

贵州小型香猪基因组 DNA 的 AFLP 检测研究

吴丰春¹, 魏 泓¹, 甘世祥², 周建华¹, 马 静¹

(1. 第三军医大学实验动物中心, 重庆 400038; 2. 贵阳中医学院, 贵阳 550002)

摘 要:报道了 AFLP 标记在研究贵州小型香猪遗传多态性方面的应用和该品系猪个体基因组 DNA 的 AFLP 扩增结果, 分析了贵州小型香猪的群体遗传结构。实验应用 10 条 AFLP 引物, 用 *Pst* I 酶切, 对 17 头猪基因组 DNA 进行 AFLP 反应, 共获得 116 个 AFLP 标记, 单引物获得的标记数在 2~22 间, 贵州小型香猪群体相似系数 AFLP 研究结果为 0.866(0.760~0.967), 该研究为评价贵州小型香猪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猪对比研究后确定

关键词:小型香猪; 群体遗传结构; 分子标记; AFLP

中图分类号: Q75; S858.28

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2001)05-0423-04

Genetic Monitoring of Genomic DNAs from Guizhou Miniature Pigs BY Aflp

WU Feng-chun¹, WEI Hong¹, GAN Shi-xiang², ZHOU Jian-hua¹, MA Jing¹

(1. Laboratory Animal Center, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;

2. Guiyang Traditional Chinese Medical College, Guiyang 550002, China)

Abstract: We reported the application of AFLP markers to detect genetic polymorphic loci in Guizhou miniature pig and their amplified AFLP results. Their genetic construction of the population was also analysed. Ten AFLP primers were used, genomic DNAs from 17 pigs were restrictive by *pst* I, 116 AFLP markers were obtained, the obtaining marker numbers of individual primer were between 2~22. The results indicate as the following: (1) AFLP marker is suitable for analysing genetic polymorphism in pig; (2) The similarity index of population in Guizhou miniature pigs was 0.866(0.760~0.967). The study provides a useful parameter with appraise genetic stability of Guizhou miniature pigs.

Key words: miniature pig; genetic construction of population; molecular marker, AFLP

由于猪与人在结构、代谢、机能等方面的相似性,使其成为一种良好的实验用动物和极具希望的异种器官移植供体。在国外由于动物保护组织的限制,利用猪代替猴、犬进行医学生物学实验已成为趋势。近十年来,国外实验用猪用量上升近一倍。由于小型猪体型小,便于操作及饲养管理,便于进行微生物学及遗传学控制,易于标准化,是猪实验动物化

的主要途径。我国具有丰富而独特的小型猪资源,其中贵州小型香猪由于长期封闭培育、适度近交以及独特的生物学特性,已引起国内外相关领域的关注^[1,2]。由 Zabeau 和 Vos Pieter 创立的 AFLP(amplified fragment length polymorphism)技术,是目前构建 DNA 指纹图最有效方法之一,该方法不但具备了其他 DNA 分子标记所具有的特点,而且还

收稿日期:2000-09-05;修回日期:2000-11-15

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(200016106)、国家“九五”重点科技攻关项目(96A-23-06-01)、国家自然科学基金重点项目(No 39830190)及面上项目(39770398)资助

作者简介:吴丰春(1969,10),男,山东省寿光市,学士,讲师,主要从事动物分子遗传学方面的研究。魏 泓:(1963-),男,四川泸县,医学博士,教授,博士生导师。电话:023-68752051, E-mail:weihong@mail.tmmu.com.cn

具有带纹丰富,用样量少,灵敏度高,快速高效等优点。使用人工合成的接头(adapter)与经限制性内切核酸酶酶切的基因组 DNA 片段连接,并以此为模板,合成一系列 3'-末端随机变化 3 个碱基与人工接头序列互补的 AFLP 引物,进行 PCR 反应,电泳后可获得 DNA 指纹图谱^[3-7],至今未见猪 AFLP 的研究报道。本实验将 AFLP 技术用于贵州小型香猪的遗传多态性研究,并对该品系猪的群体遗传结构进行分析,旨在探讨 AFLP 标记在研究猪等实验用动物遗传多态性方面的应用,评价贵州小型香猪的遗传稳定性,为以后进一步培育和相关研究形成基础。

1 材料和方法

1.1 猪的来源

贵州小型香猪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,进一步作封闭培育、适度近交而建立的品系。

1.2 接头与引物

接头与引物均由上海植物生理研究所 BECK-MAN 生物技术示范实验室合成,序列如下:

接头 adapter:

