

用 RFLP 和 PCR-RFLP 技术研究 东北虎和华南虎线粒体 DNA 多态性*

吴平 周开亚 王亚明¹⁾

(南京师范大学生物系, 南京 210097)

黄恭情²⁾

(苏州市动物园, 苏州 215001)

徐麟木³⁾

(南京玄武湖动物园, 南京 210009)

摘要 采用 mtDNA RFLP 和 PCR-RFLP 技术研究了东北虎和华南虎的 mtDNA 的多态性。在 mtDNA RFLP 研究中, 分离纯化了东北虎和华南虎肝、肾和心脏组织的 mtDNA, 用 20 种识别 6 碱基对的限制性内切酶消化, 结果只有 1 种限制性内切酶 (*Xba*) 检测到多态性片段, 其余 19 种限制性内切酶消化产生的限制性格局在东北虎和华南虎完全一致。在 PCR-RFLP 研究中, 用 PCR 技术分别扩增了东北虎和华南虎 mtDNA 的控制区 (control region), 用 8 种识别 4 碱基对的限制性内切酶分别对扩增产物进行消化, 结果只有 1 种限制性内切酶 (*Rsa*) 检测到多态性片段。mtDNA RFLP 及 PCR-RFLP 的结果均提示东北虎和华南虎之间的遗传距离极小。这可能与下列因素有关: 两者分布区间无天然隔离屏障; 具有强扩散能力; 近几百年才被相互隔离。

关键词 东北虎, 华南虎, 线粒体 DNA 多态性

Mitochondrial DNA polymorphism between Siberian tiger and South China tiger revealed by mtDNA RFLP and PCR-RFLP/ Wu Ping, Zhou Kaiya, Wang Yaming, Huang Gongqing, Xu Linmu // CHINESE BIODIVERSITY. —1997, 5 (3): 173~178

MtDNA RFLP and PCR-RFLP techniques were used to reveal polymorphism between Siberian tiger (*Panthera tigris altaica*) and South China tiger (*Panthera tigris amoyensis*). In mtDNA RFLP study, mitochondrial DNA was extracted from liver, kidney and heart tissues of Siberian tiger and South China tiger and purified. Restriction endonuclease fragment patterns of mtDNA were digested with 20 enzymes recognized 6-bp. Only 1 (*Xba*) out of 20 restriction enzymes revealed polymorphic fragments. The restriction pattern generated by 19 of the enzymes in Siberian tiger were identical with that in South China tiger. In PCR-RFLP study, D-loop was amplified and 8 endonucleases recognized 4-bp were used to digest PCR product, 1 out of 8 endonucleases (*Rsa*) revealed polymorphic fragments. Genetic distance between Siberian tiger and South China tiger calculated based on the two results was very small. This is probably due to the following factors: there was no natural barrier between the two subspecies; they have strong dispersal ability and were separated only within several hundred years.

Key words Siberian tiger, South China tiger, mtDNA polymorphism

Author's address 1) Department of Biology, Nanjing Normal University, Nanjing 210097

2) Suzhou Zoo, Suzhou 215001

3) Xuanwuhu Zoo, Nanjing 210009

1 前言

虎 (*Panthera tigris*) 仅产于亚洲, 一般认为有 8 个亚种^[1]。由于生境的破坏和人类的捕杀, 现仅存 5 个亚种^[2]。东北虎 (*Panthera tigris altaica* Temminck)、华南虎 (*Panthera tigris amoyensis* Hilzheimer) 分别分布于我国东北和华南地区, 后者为我国特有。近年来在形态学^[3]、染色体分带核型^[4]等方面已积累了一些资料。迄今未见有关其线粒体 DNA 多态性的报道。

线粒体 DNA (mtDNA) 具有快速进化、缺少重组以及严格的母系遗传等特点, 是研究种内变异的有效的遗传标记^[5,6]。mtDNA 的控制区 (control region) 又称为 D 环 (D-loop), 这个区域的突变速率估计比 mtDNA 的其它部分快 5 倍^[7], 因而这个区域在研究种内遗传变异时特别有用^[8]。

