DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.07.012
第22卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 7
642 2000年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)07-0642-03

STR-PCR方法检测贵州小型香猪遗传变异性的研究

黄中波[1],牛 荣[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,贵阳 550002)

提 要:目的 准确分析贵州小型香猪种群遗传变异及近交程度。方法 采用10对短串联重复序列(STR)引物,对贵州小型香猪个体进行PCR检测。结果 在检测到的88个有效等位基因型中,纯合基因型50个,占55.7%。个体平均杂合率为0.4081,位点平均杂合率为0.5562。结论 贵州小型香猪具有一定遗传稳定性,符合封闭群动物遗传学特征。

关键词:贵州小型香猪;遗传检测
中图法分类号:R394-3 文献标识码:A

Monitoring the genetic variation of Guizhou miniature pigs with STR-PCR

HUANG Zhong-bo, NIU Rong, WEI Hong, GAN Shi-xiang (Center of Laboratory Animals, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the genetic variation and inbreeding of Guizhou miniature pigs. Methods DNA of ten Guizhou miniature pigs extracted to observe its genotype by STR-PCR with 10 pairs of short tandem repeat (STR) as the primers. Results Fifty homozygostic genes (55.7%) were found in all 88 effective allele types. Average heterozygostic rate of individuals was 0.4081, and that of loci was 0.5562. Conclusion Guizhou miniature pigs are genetically stabe and satisfied the genetic standard of closed colony animal.

Key words: short tandem repeat; Guizhou miniature pig; genetic monitoring

短串联重复序列(Short tandem repeat, STR),又称微卫星DNA(Microsatellite DNA),是指简单重复的DNA片断,一般每个重复单位仅有1~4个碱基,广泛分布于真核细胞的基因组中。STR具有数量多、高度多态性,进化所受选择压力小等特点,在评估品种遗传多样性,估测品种间遗传距离及构建系统发生树等研究中显示出优势[1]。贵州小型香猪原产于贵州与广西邻接山区,在交通闭塞的特定环境中,长期闭锁繁殖形成自然封闭群。贵阳中医学院甘世祥教授在此基础上进行了定向培育,建立了贵州小型香猪群体[2]。本实验运用10对STR引物对贵州小型香猪个体进行STR-PCR检测,为揭示其遗传结构、遗传背景及开展品种资源保存、遗传育种工作提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 样本DNA制备[1,3,4]

随机抽选10头贵州小型香猪,前腔静脉采血10 ml,抗凝,加2倍体积2× ST激烈振荡,冰浴至完全透明,离心(4 000 r/min)10 min,弃上清,加1 ml STE溶液(含蛋白酶K和SDS终浓度分别为100 mg/ml和1%)摇匀,56 ℃水浴5 h。加等体积饱和酚剧烈振荡,离心(4 000 r/min)10 min,取上清,加等体积酚:氯仿:异戊醇(ψ_B= 25∶24∶1)充分混匀,离心(4 000 r/min)10 min,取上清,加等体积氯仿:异戊醇(ψ_B= 24∶1)充分混匀,4 000 r/min离心10 min,取上清加5 mol/L NaCl至终浓度0.25 mol/L,加2.5倍体积冰乙醇混匀,-20℃过夜。离心(15 000 r/min)15 min,弃上层水相。70%乙醇洗2次,离心(15 000 r/min)10 min,晾干,加60 μl TE液4 ℃保存,备用。

1.2 引物

根据Rohrer等[5]研究报道,选择10对猪STR引物,由上海细胞研究所合成并纯化,其碱基序列及退火温度,见表1。

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(G2000.016106);国家"九五"重点科技攻关项目(96A-23-06-01);国家自然科学基金重点资助项目(39830190)及面上资助项目(39770398)

作者简介:黄中波(1969-),男,四川省隆昌县人,实验师,主要从事医学实验动物学方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68752052

