

滇南小耳猪遗传多样性的血液蛋白电泳研究*

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 本文采用蛋白电泳技术研究滇南小耳猪血液蛋白多态性。共分析了滇南小耳猪 32 个遗传位点,其中 AKP、CAT、ES、PA、6PGD 和 TF 等 6 个位点检测到多态性,多态位点百分比 $P = 0.1875$,平均杂合度 $H = 0.0712$ 。结果表明滇南小耳猪的血液蛋白多态程度较高,反映在蛋白质水平上的遗传多样性较为丰富。

关键词 滇南小耳猪,血液蛋白电泳,平均杂合度

A study on genetic diversity of the Diannan Small-eared Pig detected by the blood protein electrophoresis/HU Wen-Ping¹⁾, LIAN Lin-Sheng¹⁾, SU Bing²⁾, NIE Long²⁾, ZHANG Ya-Ping²⁾

Abstract In this paper, protein electrophoresis was conducted to analyze the blood protein polymorphism of Diannan Small-eared Pig. Out of 32 genetic loci surveyed, six (AKP, CAT, ES, PA, 6PGD and TF) were found polymorphic, with mean heterozygosity (H) being 0.0712. The results indicated that the blood protein polymorphism of Diannan Small-eared Pig is high, and thus the Diannan Small-eared Pig is wealthy of genetic diversity at the protein level.

Key words the Diannan Small-eared Pig, blood protein electrophoresis, mean heterozygosity

Author's address 1)College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201
2)Laboratory of Cellular and Molecular Evolution, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223

云南由于独特的地理位置和复杂多样的气候和地形地貌,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,保留着许多独特的家畜地方品种和类型,滇南小耳猪就是其中具有特色的优良华南型地方品种。滇南小耳猪数量大,分布广,能适应湿热气候和放牧为主的饲养条件,具有早熟易肥,屠宰率高,肉质好等特点^[1]。多年来有关滇南小耳猪这一地方猪种的研究偏重于体形外貌、生产性能以及品种的选育、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。

生物多样性研究是当前社会研究的一个热点,保护生物多样性的核心就是保种,其实质是保存品种的基因库,即保存群体所具有的基因种类及其特有的基因组合体系。本研究采用蛋白电泳技术,对滇南小耳猪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学基础资料和依据。

1 材料与方

1.1 试验材料

本试验在云南省西双版纳州种猪场共采集了 40 头滇南小耳猪(♂ 22 头、♀ 18 头)的血液样品 ,被采血的滇南小耳猪均为来源于原产地、具有不同血统的纯种滇南小耳猪 ,而且未受外来猪种血统的干扰。

每头猪耳静脉采血 5 ~ 10 ml ,血液用肝素抗凝。首先 ,在室温下以 1000 r/min 离心 10 min ,吸取上层血浆部分。然后 ,下层血细胞部分以 5 ~ 10 倍体积生理盐水洗涤 ,以 1000 r/min 离心 10min ,弃去上层清液 ,重复洗涤一次 ,向离心得到的红细胞部分加入少量蒸馏水使红细

表 1 滇南小耳猪蛋白多态分析位点及缓冲系统
Table 1 Genetic loci of Diannan Small-eared Pig and buffer system

