

中国沙皮犬 mtDNA D-loop 第一高变区多态性分析

刘清神¹, 苏艳华², 冯定远¹

(1 华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642; 2 云南大学 生物资源保护和利用实验室, 云南 昆明 650091)

摘要:对中国沙皮犬广东原产地种质群 mtDNA 的 D-loop 第一高变区扩增片段 569 bp 进行了遗传多样性和分子进化分析. 单倍型、NJ 树和 ML 树等分析结果表明, 85 个中国沙皮犬个体享有 21 种单倍型, 单倍型的多样性为 0.936, 发现中国的家犬品种(即中国沙皮犬)拥有 E 枝系中的单倍型, 揭示了沙皮犬母系遗传背景的多态性和复杂性, 从分子水平上证明了中国沙皮犬是一个古老的犬种.

关键词:中国沙皮犬; mtDNA; DNA 多态性; 分子进化

中图分类号: Q958

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2010)03-0090-04

Analysis on mtDNA D-loop HVR-I Polymorphism of the Chinese Sharpei

LIU Qing-shen¹, SU Yan-hua², FENG Ding-yuan¹

(1 College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-resource, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: The study analysed the genetic background of Chinese Sharpei at the molecular level by using the mtDNA D-loop molecular marker. The results of haplotypes showed that the 85 Chinese Sharpei shared 21 haplotypes, with the haplotype diversity of 0.936, which meant that the mtDNA of Chinese Sharpei population was highly polymorphic, demonstrating this endangered breed's rich genetic diversity. The results from NJ and ML methods showed that many of the haplotypes of Chinese Sharpei belonged to A branch, and there were also Chinese Sharpei who had the haplotypes of B, C and E, respectively, and it is the first time that haplotype in branch E was reported in China. Considering Chinese Sharpei in Guangdong, China, with so rich diversity in mtDNA haplotypes, it is inferred that the genetic background is complicated, which could be an evidence to support that East Asia was the origin of domestic dogs. It further suggested that Guangdong, China might be a possible origin place of domestic dogs in the world, thus might played an important role in the domestication of dogs. Chinese Sharpei as an ancient dog breed which originated from Guangdong, might be one of the ancestors of modern domestic dogs, and could be a good dog breed candidate for further study of the origination of the world domestic dogs.

Key words: Chinese Sharpei; mtDNA; DNA polymorphism; molecular evolution

中国沙皮犬(The Chinese Sharpei)是原产于我国广东省佛山市南海区大沥镇的一种世界名犬. 目前, 原产地沙皮犬数量极少, 且种质极为混乱. 21 世纪初, Savolainen 等^[1]采集到来自欧洲、亚洲、非洲和北

美极地地区的 654 个家犬样品(其中包括 1 个中国沙皮犬样品), 分析了这些样品的 mtDNA 遗传变异, 提出了家犬的东亚多处起源学说. Parker 等^[2]曾报道中国沙皮犬与巧巧、秋田、柴犬等 4 种犬属于最古

收稿日期: 2009-10-06

作者简介: 刘清神(1972—), 男, 副教授, 博士, E-mail: liuqshen@scau.edu.cn

基金项目: 广东省科技计划项目(2008B020600002); 华南农业大学校长基金(2008X003, 2009B001)

老的犬之一. 本研究对广东原产地的中国沙皮犬群体进行比较全面的采样, 研究对象选用沙皮犬 mtDNA D-loop 的第一高变区进行, 试图分析沙皮犬种质群体 mtDNA 的多样性状况, 旨在为保护和利用中国沙皮犬提供科学依据, 并进一步通过分子进化探讨我国南方这一珍贵犬品种在世界家犬起源中所起的作用和地位.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物血样 85 只中国沙皮犬的血样采自广东省佛山市和广州市; 2 只拿破仑犬和 2 只川东猎犬血样采至广州市新良丰动植物繁育有限公司; 2 只德国狼犬的血样采自华南农业大学宠物医院.

1.1.2 主要仪器设备 PCR 及成像设备: Bio RAD DNA Engine Peltier Thermal Cycler (PCR 仪), Syngene Gene Genius Bio Imaging System 成像系统. 测序仪: ABI Sequence Analyser 3730 (ABI3730 全自动 DNA 序列仪).

