

## 湖羊蛋白酶遗传型结构及系统地位的研究

孙伟\*<sup>1</sup> 常洪<sup>1</sup> 杨章平<sup>1</sup> 耿荣庆<sup>1</sup> 倪大雄<sup>2</sup> 范宝生<sup>2</sup> Tsunoda K.<sup>3</sup>

(1 扬州大学 畜牧兽医学院, 扬州 225009;

2 浙江省湖州市 畜牧兽医总站, 湖州 313000;

3 Showa University, School of Medicine, 1-5-8 Hatanodai, Tokyo, Japan)

**摘要** 用“中心产区典型群随机抽样”的方法,对湖羊品种进行遗传检测,在所检测的12个位点中的11个(AIb, Tf, A1p, Lp, Ary-Es, Hb- $\beta$ X<sup>p</sup>, CA, Cat, Ly 和 Ke)具有多态性,仅Po位点为单态,多态座位比例为91.67%,在27个等位基因中,只有Po<sup>F</sup>、Tf<sup>A</sup>、Tf<sup>F</sup>、Hb- $\beta$ <sup>F</sup>、CA<sup>F</sup>和Ke<sup>L</sup>的估计可靠程度分别为0.522 2, 0.745 8, 0.522 2, 0.621 2, 0.899 0和0.907 0外,其余21个等位基因估计可靠程度均在0.954 5以上。说明“中心产区典型群随机抽样”在特定遗传背景下是一种有效的抽样方法。湖羊的平均杂合度比国内其他绵羊种群偏低,而与国外其他群体相比,平均纯合度偏低。引用国内外14个绵羊群体的相同资料,根据血液酶和其他蛋白质变异的10个基因座位共计33个等位基因的频率,进行系统聚类分析,表明湖羊与蒙古羊亲缘关系较近。

**关键词** 湖羊; 遗传型检测; 系统地位

中图分类号 S826.2

## Studies on Genotype Structure of Blood Protein and Enzyme and Phylogeny Status of Hu Sheep

Sun Wei<sup>1</sup> Chang Hong<sup>1</sup> Yang Zhangping<sup>1</sup> Geng Rongqing<sup>1</sup>

Ni Daxiong<sup>2</sup> Fan Baosheng<sup>2</sup> Tsunoda K.<sup>3</sup>

(1 Animal Science & Veterinary Medicine College, Yangzhou University, Yangzhou, 225009, China

2 Animal Science & Veterinary Medicine Bureau of Huzhou, Huzhou, 313000, China

3 Showa University, School of Medicine, 1-5-8 Hatanodai, Tokyo, Japan)

**Abstract** Hu sheep is an indigenous breed in Zhejiang province of China. Based on the “central area typical colonies random sampling method”, the genotypic structure of blood protein and enzyme in Hu sheep was investigated. Of 12 loci, polymorphism was found at 11 loci, only Po locus was monomorphic. The proportion of polymorphic loci was 91.67%. The total number of allele was 27. Of the 27 alleles, the gene frequency reliability of gene frequency estimates for Po<sup>F</sup>, Tf<sup>A</sup>, Tf<sup>F</sup>, Hb- $\beta$ <sup>F</sup>, CA<sup>F</sup> and Ke<sup>L</sup> was 0.522 2, 0.745 8, 0.522 2, 0.621 2, 0.899 0 and 0.907 0, respectively, the others reached beyond 0.954 5, which showed that “central area typical colonies random sampling method” is effective in the special genetic background. The average heterozygosity ( $H$ ) and average homozygosity ( $J$ ) were computed and the  $J$  of the sheep colonies in the countries around China in this study was found to be higher than that of Hu sheep. In order to understand the phylogeny status of Hu sheep, we collect the data of 14 sheep colonies distributed in the East and South of Central Asia and use the data of the 10 loci 33 alleles to cluster by Ward's method. The result indicates that Hu sheep cluster closely with the Mongolia sheep, which is conformed with the known history.

