DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.07.024

论著

文章编号:1000-5404(2003)07-0620-03

广西巴马小型猪和贵州小型香猪的DNA指纹分析

陈丙波[1],王传广[2],周建华[1],魏 泓[1],王爱德[3],甘世祥[4] ([1]第三军医大学实验动物中心,重庆 400038;[2]国防大学卫生部第二门诊部,北京 100856;[3]广西大学农学院遗传育种教研室,南宁 530005;[4]贵阳中医学院科研处,贵阳 550002)

提 要:目的 应用DNA指纹分析的方法研究广西巴马小型猪和贵州小型猪的遗传背景。方法 采用ECL核酸直接标记和检测系统,以HRP标记JL-02多位点小卫星探针,对广西巴马小型猪和贵州小型猪基因组DNA的*Hinf*Ⅰ或*Hae*Ⅲ酶切DNA片段进行Southern杂交,以化学发光法进行检测,获得了清晰可辨的、具有高度多态性的DNA指纹图。结果 广西巴马小型猪大于2 kb的*Hinf*Ⅰ和*Hae*Ⅲ酶切DNA指纹图带数为11.7和24.5;贵州小型猪大于2 kb的*Hinf*Ⅰ和*Hae*Ⅲ酶切DNA指纹图带数则为15.8和17.6。另外,广西巴马小型猪*Hinf*Ⅰ和*Hae*Ⅲ酶切产生的不同个体DNA指纹的相似系数分别为0.54±0.07和0.55±0.08;而贵州小型猪则分别为0.53±0.04和0.53±0.07。结论 该探针适用于这两种猪的DNA指纹分析,不同酶切产生的DNA指纹图带数不同,但不同个体间相似系数的分析结果一致。同时说明这两种猪具有相当程度的种质均质性,符合封闭群动物的要求。

关键词:DNA指纹分析;广西巴马小型猪;贵州小型猪
中图法分类号:S813.1;S828.8 文献标识码:A

DNA fingerprinting analysis of Guangxi Bama and Guizhou miniature pigs

CHEN Bing-bo, WANG Chuan-guang, ZHOU Jian-hua, WEI Hong, WANG Ai-de, GAN Shi-xiang (Laboratory Animal Center, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the genetic background of the two strains of miniature pigs by DNA fingerprinting. Methods Clear and highly polymorphic DNA fingerprints from Guangxi Bama and Guizhou miniature pigs were obtained by Southern hybridization with a non-isotopically HRP (Horseradish peroxidase)-labelled multiloci minisatellite probe JL—02. Results The DNA fingerprint bands above 2kb digested with endonucleases *Hinf* Ⅰ and *Hae* Ⅲ for Guangxi Bama miniature pigs were 11.7 and 24.5, respectively, whereas the same indices for Guizhou miniature pigs were 15.8 and 17.6, respectively. The similarity coefficients of DNA fingerprints of various individuals of Guangxi Bama miniature pigs digested with endonucleases *Hinf* Ⅰ and *Hae* Ⅲ were 0.54±0.07 and 0.55±0.08, respectively, whereas the same indices were 0.53±0.04 and 0.53±0.07 for Guizhou miniature pigs. Conclusion The probe is available for DNA fingerprinting to the two kinds of miniature pigs. Various endonucleases can produce various DNA fingerprint bands, but the analytical results of similarity coefficients are identical, suggesting that the two kinds of miniature pigs meet the requirements of closed colony.

Key words: DNA fingerprinting; Guangxi Bama miniature pig; Guizhou miniature pig

由于小型猪在解剖、组织、生理和营养代谢方面与人类近似,其猪皮在结构、理化特性及功能等方面与人类极为相似。因此,选定猪作为人类疾病动物模型研究及异种皮、异种器官移植的供体最为理想。

广西巴马小型猪和贵州小型猪分别由广西大学农学院王爱德教授和贵阳中医学院甘世祥教授,分别于1987年和1985年以小型化和实验动物化为主要选育目标,进行封闭式繁殖培育而成。现已形成两个具有独特特征的著名实验用小型猪品种,但其遗传背景至今尚不十分清楚,严重制约了品种的申报及其在医学生物学研究中的广泛应用。因此,采用DNA分子标记的方法对其遗传结构进行深入研究,确定其遗传背景,对推动这两种猪的应用具有重要意义。

DNA指纹技术已广泛应用于医学、法医学、群体遗传学和分类学等领域,并愈来愈受到重视[1~4]。本

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G2000016106);国家"九五"科技攻关项目(96-23-06-01);国家自然科学基金资助重点项目(39830190)
作者简介:陈丙波(1964—),男,山东省威海市人,硕士,副教授,主要从事DNA分子多态标记方面的研究。电话:(023)68752052
通信作者:魏 泓,E-mail:Wei Hong@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2002-06-07;修回日期:2003-09-13

