

TYR 基因外显子 1 的序列变异与家猪的起源研究

韩洪金^{1,2,4}, 吴桂生^{1,2}, 史宪伟³, 张亚平^{1,2}

(1. 中国科学院昆明动物研究所云南省畜禽分子生物学重点实验室, 昆明 650223;

2. 云南大学云南省生物资源保护与利用重点实验室, 省部共建国家重点实验室培育基地, 昆明 650091;

3. 云南农业大学动物科技学院, 云南省生物多样性与生物技术创新人才培养基地, 昆明 650201; 4. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 为了分析家猪与野猪的遗传多样性及起源, 测定了来自 12 个中国地方家猪品种、3 个欧洲引进猪品种以及 8 个中国野猪和 2 个越南野猪共 36 个个体的酪氨酸酶基因(TYR)外显子 1 的序列, 共检出 6 个单核苷酸多态性位点(SNPs), 且这 6 个位点的变异均为同义突变, 根据这些变异可将酪氨酸酶基因 DNA 序列归结为 4 种单倍型。结合已发表的数据, 构建了简约中介网络图。在网络图中, 单倍型 TYR * 2 主要为欧洲家猪与欧洲野猪和 3 条亚洲家猪染色体。大部分亚洲家猪和野猪共享单倍型 TYR * 1, 表明这是 1 个亚洲类型的单倍型; 同时也有部分欧洲家猪与野猪携带这一单倍型。而单倍型 TYR * 3 和 TYR * 4 为本研究检测到的稀有单倍型, 这两种单倍型主要由中国家猪与亚洲野猪组成。这种网络图结构支持家猪的欧洲和亚洲独立起源学说, 同时也表明, 相当部分的欧洲家猪品种受到亚洲猪的基因渗透, 而少量中国家猪和日本野猪也受到了欧洲猪的基因渗透。

关键词: 猪; TYR 外显子 1; 起源; 基因渗透

中图分类号: Q953; S828

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2005)05-0719-05

Sequence Variation of TYR Exon 1 and Origin of Pigs

HAN Hong-Jin^{1,2,4}, WU Gui-Sheng^{1,2}, SHI Xian-Wei³, ZHANG Ya-Ping^{1,2}

(1. Yunnan Laboratory of Molecular Biology of Domestic Animals, Kunming Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China; 2. Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-resource, Yunnan University, Kunming 650091, China;

3. The Center for Agricultural Biodiversity Research and Training of Yunnan Province, College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201 China; 4. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

3. The Center for Agricultural Biodiversity Research and Training of Yunnan Province, College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201 China; 4. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: To investigate the origin and genetic diversity of domestic pigs, the porcine TYR exon 1 in 36 individuals from 12 Chinese indigenous breeds, three European breeds, eight Chinese wild boars and two Vietnamese wild boars was sequenced. Sequence analysis revealed six synonymous mutations, and all the sequences could be sorted into 4 haplotypes. Combining with the published sequences, we constructed a reduced median network (RM network), in which TYR * 2 was a haplotype dominated by European domestic pigs and wild boars, plus only three chromosomes from Asian pigs. Most Asian domestic pigs and wild boars shared haplotype TYR * 1, demonstrating that TYR * 1 was an Asian specific haplotype. Meanwhile, some European domestic pigs and wild boars carried the haplotype TYR * 1. TYR * 3 and TYR * 4 were two haplotypes with low fre-

收稿日期: 2004-08-10; 修回日期: 2004-12-10

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(编号: G20000161)和云南省自然科学基金(编号: 2000C0078M, 2002C0064M)资助[Supported by the State Key Basic Research and Development Plan (No. G20000161) and Natural Science Foundation of Yunnan Province (No. 2000C0078M, 2002C0064M)]

作者简介: 韩洪金(1978—), 男, 安徽涡阳人, 硕士研究生, 研究方向: 动物进化遗传学。E-mail: hjhan25@yahoo.com

通讯作者: 史宪伟(1962—), 男, 江苏丹阳人, 博士, 教授, 研究方向: 动物分子生物学。Tel: 0871-5220521; E-mail: xwshi@hotmail.com, xwshi5@yahoo.com

