DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.01.013
第22卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 1
2000年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2000

文章编号:1000-5404(2000)01-0029-04

论著

三个封闭群小鼠线粒体 DNA PCR-RFLP 分析

戴纪刚[1],魏 泓[2],肖颖彬[1],张国强[1] (第三军医大学:[1]附属新桥医院胸外科,重庆 400037;[2]实验动物中心,重庆 400038)

提 要 目的:分析 KM 等3个封闭群小鼠线粒体 DNA(mtDNA)的多态性,探讨实验小鼠的遗传监测方法。方法:PCR-RFLP 技术,即 PCR 技术结合限制性内切酶片段长度多态分析(Restriction fragment length polymorphism,RFLP)。结果:mtDNA D-Loop、tRNA1基因、ND3基因片段经 *Hae* Ⅲ、*Hinf* Ⅰ、*EcoR* Ⅴ、*Hind* Ⅲ、*Hpa* Ⅰ、*BamH* Ⅰ、*Apa* Ⅰ、*Nde* Ⅱ、*Xho* Ⅰ、*Xba* Ⅰ、*Alu* Ⅰ、*Rsa* Ⅰ、*Stu* Ⅰ、*Dra* Ⅰ、*Ava* Ⅰ、*Hae* Ⅱ 16种内切酶分别消化后,KM、NIH、ICR 等小鼠品系内、品系间均表现出相同的酶切图谱,且与近交系小鼠 BALB/C 完全相同,未发现多态性。结论:KM、NIH、ICR 小鼠与绝大多数实验小鼠一样,遗传背景较为狭窄,不同品系小鼠间遗传背景的差异远远低于动物种属间的差异。

关键词 封闭群小鼠;mtDNA;PCR-RFLP;多态性
中图法分类号 R342.3;R394 文献标识码 A

Analysis of mitochondrial DNA in 3 closed colonies of mice

DAI Ji-gang, WEI Hong, XIAO Yin-bin, ZHANG Guo-qiang (Department of Thoratic Surgery of Xinqiao Hospital, Chongqing 400037)

Abstract Objective: To study the polymorphism of mitochondrial DNA in 3 closed colonies of mice. Methods: PCR-RFLP. Results: After the cleavage with 16 restriction endonucleases including *Hae* Ⅲ, *Hinf* Ⅰ, *EcoR* Ⅴ, *Hind* Ⅲ, *Hpa* Ⅰ, *BamH* Ⅰ, *Apa* Ⅰ, *Nde* Ⅱ, *Xho* Ⅰ, *Xba* Ⅰ, *Alu* Ⅰ, *Rsa* Ⅰ, *Stu* Ⅰ, *Dra* Ⅰ, *Ava* Ⅰ, *Hae* Ⅱ, all the restriction patterns of the D-loop of mitochondrial DNA, tRNA Ⅰ fragment and ND3 fragment were identical in the 3 colonies of KM, NIH and ICR and were the same as those of BALB/c strain of mouse. Polymorphism of mitochondrial DNA was not found. Conclusion: The genetic background of KM, NIH and ICR mice, similar to that of most of laboratory mice, is limited and the diversity of genetic background of different strains of laboratory mice is far fewer than the interspecies diversities of other animals.

Key words closed colony mouse; mitochondrial DNA; PCR-RFLP; polymorphism

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。随着分子生物技术的迅速发展,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 为环状双链的 DAN 分子,由基因编码区和非编码区组成。mtDNA 的非编码区,即 D-Loop,占全部 mtDNA 分子的 6%左右,在 mtDNA 的转录和复制中起重要作用,为 mtDNA 分子内的高变异筒区。为了解 KM、NIH、ICR 等小鼠 mtDNA 的多态性,探讨实验小鼠的遗传监测方法,我们扩增了 KM、NIH、ICR 等3个封闭群小鼠 mtDNA 的 D-Loop、tRNA1、ND3 基因片段,并对其进行了品系内、品系间限制性内切酶片段长度多态性分析。

基金项目: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:戴纪刚(1972-11),男,湖南省娄底市人,硕士研究生,住院医师,主要从事肿瘤遗传学方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)67660997

