DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.01.030
72 第22卷第1期 2000年1月 第三军医大学学报 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Vol. 22, No. 1 Jan. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)01-0072-03

应用40条引物进行不同品系小鼠RAPD遗传检测的初步研究

吴开平,魏 泓 (第三军医大学实验动物中心,重庆 400038)

提 要 目的:探讨运用RAPD-PCR对小鼠进行遗传检测的可能性,筛选在各品系小鼠间具有多态性的引物。方法:运用40条引物对TA1、BALB/c、KM、NIH、SCID、T739、DBA/2、615、BALB/c-nu/nu等9个品系小鼠的DNA进行RAPD-PCR扩增,以琼脂糖凝胶电泳观察结果。结果:40条引物中只筛选出2条多态性引物,其它38条引物扩增结果无品系间多态性。结论:RAPD-PCR方法可以区分9个品系的小鼠,是一种适宜于小鼠的遗传检测方法。

关键词 RAPD;遗传检测
中图法分类号 R394-3 文献标识码 A

Preliminary study of genetic monitoring of various strains of mouse with RAPD-PCR using 40 single primers

WU Kai-ping, WEI Hong (Center of Laboratory Animals, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract Objective: To assess the possibility of genetic monitoring of various strains of mouse with RAPD-PCR using 40 single primers. Methods: The DNA of 9 strains of mouse including TA1, BALB/c, KM, NIH, SCID, T739, DBA/2, 615 and BALB/c-nu/nu was amplified with RAPD-PCR using 40 single primers. The PCR products were resolved with electrophoresis on agarose gel and stained with ethidium bromide. Results: 2 of the 40 single primers resulted in high polymorphism and all the other primers produced monomorphic amplification products in 9 mouse strains. Conclusion: RAPD-PCR is an effective technique to proceed genetic monitoring on mice since it is able to distinguish the genetic properties of 9 strains of mouse.

Key words RAPD; genetic monitoring

实验动物质量直接影响到医学生物学研究中动物实验结果的准确性、重复性和科学性。遗传检测是保证实验动物遗传质量的重要措施。目前常规实验动物遗传质量检测方法主要有免疫标志监测(皮肤移植试验,肿瘤移植,混合淋巴细胞培养等)、生化标本检测、形成特征检测(下颌骨形态分析,毛色基因测试)等[1,2]。上述方法主要是利用遗传基因的表型特征进行检测,存在着精确度不高,检测位点及反映遗传概貌有限等局限性。现代分子生物学技术可以直接对遗传基因DNA分子进行检测,这使实验动物遗传质量检测进入一个新领域。近年来已有大量应用RAPD-PCR研究物种遗传多样性的报道[3~9],但对小鼠遗传检测的研究较少[10],本实验应用40条引物对9个品系的小鼠进行RAPD-PC,分析比较了各品系小鼠的RAPD的谱带,筛选了具有多态性的引物。

1 材料与方法

1.1 实验动物

TA1、BALB/c、BALB/c-nu/nu、SCID、T739、DBA/2、615近交系小鼠和KM、NIH封闭群小鼠各5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+}、dNTP均为德国BM公司产品。

1.3 引物

购自美国Operon Technologies公司两套试剂盒Primer kits for RAPDs AB-0320-Kit4、AB-0320-Kit5,每套试剂盒含20条引物,共40条,引物编号及序列见表1。

1.4 基因组DNA制备

取小鼠尾部组织100 mg剪碎,加入DNA抽提缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA, 1.0% SDS, 200 μg/ml 蛋白酶K, 10 mmol/L NaCl, pH 8.0)混合均匀,置56℃至完全消化,然后按常规方法提取DNA,DNA晾干后,加入适当体积TE缓冲液(10 mol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol/L EDTA)溶解,保存于4℃备用。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39600079);全军"九五"医药卫生科研基金资助项目(96M038)
作者简介:吴开平(1976.6),男,安徽省肥东县人,助教,主要从事动物分子遗传学方面的研究。电话:(023)68752053
收稿日期:1999-03-03;修回日期:1999-09-31