本文用识别 6 碱基对和识别 4 碱基对的限制性内切酶分别对 mtDNA 和 PCR 扩增的 mtDNA 的控制区进行限制性长度的比较, 试图通过这两种方法来研究东北虎和华南虎 mtDNA 的多态性。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 动物来源 东北虎成年个体 1 只, 取自南京玄武湖动物园; 死胎 2 只, 取自苏州动物园。华南虎死胎 1 只, 幼年个体 1 只, 取自苏州动物园。取肝、肾和心脏组织置液氮中备用。

2.1.2 试剂 *Hpa*、*Sac*、*Dde*、*Hha*、*Mbo*、*Msp*、*Rsa* 等限制性内切酶、琼脂糖、蛋白酶 K、dNTPs、Taq DNA 聚合酶及 WizardTM PCR Preps DNA 纯化试剂盒购自 Promega 公司, 其余限制性内切酶购自上海华美生物工程公司; SDS 购自 Serva 公司; 其余试剂均为分析纯。

PCR 扩增所用引物分别为: 5' - GAATTCCTCCCGGTCTTGTAACACC - 3', 5' - TCTCGAGATTTTCA GTGTCTTGCTTT - 3'^[9], 在南京大学生物化学系合成。

2.2 方法

2.2.1 mtDNA RFLP

(1) mtDNA 的分离纯化 用肝、肾和心脏 3 种组织各 5 g, 参照赵邦悌等^[10]、秦树臻等^[11]的方法进行, 详见吴平等^[12]。

(2) 限制性内切酶消化 限制性内切酶消化使用生产厂家提供的缓冲液和推荐的方法。消化反应体积为 30 μ l, 37 $^{\circ}$ C 消化 2 h。

(3) 琼脂糖凝胶电泳 采用 0.8% 琼脂糖凝胶, TBE 电极缓冲液, 电压为 4 V/cm。电泳 8~12 h。溴化乙锭染色, 紫外透射仪观察, 拍照。

(4) 电泳结果分析 利用电泳距离与分子量的对数成反比的关系, 根据 DNA/*EcoR* / *Hind* 各片段的电泳距离绘制标准曲线。测量各消化片段的电泳距离, 根据标准曲线, 计算各片段的分子量。

(5) 遗传距离的计算 根据 Nei 和 Li^[13]的方法计算两亚种间的遗传距离。公式如下:

$$F = 2N_{xy} / (N_x + N_y) \quad (1)$$

$$P = 1 - \{ [(F^2 + 8F)^{\frac{1}{2}} - F] / 2 \}^{\frac{1}{6}} \quad (2)$$

其中 N_x 和 N_y 分别为两亚种的限制性片段数, N_{xy} 为两者共享的限制性片段数。根据(1)

计算两亚种的限制性片段共享度 (F), 代入 (2) 计算它们之间的遗传距离 (P)。

2.2.2 PCR-RFLP

(1) PCR 反应 PCR 反应在 100 μ l 反应液中进行, 含 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 50 mmol/L KCl, 0.1% Triton X-100, 1.5 mmol/L MgCl₂, 100 μ mol/L 的 4 种 dNTP, 2 条引物各 5 pmol, 2U Taq DNA 聚合酶和约 300 ng 的模板 DNA。扩增在 GeneAmp PCR System 2400 (PE 公司) 上进行, 循环参数为 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 60 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 120 s, 循环次数为 30 次。

(2) PCR 产物的检测 同 mtDNA RFLP 的检测方法。

(3) 扩增产物的纯化 扩增产物按照 WizardTM PCR Preps DNA 纯化试剂盒 (Promega) 说明书进行纯化。

(4) 限制性内切酶消化 限制性内切酶消化使用生产厂家提供的缓冲液和推荐的方法。消化反应体积为 10 μ l, 含纯化后的扩增产物 5 μ l, 37 $^{\circ}$ C 消化 2 h, 其中 Taq 用 67 $^{\circ}$ C 消化 2 h。

