

# 波尔山羊和江苏本地山羊的 AFLP 和 RAPD 分析

曹少先<sup>1</sup>, 杨利国<sup>1</sup>, 姜勋平<sup>1</sup>, 刘红林<sup>1</sup>, 陆维忠<sup>2</sup>, 向阳海<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 南京农业大学动物科技学院, 南京 210095; <sup>2</sup> 江苏省农业科学院, 南京 210014)

**摘要:** 实验山羊共 105 只, 其中波尔山羊 60 只(公母羊各半, 采血样 20 个, 组织样 40 个), 徐淮山羊 30 只(公母羊各半, 每羊采血样 1 个), 海门山羊 15 只(公羊 7 只, 母羊 8 只, 每羊采血样 1 个)。分别提取 DNA, 按品种构建 DNA 池。应用 36 个选择性引物组合对波尔山羊、徐淮山羊和海门山羊品种间 AFLP 多样性进行研究, 其中 29 个引物组合共扩增出 3 253 个标记, 包括多态标记 92 个, 平均每个引物组合扩增 3.17 个多态标记, 多态频率达 2.8%。多态标记数较多的引物组合为: E00 + ACG/M00 + CAA(13 个)、E00 + ACG/M00 + CAG(10 个)、E00 + AAC/M00 + CAC(8 个) 和 E00 + AAC/M00 + ACT(7 个)。从 93 个随机引物中筛选出品种间多态性较强、重复性好的引物 22 个, 对 3 个品种池 DNA 进行 RAPD 扩增, 共扩增出 183 个标记, 其中多态标记 60 个, 平均每个引物扩增 2.73 个多态标记, 多态频率为 32.8%。两种方法得到一致结果, 即徐淮山羊与海门山羊遗传距离最近, 徐淮山羊与波尔山羊次之, 海门山羊与波尔山羊遗传距离最远。按 UPGMA 法将海门山羊与徐淮山羊聚为一类, 其次为波尔山羊。两种方法均能较好地反映 3 个山羊品种的遗传差异, 但 AFLP 方法多态标记数更多。

**关键词:** 波尔山羊; 徐淮山羊; 海门山羊; AFLP; RAPD

## AFLP and RAPD Analysis on the Boer and Native Breed of Goats in Jiangsu

CAO Shao-xian<sup>1</sup>, YANG Li-guo<sup>1</sup>, JIANG Xun-ping<sup>1</sup>, LIU Hong-lin<sup>1</sup>, LU Wei-zhong<sup>2</sup>, XIANG Yang-hai<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095;

<sup>2</sup> Jiangsu Academy of Sciences Agricultural Nanjing 210014)

**Abstract:** Blood and tissue samples were taken from 105 goats including 60 Boer goats (30 for each sex), 30 Xuhuai goats (15 for each sex) and 15 Haimen goats (7 stud and 8 does). DNA was abstracted and DNA pools were constructed on the basis of goat breed. In 36 selective primer combinations, 29 combinations amplified totally 3 253 markers, including 92 polymorphic markers by amplified fragment length polymorphism (AFLP). On average, 3.17 polymorphic markers were amplified per combination, with a polymorphic frequency of 2.8%. The primer combinations by which more polymorphic markers (showed in brackets) were obtained involved in E00 + ACG/M00 + CAA (13), E00 + ACG/M00 + CAG (10), E00 + AAC/M00 + CAC (8) and E00 + AAC/M00 + ACT (7). A total of 183 markers including 60 polymorphic markers were amplified by RAPD from the pooled DNA of three breeds using 22 primer with strong polymorphism and high repeatability selected from 93 arbitrary primers. On average, 2.73 polymorphic markers were amplified per primer, with a polymorphic frequency of 32.8%. The results of AFLP and RAPD coincidentally suggested that the genetic distance is the closest between the Xuhuai and the Haimen goat, next between the Xuhuai and Boer goat, and the farthest between the Haimen and the Boer goat. According to the UPGMA method, Haimen and Xuhuai goats can be gathered together as a cluster, then the Boer. Both methods can implicate the genetic difference of these three breeds, in particularly AFLP has more polymorphic markers.

