

中国西北 6 个地方绵羊品种 mtDNA 的遗传多样性研究

霍俊宏^{1,2}, 武艳平², 关伟军¹, 谢金防², 万明春², 马月辉^{1*}

(1. 中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所 北京 100193; 2. 江西省农业科学院 畜牧兽医研究所, 江西 南昌 330200)

摘要: 基于 PCR-SSCP 和克隆测序技术, 分析了西北 6 个绵羊品种的群体内和群体间的遗传变异。通过对 DNA 序列的多重比对, 得出 A、B、C 3 种单倍型。在 D-loop 区内的碱基替换全部为转换; 绵羊 mtDNA D-loop 区中存在着明显的长度变异, 引起变异原因主要是由于 1 个或多个碱基或串联重复基元序列的插入(或缺失)造成的, 不存在绵羊品种特异性; 本试验研究的绵羊在各个不同片段中所扩增出的 A、B、C 3 种单倍型基本一致, 但不是完全连锁, 存在着微小的差异; 用 NJ 法构建了系统进化树, 可明显看出中国 6 个绵羊品种 3 种单倍型的分类情况, 单倍型树表明新疆的巴音布鲁克羊和卡拉库尔羊之间的遗传关系最近。

关键词: 绵羊; mtDNA; 遗传多样性

中图分类号: S826.212 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2010)04-0637-06

A Study on mtDNA Genetic Diversity of 6 Native Sheep Breeds in Northwest China

HUO Jun-hong^{1,2}, WU Yan-ping², GUAN Wei-jun¹,
XIE Jin-fang², WAN Ming-chun², MA Yue-hui^{1*}

(1. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. Institute of Animal Science, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, China)

Abstract: The study analyzed the genetic variation within population and among populations of 6 sheep breeds based on PCR-SSCP and subsequent clone sequencing protocols. Comparison of the mtDNA sequences showed that all the replacement substitutions of base pairs in D-loop between the hypotypes A, B and C, are transitions alone; length variation in insertion or deletion of base pair or tandemly repeated sequence in D-loop was found in the six sheep breeds; hypotypes A, B and C were basically in the same linkage in the six sheep breeds with a few exceptions; phylogenetic trees of NJ support the classification of three hypotypes in the six sheep breeds in China and Bayinbuluke sheep and Kalakuer sheep had a closer relationship compared to others.

Key words: sheep; mtDNA; genetic diversity

生物多样性(biodiversity)是生命有机体及其借以存在的生态复合体的多样性和变异性,是所有生物种内遗传变异和它们生存环境的总称,包括所有不同种类动物、植物、微生物及其它它们所拥有的基因,还有它们与生存环境所组成的生态系统^[1-2]。随着遗传变异的不断积累,遗传多样性的内容也就不

收稿日期: 2010-04-16 修回日期: 2010-06-03

基金项目: 国家自然科学基金(30371026)和国家“十五”科技攻关项目(2004BA514A09)

作者简介: 霍俊宏(1975-),男,助研,硕士,主要从事畜禽遗传育种研究, E-mail: huojunhong0222@tom.com; * 通讯作者: 马月辉,研究员,博士生导师, E-mail: yuehui.ma@263.net。

断地得到丰富。而遗传多样性贫乏的物种,通常在进化上的适应性就弱,即群体内的遗传变异反映了物种的进化潜力^[3-4]。当前国外畜种遗传多样性日趋缩小,畜种资源日趋贫乏、单调。中国家养动物的丰富遗传多样性及其特殊的遗传基础就更具有吸引力。但是,中国家养动物正面临特有的遗传多样性迅速缩小的危险,无论是从保护中国古老文明的遗产或是保护特有基因,还是随着社会发展需要保存一些符合未来需求的基因角度,我国固有畜禽遗传多样性的保护都是一项紧迫的任务。因此,研究家养动物的起源及遗传多样性,不仅是现代动物遗传育种和畜牧业发展的基础,也是为了适应未来人类需求的变化培育相应的品种作准备。我国绵羊品种资源丰富,是我国种质资源的重要组成部分,是绵羊育种不可缺少的宝贵遗传材料,保护我国地方绵羊品种的多样性,关系到我国畜牧业甚至整个农业的可持续发展。关于我国地方绵羊品种的起源、分类、遗传关系等方面,有过一定研究,但还不系统、不明确^[5],不足以提供我国绵羊育种工作所需要的基础资料,从而限制了地方绵羊品种的保护和利用。运用分子生物学技术对我国地方绵羊品种从分子水平上进行遗传多样性及遗传分化研究,为地方绵羊品种的合理利用、保护提供科学的依据,将具有重要的现实意义。mtDNA是共价闭合的环状双链分子,对于不同的生物其分子量大小不一样。mtDNA不同于核DNA的一个突出特点就是母性遗传方式遗传,在遗传过程中mtDNA通过卵细胞质传递给后代,不受外来公畜杂交改良的影响。mtDNA是绵羊品种资源保护的重要依据之一。近年来,利用线粒体DNA来分析绵羊的遗传多样及起源进化已有不少报道^[6-10]。