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

次研究应用 HRP 标记 JL-02 探针, 采用 ECL 核酸直接标记和检测系统[5], 对广西巴马小型猪和贵州小型猪的 *Hinf* Ⅰ 和 *Hae* Ⅲ酶切片段进行了 Southern 杂交 DNA 指纹分析, 获得了重复性好、清晰可辨的 DNA 指纹图。

1　材料与方法

1.1　试验动物

分别选用广西大学王爱德教授培育的广西巴马小型猪和贵阳中医学院甘世祥教授培育的贵州小型香猪各 24 头为研究样本。广西巴马小型猪系广西大学王爱德教授等从 1987 年开始, 从原产地引入广西地方猪种巴马香猪公猪 2 头, 母猪 14 头, 组成零世代基础种群, 采用基础群内闭锁纯繁选育及半同胞交配为主的近交方式进行选育而成, 该猪的最大特点为白毛占体表面积大, 达 92%以上, 个体具有较为整齐的头臀黑, 其余全白的独特"两头乌"毛色特点, 适宜于有关皮肤的医学生物学研究; 贵州小型香猪系贵阳中医学院甘世祥教授等于 1985 年, 以原产于贵州省丛江县的丛江香猪为基础种群, 以小型化、早熟化为育种目标进行定向选育, 使之成为我国较早正式报道的小型猪, 这两种猪均经过 13～15 年的封闭繁育, 从而形成具有不同特点, 不同遗传特征的封闭群体。

1.2　基因组 DNA 的制备

前腔静脉采集 10 ml 血液, 分离血中白细胞, 以酚、酚∶氯仿、氯仿∶异戊醇分三步提取 DNA[6]。

1.3　基因组 DNA 的浓度测定

采用 752 分光光度计于 260 nm 和 280 nm 分别测定 D_λ 值, DNA 浓度 (μg/ml) = $D_{260}\times 50\ \mu g/ml\times 1\ 000$; 纯度 = D_{260}/D_{280}[7,8]。

1.4　酶切消化

以 *Hinf* Ⅰ 或 *Hae* Ⅲ酶切消化 10 μg DNA, 反应体系 30 μl, 3～5 U/μg DNA, 酶切 4 h。

1.5　电泳

制成 0.6%的 25 cm×20 cm 的琼脂胶, 在酶切完全的 DNA 样品中加入 3 μl 载样缓冲液 (0.25%溴酚蓝, 0.25%二甲基青蓝, 25% Ficoll 400), 混匀后上样于点样孔中, 1.5 V/cm 电泳 20 h。

1.6　转膜

采用真空转移法进行, DNA 的脱嘌呤、碱变性、中和及转移等过程均在真空转移器中完成。20× SSC 真空转移 1 h, 将电泳分离后凝胶中的 DNA 酶切片段原位转移至带正电荷的 Hybond N+ (Amesham 公司出品) 的尼龙膜上, 转膜后用 0.4 mol/L 的 NaOH 固定 3 min[6,9]。

1.7　杂交

采用 ECL 核酸直接标记和检测试剂盒 (Enhanced chemiluminescene, Amersham life Science 公司产品, RPN3000) 进行探针标记及检测。主要采用辣根过氧化物酶 (Horse Radish peroxidase, HRP) 进行探针标记, 化学发光法进行检测。

1.7.1　标记探针　　采用 JL-02 多位点探针 (800 bp 长, 公安部刑侦研究所提供) 放入沸水中 5 min, 然后立即置冰水中 5 min, 再加等体积的标记试剂 HRP 和戊二醛, 振荡, 混匀, 置 37 ℃水浴 15 min。

1.7.2　杂交　　将转膜完毕的尼龙膜正面朝里卷成筒状, 装入杂交管中, 倒入预杂交液, 放入杂交箱中, 40～42 ℃预杂交 1 h, 然后倒入标记好的探针, 40～42 ℃杂交 12 h[10]。

1.8　洗膜

用 6 mol/L 尿素, 0.5× SSC, 0.4% SDS 的混合液洗涤 25 min×2, 然后用 2× SSC 洗涤 5 min×2[1～3,5]。

1.9　显影

采用化学发光法进行显影检测。将 ECL 显影液Ⅰ 和Ⅱ 各 10 ml, 混匀后倒入洗完的膜中, 反应 2～3 min, 吸干, 用保鲜膜包好, 置于暗盒中, 在暗室内放好 ECL 胶片, 暴光 30 min, 显影 5 min, 定影 15 min[7]。