(5) 聚丙烯酰胺凝胶电泳 将消化产物点样于 5% 聚丙烯酰胺凝胶, 电泳 3~4 h, EB 染色, 紫外透射仪观察, 拍照。

(6) 电泳结果分析 利用电泳距离与分子量的对数成反比的关系, 根据 PBR322/ Hae 和

DNA/ EcoR / Hind 各片段的电泳距离绘制标准曲线, 测量各消化片段的电泳距离, 根据标准曲线, 计算各片段的分子量。

(7) 遗传距离的计算 与 mtDNA RFLP 结果的遗传距离计算相同, 但公式 (2) 修改如下:

$$P = 1 - \{ [(F^2 + 8F)^{\frac{1}{2}} - F] / 2 \}^{\frac{1}{4}}$$

3 结果

3.1 mtDNA RFLP

Sal 和 Pvu 不能消化东北虎和华南虎的 mtDNA, EcoR、Pst、Mlu、EcoR、Kpn、Hind、Pvu、Xba、Hpa、BamH、Sac、Bgl、Nsi、Cla、Sph、Sca、Stu 和 Sac 等 18 种限制性内切酶将东北虎和华南虎 mtDNA 消化成 1~9 片段。其中 Xba 将东北虎 mtDNA 消化为 3 个片段 (13.2、1.8、1.6), 而将华南虎的 mtDNA 消化为 4 个片段 (11.3、1.9、1.8、1.6) (图 1), 其余 17 种限制性内切酶在东北虎和华南虎之

间未检测出多态性。共检出东北虎 mtDNA 限制性片段 62 个, 华南虎 mtDNA 限制性片段 63 个, 其中 61 个为两者共享。东北虎的 3 个体间和华南虎的 2 个体间未检出个体差异, 在肝、肾、心脏等不同组织间也未检出差异。经计算两亚种 mtDNA 的分子量均为 16.6 kb, 检出点的核苷酸总长度占 mtDNA 整个分子的 2.27%。各片段的大小见表 1。

根据 Nei 和 Li 的公式计算, 东北虎和华南虎间的片段共享度为 0.976, 其遗传距离为

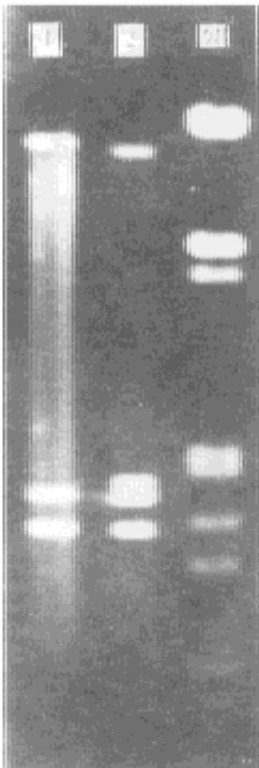


图 1 东北虎、华南虎 mtDNA 经 Xba 消化后的电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis pattern of mtDNA in Siberian tiger (*Panthera tigris altaica*) and South China tiger (*P. t. amoyensis*) digested with Xba
1: 东北虎; 2: 华南虎; M: DNA 分子量标记 (DNA/ EcoR / Hind)
1: Siberian tiger;
2: South China tiger;
M: DNA Marker (EcoR、Hind digested - DNA)

0. 00135。

表 1 东北虎和华南虎 mtDNA 限制性片段大小

Table 1 Restriction fragment sizes of mtDNA in Siberian tiger and South China tiger