1 材料与方法

1.1 绵羊耳组织样的采集及基因组DNA的提取

本试验共采集6个中国地方绵羊品种的283份耳组织样品,其中巴音布鲁克羊、策勒黑羊、叶城羊、柯尔克孜羊、卡拉库尔羊的耳组织样采自新疆,青海黑藏羊的耳组织样采自青海。采集耳样,置于ependorf离心管中,冻存于-70℃冰箱中以备用。基因组DNA的提取采用常规的酚抽提法。

1.2 PCR反应程序

本实验PCR条件参考Crawford等^[11]的反应条件和程序,DNA样品经过95℃预变性5min后,按下列过程进行反应:在94℃变性30s,50~60℃退火30s,72℃延伸30~60s,经33~35个循环,于72℃充分延伸8~10min,4℃保存。引物不同,程序略有所不同。

1.3 PCR试验所用的引物及统计分析

PCR-SSCP试验所用的引物由Primer5.0软件自行设计,原序列来自GenBank(NCBI)上发表的绵羊线粒体DNA序列(登录号为AF010406)。PCR-SSCP试验所用引物有两对(即OV2、OV3)来自Guo等^[12],另外6对,即OV4、OV5、OV6、OV7、OV8、OV9,为自行设计。D-Loop(OV1)区引物来自Hien-dleder的文献^[13]。有关引物的详细情况见表1所示。D-Loop扩增产物经回收后用北京天根提供的pGEM-Teasy连接试剂盒连接,然后转化,筛选阳性克隆送交上海生工测序。序列经BioEdit7.0软件进行多重比对^[14],MEGA3.0软件用于碱基变异位点、系统进化分析^[15]。

2 结果与分析

2.1 PCR产物的扩增结果

优化PCR扩增反应条件,可以获得较高的扩增效率,并且将非特异性条带减到最少,从而为下一步的实验分析提供保证^[16]。本试验获得较好的扩增结果,图1是一例经过优化PCR扩增反应条件后获得的3对引物的扩增结果,可直接用于连接、转化。

2.2 PCR-SSCP结果分析

本研究分别对巴音布鲁克羊(BY)、策勒黑羊(CL)、卡拉库尔羊(KL)、柯尔克孜羊(KE)、青海黑藏羊(QH)和叶城羊(YCH)这6个品种共计283个个体运用所设计的8对引物进行PCR-SSCP的检测,只有OV2、OV3、OV4引物扩增多态,6个品种均有A、B、C3种DNA单倍型出现,3对引物所检测出的C单倍型在6个绵羊品种中的所表现个体中基本连锁。这表明在中国绵羊群体中确实存在着C这种单倍型(C Haplotype)。

2.2.1 6个绵羊品种mtDNA的单倍型频率 对所测的结果总结得出,在OV5、OV6、OV7、OV8、OV9引

表 1 引物序列, 产物大小及位置
Tab.1 Primer sequence corresponding PCR product size and position