1.2 方法

1.2.1 中国沙皮犬血液 DNA 的抽取 采取经典饱和苯酚法的方法改进^[3], 抽提 DNA 溶于 TE, 检测 DNA 质量浓度, 稀释至 25 ng/ μ L.

1.2.2 mtDNA 的 PCR 反应 采用家犬 mtDNA D-loop 第一高变区的一个引物对 L15404/H222^[4] 并进行反应体系和条件的优化. 上游引物 L15404: 5'-CTCTTGCTCCACCATCAGC-3', 长为 19 bp; 下游引物 H222: 5'-AAACTATATGTCCTGAAACC-3', 长为 20 bp. 反应体系为: 模板 DNA (25 ng/ μ L) 1 μ L, 10 $\times$ buffer (含 20 mmol/L MgCl₂) 2.0 μ L, dNTP 混合物 (10 mmol/L) 1.0 μ L, 上下游引物 (3 μ mol/L) 各 1.5 μ L, rTaq 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.1 μ L, BSA 0.4 μ L, 无菌双蒸水补至总体积 20.0 μ L. 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性, 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性, 1 min, 53 $^{\circ}$ C 退火, 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸, 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 后延伸 10 min, 终止反应进行 15 mg/mL 琼脂糖电泳检测.

1.2.3 目的片段的回收和测序 用 15 mg/mL 的琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行检测, 并按“小胶回收试剂盒”产品说明书 (上海华舜生物工程有限公司生产), 将目的片段经切割、回收和纯化后, 制成 30 μ L DNA 洗脱液稀释至 10 ng/ μ L, 用 ABI 3730 全自动 DNA 序列仪进行正反链测序. 测序 PCR 反应试剂盒 (Kit): BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit,

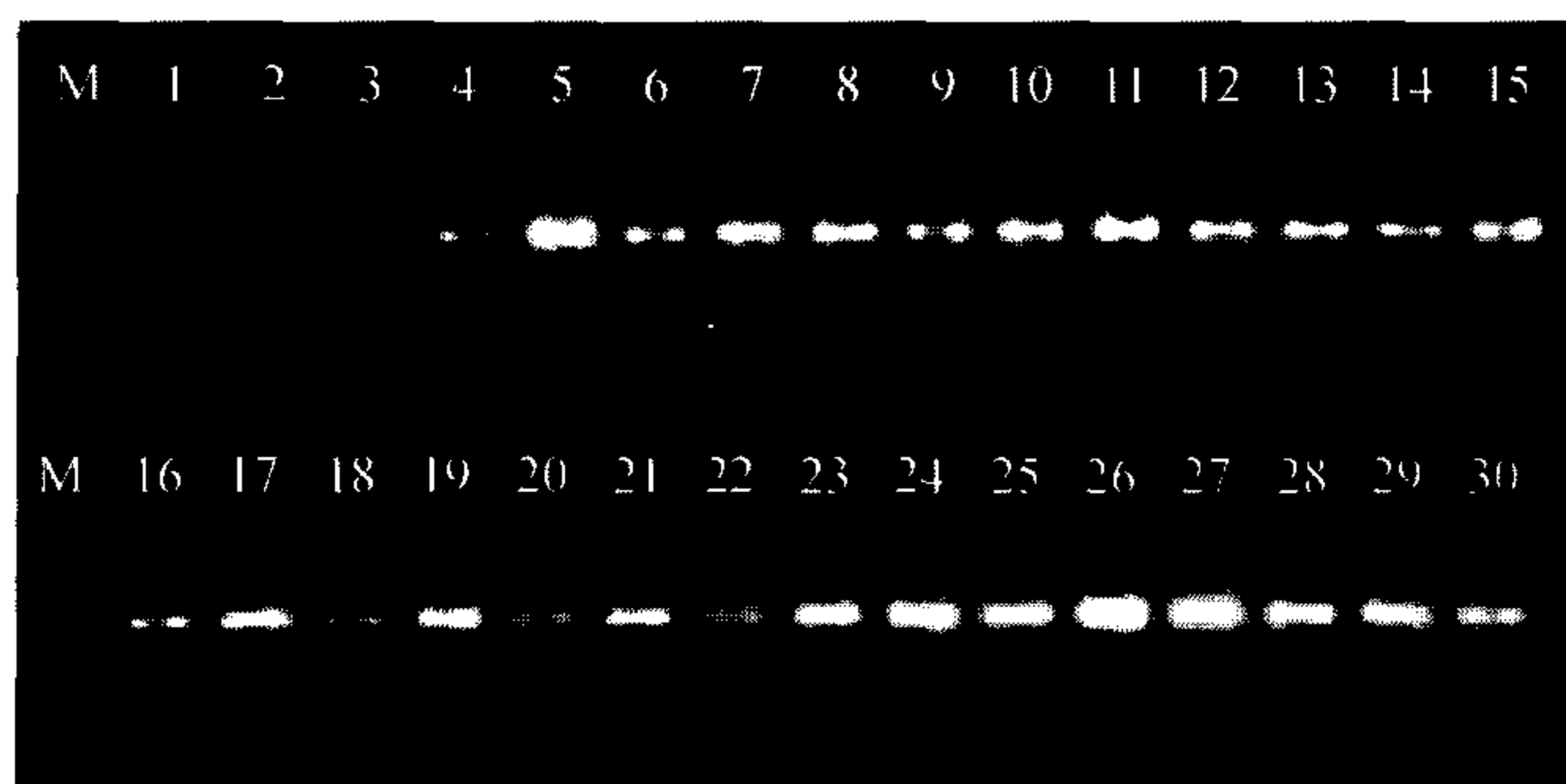
Applied Biosystems Inc.