**Key words** Hu sheep; genotype estimation; phylogeny status

收稿日期: 2002-04-24

国家自然科学基金国际合作研究资助项目(30213009)

\* 孙伟, 硕士, 讲师, 研究方向为动物遗传资源评价、保护与利用。江苏省扬州市

湖羊主要分布在中国的太湖流域,即浙江省的湖州(原吴兴)、桐乡、嘉兴等市县和及江苏省的吴县、无锡、常熟等市县以及上海市的嘉定、青浦等市郊地区。产区海拔 7.2 m,年平均气温 16.2 ,年最低气温 - 9.6 ,年最高气温 38.5 ,年温差 48.1 ,年降水量 1 246 mm<sup>[1]</sup>。湖羊的特点为耐高温、高湿,是我国著名的多胎高产仔的绵羊品种,同时也是珍贵的羔皮用绵羊品种。

目前有许多关于我国周边国家的绵羊群体蛋白酶遗传型研究的报道,我国是绵羊群体遗传资源丰富的国家,但是研究较少,尤其关于湖羊的蛋白酶遗传型结构的研究报道及所涉位点较少<sup>[2,3]</sup>,亚洲绵羊群体,尤其是中亚以东南绵羊群体系统地位的研究尚未弄清楚。本研究目的是揭示湖羊部分蛋白酶的遗传结构及湖羊系统地位,为湖羊遗传资源的开发、利用和保护提供可借鉴的遗传资料,并为中亚以东南绵羊亲缘系统的研究补充重要环节。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

浙江省湖州市练市镇长港村和建新村(两村距离 100~ 500 m),用中心产区典型群随机抽样的方法,注意避免有可追溯亲缘关系的 2 个(及以上)个体一并进入样本。样本规模为 63 头。

### 1.2 方法

颈静脉采血 8 mL,装入有抗凝剂的离心管,离心(3 000 r·min<sup>-1</sup>, 5~ 10 min)分离血清,移入洁净小瓶,编号,加入与剩余血样等体积的 0.85% 生理盐水洗涤,离心(3 000 r·min<sup>-1</sup>, 5~ 10 min)2~ 3 次,最后加入 1~ 1.5 倍体积的蒸馏水制成溶血液,装入另一小瓶,编号。- 20 冰箱保存。在采血的同时记录体尺、毛色、角型、尾型等外部特征。

### 1.3 结构基因座检测

以淀粉凝胶检测血清白蛋白(A lb)、后白蛋白(Po)、转铁蛋白(Tf)、碱性磷酸酶(A lp)、亮氨酸氨肽酶(L ap)、芳香基酯酶(A ry-Es)、编码血红蛋白 β 链(Hb-β)、X-蛋白(X-p)、碳酸酐酶(CA)和过氧化氢酶(Cat);以干燥的醋酸纤维薄膜作为支持体检测赖氨酸(L y);使用美国 MED ICA 公司 Na/K/Cl 离子分析仪对红细胞中钾的含量进行测定,以 H iCN (氰化高铁血红蛋白)参考液作对比标准,并用分光光度计按 H iCN 文齐氏液测定法测定 Hb 值进行校正,共计 12 个蛋白酶多型座位,采用各国通用的判型标准判型<sup>[4,5]</sup>。

### 1.4 统计分析

1) 等位基因频率的计算采用平方根法和基因计数法<sup>[6]</sup>。

2) 根据各群体的样本结构与规模估计基因频率方差,按下式计算估计值不偏离实际值 0.5 倍的可靠性(β)以及可靠性达到 0.954 5 时的相对偏差(η)<sup>[9]</sup>

$$\beta = \frac{\lambda}{0} \frac{2e^{-\lambda^2}}{\sqrt{2\pi}} d\lambda \quad \eta = 2[V(p)]^{\frac{1}{2}} P^{-1} \quad (1)$$