序号 Code	引物序列 Primer sequence	产物长度 Product size	位置 Position
SSCP	OV2 正链引物 L ₄₀₅₃ : 5' CAACCCACGAGCCACAGAAG 3'	206 bp	ND2: 4053 - 4258
	反链引物 H ₄₂₅₈ : 5' CTGGGACTCAGAACTGGAATGG 3'		
OV3	正链引物 L ₁₀₈₀₆ : 5' GACTCCACCTCTGACTTCC 3'	280 bp	ND4: 10806 - 11085
	反链引物 H ₁₁₀₈₅ : 5' TGAATGAGAATGGCAACA 3'		
OV4	正链引物 L ₁₄₅₇₃ : 5' TCATTCTGAGGAGCAACA 3'	257 bp	Cytb: 14573 - 14829
	反链引物 H ₁₄₈₂₉ : 5' TAATAAGGGTGAAGGGA 3'		
OV5	正链引物 L ₁₂₅₀₈ : 5' TAGTAGTAGCAGGCATCTT 3'	364 bp	ND5: 12508 - 12871
	反链引物 H ₁₂₈₇₁ : 5' AGGGCTGTTGTGGTAAAT 3'		
OV6	正链引物 L ₁₀₅₉₁ : 5' AACAGAACGCCCTAAACGC 3'	236 bp	ND4: 10591 - 10826
	反链引物 H ₁₀₈₂₆ : 5' TGGGAAGTCAGAGGTGGA 3'		
OV7	正链引物 L ₃₈₀₄ : 5' AAAACTCTTCGTGCTCCC 3'	275 bp	<tRNA - Met > - ND2: 3804 - 4078
	反链引物 H ₄₀₇₈ : 5' TTGATGCTTCTGTGGCTC 3'		
OV8	正链引物 L ₃₁₄₄ : 5' CGGCAGTAGCACAAACAAT 3'	208 bp	ND1: 3143 - 3351
	反链引物 H ₃₃₅₁ : 5' CTTCGGTGAGGTCAAATGGT 3'		
OV9	正链引物 L ₈₉₀₆ : 5' TTTCTGAGCCTTCTACCACT 3'	295 bp	COIII: 8906 - 9200
	反链引物 H ₉₂₀₀ : 5' TGAACCGTAAACTCCGTCTG 3'		
D-loop	OV1 正链引物 L ₁₅₃₉₀ : 5' CTCACCATCAACCCCAAAGC 3'	1 180 bp	D-loop
	反链引物 H ₄₈ : 5' TCATCTAGGCATTTTCAGTG 3'		15390 - 48

物中基本没有多态出现(即 C 单倍型出现的频率几乎为零)除了 OV8 只在巴音布鲁克羊(BY)这个品种中 C 型出现的频率较高,占到 20.83% (10/48) 其余的仅是个别的。C 单倍型在 6 个品种中出现的频率策勒黑羊和柯尔克孜羊最低,均为 12.77%; 卡拉库尔羊出现的频率最高,达到 38.30%。详细情况见表 2。

2.2.2 扩增片段的测序结果分析 PCR 产物经纯化回收后,进行连接、转化,将培养并检测好的菌液送测序。将 3 对引物所扩增片段的测序结果用 Bioedit 软件多重比对

