

# 白羅曼鵝逢機複製多態性 DNA 片段指印之分析<sup>(1)</sup>

林德育<sup>(2)</sup> 劉瑞珍<sup>(3)</sup> 陳若菁<sup>(2)</sup>

葉力子<sup>(4)</sup> 張秀鑾<sup>(2)</sup> 戴 謙<sup>(5)</sup>

收件日期：89 年 11 月 20 日；接受日期：90 年 2 月 1 日

## 摘 要

由白羅曼鵝種鵝族群中依公鵝性成熟體重及母鵝產蛋數分成高體重 (HBW)、低體重 (LBW)、高產蛋 (HEP) 及低產蛋 (LEP) 等 4 組，各組分別有 12、12、8 及 9 隻，總共 41 隻，利用逢機複製多態性 DNA (RAPD) 方法分析白羅曼鵝 DNA 多態性。自脛靜脈採集 1~3 ml 血液，以 DNA 萃取套組萃取全血之基因組 DNA，測定並調整適當濃度後，將所得之 DNA 作為模板，再以合成之 10 鹽基對 (10 bp) 寡核苷酸作為引子，進行聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)。PCR 複製後之產物以 1.5%瓊脂糖膠進行電泳分析。利用 328 種不同寡核苷酸序列之逢機引子分析各組鵝隻混合 DNA 及個體 DNA，尋求可能與鵝隻性成熟體重及產蛋數相關之遺傳標記。結果顯示檢測所有供試鵝隻 DNA 所使用之 328 種引子中，有 85% (279/328) 種引子可得到 PCR 產物，41% (135/328) 種引子可檢測出具有變異性的片段，在引子 AB14 (940bp)、AE03 (690bp)、AE06 (920bp)、AG10 (1350bp, 1370bp)、AL13 (1288bp) 可得具性別特異性的片段；而引子 AD06 (720bp) 與 AJ15 (490bp) 二種引子所產生之特異性 DNA 片段在高低產蛋數組間之頻率具較大差異。

關鍵詞：白羅曼鵝、逢機複製多態性 DNA、多態性。

## 緒 言

本省鵝的產值佔農業產值的比率自 1989 年至 1998 年間由 0.64% 增加至 0.98%，鵝隻在養隻數由 2,062,000 隻增加到 3,225,000 隻 (臺灣農業年報, 1991; 1995; 1999a)，年屠宰隻數也由 4,140,000 隻增至 7,955,000 隻 (臺灣農業年報, 1999b)。而本省種鵝數量達 807,137 隻，其中白羅曼鵝佔 97.6% (王等, 1996)。鵝的產蛋受光照的影響，為季節性產蛋的家禽，因此年產蛋數在家

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第1039號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所家畜育種系。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所家畜生理系。