收稿日期:1999-06-30;修回日期:1999-09-13

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

1 材料与方法

1.1 动物来源及试剂

KM、NIH、ICR 3个封闭群小鼠各 10只，BALB/C 小鼠 1只，由第三军医大学实验动物中心提供；限制性内切酶 *Hae* Ⅲ、*Hinf* Ⅰ、*EcoR* Ⅴ、*Hind* Ⅲ、*Hpa* Ⅰ、*BamH* Ⅰ、*Apa* Ⅰ、*Nde* Ⅱ、*Xho* Ⅰ、*Xba* Ⅰ、*Alu* Ⅰ、*Rsa* Ⅰ、*Stu* Ⅰ、*Dra* Ⅰ、*Ava* Ⅰ、*Hae* Ⅱ购自德国宝灵曼公司和美国 Promega 公司；多聚酶链反应(PCR)试剂盒系德国 Roch 公司产品；其它生化试剂系国产分析。

1.2 总 DNA 的提取

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

1.3 PCR 扩增

所用引物由中国科学院上海细胞生物学研究所合成，见表 1。

表 1 引物序列及扩增片段长度

Tab 1 Primer sequences and the lengths of the amplified fragments

Amplified fragments	Fragment length(bp)	Locatinn	Primer sequences
D-Loop	1 100	L chain(15294-15320)	5′-ATAAACATTACTCTGGTCTTGTAAACC-3′
		H chain(98-72)	5′-ATTAATAAGGCCAGGACCAAACCT-3′
tRNA1 fragment	1 126	L chain(3401-3419)	5′-CGCCCCATTCGCGTTATTC-3′
		H chain(4527-4508)	5′-AGGTTGAGTAGAGTGAGGGA-3′
ND3 fragment	534	L chain(9364-9385)	5′-ACGTCTCCATTTATTGATGAGG-3′
		H chain(9897-9876)	5′-GAGGTTGAAGAAGGTAGATGGC-3′

建立 100 μl 反应体系，内含 0.5 μl 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 产物限制性内切酶消化

逐一取扩增产物 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，电泳液为 1×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 PBR322 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

KM、NIH、ICR、BALB/C 小鼠样品均扩增出长 1 100 bp 的 mtDNA D环片段、长 1 126 b_p 的 tRNA1 基因片段、长 534 b_p 的 ND3 基因片段，未发现其长度多态性，见图 1。

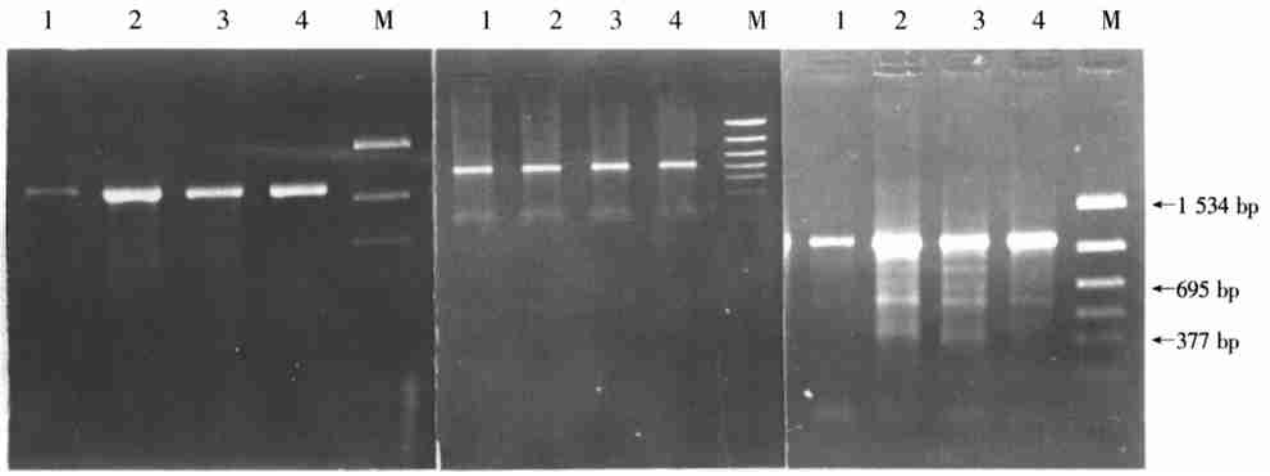


图 1 1、2、3、4：KM、NIH、ICR、BALB/C 小鼠；M：PCR 标准 Marker；Ⅰ：mtDNA D-Loop 扩增结果；Ⅱ：ND3 基因片段扩增结果；Ⅲ：tRNA1 基因片段扩增结果

Fig 1 1, 2, 3, 4 : KM, NIH, ICR and BALB/c mice respectively ; M : Standard marker of PCR ; Ⅰ : Amplified product of mtDNA D-loop ; Ⅱ : Amplified product of ND3 fragment ; Ⅲ : Amplified product of tRNA1 fragment