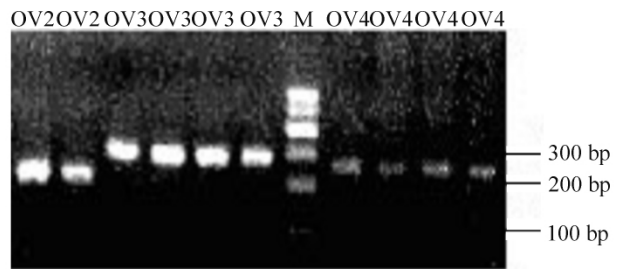


图 1 OV2、OV3、OV4 的扩增产物
Fig.1 PCR products from primer OV2、OV3、OV4

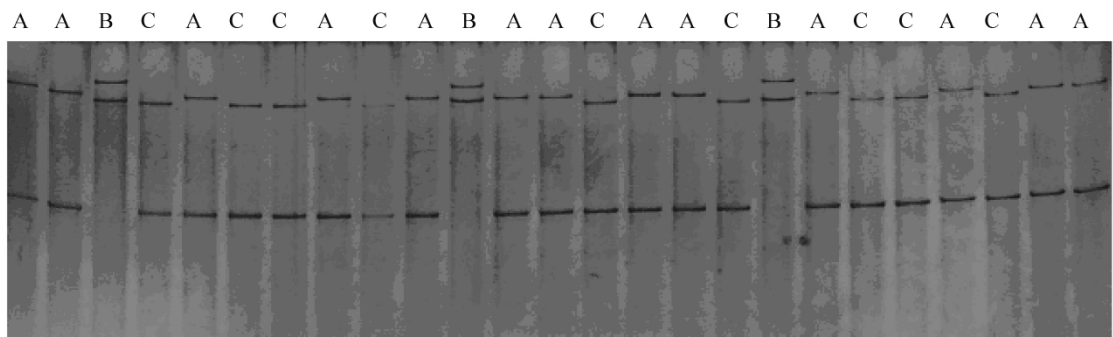


图 2 OV4 扩增片段 SSCP 结果
Fig.2 Patterns for OV4 PCR products

表2 6个绵羊 mtDNA 的单倍型频率
Tab.2 Haplotype frequencies of mtDNA in six sheep breeds

品种 Breeds	单倍型频率 Haplotype frequencies		
	A	B	C
BY	0.562 5(7/48)	0.208 3(10/48)	0.229 2 (11/48)
CL	0.787 2(37/47)	0.085 1 (4/47)	0.127 7(6/47)
KL	0.531 9 (25/47)	0.085 1 (4/47)	0.383 0 (18/47)
KE	0.723 3 (34/47)	0.149 0 (7/47)	0.127 7 (6/47)
QH	0.717 4 (33/46)	0.087 0 (4/46)	0.195 6 (9/46)
YC	0.645 8 (31/48)	0.145 8 (7/48)	0.208 4 (10/48)

之后 找出它们各自的碱基变异位点 ,与 GenBank(NCBI) 上已发表的绵羊线粒体 DNA 序列(登录号为 AF010406) 比对 找出各个变异位点的碱基替换情况 统计结果如表 3 ,可以看出 ,各对引物所扩增产物的片段在各自所在的区域内变异的位点数均不同 ,依次为 OV2 扩增产物的片段变异位点数为 4 个 ,OV3 扩增产物的片段变异位点数为 3 个 ,OV4 扩增产物的片段变异位点数为 2 个。

表3 OV2、OV3、OV4 扩增产物的碱基替换情况
Tab.3 Base substitution of PCR products from primer OV2、OV3、OV4

单倍型 Haplotype	OV2				OV3			OV4	
	130 (4182)	156 (4208)	163 (4215)	172 (4225)	47 (10852)	119 (10924)	218 (11023)	62 (14634)	81 (14653)
A	C	T	T	A	T	T	A	A	A
B	T	T	C	A	T	T	G	A	G
C	C	C	C	G	C	C	A	G	A

2.3 D - Loop 区测序结果分析

2.3.1 mtDNA D - Loop 区的 PCR 扩增 绵羊 mtDNA 的基因组为 16 616 bp ,其中 D - Loop 区的全序列为 1 180 bp。为了研究中国 6 个绵羊品种的 mtDNA D - Loop 区序列的遗传多态性 ,我们进行 D - Loop 区部分序列的测定。扩增引物为绵羊的特异性引物 ,引物的设计参考 Hiendleder(1998a、1998b、2002) [17-18]。引物的序列见表 1 ,PCR 扩增结果见图 3。

2.3.2 用于 D - Loop 区测序样品的筛选 线粒体 DNA (mitochondrial DNA , mtDNA) 是唯一独立于细胞核基因组而存在于细胞质中的 DNA 分子 ,具有其独有的一些特征。因此 mtDNA 在一般情况下不会发生交换 ,其基因的变异主要是由于碱基的自然突变而造成的 ,所以对 mtDNA 来讲 ,单倍型间的差别要大于品种间的差别。这就是说 ,如果样本量较小 ,那么抽样将带来很大的误差。尽管如此 ,我们也不能保证取样时各单倍型所占的比例与群体的实际情况相符 ,所以随机取样可能带来一定的误差。为了尽可能获得试验的预期目的 ,我们在 PCR - SSCP 的基础上将 6 个绵羊品种的 283 个样品按单倍型进行分类 ,取样时每个品种每种单倍型尽可能取一定数量的样品 ,共得到 41 个样本 ,然后进行克隆测序 ,进而建成单倍型树 ,从而获得品种间的遗传关系。