5'-GACGTGACGGCCGTCATGCA-3'

3'-GCACTGCCGGCAGT -5'

合成的两条寡聚核苷酸接头,经 37℃,10min 复性后,冷却至室温 4℃ 保存,2 条互补的寡核苷酸结合为双链。接头的 3'-末端为 3'-TGCA 黏性末端,能与被 *pst* I 酶切的基因组 DNA 黏性末端互补,把 CTGCA-3' 的 C 碱基用 A 置换,使人工接头中不含 *pst* I 酶切位点,接头与酶切片段连接后不再被 *pst* I 酶切,5'-GA 末端突出,防止接头自身连接,接头中还插入了 *Xma* III 识别位点,一方面提高 GC 含量,另一方面便于对扩增片段进行克隆^[8]。

引物(primer):根据人工接头的序列设计出相应的 AFLP 引物,本研究使用了 10 条选择性引物,引物由不变碱基(CB)和选择碱基(SB)两部分组成,3'-端具有 3 个选择碱基。引物编号和序列见表 1。

1.3 酶解及 AFLP 模板制备

随机抽取贵州小型香猪 17 头,前腔静脉取血,

按照 Maniatis 的方法制备基因组 DNA^[9]。基因组 DNA 的酶切和接头的连接在同一反应中进行:20μl 的反应体系中,含基因组 DNA 0.2μg,接头 0.2μg,*pst* I 酶 20U,T4 DNA 连接酶 2 单位,1mmol/L ATP。37℃ 反应 1 小时,20℃ 反应 1 小时为 1 循环,共 3 次,用灭菌双蒸水将反应液稀释到 100μl,置 4℃ 备用^[6]。

1.4 AFLP-PCR

在 25μl 的反应体系中含有 10 倍缓冲液 2.5μl Mg²⁺ 1.5mmol/L,dNTP200μmol/L,引物 60ng,模板 10ng,*Taq* 酶 1U。反应条件为 94℃ 变性 1 分钟,56℃ 复性 1 分钟,72℃ 延伸 1 分钟 30 秒。35 个循环后接 10 分钟延伸,扩增产物用含有 EB(0.5μg/ml)的 2% 的琼脂糖凝胶电泳。

1.5 数据处理

以“1,0”分别表示扩增带的有无,统计 10 条引物的扩增结果,利用从 internet 网上下载的软件 RAPDistance Package version 1.04 对实验结果进行分析,用软件中提供的相似系数计算方法计算不同个体间的相似系数(F):

$$F = \frac{2N_{xy}}{2N_{xy} + N_{ox} + N_{oy}}$$

其中 N_{xy} 为个体 X 和个体 Y 共有片段数, N_{ox} 为 X 个体有而 Y 个体没有的扩增带, N_{oy} 为 Y 个体有而 X 个体没有的扩增带。任意两个个体间的遗传距离(P)根据两个个体的相似系数(F)来计算,即 $P = 1 - F$ 。根据遗传距离,利用上述软件中的 NJ 聚类法对 17 头猪之间的亲缘关系进行聚类分析^[9,10]。

2 结果

2.1 基因组 DNA 的扩增结果

研究中所用的 10 条 AFLP 引物都扩增出了清晰的条带,每条引物扩增带的数目在 2~22 条之间不等,共扩出 116 条带,即检测 17 头猪的 116 个位点。所用的 10 条引物中,只有一条引物的扩增结果在 17 头猪之间完全相同(图 1),其余 9 条引物的扩增结果在 17 头猪之间不完全相同,表现出不同程度的个体间多态性(图 2)。每条引物的扩增带数见表 1。

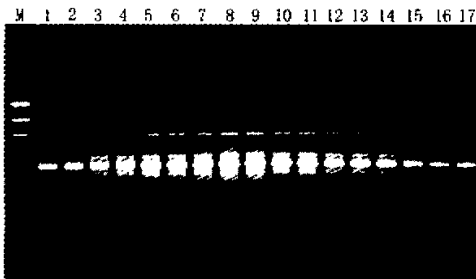


图 1 10 号引物扩增 17 头猪的结果

1~17 分别代表 17 头猪, M 为分子量标准 (pBR322 DNA)

Fig. 1 DNA banding patterns of seventeen pigs with AFLP analysis using primer 10

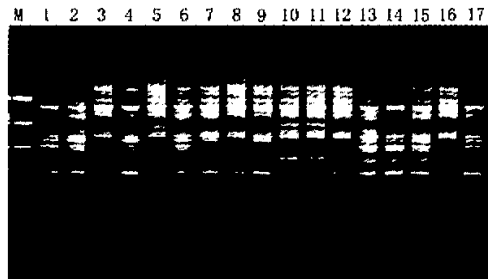
lanes 1~17: seventeen tested pigs,
M: Molecular Marker (pBR322 DNA)

