

三江白猪线粒体 DNA 的多态性*

李馨 杨隽

(黑龙江八一农垦大学动物科技学院 密山 158308)

摘要: 采用 22 种限制性内切酶分析了三江白猪 mtDNA 多态性。在 60 头个体中检出 30 种限制性态型, 归结为 7 种基因单倍型; 其间的差异来自少数限制性位点的突变。单倍型间平均遗传距离为 0.35%, 群体遗传多态程度为 0.044%。三江白猪遗传多样性非常贫乏, 说明三江白猪与地方种猪起源于一个共同祖先, 在品种形成早期受到创立者效应的制约。

关键词: 三江白猪; 线粒体 DNA; 多态性; 限制性内切酶

中图分类号: Q953 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2003)05-41-04

The Polymorphism of Mitochondrial DNA in Sanjiang White Pig

LI Xin YANG Jun

(Department of Animal Science, Heilongjiang August First Land Reclamation University, Mishan 158308, China)

Abstract: A total of 22 restriction endonucleases were used to investigate the mitochondrial DNA polymorphism of Sanjiang white pigs. Thirty restrictive morphs were detected, which can be sorted into 7 haplotypes. The differences between haplotypes came from several dots mutation. The average genetic distance among haplotypes is 0.35%, and the value of average sequence variation in Sanjiang White pigs population is 0.044%. The results indicate that the genetic diversity based on restriction endonuclease cleavage patterns within Sanjiang white pigs is remarkably scarce. They may have originated from a late common ancestor, and are likely impacted by the founder effect.

Key words: Sanjiang white pig; mtDNA; Polymorphism; Restriction endonucleases

三江白猪是著名畜牧学家许振英教授等培育出来的我国第一个优质瘦肉型母本品种。其特点是抗逆性强、产仔率高、繁殖性能好, 深受养殖业户的欢迎。为了对三江白猪品种保存有更高层次的基础理论, 作者进行了其线粒体 DNA(mtDNA)限制性片段长度多态性(RFLP)的研究。动物 mtDNA 是共价闭环双链 DNA, 具有分子量小、严格按母系方式遗传、进化速度快等特点^[1-3], 其 RFLP 被广泛应用于哺乳动物大群体遗传、种内及种间亲缘关系、系统发生、物种起源与分化、分类及育种等方面的研究^[4], 目前, 有关三江白猪 mtDNA 的研究尚无报道。故此, 对三江白猪的 mtDNA RFLP 进行分析研究,

为猪遗传育种工作提供分子生物学资料。

1 材料与方法

1.1 材料 该研究采用肝脏提取 mtDNA 的方法, 肝脏取自黑龙江八一农垦大学实习牧场三江白猪原种猪场, 共分析了 5 个家系(每个家系 12 头)60 头个体。各种限制性内切酶均购自华美生物技术公司和 Promega 公司, 其它试剂为分析纯。

* 黑龙江省农场总局“十五”科技攻关项目(No. HNK-08-01);
第一作者介绍 李馨, 女, 38 岁, 副教授; 主要从事家畜遗传育种教学、科研; E-mail: yangli_xin@sina.com.

收稿日期: 2002-12-01, 修回日期: 2003-05-08

1.2 方法

1.2.1 mtDNA 的制备 取三江白猪肝脏组织 8 ~ 10 g, 按照文献[5]改进的碱变性法提取 mtDNA, 溶于 TE 溶液中, -4℃ 保存。

1.2.2 mtDNA 的消化 利用 22 种限制性内切酶, 按厂家推荐反应条件进行。反应总体积为 20 μl, 内含 1 μg 左右的 mtDNA 和 5U 限制性内切酶, 消化彻底后(6 ~ 8 h)加溴酚蓝终止反应。

1.2.3 酶切 DNA 电泳 用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 加溴化乙锭(2 μg/ml)显色; 电泳缓冲液为 0.089 mol/L TB-0.002 mol/L EDTA, pH 8.0, 电压 3 V/cm, 电泳 5 ~ 6 h, 凝胶成相系统下成相, 观察并分析结果。

1.2.4 酶切片段的分子量测定 以 marker-15 kb 作为分子量对照, 按各片段分子量的对数与其迁移率的倒数绘制标准曲线, 测定未知 DNA 片段的分子量大小。

1.2.5 数据分析 参照 Nei 等^[6]方法计算基因单倍型间的片段共享度(F)、遗传距离(P)和群体遗传多态程度(π):

$$F = 2N_{xy} / (N_x + N_y);$$

$$P = 1 - \{[(F^2 + 8F)^{1/2} - F] / 2\}^{1/6};$$

$$\pi_A = \sum A_i A_j P_{ij}$$

式中, N_{xy} 是 X 、 Y 类型间的共享片段数, N_x 、 N_y 分别是 X 、 Y 类型的片段总数; A_i 、 A_j 为 i 、 j 类型在 A 群体中所占的分数, P_{ij} 为 i 、 j 类型间的遗传距离。

