

几种鸟类 mt DNA 限制性酶切图谱的比较研究

孙允明* 吴鹤龄

(北京大学生物系)

摘 要

本文用 5 种限制性内切酶(Hind III, Bgl I, EcoR I, Pst I 和 BamH I) 初步建立了狮头鹅、白鹅、山鸡、火鸡和鹌鹑的肝脏线粒体 DNA 的内切酶图谱。结果表明白鹅和狮头鹅的 mtDNA 的酶切图谱极为相似。山鸡、火鸡和鹌鹑的 mtDNA 限制性内切酶图谱之间的差异是很大的, 以上事实说明驯化中的鹅类的不同品种间 mtDNA 差异不大。而鸡形目中的不同物种间的 mtDNA 是有很大差异性的。

关键词 鸡类 mtDNA, 鹅类 mtDNA, 限制性酶切图谱

动物线粒体 mtDNA 的遗传学和分子生物学的比较研究表明, 高等动物 mtDNA 的基因组在进化上是保守的, 几乎所有的动物 mtDNA 都编码相同的基因, 且排列一致^[1]。但其一级结构却存在大量分歧^[2], 这种分歧现象不仅存在于不同种的动物之间, 也存在于同种内的不同遗传种群之间^[3]。mtDNA 核苷酸序列的分歧程度能反映物种亲缘关系的远近, 这一特点已在种群遗传学和分类学上得到应用。对于鸟类, 有一些报道^[2, 1, 4], 但是数量很少。本文建立了几种鹅类和鸡类 mtDNA 限制性图谱, 并进行了比较研究。

材 料 与 方 法

一、实验动物

狮头鹅 2 只 (*Anser cygnoides domestica*) 和白鹅 5 只 (*Anser cygnoides domestica*) 为北京农业大学畜牧系和中国农业科学院北京畜牧研究所家禽育种室提供。鹅龄为一年半。

山鸡 5 只 (*Phasianus colchicus*) 购自北京西郊上庄农场, 鸡龄为 8 个月。

火鸡 2 只 (*Meleagris gallopavo*) 购自北京西郊西北旺农场, 鸡龄为 8 个月。

鹌鹑 20 只 (*Coturnix coturnix*) 购自北京西莲花池鸭场, 年龄为半年。

二、mtDNA 制备

鹅肝和鸡肝 mtDNA 制备方法基本上按照 Borst 等人^[6]和赵邦悌等人^[3]的方法。

三、限制性内切酶及其对 mtDNA 的酶解反应

EcoR I、Hind III、Pst I、BamH I 和 Bgl I 购自美国新英格兰 Biolabs 公司。内切酶

* 现在北京农业大学中心实验室任职。

** 本文于 1992 年 1 月 21 日收到。

反应体系均按生产者提供的产品说明书进行酶解。

单酶完全酶解, 反应体系总体积30微升, 含 mtDNA 1微克, 内切酶 4个单位, 37°C下保温 2小时。单酶部分酶解仅将保温时间缩短为20~40分钟, 其他反应条件同完全酶解。双酶酶解是将两种内切酶(各 5个单位)同时加入, 两种酶反应缓冲液比例为1:1, mtDNA 加量和反应时间等条件均同单酶完全酶解。酶解反应用40mM EDTA溶液, pH 8.0(含50%甘油, 适量溴酚蓝)终止。

四、mtDNA 酶切片段凝胶电泳分析

1. 琼脂糖凝胶电泳^[11]: 采用无桥水平板电泳装置。胶板为14×14×0.3厘米。胶浓度为0.7%。缓冲系统为 40mM Tris-HCl, 20 mM 乙酸钠, 1mM EDTA, pH 8.0, 恒压 5伏/厘米, 室温下(10~25°C)电泳 4~6小时。胶板电泳后用溴化乙锭溶液(5微克/毫升)染色30分钟, 清水冲洗干净, 置于多用电泳摄影仪下观察, 摄象记录。