收稿日期: 2000-10-24

基金项目: 江苏省科委“新的农业技术革命”项目(BG98501-11)和江苏省农林厅“高产优质肉羊生产综合配套技术研究”课题资助。

作者简介: 曹少先(1970-), 男, 湖南沅江人, 博士研究生, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究。E-mail: caoshaoxian@263.net。杨利国为本文通讯联系人, Tel: 025-4395306; Fax: 025-4395306; E-mail:

Key words : Boer goat ; Xuhuai goat ; Haimen goat ; AFLP ; RAPD

在众多的分子标记研究中,RAPD技术具有所用DNA量少、不需特殊的探针、多态性较丰富,灵敏度高、操作简便、经济快速等优点,因此已被广泛应用于系统分类、寻找与动植物数量性状位点(QTL)相关的分子遗传标记以及基因定位和基因作图的研究中<sup>[1-5]</sup>。AFLP技术具有结果稳定可靠、标记丰富的特点。作为一种高效的DNA指纹技术,已在动、植物基因组研究、遗传图谱及指纹图谱的构建、目的基因定位、品种识别等领域显示出广阔的应用潜力<sup>[6-10]</sup>。但AFLP技术在家畜上的应用研究开展很少<sup>[9]</sup>,特别是有关山羊方面的研究国内外尚未见报道。本研究旨在开展山羊遗传多样性研究,为更好地利用和保护山羊种质资源提供理论依据;与RAPD技术对比,探讨AFLP技术是否适用于山羊遗传多样性研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 样本采集

实验所用样本采自3个品种共105只山羊,其中60个波尔山羊样本采自江苏省徐州市家畜改良站,包括20个血样和40个组织样,公母羊各半;30个徐淮山羊(公母各半)血样采自江苏省句容农校和江苏省海安农业机械化学学校,每场各15只;15个海门山羊(7公8母)血样采自江苏省海门县种羊场。

### 1.2 DNA提取和DNA池的构建

DNA提取参照孟安明<sup>[11]</sup>的方法进行。从60只波尔山羊样本DNA提取液中等量地取出一定量的DNA溶液,混合在另一干净的1.5ml离心管中,构建成波尔山羊池DNA,加入一定量的TE<sub>0.1</sub>缓冲液稀释至终浓度为250ng/μl,再取出一部分稀释至终浓度为25ng/μl。用同样的方法将30个徐淮山羊、15个海门山羊样本DNA分别构建成徐淮山羊和海门山羊池DNA,并按上述浓度稀释。

### 1.3 RAPD PCR反应条件及产物检测

从Operon公司的随机引物OPA(16)、OPE(1-20)、OPG(1-20)、OPH(1-20)、OPK(1-20)、OPP(14)和OPQ(5-15)组的93个引物中,筛选得到山羊品种间多态性较强、重复性好的引物22个,对3个山羊DNA池进行随机扩增。

RAPD方法参照文献<sup>[3]</sup>介绍的方法略加修改,即取2.0μl 10×反应缓冲液,0.8μl 2.5mmol/L 4dNTPs(MBI),1.6μl 25mmol/L MgCl<sub>2</sub>,5pmol

引物,1U TaqDNA聚合酶(Spromega),50ng模板DNA,加超纯水至20μl。RAPD-PCR反应程序为:94℃预变性5min;变性1min,36℃复性1min,72℃延伸2min,循环40次;72℃延伸10min。产物用1.5%的琼脂糖凝胶电泳分析(3V/cm),溴化乙锭染色,紫外光下观察、拍照记录。

### 1.4 AFLP方法

AFLP实验程序根据文献<sup>[8]</sup>介绍的方法略加修改,具体步骤如下:

(1)酶切:4.0μl 10×连接酶缓冲液,0.4μl 10mg/ml BSA,5U MseI(Promega),5U EcoRI(Promega),250ng DNA,加超纯水至40μl;37℃酶切3h,70℃灭活15min。

(2)连接:向上述酶切混合液中加入含1.0μl 10×连接酶缓冲液,5pmol EcoRI双链接头(GIBCO-BRL),50pmol MseI双链接头(GIBCO-BRL),2UT4DNA连接酶(Promega)的溶液,加超纯水至50μl。22℃连接过夜,70℃灭活15min。

MseI双链接头序列为:

5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'  
3'-TACTCAGGACTCAT-5'

EcoRI双链接头序列为:

5'-AATTGGTACGCAGTCTAG-3'  
3'-CCATGCGTCAGATGCTC-5'

(3)预扩增:取2.0μl 10×反应缓冲液,加1.6μl 25mmol/L MgCl<sub>2</sub>,1.6μl 2.5mmol/L 4dNTPs,75ng EcoRI预扩增引物(GIBCO-BRL),75ng MseI预扩增引物(GIBCO-BRL),1U TaqDNA聚合酶(Promega),5.0μl模板DNA(酶切连接混合物),加超纯水至20μl。94℃变性30s,56℃复性30s,72℃延伸1min,循环30次后,于72℃延伸5min。取5μl PCR产物用TE<sub>0.1</sub>稀释到150μl作为选择性扩增的模板。另取5μl 0.75%琼脂糖电泳观察结果,其余的于-20℃冻存。