2　结果

给出了广西巴马小型猪和贵州小型猪的 *Hinf* Ⅰ 和 *Hae* Ⅲ酶切 DNA 指纹图。其中 1～4 号为广西巴马小型猪的 *Hinf* Ⅰ 酶切 DNA 指纹图; 5～8 号为广西巴马小型猪的 *Hae* Ⅲ酶切 DNA 指纹图; 9～12 号为贵州小型猪的 *Hinf* Ⅰ 酶切 DNA 指纹图; 13～16 号为贵州小型猪的 *Hae* Ⅲ酶切 DNA 指纹图。

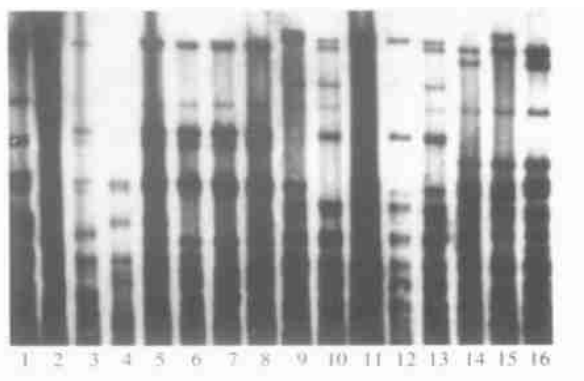


图 1　广西巴马小型猪和贵州小型猪的 ***Hinf*** Ⅰ 和 ***Hae*** Ⅲ酶切 **DNA** 指纹图

Fig 1　DNA fingerprint map of Guangxi Bama and Guizhou miniature pigs

广西巴马小型猪大于 2 kb 的 *Hinf* Ⅰ 酶切 DNA 指纹图带数为 11.7±1.2, 不同个体间的相似系数为 0.54±0.07; 而贵州小型猪大于 2 kb 的 *Hinf* Ⅰ 酶切 DNA 指纹图带数和不同个体间的相似系数分别为 15.8±1.4 和 0.53±0.043。广西巴马小型猪大于 2 kb 的 *Hae* Ⅲ酶切 DNA 指纹图带和不同个体间的相似系数分别为 24.5±1.8 和 0.55±0.08; 而贵州小型猪大于 2 kb 的 *Hae* Ⅲ酶切 DNA 指纹图带和不同个体间的相似系数分别为 17.6±1.6 和 0.53±0.07。

3　讨论

JL-02 多基因座小卫星探针是由一系列 6 bp 长的

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

重复序列串联而成，其核心序列为-(-CACCTC-)重复50次以上[11]。由于该探针属于多位点探针，因此比其他单位点探针具有更多的多态信息量[9]。该探针进行的DNA指纹分析结果表明，任意两无关个体的偶合几率为6.6×10^{-15}，谱带在亲代与子代间的传递符合孟德尔遗传规律，且同一个体不同组织的DNA指纹图相同，因而该探针已被成功地应用于法医遗传分析中[9]。首次将该探针应用于广西巴马小型猪和贵州小型猪的遗传背景分析，在低强度杂交和洗脱条件下，能够与这两种小型猪基因组DNA的*Hinf* Ⅰ或*Hae* Ⅲ的酶切片段杂交，产生具有高度多态性的DNA指纹图。说明该探针与这两种猪的基因组DNA具有较高的同源性，可用于其遗传背景分析。

广西巴马小型猪大于2 kb的*Hinf* Ⅰ和*Hae* Ⅲ酶切图带数分别为11.7和24.5；而贵州小型猪大于2 kb的*Hinf* Ⅰ和*Hae* Ⅲ的酶切图带数分别为15.8和17.6。显而易见，两种猪的*Hae* Ⅲ的酶切片段数明显高于*Hinf* Ⅰ的酶切片段数。另外，广西巴马小型猪的*Hae* Ⅲ酶切片段数高于贵州小型香猪的*Hae* Ⅲ酶切片段数；相反，贵州小型香猪的*Hinf* Ⅰ酶切片段数又高于广西巴马猪的*Hinf* Ⅰ酶切片段数。*Hae* Ⅲ的酶切位点为GG↓CC，而*Hinf* Ⅰ的酶切位点为G↓ANTC[3,4]。上述结果表明，*Hinf* Ⅰ或*Hae* Ⅲ均适用于这两种小型猪的基因组DNA的酶切，并且不同品系小型猪含上述酶切位点数目各不相同，因而其酶切片段存在差异。

