

云南地区恒河猴线粒体 DNA 控制区遗传多态性研究

禹文海¹, 黄芬², 杨凤梅¹, 鲁帅尧¹, 赵远¹, 王俊斌¹,
陈丽雄¹, 李艳艳¹, 和占龙¹

- (1. 中国医学科学院北京协和医学院 医学生物学研究所, 云南省重大传染病疫苗研发重点实验室, 昆明 650118;
2. 昆明理工大学生命科学与技术学院, 昆明 650224)

【摘要】 目的 从分子水平探讨云南地区恒河猴遗传多样性, 为今后开展恒河猴遗传资源的保护及合理利用提供借鉴和背景资料。方法 采用 PCR 直接测序法测定云南地区恒河猴 96 份样品的线粒体 DNA 控制区全序列, 用 Mege 4.0 和 DNA SP 软件对变异位点数、简约信息位点数、单倍型、单倍型多样性、核苷酸多样性等遗传信息进行分析, 基于邻接法 (neighbor-joining, NJ) 和最小进化法 (minimum-evolution, ME) 构建系统发生树。结果 在 96 份样品中, 共检测出了 149 个多态性位点, 定义了 46 种单倍型, 单倍型多样性 (Hd) 为 0.968 ± 0.007 , 核苷酸多样性 (Pi) 为 0.020。结论 云南地区恒河猴存在着较丰富的遗传多态性。

【关键词】 恒河猴; 线粒体 DNA; 单倍型; 遗传多态性

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)04-0030-06

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.04.008

Genetic Polymorphism of Mitochondrial DNA Control Region in *Macaca mulatta* from Yunnan Province

YU Wen-hai¹, HUANG Fen², YANG Feng-mei¹, LU Shuai-yao¹, ZHAO Yuan¹,
WANG Jun-bin¹, CHEN Li-xiong¹, LI Yan-yan¹, HE Zhan-long¹

- (1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research & Development on Severe Infectious Diseases, Kunming 650118, China;
2. Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China)

【Abstract】 Objective To analyze the genetic diversity and phylogenetic of *Macaca mulatta* in Yunnan Province, which provide important reference and background data for researches of macaca mulatta protection and reasonable application. **Methods** Ninety six blood samples of *Macaca mulatta* were collected for amplifying the complete sequences of mitochondrial DNA control region by polymerase chain reaction (PCR). The variation sites, parsimony informative sites, haplotypes, haplotype diversity, and nucleotide diversity were analyzed using Mega 4.0 and DNA SP software. The phylogenetic tree was constructed by neighbor-joining (NJ) and minimum-evolution (ME) methods. **Results** One hundred and forty-nine variation sites and 46 haplotypes were found in the ninety-sixth *Macaca mulatta*, the haplotype diversity (Hd) was 0.968 ± 0.007 and nucleotide diversity (Pi) was 0.020. The phylogenetic analysis based on mitochondrial control region showed that these *Macaca mulatta* lived in Yunnan was divided into two sister groups geographically.

【基金项目】 云南省应用基础研究面上项目 (编号: 2008ZC069M, 2009ZC184M); 云南省技术创新人才培养基金 (2009CI117)。

【作者简介】 禹文海 (1981 -), 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 实验动物学。E-mail: wenhaiyu1234@163.com。

【通讯作者】 黄芬 (1981 -), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 生物医学工程。E-mail: huangfen6789@163.com; 和占龙 (1972 -), 男, 副研究员, 研究方向: 实验动物学。E-mail: hzl@imbcams.com.cn。

Conclusions The results of this study indicate a high variation and phylogenetic evolution relationship of *Macaca mulatta* in Yunnan province.

【Key words】 *Macaca mulatta*; mtDNA; Haplotype; Genetic polymorphism

恒河猴 (*Macaca mulatta*) 隶属于灵长目 (Primates) 猴科 (Cercopithecidae) 猕猴属 (*Macaca*), 为国家 II 级保护动物和重要的实验灵长类动物, 是非人灵长类中分布最广且数量最多的一个类群, 广泛分布于中国、缅甸、尼泊尔、印度北部、孟加拉国、巴基斯坦等地。在我国主要分布于南方诸省(区), 以广东、广西、云南、贵州等地分布较多, 福建、安徽、江西、湖南、湖北、四川次之, 海南、陕西、山西、河南、河北、青海、西藏等局部地点也有分布。由于恒河猴在形态、生殖生理特性和生化代谢等方面与人类非常相似, 而且遗传物质与人类具有较高的同源性, 是进行医学和生物学等领域研究较为理想的实验动物^[1]。