(4) 財團法人中央畜產會。

(5) 國立成功大學生物科技研究所。

禽中亦較少。白羅曼鵝年產蛋數約 40 個，且個體變異大，尚有改進的空間。本省鵝隻生產以肉用為主且消費型態是以分切方式而非以全鵝消費，鵝農希望能生產體型較大且體重較重的鵝隻。家畜禽經濟性能的改良除藉由傳統的選拔方法外，利用分子遺傳技術尋求遺傳標記作為輔助選拔之依據亦為研究人員努力的方向。在家禽分子遺傳的研究上，過去都著重於易於分析之基因，或是與哺乳類有關之基因的分析。至於與生產性能有關之基因則未有深入的研究。最大原因在於它們大都受到數量性狀基因之影響，遺傳組成上不易有明顯之主效基因的差異；而且與環境之交互作用後之表現型不易由一簡單之遺傳型來區分 (Cheng, 1997)。但由於 DNA 片段多態性分析技術之建立，使得研究者可利用生產性能基因與遺傳組成上的多態性連鎖關係來分析基因型，進而作為家禽改良之指標。多態性 DNA 指印曾被廣泛地被應用於遺傳純度、種原鑑定、類緣分析、基因定位以及控制生產性狀基因的變異性研究 (劉等, 1999)。最常被人使用的 DNA 指印 (fingerprint) 為限制酶分切片段長度多態性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)，早期須利用南方點墨轉漬法 (Southern blot) 及探針雜交 (hybridization) 處理，所需之 DNA 量較多且操作較複雜。自從聚合酶連鎖反應 (PCR) 技術的開發後，RFLP 更被普遍地應用於多態性的分析上。然而，一般皆需有標的基因的核苷酸序列資料，以便設計所需之 PCR 引子。而另一種 DNA 多態性分析的方法是由 Welsh and McClelland (1990) 及 Williams 等人 (1990) 所發展出的 RAPD 方法。RAPD 之分析方法為利用 PCR 及寡核苷酸 (10 bp) 為引子逢機製作出來之 DNA 片段來進行多態性分析 (Caetano-Anolle's *et al.*, 1991; Welsh *et al.*, 1991)，利用此逢機選出之寡核苷酸引子及少量的 DNA 模板在較為不嚴格的條件下 (relaxed stringency) 讓其反應，可以作出多態性的 DNA 指印，這些 DNA 多態性可作為品系品種間之差異指標 (Welsh, *et al.*, 1991)，亦可提供個體間變異之指標，在蕃茄育種上已利用此法找出抗病品種 (Martin *et al.*, 1991)。RAPD 方法亦被應用於綿羊胚性別鑑定 (Gutierrez-Adan *et al.*, 1997)，微生物的分類 (Yoshida *et al.*, 1999) 及類緣關係 (Kantanen *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1996; Qui and Li, 1999)。在家禽方面，Levin 等人於 1993 年亦曾利用此法對 Z 染色體作基因定位；蕭等 (1996) 曾以 RAPD 分析番鴨、褐色菜鴨、土雞及中國鵝之 DNA 多態性；Wei *et al.*, (1997) 在洛島紅 (Rhode Island red) 與白色來亨 (White Leghorn) 雞近親品系雜交族群以 RAPD 方法找出區分近親品系的遺傳標記；劉等 (1999) 亦利用 RAPD 來分析近親台灣土雞之遺傳相似性。由於鵝隻 DNA 的研究亦不多。因此，本試驗之目的即在於利用 RAPD 來分析白羅曼鵝 DNA 多態性，以建立可供利用之遺傳標記。

## 材料與方法

### I. 試驗動物

由彰化種畜繁殖場大體型品系白羅曼鵝族群中，在 67 隻公鵝平均性成熟體重為  $6.20 \pm 0.87$  公斤，將性成熟體重在平均加一個標準偏差 (7.04 kg) 以上之公鵝列為高體重組 (HBW) 與平均減一個標準偏差 (5.35 kg) 以下者列為低體重組 (LBW)，兩組各取 12 隻公鵝；高產蛋品系母鵝群 (120 隻) 平均產蛋數為  $44.6 \pm 15.4$  個，將產蛋數在平均加一個標準偏差 (60 個) 以上之母鵝列為高產蛋組 (HEP)，而產蛋數在平均減一個標準偏差 (29 個) 以下者列為低產蛋組 (LEP)，高產蛋組與低產蛋組分別取 8 隻與 9 隻母鵝。

### II. 採血及 DNA 萃取

- (i) 由脛靜脈採集血液約 1~3 ml，置入含抗凝血劑之試管中供 DNA 之萃取。
- (ii) 以快速 DNA 萃取套組 (IsoQuick, Microprobe, USA) 萃取全血後，將取得之 DNA 樣品利用光電比色計 (Pharmacia LKB, England) 測定 DNA 濃度並調整至最後濃度為 20~30 ng/ $\mu$ l 供 PCR 反應之模板 (template)。

### III. PCR 反應與 PCR 產物之電泳

利用長度為 10 bp 的合成寡核苷酸 OPAA-01 至 OPAA-20、OPAB-01 至 OPAB-20、……、OPAQ-01 至 OPAQ-08 等 328 種隨機引子 (Operon, USA)，以分組鵝隻混合 DNA 做為模板，利用 Taq 聚合酶進行 PCR。RAPD-PCR 反應之條件與 PCR 產物之電泳沿用劉等 (1999) 採用之方法進行。

