DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.12.016
第22卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 12
1162 2000年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)12-1162-04

贵州小型香猪群体遗传结构的 RAPD 分析

吴丰春[1],魏 泓[1],甘世祥[2] ([1]第三军医大学实验动物中心,重庆 400038;[2]贵阳中医学院动物研究所,贵阳 550002)

提 要:目的 分析贵州小型香猪的群体遗传结构。方法 用经过筛选的31条引物对贵州小型香猪个体基因组DNA进行RAPD扩增。结果 经RAPD反应,共扩增出271条带,其中多态性带79条,多态性带频率在0~71%之间,平均为26.6%。不同个体猪拥有的RAPD条带具有差异,但拥有相同条带的个体猪比率较高。该群体猪的相似系数(F)为0.933(0.830~0.980),平均等位基因频率($\bar{q}$)为0.742,最低平均杂合率(H)为0.258。结论 贵州小型香猪个体间具有较好的遗传一致性和遗传稳定性,其群体分化程度处在一个较低的水平。

关键词:小型香猪;群体遗传结构;RAPD
中图法分类号:Q347;Q959.842 文献标识码:A

RAPD analysis on genetic construction of Guizhou miniature pig population

WU Feng-chun, WEI Hong, GAN Shi-xiang (Laboratory Animal Center, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To analyze the genetic construction of Guizhou miniature pig population. Methods Thirty-one selected single primers were used to amplify the genomic DNA of Guizhou miniature pigs with random amplified polymorphic DNA (RAPD) techinque. Results After the amplification, 271 bands were found, and of them polymorphic bands were 79 with the frequency of 0~71% (mean 26.6%). Different individual pig has various bands, but the frequency of common bands was high. Based on RAPD patterns, similarity index (F) was 0.933 (0.830~0.980), average alletic frequency ($\bar{q}$) 0.742 and minimum herterozygositics (H) 0.258. Conclusion There is higher degree of homogenicity and stability in heredity among individuals in the population of Guizhou miniature pig and the degree of population differentiation is at a lower level.

Key words: miniature pigs; genetic construction of population; random amplified polymorphic DNA

由于猪与人在结构、代谢、机能等方面的相似性,使其成为一种良好的实验用动物和极具希望的异种器官移植供体。在国外由于动物保护组织的限制,利用猪代替猴、犬进行医学生物学实验已成为趋势。近10年来,国外实验用猪用量上升近1倍。由于小型猪体型小,便于操作及饲养管理,便于进行微生物学及遗传学控制,易于标准化,是猪实验动物化的主要途径。我国具有丰富而独特的小型猪资源,其中贵州小型香猪由于长期封闭培育、适度近交以及独特的生物学特性,已引起国内外相关领域的关注。随机扩增多态DNA(Random amplified polymorphic DNA, RAPD)技术[1~6],在动物、植物、微生物种属鉴定,亲缘关系的划分及多态性分析中得到广泛应用,但应用于小型猪方面的研究报道很少。本实验应用RAPD技术对我国特有的实验用小型猪贵州小型香猪的群体遗传结构进行分析,旨在评价其遗传稳定性,为以后进一步培育和相关研究形成基础。

1 材料和方法

1.1 猪的来源

贵州小型香猪由甘世祥教授利用原产地近交程度较高的基础群,历经10余年,进一步作封闭培育,适度近交而建立的品系。

1.2 猪血DNA样品制备

随机抽取上述品系猪17头,分别于前腔静脉取血10 ml,加

基金项目:国家"九五"重点科技攻关项目(96A-23-06-01);国家自然科学基金资助项目(39770398)及重点项目(39830190)
作者简介:吴丰春(1969-),男,山东省寿光市人,讲师,主要从事动物分子遗传学方面的研究。电话:(023)68752053
收稿日期:2000-01-20;修回日期:2000-04-01

