DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.08.036

文章编号:1000-5404(2001)08-0951-03

论著

应用RAPD引物区分小鼠品系

李淑蓉[1],陈意生[1],魏 泓[2] (第三军医大学:[1]附属西南医院病理学研究所;[2]实验动物中心;重庆 400038)

提 要:**目的** 用随机扩增多态DNA(Random amplified polymorphic DNA,RAPD)方法区分10个常用小鼠品系。**方法** 从120条随机引物中筛选出稳定性、重复性好的4条多态性引物对10个常用小鼠品系进行RAPD扩增。扩增产物在含溴化乙锭的1.5%琼脂糖凝胶中电泳,紫外透射仪上观察照相。**结果** 仅用这4条引物就可将10个品系小鼠完全区分开来,其中包括遗传背景或外观形态很相似的品系,如BALB/c与BALB/c-nu、KM与BALB/c也能区分出来。**结论** 筛选出的4条引物对实际工作具有指导意义,适用于小鼠常规遗传监测。

关键词:小鼠;RAPD;遗传监测
中图法分类号:R-332;R392.2;R394.2 **文献标识码**:A

Application of RAPD for distinguishing strains of mouse

LI Shu-rong, CHEN Yi-sheng, WEI Hong (Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract: Objective To distinguish 10 common strains of mice by random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. **Methods** Four stable and reproducible polymorphic primers screening from set of 120 random primers were used for amplifing the genomic DNA of 10 strains of mice. The amplified products were electrophorised in agarose gel containing and obsersed under UV examiner. **Results** The ten commonly used experimental strains of mice could be distinguished from each other, including the strains similar in genetic background and appearance by the 4 selected primers, such as BALB/c and BALB/c-nu, KM and BALB/c. **Conclusion** This method be used for mouse genetic monitoring and strain identification.

Key words: mouse; RAPD; genetic monitoring

实验动物(特别是小鼠)在现代生物医学科学研究中发挥着越来越重要的作用,对其遗传质量的要求也越来越高。遗传质量监测是保证实验动物质量的重要手段,传统遗传质量监测方法大多以表型监测为主,存在一定局限性。若直接对遗传物质本身——DNA分子进行检测,并对整个基因组进行大范围的搜索,其检测结果更准确有效。随机扩增多态DNA(Random amplified polymorphic DNA,RAPD)技术正适合此要求,该技术是对整个基因组进行扫描,加之只需少量DNA、简便、快捷,已成为通用的遗传标记。国内应用RAPD技术在动、植物品系鉴定、遗传监测和遗传作图等方面已取得大量成果,如水稻分子连锁图的构建[1]、蛇类的RAPD分析[2]、太湖猪遗传多样性和系统发生关系的RAPD分析[3]等。但由于RAPD引物数量多,直接将大量引物用于实际监测工作有一定难度。我们从120条RAPD引物中筛选出稳定性、重复性好的4条多态性引物,可区分10个常用小鼠品系,适用于小鼠常规遗传监测。

1 材料和方法

1.1 材料

实验用TA2、T739、615、C57BL/6J、BALB/c、BALB/c-nu、DBA/2、SCID近交系小鼠各3只,昆明鼠(KM)和NIH封闭群小鼠各10只制成DNA池。由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 基因组DNA的制备

取小鼠肝脏组织适量,加少量液氮研碎,按常规方法加入消化液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 100 mmol/L EDTA, 0.5% SDS, 20 μg/ml RNase, 100 μg/ml 蛋白酶K)消化,用酚、氯仿提取DNA,乙醇沉淀,TE溶解,置4 ℃冰箱备用。

1.3 引物和试剂

所用随机引物为美国Operon公司产品,每一引物为10 bp的寡聚核苷酸,实验用AB-0320-kit4、AB-0320-kit5、AB-0320-kit6、AB-0320-kit7、AB-0320-kit8、AB-0320-kit9六套引物,每套20个引物,共120条。筛选出其中4条引物AB4-16: TCGGCGGTTC、AB6-1: GTGGCATCTC、AB6-7: AGAGCCGTCA、AB7-19: CTTGGCACGA对10个品系小鼠进行扩增。

10×buffer、Taq酶、$MgCl_2$、dNTP均为上海生工产品。

1.4 RAPD反应条件及扩增程序

反应总体积为25 μl,其中含2.5 μl 10×buffer,2.5 mmol/L $MgCl_2$,0.2 mmol/L dNTP,15 ng引物,25~50 ng模板DNA,TaqDNA聚合酶1.5 U。反应程序为:94 ℃预变性2 min;94 ℃ 1 min,38 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min,40个循环后,72 ℃延伸10 min。扩增产物在含溴化乙锭的1.5%琼脂糖凝胶中电泳,紫外透射仪上观察照相。

