DOI:10.16016/j.1000-5404.1999.10.006

文章编号:1000-5404(1999)10-0709-03

6个近交系小鼠线粒体DNA D-Loop区PCR-RFLP分析*

戴纪刚** 魏 泓 肖颖彬 (第三军医大学实验动物中心)重庆,400038

提 要 目的:分析T739等6个近交系小鼠线粒体DNA D-Loop区的多态性,探讨近交系小鼠的遗传监测方法。方法:PCR-RFLP技术,即PCR技术结合限制性片段长度多态分析(Restriction fragment length polymorphism,RFLP)。结果:D-Loop片段经*Hae* Ⅲ、*Hinf* Ⅰ、*EcoR* Ⅴ、*Hind* Ⅲ、*Hpa* Ⅰ、*BamH* Ⅰ、*Apa* Ⅰ、*Nde* Ⅰ、*Xho* Ⅰ、*Xba* Ⅰ内切酶消化后,T739、TA2、615、BALB/C、C3H、C57BL/6J小鼠表现出完全相同的酶切格局,未发现多态性。结论:T739等6种近交系小鼠有较近的亲缘关系,遗传背景相对近似。

关键词 近交系小鼠;mtDNA D-Loop;PCR-RFLP;多态性
中图法分类号 Q953.5 **文献标识码**:A

线粒体DNA是染色体外的遗传物质,它的限制性内切酶图谱在不同的种系、亚种间具有多态性。这种多态性反映出不同种间、亚种间的遗传差异及进化关系。随着分子生物学技术的高度发展,mtDNA基因精细结构的不断揭示,分析mtDNA特定基因或特定区域的变异以便能更为精确地找出变异已成为当前mtDNA研究热点。mtDNA D-Loop,即mtDNA的非编码区,占全部mtDNA分子的6%左右,在mtDNA的转录和复制中起重要作用。同时,其碱基替换率比mtDNA分子的其它区域高5~10倍,为mtDNA分子内的高变异性区。因此有关mtDNA D-Loop的遗传变异分析的研究已在人、牛、猪、马、鸭、鱼类、昆虫类、两栖类等多种动物中开展。但有关近交系小鼠mtDNA D环多态性的研究至今未见报道。为了解T739等小鼠间mtDNA D环的多态性,探讨近交系小鼠的遗传监测方法,我们对T739、TA2、615、BALB/C、C3H、C57BL/6J 6种近交系小鼠进行了mtDNA D-Loop限制性片段长度多态性分析。

1 材料和方法

1.1 动物来源及试剂

T739、TA2、615、BALB/C、C3H、C57BL/6J均来源于第三军医大学实验动物中心,限制性内切酶*Hae* Ⅲ、*Hinf* Ⅰ、*EcoR* Ⅴ、*Hind* Ⅲ、*Hpa* Ⅰ、*BamH* Ⅰ、*Apa* Ⅰ、*Nde* Ⅰ、*Xho* Ⅰ、*Xba* Ⅰ购自华美生物技术公司和美国Promega公司;多聚酶链反应(PCR)试剂盒系德国宝灵曼公司产品;其它生化试剂系国产分析纯。

1.2 总DNA的提取

按常规酶解法提取鼠肝脏细胞总DNA,其中包括mtDNA,取0.5 μg作PCR模板。

1.3 PCR扩增

所用鼠mtDNA D环片段引物由中国科学院上海细胞生物学研究所合成:

L链(15294-15320)5'-ATA AAC ATT ACT CTG GTC TTG TAA ACC-3'

H链(98-72)5'-ATT AAT AAG GCC AGG ACC AAA CCT-3'

建立100 μl反应体系,内含0.5 μg总DNA为模板,先经94℃变性5 min,加入1 μl(4 U/μl)的Taq酶循环30个周期(每个周期94℃ 30 s、55℃ 1 min、72℃ 1 min),最终72℃延长10 min。

1.4 PCR产物D环片段限制性内切酶消化

取扩增产物5 μl,分别加入2 U的限制性内切酶和1.2 μl 10×酶切缓冲液,加灭菌水至12 μl,37℃温育过夜。

1.5 电泳分析

用1%的琼脂糖凝胶,电液为TBE缓冲液,以3 V/cm电泳1~2 h,紫外灯下观察并拍照。酶切片段长度测定以华美公司标准Marker(以PBR 322为底物,*Hind* Ⅲ等6种酶水解)酶切片段为分子量标准,利用电泳迁移率与分子量对数间的线性关系,测得各酶切片段分子量。

2 结果

2.1 PCR扩增结果

T739、TA2、615、BALB/C、C3H、C57BL/6J 6种小鼠样品均扩增出长1 100 bp的mtDNA D环片段,未发现其长度多态性,见图1。



图1 mtDNA D-Loop扩增结果
1、2、3、4、5、6:T739、TA2、615、BALB/C、C3H、C57BL/6J小鼠;M:PCR标准Marker

Fig 1 Results of mtDNA D-Loop amplification
1~6 Strain of mouse: 1: T739; 2: TA2; 3: 615; 4: BALB/C; 5: C3H; 6: C57BL/6J; M: PCR standard Markers