引物脱氧核苷酸序列为:

M00:GATGAGTCCTGAGTAA  
和E00:GACTGCGTACCAATTC

(4)选择性扩增:取2.0μl 10×反应缓冲液,1.6μl 25mmol/L MgCl<sub>2</sub>,1.6μl 2.5mmol/L 4dNTPs,30ng EcoRI选择性引物(GIBCO-BRL),30ng MseI选择性引物(GIBCO-BRL),1U TaqDNA聚合酶,5.0μl模板DNA,加超纯水至20μl。

94℃预变性 2 min;94℃变性 30s,65℃复性 30s;72℃延伸 60s,循环 12 次,每个循环降低 0.7℃。然后在 94℃变性 30s,56℃复性 30s,72℃延伸 60s,持续 23 个循环后,于 72℃延伸 7 min。

(5) AFLP 产物凝胶电泳分析:用 6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。100 W 恒功率预电泳 30 min 后,样品与变性缓冲液 1:1 混合,96℃变性 2 min,立即置冰浴上,每个泳道加样 5μl;100 W 恒功率电泳 1.5~2h;按 GIBCOBRL 银染试剂盒方法进行染色,记录结果并拍照。

### 1.5 统计分析方法

(1) 遗传距离:根据公式  $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)^{[12]}$  计算任意两个品种之间标记的片段共享度 (F),其中  $N_{xy}$  为品种 X 和品种 Y DNA 池 PCR 扩

增分子量相同的 DNA 片段总数; $N_x$ 、 $N_y$  分别为品种 X 和品种 Y DNA 池 PCR 扩增产物的 DNA 片段总数。任意两个品种之间的遗传距离指数  $D=1-F$ 。

(2) 聚类分析:根据 D 值,运用 UPGMA(unweighted pair group method using arithmetic average) 方法对品种进行聚类分析并构建聚类关系图。

## 2 结果与分析

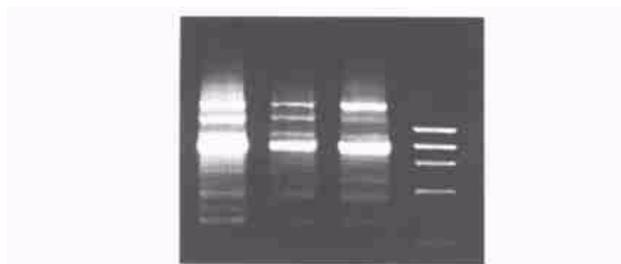
### 2.1 应用 22 个随机引物对 3 个品种山羊 DNA 池的 RAPD 扩增

运用筛选出的 22 个引物(表 1)对 3 个 DNA 池进行 RAPD 扩增,共得到 183 条清晰的标记(部分电泳图谱见图 1,图 2),其中多态性标记 60 个,多态频率 32.8%。

表 1 22 个随机引物对 3 个山羊品种池 DNA 的 RAPD 扩增结果

Table 1 The RAPD result of 3 goat breed DNA pools amplified by 22 primers

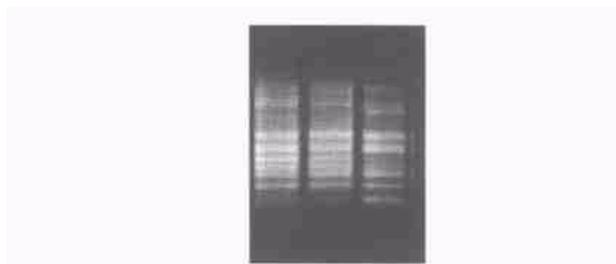
引物号 Primer	标记数 Markers	多态标记数 Poly morphic markers	引物号 Primer	标记数 Markers	多态标记数 Poly morphic markers	引物号 Primer	标记数 Markers	多态标记数 Poly morphic markers
OPE-01	12	7	OPH-02	10	2	OPH-18	10	2
OPE-04	3	2	OPH-03	5	2	OPH-19	5	5
OPE-11	7	4	OPH-05	7	3	OPH-20	9	1
OPE-13	7	3	OPH-07	7	2	OPP-14	12	2
OPE-15	5	1	OPH-09	4	3	OPQ-14	14	3
OPG-04	9	4	OPH-13	9	1	OPQ-15	12	2
OPG-07	9	2	OPH-14	10	3			
OPG-16	9	2	OPH-15	8	4			



从上至下依次为 DL2000、波尔山羊、徐淮山羊和海门山羊的电泳带  
It is DL2000, DNA fragment of Boer, Xuhuai and Hai men goat respectively from up to down

