

延边牛线粒体DNA D-loop 序列多态性研究^{* *}

王朝锋¹, 陈宏^{1, 2}, 雷初朝¹, 孙维斌¹, 党瑞华¹, 张志清¹

(1 西北农林科技大学 动物科技学院 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100;

2 徐州师范大学 生物技术研究, 江苏 徐州 221116)

[摘要] 对4头延边牛个体与GenBank中4头朝鲜牛个体的线粒体DNA (mtDNA) D环(D-loop区)910 bp全序列进行了比较分析。结果发现, 8头黄牛个体mtDNA D-loop序列由8种单倍型组成, 单倍型比例为100%, 表明2个黄牛品种mtDNA遗传多态性很丰富; 在4头延边牛D-loop区序列中, 共检测到核苷酸多态位点17个, 核苷酸变异率为1.87%; 在4头朝鲜牛中共检测到核苷酸多态位点10个, 核苷酸变异率为1.10%; 延边牛和朝鲜牛mtDNA D-loop全序列突变类型均为转换、颠换和插入/缺失, 其中以转换为主; 序列分析显示朝鲜牛与延边牛的同源性很高, 达98.90%~99.67%, 表明朝鲜牛和延边牛亲缘关系很近。

[关键词] 延边牛; 朝鲜牛; mtDNA D-loop; 多态性; 单倍型

[中图分类号] S813.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)07-0009-03

线粒体是动物细胞中进行生物能量代谢的重要细胞器, 每个线粒体中通常含有几个或几十个相同的线粒体DNA (mtDNA)。在家畜亲缘关系的研究中, 常以mtDNA作为研究工具, 这是因为mtDNA具有以下优点: (1)mtDNA基因组结构简单、稳定, 但一级结构的碱基突变率却很高, 其进化速率约为单拷贝核的5~10倍, 在遗传过程中不发生重组, 因而家畜一般能保持其祖先的类型不变, 这使得人们可以通过研究家养动物的mtDNA来考察其起源。(2)mtDNA在遗传过程中遵守严格的母系遗传方式, 子代的mtDNA来自父本的可能性小于0.004%。同一母系祖先的子代, 其mtDNA都是一样的, 因而一个个体的mtDNA类型就代表一个母系连锁群, 这就大大减少了供试动物的数量。因此, mtDNA分析不必像蛋白质基因频率那样, 需要调查大量的个体, 而且其不受外来公畜杂交改良的影响, 样品比较容易获得, 从而为大规模的畜群调查提供了可能。这些特点使mtDNA成为研究动物近缘种间或种内不同群体亲缘关系的理想工具, 并已取得了许多令人瞩目的结果^[1]。

在牛的mtDNA研究方面, Watanabe等^[2]用15种限制性酶分析了9头菲律宾本地黄牛的mtDNA, 发现菲律宾本地黄牛存在2种类型的

mtDNA分子。其中5头黄牛的酶切类型全为A型, 被命名为菲律宾I型, 另外4头黄牛的酶切类型全为B型, 被命名为菲律宾II型, 未发现中间类型或重组类型。菲律宾I型的mtDNA起源于欧洲普通牛的mtDNA类型, 菲律宾II型起源于瘤牛的mtDNA类型, 因此认为菲律宾本地黄牛群体是普通牛和瘤牛的混合型。不同的mtDNA类型可为鉴定牛品种的母系起源提供可靠的遗传标记。Yu等^[3]对我国12个南方黄牛品种mtDNA限制性片段长度多态性(RFLP)的研究发现, 南方黄牛品种的母系起源主要为瘤牛和普通牛, 但受瘤牛的影响更大, 还发现云南迪庆牛含有牦牛mtDNA单倍型。

线粒体DNA D-loop区是富含A、T的非编码区, 是整个线粒体基因序列和长度变异最大的区域, 其进化速度最快, 多态性最为丰富, 因此该区亦称控制区。在进化上, D-loop区的碱基替换率比mtDNA的其他区域高5~10倍, 是mtDNA的高变区。因此, 家畜mtDNA D-loop的多态性便成为目前mtDNA研究的热点之一。Loftus等^[4]对6个欧洲牛品种、3个印度瘤牛品种和4个非洲牛品种(3个普通牛和1个瘤牛品种)的线粒体DNA D-loop全序列进行了研究, 结果发现mtDNA在不同的牛种及品种间存在丰富的遗传多样性, 证明非洲普通牛