收稿日期:1999-12-15;修回日期:2000-03-03

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

表 1　贵州小型香猪在 10 个 STR 座位的基因型

Tab 1　Genotypes of 10 STR loci in Guizhou miniature pig

STR loci	Primer	Section size	Annealing temp	Genotypes(No.)									
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
S0003	5'-GAAGTGTTAAGGAAAGCCTT-3 5'-AGCCTCAGTTTCTCTACCTA-3	111~190(142~164) *	60 ℃	a	ab	/	a	a	ab	ab	ab	a	ab
S0004	5'-GTTATGGACACGGASAGGAT-3' 5'-GTCCTATTTCTTGCACAGTC-3	147~242(164~172)	55 ℃	a	a	a	ab	a	a	a	a	ab	ab
S0005	5'-TCCTTCCCTCCTGGTAACTA-3' 5'-GCACTTCCTGATTCTGGGTA-3'	190~331(203~241)	60 ℃	a	a	a	ab	ab	ab	ab	ab	ab	/
S0008	5'-GAGGCAGTGTGTTCTATTCA-3' 5'-GCCATGTGTAAAGTGTTGCT-3'	147~242(177~191)	58 ℃	a	ab	/	ab	ab	ab	ab	a	a	/
S0010	5'-TTAACATGGCTGTCTGGACC-3' 5'-GTCCCTGTCCAACCATAAGA-3'	107~140(102~124)	60 ℃	a	ab	ab	ab	a	ab	ab	ac	ab	ac
S0061	5'-AAGCAGAAGGGATCTCTCTA-3' 5'-CCTGTTTCTGGGTTCTCTTA-3'	147~190(167~187)	55 ℃	a	b	a	a	/	a	/	a	a	a
S0062	5'-AAGATCATTTAGTCAAGGTCACAG-3 5'-TCTGATAGGGAACATAGGATAAAT-3'	147~242(146~196)	55 ℃	a	/	ab	ab	a	/	ab	a	a	a
OPN	5'-CCAATCCTATTCACGAAAAAGC-3' 5'-CCAACCCACTTGCTCCCAC-3'	111~190(142~164)	58 ℃	a	a	/	ab	/	/	a	ab	a	/
IGFI	5'-TAATGATGGTGGTGGTTAGTGC-3' 5'-ATTAGACCCCTAGCCTGGGA-3'	190~331(223~237)	58 ℃	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
ATP2	5'-GCTTGGATGGACCATGTTG-3' 5'-CACTTGAGGGGCAAATGATT-3'	242~331(246~252)	62 ℃	a	a	a	a	a	/	ab	ab	ab	a

The molecular weight of amplification fragments were in alphabet sequence (a< b< c). Bracket: Molecular weight of amplification fragments described by Rohrer *et al*[5]

1.3　PCR 扩增

反应总体积 20 μl, 内含样本 DNA 50~70 ng, 4× dNTP 各 25 μmol/L, 引物各 10 pmol, TaqDNA 聚合酶 0.9 U, 10× buffer 2 μl, Mg^{2+} 1.5 mmol/L。反应参数: 92 ℃预变性 2 min, 94 ℃变性 30 s, 退火温度下 30 s, 72 ℃延伸 2 min, 30 个循环接 72 ℃ 5 min。

1.4　电泳

取 10 μl PCR 扩增产物在 8%聚丙烯酰胺凝胶上 200 V 电泳 30~40 min, 固定 15 min, 银染 30 min 显色 5~10 min, 停显照像。

2　结果

2.1　基因型

贵州小型香猪 10 个 STR 座位基因型见表 1, 其中 1 号个体 10 个座位均呈纯合等位基因状态, 而在 IGFI 座位, 10 头猪均呈纯合等位基因状态。本实验共观察到 88 个有效等位基因型, 其中纯合状态 50 个, 占总观察数的 55.7%, 见图 1, 2。

2.2　基因频率分布[5,6]

由于 STR 为显性遗传, 可直接推断基因型, 从而得到基因频率, 某一等位基因的频率则等于该等位基因纯合子频率加上二分之一含有该等位基因的杂合子频率, 贵州小型香猪 10 个 STR 座位的基因频率见表 2。

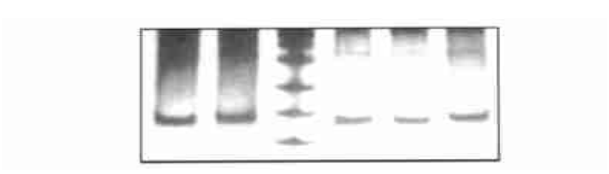


图 1　IGFI 座位电泳图

Fig 1　Electrophoresis of IGFI loci

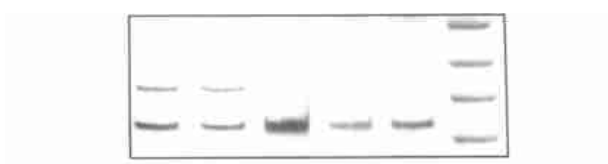


图 2　S0005 座位电泳图

Fig 2　Electrophoresis of S0005 loci

表 2　贵州小型香猪的基因频率

Tab 2　Allele frequencies at 10 STR loci in Guizhou miniature pig

Loci		Frequencies	Loci		Frequencies
S0003	a	0.7222	S0061	a	0.8750
	b	0.2778		b	0.1250
S0004	a	0.8500	S0062	a	0.7500
	b	0.1500		b	0.2500
S0005	a	0.7778	OPN	a	0.8333
	b	0.2222		b	0.1667
S008	a	0.6875	S0010	a	0.6000
	b	0.3125		b	0.3000
IGFI	a	1		c	0.1000
ATP2	a	0.8333			
	b	0.1667			

