

中国蒙古马与国外纯血马 mtDNA D-Loop 高变区序列比较

芒 来, 李金莲, 石有斐

(内蒙古农业大学动物科学与医学学院, 呼和浩特 010018)

摘要: 比较分析了 4 匹中国蒙古马和 4 匹国外纯血马的线立体 DNA(mtDNA)D-Loop 高变区 400 bp 核苷酸序列的变异情况。结果发现, 4 匹中国蒙古马 mtDNA D-Loop 高变区的平均核苷酸变异率为 3.69%, 而纯血马的为 4.00%, 其核苷酸变异类型均包括转换、颠换和缺失 3 种形式, 其中以转换最为常见。核苷酸变异基因座多, 并且存在长度变异, 不同变异在个体之间差异也很大, 因此说明中国蒙古马和国外纯血马的 mtDNA D-Loop 高变区都具有丰富的多态性。

关键词: 中国蒙古马; 国外纯血马; mtDNA D-Loop; 高变区; 多态性

中图分类号: Q953

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2005)01-0091-04

Sequence Comparing of mtDNA D-Loop Varied Region in Chinese Mongolian Horse and External Thoroughbred Horse

MANG Lai, LI Jin-Lian, SHI You-Fei

(College of Animal Science and Veterinary, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China)

Abstract: Mitochondrial DNA D-Loop varied region 400 bp sequence variations in four Chinese Mongolian horses and four External Thoroughbred horses were analyzed in this experiment. The results showed that the average nucleotide mutational rate of mtDNA D-Loop varied region in four Chinese Mongolian horses was 3.69%, while External Thoroughbred horses were 4.00%. Three types of mutations including transition, transversion and deletion were all found in the investigated mtDNA D-Loop regions, of which transition was the most frequent. Nucleotide mutational loci were abundant, length mutations were found and great differences were all observed among the eight horses. It showed there existed much polymorphism in the mitochondrial DNA D-Loop varied region of Chinese Mongolian horses and External Thoroughbred horses.

Key words: Chinese Mongolian horses; External Thoroughbred horses; mitochondrial DNA D-Loop; varied region; polymorphism

线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 是 Nass^[1,2] 于 1962 年首次用电子显微镜观察到的, 从此有关 mtDNA 的遗传结构、复制、转录、基因表达与调控等方面已做了许多工作, 并已查明它们相似的信息结构, 都编码自身的大小 rRNA, 20 几个 tRNA,

10 多个蛋白质分子, 包括细胞氧化酶亚基以及一些没有确定的蛋白质分子 (URF)^[3]。高等动物 mtDNA 作为一种核外遗传物质, 是共价闭合的双链 DNA 分子, 其分子质量大小约为 16.5 kb, 基因结构简单、稳定, 一级结构的碱基突变率高^[4,5]。自 20 世纪 80 年

收稿日期: 2003-09-05; 修回日期: 2003-12-18

基金项目: 国家教育部科学技术研究重点项目 (01018) [Supported by National Ministry of Education Science Technology Research]

作者简介: 芒 来 (1963—), 男 (蒙古族), 内蒙古自治区锡盟镶黄旗人, 农学博士, 兽医学博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 分子数量遗传学与马科学, Tel: 13947157237. E-mail: dmanglai1979@yahoo.com.cn

代以来,mtDNA 一直在动物进化遗传学、分子生态学、种群遗传结构分析、遗传多样性、物种及品系鉴定等方面都得到了广泛的应用^[6]。mtDNA 具有分子质量小、结构简单、进化速度快、母性遗传、无组织特异性及提取方便等特点,而这些是核 DNA 所不具备的。mtDNA 作为一种遗传性标记,在各种家畜上研究得较多,发现一些畜种 mtDNA 的多态性,并已用于种间及品种间起源进化关系的分析^[7]。特别是对 mtDNA 的 D-Loop 高变区,各种家畜研究的更为深入。关于马的 mtDNA 的限制性分析亦有报道^[8~11],但关于马的 mtDNA D-Loop 高变区分析的有关报道甚少,本文将对中国蒙古马和国外纯血马的 mtDNA D-Loop 高变区序列核苷酸的遗传变异情况进行初步比较。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验动物:4 匹蒙古马血样采自内蒙古自治区锡盟东乌旗牧民马场;4 匹纯血马血样采自内蒙古自治区赛马场马术队(其中 1 号马来自英国,2 号马来自澳大利亚,3 号马来自美国,4 号马来自新西兰),均用 ACD 抗凝,−70℃ 保存。