* [收稿日期] 2004-10-15

[基金项目] 国家“863”高技术研究发展计划项目(2003AA243051); 国家自然科学基金资助项目(30471238)

[作者简介] 王朝锋(1976-), 男, 河南许昌人, 在读硕士, 主要从事动物分子遗传学研究。

[通讯作者] 陈宏(1955-), 男, 陕西西安人, 教授, 博士生导师, 主要从事生物技术与动物遗传育种研究。E-mail: chen hong1212@126.com

和非洲瘤牛均起源于欧洲普通牛。国内对黄牛线粒体DNA D-loop 序列多态性的研究较少^[5],本试验拟通过对延边牛与朝鲜牛m tDNA D-loop 序列的对比分析,以揭示延边牛与朝鲜牛的亲缘关系,为延边牛向肉用方向选育提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

从吉林省延边自治州采集 4 头延边牛的脾脏组织样品(编号为 YB3, YB6, YB18 和 YB23),低温带回实验室, - 86 ℃ 冻存储用。并引用 GenBank 中与延边牛相邻的 4 头朝鲜牛的序列(A F409054~A F409057)。

1.2 DNA 提取及m tDNA D-loop 的扩增、纯化与序列测定

采用高盐法提取牛的总DNA。线粒体DNA D-loop 扩增的引物为黄牛的特异性引物,正链引物为:5'-CTG CAG TCT CAC CAT CAA CC-3';反链引物为:5'-GGG GTG TAG ATG CTT GC-3'。PCR 扩增体系为 50 μL,反应条件:95 ℃ 预变性 4 min; 94 ℃ 变性 30 s, 60 ℃ 复性 60 s, 72 ℃ 延伸 90 s, 35 个循环;最后 72 ℃ 充分延伸 10 min, 4 ℃ 保存。PCR 扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测其大小、纯度及亮度。每个样本用 5 μL 检测,对扩增效果良好且足量的样品,用北京天为时代科技有限公司回收试剂盒进行纯化和回收。回收后的 PCR 产物由北京华大中生测序公司测序。

1.3 统计方法

所测序列利用 Clustal W (1.82) 软件和 DNA STAR 软件包中的 SeqMan 程序排列同源序列,并进行人工核对与校正,用 DnaSP 3.0 和 Mega 2.1 软件统计单倍型,并进行序列多态性分析。

2 结果与分析

2.1 2 个黄牛品种m tDNA D-loop 区单倍型分析

利用 ClustalW (1.82) 软件对 8 条 m tDNA D-loop 的序列进行同源序列比对,结果发现,2 个黄牛品种 8 个个体的 m tDNA D-loop 的序列由 8 种单倍型组成,8 个个体分别单独享有 1 种单倍型,单倍型比例为 100%,说明延边牛和朝鲜牛的 m tDNA 遗传多态性很丰富。

2.2 2 个黄牛品种m tDNA D-loop 区核苷酸的突变类型与多态性

牛 m tDNA 全长为 16 338 bp,其中 D-loop 区序列的长度为 910 bp^[6]。延边牛 4 头个体中, YB18 和 YB6 2 头个体的 D-loop 区序列长度为 910 bp, YB3, YB23 和朝鲜牛 4 个个体 D-loop 区序列长度均为 911 bp。延边牛和朝鲜牛 m tDNA D-loop 全序列核苷酸多态位点见图 1,多态位点的突变类型、数目及其频率见表 1。

```
[      2222223333 3444455677 888]
[      5566690034 9125611516 277]
[      1946751234 4877401369 667]
YB18   tctccgagtt acccccggtg* gac
YB23   ...g.a...c g..tt..c.c...
YB3     ...g..... g...tt..ac aca
YB6     .t.g..g.c. g.t.....*...
AF409057 ...g.a... g...t....c...
AF409056 c..g...a.. g...t.a..c...
AF409055 ..cgt..... g...t....c...
..AF409054 ..... .t.....c...
```

图 1 延边牛和朝鲜牛m tDNA D-loop 序列多态位点
* 代表碱基插入或缺失

Fig. 1 Polymorphic sites of m tDNA D-loop sequences
in Yanbian cattle and Korean cattle
* Insertions or deletions are denoted by asterisks