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39600079;全军"九五"医药卫生科研基金资助项目,No. 96M083
** 戴纪刚,男,28岁,住院医师,硕士研究生,现在附属新桥医院心胸外科 重庆,400037

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

2.2 mtDNA D环片段限制性内切酶酶切分析

用 *Hae* Ⅲ、*Hinf* Ⅰ、*EcoR* Ⅴ、*Hind* Ⅲ、*Hpa* Ⅰ、*BamH* Ⅰ、*Apa* Ⅰ、*Nde* Ⅰ、*Xho* Ⅰ、*Xba* Ⅰ内切酶对 T739、TA_2、615、BALB/C、C3H、C57Bl/6J 小鼠的 mtDNA D-Loop 片段进行了完全酶解。这些近交系小鼠在各个内切酶消化后呈现出相同的模式，即6个近交系小鼠的切割模式和片段大小完全相同，未发现多态性，结果见图2、3及表1。



图2 mtDNA D-Loop *Hinf* Ⅰ酶切结果

1～6同图1

Fig 2 Restriction patterns of mtDNA D-Loop *Hinf* Ⅰ

Notes as in Fig 1

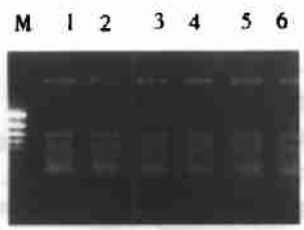


图3 mtDNA D-Loop *Nde* Ⅰ酶切结果

1～6同图1

Fig 3 Restriction patterns of mtDNA D-Loop *Nde* Ⅰ

Notes as in Fig 1

表1 鼠 mtDNA D 环酶切格局

Tab 1 Patterns of mouse mtDNA D-Loop restriction

Enzyme	Endonuclease sites	Fragment length(bp)
Hinf Ⅰ	1	700;400
Nde Ⅰ	2	650;360;90
Apa Ⅰ	1	660;440
Xba Ⅰ	1	680;420
Hae Ⅲ	3	460;450;120;70

Note: There are no endonuclease sites by the other restriction enzymes

3 讨论

高等动物 mtDNA 是共价闭合的双链 DNA，长度为16.5 kb左右。mtDNA 基因组织结构简单、稳定，且遵循母系遗传方式，在遗传过程中不发生重组。利用限制性内切酶处理 mtDNA，得到的限制性片段长度多态(RFLP)或限制性内切酶图谱既具有相对的种属稳定性，又能够反映种属间的进化关系，因而成为动物种属鉴定和系统演化研究的一种有效的遗传标记。目前所研究的包括人类在内的数百种动物的 mtDNA 多态性已取得了许多人瞩目的成果，为动物的起源及遗传分化提供了许多科学依据[1]。关于近交系小鼠 mtDNA 多态性的研究亦有报道。Ferris[2]对 BALB/C、C3H、C57Bl/6J 等9种老近交系小鼠及多种野生鼠 mtDNA 限制性酶切分析发现，野生鼠之间，mtDNA 具有丰富的多态性；而 BALB/C 等9种老近交系小鼠出现完全相同的酶切图谱，因此其认为：BALB/C 等老近交系具有相同的遗传起源，即欧洲亚种 M. m. domesticus。T739、TA_2、615 为中国自行培育且应用广泛的近交系小鼠，BALB/C、C3H、C57Bl/6J 是传统的标准近交系小鼠。我们的研究发现，这6种小鼠 mtDNA D-Loop经上述内切酶消化后，它们的酶切格局及片段大小完全一致，未出现多态性。这一现象表明 T739、TA_2、615 近交系小鼠与 BALB/C 等老近交系小鼠亲缘关系较近，遗传背景较为近似。

mtDNA 限制性片段长度多态分析，目前已广泛地应用于研究动物起源和遗传分化，成为一种有效地遗传监测方法。但这一方法需要新鲜或冻存的组织材料，这在很大程度上限制了该方法的应用。随着 PCR 技术的诞生和发展，使得我们从陈旧组织(如切片、标本)、微量组织(如毛囊)、甚至化石材料中提取并直接扩增 DNA 成为可能。采用 PCR 方法，不仅避免了实验材料的限制，而且还可通过对陈旧组织及化石 DNA 的分析，做纵向的比较研究。对于研究动物遗传、进化无疑具有重要意义。目前 PCR 技术已广泛应用于研究动物 mtDNA 的多态性。但我们的研究表明：近交系小鼠遗传背景十分狭窄，不同品系间遗传背景的差异远远低于动物种属间的差异，对近交系小鼠来说，mtDNA PCR-RFLP 不是一种有效的遗传监测手段，因此有必要发展和探索一些多态性更丰富、更精确的方法来监测近交系小鼠的遗传背景。

参考文献

1 张亚平，施立明. 动物线粒体 DNA 多态性的研究概况. 动物学研究，1992，13(3)：289

2 Ferris S D, Sage R D, Wilson A C. Evidence from mtDNA sequnces that common laboratory strains of inbred mice are desended from a single female. Nature，1982，295(14)：163

