

## 乌羊和小香羊的 RAPD 分析

杨家大<sup>1</sup>, 简承松<sup>1</sup>, 魏泓<sup>2</sup>, 朱文适<sup>1</sup>, 吴开平<sup>2</sup>, 姚家志<sup>3</sup>, 蔡志华<sup>4</sup>

(1. 贵州大学生物技术学院, 贵阳 550025; 2. 第三军医大学实验动物中心, 重庆 400038;  
3. 重庆市酉阳县畜牧局, 重庆市酉阳 408800; 4. 重庆师范学院生物系, 重庆 400047)

**摘要:**用 40 条多态引物对乌羊、小香羊、南江黄羊、黑山羊、川东白山羊、波尔山羊和马头山羊 7 个品种(或群体)进行 RAPD 分析, 其中 28 条引物扩增出多态性谱带, 并用于进一步对 12 只乌羊个体和 12 只小香羊个体基因组进行扩增。扩增产物以 1.5% 琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/ml 溴化乙锭)电泳分离。Nei 氏公式计算品种间的遗传距离指数和品种内的遗传相似指数, NJ 法构建系统聚类图。结果表明: 乌羊和川东白山羊间的遗传距离最小, 亲缘关系较近, 而小香羊与各品种间的遗传距离都较大, 亲缘关系较远。乌羊群体及小香羊品种都具有一定的遗传稳定性。  
**关键词:** 乌羊; 小香羊; RAPD

中图分类号: Q953.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2001)06-0521-05

## RAPD Analysis to Wu Goats and Small-Xiang Goats

YANG Jia-da<sup>1</sup>, JIAN Cheng-song<sup>1</sup>, WEI Hong<sup>2</sup>, ZHU Wen-shi<sup>1</sup>,  
WU Kai-ping<sup>2</sup>, YAO Jia-zhi<sup>3</sup>, CAI Zhi-hua<sup>4</sup>

(1. Biotechnology Institute, Guizhou University, Guiyang 550025, China;  
2. Laboratory Animal Center, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;  
3. Livestock Bureau of Youyang, Youyang, Chongqing 408800, China;  
4. Biology Department, Chongqing Normal University, Chongqing 400047, China)

**Abstract:** A total of 40 primers generated polymorphic loci were used in random amplified polymorphism DNA (RAPD) analysis in seven goat breeds (or populations) including Wu goat, Small-Xiang goat, Nanjiang Brown goat, Black goat, Chuandong white goat, Boer goat, Matou goat. 28 of them were selected for further amplification in individuals of 12 Wu goats and 12 Small-Xiang goats because of their different amplified patterns among seven goat breeds. Amplification products were separated by 1.5% agarose gel (contain 0.5 μg/ml ethidium bromide) electrophoresis. Genetic distance indexes among breeds and genetic similarity indexes within breed were calculated by Nei, and the phylogenetic tree was constructed by NJ method. The results indicate that the genetic distance index between Wu goat population and Chuandong white goat breed is smallest, therefore Wu goat population is closely related to Chuandong white goat breed. While the genetic distance indexes between Small-Xiang goat breed and any other goat breeds are all big, so Small-Xiang goat breed is far related to any other goat breeds. The results also indicate that the genetic stability either among the Wu goat population or the Small-Xiang goat breed reaches some extent.

**Key words:** Wu goat; Small-xiang goat; RAPD

收稿日期: 2001-12-26; 修回日期: 2001-04-28

基金项目: 本文受国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)课题(G2000016106)、国家自然科学基金(30070120)、贵州省科技基金项目(黔基合字(1997)3040号)资助

作者简介: 杨家大(1975-), 男, 贵州省天柱县人, 侗族, 硕士研究生。

通讯作者: 魏泓, 医学博士, 教授, 博士生导师。

致 谢: 感谢云南农业大学动物科技学院曾养志教授的支持与帮助。

随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphism DNA, RAPD) 是由 Willianms 和 Welsh 发展起来的一种 DNA 多态性检测技术, 具有简便、快速、灵敏度高等优点, 因而在畜禽品种分类、遗传变异和亲缘关系分析、遗传多样性研究、品种及性别鉴定、基因定位和连锁作图、杂种优势的研究<sup>[1~9]</sup>等方面都得到了广泛应用。