2. 聚丙烯酰胺浓度梯度凝胶电泳^[12]: 垂直凝胶板, 大小为18×14×0.12厘米。胶浓度为2.5~12%, 凝胶另含一个10~20%蔗糖梯度。缓冲系统同样为40mM Tris-HCl 20mM 乙酸钠, 1mM EDTA, pH 8.0, 恒压 10伏/厘米, 4°C下电泳16小时以上。

3. 电泳测定酶切片段的分子量标准: 以 λ -DNA/Hind III 片段和 SPP1-DNA/EcoR I 完全酶解片段为分子量标准。

结 果

一、鹅类和鸡类 mtDNA 的限制性内切酶酶解结果

用琼脂糖凝胶电泳鉴定所纯化 mtDNA 样品表明 DNA 样品绝大部分为闭环 DNA, 仅含少量的开环和线形 DNA。这样的样品适于限制性内切酶分析, 构建限制性图谱。

用限制性内切酶 Hind III、Pst I、BamH I、EcoR I 和 Bgl I 分别对狮头鹅 mtDNA 和山鸡 mtDNA 进行完全酶解, 酶解产物用琼脂糖凝胶电泳分析。结果表明, 这 5种酶的酶解片段数目在狮头鹅分别为 5、2、2、3和4个, 如图 1所示。在山鸡酶解片段分别为 3、3、1、3和4个, 如图 2所示。

以 λ -DNA/Hind III 和 SPP I-DNA/EcoR I 完全酶解片段为分子量标准, 利用电泳迁移率与分子量的对数的线性关系, 计算出各个酶切片段的分子量, 如表 1 和表 2 所示。表中所

表 1 狮头鹅 mtDNA 限制性片段的分子量(单位: MD)

Table 1 Molecular weight (MD) of restriction fragments of mtDNA from Lionhead goose (*Anser cygnoides domestica*) liver

	Hind III	Bgl I	EcoR I	Pst I	BamH I	
A	3.57±0.20	3.57±0.22	8.16±0.39	10.16±0.51	8.00±0.46	
B	2.50±0.10	2.73±0.15	1.69±0.13	0.58±0.17	2.76±0.15	
C	1.96±0.12	2.30±0.12	0.85±0.10			
D	1.49±0.11	2.15±0.11				
E	1.22±0.11					
	10.74	10.76	10.70	10.75	10.76	10.74

表5 鹌鹑 mtDNA 限制性片段的分子量 (单位:MD)
Table 5 Molecular weight (MD) of restriction fragments of
mtDNA from quail (*Coturnix coturnix*) liver

	Hind III	BgI I	EcoR I	Pst I	BamH I
A	7.99±0.48	6.12±0.38	10.52±0.61	10.52±0.54	
B	1.49±0.12	4.40±0.29			
C	1.04±0.10				
	10.52	10.52	10.52	10.52	10.52

二、鹌鹑类和鸡类 mtDNA 限制性图谱

我们采用部分酶解法和双酶解法来确定各种内切酶酶切位点的相对位置关系。

狮头鹑 mtDNA 限制性图谱构建: Hind III 在狮头鹑 mtDNA 上有 5 个切点, 我们用单酶部分解法确定它们的排列顺序为: E—C—A—B—D。再用双酶解法, 分别确定 Hind III、Pst I、BamH I、EcoR I 和 BgI I 5 种酶两两之间的位点位置关系, 以 BamH I 的一个切点定为零点, 建立了由这 5 种内切酶酶切位点的顺序排列所构成的狮头鹑 mtDNA 的限制性图谱, 如图 3(a) 所示。

我们用相同的方法同样建立了白鹑 mtDNA、山鸡 mtDNA、火鸡 mtDNA 和鹌鹑 mtDNA 的限制性图谱, 如图 3(B)、(C)、(D) 和 (E) 所示。