(收稿：1999-03-02；修回：1999-07-15)

(编辑 王 红)

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

Analysis of mitochondrial DNA D-loop in 6 inbred strains of mice*

Dai Jigang, Wei Hong, Xiao Yingbin (Center of Laboratory Animals, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To analyze the polymorphism of the D-loop of mitochondrial DNA (mtDNA) in 6 inbred strains of mice and explore the method of genetic monitoring of inbred mice. **Methods**: PCR-RFLP was emplyed. **Results**: Having been cleavaged with restriction endonucleases of *Hae* Ⅲ, *Hinf* Ⅰ, *EcoR* Ⅴ, *Hind* Ⅲ, *Hpa* Ⅰ, *BamH* Ⅰ, *Apa* Ⅰ, *Nde* Ⅱ, *Xho* Ⅰ and *Xba* Ⅰ, the restriction pattern of the D-loop of mtDNA showed no variation in the 6 strains of inbred mice. **Conclusion**: The genetic relationship among the 6 strains of inbred mice of T739, TA2, 615, BALH/C, C3H and C57BL/6J is quite close.

Key words inbred mouse; mitochondrium; DNA; D-loop; PCR-RFLP; polymorphism

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39600079

（上接 708 页）

置，充氧 5 min 后关闭充氧开关，此时膜盒压力表指针保持在 150～250 Pa 范围内，治疗 40 min 后将高压舱内的进氧开关关闭，再将氧罩的紧固卡打开，握住罩体的提手将氧罩揭开至定位卡的卡槽内支撑氧罩，最后将患儿抱出罩体。待高压舱正规减压完毕后出舱。

2.2　检测结果

2.2.1　婴幼儿氧罩内氧浓度　当氧罩内压力在 500 Pa，氧流量 800 L/h 时，采用浙江建德梅城电化分析仪器厂 HBO-3C 型控氧仪监测。测量结果为：5 min 时氧浓度＞75%，6 min＞80%，9 min 达 90%以上。

2.2.2　高压舱内氧浓度　采用同种测氧仪监测，结果高压舱内的氧浓度控制在 23%以内，与平时高压舱内无婴儿氧罩治疗时氧浓度无明显差别，完全符合国家标准[2]。

3　临床应用

婴幼儿氧罩制成以来，先后应用于 94 例患儿 1 500 余人次的治疗，年龄分别为 1 d 至 5 岁。治疗的病种有新生儿缺氧缺血性脑病、小儿颅脑外伤、病毒性脑炎、小儿痉挛症、小儿脑瘫等。采用婴幼儿氧罩治疗新生儿缺氧缺血性脑病，总有效率为 92.6%，与采用婴儿氧舱治疗总有效率 93%相比，疗效无差异。

4　讨论

婴幼儿高压氧治疗时以往曾采用头罩、大塑料袋、有机玻璃罩或透明塑料罩[3]。此种方法虽能暂时解决婴幼儿吸氧的问题，但排出的废氧留在高压舱，易使舱内的氧浓度增高。当舱内氧浓度超标＞25%时必须给高压舱内换气，以使氧浓度下降。因此，增加了不安全因素和工作量。

我们研制的氧罩在以往工作的基础上有所改进：①由于较好地解决了氧罩密闭问题，并将多余氧气排出舱外，减少高压氧舱内氧浓度超标的情况，可确保高压舱内其它患者的治疗安全。另外治疗时婴幼儿氧罩内压力在 500 Pa 时 5 min 后就能达到治疗所需氧浓度(75%以上)[4]。②此氧罩使用简单，同时又有量化标准，即用膜盒式压力表监测，将罩内压力控制在 500 Pa 以内，用转子流量计将供氧量控制在一定刻度。因此，患儿陪伴可在工作人员的指导下自行操作。③婴儿氧舱只适用于较小的婴儿，如遇会翻身的患儿可造成口鼻阻塞，如有呕吐物亦不能及时清理，并且限制了病情严重或气管切开需要吸痰患儿的治疗。婴幼儿氧罩能很好地避免上述不足，在治疗过程中如遇问题，可立即将氧罩揭开对症处理。④婴幼儿氧罩成本低，使用方便，便于推广，因而对于婴幼儿患者的治疗提供了更多的机会。

关键词　高压氧；氧罩；婴幼儿

中图法分类号　R459.6　　**文献标识码**：B

参考文献

1　张香菊，王　勇，王湘渝，等. GYQ-402 婴幼儿氧罩的研制. 高压氧医学杂志，1998，7(1)：55

2　中华人民共和国国家标准. 医用高压氧舱. 北京：中国标准出版社，GB12130，1995. 493

3　高春锦，杨捷云 编著. 实用高压氧学. 北京：学苑出版社，1997. 380～382

4　房广才 主编. 临床高压氧医学. 北京：华文出版社，1995. 437～439

（收稿：1998-09-24；修回：1999-04-23）

（编辑　张大春）

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