1.2.4 数据分析 用 DNASTar 4.0 软件形成一致序列, 并进行裁剪和比对. 用 DNASP 4.10.4 软件进行单倍型分析. 以郊狼序列 (Coyote, *Canis latrans*) 为外群, GenBank 登录号 AY172674, 用 MEGA 3.1 (Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis, ver 3.1. Pennsylvania State University, University Park, and Arizona State University, Tempe. 2001) 进行邻接系统树 (Neighbor-Joining Tree, NJ 树) 聚类分析. 用 PAUP * 4.0b10 [Swofford DL. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other methods). Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland. MA. 2003] 软件进行最大似然法 (Maximum likelihood approach) 分析.

2 结果与分析

2.1 中国沙皮犬 mtDNA 的 PCR 反应

样品 mtDNA 经 PCR 反应, 可清晰地扩增出约 720 bp 的 D-loop 第一高变区片段.



M: DNA marker DL2000; 1 ~ 30: 1 ~ 30 号样品.

图1 经过纯化后的部分 PCR 产物

Fig. 1 Part PCR products after purification

2.2 中国沙皮犬 mtDNA 的测序结果与分析

2.2.1 DNA 一致序列的形成 经裁剪和比对, 得到可用于 MEGA 3.1 分析的 91 个个体 (包括 85 只中国沙皮犬和 6 只其他品种犬) 的样品序列, 长度约为 569 bp. 经与 Kim^[5] 报道的家犬 mtDNA 的全序列 (GenBank 的登录号为 U96639) 比对, 序列处于 U96639 序列的 15 479 ~ 16 047 相对位置.

2.2.2 单倍型分析 运用 DNASP 4.10.4 软件分析其单倍型数据. 本段序列不存在插入/缺失的情况, 大部分序列长度为 569 bp. 91 个犬个体共有 22 种单倍型 (表 1), 单倍型的多样性 (Haplotype diversity) 为 0.939 9. 发现变异位点 32 个, 保守位点 537 个. 22 个单倍型序列碱基组成的比率分别为 29.8% (T)、

27.0% (C)、26.7% (A)、16.6% (G),这一结果和 Savolainen 等^[1]报道的数据类似,与犬科动物的碱基组成平均值也是一致的.