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

等体积 2× ST(0.64 mmol/L 蔗糖, 0.02 mol/L Tris-HCl, pH 7.6, 0.01 mol/L $MgCl_2$, 2% TritonX-100)充分混匀, 冰浴 15 min, 破碎红细胞, 加 5 ml 1× ST 洗 1~2 次, 每管加消化液 STE(10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 0.25 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl) 5 ml 和 SDS、蛋白酶 K(终浓度分别为 1%和 0.1 μg/ml)消化, 按常规酚、氯仿、异戊醇抽提, 乙醇沉淀, TE(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mmol/L EDTA)溶解。

1.3　试剂

10× buffer, Taq 酶, Mg^{2+} 为加拿大 SANGON 公司产品, dNTP 为德国 BM 公司产品。

1.4　引物

购自美国 Operon Technologies 公司 5 套试剂盒: Primers Kits for RAPD AB-0320-kitN, AB-0320-Kit2, AB-0320-Kit3, AB-0320-Kit4, AB-0320-Kit5, 每套试剂盒含 20 条引物, 共 100 条。在以多个品系猪进行品系间 RAPD 研究的基础上, 筛选多态性丰富具有品系间差异的引物 31 条应用于本实验, 分析贵州小型香猪的群体遗传结构(引物编号和序列见表 1)。

1.5　PCR 反应

采用美国 PE 公司 2400 型 PCR 仪。25 μl 的反应体系中含 10× buffer 2.5 μl, Mg^{2+} 2 mmol/L, dNTP 200 μmol/L, 引物 15 ng, Taq 酶 1.5 U, 模板 DNA 20 ng, 扩增程序为 94 ℃变性 1 min, 38 ℃退火 1 min, 72 ℃延伸 2 min, 40 个循环后接 10 min 延伸, 扩增产物用含有 EB(0.5 μg/ml)的 1.5%的琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察拍照。

1.6　数据处理

1.6.1　扩增带的统计　　以能在底片上观察到的较清晰的带为准, 每一条带用一英文字母表示, 同一引物扩增 17 头猪基因组 DNA 分子量相同的带用同一英文字母表示。依英文字母的顺序(abcd……)表示每条带分子量的大小, 分子量最小的带设定为 a。

1.6.2　不同个体间随机扩增多态 DNA 片断相似性计算　　以"1, 0"分别表示扩增带的有无, 统计 31 条引物的扩增结果, 利用从 Internet 网上下载的软件 RAPD istance package version 1.04 对实验结果进行分析, 用软件中提供的相似系数计算方法计算不同个体间的相似系数(F)[3]:

$$F=\frac{2Nxy}{2Nxy+Nox+Noy}$$

其中 Nxy 为个体 x 和个体 y 共有片断数, Nox 为 x 个体有而 y 个体没有的扩增带, Noy 为 y 个体有而 x 个体没有的扩增带。任意两个个体间的遗传距离(P)根据两个个体的相似系数(F)来计算, 即 P=1−F。

1.6.3　平均等位基因频率($\bar{q}$)和最低平均杂合率(H)的计算　$\bar{q}=\sqrt{1-F}$, $H=1-\sqrt{1-F}$, F 为不同个体间的相似系数[7]。

2　结果

2.1　基因 DNA 的扩增结果

研究中所用的 31 条引物都有良好的扩增结果, 见图 1, 共扩增出 271 条带, 即检测了 17 头猪的 271 个位点, 其中多态性图带 79 条, 多态性图带频率在 0~71%之间, 平均为 26.6%, 见表 1。