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

表 1　40 条 RAPD 引物编号及序列

Tab 1　The number and sequence of 40 RAPD primers

No	Sequence	No	Sequence
AB4-01	GGCACGTAAG	AB4-11	GACAGGAGGT
AB4-02	ACGTAGCGTC	AB4-12	CAGTGCTGTG
AB4-03	GTGTTGCTAC	AB4-13	GTCAGAGTCC
AB4-04	AAGTCCGCTC	AB4-14	ACCATGGCTC
AB4-05	CCCAGTCACT	AB4-15	TGGCGTCCTT
AB4-06	CCACGGGAAG	AB4-16	TCGGCGGTTC
AB4-07	CAGCACTGAC	AB4-17	CCCTTATGCC
AB4-08	CCTCCAGTGT	AB4-18	CTCGCTATCC
AB4-09	TCCCACGCAA	AB4-19	GGTGCACGTT
AB4-10	TCAGAGCGCC	AB4-20	ACACACGCTG
AB4-01	GGGCCACTCA	AB4-11	TTCCCCGCGA
AB4-02	GGAGAGACTC	AB4-12	GGGTGTGTAC
AB4-03	TCCACTCCTG	AB4-13	AGGACTGCCA
AB4-04	CACAGAGGGA	AB4-14	AATGCCGCAG
AB4-05	GGGTTTGGCA	AB4-15	GGATGCCACT
AB4-06	CAAGGGCAGA	AB4-16	GGTGAACGCT
AB4-07	GGCAGGCTGT	AB4-17	CCAACGTCGT
AB4-08	AACGGCGACA	AB4-18	GATGCCAGAC
AB4-09	CACCCTGAG	AB4-19	GTCCGTATGG
AB4-10	CCTTCGGAAG	AB4-20	GACCAATGCC

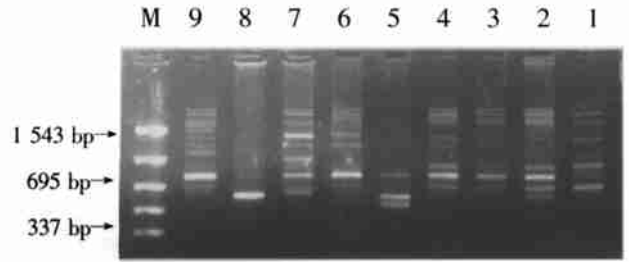


图 1　AB5-11 引物扩增 9 品系小鼠结果

1 ~ 9: TA1、BALB/ c、KM、BALB/ c-nu/ nu、NIH、SCID、T739、DBA/2、615 小鼠; M: 分子量标志

Fig 1　Results of amplification of DNA of 9 mouse strains with RAPD analysis using primer AB5-11

Lanes 1 ~ 9 : Mouse strains TA1 BALB/c, KM, BALB/c-nu/ nu, NIH, SCID, T739, DBA/2, 615 ; M : Marker

1.5　RAPD-PCR 反应体系及扩增程序

25 μl 的反应体系中含有 10× buffer、2.5 mmol/ L dNTP 50 μmol/ L、Mg^{2+} 3 mmol/ L、引物为 0.2 μmol/ L 模板 DNA、25 ng Taq 酶 2 U, 反应混合物用 20 μl 石蜡油覆盖, 反应过程包括 40 个循环, 每个循环包括 94℃ 变性 1 min, 39℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 最后一次循环后于 72℃ 延伸 10 min, 首次循环于 94℃ 预变性 2 min。扩增片段用 1.5% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 μg/ ml 溴化乙锭) 电泳 2.5 h, 紫外灯下观察结果, 比较扩增谱带、拍照、筛选具有多态性引物。