乌羊产于山峡库区苗族土家族居住地, 唇、眼部、肛门、皮肤和舌呈乌色, 肌肉及骨骼呈微乌色, 因当地群众认为具有强化筋骨、醒神、补肾等功效而被称为“药羊”。小香羊产于贵州省偏远的侗族聚居区, 以个体小、膻味轻, 肉质细嫩, 烹饪加工后香气溢人而得名。乌羊和小香羊都是经过长期的地理隔离和近亲繁殖形成的优良地方品种(或群体)。如今生产上的盲目杂交, 使这些品种与外来品种发生基因交流, 基因库受到污染。一些优良性状正面临丢失的危险。目前我国的科技工作者仅对小香羊进行了部分研究<sup>[10]</sup>, 这方面的资料还较少。为了很好地对乌羊和小香羊进行保护和开发利用, 我们利用 RAPD 技术对这两个种群进行了基因组分析, 研究其遗传背景, 以期为其群体的遗传结构和品种形成提供一些基础资料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验用羊血的来源

乌羊、南江黄羊、黑山羊、川东白山羊血样均采自山峡库区。小香羊血样采自贵州省的偏远山区。波尔山羊血样采自重庆市江北区。马头山羊血样采自湖南省芷江县。

### 1.2 DNA 的提取

颈静脉采血 5ml 于 15ml 离心管中, 加 5ml  $2\times$  ST (含 0.64mol/L 蔗糖, 0.02mol/L Tris-HCl pH7.6, 0.01mol/L MgCl<sub>2</sub>, 2% Triton-100), 剧烈振荡, 冰浴 15min, 破碎红细胞后, 离心沉淀白细胞。重复 1~2 次。再加 5ml STE (含 0.01mol/L Tris-HCl pH8.0, 0.025mol/L EDTA·2Na pH8.0, 0.1mol/L NaCl) 悬浮后加 250 $\mu$ l 10% SDS 和 25 $\mu$ l 蛋白酶 K 溶液 (100mg 蛋白酶 K/10ml), 56 $^{\circ}$ C 水浴 3h, 消化白细胞。再按常规酚、氯仿、异戊醇抽提, 乙醇沉淀, TE 溶解 DNA。4 $^{\circ}$ C 保存备用。

### 1.3 基因池的制备

将各个 DNA 样品的浓度稀释到 200ng/ $\mu$ l 后, 除

波尔山羊为 16 个样品外, 其余每个品种随机抽取 30 个 DNA 样品等量混匀构建基因池。4 $^{\circ}$ C 保存备用。

### 1.4 仪器和试剂

所用 PCR 扩增仪为 PE2400 型。所用引物为 Operon Biotechnologies 公司产品。Taq DNA 聚合酶及相应的 10 $\times$  缓冲液、MgCl<sub>2</sub> 为 Sangon 公司产品。dNTP 为 BM 公司产品。

### 1.5 PCR 反应及 RAPD 产物的分离

PCR 反应体积为 25 $\mu$ l, 包括 10mmol/L Tris-HCl pH9.0, 50mmol/L KCl, 2.0mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.4mmol/L dNTP, 15ng 引物, 15ng 基因组 DNA, 1.75U Taq DNA 聚合酶。每个反应过程为 40 个循环, 每个循环包括 94 $^{\circ}$ C 变性 1min, 38 $^{\circ}$ C 复性 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2min。首次循环前 94 $^{\circ}$ C 预变性 3min, 最后一个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。RAPD 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶 (含 0.5 $\mu$ g/ml 溴化乙锭) 电泳分离, 紫外线下观察拍照。

### 1.6 数据处理

用 RAPDistance package version 1.04 程序中的 Nei 氏公式计算品种间的遗传距离指数 D 和品种(或群体)内的遗传相似指数 F (即片段共享度)。根据遗传距离采用程序中的 NJ 法构建品种(或群体)间的系统聚类图。