表 1 22 种犬单倍型及对应的样号

Tab.1 The 22 haplotypes and their coresponding samples

单倍型	个体数量	对应的样号 ¹⁾
HAP1	7	1,74,78,79,83,97,98
HAP2	12	10,32,37,44,45,53,56,70,73,77,80,81
HAP3	3	93,94,96
HAP4	12	6,11,14,17,26,30,51,54,58,64,69,82
HAP5	4	5,12,47,84
HAP6	8	13,19,22,28,29,34,36,65
HAP7	5	15,16,59,60,63
HAP8	5	4,18,23,25,39
HAP9	5	2,43,49,68,88
HAP10	5	21,40,41,48,62
HAP11	3	24,46,91
HAP12	2	27,61
HAP13	1	35
HAP14	3	38,71,76
HAP15	3	50,92,95
HAP16	4	55,57,66,72
HAP17	1	67
HAP18	1	7
HAP19	3	75,87,89
HAP20	1	8
HAP21	2	9,86
HAP22	1	90

1):1~21 号为骨嘴型沙皮犬;22~50 号为骨肉嘴型沙皮犬;51~92 号为肉嘴型沙皮犬;93、94 号为拿破仑犬;95、96 号为德国狼犬;97、98 号为川东猎犬.

85 个中国沙皮犬个体共有 21 种单倍型,单倍型的多样性为 0.936,表明我国沙皮犬原产地的种质母系遗传的 mtDNA 存在着丰富的多样性,证明了濒危动物的多样性不一定贫乏的观点是正确的^[6-7].

从 mtDNA 母系遗传的进化角度来看,每一种单倍型类群的个体都有可能共享一个共同的母系起源.由于沙皮犬的 3 种类型的分化仅是 30~40 年左右的历史,所以从 mtDNA 单倍型的角度不能反映个体间近几代的亲缘关系,中国沙皮犬类型与单倍型间并没有直接的对应关系,但可反映相同单倍型的沙皮犬个体可能具有共同的母系祖先.所以同一个单倍型可能会包含 3 种不同类型的沙皮犬,如 HAP 2,也就是说,不同类型的骨嘴、肉嘴、骨肉嘴沙皮犬可能有着相同或不同的单倍型(表 1).从表 1 可看出,虽然单倍型多,但分布不均匀,其中 HAP 2 和 HAP 4 包含个体数最多,HAP 6 其次,值得注意的是,HAP 13(骨肉嘴)、HAP 17(肉嘴)、HAP 18(骨

嘴)、HAP 20(骨嘴)和 HAP 22(肉嘴)各仅有 1 只沙皮犬个体享有 1 个单倍型.据采样资料显示,这 5 种单倍型的 5 个个体均为母犬(其中 2 条为较纯正的骨嘴沙皮犬),分别由 5 户人家饲养着.因此,建议对这 5 只中国沙皮犬尽早集中加以合理保护和育种保存后代,否则这些珍贵的遗传多样性很可能消失.另外,HAP 12 和 HAP 21 仅各包括 2 个个体,也应加以保护.

表 1 还看出,我国的另一地方品种犬——川东猎犬与部分中国沙皮犬共同聚在 HAP 1,说明了两者的亲缘关系可能很近.原产国外的 1 只德国狼犬和 2 只拿破仑犬有同属 HAP 3 的单倍型,而所有的 85 个中国沙皮犬个体中没有单倍型为 HAP 3 的个体,显示了国外品种犬与国内品种犬存在的差异.

2.2.3 邻接系统树分析 参考 Savolainen 等^[1]的 6 大枝中相应的单倍型 A1、A3、B4、C6、D2、E1 和 F3,对 22 个单倍型构建 NJ 树(图 2).

