



FMMU白化豚鼠DNA指纹图研究初报

DNA指纹图能准确反映群体遗传特征,并为群体的遗传距离和遗传变异度的估测提供一个准确的度量[1][2]。目前,DNA指纹分析技术已成功应用于从人、动物、植物到微生物等的相关研究中[3]。封闭群FMMU白化豚鼠是本室即将育成的一个新品系实验动物。我们对其繁殖性能、生长发育、心电图、血液生化指标、药物敏感性及其耳蜗电位等方面进行了初步研究[4][5][6][7]。结果表明,白化豚鼠听觉灵敏度和缺氧耐受性与花色豚鼠有明显差异,且生长发育正常。本实验研究FMMU白化豚鼠遗传特性,为育成白化豚鼠提供可靠依据和基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 从本室培育的FMMU白化豚鼠群体和繁殖的花色豚鼠封闭群中随机选取健康豚鼠各16只,雌雄各半,体质量(300 ± 50) g。

1.1.2 试剂 各种内切酶、尼龙膜、多引物标记盒Primer- α - Gene Labeling System购自Promega公司;Proteinase K和Triton X-100购自Sigma公司;(α - 32 P) dCTP购自北京亚辉生物工程公司;M13 mp18为华美生物工程公司产品。

1.2 方法

1.2.1 染色体DNA提取 从每只豚鼠心脏采集肝素抗凝血8 ml,按文献[8]所述方法稍加改进,从血液白细胞中提取总DNA,按此法每8 ml血样可得到150 μ g左右的高纯度基因组DNA。

1.2.2 DNA电泳及Southern转移 每样品10 μ g DNA经完全酶切后,用25 cm的1%琼脂糖凝胶在30 V条件下电泳分离48 h,按改进的Southern印迹法,将DNA转移并固定到尼龙膜上。

1.2.3 探针制备 用Cla I酶切M13 mp18 DNA,电泳分离后,离心法回收有效片段作为探针,用多引物标记盒和(α - 32 P) dCTP标记探针,经柱层析(Sephadex G-50)纯化探针。

1.2.4 杂交及放射自显影 尼龙膜浸入适量杂交液中,60 $^{\circ}$ C预杂交6 h,按 1×10^6 cpm/ml加入变性的探针,55 $^{\circ}$ C杂交16~18 h。 $1 \times$ SSC,0.1% SDS洗脱液55 $^{\circ}$ C洗膜两次各30 min,将尼龙膜置于有增感屏和X光片的暗盒中,室温放射自显影1~7 d。

1.2.5 分析方法 所有图带分析均在原始放射自显影X光胶片上进行,所分析图带大小范围为2.0~23.1 kb。胶片上位置相同、自显影强度基本一致的图带视为完全相同的带,同一胶片上的两两个体配对比较,找出它们相同的图带。

2 结果

2.1 DNA指纹图分布特点

M13 mp18探针能与FMMU白化豚鼠和花色豚鼠基因组DNA的HaeIII 酶切片段杂交，产生高度变异的DNA指纹图(图1)，在2.0~23.1 kb之间，图带清晰可见，易于识别。从图1可以看出，FMMU白化豚鼠DNA指纹图带主要集中在大片段区域6.5~23.1 kb之间；普通花色豚鼠的图带多分布于2.3~6.5 kb小片段区域内，有品种特征带趋向。