图 1 OPH 14 对山羊池 DNA RAPD 扩增的电泳图谱

Fig.1 The RAPD electrophoresis photograph of goat DNA pools amplified by OPH14



从上至下依次为波尔山羊、徐淮山羊和海门山羊的电泳带  
It is DNA fragment of Boer, Xuhuai and Hai men goat respectively from up to down

图 2 OPH 18 对山羊池 DNA RAPD 扩增的电泳图谱

Fig. 2 The RAPD electrophoresis photograph of goat DNA pools amplified by OPH18

### 2.2 应用 36 个选择性引物组合对各品种池 DNA 的 AFLP 分析

用 36 个引物组合对 3 个品种山羊池 DNA 进行 AFLP 分析,29 个引物组合得到多态标记(表 2、图 3),多态标记总数 92 个。29 个引物组合共扩增出清晰的标记 3 253 个,平均每个引物组合 112.2 个。

### 2.3 各品种的 RAPD 聚类分析

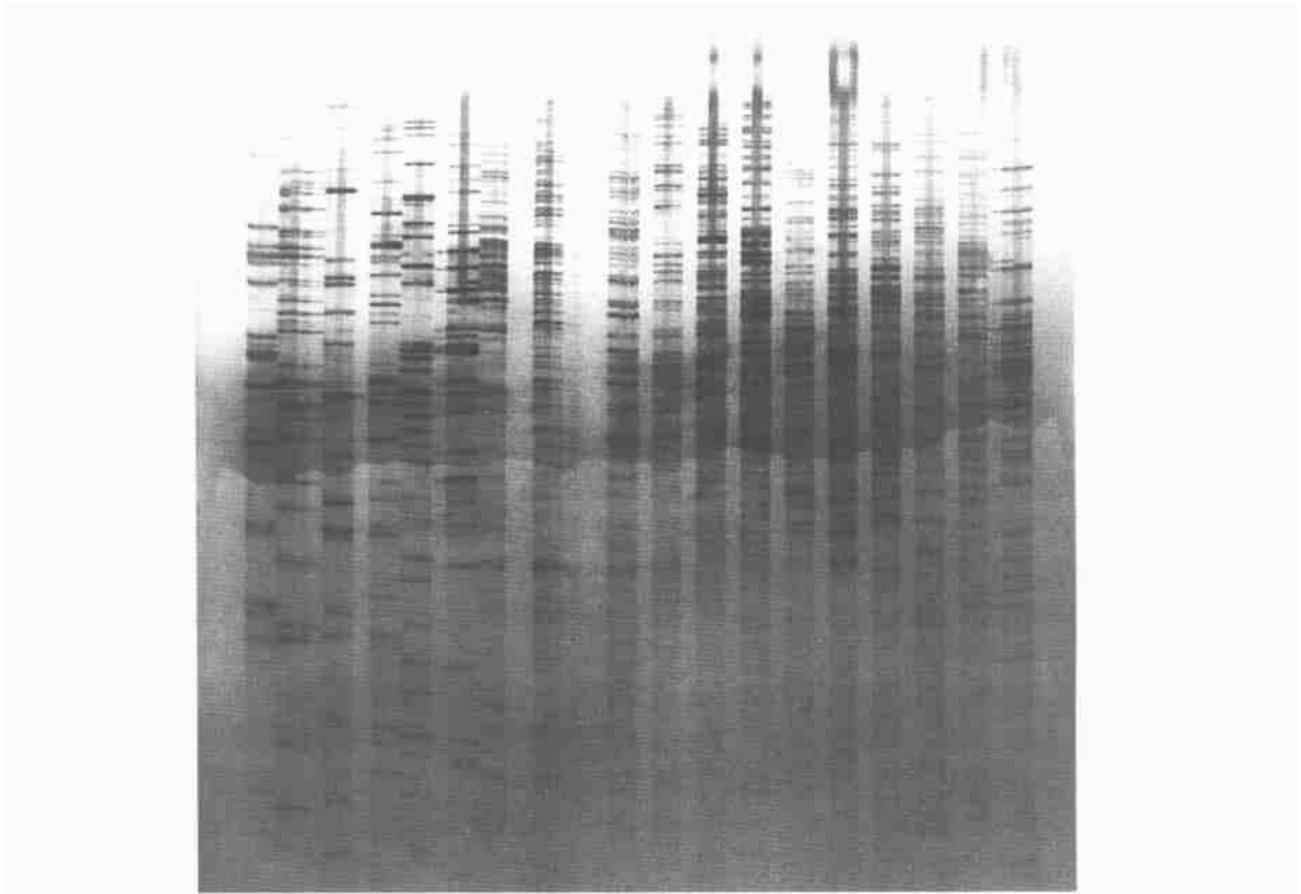
应用 22 个随机引物对 3 个品种山羊池 DNA RAPD 扩增产生的谱带数为:徐淮山羊(X)140 条,海门山羊(H)137 条,波尔山羊(B)166 条;其中徐淮山羊和海门山羊共有谱带数 123 条,海门山羊和波尔山羊共有谱带数 113 条,徐淮山羊和波尔山羊共