线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 呈母系方式遗传, 无重组, 进化速率快。其中, mtDNA 控制区的进化速度是线粒体 DNA 其它区域的 3 ~ 5 倍, 而且不编码任何基因, 在生物遗传进化及种群遗传变异程度的研究中应用广泛^[2-6]。本研究以分布于云南不同地区的 96 份恒河猴样品作为研究对象, 采用 DNA 测序技术测定 mtDNA 控制区全序列, 初步确定云南地区恒河猴群体遗传多态性, 为今后开展恒河猴遗传资源保护和合理开发利用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

96 份恒河猴全血样品来自中国医学科学院医学生物学研究所全国医学灵长类研究中心实验动物部 [实验动物生产许可证: (滇) SCXK2010-0006]。其中, 23 份为本中心自繁恒河猴(昆明市), 其余 73 份恒河猴为从野外捕获的原种群, 来源地清晰。在 73 份野外恒河猴中, 景东县 21 份、镇沅县 21 份、宁蒗县 24 份、保山市 2 份、牟定县 2 份、邓川镇 1 份、镇康县 1 份、维西县 1 份。样品来源地理位置见图 1。

1.2 试剂和仪器

Axygen DNA 提取试剂盒 (杭州爱思进生物技术有限公司), 2 × PCR Master Mix、ddH₂O、DNA marker DL2000 和 6 × 电泳上样缓冲液 (北京天根生化科技有限公司), 台式离心机 (Legend Micro



图 1 云南地区恒河猴样品来源地理位置
Fig. 1 The sampling sites of the *Macaca mulatta* in Yunnan province

21R), 梯度 PCR 仪 (Bio-Rad C1000), DYY-2C 型电泳仪电源和 DYCP-31DN 型电泳仪 (北京市六一仪器厂), UVP 凝胶成像系统 (美国基因有限公司)。

参考相关文献设计引物^[7,8], 由上海生工生物工程公司合成。上游引物 F: CCTTACCTGAA TTGGAAGCGAACC; 下游引物 R: GGCCAGGACC AAGCCTATTT。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 的提取: 静脉抽取全血 2 mL, EDTA 抗凝。采用 Axygen DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA, 详细操作步骤见说明书。-20℃ 保存备用。

1.3.2 PCR 扩增: 反应体积为 25 μL, 上游引物 F 和下游引物 R 各 (20 μmol/L) 0.5 μL, 模板 DNA 2 μL, 2 × PCR Master Mix 12.5 μL, ddH₂O 9.5 μL。反应条件为 95℃ 预变性 6 min; 然后 94℃ 变性 1 min, 66℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 40 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。

1.3.3 琼脂糖凝胶电泳及 PCR 产物直接测序: 用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 参照 DNA marker DL2000, 对 1 450 bp 左右的 PCR 产物进行纯化测序, 测序由上海杰李生物技术有限公司完成。

1.3.4 数据处理与结果分析: 每个个体测得的正反链序列用 DNASTar 软件进行分析拼接, Clustalx 1.8 软件进行序列比对并辅以人工校对, Mgea 4.0 软件分析序列的碱基组成、转换和颠换, 用 DNA SP (Version 4.10.8) 软件分析变异位点数 (variation

sites)、简约信息位点数 (parsimony informative sites)、单倍型数 (haplotypes, h)、单倍型多样性 (haplotype diversity, Hd)、核苷酸多样性 (nucleotide diversity, Pi)、平均核苷酸差异 (average No. of nucleotide differences, K) 等。以食蟹猴 (GenBank 登录号: FJ906803) 为外群, 用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 和最小进化法 (minimum-evolution, ME) 构建分子系统发生树。

2 结果

2.1 PCR 产物电泳检测结果

PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后得到片段大小约为 1 450 bp 左右的清晰条带 (图 2), 与预期结果一致。

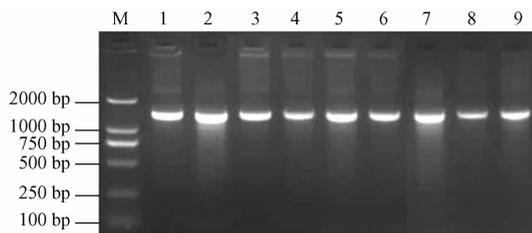


图 2 恒河猴线粒体 DNA 控制区及其两侧部分序列的 PCR 产物

注: M. 分子量标准 DL2000; 1~9. 样品编号

Fig. 2 PCR products of mtDNA control region and its flanking sequences in *Macaca mulatta*.