遗传距离  $D=1-F$

遗传相似指数  $F=2N_{xy}/(N_x+N_y)$

其中  $N_{xy}$  是 x 个体和 y 个体共有的片段数,  $N_x$  是 x 个体扩增的片段总数,  $N_y$  是 y 个体扩增的片段总数。

## 2 结果与分析

### 2.1 RAPD 扩增结果

在所用的 40 个引物中, 除 AB3-14、AB5-09、AB6-15、AB6-17、AB8-02、AB9-01、AB9-06 以外, 其余 33 个引物都获得了清晰可辨的带, 其中 28 个引物表现出多态性, 多态频率在 11.11%~87.50% 之间。33 个引物共扩增得到 324 条带, 其中多态带为 117 条, 占总扩增片段的 36.11%。多态片段在国内品种中的分布 (61.54%~71.79%) 明显高于波尔山羊 (44.44%), 而南江黄羊、黑山羊和川东白山羊又高于乌羊、小香羊和马头山羊。图 1 为引物 AB2-19 和 AB5-02 扩增产物的电泳带结果。表 1 为扩增带统计结果。

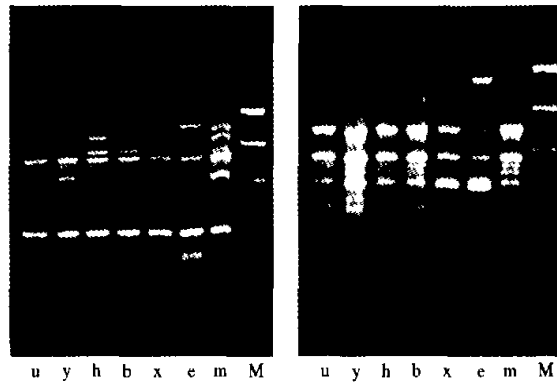


图 1 引物 AB2-19(左)和 AB5-02(右)随机扩增基因池 DNA 产物的电泳带结果  
注: u: 乌羊, y: 南江黄羊, h: 黑山羊, b: 川东白山羊, x: 小香羊, e: 波尔山羊, m: 马头山羊, M: Marker

Fig. 1 The electrophoresis patterns of RAPD products from DNA pools after random amplification with primers AB2-19 (left) and AB5-02 (right)  
Note: u: Wu goat, y: Nanjiang Brown goat, h: Black goat, b: Chuandong White goat, x: Small-xiang goat, e: Boer goat, m: Matou goat, M: Marker.

表 1 7 个山羊品种(或群体)的 RAPD 扩增结果

Table 1 The results of RAPD among 7 goat breeds (or populations)

引物	标记数	多态数	多态标记在品种中的分布							多态频率%
			u	y	h	b	x	e	m	
ABN-03	13	5	3	3	3	3	4	1	5	38.46
ABN-09	6	1	0	0	0	0	0	0	1	16.67
ABN-15	12	5	5	5	5	5	1	1	3	41.67
ABN-20	9	3	2	3	2	3	1	2	1	33.33
AB2-02	14	8	6	6	6	5	4	3	5	57.14
AB2-05	10	4	3	3	2	4	4	3	4	40.00
AB2-09	11	5	2	2	3	3	3	1	3	45.45
AB2-13	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB2-17	9	3	2	3	3	3	3	3	1	33.33
AB2-19	12	3	3	1	3	3	3	0	2	25.00
AB3-05	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB3-10	9	1	1	1	1	1	0	1	1	11.11
AB3-13	6	1	1	0	1	1	1	1	1	16.67
AB3-15	12	3	2	2	2	3	3	2	2	25.00
AB4-07	10	3	3	3	3	3	3	1	2	30.00
AB4-09	13	7	4	5	4	4	5	4	3	53.85
AB4-13	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB4-14	7	2	2	2	1	2	2	1	2	28.57
AB4-16	4	3	1	2	2	2	2	2	3	75.00
AB4-19	13	6	5	5	5	4	3	3	2	46.15
AB4-20	13	5	3	3	3	3	4	1	5	38.46
AB5-02	13	8	4	7	5	5	5	3	6	61.54
AB5-11	8	7	3	3	3	4	1	3	3	87.50
AB5-16	13	4	3	4	4	3	2	2	4	30.77
AB5-17	14	10	3	5	5	5	5	6	2	71.43
AB5-20	8	4	3	3	3	3	3	2	2	50.00
AB6-11	11	2	1	2	2	2	2	2	1	18.18
AB7-11	6	1	1	1	1	1	1	0	1	16.67
AB7-12	13	5	4	3	4	2	2	1	5	38.46
AB7-19	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB8-05	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AB8-11	13	4	2	3	3	2	2	1	3	30.77
AB8-16	13	4	2	4	4	2	3	2	2	30.77
总数	324	117	74	84	83	81	72	52	75	
多态%		36.11	63.25	71.79	70.94	69.23	61.54	44.44	64.10	