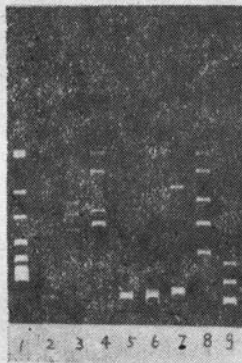


图1 狮头鹑 mtDNA 单酶完全酶解片段的电泳图谱

Fig.1 Agarose gel electrophoresis pattern of restriction digests of mtDNA from Lionhead goose (*Anser cygoides*) liver

1. spp1-DNA/EcoR I
2. mtDNA/Sma I
3. mtDNA/BgI I
4. mtDNA / Hinc II
5. mtDNA/Pst I
6. mtDNA/BamH I
7. mtDNA/EcoR I
8. mtDNA/Hind III
9. λDNA/Hind III

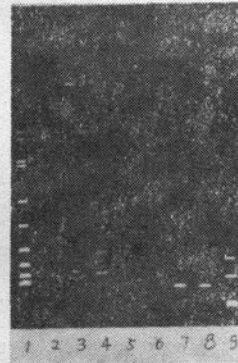


图2 山鸡 mtDNA 单酶完全酶解片段的电泳图谱

Fig.2 Agarose gel electrophoresis pattern of restriction digests of mtDNA from pheasant (*Phasianus colchicus*) liver

1. spp1-DNA/EcoR I
2. mtDNA/Sma I
3. mtDNA/BgI I
4. mtDNA / Hinc II
5. mtDNA/Pst I
6. mtDNA / BamH I
7. mtDNA / EcoR I
8. mtDNA/Hind III
9. λDNA/Hind III

