DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.06.012
第23卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 6
650 2001年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)06-0650-02

应用AFLP技术对不同品系小鼠进行遗传检测的初步研究

吴丰春,魏 泓 (第三军医大学实验动物中心,重庆 400038)

提 要:目的 探讨应用AFLP技术对不同品系小鼠进行遗传检测的可行性。方法 应用人工设计的与接头序列相应的AFLP选择性引物,对不同品系的小鼠基因组DNA进行AFLP-PCR,以琼脂糖疑胶电泳检测扩增结果。结果 不同品系小鼠基因组DNA的扩增结果具有差异。结论 AFLP技术是一种适宜于小鼠的遗传检测方法。

关键词:AFLP;小鼠;遗传检测
中图法分类号:R392.2;R394-33 文献标识码:A

Preliminary study on genetic-ally monitoring of different strains of mouse by AFLP technique

WU Feng-chun, WEI Hong (Laboratory Animal Centre, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the possibility of genetic-ally monitoring different strains of mouse by AFLP assay. Methods AFLP selective primers were used to amplify the genomic DNA of different strains of mouse. PCR products were identified on agarose gel electrophoresis and stained by ethidium bromide. Results Some differences were found in AFLP of different strains of mouse. Conclusion AFLP assay is an effective method in genetically monitoring of mouse.

Key words: mouse; AFLP; genetic moritoring

AFLP(Amplified fragment length polymorphism)是新近发展起来的一项DNA指纹技术,它从原理上结合了RFLP和RAPD的优点,通过对基因组DNA的限制性酶切片段进行选择性扩增而显示多态性。在AFLP反应中,酶切后的DNA片段被连上通用接头(Adapter)顺序作为PCR扩增的模板,这样接头顺序及其临近的酶切位点就成为扩增反应中引物的结合位点。选择性扩增的引物是在接头顺序和内切酶识别位点的基础上加一定数目(1~3个)的选择性碱基,只有那些与引物的选择性碱基严格配对的DNA片段才能被扩增出来。扩增产物通过电泳而显示多态性。AFLP技术自1995年报道以来,以其稳定性和较高的多态检出率而受到分子生物学家的关注,得到了广泛应用[1]。但是,在小鼠的遗传的遗传检测方面的应用尚未见报道。

1 材料和方法

1.1 实验动物

5个不同品系的小鼠BALB/c、DBA/2、TA1、T739、615各1只,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 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。T_4-DNA ligase购自Boehringer Mannheim公司。

1.3 接头与引物

接头与引物均由上海植物生理研究所BECKMAN生物技术示范实验室合成,序列如下:

接头Adapter: 5′-GACGTGACGGCCGTCATGCA-3′
3′-GCACTGCCGGCAGT-5′

合成的两条寡核苷酸接头,经37℃,10 min退火后,冷却至室温4℃保存,2条互补的寡核苷酸结合为双链,接头的3′-末端为3′-TGCA粘性末端,能与被*pst*Ⅰ酶切的基因组DNA粘性末端互补,把CTGCA-3′的C碱基用A置接,使人工接头中不含*pst*Ⅰ酶切位点,接头与酶切片段连接后不再被*pst*Ⅰ酶切,5′-GA末端突出,防止接头自身连接,接头中还插入了*Xma*Ⅲ识别位点,一方面提高GC含量,另一方面便于对扩增片段进行克隆。

引物(Primer):根据人工接头的序列设计出相应的AFLP引物,本研究使用了3条选择性引物,引物由不变碱基(CB)和选择碱基(SB)两部分组成,3′-端具有3个选择碱基。

|……CB…… |…SB…
引物1: 5′-GACGGCCGTCATGCAG AGG-3′
引物2: 5′-GACGGCCGTCATGCAG ACC-3′
引物3: 5′-GACGGCCGTCATGCAG CAG-3′

1.4 酶切及AFLP模板DNA的制备

取小鼠肺脏,按照Maniatis[2]的方法制备基因组DNA,基因组DNA的酶切和接头的连接是在同一反应体系中进行:20 μl的反应体系中,含基因组DNA 0.2 μg,接头0.2 μg,*Pst*Ⅰ 20 U,T_4-DNA连接酶2 U,1 mmol/L ATP,37℃反应1 h,20℃反应1 h为1循环,共3次,用灭菌双蒸水将反应液稀释到100 μl,置4℃备用[3]。

1.5 AFLP-PCR

在25 μl的反应体系中含有10× buffer 2.5 μl,Mg^{2+} 1.5 mmol/L,dNTP 200 μmol/L,引物100 ng,模板DNA 5 ng,Taq酶1 U。反应条件为94℃变性30 s,56℃退火1 min,72℃延伸

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(G2000016100);国家自然科学基金资助项目(39600079);全军"九五"医药卫生科研基金(96M083)及重庆市攻关项目资助
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,发表论文5篇。电话:(023)68752053
收稿日期:2000-06-13;修回日期:2001-02-12

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

1.5 min, 35 个循环后 5 min 延伸, 扩增产物用含有 EB(0.5 μg/ml)的 2% 的琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察拍照[3]。

2　结果

分别以 3 条引物对 5 个不同品系的小鼠基因组 DNA 进行 AFLP—PCR。结果, 只有引物 3 在 5 个品系中呈现多态性, 表现为一个品系小鼠的扩增图谱比其它 4 个品系小鼠的扩增图谱少 1 条带, 见图 1。其它 2 条引物的扩增图谱在 5 个品系小鼠间无差异, 无品系间多态性。