注: u: 乌羊, y: 南江黄羊, h: 黑山羊, b: 川东白山羊, x: 小香羊, e: 波尔山羊, m: 马头山羊

Note: u: Wu goat, y: Nanjiang Brown goat, h: Black goat, b: Chuandong White goat, x: Small-xiang goat, e: Boer goat, m: Matou goat.

## 2.2 山羊品种间的遗传距离

统计 28 个多态引物的扩增结果,用 RAPDistance package version 1.04 中的 Nei 氏公式计算出各种群间的遗传距离  $D$ ,见表 2。可以看出,乌羊、川东白山羊、黑山羊以及南江黄羊两两之间的遗传距离都较小,尤其以乌羊和川东白山羊间为最小,仅为 0.0610。小香羊以及马头山羊与上述四种山羊间的遗传距离较大,但小于它们与波尔山羊间的遗传距离。而波尔山羊与各个种群间的遗传距离都很大。

表 2 7 个山羊品种(或群体)间的遗传距离

Table 2 Genetic distances among 7 goat breeds (or populations)

	u	y	h	b	x	e
y	0.1036					
h	0.0694	0.0680				
b	0.0610	0.0961	0.0876			
x	0.1367	0.1602	0.1458	0.1129		
e	0.1935	0.2000	0.2065	0.1798	0.1705	
m	0.1293	0.1421	0.1231	0.1376	0.1551	0.2179

注:u:乌羊,y:南江黄羊,h:黑山羊,b:川东白山羊,x:小香羊,e:波尔山羊,m:马头山羊

Note: u: Wu goat, y: Nanjiang Brown goat, h: Black goat, b: Chuandong White goat, x: Small-xiang goat, e: Boer goat, m: Marou goat

## 2.3 聚类关系图

为了直观地体现各种群间的亲缘关系,根据表 2 的数据,用 NJ 聚类法构建了系统发育树状图,见图 2。可见,乌羊和川东白山羊以及南江黄羊和黑山羊两两相聚后,再相聚为一个大类。此一大类与马头山羊相聚为另一个大类后,再与小香羊相聚为一个大类,最后才与波尔山羊相聚。

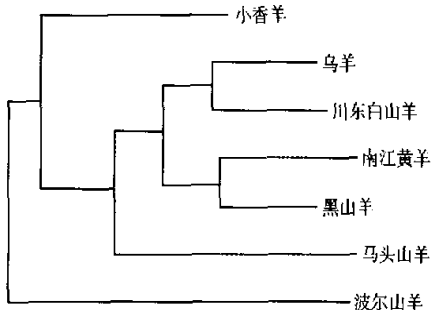


图 2 7 个山羊品种(或群体)的 NJ 聚类关系图

Fig. 2 The NJ dendrogram of 7 goat breeds (or populations)

## 2.4 乌羊群体内的遗传相似指数

遗传相似指数也称片段共享度,根据公式  $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$  计算得出 12 只乌羊个体间的遗传相似指数在 0.9341~0.9687 之间,平均为  $0.9534 \pm 0.0088$ 。