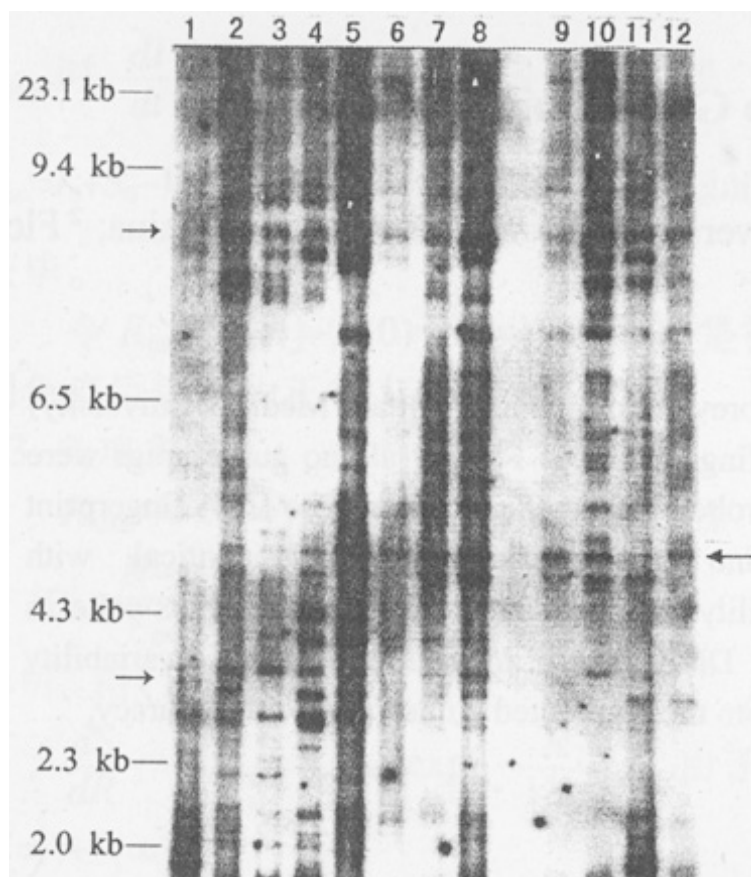


图1 M13 mp18探针产生的豚鼠的DNA指纹图

Fig.1 Guinea pig DNA fingerprints generated by M13mp18 probe

Lane1to lane5 are DNA fingerprints of different FMMU albino guinea pig individuals; Lane 6 to lane11 are DNA fingerprints of different pigmented guinea pig individuals

2.2 两品系DNA指纹图变异性比较

每个品系16个个体，两两配对比较，得到FMMU白化豚鼠与花色豚鼠遗传多态性参数相似系数(F)、共有图带的概率(X)、平均等位基因频率(q)、最低平均杂合率(Ht)、及两个随机个体具有的DNA指纹图谱概率(P)值(表1)。

表 2 FMMU 白化豚鼠与花色豚鼠 DNA 指纹图谱的变异性
Tab.2 Difference of DNA fingerprints between 2 breeds of guinea pigs

Parameter	FMMU albino guinea-pig	Pigmented guinea-pig
<i>F</i>	0.59	0.58
<i>X</i>	0.60	0.58
<i>q</i>	0.36	0.35
Ht	0.64	0.65
<i>P</i>	5.5×10^{-6}	1.5×12^{-6}

2.3 FMMU白化豚鼠DNA指纹图的组织稳定性及重复性检测

从3只白化豚鼠的肝脏血液中提取基因组DNA,用探针M13 mp18和酶HaeIII进行分析,发现同一个体不同组织细胞的DNA指纹图完全相同。同一DNA样品分成几份平行处理,同胶或异胶电泳,同次或不同次杂交,所得DNA指纹图几乎是一致的,差异主要表现为同一条带在不同胶上迁移率不同。

3 讨论

无外源DNA片段的细菌噬菌体M13 mp18最初由Vassart等[9]发现能够作为DNA指纹探针,它由1个15 bp的随机重复单位组成,核心核苷酸序列为5' -GAGGGTGGXGGXTCT-3'。本研究所用探针是从M13 mp18 DNA中用Cla I酶解得到的2.89 kb片段。在2.0~23.1 kb间,平均获得24.2条清晰可辨的图带,所产生的指纹图是高度变化的。应用M13 mp18探针对豚鼠无亲缘关系个体检测所得的指纹图表明,该探针检测的DNA片段其多态性可与Jeffreys的小卫星探针相比拟。

DNA指纹图代表了基因组中多个区域的遗传信息。DNA指纹分析的目的是检测小卫星或微卫星重复单位数目的变异性,因此避免了选用可能产生其它类型变异的限制性内切酶。

在重复实验中发现,M13 mp18探针和HaeIII能在FMMU白化豚鼠上产生不同于花色豚鼠的共有带,即图1在2.3~4.3 kb、6.5~9.4 kb间各产生一条在所有FMMU白化豚鼠个体均有大小相同的图带。而花色豚鼠仅在4.3~6.5 kb之间产生一条共同带(图1右侧箭头)。这些图带能否作为区分白化豚鼠与花色豚鼠的特征带,有待进一步系统研究。