2　结果

以 40 条引物对 9 个品系小鼠 DNA 进行 RAPD-PCR 扩增发现两条引物在 9 个品系中具有很好的多态性, 见图 1。图 1 中在 695 bp ⑤⑦⑧比其它品系少 1 条扩增带, 在 515 ~ 695 bp 间⑤比⑦⑧多 1 条扩增带, 在 994 bp 处⑧比⑦少 1 条扩增带, 表明 T739、NIH、DBA/2 与 9 个品系中的任意一种都有差异, 在略小于 695 bp 处①③④比②⑥⑨少 1 条扩增带, 在 994 bp 处②比⑥⑨多 1 条扩增带, 表明 TA1、BALB/c-nu/nu、KM 与 BALB/c 及 SCID、615 3 组之间差异均显著。其它 38 条引物在各品系小鼠的 DNA 扩增带差异不显著, 表明这些引物没有品系间多态性, 见图 2。

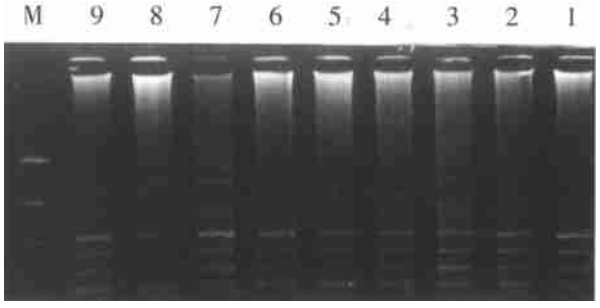


图 2　AB4-4 引物扩增 9 品系小鼠结果

1 ~ 9: TA1、BALB/ c、KM、BALB/ c-nu/ nu、NIH、SCID、T739、DBA/2、615 小鼠; M: 分子量标志

Fig 2　Results of amplification of DNA of 9 mouse strains with RAPD analysis using primer AB4-4

Lanes 1 ~ 9 : Mouse strains TA1 BALB/ c, KM, BALB/ c-nu/ nu, NIH, SCID, T739, DBA/2, 615 ; M : Marker

3　讨论

由于所取各品系小鼠亲缘关系非常近, 所以 40 条引物中绝大部分引物扩增出的结果差异不显著, 只有 2 条引物扩增结果出现多态性, 40 条引物只筛选出 2 条多态性引物, 这也与所取小鼠群体变异非常相一致。

实验结果也表明不能随意将一般的 RAPD 引物应用于各品系小鼠遗传检测, 必须进行大量的实验, 从众多的随机引物中筛选具有多态性的特异引物, 只有运用这种特异引物, 进行 RAPD-PCR, 并建立其检测标准, 才能使该技术真正应用于小鼠的遗传检测。

各品系小鼠 RAPD 谱带的差异, 是其遗传背景差异的反映, 虽然小鼠品系之间亲缘关系非常近, 遗传背景上的差异远远低于动物种属间的差异, 但是通过大量随机序列引物的 RAPD-PCR, 各品系小鼠基因组间的细微差异仍可被反应出来, 这表明 RAPD-PCR 方法适宜于小鼠遗传检测。

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

参考文献

[1] 魏 泓. 医学实验动物学[M]. 成都:四川科学技术出版社, 1998. 52—55.
[2] 张德富. 实验动物遗传监测进展[J]. 实验动物和动物实验, 1993, 5(2): 25—30.
[3] 陈永久, 张亚平. 随机扩增多态 DNA 影响因素的研究[J]. 动物学研究, 1997, 18(2): 221—227.
[4] 张春铃, 陈元霖, 桂慕燕, 等. 蓖麻蛋 DNA 导入家蚕引起遗传变异的研究[J]. 遗传, 1998, 20(3): 1—4.
[5] 王 文, 兰 宏, 宿 兵, 等. 云南 4 个少数民族的随机扩增多态 DNA 分析[J]. 科学通报, 1994, 39(2): 1900—1903.
[6] 刘恩歧, 张 薇, 徐仓宝, 等. RAPD 技术在实验动物学研究中的应用[J]. 实验动物科学与管理, 1997, 14(4): 57—60.
[7] 薛国雄, 刘 棘, 刘 洁. 三江水系草鱼种群 RAPD 分析[J]. 中国水产科学, 1998, 5(1): 1—5.
[8] Chalmers K J, Waugh R. Detection of genetic variation between and within population of gliricidia sepium and G, maculata, using RAPD Markers[J]. Heredity, 1996, 69(3): 465—472.
[9] Welsh J, Petersen C, Mcclelland M. Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping[J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19(2): 303—306.
[10] 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, 29(4): 59—69.