2.3.3 绵羊 D - Loop 区的序列分析 应用 BioEdit 软件截取 D - loop 片段 ,并将其转换成轻链序列。

然后利用 Bioedit 软件中的 Clustal W Multiple Alignment 应用程序进行多重比对 ,将二者的比对结果核对整理后修改文件的格式以便于 MEGA 的读取。然后用 MEGA 分析比对之后的数据进一步确认绵羊 D - Loop 区的片段长度为 1 185 bp ,它包括保守位点 927 个 ,变异位点 158 个(其中单碱基变异位点有 58 个 ,碱基缺失位点有 5 个) 。由变异位点的不同把总共测序的 6 个绵羊品种的 41 个个体共同定义出

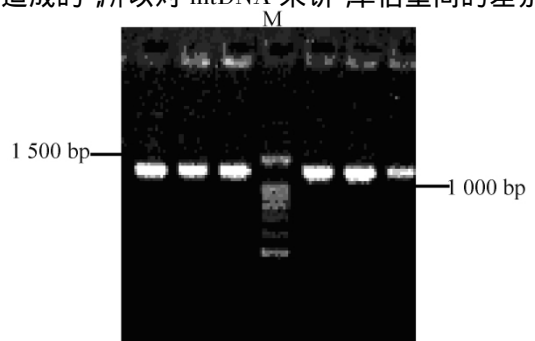


图3 OV1 PCR 的扩增产物
Fig.3 PCR products from primer OV1

38 种单倍型。本此研究得到的绵羊线粒体序列与 Genbank 序列比对(登录号 AF010406) D - loop 区 3 种单倍型碱基替换或缺失的详细情况见表 4。

表 4 D - loop 区三种单倍型碱基替换情况

Tab.4 Nucleotide substitutions in D - loop region amongst three haplotypes

	111111	22 - 222222 -	23333 - 3444	4 - 45555555	5555555556	6666666777	11111
D - loop 序列位置	2471146799	00 - 026779 -	90356 - 7122	4 - 40022222	3334447880	0016669278	900116
	3831577139	23 - 902281 -	59736 - 0228	1 - 53801379	1561262460	6820157031	348706
A	TAAAATCTTG	TGTGAACGC -	ATAGC - AACG	C - AGGCACCG	ATAGCGGGCA	CTCTGATCTT	CCCACT
B	CGAGACTTTA	CA - AGATAC -	GTAAC - GATA	C - GAATGTCG	ATGGTAGATG	TTTCAATCCC	CTCGCC
C	CGGGTCCCA	CA - AGGCATT	GCGATTGCCA	TTGAACGTTA	GCGACAAATA	TCCTGGCTTT	TCTATT

2.3.4 绵羊的系统进化分析 对所测序列用 Bioedit 软件进行多重比对(multiple align) ,由 MEGA 软件采用 Kimura 模型构建 NJ 树 ,并对拓扑图进行了自展检验(bootstrap) ,重复抽样次数为 1 000 次。所建的系统进化树见图 4 ,我们可以看到各分支的自展支持率基本在 90% 以上 ,而且 3 个分支与 3 种单倍型一一对应。为了分析品种间的遗传距离 ,我们构建了 A 单倍型树 ,从图 5 可以看出新疆的巴音布鲁克羊和卡拉库尔羊之间的遗传关系最近 ,这是和这两个品种间的地理距离一致的。

3 讨 论

3.1 中国绵羊的单倍型种类

单倍型的定义包括两方面内容:一是遗传物质来自单亲;一是在传递时等位基因紧密连锁在一起 ,构成一个遗传单元。在使用单倍型这一概念时 ,各人的理解不同 ,其外延包括的范围也不相同。遗传学家将其限定在很窄的范围。对于 mtDNA ,他们认为仅在高变区内出现碱基变异不能算作一个单倍型 ,还需要在保守区内有若干紧密连锁的位点。相反生物信息学家认为只要出现碱基变异 ,不管是在高变区还是在保守区 ,都算作一个单倍型。所以要结合上下文内容才能理解单倍型所包括的范围。如果出现在分类学、遗传学上 ,单倍型所包含的范围很窄;如果出现在程序、算法中 ,其限定范围要宽很多。在本试验中 ,主要是通过 PCR - SSCP 的试验结果来对所研究的 6 个地方绵羊品种的 283 个个体进行统计分析 ,3 对引物都扩增出了 A、B、C 3 种单倍型 ,这 3 种单倍型在这些个体中所占的比例不完全相同 ,尤其是单倍型 C 波动的频率较大。实验所用的绵羊