1.2 总 DNA 的提取

总 DNA 提取参考 Chen 等^[12]方法。

1.3 PCR 扩增

马 mtDNA D-Loop 区扩增所用的特异性引物是根据 Xu 等^[13]已发表的马 mtDNA 全序列设计的。

正链引物为 5'-AGTCTCACCATCAACAC-CCAAAGC-3';

负链引物为 5'-CCTGAAGTAGGAACCAGATG-3'。

PCR 反应总体系为 25 μL,其中包括 Ex Taq DNA 聚合酶(购自 TaKaRa 公司)12.5 μL、混合引物(10 pmol/μL)1~1.2 μL、DNA 模板 1 μL(约 60 ng)、加灭菌三蒸水至 25 μL。

PCR 反应条件为:95℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 60 s,72℃ 延伸 90 s,经过 34 个循环后,72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存。PCR 扩增产物于 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测(电泳结果见图 1)。

1.4 mtDNA 的测序

PCR 产物由上海联合基因测序公司纯化,并用

ABI PRISM 377-96 测序仪测序。



图 1 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳检测结果
1~4:蒙古马个体;1'~4':纯血马个体;M:分子量标记。

Fig.1 The pattern of PCR amplified products in agarose gel electrophoresis

1~4:the individuals of Mongolian horses;

1'~4':the individuals of Thoroughbred horses;M:marker.

2 结果与分析

2.1 核苷酸变异类型和位置

马的 mtDNA 全长为 16670 bp,本研究中所扩增的 D-Loop 高变区序列是从 74~473 bp,4 号蒙古马和 2 号纯血马 mtDNA D-Loop 高变区核苷酸序列测序结果如图 2 所示。8 匹马的 D-Loop 高变区的长度除 4 号蒙古马和 2 号纯血马为 399 bp 外,其他的均为 400 bp。

1 号蒙古马的核苷酸突变有 16 次,其中颠换 2 次,由 T→G(445),G→T(450);14 次转换,由 A→G(152,371,408,458),G→A(227,231,235,441),C→T(209,368,402,442),T→C(334,401);变异率为 4.00%;2 号蒙古马的核苷酸突变有 15 次,其中颠换 2 次,由 T→G(445),G→T(450);13 次转换,由 A→G(127,152,280),G→A(216,227,235),C→T(165,209,368,402),T→C(125,234,401);变异率为 3.75%;3 号蒙古马的核苷酸突变有 15 次,其中颠换 3 次,由 T→G(220,445),G→T(450);12 次转换,由 A→G(152,228,298,408,440),G→A(227,441),C→T(209,368,402),T→C(334,401);变异率为 3.75%;4 号蒙古马的核苷酸突变有 13 次,其中颠换 2 次,由 T→G(445),G→T(450);10 次转换,由 A→G(152,458),G→A(216,227,441),C→T(209,368,402,438),T→C(401);缺失 1 次(位于 161~163 之间);变异率为 3.26%。4 匹蒙古马 mtDNA D-Loop 高变区的平均核苷酸变异率为 3.69%。

1 号纯血马的核苷酸突变有 17 次,其中颠换 2 次,由 T→G(445),G→T(450);15 次转换,由 A→G(127,152,280,458),G→A(216,227,441),C→T

(165,209,368,402), T→C(125,233,234,401); 变异率为 4.25%; 2 号纯血马的核苷酸突变有 17 次, 其中颠换 2 次, 由 T→G(445), G→T(450); 14 次转换, 由 A→G(127,152,280), G→A(165,216,227,235,441), C→T(209,368,402), T→C(125,234,401); 缺失 1 次(位于 161~163 之间); 变异率为 4.26%; 3 号纯血马的核苷酸突变有 16 次, 其中颠换 2 次, 由 T→G(445), G→T(450); 14 次转换, 由 A

→G(127,152,280), G→A(216,227,235,441), C→T(165,209,368,402), T→C(125,234,401); 变异率为 4.00%; 4 号纯血马的核苷酸突变有 14 次, 其中颠换 2 次, 由 T→G(445), G→T(450); 12 次转换, 由 A→G(334,401,458), G→A(209,368,402), C→T(227,235), T→C(152,228,298,408); 变异率为 3.50%。4 匹纯血马 mtDNA D-Loop 高变区的平均核苷酸变异率为 4.00%。