表 1　31 条引物对 17 头猪基因 DNA 的扩增结果

Tab 1　Results of RAPD in 17 miniature pigs by 31 single primers

Primers	Sequence	Total number of bands	Number of polymorphic bands	Frenquency of polymorphic bands(%)
ABN-03	GGTACTCCCC	6	2	33.3
ABN-04	GACCGACCGA	8	2	25.0
ABN-05	ACTGAACGCC	6	1	16.7
ABN-08	ACCTCAGCTC	6	2	33.3
ABN-09	TGCCGGCTTG	11	3	27.3
ABN-11	GCGCCGCAAA	5	0	0
ABN-15	TCGTGCGGGT	4	0	0
ABN-16	AAGCGACCTG	7	2	28.6
ABN-19	GJCCGTACTG	8	3	37.5
ABN-20	GGTGCTCCGT	11	3	27.3
AB2-02	CCTGCGGGAA	8	3	37.5
AB2-03	CCAGATGCAC	7	0	0
AB2-05	TCAGGGAGGT	10	2	20.0
AB2-06	AAGACCCCTC	9	2	22.2
AB2-09	CTTCACCCCA	6	4	66.7
AB2-12	TTATCGCCCC	10	2	20.0
AB2-13	CCCGATTCGG	14	10	71.0
AB2-17	CTACTGCCGT	10	4	40.0
AB2-19	ACGGCGTATG	12	3	25.0
AB2-20	AAGGGTGACC	8	2	25.0
AB3-04	CCGAACACGG	8	0	0
AB3-05	CTCCATGGGG	7	2	28.6
AB3-08	CATACCGTGG	11	4	36.4
AB3-10	AAGCCCGAGG	11	4	36.4
AB3-14	CACCCGGATG	10	5	50.0
AB3-15	TGTAGCAGGG	8	0	0
AB4-15	TGGCGTCCTT	13	4	31.0
AB5-15	GGATGCCACT	8	0	0
AB5-16	GGTGAACGCT	8	3	37.5
AB5-18	CATGCCAGAC	15	3	20.0
AB5-20	GACCAATGCC	14	4	28.6
Average				26.6

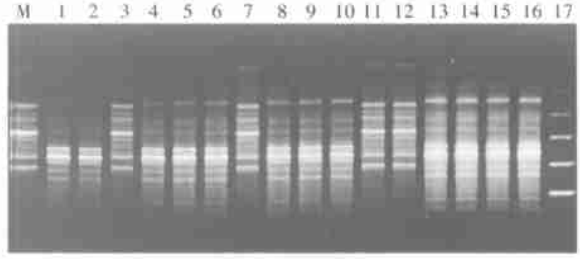


图 1　引物 AB2-13 的扩增图谱

Fig 1　Results of RAPD by AB2-13

1~17: Number of pig; M: Marker

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

2.2 群体遗传相似性

根据31条引物的扩增结果计算不同个体间的相似性(F)和遗传距离(P)，见表2。贵州小型香猪群体内相似系数位于0.830~0.980之间，平均值为0.933，平均等位基因频率($\bar{q}$)为0.742，最低平均杂合率(H)为0.258。就单个引物来讲，贵州小型香猪个体间的相似系数位于0.810~0.980之间，引物ABN-11、ABN-15、AB2-03、AB3-04、AB3-15、AB5-15在17头猪的扩增结果相同，相似系数为1。

表2 个体间的片段相似性和遗传距离

Tab 2 Similarity index of fragment and genetic distance among individuals

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1		0.93	0.94	0.90	0.98	0.96	0.88	0.94	0.93	0.89	0.92	0.93	0.96	0.93	0.96	0.92	0.95
2	0.02		0.97	0.93	0.88	0.90	0.97	0.96	0.97	0.93	0.94	0.83	0.98	0.93	0.92	0.97	0.94
3	0.06	0.03		0.91	0.89	0.96	0.97	0.89	0.83	0.97	0.83	0.94	0.96	0.94	0.98	0.94	0.98
4	0.10	0.07	0.09		0.94	0.98	0.93	0.91	0.88	0.96	0.88	0.96	0.92	0.94	0.87	0.93	0.84
5	0.02	0.12	0.11	0.06		0.93	0.96	0.96	0.86	0.94	0.97	0.98	0.95	0.93	0.95	0.96	0.97
6	0.05	0.10	0.04	0.02	0.07		0.92	0.92	0.98	0.91	0.95	0.89	0.97	0.90	0.93	0.93	0.89
7	0.12	0.03	0.03	0.07	0.04	0.08		0.97	0.92	0.90	0.98	0.95	0.93	0.93	0.97	0.97	0.85
8	0.06	0.04	0.11	0.09	0.04	0.08	0.03		0.91	0.98	0.96	0.90	0.97	0.96	0.95	0.98	0.96
9	0.07	0.03	0.17	0.12	0.14	0.02	0.08	0.09		0.95	0.94	0.92	0.93	0.98	0.92	0.96	0.94
10	0.11	0.07	0.03	0.04	0.06	0.09	0.10	0.02	0.05		0.97	0.93	0.97	0.92	0.97	0.87	0.95
11	0.08	0.06	0.17	0.12	0.03	0.05	0.02	0.04	0.06	0.03		0.97	0.94	0.94	0.96	0.88	0.95
12	0.07	0.17	0.06	0.04	0.02	0.11	0.05	0.10	0.08	0.07	0.03		0.95	0.90	0.83	0.84	0.94
13	0.04	0.02	0.04	0.08	0.05	0.03	0.07	0.03	0.07	0.03	0.06	0.05		0.97	0.92	0.88	0.91
14	0.07	0.07	0.06	0.06	0.07	0.10	0.07	0.04	0.02	0.08	0.06	0.10	0.03		0.95	0.96	0.97
15	0.04	0.08	0.02	0.13	0.05	0.07	0.03	0.05	0.08	0.03	0.04	0.12	0.08	0.05		0.88	0.96
16	0.08	0.03	0.06	0.07	0.04	0.07	0.03	0.02	0.04	0.13	0.12	0.16	0.12	0.04	0.12		0.94
17	0.05	0.06	0.02	0.16	0.13	0.11	0.15	0.04	0.06	0.05	0.05	0.06	0.09	0.03	0.04	0.06	

