

DNA 遗传标记与山羊遗传育种

贾永红¹, 张永亮², 路彦霞¹ (1. 廊坊师范学院生命科学学院, 河北廊坊 065000; 2. 周口师范学院生命科学系, 河南周口 466001)

摘要 总结了 4 种主要 DNA 遗传标记的原理、特点及其在山羊遗传育种中的研究进展。

关键词 遗传标记; 山羊; 遗传育种

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2007)14-04133-02

遗传标记是标志生物体遗传组成, 反映染色体或 DNA 上某一区段或某一位点的特征性结构或其表型的遗传特性, 可以借助一定的测量方法识别, 按孟德尔遗传方式传递, 分布规律具有种群特异性的某一类遗传物质或表型。经典的遗传标记主要有形态标记、染色体多态标记、蛋白质多态标记和免疫遗传标记等。随着限制性内切核酸酶的问世, DNA 分子杂交、克隆和 DNA 重组技术的完善, 以及 PCR 技术与电泳新技术的发明, 相继有多种 DNA 遗传标记问世。有限制性片段长度多态性 (RFLP)、卫星 DNA、随机扩增 DNA 多态性 (RAPD) 和单核苷酸多态性 (SNP) 等新型 DNA 标记。这类新型遗传标记直接以遗传物质 DNA 的多态性为标记, 具有直观准确、多态位点丰富、遗传稳定、不受环境和发育阶段等的影响、无表型效应等优点, 在生物起源分化、遗传育种、遗传图谱的构建以及医学检验等研究领域具有广泛的应用前景。DNA 遗传标记应用于牛、猪、鸡等家养动物的遗传育种研究已取得可喜的进展, 尤其是 DNA 标记与经济性状的相关分析成为当前研究的热点。但对山羊的遗传分析还十分有限, 现就常见的几种 DNA 遗传标记及其在山羊遗传育种研究中的应用概括如下。

1 RFLP 标记

RFLP 起源于生物基因组 DNA 的自身变异, 限制性内切酶酶切位点的消失或产生, 使酶切片段在长度上产生差异, 反映出不同个体来源的 DNA 在限制酶识别和切割位点上序列的差异性。经典的 RFLP 分析需经过复杂的技术处理过程, 检测成本昂贵, 自动化水平低, 甚至会带来放射性污染。利用荧光染料染色进行 RFLP 分析省时省力, 也可免除放射污染。PCR-RFLP 则为特定基因序列多态性分析提供技术支持, 使标记辅助选择成为可能。

动物线粒体 DNA (mtDNA) 遵循母系遗传, 其 RFLP 分析 (mtDNA-RFLP) 在揭示动物品种起源和遗传分化关系方面独具优势, 被用作种系发生的“分子钟”。Upholt 等最早采用电泳技术和 RFLP 方法对绵羊和山羊的 mtDNA 进行了分析比较, 发现绵羊和山羊种间及种内的 mtDNA-RFLP 图谱都不尽相同, 分子量都在 15.8-16.4 之间^[1]。Hideyuki 等研究认为亚洲家山羊的线粒体 DNA 可划分为 4 个明显的线粒体血统。Luikart 等分析了世界各地 88 个山羊品种共 406 个个体的 mtDNA D-loop 的 481 bp 高变区序列, 发现世界山羊存在 3 个高度分化的区域驯化支系 (A、B、C), 中国山羊只有分布较广的支系 A, 支系 B 只存在于东亚和南亚山羊, 但来自中国的样品很少, 尚不足以说明中国山羊的遗传结

构和起源情况^[2]。刘若余等分析中国 9 个山羊品种 mtDNA D-loop 全序列, 得出中国山羊 mtDNA D-loop 序列单倍型分为支系 A 和支系 B 两大类的结论^[3], 验证了李祥龙等 (1997, 1999, 2000) 和贾永红等 (1999) 通过 mtDNA-RFLP 分析得出的我国地方山羊品种可能起源于 2 种不同母系祖先的结论。绵羊、山羊和岩羊的 mtDNA-RFLP 分析得到与细胞遗传学研究不一致的结果, 3 种动物 mtDNA 基本单倍型间的遗传距离和 mtDNA 多态性表明, 山羊和岩羊的遗传亲缘关系比绵羊与岩羊间更近一些^[4]。线粒体细胞色素 b 基因全序列分析验证了这一结果^[5]。此外 mtDNA 与动物生产性状、疾病、衰老及细胞凋亡等的相关关系也是当前研究的热点。