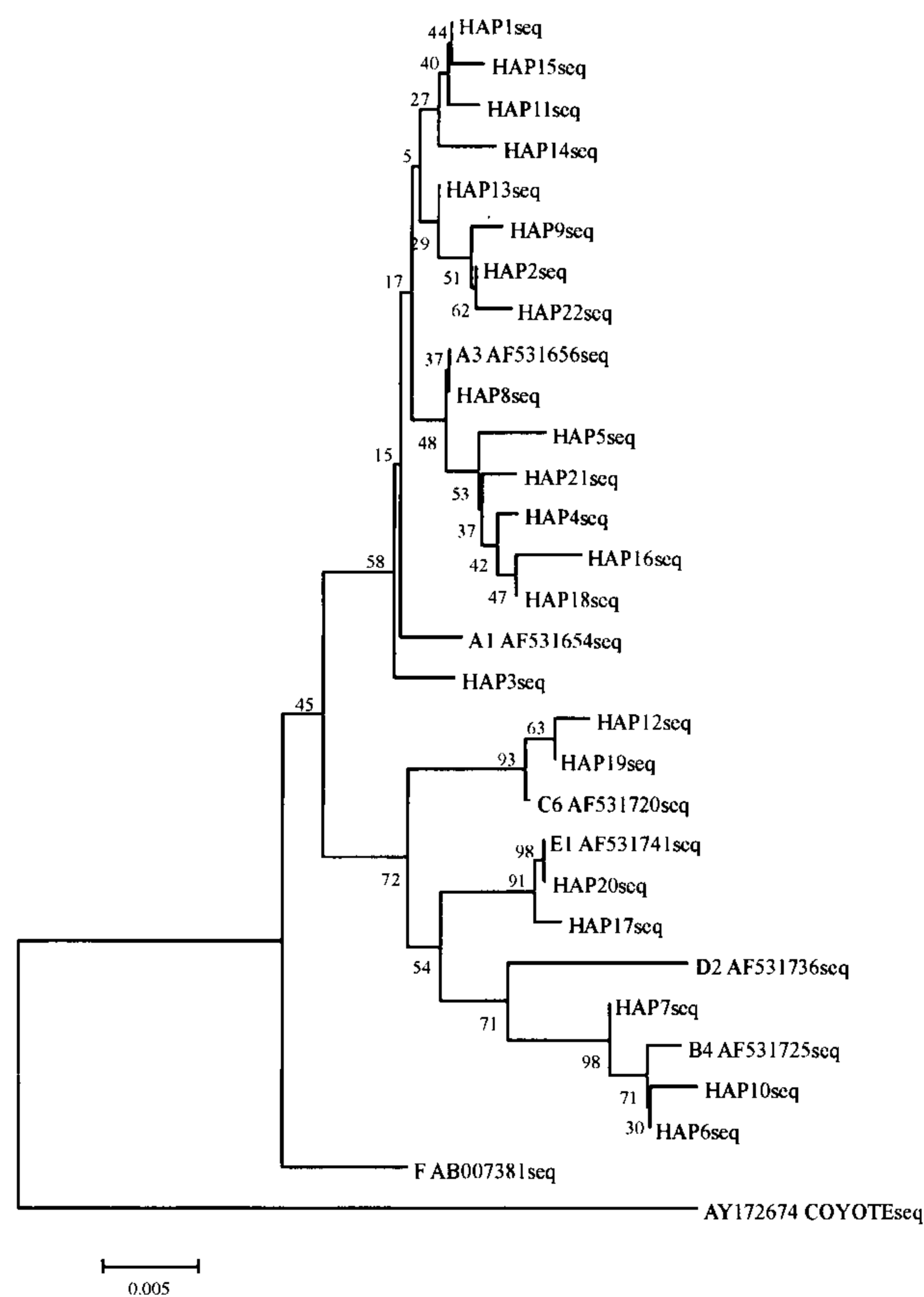
由图 2 可以看出,HAP 1、HAP 15、HAP 11、HAP 14 先后聚成一分枝,关系密切. HAP 22、HAP 2、HAP 9、HAP 13 也先后聚成另一分枝. HAP 16 与 HAP 18 聚在一起,以后依次与 HAP 4、HAP 21、HAP 5、HAP 8 及 Savolainen 等^[1]报道的 A3(中国沙皮犬)聚在一起,形成第 3 个分枝.然后上述 3 个分枝再聚成一大枝,与 Savolainen 等^[1]报道的 A1 聚在一起,都属于 A 大枝.