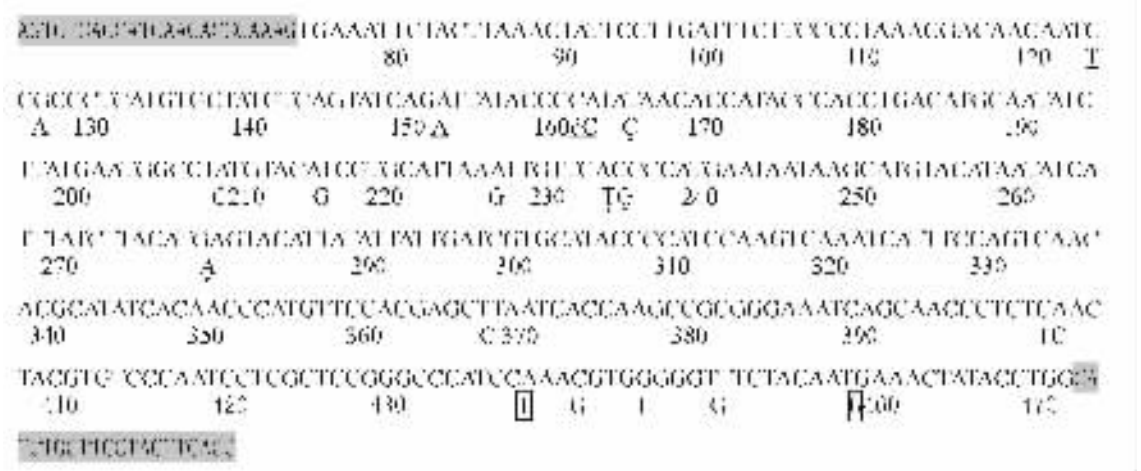


图 2 4 号蒙古马和 2 号纯血马 mtDNA D-Loop 高变区测序结果

注:加方框的碱基表示蒙古马的突变碱基;加着重号的碱基表示纯血马的突变碱基;加下划线的碱基表示两个品种马均发生突变的碱基;两端加底纹的碱基为扩增引物。

Fig.2 4th Mongolian horse and 2^{ed} Thoroughbred horse mtDNA D-Loop varied region sequence

Note: □ Nucleotide mutation of Mongolian; ··· Nucleotide mutation of Thoroughbred; Nucleotide mutation of two breeds; Two ends of grey were amplified primers.

2.2 核苷酸变异率

4 匹中国蒙古马和 4 匹国外纯血马 mtDNA D-Loop 高变区 400 bp 的核苷酸变异率见表 1。从表 1 可以看出,两个品种马 mtDNA D-Loop 高变区序列的核苷酸变异类型均包括转换、颠换和缺失 3 种形式,并以转换最为常见。纯血马的核苷酸变异率高于蒙古马。

表 1 蒙古马和纯血马 mtDNA D-Loop 高变区的核苷酸变异率

Table 1 Mongolian horse and Thoroughbred horse mtDNA D-Loop varied region nucleotide mutational rate

样品 Sample	蒙古马 Mongolian horse				纯血马 Thoroughbred horse			
	转换 Transition (%)	颠换 Trans- version (%)	缺失 Dele- tion (%)	合计 Total (%)	转换 Transi- tion (%)	颠换 Trans- version (%)	缺失 Dele- tion (%)	合计 Total (%)
NO.1	3.50	0.50	0.00	4.00	3.75	0.50	0.00	4.25
NO.2	3.25	0.50	0.00	3.75	3.51	0.50	0.25	4.26
NO.3	3.00	0.75	0.00	3.75	3.50	0.50	0.00	4.00
NO.4	2.51	0.50	0.25	3.26	3.00	0.50	0.00	3.50
平均 Mean	3.07	0.56	0.06	3.69	3.44	0.50	0.06	4.00

3 讨论

(1) 从中国蒙古马和国外纯血马 mtDNA D-Loop 高变区的核苷酸变异中可以看出, mtDNA D-Loop 高变区不仅存在基因座变异, 而且也存在长度变异, 长度变异是由碱基缺失导致, 即 161~163 之间缺失 C, 在 4 号蒙古马和 2 号纯血马中出现。

(2) 发生基因座变异时, 其中有一些基因座发生相同变异: 例如 445(T→G), 450(G→T), 8 匹马均有变异; 152(A→G), 209(C→T), 227(G→A), 368(C→T), 401(T→C), 402(C→T) 这些突变基因座除了 4 号纯血马外, 其他马都存在; 216(G→A), 2、4 号蒙古马和 1、2、3 号纯血马均有变异; 235(G→A), 1、2 号蒙古马和 2、3 号纯血马均有变异; 334(T→C), 1、3 号蒙古马均有变异; 441(G→A), 除 2 号蒙古马和 4 号纯血马外均有变异; 458(A→G), 两个品种马的 1、4 号均有变异; 125、234(T→C), 127、280(A→G), 2 号蒙古马和 1、2、3 号纯血马均有变异。