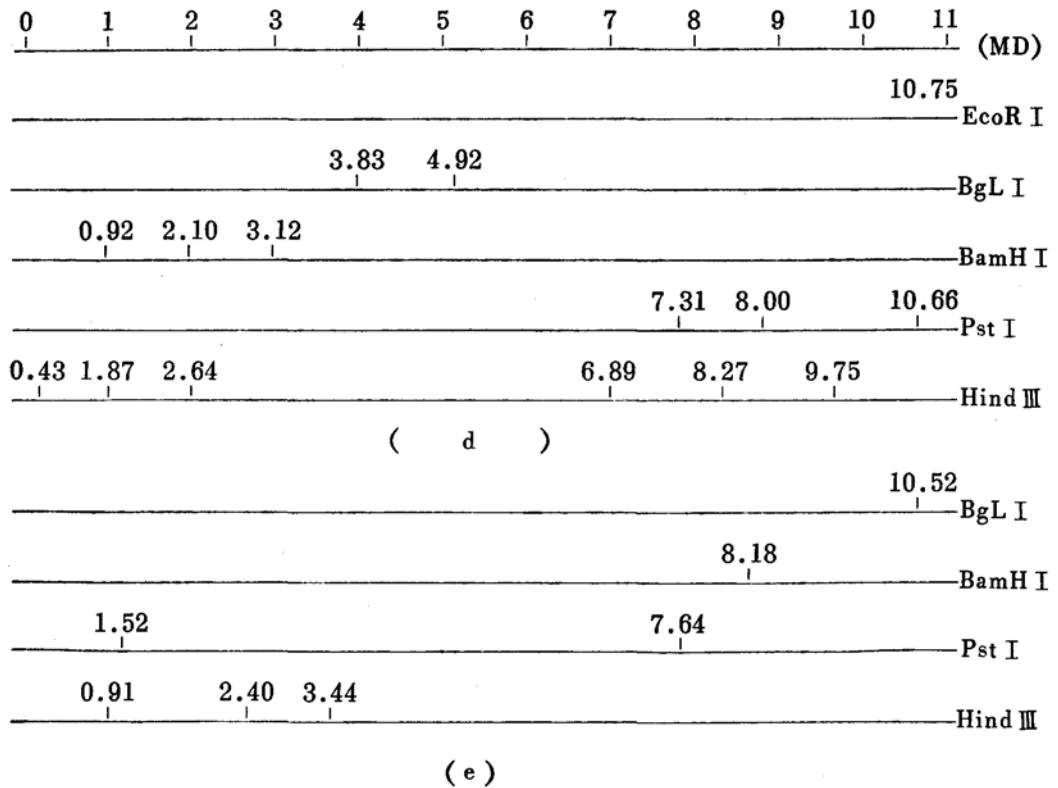


图3 鹅类及鸡类 mtDNA 的限制性图谱

(a)、(b) 和 (c) 均以 BamHI 位点为零点; (d) 以 EcoRI 为零点; (e) 以 BglI 为零点, 并以线性化形式绘出; (a) 狮头鹅 mtDNA; (b) 白鹅 mtDNA; (c) 山鸡 mtDNA; (d) 火鸡 mtDNA; (e) 鹌鹑 mtDNA.

Fig. 3 Restriction maps of goose mtDNA and bird mtDNA. The maps of (a), (b) and (c) were linearized at the BamHI site; The map of (d) was linearized at the EcoRI site; The map of (e) was linearized at the BglI site. (a) Lionhead goose (*Anser cygnoides domestica*) mtDNA; (b) White goose (*Anser cygnoides domestica*) mtDNA; (c) Turkey (*Meleagris gallopavo*) mtDNA; (e) Quail (*Coturnix coturnix*).

讨 论

白鹅与狮头鹅在分类上虽然属于同一个物种的不同品种, 但是它们的毛色、体形等都有很大差别, 并且地理分布也相差较远, 白鹅主要分布于长江中下游和长江以北地区, 狮头鹅则主要分布在广东潮汕地区的小范围内。差别这样大的两个品种鹅的 mtDNA 的酶切图谱却差异极小。这个结果完全与吴鹤龄、林建生对鸭类的 mtDNA 酶切图谱^[1]和 Glaus 对鸡类的 mtDNA 酶切图谱^[9]的研究结果是相同的。这些结果说明了在驯化中鸡类、鸭类和鹅类的不同品种间 mtDNA 差异不大, 是很保守的。当然, 要对这个问题做出确切的结论, 还要进行大量工作才能获得。

山鸡、火鸡和鹌鹑的 mtDNA 的限制性内切酶图谱之间差异是很大的。仅从酶切点数目比较来看, BgLI 在山鸡 mtDNA 由为 4 个切点; 火鸡 mtDNA 上为 2 个切点; 而在鹌鹑 mtDNA 上则为 1 个切点。这些位点在 mtDNA 限制性图谱上的位置是不同的。BgLI 在以上 3 种鸡类 mtDNA 上不仅酶切位点不同, 分子量大小也不相同。山鸡 mtDNA 为 10.68 MD, 火鸡 mtDNA 为 10.75 MD 和鹌鹑 mtDNA 为 10.52。其它内切酶在 3 类鸡中的比较结果与 BgLI 是同样的。以上结果与 3 种鸡在分类学地位上差别是相一致的。山鸡、鹌鹑和火鸡都属鸡形目 (*Calliformes*)。山鸡和鹌鹑同属雉科 (*Phasianidae*) 但不同属。火鸡则属吐绶鸡科 (*Meleagrididae*)。它们之间血缘还是较远的。这说明了不同物种间的 mtDNA 是有很大差异的。