由图 2 还可以看出,HAP 6 与 HAP 10 先聚为一枝,再与 HAP 7 聚为一枝,属于 Savolainen 等^[1]报道的 B 枝系,见图 2 中 B4,后与 Savolainen 等^[1]报道的 D 枝系聚成一个分枝;而 HAP 20 与 HAP 17 聚在一起,属于 Savolainen 等^[1]报道的 E 枝系;HAP 12 与 HAP 19 聚在一起,属于 Savolainen 等^[1]报道的 C 枝系.

前人^[1,4]的研究表明,A 枝是一个比较大的枝系,许多品种的犬都落在 A 枝系中,而 B、C、D、E 和 F 枝系分别只被很少的犬品种共享.通过比较,在中国沙皮犬的 NJ 树上,可以看出沙皮犬享有的单倍型在 Savolainen 等^[1]报道的 6 个枝系中的位置.本研究发现,采于佛山、广州两地中国沙皮犬群体的单倍型出现在 Savolainen 等^[1]的研究中除 D 和 F 外的所有大枝中,发现中国的家犬品种(即中国沙皮犬)拥有 E 枝系中的单倍型(8 号样的骨嘴沙皮犬拥有 HAP 20 和 67 号样的肉嘴沙皮犬拥有 HAP 17).沙皮犬仅为 1 个品种在原产地广东,如此大的差异,从一个侧面说明沙皮犬母系遗传背景的多态性和复杂性,支持了东亚是世界家犬的一个驯化中心,且有多个母

系起源的观点^[1].

通过比较,发现 Savolainen 等^[1]报道的 1 只采于西藏的中国沙皮犬被分为单倍型 A3,和本研究中的 HAP 8 有相同的序列(图 2). 另外还发现单倍型组 HAP 1、HAP 11、HAP 14 和 HAP 15 与单倍型组 HAP 2、HAP 9、HAP 13 和 HAP 22 虽属于 A 的大枝里面(图 2),但是由于其支持率比较低(<50%),隶属关系不是很明确,有可能是新的枝系,系统发育关系尚待确定,也从侧面说明 Savolainen 等^[1]报道的 A 枝系拥有大量的单倍型和复杂的结构.



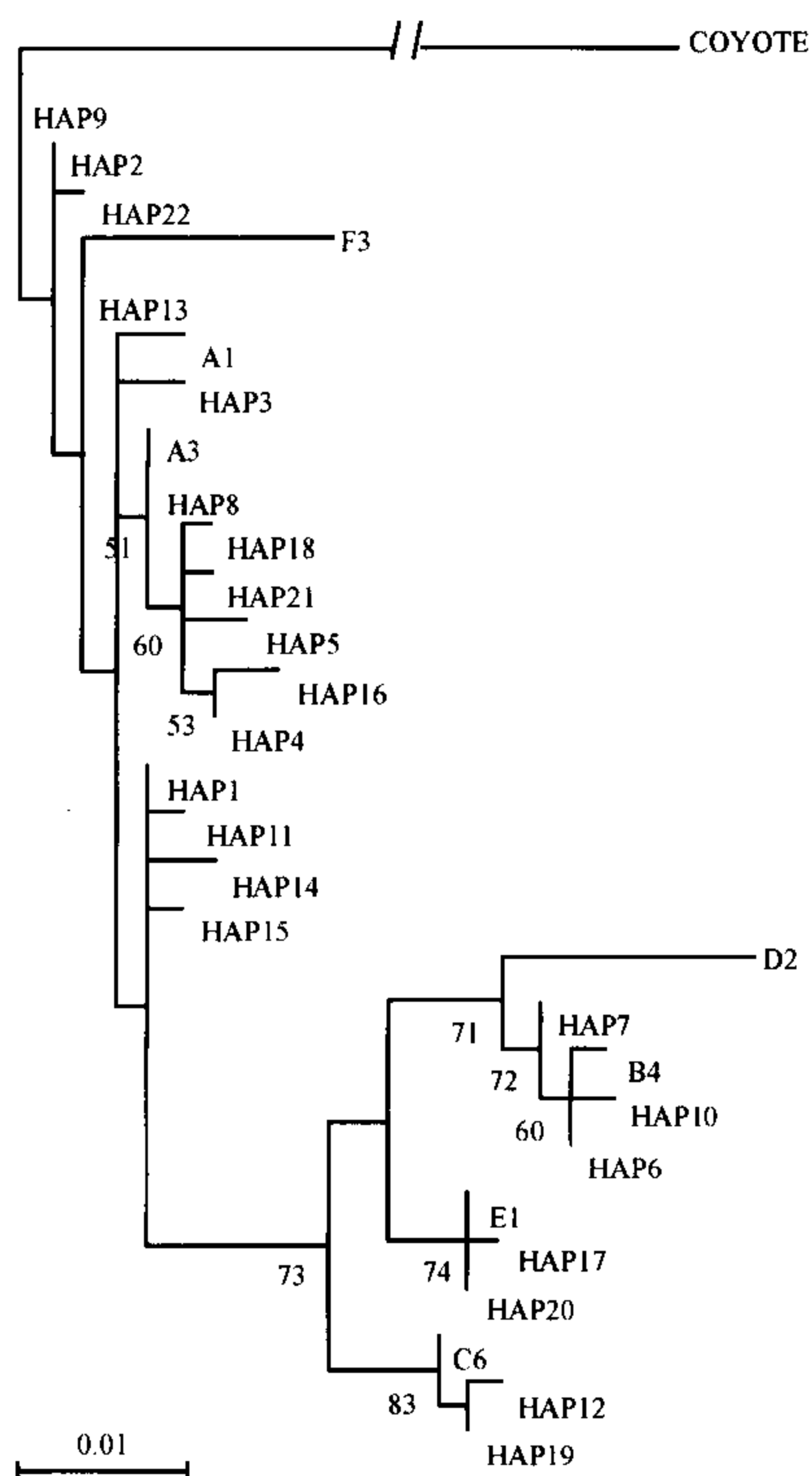
A1、A3、B4、C6、D2、E1 和 F3 分别代表文献[1]中相应枝系内的单倍型.