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

2.2　mtDNA D 环、tRNA 基因、ND3 基因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* Ⅱ、*Xho* Ⅰ、*Xba* Ⅰ、*Alu* Ⅰ、*Rsa* Ⅰ、*Stu* Ⅰ、*Dra* Ⅰ、*Ava* Ⅰ、*Hae* Ⅱ等 16 种内切酶分别对 KM、NIH、ICR 小鼠不同个体的 mtDNA D-Loop、tRNA1 基因、ND3 基因片段进行了完全酶解。结果发现其品系内、品系间均表现出相同的酶切图谱,且与 BALB/C 小鼠完全相同,未发现多态性。见图 2 及表 2。

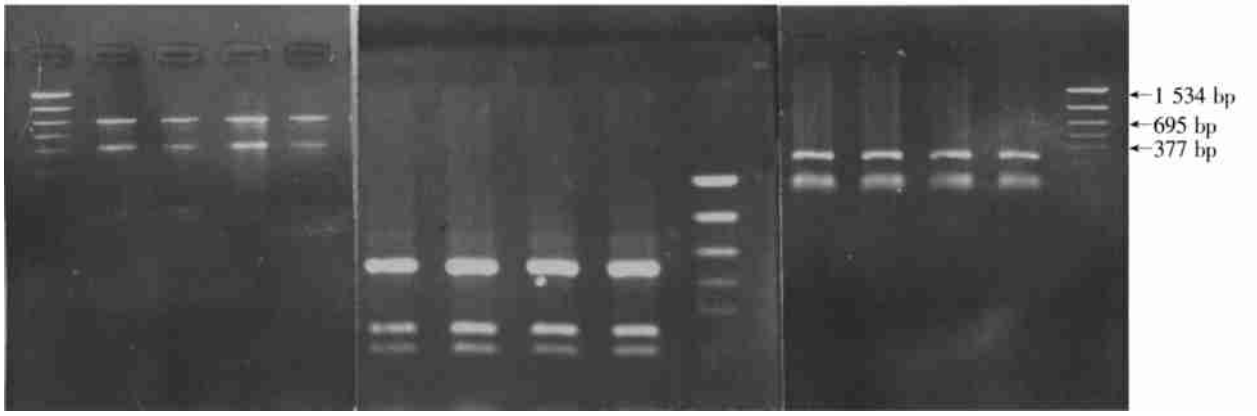


图 2　1、2、3、4:分别为 KM、NIH、ICR、BALB/C 小鼠;M: PCR 标准 Marker;Ⅰ: mtDNA D-Loop *Hinf* Ⅰ酶切结果;Ⅱ: tRNA1 基因片段 *Stu* Ⅰ酶切结果;Ⅲ: ND3 基因片段 *Hinf* Ⅰ酶切结果

Fig 2　1, 2, 3, 4 are KM, NIH, ICR, BALB/c mice, respectively; M: Standard marker of PCR; Ⅰ: Product of mtDNA D-loop digested with *Hinf* Ⅰ; Ⅱ: Product of tRNA1 fragent digested with *Stu* Ⅰ; Ⅲ: Product of ND3 fragment digested with *Hinf* Ⅰ

表 2　鼠 mtDNA D-Loop、tRNA1、ND3 基因片段限制性内切酶图谱

Tab 2　mouse mtDNA D-Loop, tRNA1, ND3 fragment Restriction patterns

Enzyme	D-Loop(1 100 bp)		tRNA1 fragment(1 126 bp)		ND3 fragment(534 bp)	
	Endonuclease sites	Fragment length	Endonuclease sites	Fragment length	Endonuclease sites	Fragment length
Hae Ⅲ	4	456,445,122,…	4	470,290,136,…	1	392,142
Hinf Ⅰ	1	700,400	0	1126	4	253,84,…
Apa Ⅰ	1	655,445	1	658,469	0	534
Alu Ⅰ	4	545,269,102,…	3	665,318,135,…	1	310,224
BamH Ⅰ	0	1 100	2	710,252,164	0	534
Dra Ⅰ	0	1 100	1	634,493	1	451,83
Stu Ⅰ	0	1 100	2	605,297,225	1	391,143
Nde Ⅱ	2	845,118,37	0	1126	0	534
Rsa Ⅰ	6	720,178,125,…	4	192,259,228,…	2	353,103,78
Xba Ⅰ	1	680,420	0	1126	0	534