由表2可见,探针M13 mp18和酶HaeIII产生的白化豚鼠的指纹图的各科参数均大于花色豚鼠。很多研究表明[10],DNA指纹图相似系数F是衡量个体间遗传变异程度的可靠参数,所有个体两两配对比较得到F平均值,可以粗略地反映个体间亲缘关系;个体间血缘关系越近,则遗传变异性越低,F值越大。白化豚鼠是从普通花色豚鼠突变种中选育而成,经过若干代选育后使一些基因位点纯化和一定程度的近亲交配,导致其遗传基础变窄。

(责任编辑:陈旺忠)

参考文献:

- [1] Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Individual specific fingerprints of human DNA [J]. *Nature*, 1985, 316:76-9.
- [2] Ali S, Muller CR, Eppelen JT. DNA fingerprinting by oligonucleotide probes specific for simple repeats[J]. *Hum Genet*, 1987, 74:239-43.
- [3] 王洪涛,孙金海. 13/17易位纯合子猪DNA指纹分析[J]. *生物技术通讯*, 1997, 8 (3):112.
- [4] 王洪涛,袁进,顾为望. 封闭群FMMU白化豚鼠繁殖与生长发育的初步观察[J]. *中国实验动物学报*, 1997, 5(1):37-40.
- [5] 顾为望,王洪涛,张嘉宁. 封闭群FMMU白化豚鼠与三色豚鼠血液成分比较[J]. *中国实验动物学报*, 1997, 5(1):23-28.
- [6] 张嘉宁,顾为望,王洪涛. 封闭群FMMU白化豚鼠心电图分析[J]. *上海实验动物科学*, 1999, 19(1): 35-37.
- [7] 林继红,顾为望,单春文. 封闭群FMMU白化豚鼠血小板对诱导剂反映性的实验[J]. *上海实验动物科学*, 1999, 19(2): 127-9.
- [8] Douglas AM, Georges AM, Benton LR, et al. Purification of human leucocyte DNA: proteinase K is not necessary[J]. *Anal Biochem*, 1992, 201:362-5.
- [9] Vassart G, Georgas M, Monsieur R, et al. A sequence of M13 phage detects hypminisatellite in human and animal DNA[J]. *Science*, 1987, 235:683-4.
- [10] Lynch M. The similarity index and DNA fingerprint[J]. *Mol Biol E vol*, 1990, 7

参考文献:

- [1] Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Individual specific fingerprints of human DNA [J]. Nature, 1985, 316:76-9.
- [2] Ali S, Muller CR, Eppelen JT. DNA fingerprinting by oligonucleotide probes specific for simple repeats[J]. Hum Genet, 1987, 74:239-43.
- [3] 王洪涛, 孙金海. 13/17易位纯合子猪DNA指纹分析[J]. 生物技术通讯, 1997, 8 (3):112.
- [4] 王洪涛, 袁进, 顾为望. 封闭群FMMU白化豚鼠繁殖与生长发育的初步观察[J]. 中国实验动物学报, 1997, 5(1):37-40.
- [5] 顾为望, 王洪涛, 张嘉宁. 封闭群FMMU白化豚鼠与三色豚鼠血液成分比较[J]. 中国实验动物学报, 1997, 5(1):23-28.
- [6] 张嘉宁, 顾为望, 王洪涛. 封闭群FMMU白化豚鼠心电图分析[J]. 上海实验动物科学, 1999, 19 (1): 35-37.
- [7] 林继红, 顾为望, 单春文. 封闭群FMMU白化豚鼠血小板对诱导剂反映性的实验[J]. 上海实验动物科学, 1999, 19(2): 127-9.
- [8] Douglas AM, Georges AM, Benton LR, et al. Purification of human leucocyte DNA: proteinase K is not necessary[J]. Anal Biochem, 1992, 201:362-5.
- [9] Vassart G, Georgas M, Monsieur R, et al. A sequence of M13 phage detects hypminisatellite in human and animal DNA[J]. Science, 1987, 235:683-4.
- [10] Lynch M. The similarity index and DNA fingerprint[J]. Mol Biol E vol, 1990, 7 (5): 478-83.