

王世锋,米耶斯尔,詹建立,等. 新疆地方绵羊 *ND2* 基因多态性及系统发育分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(13):40-43.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.13.009

新疆地方绵羊 *ND2* 基因多态性及系统发育分析

王世锋,米耶斯尔,詹建立,张秀英,王玉涛

(喀什大学生命与地理科学学院叶尔羌绿洲生态与生物资源研究重点实验室,新疆喀什 844000)

摘要:为研究新疆地方绵羊遗传多样性和系统进化,以塔什库尔干羊、和田羊和多浪羊为研究对象,采用 PCR、测序法和生物信息学方法分析绵羊 NADH 脱氢酶亚单位 2(NADH dehydrogenase subunit 2, *ND2*) 基因核酸序列。结果表明,共发现了 22 个多态位点,其中有 9 个单一多态位点,简单信息位点(2 个碱基)有 13 个;299 和 883 位点是非同义突变;绵羊群体单倍型多样性(H_d)为 0.641,核苷酸多样性(P_i)为 0.357%,平均核苷酸差异数(k)为 3.4;D 世系发现多浪羊个体。结果支持摩弗伦羊是家绵羊野生祖先的观点。

关键词:线粒体 *ND2* 基因;系统发生;多态性;绵羊;塔什库尔干羊;和田羊;多浪羊

中图分类号: S826.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)13-0040-04

绵羊与人类生活密切相关,为人类提供了肉、脂、奶、皮、毛、绒、骨和角等多种多样的畜产品^[1-3]。关于绵羊的起源仍存在争议,线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 序列分析已经确定了一种多母系血统的普遍现象,即 A、B、C、D、E 进化世系,这些世系有特定的地理范围,暗示多重母系起源,羊驯化事件可能是独立的^[4]。目前,研究发现仅欧洲摩弗伦羊可能是家绵羊的母系(世系 B)野生祖先之一。推测亚洲摩弗伦羊与欧洲摩弗伦羊与家绵羊共享最近的母系祖先^[5],未发现其他野生羊对家绵羊有遗传贡献的分子证据。

线粒体是真核细胞的动力车间,mtDNA 作为独立与核 DNA 的半自主性基因组,是核外遗传物质,动物体线粒体基因组编码的 37 个基因,包括 13 条多肽,22 个 tRNA 基因和 2 个 rRNA 基因^[6],具有分子量小、进化速度快、多拷贝、碱基替换率低、遗传自主及母系遗传等特征。

ND2 基因是 mtDNA 的 1 个蛋白编码基因,而且是 NADH 脱氢酶的 1 个亚基,而 NADH 脱氢酶是呼吸链复合体 1 的主要组成,在呼吸链中直接参与氢与电子传递并通过氧化磷酸化产生 ATP,进而参与能量代谢作用。NAD 参与生物体内的重要反应,NAD 可在糖酵解途径与三羧酸循环途径得到电子形成 NADH,NADH 又在氧化磷酸化途径中将电子通过呼吸链最终传递给氧,促成 ATP 的形成^[7]。在体内大多数代谢脱下的氢,是由 NADH 呼吸链传递给氧,糖类碳水化合物、脂质和蛋白质的分解代谢,脱氢后的氧化反应一般是由 NADH 呼吸链传递完成的。

鲁卫卫等报道鸡线粒体 *ND2* 基因的异质性,并发现异质性变异对生长性状、屠体指标、血清生化等指标均有显著效应,显示相关变异的潜在重要性^[7]。鲍海港等在对藏鸡的研究中发现,线粒体 *ND1* 和 *ND2* 基因可被选为藏鸡低氧遗传适应的候选基因,因为低氧会抑制与线粒体呼吸功能密切相

关的酶的活性,也会使线粒体产生更多的活性氧。活性氧会破坏膜脂,降低线粒体呼吸酶的活性,从而损害线粒体的呼吸功能。研究发现,3 种鸡都有但频率差异较大的 2 个错义突变都是 *ND2* 基因上的单碱基突变,推测藏鸡与低地鸡有可能在 NADH 脱氢酶的功能上存在差异^[8]。而有关高山放牧品种的塔什库尔干羊(海拔 3 000 ~ 5 000 m)、和田羊(分为山区型和农区型,海拔 1 440 ~ 3 500 m)和多浪羊(海拔 1 200 m)线粒体呼吸功能和低氧适应研究较少。