Note: M. DNA marker DL2000; 1~9. number of samples

2.2 单倍型分布

PCR 扩增产物测序后, 利用 BLAST 和 GenBank

中的恒河猴线粒体序列进行比较, 同源性达到 91.5% 以上, 说明该序列即为目的基因。经 DNA SP 软件分析, 所有 96 个序列定义了 46 个不同的单倍型 (H1-H46), 各单倍型在不同种群中的分布情况见表 1。有 7 个单倍型 (H1、H5、H13、H25、H26、H27、H28) 为部分群体间共享的单倍型, 单倍型 H1 为镇沅、景东、维西三个群体共享, 单倍型 H5 为镇沅和昆明自繁群体共享, 单倍型 H13 为镇沅和景东群体共享, 单倍型 H25 为保山和昆明自繁群体共享, 单倍型 H26 为镇沅和景东群体共享, 单倍型 H27、H28 为宁蒗和昆明自繁群体共享, 其余均为各群体特有单倍型。镇沅群体以 H1 (6/21) 和 H13 (4/21) 为主要单倍型, 景东群体以 H26 (5/21)、H13 (3/21) 和 H29 (4/21) 为主要单倍型, 宁蒗群体以 H11 (3/24)、H18 (7/24)、H27 (4/24) 和 H28 (4/24) 为主要单倍型, 昆明自繁群体以 H22 (5/22) 和 H37 (3/22) 为主要单倍型。

以本研究测定的单倍型 H1 为参考序列, 在 96 份样品中, 共检测出了 149 个多态性位点 (变异位点分布情况见图 3), 约占 13.70%。其中单一多态位点 42 个, 约占 3.86%; 简约信息位点 107 个, 约占 9.84%。两核苷酸间的单一多态位点为 41 个, 约占 3.77%; 两核苷酸间的简约信息位点为 105 个, 约占 9.66%。三核苷酸间的单一多态位点为 1 个, 约占 0.09%; 三核苷酸间的简约信息位点为 2 个, 约占 0.18%。核苷酸变异包括转换、颠换、插入和缺失, 所有核苷酸多态位点主要以转换为主。

表 1 46 个单倍型在云南地区不同恒河猴群体中的分布

Tab. 1 Distribution of 46 haplotypes in different *Macaca mulatta* populations in Yunnan province

镇沅 (21) Zhenyuan	景东 (21) Jingdong	宁蒗 (24) Ninglang	昆明 (23) Kunming	牟定 (2) Mouding	保山 (2) Baoshan	邓川 (1) Dengchuan	镇康 (1) Zhenkang	维西 (1) Weixi
H1 (6)	H1 (2)	H11 (3)	H5 (1)	H30 (1)	H23 (1)	H46 (1)	H32 (1)	H1 (1)
H3 (1)	H2 (1)	H14 (1)	H21 (1)	H36 (1)	H25 (1)			
H5 (2)	H4 (1)	H15 (1)	H22 (5)					
H6 (1)	H9 (1)	H17 (2)	H24 (1)					
H7 (1)	H10 (1)	H18 (7)	H25 (1)					
H8 (1)	H12 (1)	H27 (4)	H27 (1)					
H13 (4)	H13 (3)	H28 (4)	H28 (1)					
H16 (1)	H20 (1)	H40 (1)	H35 (2)					
H19 (1)	H26 (5)	H44 (1)	H37 (3)					
H26 (1)	H29 (4)		H38 (2)					
H31 (1)	H33 (1)		H39 (1)					
H34 (1)			H41 (1)					
			H42 (1)					
			H43 (1)					
			H45 (1)					

表 2 云南地区恒河猴群体内线粒体 DNA 控制区核苷酸序列多态性

Tab. 2 Nucleotide polymorphism of mtDNA control region within the *Macaca mulatta* population in Yunnan province

群体 Population	样本数 Sample size	变异位点 variation sites	简约信息位点 Parsimony sites	单倍型 h	单倍型多 样度 Hd	核苷酸 多样性 Pi	平均核苷 酸差异 K	Tajima's D
镇沅 Zhenyuan	21	39	28	12	0.895 ± 0.050	0.010	11.200	0.131
景东 Jingdong	21	75	27	11	0.905 ± 0.040	0.015	16.000	-0.939
宁蒗 Ninglang	24	41	37	9	0.866 ± 0.042	0.014	14.721	1.309
昆明 Kunming	23	114	78	15	0.941 ± 0.034	0.024	26.190	-0.610
牟定 Mouding	2	3	0	2	1.000 ± 0.500	0.003	3.000	/
保山 Baoshan	2	60	0	2	1.000 ± 0.500	0.055	60.000	/
邓川 Dengchuan	1	/	/	1	/	/	/	/
镇康 Zhenkang	1	/	/	1	/	/	/	/
维西 Weixi	1	/	/	1	/	/	/	/