图 2 6 号引物扩增 17 头猪的结果

1~17 分别代表 17 头猪个体, M 为分子量标准 (pBR322 DNA)

Fig. 2 DNA banding patterns of seventeen pigs with AFLP analysis using primer 6

lanes 1~17: seventeen tested pigs,
M: Molecular Marker (pBR322 DNA)

表 1 AFLP 引物序列及扩增情况

Table 1 The sequences of AFLP primers and the number of amplified fragments

引物 primers	序列 sequence	GC 含量 (%) Content of GC	扩增带数 Fragments
1	GACGGCCGTCATGCAGagg	68	5-9
2	GACGGCCGTCATGCAGacc	68	7-10
3	GACGGCCGTCATGCAGcag	68	6-10
4	GACGGCCGTCATGCAGaca	63	3-5
5	GACGGCCGTCATGCAGega	68	2-11
6	GACGGCCGTCATGCAGgat	63	14-22
7	GACGGCCGTCATGCAGget	68	4-8
8	GACGGCCGTCATGCAGgac	68	3-9
9	GACGGCCGTCATGCAGgte	68	8-13
10	GACGGCCGTCATGCAGtet	63	4

2.2 群体内相似系数

从 10 条引物的 AFLP 扩增结果来看, 贵州小型香猪群体内的相似系数位于 0.760~0.967 之间, 平均值为 0.866。就单个引物来讲, 贵州小型香猪个体间的相似系数位于 0.724~1.00 之间, 其中引物 5 的扩增结果在猪个体间的相似系数最小, 引物 10 在 17 头猪的扩增带型都相同, 相似性系数为 1。每条引物扩增结果平均相似性指数及 95% 的置信范围如图 3 所示。

2.3 17 头猪遗传距离及遗传关系

根据 17 头间的相似性指数, 可得到彼此间的遗传距离 (表 2)。在贵州小型香猪的 17 头猪中, 彼此间的遗传距离, 最小为 0.033, 最大为 0.240。

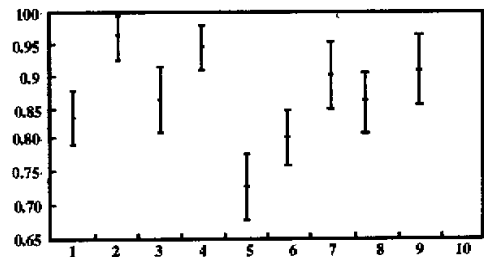


图 3 10 条引物扩增结果平均相似性指数比较

(示 95% 置信区间范围) 1~10 表示 10 条引物

Fig. 3 The comparison of average similarity indexes

using the AFLP results with 10 primers
with in 95 percent confidence intervals

3 讨 论

目前常用对实验动物进行遗传检测的方法, 都是进行的表型检测, 不能反映遗传物质本身^[2]。随着分子生物学技术的发展, 分子生物学方法已逐渐运用到实验动物的遗传检测中, 如 RFLP、RAPD 等。特别是 RAPD 技术, 它和 AFLP 一样也能运用于实验动物遗传检测, 但是 RAPD 技术, 存在着重复性差, 结果不稳定等缺点^[11-13], RFLP 技术需要先制备相应的探针进行杂交, 操作繁琐。AFLP 技术则克服了上述两种方法的不足, 既具有 RFLP 技术稳定、可靠、重复性好的优点, 又有 RAPD 技术灵敏、方便、多态性强的特点。本研究对以 AFLP 标记研究贵州小型香猪的遗传多态性进行初步尝试, 实验结果表明, AFLP 标记在贵州小型香猪中与植