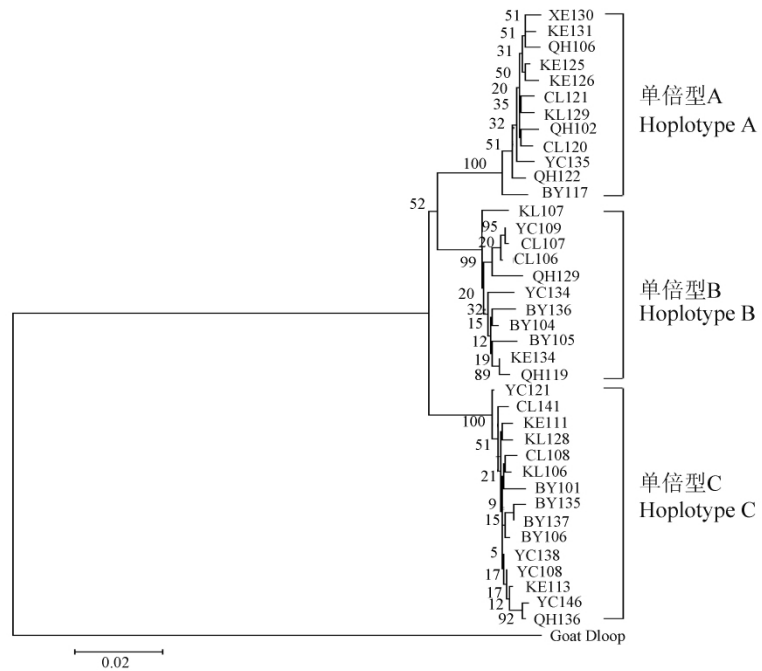


图 4 绵羊 D - Loop 进化树(NJ 法)

Fig. 4 D - loop phylogenetic tree of 38 haplotypes (NJ method) Original tree

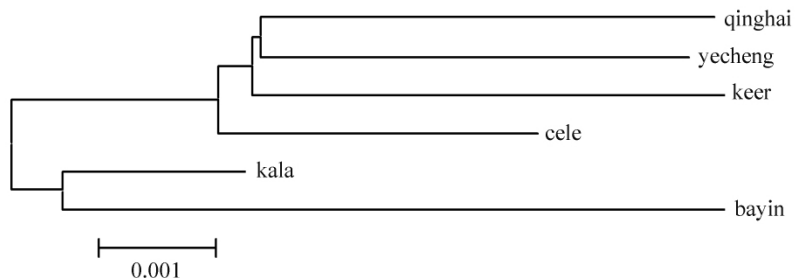


图 5 A 单倍型树(NJ 法)

Fig. 5 NJ tree of haplotype A

品种中都存在 A、B、C 3 种单倍型,其中以 A 单倍型为主,这个结果与以前报道^[18]的基本一致。

基因突变是指由于 DNA 碱基对的置换、增添或缺失而引起的基因结构的变化,亦称点突变。在自然条件下发生的突变叫自发突变;由人工利用物理因素或化学药剂诱发的突变叫诱发突变。基因突变是生物变异的主要原因,是生物进化的主要因素。在生产上人工诱变是产生生物新品种的重要方法。根据遗传信息的改变方式,基因突变又可以分为同义突变、错义突变和无义突变 3 种类型。其中同义突变是指有时 DNA 的一个碱基对的改变并不会影响它所编码的蛋白质的氨基酸序列,这是因为改变后的密码子和改变前的密码子是简并密码子,它们编码同一种氨基酸,这种基因突变称为同义突变;反之,则称之为非同义突变。在本试验中,C 单倍型处的 T 变异为 C 这个转换实际也是一个非同义突变,这个结果与参考文献^[17]完全一致,更进一步的证明了中国地方绵羊品种在遗传上的多态性。