本研究通过测定绵羊线粒体 *ND2* 基因序列,从而探讨新疆南疆地区绵羊的遗传多样性、线粒体呼吸功能及低氧适应的分子机制,从而了解并摸清其亲缘关系及低氧适应性,为能够综合开发和合理利用绵羊资源提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

于 2014 年 3 月至 2015 年 8 月先后在麦盖提县种羊场采集 33 只多浪羊、塔什库尔干县麻扎种羊场采集 41 只塔什库尔干羊、和田市屠宰场采集 17 只和田羊共计 91 只羊的静脉血液,用柠檬酸葡萄糖(ACD)抗凝,冷冻后置于冰袋中,于实验室 -20 ℃ 保存备用。

1.2 主要试剂

粪便基因组 DNA 快速提取试剂盒、全血基因组 DNA 快速提取试剂盒,均购自北京三博远志生物技术有限责任公司;Taq DNA 聚合酶、dNTP,均为杭州博日科技有限公司产品;琼脂糖为 BIOWEST 公司产品。

1.3 总 DNA 提取

绵羊总基因组 DNA 的提取是利用全血基因组 DNA 快速提取试剂盒(北京三博远志生物技术有限责任公司)。

1.4 PCR 扩增及测序

根据绵羊 mtDNA 序列(GenBank 登录号为 AF010406),采用 Primer 5.0 软件设计引物,扩增绵羊 *ND2* 基因,上游引物:5' - AGCACCCACTGATTGCTCAT - 3',下游引物:5' - TTCGTTTGTGTTGGAAT - 3'。委托北京三博远志生物技术有限责任公司合成,期望扩增长度约 901 bp。

收稿日期:2017-09-29

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金(编号:2015211B002)。

作者简介:王世锋(1980—),男,陕西合阳人,硕士,副教授,硕士生导师,主要从事动物遗传学研究。E-mail:wsf801001@163.com。

PCR 反应体系总体积为 50 μL ; 绵羊总基因组 4 μL , 10 \times Buffer(含 Mg^{2+}) 5 μL , 上下游引物各 2 μL , 2.5 mmol/L dNTPs 4 μL , *Taq* DNA 聚合酶 1 μL , 去离子水 29 μL 。

PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 进行 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

PCR 扩增产物直接送北京三博远志生物公司测序。

1.5 数据分析

应用 Clustal X 1.83 软件进行序列比对并手工校对。DnaSP 5.1 软件计算单倍型多样性、核苷酸多样性、多态位点、核苷酸总变异位点、简约信息位点和点突变位点等。MEGA 5.1 软件分析变异位点, 计算碱基组成、转换/颠换比 (T_s/T_v)、核苷酸差异和序列差异, 采用邻接法 (Neighbour-joining, 简称 NJ) Kimura 双参数模型构建系统发生树, 对拓扑图进行重复抽样 1 000 次的自展检验 (Bootstrap) 以确定各分支的置信度。