表 2 36 个选择性引物序列及 AFLP 扩增结果<sup>1)</sup>

Table 2 The Primer sequences and the AFLP result amplified by 36 selective primers

MseI 引物序列 MPS	EcoRI 引物 序列 EPS	标记数 Markers	多态标记数 PM	多态率 (%) PF	MseI 引物序列 MPS	EcoRI 引物 序列 EPS	标记数 Markers	多态标记数 PM	多态率 (%) PF
M00 + ACC( M <sub>1</sub> )	E00 + AAC( E <sub>1</sub> )	120	3	2.50	M00 + ACC( M <sub>1</sub> )	E00 + ACT( E <sub>4</sub> )	135	1	0.74
M00 + ACT( M <sub>2</sub> )	E00 + AAC( E <sub>1</sub> )	129	7	5.43	M00 + ACT( M <sub>2</sub> )	E00 + ACT( E <sub>4</sub> )	146	1	0.68
M00 + CAA( M <sub>3</sub> )	E00 + AAC( E <sub>1</sub> )	106	2	1.89	M00 + CAA( M <sub>3</sub> )	E00 + ACT( E <sub>4</sub> )	137	4	2.92
M00 + CAC( M <sub>4</sub> )	E00 + AAC( E <sub>1</sub> )	115	8	6.96	M00 + CAC( M <sub>4</sub> )	E00 + ACT( E <sub>4</sub> )	160	4	2.50
M00 + CAG( M <sub>5</sub> )	E00 + AAC( E <sub>1</sub> )	101	3	2.97	M00 + CAG( M <sub>5</sub> )	E00 + ACT( E <sub>4</sub> )	118	1	8.47
M00 + CAT( M <sub>6</sub> )	E00 + AAC( E <sub>1</sub> )	104	1	0.96	M00 + CAT( M <sub>6</sub> )	E00 + ACT( E <sub>4</sub> )	146	4	2.74
M00 + ACC( M <sub>1</sub> )	E00 + ACC( E <sub>2</sub> )	87	4	4.60	M00 + ACC( M <sub>1</sub> )	E00 + AGG( E <sub>5</sub> )	98	2	2.04
M00 + ACT( M <sub>2</sub> )	E00 + ACC( E <sub>2</sub> )	127	1	0.79	M00 + ACT( M <sub>2</sub> )	E00 + AGG( E <sub>5</sub> )	112	1	0.89
M00 + CAA( M <sub>3</sub> )	E00 + ACC( E <sub>2</sub> )	98	2	2.04	M00 + CAA( M <sub>3</sub> )	E00 + AGG( E <sub>5</sub> )	110	1	0.91
M00 + CAC( M <sub>4</sub> )	E00 + ACC( E <sub>2</sub> )	109	0	0.00	M00 + CAC( M <sub>4</sub> )	E00 + AGG( E <sub>5</sub> )	90	0	0.00
M00 + CAG( M <sub>5</sub> )	E00 + ACC( E <sub>2</sub> )	114	1	0.88	M00 + CAT( M <sub>6</sub> )	E00 + AGG( E <sub>5</sub> )	137	0	0.00
M00 + CAT( M <sub>6</sub> )	E00 + ACC( E <sub>2</sub> )	129	1	0.78	M00 + CAG( M <sub>5</sub> )	E00 + AGG( E <sub>5</sub> )	101	0	0.00
M00 + ACC( M <sub>1</sub> )	E00 + ACC( E <sub>3</sub> )	72	4	5.56	M00 + ACC( M <sub>1</sub> )	E00 + CAG( E <sub>6</sub> )	146	1	0.68
M00 + ACT( M <sub>2</sub> )	E00 + ACC( E <sub>3</sub> )	94	3	3.19	M00 + ACT( M <sub>2</sub> )	E00 + CAG( E <sub>6</sub> )	123	1	0.81
M00 + CAA( M <sub>3</sub> )	E00 + ACC( E <sub>3</sub> )	91	13	14.29	M00 + CAA( M <sub>3</sub> )	E00 + CAG( E <sub>6</sub> )	141	0	0.00
M00 + CAC( M <sub>4</sub> )	E00 + ACC( E <sub>3</sub> )	80	2	2.50	M00 + CAC( M <sub>4</sub> )	E00 + CAG( E <sub>6</sub> )	108	0	0.00
M00 + CAG( M <sub>5</sub> )	E00 + ACC( E <sub>3</sub> )	64	10	15.63	M00 + CAG( M <sub>5</sub> )	E00 + CAG( E <sub>6</sub> )	146	2	1.37
M00 + CAT( M <sub>6</sub> )	E00 + ACC( E <sub>3</sub> )	45	4	8.89	M00 + CAT( M <sub>6</sub> )	E00 + CAG( E <sub>6</sub> )	133	0	0.00

