

云南地方猪种血液蛋白多态性研究^①

胡文平 连林生

(云南农业大学动物科技学院, 昆明 650201)

宿兵 聂龙 张亚平

(中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放实验室, 昆明 650223)

摘要 采用蛋白电泳技术研究了云南地方猪种血液蛋白多态性。共分析了3个云南地方猪种32~36个遗传位点,其中AKP、CAT、DIA、ES、G6PD、PA、6PGD、PHI、TF等9个位点检测到多态性,多态位点百分比为0.1875~0.2121,平均杂合度为0.0712~0.1027。结果表明,云南地方猪种血液蛋白多态程度较高,反映在蛋白水平上的遗传多样性较为丰富。

关键词 云南地方猪种, 血液蛋白电泳, 平均杂合度

Study on Blood Protein Polymorphism in Yunnan Local Pig Breeds

Hu Wenping Lian Linsheng

(Faculty of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201)

Su Bing Nie Long Zhang Yaping

(Laboratory of Cellular and Molecular Evolution, Kunming Institute of Zoology,

The Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223)

Abstract In this paper, protein electrophoresis was used to analyze the blood protein polymorphism in Yunnan local pig breeds and 32~36 genetic loci in the Yunnan local pig breeds were surveyed. Nine of them, such as AKP, CAT, DIA, ES, G6PD, PA, 6PGD, PHI and TF, were found to be polymorphic, the mean heterozygosity(H) was 0.0712~0.1027. The results indicated that the blood protein polymorphism in the Yunnan local pig breeds is high, the Yunnan local pig breeds are wealthy in genetic diversity in point of their protein level.

Key words The Yunnan local pig breeds, Blood protein electrophoresis, Mean heterozygosity

云南由于独特的地理位置和复杂多样的气候与地形地貌,再加上交通闭塞、地理隔离以及众多少数民族特有经济、文化活动等原因,保留了许多独特的家畜地方品种及类型,是世界上至今保存最好的和具有特殊优良性状的猪种“基因库”地区。多年来有关云南地方猪种的研究集中于体形外貌,生产性能以及这些品种的选育、杂交利用上,对于其群体的遗传结构和遗传特征则知之甚少。聂龙等^[5]曾对西南地区6个猪种共20个个体进行过蛋白多态性研究,其中所包含的滇南小耳猪样本数很小。本文对云南3个地方猪种进行血液蛋白多态性分析,以期从蛋白多态角度揭示其遗传多样性现状,为家猪的起源、分化以及选育、杂交利用研究提供遗传基础资料。

^①云南省应用基础研究重大项目基金资助的课题。在采血过程中,得到楚雄州种猪场章崇友、曲靖地区富源县大河种猪场李祥、吴正德、西双版纳州种猪场胡建伟等同志的大力协助,在此一并致谢。

1 材 料 与 方 法

1.1 试验材料

在云南省楚雄州种猪场采集了 27 头撒坝猪(♂ 18 头, ♀ 9 头)的血液样品, 在云南省曲靖地区富源县大河种猪场采集了 32 头大河猪(♂ 12 头, ♀ 20 头)的血液样品, 在云南省西双版纳州种猪场采集了 40 头滇南小耳猪(♂ 22 头, ♀ 18 头)的血液样品。所采血的撒坝猪、大河猪、滇南小耳猪均为来源于原产地不同血统的纯种猪, 而且未受外来猪种血统的干扰。

每头猪耳静脉采血 5~10ml, 用肝素抗凝, 在室温下以 1 000r/min 离心 10 分钟, 吸取上层血浆部分, 下层血细胞部分以 5~10 倍体积生理盐水洗涤, 以 1 000r/min 离心 10 分钟, 弃去上层清液, 重复洗涤 1 次, 向离心得到的红细胞部分加入少量蒸馏水, 使红细胞破裂以制备红细胞溶血液。经上述处理后得到的血浆和红细胞溶血液样品由冰瓶运回实验室, 贮存于-20℃冰箱中备用。