2 结果

提取的 DNA 样品经 *Apa* I, *Ava* I, *Bam* H I, *Bcl* I, *Bgl* I, *Bgl* II, *Cla* I, *Dra* I, *Eco* R I, *Eco* R V, *Hind* III, *Hpa* I, *Kpn* I, *Pst* I, *Pvu* II, *Sac* I, *Sca* I, *Sal* I, *Sam* I, *Stu* I, *Xba* I, *Xho* I 等 22 种限制性内切酶消化后得到的单酶解各片段分子量见表 1。三江白猪 mtDNA 总分子量为 16.3 kb。三江白猪的限制性态型与兰宏等^[7]报道的基本一致, 根据多态型在群体中的分布, 可归结为 7 种限制性类型(基因单倍型), 即 *Ava* I - A, *Bgl* II - B, *Eco* R I - A, *Eco* R V - A, *Sca* I - B, *Stu* I - B

和 *Xba* I - A(表 2, 3; 图 1 ~ 3); 酶切电泳图谱也证明了这一点。在 5 个家系中, 单倍型出现频率基本相同, 即各家系间不存在遗传差异。各种限制性类型间的平均遗传距离见表 4。基因单倍型间的平均遗传距离为 0.35%, 整个群体的遗传多态程度为 0.044%, 三江白猪遗传多样性非常贫乏。

表 1 三江白猪 mtDNA 限制性片段

| 限制性内切酶 | 识别位点数 | 酶切片段分子量(kb) |
|-----------------|-------|---|
| <i>Apa</i> I | 3 | 11.5, 4.2, 0.6 |
| <i>Ava</i> I | 2 | 11.6, 4.7 |
| <i>Bam</i> H I | 5 | 10.3, 2.1, 1.8, 1.2, 1.0 |
| <i>Bcl</i> I | 7 | 5.5, 2.6, 2.2, 2.0, 1.7, 1.4, 0.9 |
| <i>Bgl</i> I | 3 | 6.7, 5.5, 4.1 |
| <i>Bgl</i> II | 1 | 16.3 |
| <i>Cla</i> I | 2 | 9.0, 7.3 |
| <i>Dra</i> I | 6 | 7.6, 2.2, 2.1, 1.8, 1.4, 1.2 |
| <i>Eco</i> R I | 3 | 8.3, 4.9, 3.1 |
| <i>Eco</i> R V | 1 | 16.3 |
| <i>Hind</i> III | 4 | 9.2, 4.3, 2.4, 0.5 |
| <i>Hpa</i> I | 2 | 13.2, 3.0 |
| <i>Kpn</i> I | 1 | 16.3 |
| <i>Pst</i> I | 3 | 9.3, 5.4, 1.6 |
| <i>Pvu</i> II | 2 | 10.1, 6.2 |
| <i>Sac</i> I | 2 | 15.5, 0.8 |
| <i>Sal</i> I | 1 | 16.3 |
| <i>Sca</i> I | 9 | 3.1, 3.1, 2.3, 1.8, 1.7, 1.4, 1.3, 0.9, 0.7 |
| <i>Sma</i> I | 0 | |
| <i>Stu</i> I | 7 | 3.9, 3.8, 3.7, 2.6, 1.1, 0.7, 0.5 |
| <i>Xba</i> I | 3 | 9.3, 5.7, 1.3 |
| <i>Xho</i> I | 0 | |

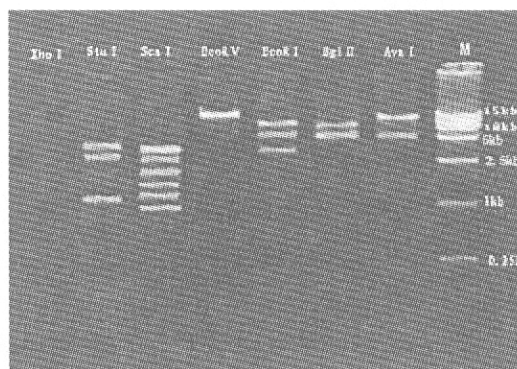


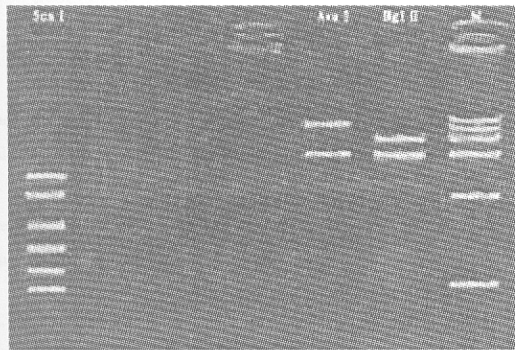
图 1 mtDNA 的 *Xho* I 等 7 种限制性内切酶图谱
从左到右依次为 *Xho* I、*Stu* I、*Sca* I、*Eco* R V、*Eco* R I、*Bgl* II、*Ava* I 和 Marker-15 电泳条带