2 结果与分析

2.1 *ND2* 基因 PCR 扩增结果

ND2 基因扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 20 min, 结果见图 1。

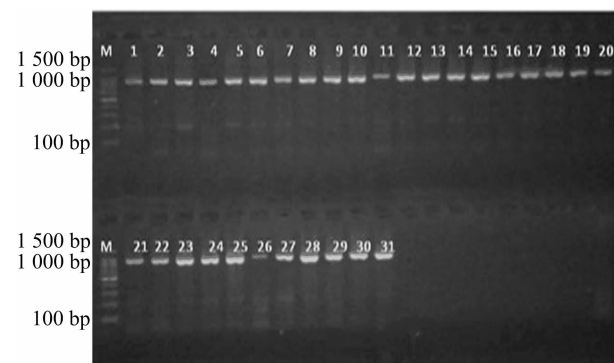


图1 绵羊 *ND2* 基因 PCR 扩增产物电泳结果

电泳条带明亮, 扩增效果较好, 扩增条带大小为 900 bp 左右, 与预期扩增的 901 bp 一致。可以直接测序。

2.2 绵羊 mtDNA-*ND2* 全序列碱基分析

测序结果表明, 所测出的绵羊 mtDNA-*ND2* 基因 A、T、C、G 含量在绵羊中分布较一致, 其中 A 占 36.8%, T 占 27.4%, C 占 27.1%, G 占 8.7%。绵羊的 A + T 含量为 64.2%, C + G 含量为 35.8%, A + T 含量高于 C + G 含量; 表明绵羊 mtDNA-*ND2* 基因含有大量的碱基 A 和 T, 存在一定的碱基偏倚性。碱基组成表明 G 相对缺乏, 其中密码子第 3 位上 G 的含量最低, 仅为 2.6%; 第 3 位的 A 含量较高, 为 49.8%。密码子的使用存在一定差异, 在密码子的第 1 位上 A 高达 43.4%; 密码子第 2 位上 T 的含量高达 45.0%, 碱基 G 的含量为 9.1%。

2.3 绵羊 mtDNA-*ND2* 序列的多样性分析

利用 DnaSP 5.1 软件进行单倍型统计分析, 本试验分析 91 个绵羊 mtDNA-*ND2* 基因序列, 发现了 22 个多态位点, 其中有 9 个单一多态位点, 简单信息位点 (2 个碱基) 有 13 个 (图 2)。其中 438、504、837、873 位点核酸变异只出现在塔什

库尔干羊个体中。核酸变异中转换远大于颠换, 转换/颠换比为 78.38。

	多态位点																					
单倍型	1	2	2	3	3	3	3	4	4	5	5	5	5	6	6	8	8	8	8	8	9	9
H1	T	T	T	C	A	A	C	G	T	A	C	T	T	A	A	C	A	T	C	A	G	C
H2	C	T	T	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
H3	C	T	T	T	T	T	T	T	T	G	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
H4	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
H5	C	C	C	G	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
H6	C	C	C	G	T	T	T	T	T	A	T	C	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T
H7	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
H8	C	C	C	G	T	T	T	T	T	A	T	C	G	T	T	G	G	C	T	T	T	T
H9	C	T	T	G	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
H10	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
H11	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
H12	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
H13	C	T	T	T	T	T	T	T	T	C	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T

图2 *ND2* 基因多态位点及单倍型

2.4 *ND2* 氨基酸分析

22 个多态位点中的 2 个位点即 299、883 位点是非同义突变, 分别导致 M 变为 T 和 R 变为 G, 其余 20 个位点为同义突变。应用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/interactive#structure>) 软件进行 *ND2* 结构在线预测, 多肽空间结构见图 3。

单倍型 H1 序列未发生突变, H8 序列在 299 位点和 883 位点均发生突变。由图 3 可知, 突变后空间结构差异不大。但是 QMEAN 分别为 -4.35 和 -4.38, C_{β} 分别为 -1.72 和 -1.82, All Atom 分别为 -1.27 和 -13.2, Torsion 分别为 -4.32 和 -4.33, Solvation 均为 1.47, 未发生变化。

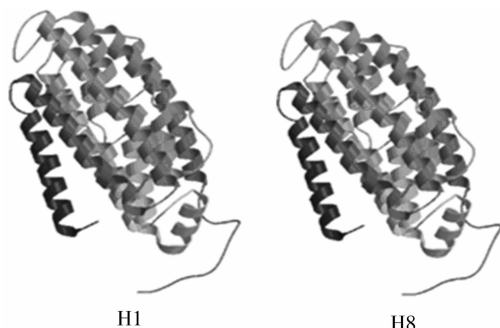


图3 H1 和 H8 单倍型的 *ND2* 亚基空间结构

2.5 mtDNA-*ND2* 基因单倍型分析

共获得 13 个单倍型, 各单倍型在各品种中分布见表 1。

由表 1 可知, H2 和 H1 为优势单倍型, 分别占 58.3% 和 13.2%。绵羊群体单倍型多样性 (H_d) 为 0.641, 核苷酸多样性 (P_i) 为 0.357%, 平均核苷酸差异数 (k) 为 3.4。塔什库尔干羊、和田羊和多浪羊核苷酸多样性分别为 0.330%、0.135%、0.463%。