表 1 延边牛和朝鲜牛D-loop 核苷酸多态位点的突变类型、数目与频率

Table 1 Mutation types, numbers and percentage of m tDNA D-loop nucleotide polymorphic sites
in Yanbian cattle and Korean cattle

突变类型 Mutation type		延边牛 Yanbian cattle		朝鲜牛 Korean cattle	
		数目 Number	频率/% Percentage	数目 Number	频率/% Percentage
转换	T ↔ C	8	47.06	5	50.00
Transition	A ↔ G	4	23.53	4	40.00
颠换	A ↔ C	2	11.76	0	0.00
Transversion	G ↔ C	2	11.76	1	10.00
插入/缺失	C	1	5.88	0	0.00
Insertion/deletion					

从表1和图1可见, 延边牛和朝鲜牛m tDNA D-loop 全序列共检测到核苷酸多态位点23个, 其中4头延边牛检测到核苷酸多态位点17个, 约占核苷酸总数的1.87%; 4头朝鲜牛检测到核苷酸多态位点10个, 约占核苷酸总数的1.10%。在转换、颠换、插入/缺失3种突变类型中, 以转换为主。

2.3 延边牛和朝鲜牛m tDNA D-loop 区核苷酸序列的同源性分析

以欧洲普通牛(GenBank 号为NC-001567)和印度瘤牛(GenBank 号为L27732)作对照, 欧洲普通牛与4头延边牛、4头朝鲜牛之间的同源性分别为98.13%和98.68%; 印度瘤牛与4头延边牛、4头朝鲜牛之间的同源性分别为94.70%和94.78%; 说明延边牛与朝鲜牛起源于欧洲普通牛。延边牛与朝鲜牛之间的同源性很高, 达98.90%~99.67%, 说明延边牛与朝鲜牛的亲缘关系很近。

3 讨论

近年来, D-loop 区序列的核苷酸变异分析是牛m tDNA 研究的热点。国外有关牛m tDNA RFLP 分析及m tDNA D-loop 区序列的核苷酸变异分析的报道很多。在国内, Yu等^[3]分析了部分南方黄牛的m tDNA RFLP, 雷初朝等^[5]研究了我国8个黄牛品种m tDNA D-loop 序列的多态性。本研究对延边牛与朝鲜牛2个黄牛品种8头个体m tDNA D-loop 区

全序列的分析表明, 除YB18和YB6 2头个体m tDNA D-loop 区全序列为910 bp外, 其余6头黄牛D-loop 区全序列均为911 bp, 都发生了D-loop 序列长度变异。这是因为在6头黄牛(YB23, YB3, AF409057, AF409056, AF409055, AF409054)相应序列上发生了1次C碱基的插入, 即769位点插入碱基C引起。

通过对延边牛和朝鲜牛2个品种m tDNA D-loop 区全序列的分析, 发现延边牛、朝鲜牛与欧洲普通牛的同源性很高, 超过98%, 提示延边牛和朝鲜牛起源于欧洲普通牛。这与外部形态、染色体核型、蛋白质多态性的研究结论完全一致^[7,8]。据文献记载, 自清道光(1821~1850年)年间以来, 中国人民和朝鲜人民就有往来, 随着朝鲜民族的迁入, 将朝鲜牛输入我国东北地区。在当地的自然和经济条件下, 输入的朝鲜牛和本地牛进行长期的杂交, 经过精心培育而形成了延边牛^[7]。朝鲜牛与延边牛m tDNA D-loop 区只相差3~10个碱基, 同源性为98.90%~99.67%, 说明其亲缘关系很近。本研究与历史记载相符合, 即延边牛是由朝鲜牛杂交形成的。下一步的研究工作应加大样本数量, 对其Y染色体微卫星位点进行深入研究, 从父系遗传方面获得证据, 将有助于进一步揭示延边牛与朝鲜牛的遗传关系。

[参考文献]

