

quence Block1, CSB1)和第二保守序列区(Conserved Sequence Block 2, CSB2)之间。猪的 mtDNA D-loop 的基因布置如图 1 所示。进化上,D-loop 的碱基替换率比 mtDNA 分子的其他区域高 5~10 倍^[4],是 mtDNA 分子内的高变区。无疑,分析 D-loop 是进行 mtDNA 研究的重要内容。在猪 mtDNA

D-loop 的研究上,MacKay 等^[5]首先测定了 D-loop 5'端序列,Chivizzani 等^[4]测定了剩余的 3'端序列,从而计算出猪线粒体 DNA D-loop 序列为 $1\ 234+10n$ 个碱基(n 为串联重复序

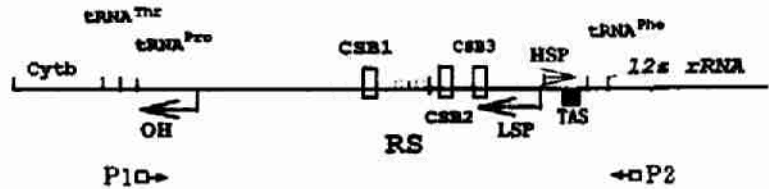


图 1 猪 mtDNA D-loop 基因布置

列数),也揭示了 D-loop 序列的精细结构和功能。Takeda 等^[6]测定了梅山、大约克、长白等猪品种的 D-loop 序列,找出了猪 mtDNA D-loop 的碱基变异位点。Davoli 等^[7]通过对八个猪群 mtDNA D-loop PCR-RFLP 分析,发现家猪存在 Hinc I (两种类型)和 Hae III (四种类型)的多态。本实验以位于 D-loop 两端的 tRNA^{Met}和 12S rRNA 基因内的部分序列设计的一对引物通过聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)扩增猪 mtDNA D-loop。引物序列如下:P1,5'-AGGAGACTAACTCCGCCAT-3',P2,5'-CGCGGATACTTGCATGTGT-3',引物在 mtDNA D-loop 的位置见图 1。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

太湖猪(二花脸,Erhualian)、大约克猪(Large White)、北京黑猪(Beijing Black pig)、长白猪(Landrace)、杜洛克猪(Duroc)、香猪(Xiang Minipig)和五指山猪(WuZhishan Minipig)共 7 个猪品种,每个品种选 12 头猪做为实验动物。

1.2 模板 DNA

猪抗凝血以常规法提取总 DNA(含 mtDNA)

1.3 PCR 反应

在 PE GeneAmp 2 400 热循环仪上进行,50 μ L 反应体积中,引物为 50 pmol,模板 DNA 100 ng,1U Taq 酶,dNTP 浓度为 200 μ mol \cdot L⁻¹。扩增反应在 94 C 5 min 后进行 30 个循环的 94 C 1 min,60 C 1 min,72 C 2 min 之后,反应于 72 C 延伸 5 min。

1.4 PCR 产物的纯化

以 2 倍体积的无水乙醇沉淀扩增产物,再以 70%的乙醇洗涤沉淀 2 次,真空干燥后以

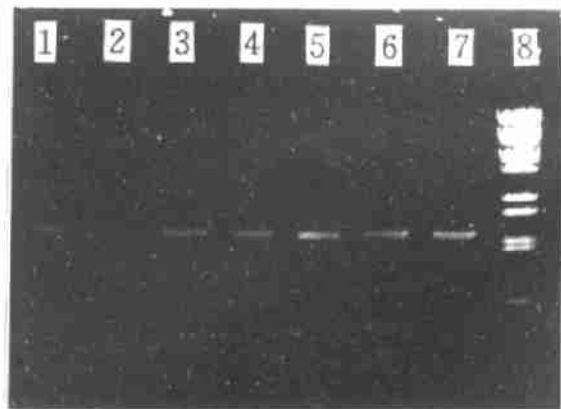


图 2 猪 mtDNA D-loop 的扩增

1~7 为扩增产物,8 为 λ /BstE I marker

50 μL 灭菌双蒸水溶解 DNA。

1.5 扩增产物的酶切

取扩增产物 5 μL , 加入 2U 的限制酶和 1 μL 10 倍的酶切缓冲液, 加灭菌水至 10 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h。