(3) 还有一些发生突变的基因座只在某一个体中单独出现; 例如 231(G→A), 371(A→G), 442(C→T) 3 个基因座变异均只在 1 号蒙古马出现; 334, 401(A→G), 209, 368, 402(G→A), 227, 235(C→T), 152, 228, 298, 408(T→C), 11 个基因座变异均只在 4 号纯血马出现。

(4) 中国蒙古马和国外纯血马的 mtDNA D-Loop 高变区的核苷酸变异率都很高, 即 4 匹蒙古马 mtDNA D-Loop 高变区的平均核苷酸变异率为 3.69%, 而纯血马的为 4.00%, 并且纯血马高于蒙古马。

(5) 变异基因座多且不同个体之间差异很大, 这可能部分由于生存的环境不同所导致, 因此得出中国蒙古马和国外纯血马的 mtDNA D-Loop 高变区多态性丰富。

参考文献(References):

- [1] Nass M M K. Fibrous structures within the matrix of developing chick embryo mitochondria. *Exp Cell Res*, 1962, (26): 424 ~ 437.
- [2] LIU Zhong-Lu, WEI Hong, ZENG Yang-Zhi, WANG Ai-De, GAN Shi-Xiang. Analysis of the Polymorphism of mtDNA D-Loop in three breeds of experimental miniature pig in China. *Hereditas* (Beijing), 2001, 23(2): 123~127.
刘中禄, 魏泓, 曾养志, 王爱德, 甘世祥. 中国三种实验用小型猪 mtDNA D-Loop 多态性分析. *遗传*, 2001, 23(2): 123~127.
- [3] SONG Cheng-Yi, JING Rong-Bin, WANG Xue-Feng, GAO Bo. The study and application of pig mtDNA polymorphisms. *Ecology of Domestic Animal*, 2002, 23(1): 75~77.
宋成义, 经容斌, 王学峰, 高波. 猪 mtDNA 多态性的研究与应用. *家畜生态*, 2002, 23(1): 75~77.
- [4] PAN Cai-Hong. Genetic research progress of animal mtDNA and its application in breeding. *Gansu Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 1997, 27(1): 23~25.
潘彩虹. 动物 mtDNA 遗传研究进展及其在育种上的应用. *甘肃畜牧兽医*, 1997, 27(1): 23~25.
- [5] QU Kai-Xing, LIAN Lin-Sheng, NIE Long, SHI Xian-Wei, ZHANG Ya-Ping. Primary analysis of mitochondrial DNA D-Loop region sequence in Baoshan pig. *Hereditas* (Beijing), 2003, 25(5): 526~528.
丐开兴, 连林生, 聂龙, 史宪伟, 张亚平. 云南保山猪线粒体 DNA D-Loop 区序列初步分析. *遗传*, 2003, 25(5): 526~528.
- [6] XIA De-Quan, WANG Wen-Jun. The study of animal mitochondrial DNA and its application on fish population genetic structure. *Journal of Fisheries China*, 1998, 22(4): 364~369.
夏得全, 王文君. 动物线粒体 DNA 研究及在鱼类种群遗传结构中的应用. *水产学报*, 1998, 22(4): 364~369.
- [7] CHEN Hong, Leibenguth, QIU Huai. Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA of german saddle-horse. *Acta Univ Agric Boreali-occidentalis*, 1999, 27(4): 23~27.
陈宏, Leibenguth, 邱怀. 德国骑乘马线粒体 DNA 的限制性酶分析. *西北农业大学学报*, 1999, 27(4): 23~27.
- [8] Hutchison C A III, Newbold J E, Potter S S, Bogler S A. Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature*, 1974, 251: 536~538.
- [9] Potter S S, Newbold J E, Hutchinson C A III, Bogler S A. Specific cleavage analysis of mitochondrial DNA. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1975, 72: 4496~4500.
- [10] George J M, Ryder O A. Mitochondrial DNA evolution in the genus equus. *Mol Biol Evol*, 1986, 3: 535~546.
- [11] Wang W, Liu A H, Liu S Y, Lan H, Su B, Xie D W, Shi L M. Multiple genotypes of mitochondrial DNA within a horse population from a small region in Yunnan province of China. *Biochem Genet*, 1994, 32: 371~378.
- [12] Chen H, Leibenguth F. Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA of three farm animal species, cattle, sheep and goats. *Comp Biochem Physiol*, 1995, 111B: 643~649.
- [13] Xu X, Arnason U. The complete mitochondrial DNA (mtDNA) of the donkey and mtDNA comparison among four closely related mammalian species-pairs. *Journal of Molecular Evolution*, 1996, 43(5): 438~446.