RELATIONSHIPS BETWEEN SIX PIG BREEDS USING RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA

Liu Dewu Yang Guanfu Li Jiaqi

(Dept. of Anim. Sci., South China Agric. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

A total of 140 short primers, of arbitrary nucleotide sequence, were used singly in polymerase chain reactions to amplify DNA fingerprints in pools of DNA from six pig breeds, including Duroc, Seghers, Landrace, Large White, Lantang and Dahuabai. Of these primers, 23 amplified no DNA fingerprint, 66 produced polymorphic DNA fingerprints and 51 monomorphic DNA fingerprints. Average number of bands per primer was 4.2, ranging from 1 to 11 bands. Similarity coefficients and cluster analysis, calculated according to the DNA fingerprints, indicated that there were close relationships between the Lantang and Dahuabai, and between the Seghers and Landrace. Duroc expressed a farther relationship to native breeds than to other imported pig breeds.

Key words RAPD (Random amplified polymorphic DNA); pig breeds; similarity coefficients; relationship