<sup>1)</sup> MPS: MseI primer sequence, EPS: EcoRI primer sequence, PM: polymorphic markers, PF: polymorphic frequency



1 - 18 依次表示选择性引物组合 M<sub>6</sub>/E<sub>3</sub>、M<sub>5</sub>/E<sub>3</sub>、M<sub>4</sub>/E<sub>3</sub>、M<sub>3</sub>/E<sub>3</sub>、M<sub>2</sub>/E<sub>3</sub>、M<sub>1</sub>/E<sub>3</sub>、M<sub>6</sub>/E<sub>2</sub>、M<sub>5</sub>/E<sub>2</sub>、M<sub>4</sub>/E<sub>2</sub>、M<sub>3</sub>/E<sub>2</sub>、M<sub>2</sub>/E<sub>2</sub>、M<sub>1</sub>/E<sub>2</sub>、M<sub>6</sub>/E<sub>1</sub>、M<sub>5</sub>/E<sub>1</sub>、M<sub>4</sub>/E<sub>1</sub>、M<sub>3</sub>/E<sub>1</sub>、M<sub>2</sub>/E<sub>1</sub> 和 M<sub>1</sub>/E<sub>1</sub> 对 3 个品种池 DNA 限制性片段扩增的电泳图谱。每个数字均代表 3 个泳道, 从左至右依次为波尔山羊、海门山羊、徐淮山羊池 DNA

1 - 18 stand for AFLP electrophoresis bands of restrict fragment of three breeds DNA pools amplified by selective primer combinations M<sub>6</sub>/E<sub>3</sub>, M<sub>5</sub>/E<sub>3</sub>, M<sub>4</sub>/E<sub>3</sub>, M<sub>3</sub>/E<sub>3</sub>, M<sub>2</sub>/E<sub>3</sub>, M<sub>1</sub>/E<sub>3</sub>, M<sub>6</sub>/E<sub>2</sub>, M<sub>5</sub>/E<sub>2</sub>, M<sub>4</sub>/E<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>/E<sub>2</sub>, M<sub>2</sub>/E<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>/E<sub>2</sub>, M<sub>6</sub>/E<sub>1</sub>, M<sub>5</sub>/E<sub>1</sub>, M<sub>4</sub>/E<sub>1</sub>, M<sub>3</sub>/E<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>/E<sub>1</sub> and M<sub>1</sub>/E<sub>1</sub> correspondingly. Each number stands for three lanes which is Boer, Haimen and Xuhuai goat respectively DNA fragment from light to right

图 3 波尔山羊、海门山羊、徐淮山羊的 AFLP 电泳图谱

Fig. 3 The AFLP electrophoresis photograph of Boer goat, Haimen goat and Xuhuai goat

有谱带数 127 条。

根据共享度  $F = 2N_{XY} / (N_X + N_Y)$  得,  $F_{XH} = 0.888$ ,  $F_{HB} = 0.746$ ,  $F_{XB} = 0.830$ 。

根据遗传距离指数  $D = 1 - F$ , 则  $D_{XH} = 0.112$ ,  $D_{HB} = 0.254$ ,  $D_{XB} = 0.170$ 。

根据 3 个群体间的遗传距离指数, 按 UPGMA 方法, 得到 3 个品种的聚类图(图 4)。

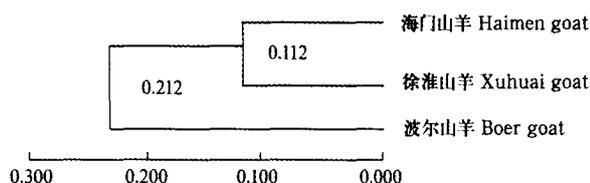


图 4 3 个山羊品种的 RAPD 聚类图

Fig. 4 The cluster of three goat breeds based on RAPD

## 2.4 各品种的 AFLP 聚类分析

应用 29 个选择性引物组合对 3 个品种山羊池 DNA 扩增共产生标记数:徐淮山羊(X) 3 215 个,海门山羊(H) 3 199 个,波尔山羊(B) 3 213 个,其中徐淮山羊和海门山羊共有标记数 3 187 个,海门山羊和波尔山羊共有标记数 3 165 个,徐淮山羊和波尔山羊共有标记数 3 178 个。根据共享度  $F = 2N_{XY} / (N_X + N_Y)$  得,  $F_{XH} = 0.9938$ ,  $F_{HB} = 0.9872$ ,  $F_{XB} = 0.9888$ 。根据遗传距离指数  $D = 1 - F$ , 则  $D_{XH} = 0.0062$ ,  $D_{HB} = 0.0128$ ,  $D_{XB} = 0.0112$ 。根据 3 个群体间的遗传距离指数, 按 UPGMA 方法, 得到 3 个品种的聚类图(图 5)。