张亚平(1965—), 男, 云南昭通人, 研究员, 博士, 研究方向: 动物进化遗传学。Tel: 0871-5190761; E-mail: zhangyp@public.km.yn.cn

致谢: 本研究得到中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放实验室苟世康、吴世芳、林世英、朱春玲、庞俊峰、向余劲功、聂龙等老师在实验上的帮助, 谨致谢意!

quencies, containing mainly Chinese indigenous pigs and Asian wild boars, plus some European domestic pigs. Independent domestication of pigs from Asia and Europe was supported by the pattern of RM network. The European commercial breeds had been suffered from introgression from Chinese pigs, and a few Chinese indigenous breeds and Japanese wild boars were also suffered from introgression from European pigs as well.

Key words: pig; *TYR* exon 1; origin; introgression

哺乳动物酪氨酸酶(*TYR*)是一个 I 型膜结合糖蛋白,其基因组序列包括 5 个外显子和 4 个内含子,编码序列长约 1.6 kb^[1,2]。*TYR* 是色素合成过程中的一个重要功能酶,与两个相关性蛋白(*TYRP1* 和 *TYRP2*)一起启动一系列反应,将酪氨酸转化为色素,其中 *TYR* 在色素合成过程中催化了多巴及多巴醌生成等 3 个不同的反应^[3]。*TYR* 变异可导致绵羊^[4]、小鼠^[5]、家兔^[6]和人类^[7]等许多物种的白化特征。

家猪是一种重要的经济动物,其遗传多样性和起源问题受到了广泛的关注^[8~11]。中国地方家猪资源十分丰富,对世界许多著名猪种的育成也做出过重要贡献^[9,12~14]。Giuffra 等(2000)研究了猪 *TYR* 基因的多态性,在欧洲家猪、欧洲野猪、中国梅山猪和日本野猪 *TYR* 基因外显子 1 的部分核苷酸序列中,共检测到 2 种单倍型(*TYR* * 1 和 *TYR* * 2),分别对应于东亚家猪/野猪和欧洲家猪/野猪。但 Giuffra 等人的研究在中国家猪品种中仅包括了梅山猪,中国其他家猪品种和类型 *TYR* 基因的变异情况还不得而知。本文测定了 12 个中国地方家猪品种、3 个欧洲引入品种以及中国野猪和越南野猪的 *TYR* 基因的序列,结合已经发表的序列,研究家猪在 *TYR* 外显子 1 上的序列变异和单倍型分布情况,为家猪的起源和驯化历史提供核基因上的证据。

1 材料和方法

1.1 样品

本研究采集了 12 个中国地方家猪品种、3 个欧洲引入品种以及中国野猪和越南野猪共 36 个个体。中国地方家猪品种的血样或肌肉组织采集于当地的保种场,欧洲商品猪取样于云南省畜牧兽医研究所。家猪和野猪的名称和采样地点见表 1。

1.2 基因组 DNA 的提取

采用常规的蛋白酶 K 消化,苯酚、氯仿/异戊醇方法提取,无水乙醇沉淀的方法。

1.3 扩增和测序

采用引物 *TYRe1F*: 5'-AGGGGTAGCTG-

GAAAGAGAA-3' 和 *TYRe1R*: 5'-CAATACCAG-CAAGAAGAGTC-3'^[8] 扩增 *TYR* 外显子 1 的一段 727 bp 的片段。所采用 *Taq* DNA 聚合酶为宝生物工程(大连)产品。PCR 条件:95℃ 预变性 3 min; 然后进行 35 个循环,每个循环包括:94℃ 变性 1 min,56℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1 min; 最后 72℃ 延伸 5 min。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳分离,回收用上海华舜生物工程有限公司 Gel Extraction Mini Kit 试剂盒进行。回收产物用 PCR 引物直接测序,采用 Perkin-Elmer 公司的 BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 作测序反应。序列分析在 ABI 3700 DNA 序列分析仪上进行。

1.4 克隆

为了区分杂合位点的单倍型,重新进行扩增,并将 PCR 产物连接到 pMD18-T 质粒(宝生物工程(大连)中,连接反应、转化和质粒提取按试剂盒操作手册(宝生物工程(大连)进行。对每一个体,至少挑出 5 个阳性克隆进行测序。