广西巴马猪基因组DNA *Hinf* Ⅰ和*Hae* Ⅲ两种不同内切酶产生的DNA指纹图谱分析结果表明，其不同个体间的相似系数分别为0.54 ± 0.073和0.55 ± 0.08；而贵州小型猪*Hinf* Ⅰ和*Hae* Ⅲ酶切产生的不同个体DNA指纹的相似系数分别为0.53 ± 0.043和0.53 ± 0.073。不难看出，尽管*Hinf* Ⅰ和*Hae* Ⅲ两种内切酶产生的DNA图带数各不相同，但采用同种探针杂交产生的不同内切酶DNA图带，进行同一群体不同个体间的相似系数分析结果基本一致，说明该探针具有较好的稳定性。另外，孟安明等用33.15、33.6和3′HVR探针对枫桂猪、香猪和长白猪3个猪种纯繁群体进行了DNA指纹分析，其平均相似系数为0.5左右[6,9,12]，本研究结果与上述结果基本相一致。而笔者应用同样手段对西双版纳近交系小耳猪的DNA指纹分析结果表明，近交15代的西双版纳小耳猪的DNA指纹图相似系数高达0.92，远远高于广西巴马小型猪和贵州小型香猪。许多研究业已表明[8]，DNA指纹图相似系数可以很好地反映一个群体的变异性或遗传纯度，在没有严重近交的畜禽品种内，DNA指纹图相似系数大多在0.4～0.5之间[6,12～14]，我们所研究的这两个小型猪群体的DNA指纹图平均相似系数为0.5～0.55之间，表明它们已达到相当程度的种质均匀性，已形成品种特异性，但不太可能存在严重近交。至于其矮小体型，不少人认为是严重近交的后果，而我们的DNA指纹图分析结果似乎排除了这种因果关系，至于其确切原因，有待进一步深入研究。

参考文献：

[1] Burke T, Bruford M W. DNA fingerprinting in birds[J]. Nature, 1987, 327(6118): 149—152.

[2] Kuhnlein U, Zadworny D, Dawe Y, *et al*. Assessment of inbreeding by DNA fingerprinting: development of a calibration curve using defined strains of chickens[J]. Genetics, 1990, 125(1): 161—165.

[3] Kunieda T, Nomura N, Ishizaki R, *et al*. Indentification of Inbred rat strains by using DNA fingerprinting method[J]. Lab Animal Sci, 1993, 43(6): 603—606.

[4] Russell-Michael Robert J, Festing F W, Deeny A A, *et al*. DNA fingerprinting for genetic monitoring of inbred laboratory rats and mice[J]. Lab Animal Sci, 1993, 43(5): 460—465.

[5] 陈丙波，周建华，魏 泓，等. 化学发光加强法核酸标记检测系统用于猪DNA指纹分析的研究[J]. 中国实验动物学杂志，2001，3(11)：15—18

[6] 孟安明，齐顺章，于汝梁，等. 枫桂猪、香猪和长白猪的DNA指纹图分析[J]. 遗传，1995，17(3)：19—22.

[7] Jeffreys Alec J, Willon Victoria, Kelly Robert, *et al*. Mouse DNA fingerprint: analysis of chromosome localization and germ-free stability of hypervariable loci in recombinant inbred strains[J]. Nucleic Acids Res, 1987, 15(7): 2823—2826.

[8] Gilbert D A, Lehman N, O′Brien S J, *et al*. Genetic fingerprinting reflects population differentiation in the california channel island fox[J]. Nature, 1990, 344(6268): 764—766.

[9] 梁永红，邓昌彦，熊远著. DNA指纹技术用于湖北白猪群体遗传结构的研究[J]. 畜牧兽医学报，2000，31(2)：106—112.

[10] 陈丙波，周建华，魏 泓，等. 西双版纳小耳猪群体遗传结构的RFLP分析[J]. 中国实验动物学报，2001，9(1)：15—19.

[11] 季安全，李继周，叶 健，等. JL-02多位点探针DNA指纹的法医学应用研究[J]. 中国法医学杂志，1997，12(2)：65—68.

[12] 孟安明，冯书堂，蔡正华，等. 五指山小型猪的分子生物学基础之初探[J]. 畜牧兽医学报，1998，29(2)：72—78.

[13] Reeve H K, Westneat D F, Noon W A, *et al*. DNA fingerprinting reveals high levels of inbreeding in colonies of the eusocial naked mole-rat[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(7): 2496—2500.

[14] Hill W G. DNA fingerprints applied to animal and bird populations[J]. Nature, 1987, 327(6118): 98—99.

（编辑 薛国文）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net