

藏獒血液蛋白多态性研究

兰小平¹, 郭宪², 陈永昌³, 鄢琦⁴, 崔泰保⁴

(1. 天水师范学院生命科学与化学学院, 甘肃天水 741000; 2. 中国农业科学院兰州

畜牧与兽药研究所, 甘肃兰州 730050; 3. 中国科学院昆明动物研究所, 云南昆明 650223; 4. 甘肃农业大学, 甘肃兰州 730070)

摘要 [目的]了解藏獒血液蛋白基因座的遗传变异状况,为藏獒品种资源保护及合理开发利用提供理论依据。[方法]采用不连续垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,对河曲藏獒、青海藏獒、青海藏狮犬和青海土种犬共4个群体103只犬的7个血液蛋白基因座(Tf、Po、 $S\alpha_2$ 、Hb、Alb、Pr、Amy)的多态性进行研究,并分析不同群体的群体内遗传变异。[结果]4个犬群中,Tf、Po和 $S\alpha_2$ 3个基因座上存在多态性,其中Tf和Po分别由3个等位基因控制, $S\alpha_2$ 由2个等位基因控制,Hb、Alb、Pr和Amy基因座均呈现单态;藏獒群体的有效等位基因数(N_e)和Nei氏平均预期基因杂合度(H)分别为1.5324和0.2303,均高于其他犬群。[结论]藏獒群体内在血液蛋白位点上存在丰富的遗传变异。

关键词 藏獒;血液蛋白多态性;有效等位基因数;Nei氏平均预期基因杂合度

中图分类号 S829.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)33-16274-03

Study on the Protein Polymorphism in the Blood of Tibetan Mastiff

LAN Xiao-ping et al (School of Life Science and Chemistry, Tianshui Normal University, Tianshui, Gansu 741000)

Abstract [Objective] The aim was to find out the genetic variations in blood protein of Tibetan Mastiff, and provide some theoretical basis for resource protection and reasonable development and utilization of Tibetan Mastiff. [Method] A total of 103 blood samples were taken from four populations of Hequ Tibetan Mastiff, Qinhai Tibetan Mastiff, Tibetan Spaniel and native dogs of Qinghai. Seven blood protein locus (Tf, Po, $S\alpha_2$, Hb, Alb, Pr and Amy) were investigated by using vertical polyacrylamide gel electrophoresis with discontinuous buffer system. Then the genetic variation during different populations was analyzed. [Result] Genetic variations were observed in Tf, $S\alpha_2$ and Po in four populations, others were not polymorphic. There were three alleles at the locus of Tf and Po, two alleles at the loci of $S\alpha_2$. Effective number of alleles and Nei's expected average heterozygosity were 1.5324 and 0.2303 relatively, all higher in Tibetan Mastiff than other populations. [Conclusion] Genetic variations within population in blood protein loci of Tibetan Mastiff were richer than other populations.

Key words Tibetan Mastiff; Blood protein polymorphism; Effective number of alleles; Nei's expected average heterozygosity

藏獒(Tibetan Mastiff),又名藏狗、蕃狗、羌狗,古称苍猯犬,是我国唯一的大型犬种,属西藏地区二级保护动物,被列为世界名犬之一。藏獒起源于距今58000年前的灰狼,原产于我国青藏高原的西藏、青海、甘肃和四川等省区,近年来,藏獒足迹遍及世界各地,世界上许多大型犬种如圣伯纳犬(Saint Bernard)、兰伯格犬(Leonberger)和英国牧羊犬(English Sheepdog)等都含有藏獒的血统^[1-2]。藏獒以其体型高大,适应性强,性格刚毅,勇猛无畏和对主人无比忠诚而深受世界各地养犬爱好者的青睐。据估算,现存世界的藏獒总数约为30万只^[3],且品种退化极为严重,纯种藏獒已十分罕见,面对藏獒基因资源严重流失的现状,开展有关藏獒种质资源保护和开发利用方面的研究已迫在眉睫^[4]。利用血液蛋白多态性分析畜禽品种的遗传多样性,是研究品种起源、分化和遗传变异的重要手段之一,是畜禽品种资源保存和合理开发利用的重要科学依据^[5]。笔者从生化遗传学角度对河曲藏獒、青海藏獒、青海藏狮犬和青海土种犬4个群体的103只犬的7个血液蛋白基因座的多态性进行研究,旨在从基因的产物——蛋白质水平上阐明藏獒种群遗传结构,为藏獒品种资源保护及合理开发利用提供理论依据。

1 材料与方

1.1 材料 该研究共采集血样103份,其中,44份为河曲藏獒(HTM),42份为青海藏獒(QTM),5份青海藏狮犬(QTS)以及12份青海土种犬(NAD)。均后肢静脉采集肝素