图 2 采用 MEGA 3.1 软件 Kimura 双参数模型构建的邻接树 (重复抽样数为 1 000)

Fig. 2 Neighbor-joining tree constructed by Kimura 2-parameter distance model (bootstrap value from 1 000 replication)

2.2.4 最大似然法分析 类似的结果也可以从对中国沙皮犬群体的最大似然法构建的最大似然树 (ML 树)中得到. 其拓扑结构与 NJ 树的结构基本一致(图 3),与 Savolainen 等^[1]发表的 ML 树拓扑结构所提供的信息也相符. 所有 85 只中国沙皮犬单倍型都可以归为 Savolainen 等^[1]报道的 A、B、C 和 E 4 大枝. 在 Savolainen 等^[1]报道的单倍型很少的 C 和 E 枝中,也有至少 2 个单倍型分别与其聚在一起,且各个大枝的支持率较高.

对于 F 枝, Savolainen 等^[1]报道中仅有 3 个单倍型,而本研究的 ML 树发现单倍型组 HAP 9、HAP 2 和 HAP 22 处于比 F3 更基部的地位,但是由于其支持率比较低(<50%),地位还待确定. 同样,发现单倍型组 HAP 1、HAP 11、HAP 14、HAP 15 虽属于 A 大枝里面,但游离于 A 枝其他已知单倍型之外,独立构成一个新的分枝,关系与 B、C、D 和 E 等枝相对也近些,但是由于其支持率比较低(<50%),其地位还待确定.



选用碱基替换模型 HKY + I + G, $\alpha = 0.8350$, $I = 0.7546$, bootstrap 值为重复 100 次的结果,其中 A1、A3、B4、C6、D2、E1 和 F3 分别对应文献[1]中的相应枝系内的单倍型.

图 3 以 Coyote 为外群构建的沙皮犬最大似然树

Fig. 3 Maximum likelihood tree of Chinese Sharpei dogs with outgroup by coyote

3 讨论

Parker 等^[2]用 SSR 标记分析了 85 个品种犬和狼的遗传关系,认为不同品种犬间的遗传差异达 30%,SSR 基因型能将不同的犬个体归属于不同的犬品种中,准确率达 99%. 在文献[2]中中国沙皮犬也作为其中一个品种的个体得到了比较. 从其构建的 NJ 树来看,中国沙皮犬与巧巧、秋田、柴犬 4 种犬属于最古老的犬之一,与狼关系最近,与其他现代家犬又明显分离. 在这 4 种古老犬种中,又以中国沙皮犬与狼关系最近.