1.5 数据分析

采用 DNASTAR 软件包(DNASTAR Inc.)对序列进行人工核对校正。将本研究所有个体序列和已经发表的序列^[8],用 CLUSTAL-V 软件^[15]进行序列比对,然后用 MEGA2.1^[16]统计单倍型及变异位点。对于短片段的核基因序列,在很短的世代间隔内如研究种内群体关系,可以认为该片段内没有重组发生;因此我们根据构建系统发育关系的最大简约法原理,参照 Bandelt 等(1995)的方法^[17],构建了一个能包含绝大部分可能的简约树的中介网络图来说明各群体间的关系。

2 结果

2.1 猪 *TYR* 位点外显子 1 序列变异

本研究分析了猪 *TYR* 第一外显子 699 bp 编码区序列,将 GenBank 中序列 AF181962 (*TYR* * 1, 日本野猪)作为参照序列,核苷酸位点编号从 AF181962 第一个碱基开始。序列比对揭示了 6 个单核苷酸多态性位点(SNPs)(表 2),其中 C322T 和

C514T 为新发现的变异位点。值得提出的是,所有这 6 个单核苷酸多态性位点都位于密码子第三位,为同义突变。这 6 个变异位点除了 628 位点为颠

换,其余 5 个变异位点均为转换。根据这 6 个变异位点,可将所有 DNA 序列分为 4 个单倍型, $TYR * 3$ 和 $TYR * 4$ 为本研究新发现的两个单倍型(表 2)。

表 1 样品采集地及 4 个 *TYR* 单倍型在各个群体中的分布
Table 1 Sample localities and distribution of the four *TYR* haplotypes in different populations

品种/群体 Breeds/Populations	采样地点 Sample localities	染色体数 [§] Numbers [§] of chromosomes	单倍型($TYR *$) Haplotypes($TYR *$)			
			1	2	3	4
亚洲 Asia			1	2	3	4
中国家猪 Chinese DP		50	43	2	1	4
碧湖猪 Bihu	浙江 Zhejiang	4	4			
成华猪 Chenghua	四川 Sichuan	4	3			1
汉江黑猪 Hanjiang Black	陕西 Shaanxi	4	3		1	
槐猪 Huai	福建 Fujian	2	1	1		
姜曲海猪 JiangquHai	江苏 Jiangsu	2	1			1
内江猪 Neijiang	四川 Sichuan	4	4			
莆田猪 Putian	福建 Fujian	2	2			
荣昌猪 Rongchang	四川 Sichuan	2	2			
太湖猪 Taihu	江苏 Jiangsu	6	4			2
梅山猪 [®] Meishan [®]		14	13	1		
圩猪 Wei	安徽 Anhui	2	2			
皖浙花猪 Wan-zhe Spotted	浙江 Zhejiang	2	2			
玉江猪 Yujiang	江西 Jiangxi	2	2			
中国野猪 Chinese WB		16	11		3	2
贵州野猪 Guizhou WB	贵州 Guizhou	2	1			1
福建野猪 Fujian WB	福建 Fujian	2	1		1	
海南野猪 Hainan WB	海南 Hainan	6	5		1	
云南野猪 Yunnan WB	云南 Yunnan	2	2			
浙江野猪 Zhejiang WB	浙江 Zhejiang	2	1		1	
江西野猪 Jiangxi WB	江西 Jiangxi	2	1			1
越南野猪 Vietnamese WB	越南 Vietnam	4	4			
日本野猪 [®] Japanese WB [®]		14	13	1		
欧洲 Europe						
意大利野猪 [®] Italian WB [®]		40	2	38		
波兰野猪 [®] Polish WB [®]		26	12	14		
欧洲家猪 European DP		140	40	99		1
约克夏 Yorkshire	引进 Introduced	2	2			
杜洛克 Duroc	引进 Introduced	6	2	3		1
兰德瑞斯 Landrace	引进 Introduced	8	5	3		
大白猪 [®] Large White [®]		40	14	26		
兰德瑞斯 [®] Landrace [®]		26	12	14		
汉普夏 [®] Hampshire [®]		38		38		
杜洛克 [®] Duroc [®]		20	5	15		
总计 Total		290	125	154	4	7

§:核基因染色体数目为猪个体数目的二倍;®:参考文献[8]中的序列。

缩写:DP, Domestic Pigs; WB, Wild Boars.