2 结果

用120条RAPD引物对C57BL/6 J和BALB/c小鼠进行扩增,选出其中81条引物对10个品系小鼠进行亲缘关系的分析,在此基础上筛选出4条引物鉴定10个品系的小鼠。4条引物扩增出的条带清晰,重复性好。片段大小在250~2 000 bp之

基金项目:国家重点基础研究发展规化项目(G2000016106);国家自然科学基金资助项目(39600079、39900173);全军"九五"医药卫生科研基金资助项目(96M083);重庆市攻关项目
作者简介:李淑蓉(1965-),女,四川省双流县人,博士,副教授,主要从事分子病理学方面的研究,发表论文12篇。电话:(023)68752283
收稿日期:2000-07-18;修回日期:2000-12-26

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

间。主要以强带的差异来区分不同品系小鼠。由引物 AB4-16 扩增图谱，见图 1A，KM 鼠(1 号)与其它 9 个品系相比，多一条约 697 bp 的条带；T739(3 号)与其它 9 个品系相比，缺失一条约 1 400 bp的条带；而 C57BL/6J(5 号)多一条 377 bp 的条带，据此可将 1、3、5 号分别从 10 个品系中区别出来。图 1B 为引物 AB6-1 的扩增产物电泳图，其中 BALB/c-nu(7 号)和 NIH(9 号)带型与其它都不相同，可以区别这两个品系与其它 8 个品系。引物 AB6-7 的扩增图谱见图 1C，DBA/2(8 号)与其它品系明显不同，缺失一条约 697 bp 的条带；而 615(4 号)、DBA/2(8 号)、NIH(9 号)各多一条约 1 500 bp 的带。图 1D(引物 AB7-19 扩增图)可见 BALB/c(6 号)与 SCID(10 号)相比，6 号多一条约 994 bp 的带。综合上述结果，用 4 条引物将 10 个品系小鼠全部区分开来，并简单归纳为：

1～10 号 —AB4-16→ 区分出 1、3、5，其余分两组 [2、7、8、9 / 4、6、10]

—AB6-1→ 区分出 4、7、9，其余分两组 [2、8 —AB6-7→ 区分出 8，6、10]

