DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.09.001


# 猪线粒体 DNA D-loop PCR的建立*

论著

刘中禄** 魏 泓 (第三军医大学实验动物中心) 重庆,400038

提 要 目的: 建立猪线粒体 DNA D-loop、D-loop 5′端和 3′端 PCR扩增方法。方法: 设计三对引物,应用 PCR对西双版纳近交系小耳猪、广西巴马小型猪、贵州小型香猪、大约克夏猪、荣昌猪和长白猪血液总 DNA样品中 mtDNA D-loop、5′端和 3′端进行扩增,琼脂糖凝胶电泳检测。结果: 三对引物扩增带清晰,与已知片段长度一致。结论: 引物设计合理,扩增方法可行,为进一步应用 mtDNA D-loop PCR-RFLP、5′端 SSCP、3′端 SSCP和 PCR直接顺序等方法分析线粒体 DNA控制区多态性奠定了基础。

关键词 PCR; mtDNA D-loop; D-loop 5′端; D-loop 3′端;猪
中图法分类号 R394-3; R446.9

线粒体 DNA(Mitochondrial DNA, mtDNA)作为核外遗传物质,从 Nass等(1962年)发现以来,便成为核外遗传研究的热点。目前,已对人和马、小鼠、大鼠、牛、鸡等 20多种动物 mtDNA进行了全序测定。猪 mtDNA至今未见其全序报道,但对控制区(D-loop)序列的精细结构和功能作了较深入的研究,Mackay[1], Ghivizzani[2], Takeda[3]分别测定了 mtDNA控制区 5′端、3′端和全序。其物理结构可分为编码区和非编码区。编码区共编码 37个基因,非编码区即线粒体基因组的控制区,也称 D-loop,它位于 mtRNA的 tRNAPro和 tRNAPhe之间,占 mtDNA的 6%左右,富含 A-T碱基,遗传上是高变区,其碱基替换率比 mtDNA其它区域高 5~10倍,控制 mtDNA的复制和转录。因此对 D-loop的研究受到广泛关注。Davoli[4]和赵兴波[5]等作了 mtDNA D-loop PCR-RFLP分析,Lan[6]和劳为德[7]等对猪 mtDNA-RFLP也进行了分析研究。但对我国独特的小型猪如广西巴马小型猪、西双版纳近交系小耳猪和贵州小型香猪的研究未见报道。本文意在设计引物对猪 mtDNA D-loop、D-loop 5′端和 3′端进行扩增,为后续 mtDNA D-loop-RFLP、5′端 SSCP、3′端 SSCP和 PCR直接测序等多态分析打下基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物来源 西双版纳近交系小耳猪 JS系和 JB系、广西巴马小型猪、贵州小型香猪(实验用香猪和民间香猪)、大约克夏猪、荣昌猪和长白猪等 8个品种品系猪各 10头,分别由云南农业大学曾养志教授、广西大学王爱德教授、贵阳中医学院甘世祥教授和重庆市种猪场提供。

1.1.2 仪器 美国 PE2400型 PCR仪。

1.1.3 试剂 Taq酶、10× Buffer、MgCl2、dNTP均为德国 BM公司产品,其它试剂均为分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 样品采集和总 DNA制备 野外远距离采血血样保存和总 DNA制备参照刘中禄[8]等的方法进行。颈静脉采血 10 ml,加等体积 2× ST(0.64 mol/L蔗糖, 0.02 mol/L Tris-HCl pH 7.6, 0.01 mol/L $MgCl_2$, 2% Triton X-100),充分混匀,冰浴 15 min,破碎红细胞,加 5 ml 1× ST洗 1~2次,每管加消化液 STE(10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 0.25 mmol/L $EDTANa_2$, 100 mmol/L NaCl) 5 ml和 SDS 蛋白酶 K(终浓度分别为 1%和 0.1 μg/ml),混匀,室温保存运输,按常规酚、氯仿、异戊醇抽提,乙醇沉淀 DNA, 12 000× g离心 5 min, TE溶解。

1.2.2 引物设计与合成 参照 Takeda等[3]测定的猪 D-loop全序和赵兴波[5]等的引物设计方法设计引物,引物由上海细胞生物研究所合成。

$P_1$ 5′-AGACTAACTCCGCCATCAG-3′
$P_2$ 5′-CGCGGATACTTGCATGTGT-3′
$P_3$ 5′-GAGTTCCATGAAGTCCAGC-3′
$P_4$ 5′-CACGCGCATATAAGCAGGT-3′

扩增片段大小见表 1。

表 1 扩增片段及大小

Tab 1 Amplification fragment and its sizes

| Amplification fragment | Primers | Molecular sizes of amplification (bp) |
|---|---|---|
| D-loop | $P_1$、$P_2$ | 1 480 |
| 5′end of D-loop | $P_1$、$P_3$ | 695 |
| 3′end of D-loop | $P_2$、$P_4$ | 468 |

1.2.3 PCR反应体系及扩增程序 反应总体积 50μl,内含 dNTP 200μmol/L,引物 0.5μmol/L, $Mg^{2+}$ 1.5 mmol/L,模板

* 国家"九五"重点科技攻关项目, No. 96-A23-06-01;国家自然科学基金资助项目, No. 39830190
** 刘中禄,男,33岁,讲师,硕士

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

总 DNA 200 ng 按 94℃ 5 min, 30循环的 94℃ 1 min, 58℃ 1 min和 72℃ 2 min,接 72℃ 7 min后 4℃保存的扩增程序进行。