Note: Numbers above the diagonal are similarity index and below the diagonal are genetic distance

2.3 不同RAPD条带在17头猪中的频率比较

统计每条引物的扩增带数，计算RAPD图谱中每条带在17头猪中出现的频率。从统计结果看，17头猪拥有的特异条带不完全相同，但拥有相同条带个体猪比率较高，扩增的271条带中，192条带在17头猪中出现的频率达100%，占71.2%。

3 讨论

研究表明，DNA指纹相似系数F是衡量个体间遗传变异程度的可靠参数，F值越大，个体间共有的片段数越多，平均等位基因频率越大，平均杂合率越低，个体间血缘关系越近，遗传变异性越小[4-7]。常青等[1]对太湖猪各类群内及类群间的相似性系数RAPD研究结果分别为大于或接近0.9。而贵州小型香猪群体内相似系数为0.933(0.840~0.980)，高于一般品种猪的水平，其群体分化程度处于一个较低的水平。这与该品系猪是利用原产地近交程度较高的基础群，历经10余年，进一步作封闭或近交培育而成这一事实相符。单一选择，定向培育，可能是该品系猪群体遗传多样性变异较小的主要原因。

多态性图带频率和RAPD条带在猪个体中出现的频率可反应群体的选育程度和遗传位点的纯合度。多态性图带频率越低，RAPD条带在群体中出现的频率越高，个体之间共有的片段数越多，遗传位点的纯合度越高，群体的选育程度就越高。本实验扩增出的271条带中，192条在17头猪中出现的频率达100%，占71%，表现出较好的均一性和一致性。以上结果都反映贵州小型香猪是一个近交程度较高的群体，其分化程度处于较低的水平。

本实验所用的31条引物是在多品系猪RAPD研究的基础上从100条引物中筛选出的在猪品系间具有多态性的引物，用这些经过筛选的在猪品系间具有多态性的引物分析贵州小型香猪的群体遗传结构，比应用不经筛选、随机选用的RAPD引物来分析该群体的遗传结构，其效率更高，结果更可靠。

参考文献：

[1] 常 青，周开亚，王义权，等. 太湖猪遗传多样性和系统发生关系的RAPD分析[J]. 遗传学报，1999，26(5)：480-488.

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

[2] 陈永久, 张亚平, 刘瑾, 等. 中国貉随机扩增多态 DNA 及其亚种分化关系[J]. 遗传学报, 1998, 25(1): 16—21.
[3] 李　明, 张树义. 白腹管鼻蝠两个冬眠群不同个体的随机扩增多态 DNA 分析[J]. 动物学报, 1994, 45(2): 232—237.
[4] 刘春宇, 张春玲, 夏家辉. 随机引物在分子生物学研究中的应用[J]. 生物化学与生物物理进展, 1990, 23(6): 517—520.
[5] Welsh J M, Mcclelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(24): 7 213—7 218.
[6] Williams J G, Kubelik A R, Livak K J, *et al*. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(22): 6 531—6 535.
[7] 孙宗炎, 唐辉煌, 杨仕柳, 等. 应用 DNA 指纹图谱法对湘白猪群体遗传结构的研究[J]. 畜牧兽医学报, 1995, 26(1): 29—34.