§: Numbers of nuclear chromosomes are twice of those the pig individuals; ®: Data from Guiffra *et al.* 2000.

Abbreviations: DP, Domestic Pigs; WB, Wild Boars.

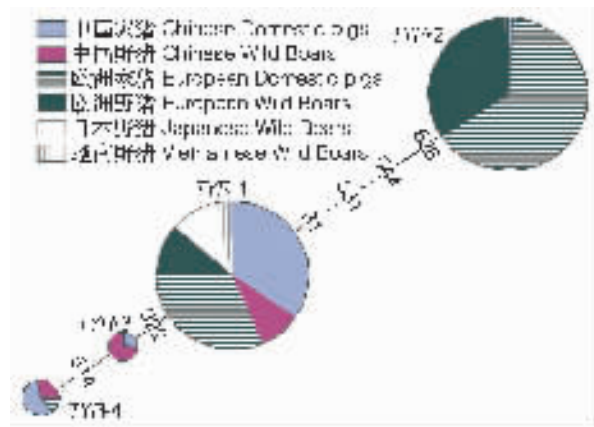
表 2 猪 *TYR* 外显子 1 的 4 个单倍型Table 2 Four haplotypes at porcine *TYR* exon 1

单倍型	变异位点
Haplotypes	Variable sites
	0 3 3 5 5 6
	3 2 3 1 4 2
	1 2 1 4 4 8
<i>TYR</i> * 1	G C C C T T
<i>TYR</i> * 2	A . T . C A
<i>TYR</i> * 3	. T
<i>TYR</i> * 4	. T . T . .

结合已发表的数据,本研究共分析了 145 个个体,包括 290 条染色体(表 2),其中单倍型 *TYR* * 1、*TYR* * 2 为优势单倍型,分别占 125 和 154 条染色体。单倍型 *TYR* * 3 和 *TYR* * 4 只有零星分布,分别占 4 和 7 条染色体。50 条中国家猪的染色体占有 4 种单倍型,其中单倍型 *TYR* * 1 频率为 86% (43/50)。16 条中国野猪染色体中,单倍型 *TYR* * 1 的频率为 68.8% (11/16),单倍型 *TYR* * 3 和 *TYR* * 4 共占有 5 条染色体。日本野猪有 1 条染色体携带单倍型 *TYR* * 2,其余都和越南野猪一样,携带单倍型 *TYR* * 1。在两个欧洲野猪群体中,单倍型 *TYR* * 2 的频率分别为 95% (意大利野猪)和 53.8% (波兰野猪),其余部分为 *TYR* * 1。欧洲家猪除携带单倍型 *TYR* * 2 (99/140) 和 *TYR* * 1 (40/140) 外,还有 1 条染色体携带 *TYR* * 4。

2.2 简约中介网络图结构

结合已发表的序列^[8],我们构建了简约中介网络图(图 1)。4 个单倍型间的变异关系用线条表示,每个单倍型用圆圈表示,圆圈的大小表示这个单倍型的相对频率,不同颜色部分代表不同的群体,单倍型间位点的差异在线条上标出。在简约中介网络图中,*TYR* * 1 和 *TYR* * 2 为两个相差 4 个变异位点的单倍型,其中 *TYR* * 2 中的个体基本全是欧洲家猪和野猪,很明显,这是 1 个欧洲特有的单倍型。中国家猪、中国野猪、越南野猪、日本野猪都享有单倍型 *TYR* * 1。亚洲猪中,槐猪、梅山猪和日本野猪各有一条染色体携带欧洲单倍型 *TYR* * 2;而欧洲猪中,除了汉普夏猪外,各个家猪品种和野猪群体都共享 *TYR* * 1 这一亚洲单倍型。*TYR* * 3 和 *TYR* * 4 是两个与 *TYR* * 1 较近的单倍型,主要包括中国家猪和野猪,表明这两个单倍型也是亚洲猪的单倍型。此外,我们所测定的杜洛克猪的 1 条染色体也携带单倍型 *TYR* * 4。