表 2 三江白猪 mtDNA 限制性态型及多态频率

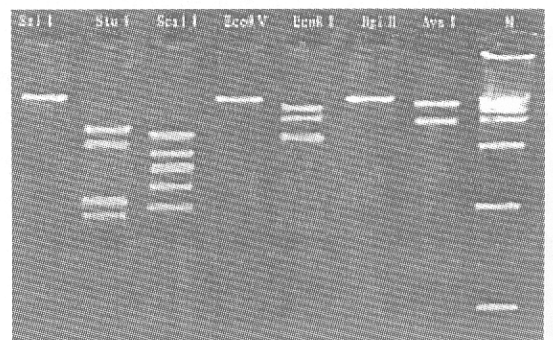
| 态型 | 个体数 | 多态频率(%) | 识别位点 | 酶切片段分子量(kb) |
|--------------------|-----|---------|------|---------------------------------|
| <i>Ava</i> I - A | 58 | 96.7 | 2 | 11.6,4.7 |
| <i>Ava</i> I - B | 1 | 1.7 | 1 | 16.3 |
| <i>Ava</i> I - C | 1 | 1.7 | 3 | 11.6,2.4,2.3 |
| <i>Bgl</i> II - A | 3 | 5.0 | 3 | 7.4,4.6,4.3 |
| <i>Bgl</i> II - B | 56 | 93.3 | 1 | 16.3 |
| <i>Bgl</i> II - C | 1 | 1.7 | 2 | 8.9,7.4 |
| <i>Eco</i> R I - A | 58 | 96.7 | 3 | 8.3,4.9,3.1 |
| <i>Eco</i> R I - B | 2 | 3.3 | 4 | 4.9,4.4,3.9,3.1 |
| <i>Eco</i> R V - A | 59 | 98.3 | 1 | 16.3 |
| <i>Eco</i> R V - B | 1 | 1.7 | 2 | 10.8,5.5 |
| <i>Sca</i> I - A | 4 | 6.7 | 8 | 3.1,2.5,1.8,1.7,1.4,1.1,0.9,0.7 |
| <i>Sca</i> I - B | 55 | 91.7 | 8 | 3.1,2.3,1.8,1.7,1.4,1.3,0.9,0.7 |
| <i>Sca</i> I - C | 1 | 1.7 | 8 | 4.5,3.1,2.3,1.8,1.7,1.3,0.9,0.7 |
| <i>Stu</i> I - A | 6 | 10.0 | 7 | 4.1,3.7,3.6,2.6,1.1,0.7,0.5 |
| <i>Stu</i> I - B | 54 | 90.0 | 7 | 3.9,3.8,3.7,2.6,1.1,0.7,0.5 |
| <i>Xba</i> I - A | 58 | 96.7 | 3 | 9.3,5.7,1.3 |
| <i>Xba</i> I - B | 2 | 3.3 | 2 | 9.3,7.0 |

表 3 三江白猪基因单倍型及分布频率(%)

| 单倍型 | 个体数 | 频率 | <i>Ava</i> I | <i>Bgl</i> II | <i>Eco</i> R I | <i>Eco</i> R V | <i>Sca</i> I | <i>Stu</i> I | <i>Xba</i> I |
|-----|-----|------|--------------|---------------|----------------|----------------|--------------|--------------|--------------|
| I | 7 | 11.7 | A | A | A | A | A | A | A |
| II | 2 | 3.3 | A | B | A | B | B | B | A |
| III | 1 | 1.7 | A | B | B | A | B | B | A |
| IV | 1 | 1.7 | C | C | B | A | B | A | A |
| V | 1 | 1.7 | A | B | C | B | A | A | B |
| VI | 2 | 3.3 | B | B | A | A | B | B | B |
| VII | 46 | 76.7 | A | B | A | B | A | B | A |

图 2 mtDNA 的 *Sca* I 等 3 种限制性内切酶图谱

从左到右依次为 *Sca* I、*Ava* I、*Bgl* II
和 Marker-15 电泳条带

图 3 mtDNA 的 *Sal* I 等 7 种限制性内切酶图谱

从左到右依次为 *Sal* I、*Stu* I、*Sca* I、*Eco* R V、
Eco R I、*Bgl* II、*Ava* I 和 Marker-15 电泳条带