钠抗凝血5~10ml,24h内带回实验室,处理后置低温冰箱(-40℃)冻存备用。

1.2 方法

1.2.1 电泳与表型识别。采用双垂直板高pH不连续性聚丙烯酰胺凝胶电泳系统分析测定血红蛋白(Hb)等7个血液蛋白基因座的多态性。血红蛋白(Hb)、转铁蛋白(Tf)、后白蛋白(Po)和慢- α_2 -球蛋白($S\alpha_2$)采用8.0%的分离胶和3.0%浓缩胶,前白蛋白(Pr)和白蛋白(Alb)采用14%的分离胶和4%的浓缩胶,均采用考马斯亮蓝染色法进行染色。淀粉酶(Amy)采用7.5%的分离胶和3.5%的浓缩胶,采用碘化钾-碘染色法染色。各等位基因及表型识别均参照铃木正三等的标准进行^[6]。

1.2.2 数据统计分析。各基因座的电泳结果用群体遗传学分析软件PopGene 32进行统计分析,得到各基因座的基因型频率、基因频率、有效等位基因数(N_e)和Nei氏平均预期基因杂合度(H)^[7]。

2 结果与分析

2.1 电泳图谱及表型识别

2.1.1 转铁蛋白(Tf)。在所检测的4个犬群中,Tf都由A、B和C3个等位基因控制,河曲藏獒具有AB、AC、BB、BC和CC5种基因型,青海藏獒存在AB、AC、BB和BC4种基因型,青海藏狮犬群仅出现AB、AC和BB3种基因型,土种犬群出现AB、BB和BC3种基因型,电泳图谱模式图见图1~2。

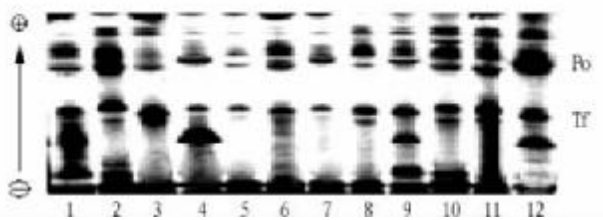
2.1.2 后白蛋白(Po)。4个犬群的Po都由A、B和C3个等位基因控制,表现为AA、AB、AC和BC4种基因型,电泳图谱及模式图见图1~2。

2.1.3 慢- α_2 -球蛋白($S\alpha_2$)。4个犬群中 $S\alpha_2$ 存在AA和AB2种基因型,分别受A和B2个等位基因所控制。

基金项目 甘肃省科技厅基金项目(GKC-97-27-5);天水师范学院青年基金资助项目(X4-25)。

作者简介 兰小平(1974-),男,甘肃华亭人,硕士,讲师,从事动物遗传育种及遗传多样性研究。

收稿日期 2009-07-17



注:2,8,10,11的Tf为AB型,1,5,7的Tf为BB型,4,9,12的Tf为AC型;1,2,6,10,11的Po为AC型,3,5,8,9的Po为BC型,4和7的Po为AB型。

Note: The genotypes of Tf in 2, 8, 10 11 lanes were AB, and in 4, 9, 12 lanes were AC; The genotypes of Po in 1, 2, 6, 10, 11 were AC, in 3, 5, 8, 9 lanes were BC, and in 4, 7 lanes were AB.

