

文章编号 :1003-8701(2009)01-0040-03

# 郟县红牛细胞色素 B 序列测定及多态性分析

唐立刚

(德州学院生物系 山东省生物物理重点实验室,山东 德州 253023)

**摘要** :以郟县红牛基因组 DNA 为模板,对 mtDNA Cytb 全序列进行扩增、测序、序列核苷酸组成分析、序列的变异和多态性分析,得出 2 点结论:①mtDNA 基因全序列长度均为 1 140 bp,不存在序列长度差异,富含 A 和 T。②全序列比对与普通牛仅有 1 个突变位点,与瘤牛有 8 个突变位点。

**关键词** :郟县红牛;mtDNA;细胞色素 B;多态性分析

中图分类号 :S823.2

文献标识码 :A

## Sequence Analysis and Polymorphism Analysis of Cytochrome B in 'JiaXian Red Cattle'

TANG Li-Gang

(Department of Biology, Dezhou University, Shandong Key Laboratory of Biophysics, Dezhou 253023, China)

**Abstract**: Using genome DNA of 'JiaXian Red Cattle' as template, the mt DNA Cyt b was amplified, sequenced, and analyzed to nucleotide composition. Two conclusions have been drawn: the first one is that mt DNA has the same length of 1140 base pairs; and the second one is that there is one mutation compared with bos. Taurus and there are 8 mutations compared with zebu cattle.

**Key words**: JiaXian Red Cattle; mtDNA; Cytochrome B; Polymorphism analysis

线粒体是存在于绝大多数真核细胞内的一种基本的、重要的细胞器。它是细胞进行氧化磷酸化的场所。高等哺乳动物线粒体 DNA (mtDNA) 是共价闭合的环状双链 DNA 分子,大小为 16.5 kb 左右,每个细胞中有 1 000~10 000 个拷贝。母系遗传、缺乏重组和进化速率高是 mtDNA 的遗传特性,也是其作为研究生物种群系统进化、母系迁徙历史的一个很有用的遗传标记的重要原因<sup>[1]</sup>。

细胞色素 B(cyt b)基因相比其他线粒体基因其进化速率虽不及 D-loop (控制区)快<sup>[2]</sup>,但由于能用一些通用引物扩增,其进化速度适中,一个较小的基因片段可包含从种内到种间乃至到科间的进化遗传信息<sup>[3]</sup>,因而被广泛地用来进行脊椎动物种

上和种下分类阶元的系统进化研究。在系统进化和分类研究中具有很好的适用性,已成为研究种内和近缘种间系统发育和遗传问题的理想工具之一<sup>[4-5]</sup>,它的部分或者全部序列被广泛地应用于动物类群的系统进化和分类研究中<sup>[6-11]</sup>。已经证实,cyt b 序列在解决亲缘关系很近的分类阶元间的系统关系方面很有用,被认为是解决系统发育问题最可信的线粒体 DNA 标记之一<sup>[12]</sup>。

本研究以郟县红牛为研究对象,对其 cyt b 基因的全序列进行了克隆和测序,为我国地方黄牛品种的系统进化和分类研究提供理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

实验材料为郟县红牛基因组 DNA,由西北农林科技大学陕西省农业分子重点实验室馈赠。

### 1.2 引物的设计和 PCR 扩增

中国黄牛 mtDNA cyt b 基因全序列的扩增与测序引物,是 Irwin 等<sup>[13]</sup>根据 Anderson 等<sup>[14]</sup>发表

收稿日期 2008-09-14

基金项目 :山东省自然科学基金项目(Q2007D02, Y2007D55),山东省教育厅资助项目 (J07WJ50),德州学院人才引进项目 (06rc012, 07rc007)

作者简介 :唐立刚(1976-)男,讲师,在读博士,从事动物生物技术研究。

的牛的 mtDNA 基因组全序列 (GeneBank accession no. V00654) 设计的 *cyt b* 基因在 V00654 中处于 14514~15653 的区段 如图 1 所示 扩增引物 正链引物 L14724B 5' -CGAAGCTTGATATGAAAAAC-CATCGTTG -3'; 反链引物 H15915R 5' -GGAA TTCATCTCTCCGGTTTACAAGAC-3'。测序时也使用这对引物, 由于序列长另需要一条测序引物: L15408 5' -ATAGACAAAATCCCATT CCA -3'。