3.2 中国绵羊 mtDNA D-Loop 区的核苷酸变异

本研究对中国 6 个地方绵羊品种的 41 个个体 38 种单倍型的 mtDNA D-Loop 区的序列分析表明:6 个绵羊品种的 D-Loop 区序列的核苷酸变异全部是碱基转换,无一处碱基颠换,同时 D-Loop 区序列的长度也发生了变异。有 158 个位点发生了碱基突变,其中突变频率大于 5% 的高变异的多态位点有 91 个。基于本试验所获取的 41 个个体的序列资料,按长度变异可将绵羊的 D-Loop 区划分为 6 种分子类型,即:1 180 bp(11 个)、1 181 bp(9 个)、1 183 bp(17 个)、1 182 bp(1 个)、1 184 bp(1 个)和 1 106 bp(2 个),其中,主要的分子类型是前三种,合计频率达 90.24%,而 GenBank 上发表的绵羊线粒体 DNA 序列(登录号为 AF010406)的 D-Loop 区长度是 1 185 bp,是因为在 907 位与 908 位之间缺失的“C”碱基而造成的。分析认为引起这种分子长度异质性的主要原因是由于 1 个或少数几个碱基或串联重复基元序列的插入(或缺失)而造成的,不存在绵羊品种的特异性。

参考文献:

- [1] MCNEELY J A. Conserving the World's Biological Diversity [C]. Washington D C and Gland Switzerland, 1990.
- [2] 汪松, 陈灵芝. 中国科学院生物多样性研讨会会议录 [C]. 北京: 中国科学院生物科学与技术局, 1990.
- [3] 马克平, 钱迎倩. 《生物多样性公约》的起草过程与主要内容 [J]. 生物多样性, 1994, 2(1): 54-57.
- [4] BRAATZ S. Conserving Biological Diversity - A Strategy for Protected Areas in the Asia-Pacific Region [C]. Washington D C: the World Bank, 1992.
- [5] 马月辉, 陈幼春, 冯维祺. 中国家养动物多样性概况 [J]. 畜牧兽医学报, 2000, 31(5): 394-399.
- [6] CINKULOV M, POPOVSKI Z, PORCU K, et al. Genetic diversity and structure of the West Balkan Pramenka sheep types as revealed by microsatellite and mitochondrial DNA analysis [J]. J Anim Breed Genet, 2008, 125(6): 417-426.
- [7] PARDESHI V C, KADOO N Y, SAINANI M N, et al. Mitochondrial haplotypes reveal a strong genetic structure for three Indian sheep breeds [J]. Anim Genet, 2007, 38(5): 460-466.
- [8] Pedrosa S, Arranz J J, Brito N, et al. Mitochondrial diversity and the origin of Iberian sheep [J]. Genet Sel Evol, 2007, 9(1): 91-103.
- [9] MEADOWS J R, CEMAL I, KARACA O, et al. Five ovine mitochondrial lineages identified from sheep breeds of the near East [J]. Genetics, 2007, 175(3): 1371-1379.
- [10] CHEN S Y, DUAN Z Y, SHA T, et al. Origin, genetic diversity, and population structure of Chinese domestic sheep [J]. Gene, 2006, 376(2): 216-223.
- [11] CRAWFORD A M. An Autosomal Genetic Linkage Map of the Sheep Genome [J]. Genetics, 1995(1): 112-116.
- [12] GUO J, DU L X, MA Y H, et al. A novel maternal lineage revealed in sheep (*Ovis aries*) [J]. Anim Genet, 2005, 36(4): 331-336.
- [13] HIENDLEDER S, KAUPÉ B, WAAAMUTH R, et al. Molecular analysis of wild and domestic sheep questions current nomenclature and provides evidence for domestication from two different subspecies [J]. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 2002, 269(1494): 893-904.
- [14] HALL T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT [J]. Nucleic Acids Symp, 1999, 41: 95-98.
- [15] KUMAR S, TAMURA K, NEI M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics. Analysis and sequence alignment [J]. Brief Bioinform, 2004, 5(2): 150-163.
- [16] 曹红鹤. 肉牛主要生产性状的生化和分子遗传标记的研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2000.
- [17] HIENDLEDER S. A low rate of replacement substitutions in two major *Ovis aries* mitochondrial genomes [J]. Anim Genet, 1998, 29(2): 116-122.
- [18] Hiendleder S, Lewalski H, WASSMUTH R, et al. The complete mitochondrial DNA sequence of the domestic sheep (*Ovis aries*) and comparison with the other major ovine haplotype [J]. J Mol Evol, 1998b, 47(4): 441-448.