酶 Enzyme	片段大小 (kb) Fragment sizes
	东北虎 (<i>P. t. altaica</i>)
	华南虎 (<i>P. t. amoyensis</i>)
<i>Bam</i> H	5. 4, 5. 3, 5. 1, 0. 5, 0. 3
<i>Bgl</i>	13. 0, 3. 1, 0. 5
<i>Cla</i>	12. 1, 4. 5
<i>Eco</i> R	11. 4, 3. 8, 1. 4
<i>Eco</i> R	16. 6
<i>Hind</i>	7. 3, 5. 0, 3. 1, 1. 2
<i>Hpa</i>	5. 4, 3. 2, 2. 7, 2. 3, 1. 8, 1. 2
<i>Kpn</i>	16. 6
<i>Mlu</i>	9. 3, 7. 3
<i>Nsi</i>	6. 5, 4. 6, 3. 7, 1. 8,
<i>Pst</i>	16. 2, 0. 4
<i>Pvu</i>	11. 5, 4. 6, 0. 5
<i>Sac</i>	10. 1, 4. 5, 2. 0
<i>Sac</i>	15. 0, 1. 6
<i>Sca</i>	6. 2, 5. 2, 3. 2, 2. 0
<i>Sph</i>	8. 2, 3. 7, 2. 5, 2. 0, 1. 8, 1. 4, 1. 1,
<i>Stu</i>	8. 2, 3. 7, 2. 5, 2. 0, 1. 8, 1. 4, 1. 1,
<i>Xba</i>	13. 0, 0. 5, 8. 1, 6

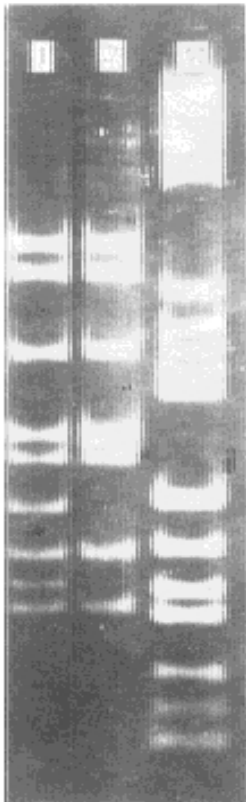


图 2 东北虎和华南虎 PCR 扩增产物经 *Rsa* 消化后的电泳图

Fig. 2 Electrophoresis pattern of PCR products in Siberian tiger (*Panthera tigris altaica*) and South China tiger (*P. t. amoyensis*) digested with *Rsa*

1: 东北虎; 2: 华南虎; M: DNA 分子量标记 (PBR322/*Hae*)
1: Siberian tiger;
2: South China tiger DNA;
M: DNA marker (*Hae* digested PBR322)

3.2 PCR-RFLP

从所有个体的 DNA 提取液均能扩增到 1.5 kb 的产物。用 *Dde*、*Hae*、*Hha*、*Mbo*、*Msp*、*Rsa*、*Taq* 和 *Hinf* 等 8 种识别 4 碱基对的限制性内切酶分别消化扩增产物, 只有 *Rsa* 1 种限制性内切酶检测到多态性片段 (图 2)。 *Rsa* 分别将东北虎和华南虎 PCR 的扩增产物消化为 9 个和 7 个片段。在东北虎 3 个体间和华南虎 2 个体间未检出多态性。经过 3 次重复扩增与消化实验, 结果稳定 (表 2)。

共检测到限制性片段 30 个, 其中 28 个为东北虎和华南虎共有。根据 Nei 和 Li 的公式计算片段共享度为 0.9655, 遗传距离为 0.00293。

4 讨论

东北虎和华南虎在体形大小、毛色深浅、条纹疏密等外形特征上有明显差异^[3]。张锡然等^[4]比较了东北虎和华南虎的分带核型, 两者的二倍体数相同, G 带特征、C 带特征、Ag-NORs 均无明显差异。本文首次报道在 DNA 水平上检测到的

这两个亚种之间的差异。

Nei^[14] 认为地理种群之间的遗传距离在 0.00~0.05, 亚种间的遗传距离约为 0.05 或更

表 2 东北虎和华南虎 PCR-RFLP 限制性片段大小

Table 2 Restriction fragment sizes of PCR products in Siberian tiger and South China tiger