图 1 猪 *TYR* 外显子 1 位点的简约中介网络图Fig. 1 RM network of porcine *TYR* exon 1

3 讨论

本研究中,36 个个体包含了不同毛色类型的猪。从野猪、荣昌猪(白色)、皖浙花猪(黑白花色)到内江猪和太湖猪(黑色),在这些个体中只发现了 6 个同义突变。所以,在中国猪中,*TYR* 外显子 1 与毛色变异无关。在我们分析的 145 个个体中,只有 4 个单倍型,并且绝大部分个体都落入 *TYR* * 1 和 *TYR* * 2 这两个单倍型,表明猪 *TYR* 多态性很低,是 1 个保守的位点。

在简约中介网络图中,大部分中国家猪和东亚野猪共享 *TYR* * 1、*TYR* * 3 和 *TYR* * 4 这 3 个单倍型,表明中国家猪和东亚野猪的关系较近,而和欧洲类型的猪关系较远,支持中国家猪起源于东亚野猪。而大部分欧洲家猪和欧洲野猪共享 *TYR* * 2,从而支持欧洲家猪起源于欧洲野猪。这种网络图结构明显支持欧洲和亚洲家猪的独立起源,与以前对于线粒体 DNA 的研究结论一致^[8,9]。

欧洲猪除了享有 *TYR* * 2 这一欧洲猪的单倍型,几乎每个欧洲家猪品种和野猪群体都有 *TYR* * 1 这一亚洲单倍型,这些可能是欧洲家猪育成过程中掺入了中国家猪的结果。19 世纪英美等国又引进我国广东猪种,在巴克夏、波中、大白等猪种的育成过程中都有中国猪的掺入^[18]。对细胞色素 b 的分析^[14],也证明了大部分欧洲标准猪品种都有亚洲猪的基因渗透。有趣的是,欧洲野猪中也有亚洲猪的单倍型,这种结果可能是由于这些野猪中掺入了家猪的基因。由于天然野猪群体数量的下降,有些地方将野猪与家猪杂交个体或家猪放到野外,以扩大野猪的群体,来满足当地打猎的习惯^[19],这样,亚

洲家猪的单倍型也渗入到欧洲野猪的一些群体中去。同样,亚洲家猪中的 1 个槐猪和 1 个梅山猪携带 $TYR * 2$, 表明这两个中国猪种也受到欧洲猪的基因渗透。中国不断引进一些欧洲商品猪, 来改良中国家猪^[18], 在此过程中, 欧洲猪的基因可能渗入少数中国地方品种里。同时, 一头日本野猪也携带 $TYR * 2$, 表明日本野猪可能也受到了欧洲猪的基因渗透。

参 考 文 献 (References):

- [1] del Marmol V, Beermann F. Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS Lett*, 1996, 381(3): 165~168.
- [2] Oetting W S. The tyrosinase gene and oculocutaneous albinism type 1 (OCA1): A model for understanding the molecular biology of melanin formation. *Pigment Cell Res*, 2000, 13(5): 320~325.
- [3] Sturm R A, O'sullivan B J, Box N F, Smith A G, Smit S E, Puttick E R, Parsons P G, Dunn I S. Chromosomal structure of the human *TYRP1* and *TYRP2* loci and comparison of the tyrosinase-related protein gene family. *Genomics*, 1995, 29(1): 24~34.
- [4] Rowett M A, Fleet M R. Albinism in a Suffolk sheep. *J Hered*, 1993, 84(1): 67~69.
- [5] Orlow S J, Lamoreux M L, Pifko-Hirst S, Zhou B K. Pathogenesis of the platinum (cp) mutation, a model for oculocutaneous albinism. *J Invest Dermatol*, 1993, 101(2): 137~140.
- [6] Aigner B, Besenfelder U, Muller M, Brem G. Tyrosinase gene variants in different rabbit strains. *Mamm Genome*, 2000, 11(8): 700~702.
- [7] King R A, Pietsch J, Fryer J P, Savage S, Brott M J, Russell-Eggitt I, Summers C G, Oetting W S. Tyrosinase gene mutations in oculocutaneous albinism 1 (OCA1): definition of the phenotype. *Hum Genet*, 2003, 113(6): 502~13.
- [8] Giuffra E, Kijas J M H, Armager V, Carlborg O, Jeon J-T, Andersson L. The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. *Genetics*, 2000, 154: 1785~1791.
- [9] Kim K I, Lee J H, Li K, Zhang Y P, Lee S S, Gongora J, Moran C. Phylogenetic relationships of Asian and European pig

breeds determined by mitochondrial DNA D-loop sequence polymorphism. *Anim Genet*, 2002, 33(1): 19~25.