式中: P、V(p) 分别为基因频率及其方差; λ 为估计值的标准偏差,适合于式(1)的标准偏差为 λ = 0.5 ÷ [V(p)]<sup>1/2</sup>。

3) 基因平均纯合度 J 和平均杂合度  $\overline{H}$  的计算

$$J = \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m \sum_{i=1}^k x_{ij}^2, \quad \overline{H} = 1 - J \quad (2)$$

式中:  $m$  为座位数;  $k$  为某一座位的等位基因数; 为  $x$  群体第  $j$  座位上第  $i$  个等位基因的频率。

4) 亲缘关系聚类采用 Ward 法。

### 1.5 相关资料的引用

在上述亲缘聚类中, 引用国外学者以相同试验方法获得的分布于中亚以东南的 9 个亚洲绵羊群体和 5 个日本的欧洲绵羊共计 14 个群体 10 个基因座的 33 个等位基因频率分布资料, 用作分析背景(由于原作者未检测蒙古羊的  $Po$  座位及饲养于日本的欧洲 Bor 绵羊的  $Ke$  位点, 为便于比较, 故仅用 10 个座位)。

## 2 结果与分析

### 2.1 湖羊等基因座位基因频率估计值及其精确度和可靠性

在所检测的 12 个座位中, 11 个座位为多型。其群体基因频率的样本估计值及其不偏离实际值 0.5 倍的可靠性以及可靠性达 0.9545 时的精确度(相对偏差)(表 1)。说明, 在湖羊 12 个基因座共计 27 个等位基因中除  $Po^F$ 、 $Tf^A$ 、 $Tf^F$ 、 $Hb-\beta^A$ 、 $CA^F$  和  $Ke^L$  基因频率估计值可靠性分别为 0.5222, 0.7458, 0.5222, 0.6212, 0.899 和 0.9070 外, 其余 21 个等位基因频率估计值不偏离实际值的可靠性均在 95% 以上。因此, 这些资料可用作亲缘关系分析。

表 1 各座位基因频率估计及其精确度及可靠性

座位	表型	$n$	等位基因	$P$	$V_p$	$\lambda$	$\beta$	$\eta$
A1	C	60	$AL^C$	1	0	0	1	0
$Po$	FS	58	$P_0^F$	0.0167	$1.368 \times 10^{-4}$	0.7137	0.5222	1.4012
	SS	2	$P_0^S$	0.9833	$1.368 \times 10^{-4}$	42.0210	1	0.0238
$Tf$	AB	5	$Tf^A$	0.0417	$3.330 \times 10^{-4}$	1.1425	0.7458	0.8750
	BC	7	$Tf^B$	0.15	$1.063 \times 10^{-3}$	2.3006	0.9786	0.4340
	CD	25	$Tf^C$	0.30	$1.750 \times 10^{-3}$	3.5858	1	0.2790
	BD	3	$Tf^D$	0.3417	$1.875 \times 10^{-3}$	3.9466	1	0.2530
	DE	11	$Tf^E$	0.15	$1.063 \times 10^{-3}$	2.3006	0.9786	0.4340
	EF	1	$Tf^F$	0.0166	$1.368 \times 10^{-4}$	0.7137	0.5222	1.4012
	CF	1						
	CE	3						
A1p	B(+)	38	$B^+$	0.3945	$1.990 \times 10^{-3}$	4.423	1	0.2261
	B(-)	22	$B^-$	0.6055	$1.990 \times 10^{-3}$	6.788	1	0.1473
Es	Es(+)	33	$Es^+$	0.3292	$1.840 \times 10^{-3}$	3.837	1	0.2606
	Es(-)	27	$Es^-$	0.6708	$1.840 \times 10^{-3}$	7.818	1	0.1279
Lap	A	41	$Lap^A$	0.4373	$2.050 \times 10^{-3}$	4.827	1	0.2072
	B	19	$Lap^B$	0.5627	$2.05 \times 10^{-3}$	6.211	1	0.1610
$Hb-\beta$	AB	3	A	0.0238	$1.84 \times 10^{-4}$	0.8763	0.6212	1.1412
	BB	60	B	0.9762	$1.84 \times 10^{-4}$	35.943	1	0.0278
x $\tau$ p	x(+)	28	X	0.2546	$1.506 \times 10^{-3}$	3.280	1	0.3049
	x(-)	35	X	0.7454	$1.506 \times 10^{-3}$	9.603	1	0.1041
CA	Fs	10	$CA^F$	0.0794	$5.801 \times 10^{-4}$	1.648	0.8990	0.6067
	SS	53	$CA^S$	0.9206	$5.801 \times 10^{-4}$	19.111	1	0.0523