PCR 反应总体系 50 $\mu$ L, 其中 10 $\times$ PCR buffer 5 $\mu$ L, Mg<sup>2+</sup> (25 mmol/L) 3 $\mu$ L, dNTPs (10 mmol/L) 4 $\mu$ L, 模板 DNA (20 ng/ $\mu$ L) 2 $\mu$ L, 上下游引物 (10 pmol/L) 各 1 $\mu$ L, Taq DNA 聚合酶 (5 U/ $\mu$ L) 0.25 $\mu$ L, 超纯灭菌水 33.75 $\mu$ L。反应体系在 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 充分延伸 7 min, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。每个样品取 2 $\mu$ L 的 PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳检测扩增的效果, 剩余的 48 $\mu$ L 用于纯化回收。PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 复性 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。产物用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.3 PCR 产物的回收纯化以及测序

将扩增效果好的每个样的 PCR 产物 48 $\mu$ L 先进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 然后按照凝胶 DNA 纯化试剂盒的说明进行回收, 从回收产物中取 1 $\mu$ L 再通过琼脂糖凝胶电泳检测回收的效果以及产物的浓度。

从每个样品的回收产物中取出 10 $\mu$ L 连同测序引物一起送往大连宝生物工程有限公司在 ABI 3730 型全自动序列分析仪上进行测序。

### 1.4 序列分析

#### 1.4.1 序列核苷酸组成分析

先将所有 *cyt b* 基因序列输入 Clustal W 1.83 程序<sup>[15]</sup>进行多序列比对, 然后通过 MEGA version 3.1 软件<sup>[16]</sup>分析所有序列的核苷酸组成。

#### 1.4.2 序列的变异和多态性分析

应用 DnaSP Version 3.5 软件<sup>[17]</sup>分析序列的变异 (多态) 位点、核苷酸多样性 (nucleotide diversity, Pi)、单倍型的数目、单倍型多样性 (haplotype diversity, Hd)。

## 2 结果与分析

### 2.1 *cyt b* 基因全序列的 PCR 扩增

从图 1 可见 PCR 扩增出的大小在 1000 bp~1500 bp 之间的特异条带为 1247 bp 的目的带 其中包

含了黄牛 mtDNA *cyt b* 基因 1140 bp 的全长序列。

### 2.2 *cyt b* 基因全序列的变异和多态性分析

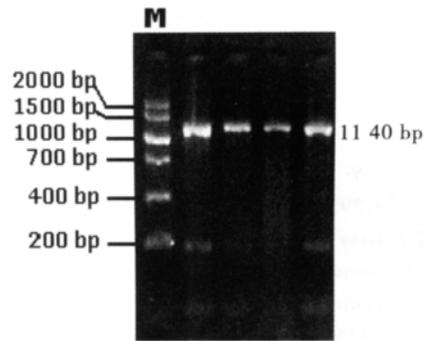


图 1 郟县红牛 *cyt b* 基因全序列 PCR 扩增结果

以 Anderson 等<sup>[14]</sup>测定的欧洲牛 mtDNA *cyt b* 基因全序列 (14 514~15 653 bp) (GenBank 登录号: V00654 或 J01394) 为标准对郟县红牛的 *cyt b* 基因全序列的核苷酸变异和多态性进行分析, 只检测到 1 个单核苷酸替代突变位点 C 变为 T。与其他普通牛相比最多也只有 2 个替代突变 (AY074963, AB074968, AY526085)。与瘤牛 (AF419237, AF492350, AF531473, AY126697, AY689190, NC-005971) 对比有 8 个核苷酸突变位点, 以 C 变为 T 和 T 变为 C 居多。突变中以转换类型居多。

## 3 讨论

### 3.1 mtDNA *cyt b* 基因全序列核苷酸组成

郟县红牛 3 个个体中的 2 个 mtDNA *cyt b* 基因全序列长度均为 1140 bp, 不存在序列长度差异, 所有序列均以 ATG 为起始密码子, 中间无插入、缺失或终止密码子, 均以终止密码子 AGA 结束, A+T 平均的含量为 56.7% 显著高于 G+C 平均含量 43.4%, 可见郟县红牛 mtDNA *cyt b* 基因富含碱基 A 和 T。