根据山羊 GoLA-DRB₃ 基因外显子 2 的 PCR-RFLP 分析结果绘制的遗传聚类图, 与所研究山羊群体所处的地理位置、外貌特征以及已知的山羊品种育成史的实际状况一致^[7-9]。蓝贤勇等利用 PCR-RFLP 技术研究西农萨能奶山羊乳蛋白基因多态与产羔数之间的相关性, 发现 CSN3 和 CSN1S2 基因对奶山羊产羔数有显著影响, 推测酪蛋白基因可能与 Fec^B 基因连锁, 认为 CSN3-TaqI 和 CSN1S2-Alw26I 位点可作为奶山羊高产羔数标记辅助选择 (MAS) 的有效分子标记^[9]; 而且 CSN1S2 基因多态与产奶性能、初生重和体高等指标间存在相关性, CSN1S2 基因座上的 N 等位基因的纯合子平均产奶量显著地高于 F 等位基因的纯合子平均产奶量, F 等位基因可能与高产奶量呈负相关, 而对 NF 基因型个体和 FF 基因型个体的选择可能提高奶山羊初生重和体高^[9]。对波尔山羊及波唐杂种山羊肌肉抑制素基因 (MSTN) 的 PCR-RFLP 多态分析则提示, MSTN 基因可能是影响山羊体重性状的主基因或与主基因相连锁, 可以用该位点对山羊体重性状进行标记辅助选择^[10]。

2 卫星 DNA 标记

Hamada (1982) 发现的简短串联重复序列 (STR) 和 Jeffrey 等 (1985) 发现的可变数目串联重复序列 (VNTR), 可分别称之为微卫星 (microsatellite) 和小卫星 (minisatellite), 这类重复序列在真核生物基因组中广泛存在, 重复单位的差异及重复单元拷贝数变化构成卫星 DNA 的高度多态性。这种多态性多由有丝分裂或减数分裂过程中的不等价交换, 以及重复单位复制滑移等因素造成。卫星 DNA 的 DNA 指纹 (DFP) 图谱带丰富、稳定性好, 具有高度个体特异性, 能准确反映群体间的亲缘关系, 在动物起源分化和遗传多样性分析、遗传制图、医学和法医检验中得到广泛应用。荧光素探针标记微卫星因其在基因组中分布广泛均匀, 可比性强, 且更适合于 PCR 分型, 成为比小卫星更有前景的 DNA 标记。而且一种微卫星引物可在同科物种中扩增得到较丰富的多态性。

作者简介 贾永红 (1969-), 男, 内蒙古武川人, 硕士, 讲师, 从事动物遗传育种科学教学研究。

收稿日期 2007-02-14

微卫星标记较结构基因座标记更能表达近缘种间进化趋异水平,野山羊品种比家养山羊品种具有更丰富的多态性^[2],地理分布差异大的群体间多态性高于群体内多态性,聚类关系能够反映群体在地理分布或育成史上的差异^[3]。杨章平等提出可将 FCB11,MAF33,AE101,FCB128 及 FCB304 位点作为研究绵山羊近缘种间遗传分化的标志位点^[4]。张英杰等发现某些微卫星可用于山羊的遗传多样性评估和山羊品种间的杂种优势预测^[5]。世界动物遗传协会 1996 年还提出建议,用一套由 9 个微卫星标记组成的 3 个多重 PCR 反应体系作为系谱检测和亲子鉴定标准方法,为品种资源的保护和开发利用提供参考。

3 RAPD 标记

随机扩增 DNA 多态性(RAPD)标记是 1990 年 Williams 等和 Welsh 等几乎同时建立的,是以一种人工合成的短序列随机引物,在较低退火温度下对基因组 DNA 随机扩增得到多态性图谱,具有引物无种属特异性,操作相对简便快捷且模板用量少的优点。RAPD 属显性标记,因 RAPD 在基因组中分布广,种间种内变异丰富,已被广泛用于群体遗传结构和亲缘关系分析以及基因的快速定位和遗传作图。

国内关于山羊的 RAPD 分析大多局限于地方山羊品种,许多研究都表明 RAPD 可作为一种有效的分子标记,用于山羊群体的遗传多样性检测和山羊品种间的遗传亲缘关系分析,进而预测品种间的杂种优势^[6-7]。有些 RAPD 标记与表型性状相关联,可望用于标记辅助选择^[8]。李祥龙等利用 RAPD 技术研究了我国主要地方山羊品种及部分国外品种共计 23 个品种 251 个山羊个体的多态性,结果表明所研究山羊群体具有较为丰富的遗传多样性,山羊核基因组遗传变异主要存在于品种间,我国地方山羊品种间遗传分化比较明显^[9]。杨家大等和陈祥等通过 RAPD 分析,为确立黔东南小香羊在遗传上独立的品种地位提供证据^[20-21],验证了贾永红等(1999)的 mtDNA-RFLP 分析结果。王杰等用 40 个随机引物,对四川 5 个山羊品种、藏山羊 2 个生态类型,3 个杂交群体和岩羊共计 113 个个体进行 RAPD 分析,聚类关系与各群体的地理分布和育成史相对应,岩羊与山羊全部类群的遗传距离指数为 0.506 7,单独为一类^[22]。