续表

座位	表型	<i>n</i>	等位基因	<i>P</i>	<i>V<sub>p</sub></i>	$\lambda$	$\beta$	$\eta$
Cat	BB	16	Cat <sup>B</sup>	0.444 4	$1.960 \times 10^{-3}$	5.016	1	0.199 4
	BC	24	Cat <sup>C</sup>	0.555 6	$1.960 \times 10^{-3}$	6.27	1	0.159 5
	CC	23						
Ly	Ly(-)	58	Ly <sup>A</sup>	0.091 5	$1.606 \times 10^{-3}$	8.962	1	0.116 0
	Ly(+)	5	Ly <sup>a</sup>	0.908 5	$1.606 \times 10^{-3}$	3.515	1	0.284 5
Ke	LK	10	Ke <sup>L</sup>	0.082 8	$6.027 \times 10^{-4}$	1.685 7	0.907 0	0.593 2
	HK	53	Ke <sup>h</sup>	0.917 2	$6.027 \times 10^{-4}$	18.672 6	1	0.053 6

## 2.2 国内外 15 个绵羊群体聚类分析

引用国外资料<sup>[4-8,10]</sup>,对国内外 15 个绵羊群体用 10 个蛋白酶多型座位 33 个等位基因频率进行系统聚类。

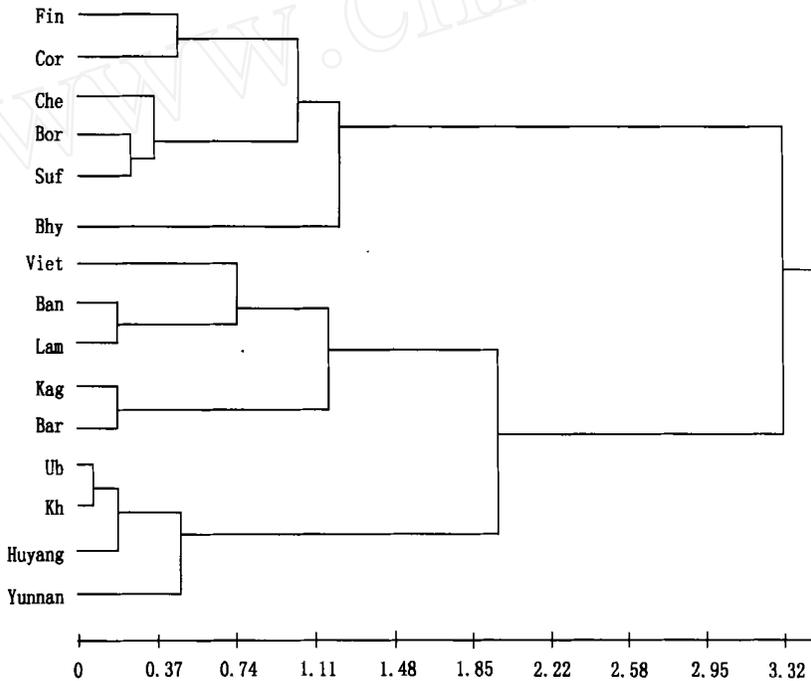


图 1 中亚以东南 15 个绵羊群体聚类图

由图 1 看出,首先蒙古国(Central Mongolia)Kh 地区的蒙古羊与 Ub 地区的蒙古羊聚为一类,紧接着湖羊与前两者聚为一类,这说明湖羊与蒙古羊亲缘关系较近。随后,这三者与云南绵羊聚为一类,与湖羊和云南绵羊的畜牧遗传背景基本一致:湖羊虽与蒙古羊地域分布相隔较远,但产区湖羊主要以本品种选育为主,未曾受到外来血统的影响,因而基本保持着原来的血统<sup>[1]</sup>;而云南绵羊地处藏滇地区,历史上有藏滇交界处绵羊基因交流的记载<sup>[12]</sup>,其遗传结构一定程度上受到基因交流的影响,与蒙古羊的关系较湖羊相对隔离,但是其主要的血统仍属蒙古羊系绵羊。

### 2.3 群体遗传变异程度

从 15 个绵羊群体的 10 个座位<sup>[4~8]</sup>(表 2) 计算得到的基因平均杂合度和平均纯合度可以看出在 15 个群体中, 湖羊的平均杂合度为 0.360 5, 平均纯合度为 0.639 5, 与国外其他群体相比基因的多样性相对丰富, 但与国内其他绵羊群体相比较时<sup>[13]</sup>, 湖羊的杂合度程度偏低, 这与湖羊中心产区严控外来血统、长期近交有密切关系。