参 考 文 献

- [1] 吴鹤龄等. 鸭类 mtDNA 限制性酶切图谱的比较研究. 遗传学报, 1987, 14(3):230~236.
- [2] 赵邦梯等. 北京鸭肝脏线粒体 DNA 的限制酶图谱. 中国科学 (B 辑), 1983, 3:213~222.
- [3] 赵邦梯等. 北京鸭肝线粒体 DNA 的制备及性质. 北京大学学报 (自然科学版), 1983, (1):72~77.
- [4] 赵邦梯等. 鹅肝脏线粒体 DNA 的限制性内切酶酶切图谱. 生物化学杂志, 1985, 1(1):49~55.
- [5] Avise, J C. et al. Polymorphism of mitochondrial DNA in populations of higher animals. In evolution of genes and proteins. Nei, M. and Koehml, R K. (eds), New York, 1983, 147~164.
- [6] Borst, P. Mitochondrial DNA; 1. Preparation and properties of mitochondrial DNA from chick liver. Biochem. Biophys. Acta., 1967, 149:140~155.
- [7] Brown, W M. et al. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1979, 76:1967~1971.
- [8] Brown, W M. Evolution of animal mitochondrial DNA. In evolution of genes and proteins. Nei, M. and Koehml, R K. (eds), New York, 1983, 62~88.
- [9] Glaus, K R. et al. Avian mtDNA; Structure, organization and evolution. In the organization and expression of the mitochondrial genome. Kroon, A M. and Saccon, C (eds). 1980, 131~135.
- [10] Jeppesen, P G M. A method for separating DNA fragments by electrophoresis in polyacrylamide concentration gradient slab gels. Anal. Biochem., 1974, 58:195.
- [11] Southen, E. Gel electrophoresis of restriction fragments. Methods in enzymology, 1979, 68:152~176.

COMPARATIVE STUDY OF RESTRICTION MAPS OF SOME BIRDS

Sun Yunming, Wu Heling

(Peking University)

Five restriction cleavage maps of mtDNA from liver of Lionhead goose (*Anser cygnoides domestica*), White goose (*Anser cygnoides domestica*), Pheasant (*Phasianus colchicus*), Turkey (*Meleagris gallopavo*) and Quail (*Coturnix coturnix*) are reported. Restriction endonucleases Hind III, Pst I, BamH I, EcoR I and Bgl I have 3, 3, 1, 3 and 4 sites from *Phasianus colchicus*, respectively. The restriction endonucleases have 6, 3, 3, 1 and 1 site from *Meleagris gallopavo*, respectively. The restriction endonucleases map of mtDNA from two varieties of *Anser cygnoides domestica* are the same, and these restriction enzymes have 5, 2, 2, 3 and 4 sites on those mtDNA, respectively. Restriction endonucleases Hind III, Pst I, BamH I and Bgl I have 3, 2, 1 and 1 sites from *Coturnix coturnix*.

Analyzing five restriction maps, we discovered that:

- (1) There was high interspecific variation on fowl and goose;
- (2) There was no heterogeneity between two varieties of goose.

Key words Fowl mtDNA, Goose mtDNA, Restriction map

著名兽医学大家程绍迥逝世

我国著名的兽医学大家，一级研究员程绍迥同志，因病于1993年7月29日在京逝世，享年92岁。

程绍迥同志历任东北大学、复旦大学、中央大学农学院教授，农林部渔牧司司长、中央畜牧实验所所长、中华人民共和国成立之后，任农业部畜牧兽医司司长、畜牧兽医总局副局长、中国农业科学院副院长、学术委员会副主任委员，中国农学会副理事长，中国畜牧兽医学学会理事长等职。他是第二、三届全国人民代表大会代表，第五、六届全国政协委员，九三学社六届中央常委，1984年加入中国共产党。

程绍迥同志于1901年生于四川黔江县，土家族。早年留学美国，获美国衣阿华州农工学院兽医学博士学位和美国约翰斯·霍普金斯大学科学博士学位。他是我国兽医事业的奠基人之一，长期从事兽医教育、兽医生物药品研究和技术行政领导工作，为国家培育出一批兽医专业人才，并在兽医生物药品的兽疫防治研究方面取得重要成就。他组织全国畜牧兽医技术人员共同努力，于1955年在全国范围内消灭了逞凶千百年的牛瘟。

程绍迥同志的逝世，是我国畜牧兽医界的一大损失。我们将永远缅怀他对我国畜牧兽医科学事业所做的杰出贡献，学习和发扬他的高尚科学道德，努力发展我国的农业科学事业，促进我国农业现代化建设。

(本刊编辑部)