余下 2、6、10 —AB7-19→ 6、10 区分开

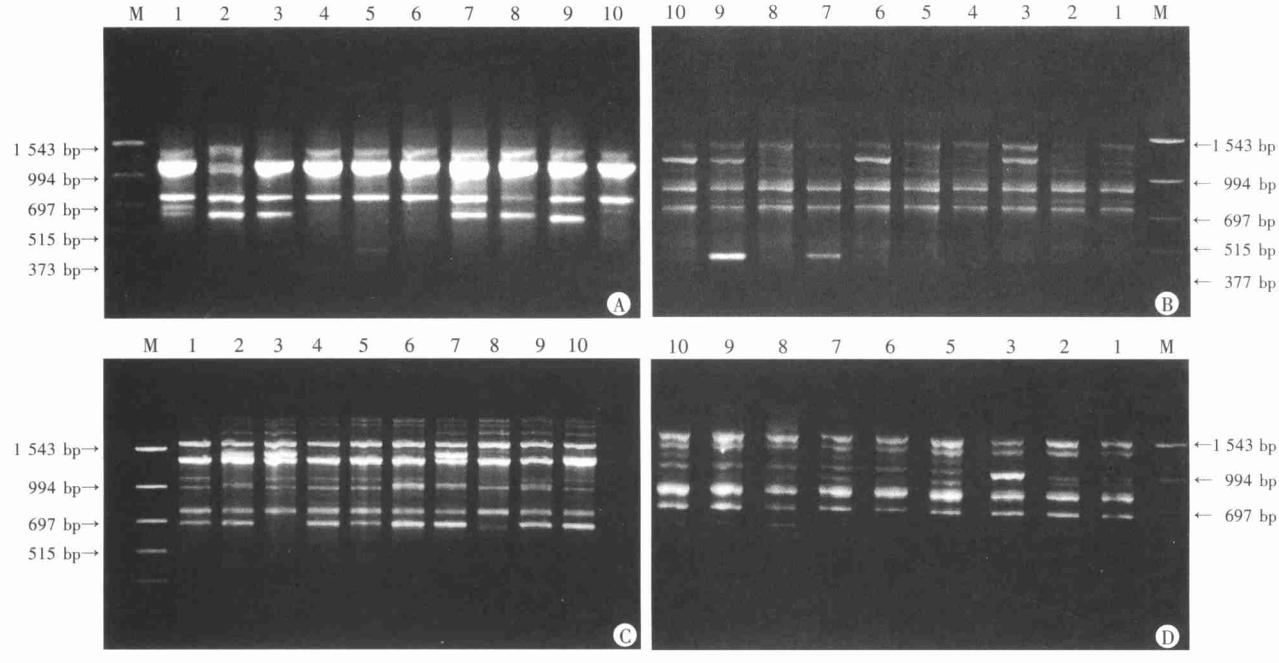


图 1 引物的扩增图谱

A：AB4-16；B：AB6-1；C：AB6-7；D：AB7-19；1～10 分别为 KM、TA2、T739、615、C57BL/6J、BALB/c、BALB/c-nu、DBA/2、NIH、SCID 鼠株；M：分子量标记

Fig 1 Figures of amplified bands of primer

A: AB4-16; B: AB6-1; C: AB6-7; D: AB7-19; 1 – 10: Strain of mouse of KM, TA2, T739, 615, C57BL/6J, BALB/c, BALB/c-nu, DBA/2, NIH, SCID; M: Molecular weight mark

3 讨论

小鼠在生命科学研究中具重要地位，特别是近交系小鼠在实验中所表现出的再现性、一致性和敏感性是其它实验动物不能代替的。而高质量实验动物的建立有赖于严格的遗传质量监测[4]。实验动物遗传监测是在同种属动物的共性中确定该种属动物中不同品系或品种个性，是以动物个体的遗传多态性为核心进行遗传标记的研究。为保证小鼠的遗传质量，建立行之有效的遗传质量监测方法至关重要。

传统实验动物质量监测方法，多限于基因表型的检测，如免疫标志检测、生化标志检测、形态特征检测，检测位点在整个基因组中所占比例小，分布不均。而直接从 DNA 分子水平对小鼠进行检测也有报道，程振华等[5]用小卫星探针对 4 个近交系小鼠进行遗传监测，其不同品系表现一定的多态性和特异性。Venugopal 等[6]用 100 条 RAPD 引物对 BALB/c 和 SJL/J 两个近交系小鼠进行研究，张文艳等[7]用 21 条 RAPD 引物对 BALB/c、C57BL 和昆明种小鼠进行扩增，以及我们用 120 条 RAPD 引物对 10 个品系小鼠的研究都表明 RAPD 标记在不同品系小鼠间产生丰富的多态性。在此基础上我们仅用 4 条引物，就把 10 个品系小鼠全部区分开来，不仅能区分外观形态差异大的品系如 BLBA/c 与 C57BL/6J，甚至遗传背景或外观形态很相似的品系，如 BALB/c 与 BALB/c-nu、KM 与 BALB/c 也能区分出来。此结果对实际工作具一定指导意义，加之 RAPD 技术操作简便、快捷、灵敏，适用于小鼠常规质量监测。可检测已知品系小鼠的遗传纯度，是否发生遗传污染，或用于其它来历不明小鼠的鉴定。另外，我们从 120 条引物中筛选出的其它多态引物，还可单独或以几条引物形成不同的组合，特异用于某个品系的鉴定，其

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

差异更明显。总之,RAPD技术在小鼠遗传监测、品系鉴定、建立新品系等工作中具良好的应用前景。

参考文献:

[1] 陈 洪,朱立煌,徐吉臣,等. RAPD标记构建水稻分子连锁图[J]. 植物学报,1995,37(9):677-684.
[2] 沈 曦,周开亚,王义权. 中国蝮属蛇类的RAPD分析[J]. 动物学报,1999,45(1):40-48.
[3] 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.
[4] Nomura T. Practical development of genetically engineered animals as human disease models[J]. Lab Anim Sci,1997,47(2):113-117.
[5] 程振华,张连峰,秦 川,等. 小鼠小卫星DNA阳性克隆的鉴定及DNA指纹分析[J]. 中国实验动物学报,1996,4(2):82-85.
[6] Venugopal G, Trivedi H N, Mohapatra S S. Arbitrary single short primers identify polymorphic DNA markers that distinguish inbred strains of mice [J]. Biochem Biophys Res Commun,1994,203(1):659-665.
[7] 张文艳,龚春梅,魏云林,等. 一种新的近交系实验动物遗传监测方法及小鼠性别相关RAPD标记的发现[J]. 实验生物学报,1996,25(4):59-69.