4 SNP 标记

单核苷酸多态性(SNP)是由 Lander 于 1996 年提出的一类新型标记,是基因组单个核苷酸位置上的碱基变异而产生的多态性,属于双等位型标记。与第 1、2 代 DNA 遗传标记相比,这种标记数目多,覆盖密度大,易于自动化批量检测,因而在基因定位研究中有其他标记不可比拟的优越性,已成为人类基因组计划的研究热点。目前 SNP 主要用于人类和模式生物的种群多样性研究及基因连锁不平衡分析、致病基因的搜寻定位、法医学检验以及高密度 SNPs 图谱的绘制。多种非凝胶电泳基础上的 SNP 的检测手段和高密度 DNA 芯片技术的成熟,将使 SNP 的检测和分型更加便捷精确,为基因组、后基因组研究和基因表达调控研究以及基因诊断提供强有力的技术支持。随着 SNP 检测手段的普及应用,可望广泛应用于畜禽疾病防控及遗传育种等领域。

目前国内有关山羊的 SNP 研究报道还较有限。对山羊 FSHR 和 FSH β 基因有关调控序列和外显子片段的 PCR-SSCP 分析表明 FSH 基因可能是控制山羊多胎性能的一个

主效基因或与之紧密连锁的标记,可望用于标记辅助选择来提高山羊产羔数或评价山羊的超排潜力^[23-25]。吴泽辉等根据绵羊 GDF9 基因序列设计 4 对引物,采用 PCR-SSCP 技术发现 GDF9 基因外显子 2 在 5 个山羊品种中存在 2 个单核苷酸多态,初步表明 GDF9 基因可能是控制济宁青山羊多胎性能的一个主效基因或是与之紧密连锁的分子标记,山羊与绵羊的 GDF9 基因外显子 2 核苷酸序列同源率为 99%^[26]。李美玉等首次证实山羊生长激素(GH)基因在 5' 调控区存在序列多态性,其中 26~239 bp 片段上等位基因在群体水平上表现出明显的种间差异^[27]。高爱琴等采用 PCR-SSCP 技术分析成纤维细胞生长因子 5(FGF5)基因外显子在 3 个山羊品种的多态性,结果发现对产绒性状长期选择的内蒙古绒山羊、辽宁绒山羊在引物 2 的 SNP 位点基因频率处于 Hardy-Weinberg 不平衡状态^[28]。Li 等对山羊和绵羊肌肉抑制素基因(MSTN)内含子 2 的 SNP 分析发现,MSTN 基因内含子 2 种间序列差异大于种内,南方山羊核苷酸多态性高于北方山羊,国外山羊高于国内山羊,MSTN 基因内含子 2 存在 2 种主要单倍型,可能代表 2 种祖先类型,支持世界山羊有 2 种主要起源的结论^[29]。

5 结语

我国是世界上的山羊生产大国,也是最大的山羊绒生产和出口国,原绒产量和贸易量占世界的 50%,居世界首位。联合使用多种标记,对我国山羊群体遗传结构进行系统研究,可望为山羊品种资源保护和合理利用提供科学依据。