- [10] Alves E, C óvilo, M C Rodríguez, L Silió. Mitochondrial DNA sequence variation and phylogenetic relationships among Iberian pigs and other domestic and wild pig populations. *Animal Genetics*, 2003, 34(5): 319~322.
- [11] Huang Y, Shi X, Zhang Y. Mitochondrial genetic variation in Chinese pigs and wild boars. *Biochemical Genetics*, 1999, 37: 335~343.
- [12] Kijas J M, Andersson L. A phylogenetic study of the origin of the domestic pig estimated from the near-complete mtDNA genome. *J Mol Evol*, 2001, 52(3): 302~308.
- [13] Yang S L, Wang Z G, Liu B, Zhang G X, Zhao S H, Yu M, Fan B, Li M H, Xiong T A, Li K. Genetic variation and relationships of eighteen Chinese indigenous pig breeds. *Genet Sel Evol*, 2003, 35(6): 657~671.
- [14] Clop A, Amills M, Noguera J L, Fernandez A, Capote J, Ramon M M, Kelly L, Kijas J M, Andersson L, Sanchez A. Estimating the frequency of Asian cytochrome B haplotypes in standard European and local Spanish pig breeds. *Genet Sel Evol*, 2004, 36(1): 97~104.
- [15] Higgins D G, Sharp P M. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *Comput Appl Biosci*, 1989, 5(2): 151~153.
- [16] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, Nei M. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*, 2001, 17(12): 1244~1245.
- [17] Bandelt H J, P Forster, B C Syke, M B Richards. Mitochondrial portraits of human populations using median networks. *Genetics*, 1995, 141: 743~753.
- [18] ZHANG Zhong-Ge. In: Pig breeds in China. Shanghai: Shanghai Science and Technical Publishers, 1986, 219~221. 张仲葛. 见: 中国猪品种志. 上海: 上海科学技术出版社, 1986, 219~221.
- [19] Vernesi C, Crestanello B, Pecchioli E, Tartari D, Caramelli D, Hauffe H, Bertorelle G. The genetic impact of demographic decline and reintroduction in the wild boar (*Sus scrofa*): a microsatellite analysis. *Mol Ecol*, 2003, 12(3): 585~595.

欢迎订阅 2006 年《生命的化学》

《生命的化学》是由中国科学技术协会主管, 中国生物化学与分子生物学会主办, 国内外公开发行, 以生物化学、分子生物学与细胞生物学为主要内容的期刊(双月刊)。办刊的宗旨是反映当今上述学科的发展状况和研究动态, 并介绍有关的研究技术, 以及帮助科研工作者交流思想和为学术组织沟通活动信息。办刊的方针是提高与普及兼顾, 重点刊登综述性、进展性的文章, 同时也旁及技术和方法、书评、会议报道、名词讨论等内容。本刊的读者对象是广大会员以及从事与生物化学、分子生物学和细胞生物学有关研究和应用的科技工作者、医药工作者、大专院校生物系和化学系的师生等。《生命的化学》已先后成为中国科学院的中国科学引文数据库期刊和国家科技论文统计源期刊, 也是中国科学院研究生《生物化学》入学考试命题的主要参考书之一。2004 年被收录为中国科技核心期刊。

本刊国内发行代号: 4-315 全国各地邮局订阅; 国外发行: 中国国际图书贸易总公司(北京 399 信箱), 国外发行代号: 0516BM; 定价: 8.00 元。

若您没有在当地邮局订阅上本刊, 可汇款至本刊编辑部: 上海市岳阳路 320 号 23 号楼 112 室《生命的化学》编辑部, 邮编: 200031。全年定价 48 元整(免邮资)。