表 2 15 个绵羊群体 10 个座位的多型座位基因平均杂合度与平均纯合度

群体名称	平均杂合度 ( $\bar{H}$ )	平均纯合度 ( $J$ )	群体名称	平均杂合度 ( $\bar{H}$ )	平均纯合度 ( $J$ )
Yunnan	0.230 2	0.769 8	U b	0.314 4	0.685 6
Hu sheep	0.360 5	0.639 5	V iet	0.239 3	0.760 7
Bar	0.123 8	0.876 2	Suf	0.255 8	0.744 2
Kag	0.208 6	0.791 4	Che	0.213 7	0.786 3
L an	0.225 2	0.774 8	Cor	0.171 7	0.828 3
Bhy	0.294 7	0.705 3	Fin	0.241 5	0.758 5
Ban	0.294 4	0.705 6	Bor	0.160 6	0.839 4
Kh	0.313 1	0.686 9			

### 2.4 抽样方法的探讨

1) 在对畜禽品种进行遗传检测时, 应该采取适宜的抽样方法, 以便提高样本的代表性, 得出比较正确的结论。

本研究采用的是“中心产区典型群随机抽样”。结果表明, 除了  $Po^F$ 、 $Tf^A$ 、 $Tf^F$ 、 $Hb-\beta^A$ 、 $CA^F$  和  $Ke^L$  6 个等位基因频率的可靠性较低分别为 52.22%, 74.58%, 52.22%, 62.12%, 89.90% 和 90.70% 外, 其余 21 个等位基因频率可靠性均在 95.45% 以上。可见“中心产区典型群随机抽样”是一种有效的抽样方法, 是对既有的遗传检测的抽样方法<sup>[14]</sup>的补充。

2) 在对样本抽样调查时, 除了考虑适当的样本规模, 也应考虑样本总体状况和检测目的及经费。在本研究中, 由于浙江湖州(原吴兴县)为湖羊中心产区且未受到任何外来血统的影响, 基本可以代表湖羊品种的遗传结构, 所以本试验采取“中心产区典型群随机抽样”方法。

## 3 结 论

- 1) 本研究从实验的角度证实我国湖羊与蒙古羊亲缘关系较近。
- 2) 与国内其他绵羊群体相比, 湖羊平均杂合度偏低; 而与国外其他绵羊群体相比, 平均纯合度偏低。应该进一步加强湖羊品种选育, 但应避免极端近亲交配。
- 3) 中心产区典型群随机抽样是在特定遗传背景下一种有效的抽样方式。