### 3.2 mtDNA *cyt b* 基因全序列的变异和多态性分析

以 Anderson 等<sup>[14]</sup>测定的欧洲牛 mtDNA *cyt b* 基因全序列 (14 514~15 653 bp) (GenBank 登录号: V00654 或 J01394) 为标准对郟县红牛的 *cyt b* 基因全序列的核苷酸变异和多态性进行分析, 只检测到 1 个单核苷酸替代突变位点 C 变为 T, 与其他普通牛相比最多也只有 2 个替代突变 (AY074963, AB074968, AY526085)。与瘤牛 (AF419237, AF492350, AF531473, AY126697, AY689190, NC-005971) 对比有 8 个核苷酸突变位点, 以 C 变为 T 和 T 变为 C 居多, 与羯牛 (AF348593) 相比 41 个突变位点, 以 C 变为 T 和 T 变为 C 居多。与牦牛斑羚牛欧洲野牛突变位点更多, 多达 50 个以上 (AY374124, 82889,

Y15005)。突变中以转换类型居多。对此我们可以看出, 郟县红牛为普通牛中, 与瘤牛的亲缘关系比较近, 与其他牛种相差较远, 要想探询郟县红牛的起源以及与其它牛种的进化关系, 还需进行多个体的系统进化分析。

参考文献:

[1] 姚永刚, 张亚平. 线粒体 DNA 和人类进化[J]. 动物学研究, 2000, 21 (5) :392- 406 .  
 [2] Digby T J, Gray M W, Lazier C B. Rainbow trout mitochondrial DNA sequence and structure characteristics of the noncoding control region and flanking tRNA genes [J]. Gene, 1992, 113 :179- 204 .  
 [3] Kocher T D, Thomas W K, Meyer A, et al. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals : amplification and sequencing with conserved primers [J]. Proc Natl acad Sci USA, 1989, 86 :6196- 6200 .  
 [4] Vladimir O, Poltoraus A, Zhivotovsky L A, et al. Mitochondrial DNA sequence diversity in Russians [A]. Federation of European Biochemical Societies Letter 179- 201 .  
 [5] 曹祥荣, 束峰珏, 张锡然, 等. 毛冠鹿与 3 种麂属动物的线粒体细胞色素 b 的系统进化分析[J]. 动物学报, 2002, 48 (1) : 44- 49 .  
 [6] Meyer A, Wilson A C. Origin of tetrapods inferred from their mitochondrial DNA affiliation to lungfish [J]. J Mol Evol, 1990, 31 :359- 364 .  
 [7] Smith M F, Patton J L. Variation in mitochondrial cytochrome b sequence in natural populations of south akodon-

tine rodents [J]. Mol Biol Evol, 1991, 8 (1) :85- 103 .  
 [8] Cibele R B, Moreira A M. Molecular phylogeny of Genus Oryzomys (Rodentia, Sigmodontinae) based on cytochrome b DNA sequences [J]. Mol Phy Evol, 2001, 18 (2) :282- 292 .  
 [9] 周继亮, 张亚平, 黄美华, 等. 蝮亚科蛇线粒体细胞色素 b 基因序列分析及其系统发育[J]. 动物学报, 2001, 47 (4) 361- 366 .  
 [10] 王义权, 周开亚, 徐璐珊, 等. 几种游蛇的 Cyt b 基因片段序列分析及其演化关系[J]. 动物学报, 1999, 45 (3) :332- 338 .  
 [11] 雷初朝, 陈宏, 杨公社, 等. 中国部分黄牛品种 mtDNA 遗传多态性分析[J]. 遗传学报, 2004, 31(1) :57- 62 .  
 [12] Zardoya R, Meyer A. Phylogenetic performance mitochondrial protein coding genes in resolving relationship among vertebrates [J]. Mol Biol Evol, 1996, 13 :933- 942 .  
 [13] Irwin D M, Kocher T D, Wilson A C. Evolution of cytochrome b gene of mammals [J]. J Mol Evol, 1991, 32 :128- 144 .  
 [14] Anderson S, de Bruijn M H L, Coulson A B, et al. Complete sequence of bovine mitochondrial DNA conserved features of the mammalian mitochondrial genome [J]. J Mol Biol, 1982, 156 :683- 717 .  
 [15] Chen H, Leibenguth F. Studies on multilocus fingerprints, RAPD markers and mitochondrial DNA of a gynogenetic fish (Carassius auratus gibelio) [J]. Biochem Genet, 1995, 33 :297- 306 .  
 [16] Chenna, Ramu, Sugawara, et al. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs [J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31 (13) :3497- 3500 .  
 [17] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3 :Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment [J]. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5 :150- 163 .