(下转第 94 页)

鸡排泄物中洛克沙肿与多价态 As 的 分离与测定方法研究

曾 婧, 卓家珍, 陈杖榴, 孙永学

(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:对鸡排泄物中洛克沙肿、总 As 及无机 As(Ⅲ)和 As(V)的分离与测定进行了研究. 采用磷酸氢二钾-甲醇混合液提取和载入固相萃取小柱净化, 对洛克沙肿进行 HPLC 法分析, 回收率 $\geq 74.4\%$, 最低检测限为 $0.1 \mu\text{g/g}$. 经微波消解处理后采用 AFS 法检测排泄物中总 As 含量, 检出限为 $0.08 \mu\text{g/L}$, 回收率 $\geq 94.7\%$. 经磷酸二氢钾溶液振荡提取过滤后, 依次经阳离子和阴离子交换树脂静态吸附与动态分离, 采用 AFS 法分别测定 As(Ⅲ)、As(V)含量, 检出限分别为 0.084 和 $0.210 \mu\text{g/L}$, 回收率分别为 $87.8\% \sim 113.0\%$ 和 $81.1\% \sim 127.3\%$.

关键词:鸡排泄物; 洛克沙肿; 砷; 高效液相色谱法; 原子荧光光谱法

中图分类号: S859.83

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2010)03-0094-04

Studies on the Separation and Determination of Roxarsone and Multi Valence As in the Excreta of Chicken

ZENG Jing, ZHUO Jia-zhen, CHEN Zhang-liu, SUN Yong-xue

(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The methods based on HPLC and AFS for the separation and determination of roxarsone, total arsenic, As(Ⅲ) and As(V) in the excreta of chicken were established. The excreta were extracted with $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-CH}_3\text{OH}$, cleaned-up by Strata-X-AW SPE column and quantified with HPLC system. The recovery was all over 74.4% , and LOD was $0.1 \mu\text{g/g}$. A microwave digestion-atomic fluorescence spectrometry (AFS) method for determination of total arsenic was applied. The excreta were digested in a closed vessel device and determined by AFS. The LOD was $0.08 \mu\text{g/L}$ and the recovery was all over 94.7% . An ion exchange resin coupled with AFS method was also developed for isolating and determining As(Ⅲ) and As(V). The excreta were extracted with KH_2PO_4 , separated by cation and anion exchange resin and determined by AFS. The LODs of As(Ⅲ) and As(V) were 0.084 and $0.210 \mu\text{g/L}$ respectively. The recoveries of $87.8\% \sim 113.0\%$ for As(Ⅲ) and $81.1\% \sim 127.3\%$ for As(V) were obtained.

Key words: excrement; roxarsone; arsenic; HPLC; AFS

洛克沙肿(Roxarsone, ROX)是近十几年来被广泛用作畜禽促生长的一种有机砷添加剂,经畜禽摄入后大部分经排泄物排出体外并进入周边环境.国外对畜禽粪便中总 As 含量及其代谢物的检测已有报道^[1-2],结果表明排泄物中以 ROX 为主,亦检测到的不同价态 As. 关于 ROX 原形的测定已有氮定

法^[3]、GC 法^[4]和 HPLC 法^[5-6]等,用于砷价态分析的分方法有多种,其中以离子交换树脂法最为常用^[7-8],原子荧光法(AFS)亦常用于总 As 及无机 As(Ⅲ)、As(V)的痕量测定. 本文通过建立鸡排泄物中 ROX、总 As 及无机 As(Ⅲ)、As(V)的分离与测定,旨在为研究洛克沙肿在鸡饲喂后的排泄及消除

收稿日期: 2009-11-01

作者简介: 曾 婧(1985—),女,硕士研究生;通信作者:孙永学(1969—),男,副教授,博士, E-mail: sunyx@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(30130140)