浙江省湖州市炼市镇畜牧兽医站工作人员及长港村、建新村广大农户在本试验采样过程中给予大力支持, 谨致谢意。

## 参 考 文 献

- 1 郑丕留. 中国家畜品种及其生态特征. 北京: 农业出版社, 1980. 96~100
- 2 程瑞禾, 张有川, 蔡恬一, 等. 血红蛋白多态性作为湖羊品种遗传结构标记的探讨. 中国养羊, 1992, (1):

18~ 19

- 3 程瑞禾,沈瑜,陈明朗 湖羊、苏联美利奴羊血红蛋白型及钾型的研究 畜牧与兽医,1991,(4): 147~ 149
- 4 Tsunoda K, Amano T, Nozawa K, et al Morphological characters and blood protein polymorphism of sheep in bangladesh and genetic relationship with European sheep breeds Rep Soc Res Native Livestock, 1988, 12: 161~ 185
- 5 Tsunoda K, Doge K, Yamamoto Y, et al Morphological traits and blood protein variation of the native nepalese sheep. Rep Soc Native Livestock 1992, 14: 155~ 183
- 6 Tsurunoda K, Amano T, Nozawa K, et al Genetic characteristics of Bangladeshi sheep as based on biochemical variations Jpn J Zootech Sci, 1990, 61(1): 54~ 66
- 7 Tsunoda K, Nozawa K, Okamoto S, et al Blood protein variation of native sheep populations in Lufeng and Lunan in Yunnan province of China Rep Soc Res Native Livestock, 1995, 15: 119~ 129
- 8 Tsunoda K, Nozawa K, Madeda Y, et al, External morphological characters and blood protein and Non-Protein polymorphisom of native sheep in Central Mongolia Rep Soc Res Native Livestock, 1999, 17: 63~ 82
- 9 常洪 家畜遗传资源学纲要 北京: 农业出版社, 1995 99~ 109
- 10 Tsunoda K, Okabayashi H, Amano T. et al Morphologic and genetic characteristics of sheep raised by the Cham Tribe in Vietnam. Rep Soc Res Native Livestock, 1998, 16: 63~ 73
- 11 中国家畜家禽品种志编委会, 中国羊品种志编写组 中国羊品种志 上海: 上海科学出版社, 1989 6~ 14
- 12 云南省畜牧局, 云南省家畜家禽品种志编写委员会 云南省家畜家禽品种志 昆明: 云南科学出版社, 1987. 123~ 127
- 13 马海明 兰州大尾羊血液蛋白的遗传多样性的研究: [学位论文] 兰州: 甘肃农业大学, 1998
- 14 常洪, 耿社民, 武彬, 等, 中国黄牛品种基因频率抽样效率的研究 西北农业大学学报, 1989, 17(3): 30~ 37

## 简讯

### 我国第一头克隆黄牛诞生

科技部生物工程开发中心和中国农业大学联合召开新闻发布会公布, 中国农业大学成功地应用体细胞克隆技术克隆了我国第一头地方优质黄牛——红系冀南牛(取名“波娃”), 于2002年4月27日降生。经公安部物证鉴定中心进行DNA鉴定, 表明“波娃”与供体细胞的遗传物质完全相同。此项目在克隆胚胎妊娠率、细胞的融合、卵裂率等达到了国际前沿水平。

### “淡水养殖综合配套技术的推广应用”课题通过成果鉴定

由我校傅泽田教授主持的“淡水养殖综合配套技术的推广应用”通过成果鉴定。该项目将信息技术与工程技术相结合, 为生产提供了一种快捷、方便、直接的技术平台, 应用前景广、推广价值大。该研究成果居国内同类领域领先水平, 其中的水产养殖信息技术应用系统居国际先进水平。