1.2 血液蛋白电泳

试验采用常规水平淀粉胶蛋白电泳技术, 淀粉胶的浓度为 12%, 电泳缓冲系统如下:

I. Tris-Citrate (pH 7.0); II. Tris-Borate-EDTA (pH 8.0); III. Borate-NaOH (pH 8.0); IV. LiOH-Borate (pH 8.0); V. Citrate-Tris-LiOH-Borate (pH 8.0); VI. Tris-Borate-EDTA (pH 8.6); VII. Tris-Citrate (pH 8.0)。

蛋白质和同工酶的组织化学染色方法见前人的报道^[7,8,10], 所检测的血液蛋白质和同工酶 29~31 种, 共计 32~36 个遗传座位(表 1)。

1.3 数据处理

参照参考文献[3]等, 根据蛋白质相对迁移率进行定型, 依电泳移动速度快慢顺序依次被命名为某一位点的等位基因 A、B、C。根据血液蛋白电泳测得的等位基因频率, 计算每个位点的杂合度(h)及平均杂合度(H)

$$h = 1 - \sum q_i^2, H = \sum h / r$$

其中 q_i 为某一位点的第 i 个等位基因的频率, r 为所检测的位点数目, h 为每个位点的杂合度。

2 结 果 和 讨 论

2.1 血液蛋白多态位点基因频率

试验共检测了云南撒坝猪、大河猪、滇南小耳猪 29~31 种蛋白质和同工酶, 32~36 个遗传座位, 每个品种在 6~7 个座位上表现出多态性, 每个多态座位检测到 2~3 个等位基因, 根据表现型推断基因型, 计算出基因频率, 结果见表 2。碱性磷酸酶位点的基因频率以 AKP^B 最高, 这与唐海东^[4]所报道的我国 4 个猪种(八眉猪、黑河猪、内江猪、荣昌猪)的结果一致。血浆脂酶的基因频率以 ES^A 为高, TF 多态性受 3 个等位基因 TF^A 、 TF^B 和 TF^C 控制, 但 TF^C 基因频率非常低, 甚至为零。值得指出的是, G6PD 位点在撒坝猪表现出多态性, 在大河猪、滇南小耳猪中则为单态, 而且基因频率差异很大, 究其原因, 尚不清楚。

2.2 云南猪种群体的遗传多样性及起源

云南猪种蛋白多态座位的杂合度值见表 3。通常用以衡量群体蛋白多态性的指标包括: 多态座位百分比(P 值)、平均杂合度(H 值)等。各个品种的 P 值及 H 值如表 3 所示。

蛋白或酶技术作为遗传多样性及品种鉴定, 划分的研究手段之一, 近年来已在野生动物和家养动物中得到了广泛应用。根据 Nevo 等^[9]的统计数据, 在已研究过的哺乳动物类群中 H 值平均为 0.050, P 值为 0.222。本试验中猪的多态座位百分比(P 值)为 0.1875~0.2121, 平均杂合度为 0.0712~0.1027。相比之下, 云南猪种的血液蛋白

多态程度是比较高的,表明其蕴藏着多样的遗传基因。需要指出的是,Nevo 等的数据多来源于对野生动物群体的研究,而家畜的遗传多样性又如何呢?自七十年代以来,许多学者对数种家畜的蛋白多态性进行了广泛研究,他们的研究结果给出了相当水平的平均杂合度值,其中猪的杂合度值在 0.1 左右⁽⁵⁾。然而,在他们的研究中所分析的遗传座位数仅有 19~22 个,这使得平均杂合度值可能偏高,因为所分析遗传座位的多少在很大程度上影响 H 值同实际情况的近似程度。考虑到以上因素,可以认为云南地方猪种的蛋白多态程度较高,其遗传背景较为丰富。