2.6 绵羊系统进化分析

利用 MEGA 5.05 软件构建绵羊 *ND2* 基因不同单倍型 NJ 系统发育树 (图 4)。其中包括 GenBank 下载的 36 个序列分别是 A 世系 (HM236174-5)、B 世系 (AM236176-7)、C 世系 (AM236178-9)、D 世系 (HM236180-1)、E 世系 (HM236182-3) 序列、盘羊线粒体序列 (藏盘羊 JX101654.1、帕米尔盘羊 KT781689.1、Darwini 盘羊 KX609626.1、东方盘

表 1 各单倍型在各品种中的分布

品种	数量(只)													合计
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	
塔什库尔干羊	2	26	1	2	3	4	0	0	0	1	0	0	2	41
和田羊	2	14	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	17
多浪羊	8	13	0	0	5	2	2	1	0	0	1	1	0	33
合计	12	53	1	2	8	6	2	1	1	1	1	1	2	91

羊 NC020656. 1、HM236188. 1、加拿大盘羊 NC015889. 1、JN181255. 1)、Vignei(HM236186. 1、HM236187. 1、HM236189. 1、NC026064. 1、KF938361)、摩弗伦羊(HM236185、KF312238. 1、KF938360. 1、NC026063. 1)、新疆地方绵羊阿勒泰羊(KF938320. 1)、和田羊(KF938322. 1)、吐鲁番黑羊(KF938324. 1)、巴什拜羊(KF938330. 1)巴音布鲁克羊

(KF938331. 1)、多浪羊(KF938332. 1)、哈萨克羊(KF938333. 1)、塔什库尔干羊(KF938337. 1)、叶城羊(KF938338. 1)。

由图 4 可知,单倍型 H2、H3、H9、H10、H11 和 H13 属于 A 世系;单倍型 H1、H4 和 H7 与欧洲摩弗伦羊和亚洲摩弗伦羊属于 B 世系;H5、H6 和 H8 与塞浦路斯摩弗伦羊属于 C 世系;H12 属 D 世系。