图1 运铁蛋白(Tf)和后白蛋白(Po)电泳图谱

Fig.1 Electrophoretogram of Tf and Po

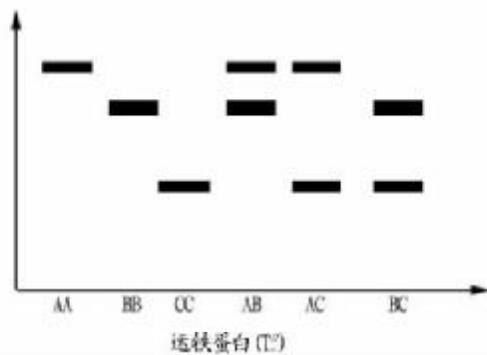


图2 运铁蛋白(Tf)和后白蛋白(Po)模式图

Fig.2 Mode chart of Tf and Po

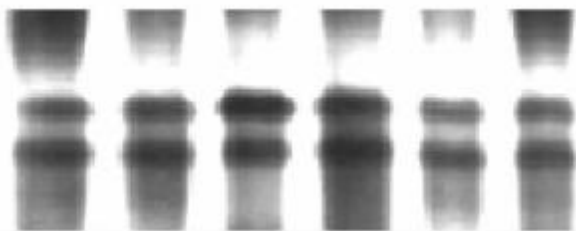


图3 血红蛋白(Hb)电泳图谱

Fig.3 Electrophoretogram of Hb

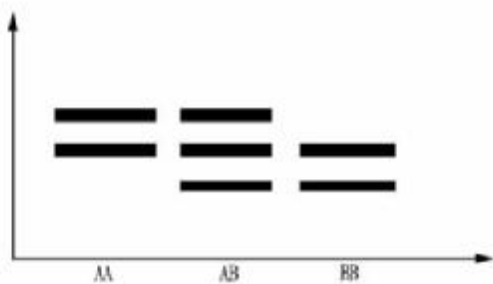


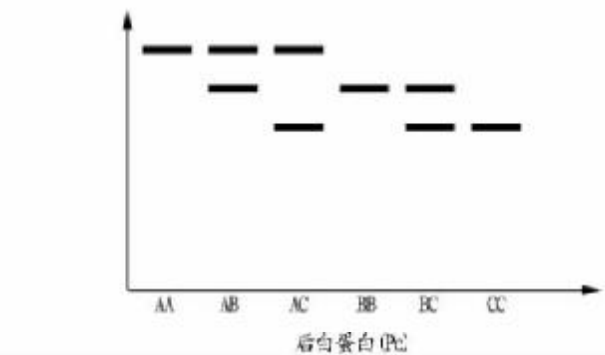
图4 血红蛋白(Hb)模式图

Fig.4 Mode chart of Hb

不同血液蛋白位点的优势基因型和优势基因在所检测的4个群体中基本一致,Tf位点的优势基因型为BB,优势基因为B;Po位点的优势基因型为BC,优势基因为C; $S\alpha_2$ 位点的优势基因型为AB,优势基因为A。2个藏獒群体在这3个血液蛋白位点上的基因频率差别较大,尤其在Tf位点上,河曲藏獒的C基因频率(0.2386)明显高于青海藏獒(0.0714),表明不同生态类群的藏獒在同一基因位点上的基因频率存

2.1.4 血红蛋白(Hb)、白蛋白(Alb)、前白蛋白(Pr)和血清淀粉酶(Amy)。Hb、Alb和Pr基因座在4个犬群中都不存在多态性,均表现为单一BB基因型(图3~4)。4个犬群的Amy在有 Ca^{2+} 和无 Ca^{2+} 的孵育液中均显现出一条泳动速度较慢的活性区带,该结果可能与藏獒对青藏高原特殊生态环境的适应性有关。藏獒分布地区的海拔大多在3000m以上,气候寒冷潮湿,年平均气温在0℃左右,昼夜温差极大。因此,藏獒在能量的储存和利用上比分布在其他地区的动物更为迅速而有效,否则,则会被这种严酷的生活环境所淘汰。在这种情况下,具有Amy变异类型的个体,就可能会由于Amy活性受到影响而被淘汰,只有那些Amy活性较强的个体才能存活下来。

2.2 血液蛋白位点的基因型频率和基因频率 4个犬群血液蛋白位点的基因型频率和基因频率见表1。由表1可知,



在一定的差异,这种差异表现出类群的差异,可以作为藏獒类群鉴定的重要基础,也是藏獒遗传资源保护和开发利用的重要依据。卡方检验的结果表明,所有血液蛋白位点的基因频率均处于Hardy-Weinberg平衡状态($P > 0.05$)。

表1 藏獒、藏狮及土种犬群体血液蛋白位点的基因型频率和基因频率
Table 1 Genotype and gene frequencies of protein loci in the blood of Tibetan Mastiff, Tibetan Spaniel and native dog

蛋白位点 Protein loci	河曲藏獒 Hequ Tibetan Mastiff	青海藏獒 Qinghai Tibetan Mastiff	藏狮犬群 Tibetan Spaniel	土种犬群 Native dog
Tf 基因型频率 Genotype frequency	AB	0.159 1	0.357 2	0.200 0
	AC	0.090 9	0.047 6	0.200 0
	BB	0.386 4	0.500 0	0.600 0
	BC	0.340 9	0.095 2	0
	CC	0.022 7	0	0
基因频率 Gene frequency	A	0.125 0	0.202 4	0.200 0
	B	0.636 4	0.726 2	0.700 0
	C	0.238 6	0.071 4	0.100 0
Po 基因型频率 Genotype frequency	AA	0.045 5	0.047 6	0.200 0
	AB	0.113 6	0.119 0	0
	AC	0.409 1	0.214 3	0
	BC	0.431 8	0.619 1	0.800 0
基因频率 Gene frequency	A	0.306 8	0.214 3	0.200 0
	B	0.272 7	0.369 0	0.400 0
	C	0.420 5	0.416 7	0.400 0
$S\alpha_2$ 基因型频率 Genotype frequency	AA	0.045 5	0.214 3	0.200 0
	AB	0.954 5	0.785 7	0.800 0
基因频率 Gene frequency	A	0.522 7	0.607 1	0.600 0
	B	0.477 3	0.392 9	0.400 0