表 1 云南地方猪种蛋白多态分析位点及缓冲系统

序号	英文缩写	中文名	标准名称	组织来源	缓冲系统
1	ADH	乙醇脱氢酶	EC1.1.1.1	红细胞溶血液	II
2	AK	腺苷激酶	EC2.7.4.3	红细胞溶血液	II
3	ALB	白蛋白		血浆	III
4	AKP	碱性磷酸酶	EC3.1.3.1	血浆	III
5	ALD	醛缩酶	EC4.1.2.13	红细胞溶血液	VII(1)
6	CAT	过氧化氢酶	EC1.11.1.6	红细胞溶血液	VI
7	CK	肌酸激酶	EC2.7.3.2	红细胞溶血液	I
8	CP	铜蓝蛋白		血浆	V
9	DIA	硫锌酰胺脱氢酶	EC1.6.4.3	红细胞溶血液	VI
10	ES-1	脂酶-1	EC3.1.1.1	红细胞溶血液	I
11	ES-2	脂酶-2	EC3.1.1.1	血浆	IV
12	ES-3	脂酶-3	EC3.1.1.1	血浆	IV
13	GLC	葡萄糖脱氢酶	EC1.1.1.47	红细胞溶血液	II
14	GLD	谷氨酸脱氢酶	EC1.4.1.2	红细胞溶血液	II
15	G6PD	葡萄糖-6-磷酸脱氢酶	EC1.1.1.49	红细胞溶血液	VII
16	GPI	磷酸葡萄糖异构酶	EC5.3.1.9	红细胞溶血液	VII
17	HAP	结合珠蛋白		血浆	III
18	HB- α	血红蛋白- α		红细胞溶血液	IV(2)
19	HB- β	血红蛋白- β		红细胞溶血液	III(2)
20	HBDH	β -丁酸脱氢酶	EC3.1.1.31	红细胞溶血液	I
21	HK	己糖激酶	EC2.7.1.1	红细胞溶血液	I
22	IDH	异柠檬酸脱氢酶	EC1.1.1.42	红细胞溶血液	I(2)
23	LAP	亮氨酸氨基肽酶	EC3.4.11.1	血浆	III
24	LDH-1	乳酸脱氢酶-1	EC1.1.1.27	红细胞溶血液	I
25	LDH-2	乳酸脱氢酶-2	EC1.1.1.27	红细胞溶血液	I
26	MDH	苹果酸脱氢酶	EC1.1.1.37	红细胞溶血液	I
27	ME	苹果酸酶	EC1.1.1.40	红细胞溶血液	I
28	PA	前白蛋白		血浆	III
29	P α	血浆巨球蛋白		血浆	III
30	PEP-A	肽酶-A	EC3.4.13.11	红细胞溶血液	I
31	PEP-B	肽酶-B	EC3.4.13.11	红细胞溶血液	I(2)
32	PGM	磷酸葡萄糖变位酶	EC2.7.5.1	红细胞溶血液	I
33	PHI	磷酸己糖异构酶	ECC5.3.1.9	红细胞溶血液	VII(1)
34	6PGD	6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶	EC1.1.1.43	红细胞溶血液	I(3)
35	SDH	山梨醇脱氢酶	EC1.1.1.14	红细胞溶血液	II
36	TF	转铁蛋白		血浆	III
37	TO	超氧化物歧化酶	EC1.15.1.1	红细胞溶血液	I
38	XDH	黄嘌呤脱氢酶	EC1.2.1.37	红细胞溶血液	II

注: (1) 仅在撒坝猪中检测了的位点; (2) 仅在大河猪中检测了的位点; (3) 仅在大河猪、滇南小耳猪中检测了的位点。

大河猪和撒坝猪是属于西南型猪乌金猪不同的地方类型,分布于乌蒙山区与金沙江畔,大河猪主产于云南省富源县,撒坝猪则产于滇中楚雄彝族自治州的绿劝、武定县一带。由于分布地区不同,乌金猪在不同产区有不同的地方名称,但均属同种异名^(1,2)。而滇南小耳猪分布于云南广大北亚热带和南亚热带地区,属华南型猪的优良地方品种。在本研究所分析的遗传座位中,各品种相同的位点数为 31 个。根据 Nei 等⁽⁶⁾的方法,由各个品种共有的