\*\*\*\*\*  
 (上接第 4 页) 表 4 各调亏处理产量性状

| 处理  | 穗长(cm) | 穗粗(cm) | 秃尖(cm) | 穗粒数(cm) | 千粒重(g) | 单株经济产量(g) | 与 CK 比增减% |
|-----|--------|--------|--------|---------|--------|-----------|-----------|
| 苗期轻 | 16.50  | 4.20   | 2.60   | 315     | 320.8  | 100.20    | - 1.47    |
| 苗期中 | 16.90  | 4.25   | 2.50   | 326     | 320.6  | 103.62    | 1.90      |
| 苗期重 | 16.58  | 4.13   | 2.75   | 302     | 315.6  | 95.00     | - 6.58    |
| CK  | 16.70  | 4.22   | 2.30   | 320     | 320.1  | 101.69    | 0.00      |

对产量的影响在 1%水平上差异不显著, 重度调亏处理对产量的影响在 1%水平上差异显著。分析表明, 苗期土壤持水量在田间持水量的 50%以上时, 可以考虑不灌, 这样可以起到蹲苗促根生长的作用。本试验是在苗期的中后期 6.5 片叶的时候开展的调亏处理, 在苗期的早期是否适宜调亏处理还有待进一步试验。

表 5 方差分析结果

| 处理     | 单株经济产量(g) | 5%显著水平 | 1%显著水平 |
|--------|-----------|--------|--------|
| 苗期轻度调亏 | 100.20    | b      | A      |
| 苗期中度调亏 | 103.62    | a      | A      |
| 苗期重度调亏 | 95.00     | c      | B      |
| CK     | 101.69    | ab     | A      |

### 3 小 结

在玉米营养生长期的苗期, 各调亏处理株高、茎粗、单株叶面积、单株冠风干重和单株根风干重均低于 CK, 但根冠比、根长高于 CK, 根的活力增

强, 提高了根系的吸收性能和吸收范围, 在根的形态上表现出一定的补偿生长, 起到苗期蹲苗促根生长的作用。各调亏处理叶片水分利用效率均高于对照。苗期中度调亏增产 1.90%, 苗期轻度、重度调亏处理分别减产 1.47%和 6.58%。苗期轻度调亏和中度调亏处理产量与 CK 比差异不显著。苗期土壤持水量在田间持水量的 50%以上时, 可以考虑不灌, 这样可以起到蹲苗促根生长的作用。本试验是在苗期的中后期 6.5 片叶的时候开展的调亏处理, 在苗期的早期是否适宜调亏处理还有待进一步试验。

参考文献:

[1] 史文娟, 胡笑涛, 康绍忠. 干旱缺水条件下作物调亏灌溉技术研究状况与展望[J]. 干旱地区农业研究, 1998, 16(2) 84- 88 .  
 [2] 康绍忠, 史文娟, 胡笑涛, 等. 调亏灌溉对玉米生理指标及水分生产效率的影响[J]. 农业工程学报, 1998, 14(2):82- 87 .  
 [3] 胡笑涛, 梁宗锁, 康绍忠. 模拟调亏灌溉对玉米根系生长及水分利用效率的影响[J]. 灌溉排水, 1998, 17(2):11- 15 .  
 [4] 孟兆江, 刘安能, 庞鸿宾, 等. 夏玉米调亏灌溉的生理机制与指标研究[J]. 农业工程学报, 1998, 14(4) :88- 92 .