1.6 DNASIS 模拟 D-loop 酶切图谱

以 DNASIS 软件分析已发表的猪 mtDNA D-loop 序列, 查找出所用限制酶的酶切图谱。

2 实验结果

2.1 MtDNA D-loop 的扩增

本实验扩增出的各品种猪 mtDNA D-loop 的电泳结果见图 1, 扩增产物均约为 1 500 bp, 与已发表的猪的 D-loop (含 25 个串联重复序列的 D-loop 为 1 484 bp) 大小十分相近。

2.2 七个品种猪 mtDNA D-loop PCR-RFLP

太湖猪(二花脸)、大约克猪、北京黑猪、香猪、五指山猪、长白猪、杜洛克猪的 mtDNA D-loop 扩增产物经 24 种限制性内切酶酶切结果及 DNASIS 软件模拟的酶切结果的比较见表 1。

表 1 七个品种猪 mtDNA D-loop 24 种内切酶酶切位点与酶切片段

内 切 酶	酶切片段大小	酶切位点数
Acc I -A	1 500	0
Acc I -B	1 350, 150	1
Alu I	400, 370, 350, 300, 80	4
Apa I	1 050, 450	1
Ava I	1 420, 80	1
Avd I	950, 550	1
BamH I	1 050, 450	1
Ban I	1 200, 300	1
Bgl I	1 500	0
Cla I	1 500	0
Dra I	1 400, 100	1
EcoR I	1 500	0
EcoRV	1 500	0
Hae I	800, 450, 250	2
Hap I	800, 500, 200	2
Hinc I	1 100, 400	1
Hind I	1 500	0
Hinf I	900, 600	1
Msp I	1 500	0
Pst I	1 500	0
Pvu I	1 500	0
Rsa I	500, 380, 400, 120, ...	15
Sca I	1 450, 50	1
Taq I	1 000, 500	1
Xba I	1 500	0

长白猪及部分大约克猪的 Acc I 酶切图谱与其他品种猪存在差异(图 3),各品种猪头数及 mtDNA D-loop Acc I 的酶切类型如表 2 所示。

2.3 太湖猪、大约克猪正反交家系 mtDNA D-loop Acc I 的酶切图谱

太湖猪、大约克猪正反交家系 mtDNA D-loop 在 Acc I 酶切位点上存在多态性,酶切图谱见图 4。

2.4 DNASIS 软件模拟 mtDNA D-loop 的酶切图谱

通过 Genebank 查询到 Takeda、Ghivizzani 和 MacKay 测定的梅山、大约克、长白等猪种的 D-loop 序列,通过 DNASIS 软件模拟各品种猪 D-loop 限制性内切酶酶切图谱,通过与实验结果比较,发现本实验的 24 种限制性内切酶的酶切图谱与 DNASIS 软件模拟的结果完全一致,从而也验证了本实验扩增 mtDNA D-loop 的正确性。

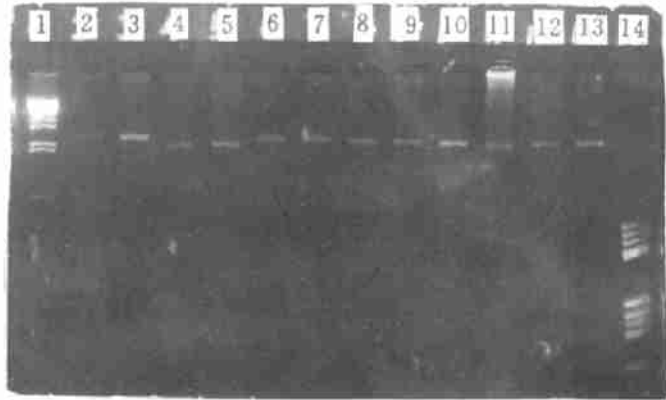


图 3 七个品种猪 mtDNA D-loop Acc I 酶切图谱
1 1 kb ladder marker; 2.3 五指山猪; 4.5 长白猪;
6.7 大约克猪; 8.9 二花脸猪; 10 北京黑猪; 11 香猪;
12.13 杜洛克猪; 14 PBR322/Hae III marker