## 2.5 小香羊品种内的遗传相似指数

根据公式  $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$  计算得出小香羊品种内 12 个个体间的遗传相似指数。其大小在 0.9383~0.9843 之间,平均为  $0.9592 \pm 0.0082$ 。

## 3 讨 论

### 3.1 RAPD 方法研究山羊遗传关系的有效性

本实验用从 190 条随机引物扩增猪基因组筛选得到的 40 条多态引物对 7 个山羊品种(或群体)基因组混合 DNA 进行扩增,结果有 33 条引物获得清晰可辨、重复性好的扩增带,其中 28 条引物扩增出多态性谱带,检出率 and 多态率分别达到 82.50% 和 84.85%。本研究中每条引物扩增的片段数在 4~14 之间,平均为 9.82。明显高于有关文献的报道<sup>[11,12]</sup>,但与吴开平等以及 Carpio 等的报道<sup>[13,14]</sup>相符。扩增片段的大小在 180bp~3200bp 之间。与史宪伟等的报道<sup>[15]</sup>相一致,但又有别于吴开平等的报道<sup>[13]</sup>。这可能与所用的引物和研究的物种不同有关。

### 3.2 乌羊、小香羊与其他山羊种群间的亲缘关系

遗传距离指数表明乌羊和川东白山羊间的遗传距离最小,在 NJ 聚类图上首先聚在一起,说明它们间的亲缘关系较近。这与它们的地理分布是相符的。关于物种间亲缘关系的远近,常青等以及任军等都发现与地理分布有关<sup>[16,17]</sup>。乌羊是从川东白山羊品种中选育出来的,因而两者有共同的地理分布。从毛色上看,二者都为白色。外部形态也有很多相似之处。因此,乌羊有可能是由川东白山羊品种中的某些个体发生基因突变而形成的。从 NJ 图上可以看出,南江黄羊和黑山羊之间的亲缘关系也较近,这与南江黄羊的培育历史有关。它是由引进的四川铜羊和含努比羊基因的杂种公羊,同南江本地母山羊(俗称“火羊”)以及四川引入的金堂黑山羊进行多品种复杂育成杂交培育而形成的品种<sup>[18]</sup>。而本研究中的黑山羊是几年前酉阳县畜牧局才引入的金堂黑山羊(属于川东白山羊品种的范畴),故南江黄羊和黑山羊有着较近的亲缘关系。从总体上

看, 乌羊、南江黄羊、黑山羊、川东白山羊间的遗传距离都较小, 亲缘关系都较近, 在聚类图上聚为一个大类, 这是与事实相符的。马头山羊与上述 4 种山羊同分布在武陵山区, 但相距较远, 受地理隔离的影响较大, 基因交流少, 故亲缘关系较远。小香羊则位于黔桂交界的山区, 与上述种群根本没有基因交流, 其形成历史也不一样, 故与上述品种的亲缘关系更远。简承松等认为黔东南小香羊的遗传组成明显不同于贵州白山羊、贵州黑山羊和黔北麻羊, 是一个独特的种群<sup>[10]</sup>。但它们有共同的母系祖先起源。

### 3.3 乌羊和小香羊的遗传稳定性与保种

遗传相似指数表明, 乌羊群体内及小香羊品种内的遗传差异都较小。其值平均分别为 0.9534 和 0.9592。说明这两个种群都具有一定的遗传稳定性。这主要是由于它们分布在交通落后的山区, 与外界没有或很少发生基因交流, 长期进行近亲繁殖, 导致基因型纯合度提高, 加上当地群众定向选择和淘汰的结果。任军等在赣中南花猪的 RAPD 分析中得到的片段共享度在 0.7792~0.9491 之间<sup>[17]</sup>。而王义权等用 RAPD 方法对 6 种蛇的研究中发现, 锦蛇属 3 个种间的片段共享度在 0.4267~0.5101 之间, 而异属物种之间的片段共享度在 0.1986~0.3286 之间, 不同科物种间的片段共享度仅 0.0845~0.1417 之间<sup>[19]</sup>。可见两个物种间的亲缘关系越近, 基因组的共有序列就越多, 用相同引物进行扩增得到的共有片段数就越多, 片段共享度也就越高。遗传相似指数越高, 群体的表型性状就越一致, 其遗传就越稳定。高的遗传相似指数对于保持一个物种的优良性状代代相传至关重要。