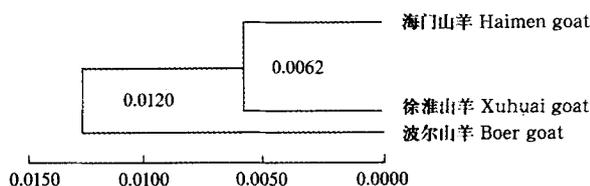


图 5 3 个山羊品种的 AFLP 聚类图

Fig. 5 The cluster of three goat breeds based on AFLP

## 3 讨论

### 3.1 关于 RAPD 和 AFLP 方法

#### 3.1.1 关于 RAPD 反应条件及扩增产物的重复性

由于 RAPD 反应非常灵敏, 扩增条件中稍有差异就会导致结果发生改变, 因此, RAPD 结果在不同的实验室间的重复性和可比性一直困扰着研究人员,

也给该技术的应用带来不便。本试验中通过对模板 DNA、Taq 酶、镁离子、引物、dNTP 等进行浓度梯度分析, 优化反应条件, 获得稳定性、重复性良好的扩增产物。为了尽量避免或减少因反应条件而造成的实验偏差, 一旦确定最佳反应体系就严格遵循、规范操作。所有试剂使用同一厂家同一批次产品, 试剂批量配制, 分装冻存, 使用同一 PCR 扩增仪, 各种热循环参数一致。这与陈永久等<sup>[13]</sup>在 RAPD 分析规范化研究中得出的结果(RAPD 的重复性取决于反应条件的一致性程度)是一致的。

#### 3.1.2 关于银染 AFLP 分析中应注意的几个问题

AFLP 操作步骤复杂, 因此应该严格控制实验条件, 将实验误差减少到最低限度。就技术操作而言, 酶切是最关键的。酶切必须完全彻底, 否则电泳时表现为胶板上部谱带多而密, 中下部谱带稀少, 还会出现假多态现象。而要保证酶切效果, 关键是 DNA 的质量及酶切体系的优化。高质量的 DNA 是保证充分酶切的关键, 本实验 DNA 检测基本没有降解,  $OD_{260} / OD_{280}$  在 1.7 ~ 1.9 之间, 完全符合实验要求。酶切时, 时间不能过长, 否则会因体系中杂质等原因导致部分 DNA 降解, 结果表现为上部带稀少, 中下部稠密。关于分析中使用的酶切组合, Vos 等<sup>[8]</sup>比较了 EcoRI、HindIII、PstI、BglII、XbaI、Sse8387I 和 MseI 或 TaqI 各种组合在 AFLP 分析中的效果, 发现 MseI 可高效地酶切富含 AT 的真核生物重复序列区域, 产生的片段大小适合于 PCR 扩增和变性聚丙烯酰胺凝胶的分离, 而其它寡切点酶的酶切效果与 EcoRI 基本相差不大, 但 EcoRI 价格低且酶切较为完全, 避免了由于酶切不完全而产生的带纹失真问题, 因而 EcoRI 在 AFLP 指纹图谱分析中应用较为广泛。

银染方法用于 AFLP 分析, 不但可以避免放射性同位素危害, 降低分析成本, 而且可以得到结果可靠、分辨率较高的指纹图谱, 因而近年来倍受关注。Cho 等<sup>[7]</sup>对水稻 AFLP 进行同位素标记和银染, 发现银染可以观察到约 100 条谱带, 而<sup>32</sup>P-dCTP 只能观察到 65 条, 认为银染分辨率高于<sup>32</sup>P 标记, 这种情况在扩增片段分子量大于 300bp 时尤为明显。本研究中 29 个引物组合产生 3 253 条谱带, 平均每个引物组合 112.2 条, 同样显示银染 AFLP 具有较高的分辨率。