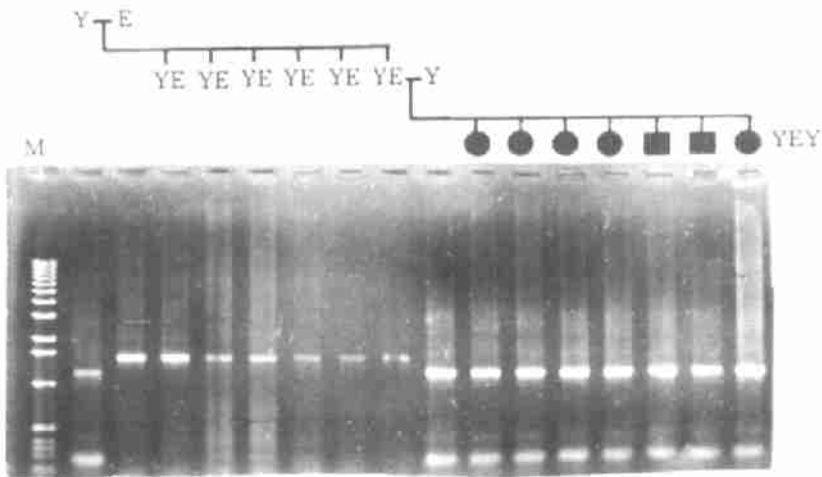


图 4 太湖猪、大约克猪正反交家系 mtDNA D-loop Acc I 的酶切图谱

3 讨论

①本实验试图通过 D-loop PCR-RFLP 揭示核外遗传物质在太湖猪高繁殖性能中的作

用。实验扩增的 mtDNA D-loop 经与已知序列进行大小比较和通过酶切并与 DNASIS 软件模拟的酶切图谱的比较都证实了扩增的正确性。

②通过 mtDNA D-loop RFLP 分析,发现长白猪、部分大约克猪存在一个 Acc I 酶切位点,而杜洛克及四个国内品种猪则未发现这一酶切位点。经大约克与二花脸正反交家系 PCR-RFLP 分析,这一酶切位点多态的遗传方式完全符合母系遗传特性。七个猪品种 Acc I 酶切位点的多态与太湖猪高每殖性能并无直接关系。由于实验猪品种数和实验猪头数的原因,尚不能确认该位点变异就只存在于长白猪和部分大约克猪品种上,其在起源上意义也有待深入研究。

③本实验结果与 Davoli 等的研究结果不一致,在 Hinc II 和 Hae III 酶切位点上没有发现多态性的存在。在实验中,当凝胶浓度较高时(一般大于 1.5%)可以观察到 D-loop 的分子长度变异和异质型多态(heteroplasmic polymorphism),这是由于 D-loop 内重复序列数目变异的结果,而不是酶切产生的多态。Davoli 等观察到的 Hinc II 和 Hae III 的多态主要是 D-loop 的分子长度变异和异质型多态。

④在本实验中, DNASIS 软件模拟的 mtDNA D-loop 酶切图谱完全与实验结果相一致, Acc I 酶切位点的多态也为计算机模拟所证实。由计算机模拟出的存在多态的内切酶尚有数种,均为极不常见的酶类,这些限制酶在猪 mtDNA D-loop 中的多态能否揭示出与经济性状的联系尚需进一步研究。

表 2 七个品种猪实验头数及 mtDNA D-loop Acc I 的酶切类型

品 种	头 数	限制类型
长白猪	12	B
杜洛克	12	A
大约克	8	A
	4	B
二花脸	12	A
北京黑	12	A
香猪	12	A
五指山猪	12	A

参 考 文 献

- 1 Wolstenholme D R. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *Int Rev Cytol*, 1992, 141: 173~216
- 2 Wallace D C. Mitochondrial disease: genotype versus phenotype. *TIG*, 1993, 9(4): 128~133
- 3 Wu Mingche. Ear characteristics of pigs affected by mitochondrial DNA polymorphism in maternal mode. *Proc 5th World Congress on Genetic App to Livestock Prod*, 1994, 21: 298~301
- 4 Ghivizzani S C et al. Transcribed heteroplasmic repaeted sequences in the porcine mitochondrial DNA D-loop region. *J Mol Evol*, 1993, 37: 36~47
- 5 MacKay S L D, Oliver P D, Laipis P J, Hauswirth W W. Template-directed arrest of mammalian mitochondrial DNA synthesis. *Mol Cell Biol*, 1986, 6: 1261~1267
- 6 Takeda K, Onishi A, Ishida N, Kawakami K, Komatsu M, Inumaru S. SSCP analysis of pig mitochondrial DNA D-Loop region polymorphism. *Animal genetics*, 1995, 26: 321~326
- 7 Davoli R, Costosi E, Costa N, Tagliavini J, Russo V. Hinc II and Hae III RFLPs in the porcine mtDNA D-Loop region. *Animal genetics*, 1995, 26: 201~213