参考文献

- [1] UPHOLT W B, DAWID I B. Mapping of mitochondrial DNA of individual sheep and goats: Rapid evolution in the D loop region [J]. Cell, 1977, 11: 571-583.
- [2] LUIKART G, GIELLY L, EXCOFFIER L, et al. Multiple maternal origins and weak phylogeographic structure in domestic goats [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 5382-5384.
- [3] 刘若余, 杨公社, 雷初朝. 中国山羊 mtDNA D-loop 遗传多样性及其起源研究 [J]. 遗传学报, 2006, 33(5): 420-428.
- [4] 李祥龙, 郝桂茹, 张亚平. 绵羊、山羊和岩羊 mtDNA 的 RFLP 及其遗传分化研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2000, 31(4): 289-295.
- [5] 曹丽荣, 王小明, 饶刚, 等. 从细胞色素 b 基因全序列分析岩羊和山羊、绵羊的系统发生关系 [J]. 兽类学报, 2004, 24(2): 109-114.
- [6] 金梅, 白雪, 张巍, 等. 两种绒山羊线粒体细胞色素 b 序列分析与系统进化 [J]. 中国农业科学, 2006, 39(9): 1897-1901.
- [7] 孙东晓, 张沅, 李宁. 蒙古山羊和哈萨克山羊 GOLA-DRB3 基因的 HaeIII 酶切多态性分析 [J]. 遗传, 2004, 26(1): 55-58.
- [8] 杨易, 徐金瑞, 王杰, 等. 四川 4 个地方山羊品种(群体)MHC-DRB3 外显子 2 的多态性 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2006, 1: 12-15.
- [9] 蓝贤勇, 陈宏, 潘传英, 等. CSN3, CSN1S2 和 β -1g 基因多态与西农萨能奶山羊产羔数的相关性研究 [J]. 中国农业科学, 2005, 38(11): 2333-2338.
- [10] 蓝贤勇, 陈宏, 张润锋, 等. 西农萨能奶山羊 CSN1S2 基因多态与产奶量、体尺指标的相关分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(4): 318-322.
- [11] 刘铮铸, 李祥龙, 巩元芳, 等. MSTN 基因内含子 2 多态性与山羊体重性状相关研究. 畜牧兽医学报, 2006, 37(8): 745-748.
- [12] SAITBEKOVA N, GAILLARD C, OBEXER-RUFF G, et al. Genetics diversity in Swiss goat breeds based on microsatellites analysis [J]. Anim Genet, 1999, 30(1): 36-41.
- [13] YANG L, ZHAO S H, LI K, et al. Determination of genetic relationships among five indigenous Chinese goat breeds with six microsatellite markers [J]. Animal Genetics, 1999, 30(3): 452-455.
- [14] 杨章平, 常洪, 孙伟, 等. 结构基因座和微卫星标记应用于绵(山)羊群体遗传分化的比较研究. 畜牧兽医学报, 2003, 34(5): 427-433.
- [15] 张英杰, 赵有璋, 刘月琴, 等. 3 个山羊群体中 4 个微卫星 DNA 多

(上接第 4134 页)

态性及其与杂种优势的关系[J].遗传,2004,26(5):631-636.

- [16] 李祥龙,田庆义,马国强,等.波尔山羊杂交后代及其亲本随机扩增多态 DNA 研究[J].遗传,2000,22(2):75-77.
- [17] 杜美红,李步高,周忠孝.RAPD 分析山西主要地方山羊品种的遗传多态性[J].畜牧兽医学报,2005,36(2):202-204.
- [18] 李力,邱敦莲,黄健,等.RAPD 标记与四川黑山羊表型性状的相关性研究[J].畜牧兽医学报,2006,37(5):424-429.
- [19] 李祥龙,张亚平,陈圣偶,等.我国主要地方山羊品种随机扩增多态 DNA 研究[J].畜牧兽医学报,2000,31(5):416-422.
- [20] 杨家大,简承松,魏泓,等.乌羊和小香羊的 RAPD 分析[J].遗传,2001,23(6):521-525.
- [21] 陈祥,廖正录,李国红,等.贵州地方山羊品种的 RAPD 分析[J].动物学研究,2004,25(2):141-146.
- [22] 王杰,徐金瑞,白文林,等.四川几个山羊品种(群体)与岩羊 RAPD 分析[J].畜牧兽医学报,2003,34(5):434-437.

- [23] 姜怀志.双羔型辽宁绒山羊 FSHR 基因 SNP 分析的研究.吉林农业大学学报,2004,26(5):550-553.
- [24] 宋美玲,马向明,王建民.波尔山羊 FSHR 5'端序列的 SNP 多态性及超排效果分析[J].家畜生态学报,2006,27(4):25-28.
- [25] 梁琛,储明星,张建海,等.FSH β 基因 PCR-SSCP 多态性及其与济宁青山羊高繁殖力关系的研究[J].遗传,2006,28(9):1071-1077.
- [26] 吴泽辉,储明星,李学伟,等.山羊生长分化因子 9 基因外显子 2 的 PCR-SSCP 分析[J].中国农业科学,2006,39(4):802-808.
- [27] 李美玉,闵令江,孙国强,等.山羊生长激素基因 5'调控区的多态性分析[J].遗传,2004,26(6):831-835.
- [28] 高爱琴,李宁,李金泉,等.山羊 FGF5 基因单核苷酸多态性群体遗传学分析[J].华北农学报,2006,21(3):71-76.
- [29] LI XL, WU ZL, LIU ZZ, et al. SNP identification and analysis in part of intron 2 of goat MSTN gene and variation within and among species[J]. Journal of Heredity, 2006, 97(3):285-289.