(编辑 郭建秀)

文章编号:1000-5404(2001)08-0953-01

个案与短篇

犬急性胰腺炎动物模型的建立

Establishment of a dog model of acute pancreatitis

夏时海,赵晓晏 (第三军医大学附属新桥医院消化内科,重庆 400037)

开展对急性胰腺炎的实验研究,制备理想可靠的动物模型至关重要。我们参照并比较了国内外制备急性胰腺炎动物模型的各种不同方法[1],建立了制备犬水肿型和出血坏死型急性胰腺炎模型的方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物

重庆地区健康杂种犬28只,体重10~15 kg,雌雄不拘,购自第三军医大学实验动物中心,实验前于本院动物室驯养2周。

1.2 试剂和药品

胰蛋白酶由上海浦东生化试剂厂提供,淀粉酶试剂盒由Beckman公司提供,牛磺胆酸钠由Sigma公司提供。

1.3 犬急性胰腺炎模型的制备

所有犬实验前禁食12 h,不禁水。先以氯胺酮肌注诱导麻醉,继以2.5%戊巴比妥钠(1 ml/kg)静脉麻醉,再以5%葡萄糖盐水静滴。将犬仰卧,四肢固定于手术台上,常规皮肤准备、消毒、铺巾后在无菌条件下进行手术。先行右股静脉置管备抽血样本用。经上腹正中切口入腹,寻及十二指肠,于主胰管开口附近(距幽门约7 cm)十二指肠对系膜面切开,寻及小乳头,置一直径为2 mm塑料管于主胰管内,用不同的压力注入5%牛磺胆酸钠(0.5 ml/kg)和胰蛋白酶(3 000 U/kg)混合液,滞留5 min后拔去塑料管,荷包缝合十二指肠壁,关腹。术后补液1 500 ml等渗液体,并加强护理。

1.4 实验分组

所有犬利用随机数字表法分3组:假手术组(SO,$n=8$)、水肿型胰腺炎组(AP,$n=10$)和出血坏死型胰腺炎组(AHNP,$n=10$)。假手术组除不注入上述混合液外,其余操作相同。分别以2.0 kPa和8.0 kPa恒定压力向主胰管内注入上述混合液,复制急性水肿型胰腺炎和急性出血坏死型胰腺炎模型。

1.5 观察项目

于术前麻醉状态下,术后1、6、24 h分别抽血测血清淀粉酶。各组未死亡犬于术后72 h处死,取胰腺组织作光镜检查。

1.6 统计学分析

数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验。

2 结果

2.1 血清淀粉酶变化见表1

表1 各组血清淀粉酶测定结果(U/L)

组别	n	0 h	1 h	6 h	24 h
SO	8	849.6±238.8	950.0±210.5	942.5±150.8	984.0±174.6
AP	10	1052.2±189.6	1568.5±307.5*	2153.5±721.3*	1479.9±420.6*
AHNP	10	1008.2±182.0	1789.5±214.6**	6240±3430.4**	5486.9±2635.3**

*:$P<0.05$,**:$P<0.01$ 与SO组相比

2.2 病理学观察

SO组胰腺腺泡结构正常;AP组胰腺间质轻度水肿、充血,少量炎性细胞浸润;AHNP组胰腺腺泡结构模糊,可见大片出血和坏死,大量炎性细胞浸润。

3 讨论

目前用于制备急性胰腺炎的动物主要是狗和大鼠,有的也用猫和兔等,其中狗是制作急性胰腺炎模型的首选动物[2]。狗的消化系统发达,与人有相同的消化过程,所以特别适合用作消化系统的实验研究。狗胰腺平均重量达230 g,大鼠只有1 g左右,猫和兔约20 g。狗胰腺与人胰腺相似,起源于两个原基,一般有两条胰管,即主胰管和副胰管,主胰管开口于十二指肠小乳头,直径大于2 mm,长度大于12 mm[2,3]。完全可进行主胰管插管,并通过调节注入主胰管药物的压力,分别复制出急性水肿型或出血坏死型胰腺炎,因为不同的压力导致药物对毛细

(下转956页)

作者简介:夏时海(1971-),男,四川省平昌县人,硕士,医师,助教,主要从事重症急性胰腺炎血循环障碍机制方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68755604

收稿日期:2000-09-01;修回日期:2001-01-05

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