2.3 有效等位基因数(N_e)和 Nei 氏平均预期基因杂合度(H) 4个犬群有效等位基因数(N_e)和 Nei 氏平均预期基因

杂合度(H)见表2。由表2可知,河曲藏獒的 N_e 最大,其次为青海藏狮犬和青海藏獒,土种犬的 N_e 最小。该结果表明,河曲藏獒血液蛋白基因座在发生选择、突变或随机漂变时,群体保持其等位基因的能力相对较强。就整体而言,所有被测群体的群体内都具有一定程度的遗传变异,但群体之间差别不大。就 H 来看,4个被测群体中,河曲藏獒最大,其次为青海藏獒和青海藏狮犬,而土种犬群最小,仅为0.1895。说明河曲藏獒在长期的进化过程中积累了丰富的遗传变异。

表2 4个犬群有效等位基因数(N_e)和Nei氏平均预期基因杂合度(H)

Table 2 Effective number of alleles (N_e) and Nei's expected average gene heterozygosity (H)

项目 Item	河曲藏獒 Hequ Tibetan Mastiff	青海藏獒 Qinghai Tibetan Mastiff	藏狮犬群 Tibetan Spaniel	土种犬群 Native dog
N_e	1.569 4	1.495 3	1.507 5	1.308 9
H	0.239 4	0.221 1	0.225 7	0.189 5

3 结论与讨论

3.1 藏獒血液蛋白多态性

3.1.1 血红蛋白(Hb)。该研究所检测的4个犬群中,Hb均表现为单一的BB基因型,这一结果与Shifrine等对比格犬^[8]、铃木正三对比格犬以及田名部等对比格犬^[6]的Hb研究结果相一致,即在Hb基因座上都不存在多态性,而与Kim对韩国的京都犬^[9]以及田名部等对日本犬种^[6]的研究结果不同。绵羊Hb多态性的研究结果表明,Hb的A基因具有较强的氧结合能力,认为具有A基因的个体在高海拔和不良生态环境的自然选择中处于有利地位^[10-12]。藏獒虽然也生活在高海拔地区,但在该研究中Hb只表现为单一的BB基因型。因此,在除绵羊以外的其他动物Hb基因座上具有A基因的个体是否对高海拔和不良生态环境同样具有较强的适应性,还有待于更进一步研究。

3.1.2 运铁蛋白(Tf)。该研究中2个藏獒群体的Tf都存在A、B和C3种等位基因。这一结果与晁生玉等对21只青海德令哈藏獒^[13]Tf的研究结果相一致,同时,也与Kim对韩国京都犬^[9]以及Komatsuzaki对比格犬^[14]的研究结果相一致。而田名部等对日本犬种^[6]、Jordana等对西班牙犬种^[15]以及Reetz对德国牧羊犬^[16]Tf的研究发现,犬Tf基因座除A、B和C3个等位基因外,还存在另外2种等位基因D和E,但在所有犬种中均以B和C基因较为普遍。不同犬品种在Tf基因座上等位基因数不同,可能与不同犬品种的起源、进化以及品种形成过程有关。

3.1.3 白蛋白(Alb)和后白蛋白(Po)。该研究中,2个藏獒群体的Alb均表现为单一的BB基因型,与Komatsuzaki对比格犬^[14]Alb的研究结果相一致。而在Kim对韩国京都犬^[9]、田名部等对日本犬种^[6]以及Jordana对10个西班牙犬种^[15]的研究中都发现了Alb存在A和B2种等位基因的多态现象。该研究中2个藏獒群体的Po基因座受A、B和C3个等位基因所控制,与晁生玉等对青海德令哈藏獒^[13]Po的研究结果相一致,也与田名部等对日本犬种及部分欧洲犬种^[6]的研究结果相符,但Komatsuzaki等对比格犬^[14]以及Jordana对10个西班牙犬种^[15]的研究中,只出现了A和B2个等位基因。

3.2 藏獒的群体内遗传变异 群体的有效等位基因数(N_e)