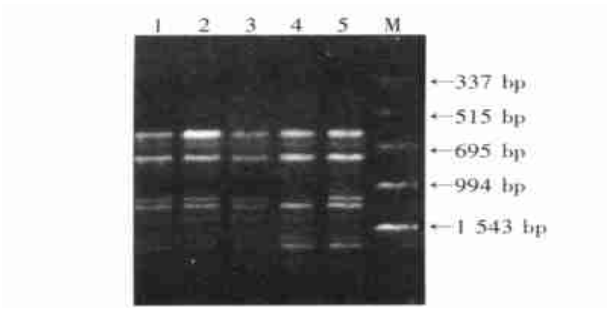


图 1　引物 3 扩增 5 个品系小鼠的结果

Fig 1　Results of amplification amplified by primer 3 in 5 strains of mouse

1: 615; 2: T739; 3: TA1; 4: DBA/2; 5: BALB/c; M: Marker

3　讨论

各品系小鼠 AFLP 谱带的差异, 反应了其遗传背景的差异, 虽然各品系小鼠遗传背景的差异远低于动物种属间的差异, 但是通过其基因组 DNA 的 AFLP-PCR, 各品系小鼠基因组间的微小差异仍可被反应出来, 这表明 AFLP 技术适宜于小鼠的遗传检测。

目前常用的对实验用动物进行遗传检测的方法, 都是进行的表型检测不能反应遗传物质本身的差异[4]。随着分子生物学技术的发展, 分子生物学方法已逐渐运用到实验用动物的遗传检测中, 如 RFLP、RAPD 等。特别是 RAPD, 它和 AFLP 一样也能运用于实验用动物的遗传检测, 但是 RAPD 使用的是随机引物, 很多因素影响其扩增结果, 存在着重复性差, 结果不稳定等缺点[5], RFLP 技术需要先制备相应的探针进行杂交, 操作繁琐。而 AFLP 技术克服了上述两种方法的不足, 既具有 RFLP 技术稳定、可靠、重复性好的优点又有 RAPD 技术灵敏、方便、多态性强的特点[6,7]。AFLP 和 RFLP 的根本差异在于 RFLP 是由限制性内切酶位点不同而显示多态性, 而 AFLP 则是由内切酶位点附近的选择性碱基来决定其多态性。RAPD 技术是在高 Mg^{2+} 浓度, 低复性温度, 短引物序列, 允许引物与模板错配等不严格条件下进行的扩增, 而 AFLP 技术, 引物与模板严格配对的碱基数达 19 个之多, 又是在 56 ℃退火温度下进行, 其结果的可靠性高于 RAPD。用与接头对应的 3′-末端变化 3 个碱基的选择性引物扩增酶切后的基因组 DNA 获得多态性结果, 更有利的是可根据研究的需要, 增减 3′-末端变化碱基数目, 以获取更多的引物, 使相关研究更方便, 更具效力。

研究中我们仅使用了 3 个 3′-末端变化 3 个碱基的引物就筛选了 1 条多态性引物, 表明了 AFLP 具有高效的多态检出率, 但是真正把 AFLP 技术应用到小鼠遗传检测中, 目前的研究结果还不成熟, 还要进行大量引物的筛选。但是本研究为小鼠从 DNA 水平上的遗传检测提供了一种新的技术手段, 将对小鼠的遗传检测研究起到推动作用。

参考文献:

[1] 陈　洪, 朱立煜. 致病性念珠菌 DNA 的 AFLP 指纹图[J]. 科学通报, 1996, 41(10): 935—938.

[2] J. 萨姆布鲁克, E. F 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯 著. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学技术出版社, 1989. 436—466.

[3] 李传友, 伏健民. AFLP 分析中多态性扩增片段的回收、克隆及鉴定[J]. 遗传快报, 1998, 20(4): 52—55.

[4] 魏　泓 主编. 医学实验动物学[J]. 成都: 四川科学技术出版社, 1998. 52—55.

[5] Williams J G, Kubelik A R, Livak K J, *et al*. DNA polymorphises amplified by arbitrary primers and useful genetic markers[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(22): 6 531—6 535.

[6] Vos P, Hogers R, Blecker M, *et al*. AFLP: a new technique for DNA finger printing[J]. Nucl Acid Res, 1995, 23(4): 4 407—4 414.

[7] 翁曼丽, 谢纬武. 新一代的分子标记技术-AFLP[J]. 应用与环境生物学报, 1996, 2(4): 424—429.

(编辑　王　红)

(上接 649 页)

不良[1], 是一种家簇性慢性进行性常染色体显性遗传性双眼角膜上皮疾病。病理改变为角膜上皮层内细胞肿胀, 有大小不等囊泡而囊腔内有退变细胞碎屑及固缩胞核[2]。临床主要表现为角膜上皮点状, 囊泡状混浊。角膜上皮的病变造成视力下降, 屈光改变。反复发作则形成角膜斑翳, 严重危害视力, 可行角膜移植术, 但病变可复发于植片中。目前尚无最佳治疗方法, 只能对症治疗, 减少反复发作。

Messmann 角膜营养不良是一种家族性角膜疾病, 各年龄组均可见到, 最小年龄可见于 6 个月婴儿[1], 因而对家族视力危害较大, 随着年龄的增长, 反复发作机率增多, 视力受损加重。建议患者应尽量避免角膜的炎症, 以减少发作机率。

本组家系为布依族, 无近亲结婚, 代代发病, 男女性皆有患者, 遗传与性别无关, 符合常染色体显性遗传病的特征。

关键词: 角膜营养不良; 遗传性疾病; 家系

中图法分类号: R772.2　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 李美玉. 现代眼科诊疗手册[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1994. 49.

[2] 孙秉基, 徐锦堂. 角膜病的理论基础与临床[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1994. 42.

(编辑　陈聪连)

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