（编辑　陈聪连）

文章编号: 1000-5404(2000)12-1165-01

经验与短篇

杜冷丁与胃复安术前用于人工流产术 1 080 例分析

Preoperative application of dolantin and maxolon in artificial abortion: An analysis of 1 080 cases

杨合荣, 郑世菊　（第三军医大学附属西南医院妇产科, 重庆 400038）

人工流产术(人流)是早期终止妊娠最常用的手术, 因术中扩张子宫颈, 吸刮子宫造成疼痛, 甚至出现呕吐, 大汗淋漓, 血压下降等人流综合反应。我院门诊自 2000 年 1 月至 7 月开展人流术前静脉注射杜冷丁与胃复安镇痛共 1 080 例, 收到满意效果, 现报告如下。

1　资料和方法

1.1　资料

2000 年 1 月至 7 月, 我院门诊确诊早孕, 应病员要求行人流术者 1 080 例, 妊娠 6～10 周, 年龄 18～42 岁, 平均为29.6 岁。未产妇 702 例, 占 65%。经产妇多次手术者 378 例, 占 35%。

1.2　方法

在人流术前 3～5 min, 杜冷丁 75 mg 加胃复安 10 mg 静脉缓慢注射(注药时间 40～60 s)。对初次受术者可用杜冷丁 100 mg 加胃复安 10 mg 静脉缓慢注射, 然后施术。

2　效果

用药后 3～5 min, 全部病员安静, 不紧张, 不恐惧, 术中扩张宫颈不痛, 牵拉吸刮子宫无不适, 无人流综合征发生。

3　讨论

杜冷丁为人工合成阿片, 为中枢抑制药, 镇痛作用相当于吗啡的 1/10～1/8。据报道, 肌肉注射 125 mg 痛阈可提高 75%[1]。我们采用静脉注射 75 mg, 其镇痛作用与肌肉注射 125 mg 相似。用药后, 镇痛效果好, 起效快, 作用最强时间在用药后 5～10 min[1], 最适宜人流术所需要的手术时间。

杜冷丁用药后有 15%的人可能发生恶心、呕吐[1]。加上手术时扩张子宫颈, 吸刮子宫会加重恶心、呕吐反应。预防性或对症性加用胃复安 10 mg, 可抑制延脑的催吐化学感受器, 降低杜冷丁恶心、呕吐副反应, 达到镇痛止吐效果。可使受术者安静, 无痛苦。有利于手术顺利进行。

杜冷丁与胃复安合用镇痛, 毒副作用与杜冷丁与非拉根、安定合用相比, 后者常出现头晕、嗜睡、四肢无力、休息时间长。前者副作用小, 嗜睡时间短, 术后病员只需休息 15～20 min 便可行走回家, 无明显不适。但需注意, 注射时间不宜过快, 宜掌握在 40～60 s 内完成。注药过快会导致咽喉部不适, 咳嗽、心慌、胸闷等症状。

副作用: 杜冷丁与胃复安静脉注射后, 有头晕、嗜睡反应。手术在病员安静、无痛感中进行。但手术中如出现器械损伤子宫造成穿孔等并发症时, 病员无感觉, 增加了手术难度。对手术者技术要求更高。

关键词: 人工流产; 杜冷丁; 胃复安
中图法分类号: R719.7　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 单家治. 分娩期镇痛药物的应用[J]. 中国实用妇产科杂志, 1998, 5(14): 268—269.

（编辑　汪勤俭）

作者简介: 杨合荣(1956—), 女, 重庆市人, 主管护师, 主要从事宫内节育器进展方面的研究。电话: (023)68754000-73043

收稿日期: 2000-09-01; 修回日期: 2000-11-01

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