和Nei氏预期平均基因杂合度(H)是度量群体内遗传变异的重要指标。该研究中2个藏獒群体的有效等位基因数分别为1.5694和1.4953,平均为1.5324,而土种犬群的有效等位基因数仅为1.3089,从这一结果可以推测,藏獒在群体内发生选择、突变、随机漂变和群体迁入等事件时,其保持群体遗传平衡的能力比土种犬群大。这一结果与河曲藏獒在选育实践中表现出对近交具有较强抵抗力的结论相一致^[17]。2个藏獒群体的Nei氏预期平均基因杂合度分别为0.2394和0.2211,平均为0.2303,并且2个群体之间差异不显著($P>0.05$),青海土种犬群的Nei氏预期平均基因杂合度为0.1895,说明藏獒的群体内遗传变异比土种犬群更为丰富。以往对血液蛋白多态性的研究表明,哺乳动物种内存在一定水平的遗传变异,其平均基因杂合度的均值为 $H=0.050$ ^[18]。相比之下,藏獒群体的 H 显著的大于哺乳动物的平均水平,因此,可以认为藏獒群体内在血液蛋白位点上存在着丰富的遗传变异,这可能与藏獒作为一个未经系统选育的原始品种而积累了大量的遗传变异有关。遗传多样性的丰富程度,与物种对环境的适应能力和进化潜力之间存在着密切的关系^[19]。藏獒群体内在血液蛋白位点上存在丰富的遗传变异,这与藏獒对青藏高原严酷自然环境的高度适应性表现相一致。

参考文献

- [1] LI Q F, LIU Z S, LI Y X, et al. Origin and phylogenetic analysis of Tibetan Mastiff based on the mitochondrial DNA sequence[J]. J Genet Genomics, 2008, 35: 335-340.
- [2] 崔泰保. 比较藏獒学[M]. 北京: 中国书籍出版社, 2008.
- [3] 王子仁. 玛曲藏獒的合理开发利用和物种资源保护对策[J]. 中国工作犬业, 2006(11): 26-28.
- [4] 兰小平, 崔泰保, 鄢珣. 藏獒血浆酯酶多态性研究[J]. 甘肃畜牧兽医, 2004, 175(2): 6-8.
- [5] 肖炜, 张元, 孙东晓, 等. 中国地方猪种血液蛋白遗传多样性的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35(3): 246-251.
- [6] 铃木正三, 渡边嘉彦, 吉田治弘, 等. 比较血型学[M]. 程光潮, 韩建林, 杨华林, 等. 译. 北京: 中国科学技术出版社, 1991.
- [7] NEI M. Molecular evolutionary genetics[M]. New York: Columbia University Press, 1987: 176-187.
- [8] SHIFRINE M, STORMONT C. Hemoglobins, haptoglobins and transferrins in beagles[J]. Laboratory Animal Science, 1973, 20(1): 135-144.
- [9] KIM W K. Studies on types of haemoglobin, albumin and transferrin in dogs[J]. Korean Journal of Veterinary Research, 1974, 14(2): 191-200.
- [10] 周虞灿, 刘国富. 藏羊绵羊血红蛋白的组成及其对氧亲和力的研究[J]. 高原生物学集刊, 1985(4): 99-104.
- [11] 张才俊. 青海细毛羊血红蛋白多态性的研究[J]. 高原生物学集刊, 1987, 7: 177-185.
- [12] 汪时荃, 马振中, 王绥芳. 滩羊血红蛋白分布的地区差异[J]. 畜牧兽医学报, 1988, 19(2): 95-98.
- [13] 晁生玉. 青海藏獒血液蛋白质多态性的初步研究[J]. 畜牧与兽医, 1998, 30(2): 55-56.
- [14] KOMATSUZAKI T. Genetics polymorphisms of plasma proteins in Beagles[J]. Bulletin of Azabu-University, Veterinary Medicine, 1983, 4(2): 141-148.
- [15] JORDANA J, PIEDRAFITA J, SANCHEZ A. Genetic relationships: Spanish dog breeds. II. The analysis of biochemical polymorphism[J]. Genetics, Selection, Evolution, 1992, 24(3): 245-263.
- [16] REETZ I. Studies on some genetic markers in the blood of dogs with special consideration of their use in inparentage checking in German breeds[C]. Thesis, Tierärztliche Hochschule, Hannover, 1983.
- [17] 崔泰保. 河曲藏獒育种核心群选育的研究[J]. 甘肃畜牧兽医, 2002, 32(2): 3-5.
- [18] NEVO E, BELLES A, BEN-SCHLOMO R. The evolutionary significance of genetic diversity[C]//COOK L M. Genetic and ecological diversity. London: Chapman and Hall, 1984: 105-109.
- [19] 蒋志刚, 马克平, 韩兴国. 保护生物学[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1997.