酶	Enzyme	片段大小 (kb)		Fragment sizes	
		东北虎 (<i>P. t. altaica</i>)		华南虎 (<i>P. t. amoyensis</i>)	
<i>DdeI</i>		0.80, 0.55, 0.20		0.80, 0.55, 0.20	
<i>Hae</i>		0.82, 0.53, 0.20		0.82, 0.53, 0.20	
<i>Hha</i>		0.95, 0.60		0.95, 0.60	
<i>Hinf</i>		0.85, 0.70		0.85, 0.70	
<i>Mbo</i>		0.70, 0.55, 0.20, 0.10		0.70, 0.55, 0.20, 0.10	
<i>Msp</i>		0.95, 0.32, 0.28		0.95, 0.32, 0.28	
<i>Rsa</i>		0.37, 0.29, 0.21, 0.16, 0.14, 0.12, 0.10, 0.09, 0.085		0.37, 0.29, 0.21, 0.16, 0.14, 0.10, 0.085	
<i>Taq</i>		0.75, 0.58, 0.14, 0.08		0.75, 0.58, 0.14, 0.08	

大。然而有许多例外, 在有些情况下, 亚种间的遗传距离可能与地理种群间的遗传距离一样的小。由于亚种分类可能受到人为因素的影响, 在分类学实践中亚种形态分化的标准以约 75% 的个体呈现不同为界限; 另一方面, 形态学变化和分子歧异之间既存在相关性, 又存在独立性^[15,16], 在分子水平研究亚种的亲缘关系时, 得到的遗传距离可能会大于或小于 Nei 估算的亚种间的遗传距离。例如: Sage^[17]应用同工酶技术研究了小家鼠 (*Mus musculus*) 的几个亚种, 发现它们之间的遗传距离为 0.2, 因此他认为应把那些亚种提升为种; Ferris 等^[18]用 mtDNA RFLP 技术对它们进行研究的结果支持这一观点。

过去对于 mtDNA 多态性的研究多集中于小型脊椎动物和无脊椎动物, 这些动物大多数扩散能力较弱。80 年代中期以来, 对于一些具有较强扩散能力的动物如红尾黑鹇 (*Agelaius phoeniceus*)^[19]和维基尼亚鹿 (*Odocoileus virginianus*)^[20]的研究表明它们种群间 mtDNA 差异程度较小, 最大的分别为 0.008 和 0.016。Ashley 等^[21]对黑犀牛 (*Diceros bicornis*) 两亚种的研究也证实了这一点, 两亚种之间的遗传距离仅为 0.0029。

根据我们的 mtDNA RFLP 的结果, 东北虎和华南虎的遗传距离只有 0.00135, 这在已研究的哺乳动物亚种中是非常小的, 甚至比其它一些脊椎动物地方种群间的还小。即使是用进化速率较快的 D 环计算, 两者间的遗传距离也仅为 0.00293。这一结果提示, 虽然形态学研究把它们归为不同的亚种, 但它们在遗传上的差异极小。如果哺乳动物 mtDNA 的碱基突变率如 Brown^[22]建议的为每百万年 2%, 东北虎和华南虎的分歧大约发生在 7 万年前。

东北虎和华南虎之间的遗传距离近可能与下列因素有关: 第一, 两者的分布区间无天然隔离屏障; 第二, 虎具有强扩散能力; 第三, 人类活动将它们相互隔离只是近数百年的事, 根据上面引述的碱基突变率, 在数百年内发生的 mtDNA 变异是微不足道的。

华南虎和中国东北虎的野生种群已濒临灭绝。本文研究的华南虎都是 1974 年上海动物园饲养的华南虎的后代^[23], 20 余年中各代均为近亲繁殖, 未与其它亚种发生过基因交流; 而东北虎也是动物园繁殖的后代。虽然本文研究的样本较小, 不能完全代表两亚种的遗传性状, 但仍可在一定程度上反映两亚种的遗传差异。