物一样也能产生丰富的多态性,适宜于贵州小型香猪的遗传检测,尤其对近交程度较高,遗传背景差异

较小的实验动物,这种高效的遗传标记技术,必将对其遗传检测起到积极的作用。

表 2 贵州小型香猪 17 头之间的遗传距离
Table 2 The genetic distance among 17 pigs

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1																	
2	0.092																
3	0.033	0.119															
4	0.092	0.089	0.119														
5	0.177	0.218	0.124	0.072													
6	0.126	0.084	0.076	0.084	0.170												
7	0.084	0.039	0.151	0.101	0.211	0.117											
8	0.169	0.102	0.156	0.081	0.240	0.098	0.095										
9	0.042	0.137	0.087	0.056	0.245	0.092	0.170	0.133									
10	0.156	0.111	0.204	0.089	0.161	0.064	0.123	0.128	0.183								
11	0.124	0.122	0.112	0.142	0.190	0.056	0.104	0.073	0.149	0.123							
12	0.152	0.077	0.191	0.034	0.190	0.114	0.068	0.091	0.106	0.033	0.111						
13	0.153	0.131	0.197	0.112	0.117	0.107	0.184	0.190	0.158	0.072	0.124	0.101					
14	0.091	0.139	0.185	0.099	0.114	0.114	0.112	0.177	0.204	0.163	0.131	0.181	0.053				
15	0.091	0.158	0.157	0.199	0.124	0.153	0.151	0.177	0.184	0.184	0.230	0.210	0.121	0.090			
16	0.156	0.171	0.121	0.191	0.096	0.184	0.204	0.169	0.158	0.177	0.124	0.183	0.086	0.159	0.046		
17	0.170	0.190	0.138	0.114	0.154	0.63	0.141	0.122	0.093	0.175	0.161	0.116	0.129	0.116	0.136	0.129	

研究表明,DNA 指纹相似系数(F)是衡量个体间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,遗传变异性越小。常青等对太湖猪各类群内及类群间的相似系数 RAPD 研究结果分别为大于或接近 0.9^[14],秦树臻在家猪 7 个品系的 RAPD 分析中得到的片段共享度在 0.7651~0.9692 之间^[15]。而贵州小型香猪是利用当地近交程度较高的基础群,历经 10 余年作进一步封闭培育而建立的品系,经 AFLP 研究,群体内的平均相似系数为 0.866,仅从相似系数这一数值比较看,贵州小型香猪的 AFLP 研究结果相似系数偏低。这与研究方法不同是否有关,AFLP 技术和 RAPD 技术对同一群体的遗传相似性研究结果是否有可比性,二者之间具有何种内在联系,哪种方法更适合于群体的遗传相似性分析? 尚待进一步研究。

参考文献(References):

- [1] 甘世祥. 贵州小型猪——实验用小香猪[M]. 贵阳: 贵州科学技术出版社, 1997.
- [2] 魏泓. 医学实验动物学[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1998, 52~51.
- [3] 翁跃进. AFLP——一种 DNA 分子标记新技术[J]. 遗传, 1996, 18(6): 29~31.
- [4] Vos P, Hogers R, Bleekor M, Reijans. M. AFLP a new tech-

nique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23:4407~4414.

- [5] 李传友, 伏健民, 金德民. AFLP 分析中多态性扩增产物的回收克隆及鉴定[J]. 遗传, 1998, 20(4): 1~4.
- [6] 翁曼丽, 谢纬武, 伏健民. 新一代分子标记技术[J]. 应用与环境生物学报, 1996, (4): 424~429.
- [7] 王斌, 翁曼丽, 谢纬武. AFLP 的原理及其应用[J]. 杂交水稻, 1996, 5: 27~30.
- [8] 陈洪, 朱立煌, 李冬梅. 致病性念珠菌 DNA 的 AFLP 指纹图谱[J]. 科学通报, 1996, (10): 935~937.
- [9] 萨姆布鲁克, E.F 弗里奇 T, 曼尼阿蒂斯著(金冬雁, 黎孟枫等译)分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1996, 436~466.
- [10] 李明, 张树义. 白腹管鼻蝠两个冬眠群不同个体的随机扩增多态 DNA 分析[J]. 动物学报, 1999, 45(2): 232~237.
- [11] Williams J G K, Kubelik A R, Livak k J, Rafalski J A, Tingey S V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic Markers[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18: 6531~6535.
- [12] 张文艳, 袁春梅, 魏云林, 等. 一种新的近交系实验动物遗传检测方法与小鼠性别相关 RAPD 标记的发现[J]. 实验生物学报, 1996, 25(4): 59~64.
- [13] 陈永久, 张亚平. 随机扩增多态 DNA 影响因素研究[J]. 动物学报, 1997, 18(2): 221~227.
- [14] 常青, 周开亚, 王义权, 等. 太湖猪遗传多样性和系统发生关系的 RAPD 分析[J]. 遗传学报, 1999, 26(5): 480~488.
- [15] 王义权, 周开亚, 秦树臻. 用 RAPD 标记检测六种蛇基因组 DNA 多态性[J]. 动物学报, 1996, 42(2): 172~180.