There are no endonulease sites by *EcoR* Ⅴ、*Hind* Ⅲ、*Hpa* Ⅰ、*Hae* Ⅱ、*Xho* Ⅰ、*Ava* Ⅰ restriction enzyme

3　讨论

高等动物 mtDNA 是共价闭合的双链 DNA,分子量大小为 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,得到的限制性内切酶片段长度多态(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。mtDNA 限制性内切酶片段长度多态分析,目前已广泛地应用于动物起源和遗传分化的研究,成为一

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

种有效地遗传监测方法[1]。但这一方法需要新鲜或冻存的组织材料，且制备 mtDNA 所需细胞量大、操作程序复杂，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、甚至化石材料中提取并直接扩增 DNA 成为可能。采用 PCR 技术结合 RFLP 分析，不仅避免了实验材料的限制，而且还可有目的地选择性扩增 mtDNA 突变频率高的特定区域或特定基因，更为精确地分析 mtDNA 的变异。这对于研究动物遗传、进化无疑具有重要意义[2,3]。

实验用小鼠是目前使用最为广泛的实验动物，主要分为近交系小鼠和封闭群小鼠等。近交系小鼠由于其特殊的繁育过程，最终导致品系内个体除雌雄间存在着有无 Y 染色体的差别外其余遗传构成的多样性完全消失，即在同一近交系中不同个体的基因型（除雌雄间由 Y 染色体决定外）在个体间完全相同；而不同近交系间，由于始建时个体来源不同，所以最终品系间存在基因型的不同。而封闭群小鼠是在封闭条件下，不从外部引种，群体内随机交配繁殖，培育 5 年以上形成的群体遗传特性保持相对稳定而个体间存在一定遗传差异的小鼠群体[4]。了解和分析实验用小鼠 mtDNA 的多态性，探讨实验用小鼠的遗传质量监测方法，更好地保证其遗传质量具有重要意义。关于近交系小鼠 mtDNA 多态性的研究已有报道。Ferris 等[5] 对 9 种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 种近交系小鼠出现了完全相同的酶切图谱，并且与欧洲亚种 M. m. domesticus 的酶切图谱一致。Yonekawa 等[6,7] 人对 Mus musculus 的各个亚种及 BALB/ C、AKR、C57BL 等主要实验小鼠品系进行了 mtDNA 的限制性内切酶片段长度多态分析，结果发现：BALB/ C、AKR、C57BL 等 50 余种主要实验小鼠品系 mtDNA 内切酶图谱完全相同，且与 M. m. domesticus 内切酶图谱一致；其余个别品系如 RR 小鼠 mtDNA 内切酶图谱与 M. m. brevirostis 相同。但迄今为止，对封闭群的研究鲜见报道。我们用 PCR-RFLP 技术对 KM、NIH、ICR 等 3 个封闭群小鼠 mtDNA 的 D-Loop、tRNA1、ND3 基因片段进行了分析，结果发现其品系内、品系间均表现出相同的酶图谱，且与 BALB/C 小鼠完全相同，未发现多态性。结果表明 KM、NIH、ICR 小鼠与绝大多数实验小鼠一样，遗传背景较为狭窄，不同品系小鼠间遗传背景的差异远远低于动物种属间的差异。也正因为如此，对实验小鼠来说，mtDNA 限制性内工酶片段长度多态分析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丰富、更精确的方法来对实验小鼠进行遗传监测。

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[J]．动物学研究，1992，13(3)：289－295.

[2] Smith M F，Patton J L. Variation in mitochondrial cytochrome b sequence in natural population of South American akodontine rodents[J]. Mol Biol Evol，1991，8(11)：85－103.

[3] Davoli R，Costosi A，Costs N，*et al*. Hinc Ⅱ and Hae Ⅲ RFLPs in the porcine mtDNA D-loop region[J]. Anim Genet，1995，26(7)：201－213.

[4] 魏 泓．医学实验动物学[M]．成都：四川科学技术出版社，1998. 24－54.

[5] Ferris S D，Sage Rd，Wilson A C. Evidence from mtDNA sequnces that common laboratory strains of inbred mice are descended from a single female[J]. Nature，1982，295(14)：163－168.

[6] Yonekawa H K，Moriwaki O，Gotoh N，*et al*. Origins of labaratory mice deduced from restriction patterns of mitochondrial DNA[J]. Differentiation，1982，22(5)：222－226.

[7] Ferris S D，Sage R D，Prager E M，*et al*. Mitochondrial DNA evolution in mice[J]. Genetics，1983，105(12)：681－721.

（编辑 刘 鹏）

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