本文 PCR-RFLP 的结果对华南虎保护工作也将有一定的帮助。在华南虎的保护工作中, 绝对不允许华南虎和东北虎的杂交后代进入繁殖计划, 所以对不能确定谱系来源的个体可以用本文的结果检出其母系来源是否是东北虎。由于 PCR 技术具有所需样品量小及快速简便的特点, 检测只需几微升血液甚至取一根毛发即可, 不需要损伤动物就可以快速、准确地完成鉴定工作。

参 考 文 献

- 1 Nowak R M, J L Paradiso. Walker's mammals of the world (Fourth edition). Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 1983, 1087~1089
- 2 Maguire L A, R C Lacy. Allocating scarce resources for conservation of endangered subspecies: partitioning zoo space for tigers. *Conservation Biology*, 1990, **4** (2): 157~166
- 3 高耀亭. 中国动物志兽纲第八卷食肉目. 北京: 科学出版社, 1987, 357~358
- 4 张锡然等. 东北虎和华南虎分带核型比较研究. 中国遗传学会动物遗传专业委员会编, 第三届全国动物遗传学术讨论会论文集, 南京: 1993, 65~66
- 2 Avise J C et al. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 1987, **18**: 489~522
- 6 Harrison R G. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Tree*, 1989, **4**: 6~11
- 7 Aquadro C F, B D Greenburg. Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequence from seven individuals. *Genetics*, 1982, **103**: 287~312
- 8 Woodruff D A. Noninvasive genotyping of primates. *Primates*, 1993, **34**: 333~346
- 9 Hoelzel A R, J M Hamcock, G A Dover. Evolution of the cetacean mitochondrial Dloop region. *Mol. Biol. Evol.*, 1991, **8** (3): 475~493
- 10 赵邦悌等. 北京鸭肝脏线粒体 DNA 的限制酶图谱. 中国科学 (B 辑), 1983, **3**: 13~22
- 11 秦树臻等. 福建黄兔线粒体 DNA 的限制性内切酶分析. 中国养兔杂志, 1993, (5): 5~6
- 12 吴平, 周开亚, 秦树臻. 二花脸猪与华北野猪线粒体 DNA 限制性位点图的比较研究. 见: 杨茂成, 谢庄等主编, 中国动物遗传育种研究, 北京: 中国农业科技出版社, 1995, 86~90
- 13 Nei M, W H Li. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1979, **76** (10): 5269~5273
- 14 Nei M. Molecular evolutionary genetics. New York: Columbia University Press, 1987, 1~511
- 15 Wilson A C, V M Sarich, L R Maxson. The importance of gene rearrangement in evolution: evidence from studies of rates of chromosomal, protein, and anatomical evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1974, **71**: 3028~3030
- 16 Wilson A C, S S Carlson, T J White. Biochemical evolution. *Annu. Rev. Biochem.*, 1977, **46**: 473~639
- 17 Sage R D. Wild mice. In: Foster H L, J D Small, J G Fox (eds.), *The Mouse in Biomedical Research*. 1981, **1**: 39~90
- 18 Ferris S D et al. Mitochondrial DNA evolution in mice. *Genetics*, 1983, **105**: 681~721
- 19 Ball R M et al. Phylogeographic population structure of Red-winged Blackbirds assessed by mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, **85**: 1558~1562
- 20 Carr S M et al. Mitochondrial DNA analysis of hybridization between sympatric white-tailed deer and mule deer in west Texas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, **83**: 9576~9580
- 21 Ashley M V, D J Melnick, D Western. Conservation genetics of the black rhinoceros (*Diceros bicornis*). Evidence from the mitochondrial DNA from three populations. *Conservation Biology*, 1990, **4** (1): 71~77
- 22 Brown W M. Evolution of animal mitochondrial DNA. In: Nei M, R K Koehml (eds.), *Evolution of Genes and Proteins*. New York: Sinauer Association Inc. Press, 1983, 62~88
- 23 刘舰, 李映红, 沈庆永. 中国华南虎人工繁殖工作分析. 见: 中国兽类生物学研究, 北京: 中国林业出版社, 1995