### IV. RAPD 指印分析

上述的照片，以目測配合電腦影像掃描分析軟體 (GelCompar 4.0, Applied Maths, Belgium) 進行 RAPD 指印之多態性分析與比對。

表 1. 不同引子對白羅曼鵝 DNA 所複製出之 PCR 產物

Table 1. PCR product information in White Roman geese from different random primers

Primer kits	Numbers of amplifiable primer	Numbers of DNA Fragment	Length of DNA fragment (kb)	Unamplifiable primers
AA01~AA20	17	2~11	0.40~2.50	AA05, AA14, AA20
AB01~AB20	20	1~13	0.40~2.50	
AC01~AC20	18	2~7	0.43~2.90	AC16, AC18
AD01~AD20	18	3~9	0.38~2.50	AD07, AD10
AE01~AE20	20	4~8	0.36~2.60	
AF01~AF20	15	5~21	0.25~2.60	AF01, AF14, AF15, AF16, AF19
AG01~AG20	20	6~18	0.35~2.70	
AH01~AH20	17	8~19	0.39~2.60	AH05, AH06, AH07
AI01~AI20	20	6~14	0.30~2.60	
AJ01~AJ20	20	6~24	0.32~3.00	
AK01~AK20	20	4~17	0.28~2.50	
AL01~AL20	19	4~15	0.36~2.50	AL02
AM01~AM20	12	5~17	0.37~2.50	AM05, AM09, AM10, AM13, AM14, AM15, AM16, AM17
AN01~AN20	14	2~11	0.50~2.60	AN02, AN03, AN04, AN08, AN09, AN16
AO01~AO20	11	3~13	0.48~2.40	AO01, AO02, AO06, AO07, AO10, AO11, AO13, AO16, AO20
AP01~AP20	13	2~12	0.49~2.70	AP03, AP09, AP12, AP14, AP15, AP18, AP20
AQ01~AQ08	5	3~11	0.42~2.50	AQ01, AQ07, AQ08

## 結果與討論

利用 RAPD 方法分析彰化場之白羅曼鵝 DNA，在 328 種 operon 10 bp 寡核苷酸引子所得之指印中，有 85% (279/328) 種引子可獲得複製 DNA 片段產物 (表 1)，而可複製出具多態性 DNA 片段的引子有 41% (135/328) 種 (表 2)。其中有一些引子對白羅曼鵝 DNA 所產生之 DNA 片段為相同型態 (圖 1)，另一類則可使不同個體間產生多態性 (圖 2)。又在所作出之 RAPD 指印，平均約可產生 8 至 10 條產物，而 DNA 片段之長度變異範圍為 0.2~3.0 kb。在 RAPD-PCR 能產生 DNA 片段的引子中白羅曼鵝僅有 48% (135/279) 可產生多態性 DNA 片段，相較蕭等 (1996) 分析正番鴨 (95%)、褐色萊鴨 (86%)、土雞 (90%) 及中國鵝 (70%) 低，可能為該族群經長期的閉鎖選留，而造成多態性 DNA 片段變異降低。

以引子 AB14 檢測所有供試之母鵝 DNA 發現可複製出一條 860 bp DNA 片段，在供試公鵝 DNA 中則無此片段 (圖 3)；此外，在引子 AE03 (690 bp)、AE06 (920 bp)、AG10 (1350 bp, 1370 bp)、及 AL13 (1288 bp) 亦在母鵝具特異的片段。檢測高產蛋組及低產蛋組白羅曼鵝 RAPD 型態，發現 AD06 與 AJ15 (圖 4) 二種引子所產生之特異性 DNA 片段在組間之頻率具較大變異 (表 3)，而 AD14 (700 bp) 與 AH13 (2400 bp) 在所有高產蛋組之母鵝皆無此特異性 DNA 片段，而在低產蛋組之母鵝分別有 22.2% (2/9) 與 33.3% (3/9) 產生此特異性 DNA 片段。