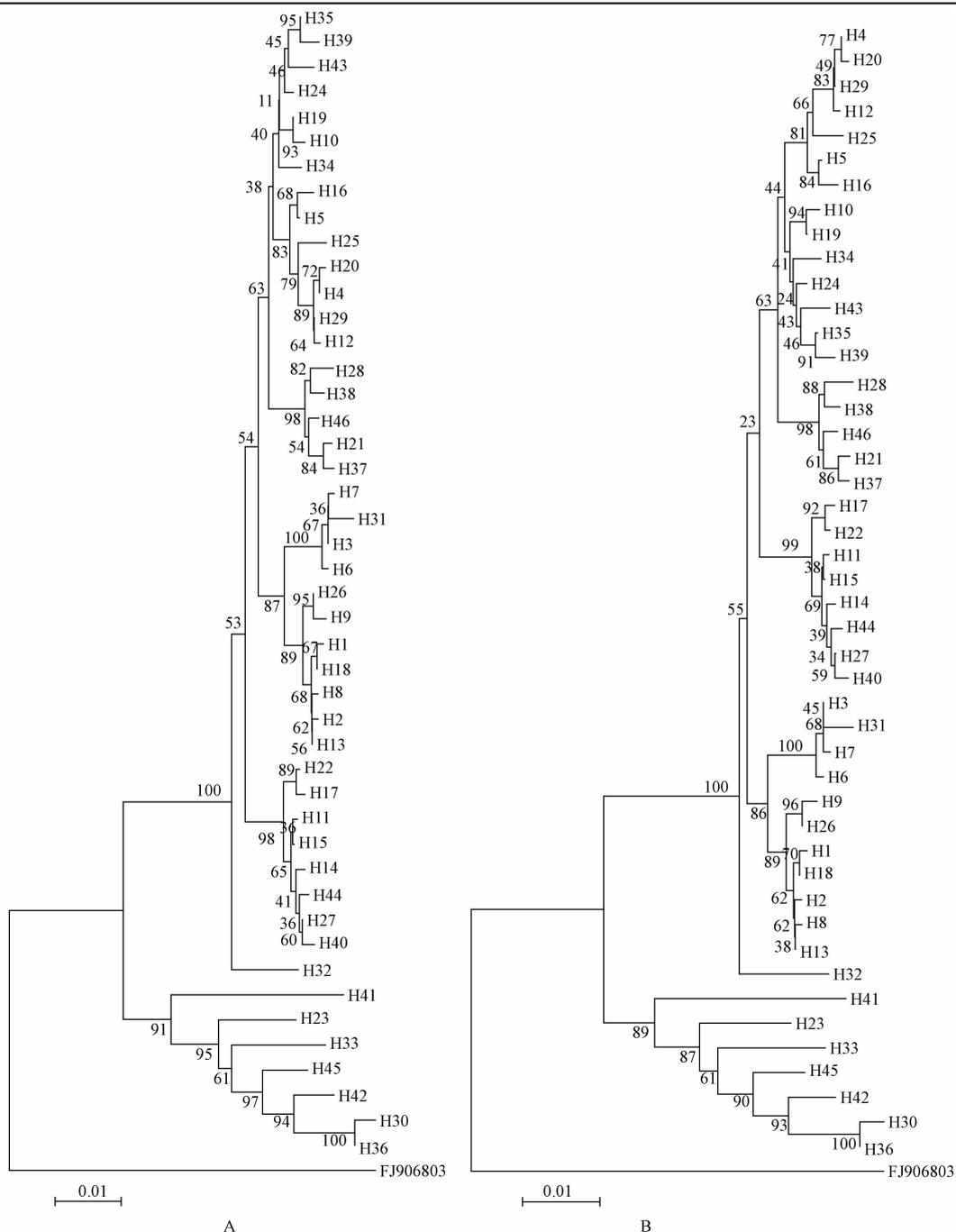


图 4 基于线粒体 DNA 控制区构建的 NJ(A) 和 ME(B) 系统树

Fig. 4 Phylogenetic trees constructed using NJ (A) and ME (B) methods based on the complete sequences of mtDNA control region