3 讨论

三江白猪来源于东北民猪与长白猪。从表

1~3 很容易确定,三江白猪 mtDNA 基本限制类型为单倍型 VII,与前人^[8,9]的研究结果一致,这也符合三江白猪品种起源(长白猪75%+民猪

表 4 三江白猪 mtDNA 限制性类型间的遗传距离(%)

| | I | II | III | IV | V | VI | VII |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|
| I | 56 | 1 | 1 | 2 | 4 | 5 | 5 |
| II | 0.368 | 57 | 3 | 4 | 6 | 7 | 7 |
| III | 0.246 | 0.476 | 52 | 4 | 6 | 7 | 7 |
| IV | 0.185 | 0.498 | 0.477 | 53 | 5 | 6 | 6 |
| V | 0.091 | 0.279 | 0.305 | 0.475 | 55 | 11 | 11 |
| VI | 0.089 | 0.186 | 0.284 | 0.518 | 0.896 | 55 | 7 |
| VII | 0.089 | 0.181 | 0.184 | 0.289 | 0.556 | 0.411 | 54 |

对角线上的数据是所检测到的位点数,对角线以上数据是限制性类型间相异的位点数

25%)。在图 1、2 中, *Bgl* II 为 C 型, *Sca* I 为 A 型,而在图 3 中 *Sca* I 则为 B 型, *Bgl* II 为 B 型; *Eco* RI、*Eco* RV 比较稳定,均为 A 型,即个别样品存在一定差异,相差几个限制性位点,似乎属于不同起源,但它们都是从基本型经过少数几个位点突变产生的,属于个体差异,并不代表不同的起源。因此,对所有的三江白猪 5 个家系可作为同一个群体来对待,研究结果可以代表三江白猪的基本特征。动物群体的 mtDNA 变异程度的衡量标准之一是限制性类型间的平均遗传距离。大多数哺乳动物的平均遗传距离都在 1% 以上,但我们的结果是已知哺乳动物中最低的,这也说明了三江白猪同其它猪种一样,缺乏种内变异。

遗传多态程度(π)是衡量动物群体 mtDNA 多态性的又一指标,其值越小,群体的多态程度越低。一般动物 π 值都在 0.15% 以上,大多数超过 0.6%,而三江白猪则只有 0.044%。由于 π 值考虑了各种 mtDNA 单倍型在群体中所占的比例,因而,在衡量群体 mtDNA 多态程度时,比遗传距离平均值还要精确。

上述结果表明,三江白猪 mtDNA 群体分化

程度水平相当低。从外表看,各种猪的特征差别明显,但它们的 mtDNA 在遗传结构上没有太大差别,这也反映了它们母系起源上的一致性。三江白猪与其它猪种可能是一个共同的野生祖先,猪群体在其形成过程的早期很可能经历过创立者效应的制约,即驯养驯化的制约。形态及生态特征的高度差异,是长期定向选择的结果,并不是自然适应现象^[6]。

本研究结果只反映三江白猪群体 mtDNA 方面的遗传多样性的贫乏,这一现象能否代表猪群体遗传结构的单一性,以及猪种普遍存在的现象,尚待进一步系统深入的研究。

参 考 文 献

- [1] 张亚平,施立明. 动物线粒体 DNA 多态性的研究概论. 动物学研究, 1992, 13(3): 289 ~ 298.
- [2] 叶绍辉,彭和禄等. 云南保种山羊线粒体 DNA 限制性酶切研究. 中国畜牧杂志, 1998, 34(3): 11 ~ 12.
- [3] 杨隽. 线粒体 DNA 多态性与家畜遗传育种. 四川畜牧兽医, 2001, 1: 32 ~ 33.
- [4] 宋成义,经荣斌,王学峰等. 猪 mtDNA 多态性的研究与应用. 家畜生态, 2002, 23(1): 75 ~ 77.
- [5] 王文,施立明. 一种改进的动物线粒体 DNA 提取方法. 动物学研究, 1993, 14(2): 197 ~ 198.
- [6] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76(10): 5 269 ~ 5 273.
- [7] 兰宏,王文,施立明. 西南地区家猪和野猪 mtDNA 遗传多样性研究. 遗传学报, 1995, 22(1): 28 ~ 33.
- [8] Watanabe T. Polymorphism of mitochondrial DNA in pigs based on restriction endonuclease cleavage patterns. *Biochemical Genetics*, 1985, 23: 105 ~ 113.
- [9] Watanabe T. Pig mitochondrial DNA: polymorphism, restriction map orientation, and sequence data. *Biochemical Genetics*, 1986, 24: 385 ~ 395.