表 2. 在白羅曼鵝中可以複製多態性 RAPD 片段之引子

Table 2. Primers yielding polymorphic bands in White Roman geese

Operon primer kits	Primers yielding polymorphic bands
AA01~AA20	AA-07, 08, 15, 17
AB01~AB20	AB-01, 03, 04, 05, 07, 08, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20
AC01~AC20	AC-02, 05, 09, 12, 15, 17
AD01~AD20	AD-01, 06, 11, 12, 14, 16, 19, 20
AE01~AE20	AE-01, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 20
AF01~AF20	AF-04, 05, 06, 07, 08, 10, 13, 17, 20
AG01~AG20	AG-01, 03, 10, 13, 14, 15, 16, 17
AH01~AH20	AH-02, 04, 09, 12, 13, 14, 15, 18, 20
AI01~AI20	AI-02, 03, 05, 06, 12, 17, 18
AJ01~AJ20	AJ-03, 07, 10, 11, 15, 17, 20
AK01~AK20	AK-01, 02, 04, 06, 13, 15, 18
AL01~AL20	AL-03, 04, 06, 09, 13, 16
AM01~AM20	AM-01, 02, 03, 05, 06, 07, 08, 11, 12, 18, 19, 20
AN01~AN20	AN-01, 05, 06, 07, 11, 12, 15, 18, 20
AO01~AO20	AO-08, 14, 15, 17, 19
AP01~AP20	AP-01, 04, 05, 06, 07, 11, 17, 19
AQ01~AQ08	AQ-02, 04, 06

表 3. 高產蛋組與低產蛋組白羅曼鵝之 RAPD 片段具較大頻率差異性之引子

Table 3. Frequency difference between high egg production (HEP) and low egg production (LEP) White Roman geese in specific band of different RAPD primers

Primer	DNA fragment(kb)	Frequency (%)	
		HEP	LEP
AD06	0.72	50.0 (4/8)	0 (0/9)
AJ15	0.49	62.5 (5/8)	0 (0/9)

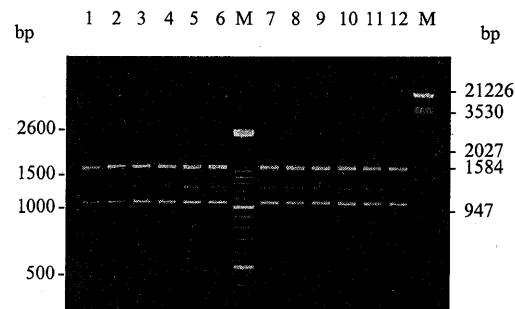


圖 1. 以引子 AO04 在白羅曼鵝複製出相同型態之 RAPD 指印。M：marker。

Fig. 1. The RAPD fingerprint polymorphism of White Roman geese from operon primer AO04. M: represents molecular size markers.

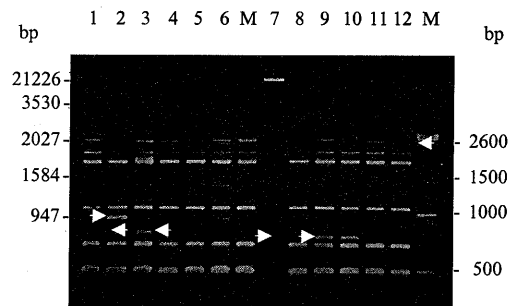


圖 2. 以引子 AG01 在白羅曼鵝複製出多態性之 RAPD 指印。白色箭頭所指為具變異性的 DNA 片段。M：marker。

Fig. 2 The polymorphic RAPD fingerprint of White Roman geese from primer AG01.

The white arrows indicate the band variation among geese. M: represents molecular size markers.

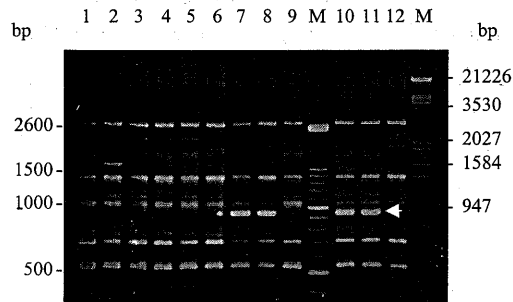


圖 3. 以引子 AB14 分析不同性別白羅曼鵝之 RAPD 指印。1-6, 9, 12 為公鵝，7, 8, 10, 11 為母鵝。M：marker，白色箭頭所指為性別特異性的 DNA 片段。

Fig. 3. RAPD products amplified by AB14 in different gender of White Roman geese. Lanes 1-6, 9, 12 are males and lanes 7, 8, 10, 11 are females. M : represents molecular size markers. The white arrow indicate the female-specific DNA fragment.