3 讨论

恒河猴在我国《国家重点保护野生动物名录》中被列为国家二级保护动物,在《中国濒危动物红皮书兽类》中被列为易危种。而遗传多样性的低是评判物种是否能够长期生存的依据,遗传多样性的丧失对物种生存带来直接的不利影响,可以使物种更易灭绝^[9]。因此,对恒河猴遗传资源进行保护及合理开发利用显得非常的重要。许多学者从蛋白质水平对中国恒河猴进行了分析,结果表明中国恒河猴在蛋白质水平上的遗传标记数量有限、变异不够丰富、多态性有局限。目前认为 DNA 分析是最有效的遗传多样性分析方法,中国恒河猴 DNA 分子水平的遗传多态性主要见于对主要组织相容性复合体(MHC)、微卫星座位及线粒体 DNA 的研究^[10-14],研究结果表明中国恒河猴表现出了丰富的遗传多样性。

本研究从分子水平研究了云南地区恒河猴遗传多样性,在 96 个恒河猴个体中,共检测出了 149 个多态性位点,定义了 46 种单倍型,其中仅有 7 个单倍型为部分群体间共享,其余均为各群体特有单倍型。各群体的核苷酸多样性(P_i)均较高,从 0.003(牟定)至 0.055(保山),说明云南地区恒河猴遗传多态性较高,遗传资源较丰富。此外,云南地区不同恒河猴群体 Tajima's D 中性检验均不显著($P > 0.10$),这些群体均符合中性突变,说明云南地区恒河猴在过去没有出现群体扩张,群体大小较稳定。

参考文献:

- [1] 鄧琦,陈永昌,陈学进. 猕猴在生物医学研究中的应用[J]. 上海实验动物科学, 2003, 23(1): 59-62.
- [2] Nishibori M, Shimogiri T, Hayashi T, et al. Molecular evidence

for hybridization of species in the genus *Gallus* except for *Gallus varius* [J]. *Anim Genet*, 2005, 36(5): 367-375.

- [3] Wenink PW, Baker AJ, Tilanus MG. Mitochondrial control-region sequences in two shorebird species, the turnstone and the dunlin, and their utility in population genetic studies [J]. *Mol Biol Evol*, 1994, 11(1): 22-31.
- [4] 潘登,符云新,张亚平. 基于线粒体控制区的滇金丝猴群体遗传学研究[J]. 遗传, 2006, 28(4): 432-436.
- [5] 何丽,张于光,李迪强,等. 川金丝猴 mtDNA D-loop 序列遗传多样性分析[J]. 动物学杂志, 2010, 45(1): 70-76.
- [6] 徐怀亮,李地艳,程安春,等. 四川地区猕猴线粒体 DNA 控制区遗传多样性及其种群遗传结构[J]. 兽类学报, 2010, 30(3): 247-255.
- [7] Blancher A, Bonhomme M, Crouau-Roy B, et al. Mitochondrial DNA sequence phylogeny of 4 populations of the widely distributed cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis fascicularis*) [J]. *J Hered*, 2008, 99(3): 254-264.
- [8] 董高华,徐怀亮,帅素容. 藏酋猴线粒体基因组序列测定与进化分析[D]. 硕士学位论文, 2008, 四川农业大学.
- [9] David P. Heterozygosity-fitness correlations: new perspectives on old problems [J]. *Heredity (Edinb)*, 1998, 80(pt5): 531-537.
- [10] 闫熙,李万波. 利用微卫星遗传标记对恒河猴进行遗传同质性分群的探索[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(11): 11-18.
- [11] 张卉,李进华,赵健元,等. 皖南山区猕猴种群的形态特征与微卫星遗传多样性初步分析[J]. 实验动物与比较医学, 2008, 28(4): 225-229.
- [12] 万玉玲,季芳,饶军华,等. 中国不同地域恒河猴 MHC-I 型部分等位基因的调查[J]. 动物学杂志, 2007, 42(2): 1-5.
- [13] 李瑞生,赵爽,高蓉,等. 恒河猴与食蟹猴微卫星 DNA 多态性的比较分析[J]. 中国实验动物学报, 2009, 17(1): 57-60.
- [14] 徐怀亮,汪宴廷,程安春,等. 猕猴 MHC-DPB1 基因外显子 2 多态性研究[J]. 遗传, 2010, 32(6): 588-598.

[修回日期]2012-01-09