(编辑 王 红)

经验与短篇

文章编号: 1000-5404(2000)01-0074-01

高血压脑出血血肿扩大的临床观察与文献复习

Clinical observation and literature review of hemotomas expanding in hypertensive cerebral hemorrhage

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

高血压性脑出血, 血肿进行性增大是病情恶化的主要原因, 常预后不良。我科近两年内收治该类病人 15 例, 进行临床分析并结合文献复习探讨发病规律与预后。

1 资料与方法

1.1 临床资料

高血压性脑出血(HICH)血肿扩大 15 例, 男 13 例, 女 2 例。年龄 53~64 岁, 平均 58.4 岁。

1.2 临床特点

起病急, 于病后 2~43 h 入院。活动时起病 11 例, 起病时头痛 12 例, 恶心呕吐 8 例, 其中呕吐咖啡样液体 2 例。既往均有高血压病史, 病程 15~35 年不等, 都未行正规治疗, 多间断服用罗布麻与复方降压片; 有高血压家族史 5 例, 糖尿病史 4 例, 高脂血症 6 例, 中风家族史 4 例, 饮酒 7 例 (每天平均饮酒 150 g 左右, 达 15~30 年)。入院时体征: 意识清楚 4 例, 嗜睡 7 例, 浅昏迷 3 例, 中度昏迷 1 例。血压 22~33/14~17 kPa, 左侧瘫 7 例, 右侧瘫 8 例, 脑膜刺激征 11 例。辅助检查: 白细胞(10.0~31.4)$\times 10^9$/L、中性 0.87~0.98 有 9 例。室性心动过缓伴心肌缺血 7 例, 左前分支传导阻滞 4 例, 左室扩大伴劳损 6 例。胸片一侧肺部炎性病变 5 例。肾功能异常 4 例(尿素氮 10.37~55.12 mmol/L, 肌酐 204.42~1 121.40 μmol/L)。肝酶谱升高 3 例, 碱性磷酸酶、谷氨酰转肽酶、谷草转氨酶、谷丙转氨酶均呈轻到中度升高, 血糖 8.9~15.7 mmol/L。头颅 CT 于入院后 2~45 h 内检查, 平均 17.8 h。出血量 15~48 ml, 平均 27 ml。基底节血肿 13 例, 丘脑 2 例。第 2 次复查头颅 CT 距第 1 次检查 6~120 h, 出血量明显增加 52~80 ml, 平均 67 ml。病情恶化的变化: 意识障碍加深, 血压持续性升高, 生命征不稳, 1 例出现明显的精神症状, 表现躁动不安, 1 例肝酶谱持续性升高。

1.3 治疗与预后

进行脱水、抗感染、维持电解质平衡等治疗。病情好转 4 例, 平均住院日 34 d, 恶化自动出院 2 例。死亡 9 例, 平均住院日 7 d。

2 讨论

2.1 自发性脑出血血肿扩大标准

血肿体积增大超过首次 CT 血肿体积的 50%以上, 或 2 次

(下转 84 页)

作者简介: 邵淑琴(1941.6), 女, 辽宁省绥中市人, 主任医师, 教授, 主要从事缺血性脑血管病方面的研究, 发表论文 30 余篇。电话: (023) 68754391

收稿日期: 1998-12-14; 修回日期: 1999-09-20

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