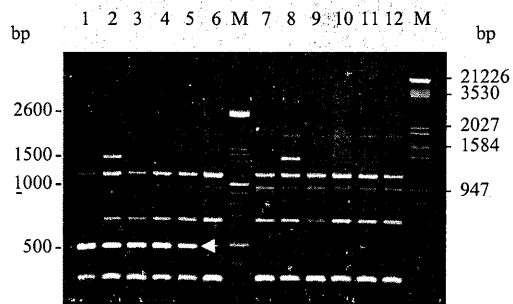


圖 4. 引子 AJ15 分析不同產蛋組白羅曼鵝之 RAPD 指印。1~6 為高產蛋組母鵝，7~12 為低產蛋組母鵝。M：marker，箭頭所指為具多態性的 DNA 片段。

Fig. 4. RAPD fingerprints of high egg production and low egg production of White Roman geese amplified by primer AJ15. Lanes 1-6 are from high egg production geese and lanes 7-12 are from low egg production geese. M : represents molecular size markers. The white arrow indicates the polymorphic band.

本試驗利用 RAPD 方法分析白羅曼鵝 DNA 多態性，確實容易可獲得 PCR 產物，且得到許多多態性的 DNA 指印。目前並未有利用 RAPD 分析鵝 DNA 多態性的報導，但已有利用微衛星型探討鵝品種 DNA 多態性，如吐魯斯鵝 (Zhu *et al.*, 1990) 與加拿大鵝 (Cathey *et al.*, 1998)。利用 RAPD 分析白羅曼鵝遺傳組成時，如果 PCR 反應條件控制良好，DNA 貯存情況適當，則 RAPD 指印再現性很高，本試驗結果顯示以 RAPD 方法容易獲得多態性變異。然而，在所有使用之引子除了少數可檢測性別特異性外，並未有明顯與體重相關之引子，而引子 AD06 與 AJ15 可能與鵝隻產蛋數有關。

## 誌 謝

本研究承彰化種畜繁殖場吳國欽股長、王勝德先生及現場工作同仁協助試驗鵝隻血樣採集與鵝隻飼養管理；家畜育種系黃鈺嘉博士提供寶貴意見與實驗室同仁協助血樣處理工作，謹此一併誌謝。

## 參考文獻

- 王勝德、吳國欽、邱作相、陳振台、葉力子。1996。八十四年度種鵝資訊調查。臺灣農業 32(5)：82~88。
- 臺灣省政府農林廳。1991。臺灣農業年報。pp.18~19。
- 臺灣省政府農林廳。1995。臺灣農業年報。pp.18~19。
- 臺灣省政府農林廳。1999a。臺灣農業年報。pp.18~19。
- 臺灣省政府農林廳。1999b。臺灣農業年報。pp.171~173。
- 蕭振文、劉瑞珍、陳若菁、黃祥吉、戴謙。1996。家禽逢機複製多態性 DNA 之分析。畜產研究 29(4)：317~330。
- 劉瑞珍、陳若菁、黃祥吉、林德育、戴謙。1999。利用逢機複製 DNA 片段多態性分析近親台灣土雞之遺傳相似性。中華農學會報新 186：89~98。
- Caetano-Anolle's, G., B. T. Bassam and P. M. Gresshoff. 1991. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligo-nucleotide primers. Biotechnology 9：553~557.
- Cathey, J. C., J. A. DeWoody and L. M. Smith. 1998. Microsatellite markers in Canada geese (*Branta canadensis*). J. Hered. 89(2)：173~175.
- Cheng, H. H. 1997. Mapping the chicken genome. Poult. Sci. 76：1101~1107.
- Gutierrez-Adan, A., W. T. Cushwa, G. B. Anderson and J. F. Medrano. 1997. Ovine-specific Y-chromosome RAPD-SCAR marker for embryo sexing. Anim. Genet. 28(2)：135~138.
- Kantanen, J., J. Vilkkilä, K. Elo and A. Maki-Tanila. 1995. Random amplified polymorphic DNA in cattle and sheep：application for detecting genetic variation. Anim. Genet. 26(5)：315~320.
- Levin, I., L. B. Crittenden and J. B. Dodson. 1993. Genetic map of the chicken Z chromosome using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Genomics 16：224~230.
- Martin, G. B., J. G. K. Williams and S. D. Tanksley. 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. 88：2336~2340.
- Qui, J. J. and Y. P. Li. 1999. Random amplified polymorphic DNA analysis of eel genome. Cell Res. 9(3)：217~223.
- Smith, E. J., C. P. Jones, J. Bartlett and K. E. Nestor. 1996. Use of randomly amplified polymorphic DNA markers for the genetic analysis of relatedness and diversity in chickens and turkeys. Poult. Sci. 75：579~584.