多态遗传座位 AKP、CAT、ES、PA、TF 的等位基因频率计算出大河猪与撒坝猪群体间的遗传距离 D 值为 0.0041, 而滇南小耳猪与撒坝猪、大河猪的遗传距离 D 值分别为 0.0067 和 0.0165。由此表明, 撒坝猪与大河猪在遗传上存在很近的血缘关系, 从血液蛋白多态性方面支持其具有共同起源的看法。而滇南小耳猪与撒坝猪、大河猪的距离则较远, 表明地理分布、地理隔离与遗传分化具有一定的相关性, 本研究结果与有关云南地方品种的划分^(1,2)相一致。

表 2 云南三个猪种多态位点基因频率

位 点	等位基因	撒坝猪	大河猪	滇南小耳猪
AKP	A	0.3077	0.1607	0.1250
	B	0.5770	0.4464	0.8250
	C	0.1153	0.3929	0.0500
CAT	A	0.3148	0.1136	0.6750
	B	0.6111	0.7273	0.3250
	C	0.0741	0.1591	0
DIA	A	1	0.8889	1
	B	0	0.1111	0
ES	A	0.7885	0.7414	0.9750
	B	0.2115	0.2586	0.0250
G6PD	A	0.5741	1	1
	B	0.4259	0	0
PA	A	0.5600	0.4500	0.5513
	B	0.4400	0.5500	0.4487
6PGD	A	—	0.3906	0.5500
	B	—	0.6094	0.4500
PHI	A	0.4630	—	—
	B	0.5370	—	—
TF	A	0.4615	0.3276	0.5128
	B	0.5385	0.6207	0.4872
	C	0	0.0517	0

表 3 蛋白多态座位的杂合度值(h)及平均杂合度(H)

品 种	个体数	AKP	CAT	DIA	ES	G6PD	PA	6PGD	PHI	TF	H
撒坝猪	27	0.5591	0.5220	0	0.3335	0.4890	0.4928	—	0.4973	0.4970	0.1027
大河猪	32	0.6205	0.4328	0.1975	0.3835	0	0.4950	0.4761	—	0.5047	0.0864
滇南小耳猪	40	0.3013	0.4388	0	0.0488	0	0.4947	0.4950	—	0.4997	0.0712

参 考 文 献

- 1 黄启昆等编著. 云南省家畜家禽品种志. 昆明: 云南科技出版社, 1988, 190~228
- 2 张仲葛等编写. 中国猪品种志. 上海: 上海科学技术出版社, 1986, 169~173
- 3 佐佐木清纲著(李世安译). 家畜的血液型及其应用. 上海: 上海科技出版社, 1982, 172~179
- 4 唐海东, 路兴中. 猪血清碱性磷酸酶(AKP)多态性的研究初报. 上海农学院学报, 1990, 8(3): 183~185
- 5 聂 龙, 施立明. 西南地区地方品种猪血液蛋白遗传多样性研究. 生物多样性, 1995, 3(1): 1~7
- 6 Nei M. Genetic distance between population. Amer. Nat., 1972, 106: 283~292
- 7 Pasture N, Pasture G, *et al.* Practical Isozyme Genetics. Haslsted Press, New York, 1990, 83~150
- 8 Farrand N. Biochemical and genetic studies on rabbit hemoglobin. Biochem. Genet., 1990, 28: 117~122
- 9 Nevo E. *et al.* In: Cook, L. M.(ed.), Genetic and ecological diversity. Champan and Hall, London, 1984, 105~109
- 10 Shaw C R, Prasad R. Starch gel electrophoresis of enzymes — a compilation of recipes. Biochem. Genet., 1970, 4: 297~320

1996-11-20 收稿, 1997-01-30 修回.