#### 3.2 RAPD 和 AFLP 标记在山羊遗传多样性研究中的应用

运用 RAPD 和 AFLP 两种标记对 3 个品种间亲

缘关系的研究结果一致。徐淮山羊与海门山羊具有最近的亲缘关系,而波尔山羊与徐淮山羊的亲缘关系较波尔山羊与海门山羊的亲缘关系近。RAPD用于品种间亲缘关系研究的可行性已得到了大量实验支持<sup>[2~5]</sup>,而 AFLP 方法由于其多态标记丰富,实验重复性好,已在植物品种鉴定方面展示出诱人的前景。由于 AFLP 在家畜方面的应用较少,特别是在山羊上的应用国内外还未见报道(已检索 NCBI 数据库),因此本研究选用应用最为广泛的 EcoRI、MseI 酶切组合,参照猪<sup>[9]</sup>品种间多态性较为丰富的 36 个引物组合对山羊的遗传多样性进行了初步研究。结果表明,29 个引物组合表现出多态,共产生 92 个多态标记,平均每个引物组合 3.17 个;而 RAPD 方法中,93 个引物仅筛选出 22 个多态性较好的引物,共得到 60 个多态标记,平均每个引物 2.73 个,由此看出 AFLP 方法多态标记更丰富。如进一步筛选引物组合,则能更充分地发挥 AFLP 多态标记丰富的特点。同时表明,AFLP 方法适用于山羊遗传多样性研究,这与万春玲运用 AFLP 方法对家蚕研究的结果是一致的<sup>[10]</sup>。

致谢:AFLP 实验得到南京农业大学园艺系房金贵博士指导,样本采集过程中,得到徐州市家畜改良站、句容农校羊场、海安农校羊场和海门县种羊场的大力支持,特此致谢。

## References

- [ 1 ] Dong Z J, Xia D Q, Wu T T, Yang H, Wang T. Application of RAPD technique in a study of fish heterosis. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1999, 6(1):37-40. (in Chinese)  
董在杰,夏德全,吴婷婷,杨弘,王涛. RAPD 技术在鱼类杂交优势研究中的应用. *中国水产科学*, 1999, 6(1):37-40.
- [ 2 ] Ezer A D, Williams R W, Goldowitz D. Arbitrary primer PCR of dog DNA with estimate of average heterozygosity. *Journal of Heredity*, 1996, 87:450-455.
- [ 3 ] Williams J G, Kublik A R, Livak K J, Rafalski J A, Tingey S V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res.* 1990, 18:6531-6535.
- [ 4 ] Kemp S J, Teal A J. Randomly primed PCR amplification of pooled DNA reveals polymorphism in a ruminant repetitive DNA sequence which differentiates *Bos indicus* and *taurus*. *Animal Genetics*, 1994, 25:83-88.
- [ 5 ] Liu D W. A primary study on six pig breeds using random amplified polymorphic DNA. *Animal biotechnology Bulletin*, 1998, 5(Supplement):48-50.
- [ 6 ] Thomas C M, Vos P, Zabeau M, Jones D A, Norcott K A, Chadwick B P, Jones J D. Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato cf9 gene for resistance to *cladosporium fulvum*. *The Plant Journal*, 1995, 8(5):785-794.
- [ 7 ] Cho Y G, Blair M W, Panaud, McCouch S R. Cloning and mapping of variety-specific rice genomic DNA sequences amplified fragment length polymorphisms (AFLP) from silver-stained polyacrylamide gel. *Genome*, 1996, 18:68-69.
- [ 8 ] Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Homes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 1995, 21:4407-4414.
- [ 9 ] Innan H, Terauchi R, Kahl G, Tajima F. A method for estimating nucleotide diversity from AFLP data. *Genetics*, 1999, 151(3):1157-1164.
- [ 10 ] Wan C L, Zhu Y F, Tan Y D, Lu C. Application of AFLP markers to detecting genetic polymorphisms in silk worm (*Bombyx mori*). *Biotechnology*, 1999, 9(5):4-9. (in Chinese)  
万春玲,朱玉芳,谭远德,鲁成. AFLP 标记在研究家蚕遗传多态性方面的应用. *生物技术*, 1999, 9(5):4-9.
- [ 11 ] Mong A M, Qi S Z, Gong G F. The DNA fingerprint of domestic poultry by 4 probes. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 1993, 20(2):139-142. (in Chinese)  
孟安明,齐顺章,宫桂芳. 四个探针产生的家禽 DNA 指纹图谱. *生物化学与生物物理进展*, 1993, 20(2):139-142.
- [ 12 ] Nei M, Li W. Mathematical populations. *Am Nature*. 1979, 106:283-292.
- [ 13 ] Chen Y J, Zhang Y P. Studies on factors in random amplified polymorphic DNA analysis. *Zoological Research*, 1997, 18(2):221-227. (in Chinese)  
陈永久,张亚平. 随机扩增多态 DNA 影响因素的研究. *动物学研究*, 1997, 18(2):221-227.