- [1] 张亚平. 动物线粒体DNA 多态性的研究概况[J]. 动物学研究, 1992, 13(3): 289-298
- [2] Watanabe T, Masangkay J S, Wakana S, et al. Mitochondrial DNA polymorphism in native Philippine cattle based on restriction endonuclease cleavage patterns[J]. Biochem Genet, 1989, 27: 431-438
- [3] Yu Y, Nie L, He Z Q, et al. Mitochondrial DNA variation in cattle of South China: origin and introgression[J]. Animal Genetics, 1999, 30: 245-250
- [4] Loftus R T, MacHugh D E, Bradley D G, et al. Evidence for two independent domestication in cattle[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 2575-2761
- [5] 雷初朝, 陈宏, 杨公社, 等. 中国部分黄牛品种m tDNA 遗传多态性研究[J]. 遗传学报, 2004, 31(1): 57-62
- [6] Anderson S, De Bruijn M H L, Coulson A B, et al. Complete sequence of bovine mitochondrial DNA: conserved features of the mammalian mitochondrial genome[J]. J Mol Biol, 1982, 156: 683-717
- [7] 邱怀. 中国牛品种志[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986
- [8] 陈幼春. 中国黄牛生态种特征及其利用方向[M]. 北京: 农业出版社, 1990

(下转第16页)

Dynam ic study on the contents of Zinc in different tissues of Gushi chick

JIANG Rui-rui, KANG Xiang-tao, SUN Gui-rong, HAN Rui-li, LI Guo-xi,
HUANG Yan-qun, WANG Yan-bing, LI Ming, SHA Ji-ding

(College of Animal Science, Henan Agricultural University, Agricultural Biotechnology Opening Laboratory
of Henan Province, Zhengzhou, Henan 450002, China)

Abstract: The contents of Zn in ten different tissues (breast muscle, leg muscle, liver, kidney, heart, pancreas, shankbone, phalange, metatarsus, bursa cloacalis) of Gushi chicks were determined by atomic absorption spectrophotometry and the data were analysed with ANOVA. The results show: (1) the contents of Zn in heart is not significantly different going with the week-age ($P > 0.05$), while the contents of Zn in liver is significantly different ($P < 0.05$), and the contents of Zn in kidney, pancreas, bursa cloacalis, breast muscle, leg muscle, shankbone, metatarsus, phalange are terribly significantly different ($P < 0.01$); (2) Since the second weekend, the contents of Zn in bones, pancreas, bursa cloacalis are higher, lower in muscle, and lowest in breast muscle (3) the contents of Zn in bursa cloacalis, breast muscle, kidney and pancreas decrease gradually, and the change of the contents are terribly significantly different ($P < 0.01$). The contents of Zn in leg muscle, liver, heart, shankbone, phalange, metatarsal go up between 0 to the 4th week, then has a downtrend until the 6th weekend, but the change is not evident

Key words: Gushi chick; tissues; contents of Zn; dynamic diversification

(上接第 11 页)

Abstract ID: 1671-9387(2005)07-0009-EA

Study of mtDNA D-loop sequence polymorphism in Yanbian cattle

WANG Chao-feng¹, CHEN Hong^{1,2}, LEI Chu-zhao¹, SUN Wei-bin¹,
DANG Rui-hua¹, ZHANG Zhi-Qing¹

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Shaanxi Key Laboratory of
Agricultural Molecular Biology, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Biotechnology, Xuzhou Normal University, Xuzhou, Jiangsu 221116, China)

Abstract: The complete mitochondrial D-loop sequences, 910 bp in length, in 4 individuals from Yanbian cattle and 4 individuals from Korean cattle cited from GenBank were analyzed. The results showed that comparisons of these 8 sequences revealed 8 mitochondrial haplotypes and the percentage of haplotype was 100%, showing that abundant mitochondrial genetic diversity exists in Yanbian cattle and Korean cattle breeds. Comparisons of these 4 sequences from Yanbian cattle revealed 17 polymorphic sites, with the percentage of 1.87% of 910 bp. Comparisons of the 4 sequences from Korean cattle revealed 10 polymorphic sites, with the percentage of 1.10% of 910 bp. And 3 types of mutation, transition, transversion /insertion were observed and transition was the major type of mutation. The percentage of homology of mtDNA D-loop was very high, up to 98.90% - 99.67% between Yanbian cattle and Korean cattle, revealing close genetic relationship between Yanbian cattle and Korean cattle.

Key words: Yanbian cattle; Korean cattle; mitochondrial DNA D-loop; polymorphism; haplotype