中文名	英文缩写	标准名称	组织来源	缓冲系统
Chinese name	Symbol	Enzymatic system	Tissue source	Buffer system
1 乙醇脱氢酶	ADH	BC1.1.1.1	红细胞溶血液	II
2 腺苷激酶	AK	EC2.7.4.3	红细胞溶血液	II
3 白蛋白	ALB	/	血 浆	III
4 碱性磷酸酶	AKP	EC3.1.3.1	血 浆	III
5 过氧化氢酶	CAT	EC1.11.1.6	红细胞溶血液	VI
6 肌酸激酶	CK	EC2.7.3.2	红细胞溶血液	I
7 铜蓝蛋白	CP	/	血 浆	V
8 硫锌酰胺脱氢酶	DIA	EC1.6.4.3	红细胞溶血液	VI
9 脂酶-1	ES-1	EC3.1.1.1	红细胞溶血液	I
10 脂酶-2	ES-2	EC3.1.1.1	血 浆	IV
11 脂酶-3	ES-3	EC3.1.1.1	血 浆	IV
12 葡萄糖脱氢酶	GLC	EC1.1.1.47	红细胞溶血液	II
13 谷氨酸脱氢酶	GLD	EC1.4.1.2	红细胞溶血液	II
14 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶	G6PD	EC1.1.1.49	红细胞溶血液	VII
15 磷酸葡萄糖异构酶	GPI	EC5.3.1.9	红细胞溶血液	VII
16 结合珠蛋白	HAP	/	血 浆	III
17 β-羟丁酸脱氢酶	HBDH	EC3.1.1.31	红细胞溶血液	I
18 己糖激酶	HK	EC2.7.1.1	红细胞溶血液	I
19 亮氨酸氨基肽酶	LAP	EC3.4.11.1	血 浆	III
20 乳酸脱氢酶-1	LDH-1	EC1.1.1.27	红细胞溶血液	I
21 乳酸脱氢酶-2	LDH-2	EC1.1.1.27	红细胞溶血液	I
22 苹果酸脱氢酶	MDH	EC1.1.1.37	红细胞溶血液	I
23 苹果酸酶	ME	EC1.1.1.40	红细胞溶血液	I
24 前白蛋白	PA	/	血 浆	III
25 血浆巨球蛋白	Pα	/	血 浆	III
26 肽酶-A	PEP-A	EC3.4.13.11	红细胞溶血液	I
27 磷酸葡萄糖变位酶	PGM	EC2.7.5.1	红细胞溶血液	I
28 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶	6PGD	EC1.1.1.43	红细胞溶血液	I
29 山梨醇脱氢酶	SDH	EC1.1.1.14	红细胞溶血液	II
30 转铁蛋白	TF	/	血 浆	III
31 超氧化物歧化酶	TO	EC1.15.1.1	红细胞溶血液	I
32 黄嘌呤脱氢酶	XDH	EC1.2.1.37	红细胞溶血液	II

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^[2,3],所检测的血液蛋白质和同工酶29种,共计32个遗传座位(见表1)。

1.3 数据处理

参考文献[4]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,计算每位点的杂合度(h)及平均杂合度(H):

$$h = 1 - \sum q_i^2$$

q_i 为某一位点的第*i*个等位基因的频率;

$$H = \sum h/r$$

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

试验共检测了滇南小耳猪29种蛋白质和同工酶,32个遗传座位,其中6个座位表现出多态性,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。

表2 血液蛋白多态位点基因频率

Table 2 Gene frequency of blood protein polymorphic loci

位点 Loci	等位基因 Allele	基因频率 Gene frequency	位点 Loci	等位基因 Allele	基因频率 Gene frequency
AKP	A	0.1250	PA	A	0.5513
	B	0.8250			
	C	0.0500		B	0.4487
CAT	A	0.6750	6PGD	A	0.5500
	B	0.3250		B	0.4500
ES	A	0.9750	TF	A	0.5128
	B	0.0250		B	0.4872

碱性磷酸酶 AKP 位点基因频率以 AKP^B 最高,这与我国4个猪种(八眉猪、黑河猪、内江猪、荣昌猪)^[5]以及撒坝猪^[6]的基因频率一致(见表3)。前白蛋白共检测到AA、AB、BB三种表现型,基因频率以PA^A为高。TF只检测到1对等位基因,未发现国内许多研究中所报道的与TF^A、TF^B等位的第3个基因TF^C,推测可能由于TF^C基因频率低而未检测到。本试验研究

中尚在 CAT、ES、6PGD 等位点检测出多态性 ,这几个位点存在多态性 ,在一些研究中曾有过报道^[6,7]。在云南撒坝猪等其它猪种中 ,发现 CAT、ES、6PGD 等表现出多态性。

表 3 6 个品种猪碱性磷酸酶的基因频率*
Table 3 Gene frequency of AKP in six pig breeds

品种 Breeds	样本数 No. of samples	基因频率 Gene frequency			品种 Breeds	样本数 No. of samples	基因频率 Gene frequency		
		AKP ^A	AKP ^B	AKP ^C			AKP ^A	AKP ^B	AKP ^C
八眉猪 Bamei Pig	61	0.3361	0.6475	0.0164	黑河猪 Heihe Pig	41	0.1707	0.6463	0.1830
内江猪 Neijiang Pig	70	0.1929	0.6786	0.1286	荣昌猪 Rongchang Pig	48	0.2088	0.4688	0.3229
撒坝猪 Saba Pig	27	0.3077	0.5770	0.1153	滇南小耳猪 Diannan Small-eared Pig	40	0.1250	0.8250	0.0500

* 资料来源 :八眉猪、黑河猪、内江猪和荣昌猪^[5] ,撒坝猪^[6]。
Data source : Bamei Pig , Heihe Pig , Neijiang Pig and Rongchang Pig^[5] . Saba Pig^[6]

