猪线粒体 DNA D-loop PCR-RFLP 分析[®]

赵兴波②

李 宁

吴常信

(动物科技学院)

(生物技术国家重点实验室)

(动物科技学院)

摘 要 对太湖猪(二花脸)、大约克猪、北京黑猪、五指山猪、香猪、长白猪、杜洛克猪以及太湖猪与7个品种猪的正反交杂交家系线粒体 DNA D-loop PCR-RFLP分析,发现猪的线粒体 DNA D-loop约为1500bp,长白猪及部分大约克猪与其他猪品种在Acc I 酶切位点存在多态性;太湖猪、大约克猪的正反交后代的线粒体 DNA D-loop在Acc I 酶切位点存在多态性,其遗传方式遵循母系遗传特性。

关键词 猪; 线粒体 DNA; D-loop; PCR-RFLP; 线系遗传

中图分类号 Q311.7; S828.1

PCR-RFLP Analysis of Porcine Mitochondrial DNA D-loop

Zhao Xingbo

Li Ning

(College of Animal Science and Technology)

(the National Opened Laboratory of Agrobiotechnology)

Wu Changxin

(College of Animal Science and Technology)

Abstract Mitochondrial DNA D-Loops of Taihu (Erhualian), Large White, Beijing Black, Xiang Mini pig, Wuzhishan Mini pig, Landrace, Duroc were amplified and analyzed using 24 restriction endonucleases. The molecular size of porcine mitochondrial DNA D-loop amplified was about 1 500 bp, and the cleavage patterns of 24 restriction endonucleases, except Acc1 were identical among all pigs examined, the D-loop digested by Acc1 was polymorphic that had 150bp and 1 350 bp fragments in all Landrace and parts of Large White while other breeds' D-loop had no cleavage site. the restriction patterns of reciprocal cross of family line between Taihu and Large White showed maternal inheritance.

Key words pig; mitochondrial DNA; D-loop; PCR-RFLP; maternal inheritance

线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)是动物体内唯一发现的核外遗传物质,其分子为共价、闭合、环状结构,脊椎动物的 mtDNA 大小在 16.5 kb 左右。MtDNA 以其分子量小、进化速度快(为单拷贝核基因的 5~10 倍)、遗传上具有自主性及严格的线 遗传等特性而被广泛地用于分子进化、生物分类、人类疾病及家畜经济性状的研究[1~3]。D-loop 为mtDNA 分子的控制区,该区 A-T 碱基富集,为非编码区,约占线粒体基因组的 6%。猪的 D-loop 位于其 mtDNA 的 tRNA^{Pro}和 tRNA^{Phe}之间。已知 mtDNA 分子的重链复制起点和双链的启动子即重链启动子(Heavy Strand Promotor, HSP)和轻链启动子(Light Strand Promotor, LSP)均在 D-loop 内。猪 D-loop 有 5~29 个基元序列为 CGTGCGTACA 共 10 个碱基的串联重复序列(Tandem Repeated Seqence, TRS)位于第一保守序列区(Conserved Se-

收稿日期: 1996-11-11

①本研究为自然科学基金重点项目"太湖猪高繁殖性能的遗传基础研究"的一部分。

②赵兴波,北京圆明园西路2号中国农业大学(西校区),100094

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的藏基替换率比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-loop5'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 Dloop 序列为 1 234+10n 个碱基(n 为串联重复序

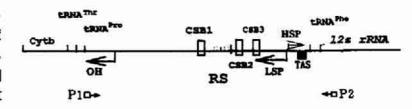


图 1 猪 mtDNA D-loop 基因布置

列数),也揭示了 D-loop 序列的精细结构和功能。 Takeda 等[*]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 II (两种类型)和 Hae II (四种类型)的多态。 本实验以位于 D-loop 两端的 tRNA ***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

猪抗凝血以常規法提取总 DNA(含 mtDNA)

1.3 PCR 反应

在 PE Gene Amp 2 400 热循环仪上进行, 50 μL 反应体积中, 引物为

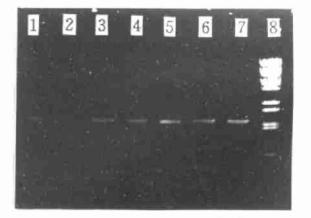


图 2 猪 mtDNA D-loop 的扩增 1~7 为扩增产物,8 为 \//BatE I marker

50 pmol,模板 DNA100 ng,1UTaq 酶,dNTP 浓度为 200 μmol·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

0

50 μL 灭菌双蒸水溶解 DNA。

1.5 扩增产物的酶切

取扩增产物 $5 \mu L$,加入 2U 的限制酶和 $1 \mu L$ 10 倍的酶切缓冲液,加灭菌水至 $10 \mu L$, 37 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。

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
Bg1 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

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

Xba I

1 500

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 mtD-NA D-loop 的酶切图谱

通过 Genebank 查询到 Takeda、Ghivizzani 和 MacKay 獨定的梅山、大约克、长白等猪 种的 D-loop 序列,通过 DNA-SIS 软件模拟各品种猪 D-loop 限制性内切酶酶切图谱,通过

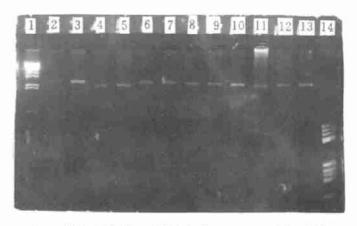


图 3 七个品种猪 mt DNA D-loop Acc I 酶切图谱
1 1 kb ladder marker; 2.3 五指由籍; 4.5 长白猪;
6.7 大约克猪; 8.9 二花脸猪; 10 北京黑猪; 11 香糖;
12.13 杜洛克猪; 14 PBR322/Hae I marker

与实验结果比较,发现本实验的 24 种限制性内切解的酶切图谱与 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。

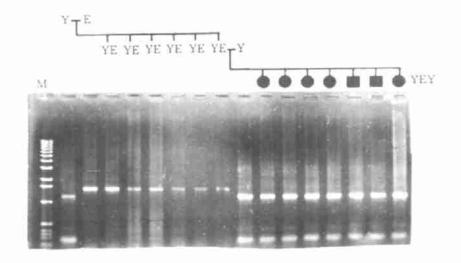


图 4 太湖猪、大约克猪正反交家系 mtDNA D-loop Acc 1 的酶切图谱

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。经大一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 I 和 Hae II 酶切位点上没有发现多态性的

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
Kı	白猪	12		В
杜泽	各克	12		Α
大	约克	8		Α
		4		В
=;	花脸	12		Α
北	京黑	12		Α
香	猪	12		Α
五指	山猪	12		Α.

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 I 和 Hae II 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。

参考文献

- 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
- 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 synthsis. 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 I and Hae I RFLPs in the porcine mtD-NA D-Loop region. Animal genetics, 1995,26:201~213