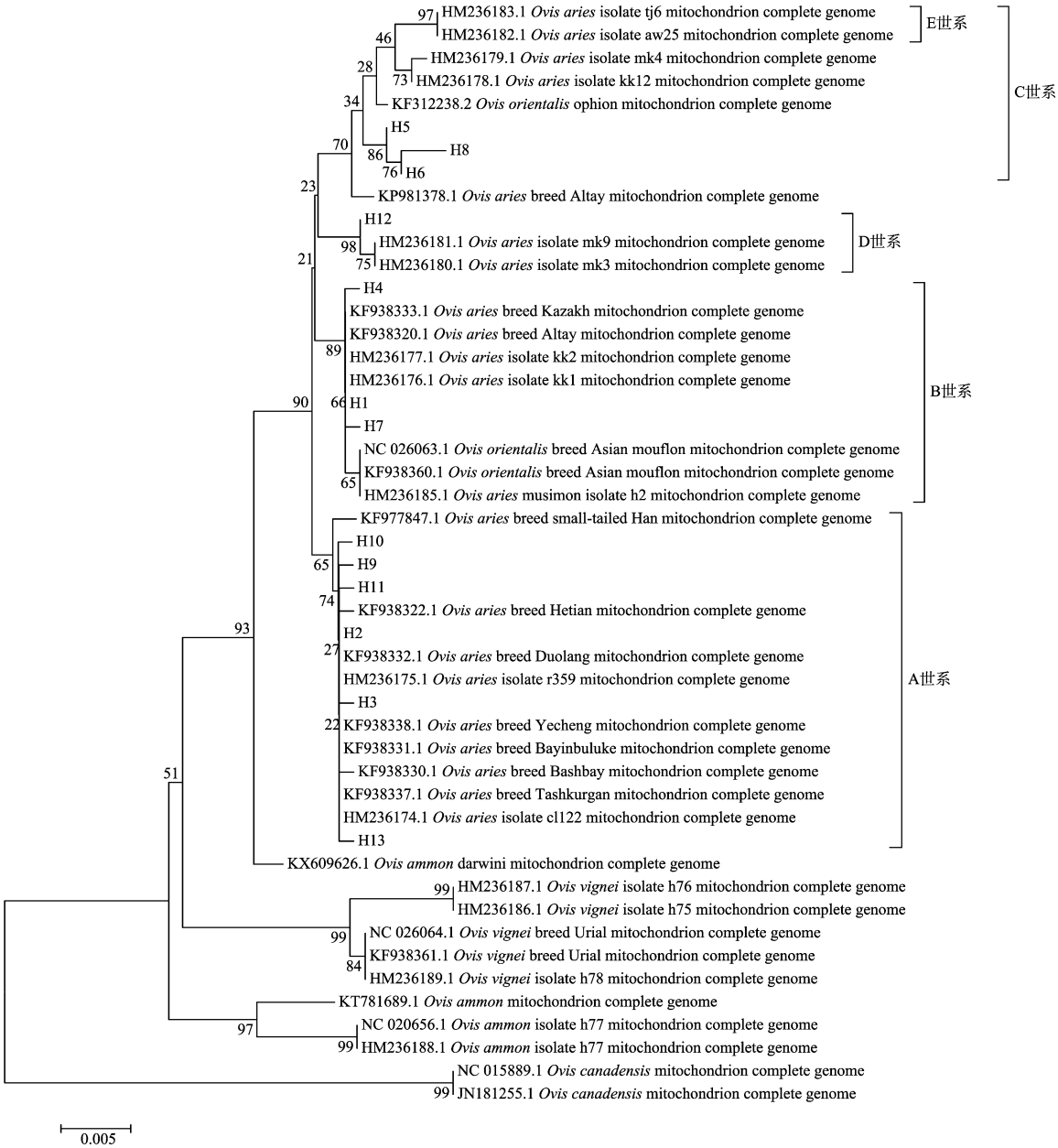


图4 绵羊单倍型 NJ 系统发生树

2.7 3 个品种间的遗传距离及系统发生树

利用 MEGA 5.0 计算不同品种间遗传距离(表 2),根据遗传距离构建不同品种间 NJ 系统发生树(图 5)。由图 5 可知,塔什库尔干羊与和田羊关系较近,其次是多浪羊。

表 2 3 个品种间的遗传距离

品种	遗传距离		
	塔什库尔干羊	和田羊	多浪羊
塔什库尔干羊	—	—	—
和田羊	0.002	—	—
多浪羊	0.004	0.004	—

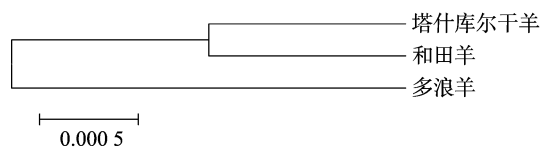


图 5 不同绵羊品种间 NJ 系统发生树

3 讨论

绵羊的 A + T 含量为 64.2%, C + G 含量为 35.8%, A + T 含量高于 C + G 含量;表明绵羊 mtDNA - ND2 基因含有大量的碱基 A 和 T,存在一定的碱基偏倚性,与笔者前期研究结果^[9-10]一致。

基因变异发生在密码子第 1、2、3 位置分别占 9.09%、4.55%、86.36%,与前期研究结果^[9]一致。

转换颠换比 78.38 远大于 36.81^[9]和转换颠换比的临界值 2,说明新疆南疆地区地方绵羊 ND2 基因序列突变可能未达到饱和状态,转换随着遗传变异增加趋于饱和。

马丽娜等在蒙古羊和小尾寒羊上发现 770 位点上发生了 T 到 C 的转换^[11],本研究未发现此变异。

438、504、837、873 位点核酸变异只出现在塔什库尔干羊个体中,单倍型 H3、H4、H10 和 H13 也只分布于塔什库尔干羊中,是否与其 NADH 脱氢酶功能差异和低氧适应有联系,仍需进一步研究。另外单倍型 H8 序列在 299 位点和 883 位点均发生突变。突变后 ND2 亚基空间结构差异不大,但是多肽部分性质发生改变,是否影响线粒体呼吸功能有待进一步探讨。