2.2 滇南小耳猪群体的遗传多样性

6 个蛋白多态座位的杂合度值见表 4。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。经计算 ,滇南小耳猪的 *P* =0. 1875 , *H* =0. 0712。

表 4 滇南小耳猪 6 个蛋白多态座位杂合度值(*h*)
Table 4 Heterozygosity (*h*) of six protein polymorphic loci of Diannan Small-eared Pig

AKP	CAT	ES	PA	6PGD	TF
0.3013	0.4388	0.0488	0.4947	0.4950	0.4997

表 5 云南撒坝猪、大河猪多态位点基因频率*
Table 5 Gene frequency of blood protein polymorphic loci of Yunnan Saba , Dahe Pig breeds

位点 Loci	等位基因 Allele	撒坝猪 Saba Pig	大河猪 Dahe Pig
AKP	A	0.3077	0.1607
	B	0.5770	0.4464
	C	0.1153	0.3929
CAT	A	0.3148	0.1136
	B	0.6111	0.7273
	C	0.0741	0.1591
ES	A	0.7885	0.7414
	B	0.2115	0.2586
PA	A	0.5600	0.4500
	B	0.4400	0.5500
TF	A	0.4615	0.3276
	B	0.5385	0.6207
	C	0	0.0517

* 资料来源 :撒坝猪^[6] Data source : Saba Pig^[6]

以往的蛋白多态性研究表明 ,在哺乳动物有一定水平的种内差异 ,多态座位百分比(*P* 值)平均为 0. 222 ,平均杂合度(*H* 值)平均为 0. 050^[8]。相比之下 ,滇南小耳猪的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 70 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相当水平的平均杂合度值,其中猪的平均杂合度值在 0.1 左右^[7]。然而,在他们的研究中,所分析的遗传座位仅 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,滇南小耳猪的蛋白多态程度较高,其遗传背景较为丰富。

2.3 滇南小耳猪与云南撒坝猪、大河猪的遗传分化关系

蛋白质或酶的存在受基因控制,各种蛋白质或酶在遗传上表现不同,同一物种的不同品种(类群)相应的蛋白质电泳呈现多态现象,因此,蛋白质多态性以及等位基因在不同种群中分布和差异程度,可作为动物分类和探索品种起源、进化的重要依据之一。滇南小耳猪为分布云南广大北热带和南亚热带地区、属华南型的优良地方品种,而撒坝猪和大河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,撒坝猪主产于滇中楚雄彝族自治州的禄劝、武定县一带,大河猪主产于云南省富源县。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^[1,9]。我们曾采用同样的蛋白电泳技术,对撒坝猪^[6]、大河猪的血液蛋白多态性进行过研究,在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^[10]的方法,由滇南小耳猪、撒坝猪和大河猪 3 个品种共有的多态遗传座位 AKP、CAT、ES、PA、TF 的等位基因频率(表 2、表 5)计算出撒坝猪与大河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。云南地方猪种的地理分布、地理隔离与其遗传分化存在一定的相关性,本研究结果与有关云南地方品种的划分^[1,9]相一致。

致谢 在采血过程中得到西双版纳州种猪场胡建伟等同志的大力协助,谨致谢意。

参 考 文 献

- 1 黄启昆等编著. 云南省家畜家禽品种志. 云南科技出版社,1987
- 2 Pasture N, Pasture G et al. Practical isozyme genetics. New York: Haslsted Press, 1990
- 3 Shaw C R, Prasad R. Starch gel electrophoresis of enzymes—a compilation of recipes. *Biochem. Genet.* 1970, 4: 297~320
- 4 佐佐木清纲著,家畜的血液型及其应用. 李世安译,上海科技出版社,1982
- 5 唐海东,路兴中. 猪血清碱性磷酸酶(AKP)多态型的研究初报. 上海农学院学报,1990,8(3): 183~185
- 6 胡文平,连林生. 撒坝猪血液蛋白多态性研究. 云南农业大学学报,1995,10(3): 231~235
- 7 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
- 8 Nevo E et al. The evolutionary significance of genetic diversity, ecological demographic and life history correlates in evolutionary dynamics of genetics diversity. *Springer*, Berlin, 1984
- 9 张仲葛等编写. 中国猪品种志. 上海科学技术出版社,1986
- 10 Nei M. Genetic distance between population. *Amer. Nat.*, 1972, 106: 283~292