目前乌羊仅有数百只, 小香羊的数量也不多。因此在保种中应同开发利用相结合, 通过品系繁育等途径, 适当多建立一些支系, 以丰富和扩展种群的遗传结构, 这对这两个种群的发展都是有利的。

### 参考文献 (References):

- [1] Gwakisa P S, Kemp S J, Teale A J. Characterization of Zebu cattle breeds in Tanzania using random amplified polymorphic DNA markers[J]. *Anim Genet*, 1994, 25(2): 89~94.
- [2] Appa Rao K B C, Bhat K V, Totey S M. Detection of species-specific genetic markers in farm animals through random amplified polymorphic DNA (RAPD)[J]. *Genet Anal; Biomol Eng*, 1996, 13(5): 135~138.
- [3] Cushwa W T, Dodds K G, Crawford A M, *et al.* Identification and genetic mapping of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to the sheep genome[J]. *Mammal Genome*, 1996, 7(8): 580~585.
- [4] Cargill S L, Anderson G B, Medrano J F. Development of a species-specific marker using RAPD analysis to distinguish between sheep and goats[J]. *Anim Biotechnol*, 1995, 6(2): 93~100.
- [5] Castellanos C, Barragan C, Rodriguez M C. Detection of four porcine Y-specific markers by RAPD[J]. *Anim Genet*, 1996, 27(6): 433~434.
- [6] Hunt G J, Page R E Jr. Linkage analysis of sex determination in the honey bee (*Apis mellifera*)[J]. *Mol Gen Genet*, 1994, 244(5): 512~518.
- [7] 张细权, 吕雪梅, 杨玉华, 等. 用卫星多态性和 RAPD 分析广东地方鸡种的群体遗传变异[J]. *遗传学报*, 1998, 25(2): 112~119.
- [8] 吕雪梅, 杨关福, 张细权, 等. 蛋鸡品系 RAPD 变异及其与杂种优势关系的分析[J]. *遗传*, 1999, 21(2): 24~28.
- [9] 郝家胜, 周开亚. 中国鹅 5 个品种遗传多样性的随机扩增多态 DNA 分析[J]. *南京农业大学学报*, 2000, 23(1): 58~62.
- [10] 简承松, 张亚平, 李通权, 等. 黔东南小香羊与贵州原有其它山羊品种的线粒体 DNA 多态性比较[J]. *西南农业学报*, 1999, 12(4): 86~91.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 吴开平, 吴丰春, 魏泓, 等. 五种品系猪亲缘关系的 RAPD 分析[J]. *遗传*, 2000, 22(4): 217~220.
- [14] Carpio C M, Ambady S, De Leon F A P. Bovine DNA polymorphisms uncovered by RAPD-PCR[J]. *Anim Biotechnol*, 1996, 7(2): 125~134.
- [15] 史宪伟, 陈永久, 刘爱华, 等. 云南 4 个马品种的随机扩增多态 DNA (RAPD) 分析[J]. *畜牧兽医学报*, 1998, 29(3): 193~203.
- [16] 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.
- [17] 任军, 黄路生, 高军, 等. 赣中南花猪随机扩增多态 DNA 与群体遗传关系的研究[J]. *遗传*, 2000, 22(2): 69~72.
- [18] 王维春, 贾正贵, 何焕周. 肉用型南江黄羊新品种的培育研究[A]. 见赵有璋主编. 中国山羊业的成就和进展[C]. 北京中国农业出版社, 1996, 17~20.
- [19] 王义权, 周开亚, 秦树琳. 用 RAPD 标记检测六个蛇基因组 DNA 多态性[J]. *动物学报*, 1996, 42(2): 172~181.