单倍型 H12 只分布于多浪羊中,与 D 世系聚在一起,表明多浪羊存在世系 D,与基于细胞色素 b 的分析结果^[9]一致。和田羊未发现世系 C,可能与研究样品数量偏少有关。

3 个品种平均核苷酸多样性(P_i)为 0.357%,塔什库尔干羊、和田羊和多浪羊核苷酸多样性分别为 0.330%、0.135%、0.463%,低于赵倩君等^[12]、王昕等^[13]、张传生等^[14]基于细胞色素 b 研究的 0.805%、0.602%、0.850%。但与笔者基于细胞色素 C 氧化酶亚基 I (CO I) 基因分析塔什库尔干羊的 0.421% 接近。

基于 ND2 基因的系统发生树表明摩弗伦羊可能是家绵羊世系 B 的野生祖先,与前人研究观点^[5]一致。但是塞浦路斯摩弗伦羊与世系 C 聚在一起,可能对世系 C 有遗传贡献,此观点有待进一步验证。另外塔什库尔干羊与和田羊关系较近,其次是多浪羊,此观点与汤存伟等基于微卫星的分析结果^[15]一致。

参考文献:

- [1] 李基棕,李文良,毛立,等. 1 株绵羊溶血性曼氏杆菌的分离鉴定及致病性研究[J]. 江苏农业科学,2017,45(7):156-158.
- [2] 席丽,闫永锋,秦新喜,等. 绵羊血浆催产素水平定量检测方法的建立[J]. 江苏农业科学,2017,45(5):157-160.
- [3] 梁田,杨霞,张勋,等. 绵羊 Toll 样受体 7 基因多态性分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(8):26-29.
- [4] Singh S, Kumar S, Kolte A P, et al. Extensive variation and sub-structuring in lineage A mtDNA in Indian sheep: genetic evidence for domestication of sheep in India [J]. PLoS One, 2013, 8(11):e77858.
- [5] Lv F H, Peng W F, Yang J, et al. Mitogenomic Meta-Analysis identifies two phases of migration in the history of eastern Eurasian sheep[J]. Molecular Biology and Evolution, 2015, 32(10):2515-2533.
- [6] 郑九嘉,黄学锋,杨宗,等. mtND2 基因多态性及 mRNA 表达与弱精子症的相关性分析[C]//2010 中国青年遗传学家论坛论文集. 嘉兴,2010:1.
- [7] 鲁卫卫,侯玲灵,陈文,等. 鸡线粒体 ND2 基因异质性变异及其效应的研究[C]//第十六次全国禽学学术讨论会论文集. 扬州,2013.
- [8] 鲍海港,赵春江,李俊英,等. 藏鸡和两种低地鸡线粒体全基因组序列的测定和比对[J]. 中国科学(C 辑:生命科学),2007(6):620-624.
- [9] 王世锋,蔡佳麒,沙晓娟,等. 基于 cytb 基因分析帕米尔盘羊和新疆地方绵羊的系统发育[J]. 生物技术,2016,26(1):48-52.
- [10] 王世锋,李静,王玉涛. 多浪羊 mtDNA D-loop 区遗传多样性及系统发育分析[J]. 生物技术进展,2014,4(6):429-434.
- [11] 马丽娜,杨炜迪,马青,等. 滩羊线粒体 ND2 基因的多态性研究与序列分析[J]. 黑龙江畜牧兽医,2013(7):48-49.
- [12] 赵倩君,关伟军,乔海云,等. 基于 cytb 基因探讨家绵羊和多角绵羊的系统发育[J]. 中国农业科学,2010,43(14):3005-3011.
- [13] 王昕,马月辉,陈宏. 绵羊 Cytb 基因序列多态性及系统进化研究[J]. 遗传学报,2006(12):1081-1086.
- [14] 张传生,耿立英,杜立新. 山东主要绵羊品种线粒体细胞色素 b 的多态性研究[J]. 山东农业大学学报(自然科学版),2004(4):481-484.
- [15] 汤存伟,余雄,刘武军,等. 新疆 13 个绵羊群体遗传多样性及遗传分化的研究[J]. 家畜生态学报,2011,32(1):13-19.