- Wei, R., M. R. Dentine and J. J. Bitgood. 1997. Random amplified polymorphic DNA markers in crosses between inbred lines of Rhode Island red and White Leghorn chickens. *Anim. Genet.* 28(4) : 291~294.
- Welsh, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18 : 7213~7218.
- Welsh, J., C. Petersen and M. McClelland. 1991. Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping. *Nucleic Acids Res.* 19(2) : 303~306.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18 : 6531~6535.
- Yoshida, T., M. Takeuchi, M. Sato and K. Hirai. 1999. Typing *Listeria monocytogenes* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting. *J. Vet. Med. Sci.* 61(7) : 857~860.
- Zhu, X., J. Skinner and L. A. Burgoyne. 1990. The microsatellites of the Toulouse goose: the major tandemly repetitive DNA in the Toulouse goose genome. *Genome* 33(5) : 641~645.



## Polymorphism of Random Amplified Polymorphic DNA in White Roman Geese<sup>(1)</sup>

Der-Yuh Lin<sup>(2)</sup>, Jui-Jane Liu Tai<sup>(3)</sup>, Jo-Chin Chen<sup>(2)</sup>,  
Li-Tzu Yeh<sup>(4)</sup>, Hsiu-Luan Chang<sup>(2)</sup> and Chein Tai<sup>(5)</sup>

Received Nov. 20, 2000 ; Accepted Feb. 1, 2001

### Abstract

The purpose of this study was to explore the association between production performance and RAPD (random amplified polymorphic DNA) polymorphism of White Roman Geese. Blood samples of 41 geese were collected based on mature body weight (male) and egg production performance (female). Twelve best or worst geese were assorted into each high body weight (HBW) and low body weight (LBW) groups, while nine best or eight worst geese were assorted into each high egg production (HEP) and Low egg production (LEP) groups. Individual genomic DNA was extracted from blood sample and was detected for its concentration for DNA template. There were 328 kinds of a single, short (10 bp) oligonucleotide for RAPD tests. After electrophoresis in 1.5% agarose gels and stained with ethidium bromide, the results showed that 85% (279/328) of these primers got PCR products, and 41% (135/328) got polymorphic PCR products. The primers, AB14 (940 bp), AE03 (690 bp), AE06 (920 bp), AG10 (1350 bp, 1370 bp) and AL13 (1288 bp), produced distinct PCR products for different genders and polymorphic patterns of AD06 (720 bp) and AJ15 (490 bp) were not independent between high and low egg production groups.

Key words : White Roman Geese, Random amplified polymorphic DNA (RAPD), Polymorphism.

- 
- (1) Contribution No. 1039 from Taiwan Livestock Research Institute, Council of Agriculture.  
(2) Department of Animal Breeding, COA-TLRI, Hsinhua Taiwan, R.O.C.  
(3) Department of Animal Physiology, COA-TLRI, Hsinhua Taiwan, R.O.C.  
(4) National Animal Industry Foundation, Taipei, Taiwan, R.O.C.  
(5) Institute of Biotechnology, National Cheng-Kung University, Tainan, Taiwan, R.O.C.