2.3　样本平均杂合度与座位平均杂合度[5,7]

根据 Nei(1974, 1978)介绍的计算公式可估算所测样本的平均杂合度[$H_{(S)}$], 座位平均杂合度[$H_{(L)}$], 公式如下:

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

$$H_{(s)}=1-\sum_{L=1}^{m}\sum_{j=1}^{Ks}X^2 \quad Lij/m$$

$$H_{(L)}=1-\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{Ki}X^2 \quad Lij/n$$

其中，X_{Lij}表示第L个体在第i个座位的第j个等位基因的频率，m是样本总数，n为STR座位数，Ks为第S个座位的主要等位基因数。计算结果如下：

$$H_{(s)}=0.4081$$

$$H_{(L)}=0.5562$$

3 讨论

本实验结果显示，10头贵州小型香猪个体在9个STR座位呈多态性，均出现1～3个等位基因，共观察到88个有效等位基因型，其中纯合状态基因型50个，占55.7%，与个体平均杂合率0.4081相符，反映所取样本个体具有一定基因纯合度，与该群体的封闭繁育相关。个体平均杂合度反映了个体间在若干座位基因的杂合程度，其大小反映了群体遗传变异的大小。而座位平均杂合度则显示了10个个体在各个位点基因平均杂合度，其大小反映了个体在若干座位的遗传变异程度，本实验中测得座位平均杂合率为0.5562。以上结果表明，贵州小型香猪具有一定的基因纯合度，但仍有相当数量基因处于杂合状态。揭示贵州小型香猪具有一定的遗传稳定性，但个体间又具有相当遗传差异。因此，贵州小型猪具有封闭群动物的遗传特点，与该种群繁育方式、培育世代基本相符，其动物群体的基因频率已趋于稳定，已基本形成一个新的封闭群。

参考文献：

[1] 樊 斌，李 奎，彭中镇. 中国动物遗传育种研究进展[M]. 北京：中国农业科技出版社，1999. 32—36.

[2] 甘世祥. 贵州小型猪实验用小香猪[M]. 贵阳：贵州科技出版社，1997. 1—17.

[3] 樊 斌，李 奎，彭中镇，等. 湖北省三种猪27个微卫星座位的遗传变异[J]. 生物多样性，1999，7(2)：12—18.

[4] 曾 苹，张连峰，程振华，等. 利用PCR技术分析微卫星DNA进行小鼠的遗传监测[J]. 中国实验动物学杂志，1995，5(4)：225—228.

[5] Rohrer A，Alexander J，Keele W，*et al*. A microsatellite linkage map of the porcine genome[J]. Genetics，1994，136(2)：231—245.

[6] 徐云碧，何 颖，朱立煌. 分子数量遗传学[M]. 北京：中国农业出版社，1994. 10—20.

[7] 郭 政，李 霞，何 颖. 医学遗传学与遗传流行病学数据分析[M]. 哈尔滨：黑龙江科技出版社，1996. 1—23.

（编辑 谢义霞）

经验与短篇

文章编号：1000-5404(2000)07-0644-01

百忧解对中风后神经功能恢复的影响

The effect of Prozac on neuronal function after stroke

陈康宁，程思远，史树贵 （第三军医大学附属西南医院神经内科，重庆 400038）

近年来的研究发现中风后情绪的改变对脑血管病的神经功能恢复有很大的影响。本研究观察了患者中风后抑郁(SDS)、汉密尔登抑郁评分的变化及神经功能Rakin's Disability(RD)评分，同时观察了抗抑郁治疗对上述的影响，旨在探讨抗抑郁治疗在脑血管病神经功能恢复中的作用。

1 材料与方法

入选的病人共96例，其中缺血性中风61例，出血性中风35例。男性53例，女性43例，平均年龄(60.4±10.8)岁。起病后1周行SDS(≥43分的评为有抑郁)及RD评分。SDS大于43分的患者共46例，平均分成两组，治疗组每日早晨服百忧解(20 mg)治疗，非治疗组不用抗抑郁药治疗。4～5周后对抑郁患者再行抑郁及RD评分。

统计学方法采用*t*检验。

2 结果

本组病例抑郁的发生率为47.9%(46/96)。治疗组与非治疗组RD及抑郁评分，见表1。

（下转648页）

作者简介：陈康宁(1964—)，男，四川省雅安市人，博士，副主任医师，副教授，主要从事脑血管病及神经症方面的研究，发表论文17篇。电话：(023)68754114-73079

收稿日期：1999-08-11；修回日期：2000-01-19

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