1.2.4 琼脂糖凝胶电泳 配制 1.2% 琼脂糖平板凝胶,电泳缓冲液为 1× TBE, pH 8.0 电压为 5 V/cm 溴化乙锭染色,紫外灯下观察、拍照。

## 2 结果

### 2.1 8 个品种品系猪 mtDNA D-loop扩增

各品种品系各取 8头猪的总 DNA样混合为 DNA池,采用引物 $P_1$和 $P_2$扩增 mtDNA D-loop,扩增片段为 1 480 bp左右,与已报道 D-loop长度一致,见图 1。

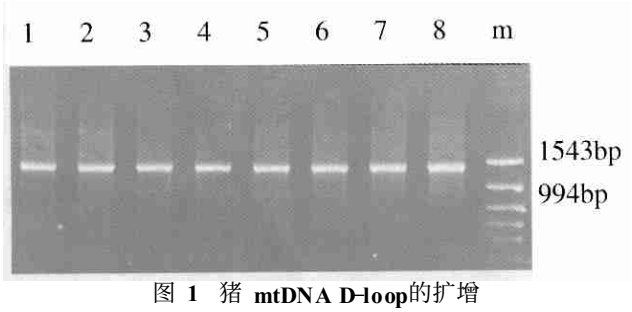



图 1 猪 mtDNA D-loop的扩增

1.西双版纳小耳猪近交 JS系; 2.西双版纳小耳猪近交 JB系; 3.广西巴马小型猪; 4.贵州小型香猪(实验用香猪); 5.贵州小型香猪(民间香猪); 6.大约克夏猪; 7.荣昌猪; 8.长白猪

**Fig 1 Amplification of the porcine mtDNA D-loop**

1. Xishuangbanna Small-ear inbred JS strain pig; 2. Xishuangbanna Small-ear inbred JB strain pig; 3. Guangxi Bama miniature pig; 4. Guizhou miniature Xiang pig (experimental pig); 5. Guizhou miniature Xiang pig (folr pig); 6. Large Yorkshire; 7. Rongchang pig; 8. Landrance

### 2.2 8 个品种品系猪 mtDNA D-loop 5′端扩增

采用引物 $P_1$和 $P_3$扩增 mtDNA D-loop 5′端,扩增片段为 700 bp左右,与已报道 D-loop5′端长度一致,见图 2。

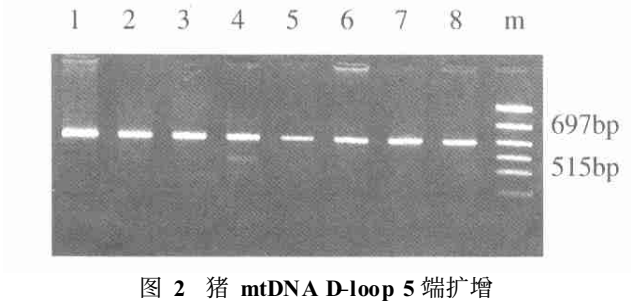



图 2 猪 mtDNA D-loop 5′端扩增

1~ 8同图 1

**Fig 2 Amplification of the porcine mtDNA D-loop 5′-end**

Notes as in Fig 1

### 2.3 8 个品种品系猪 mtDNA D-loop 3′端扩增

采用 $P_2$和 $P_4$扩增 mtDNA D-loop 3′端,扩增片段为 470 bp左右,与已报道 D-loop 3′端长度一致,见图 3。

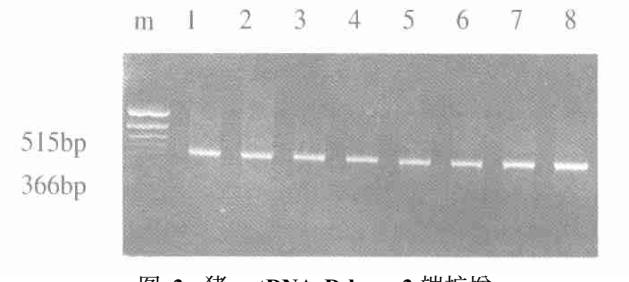



图 3 猪 mtDNA D-loop 3′端扩增

1~ 8同图 1

**Fig 3 Amplification of the porcine mtDNA D-loop 3′-end**

Notes as in Fig 1

## 3 讨论

制备总 DNA用于猪 mtDNA控制区的扩增。由于猪 mtDNA分子量小,处于限制性内切酶分析范围,所以目前研究多集中在 mtDNA-RFLP(Restriction fragement length polymorphism),但 mtDNA提取纯化繁杂。本实验采取制备血液总 DNA(含 mtDNA)样品,设计引物扩增 mtDNA D-loop区域,省去了 mtDNA繁琐的提取纯化工作。但切记注意乙醇沉淀总 DNA离心时,离心力应 12 000× g以上,以防 mtDNA的丢失。

关于引物设计和 mtDNA多态性分析。赵兴波[5]设计四条引物:

$P_1$: 5′-AGGAGACTAACTCCGCCAT-3′

$P_2$: 5′-CGCGGATACTTTGCATGTGT-3′

$P_3$: 5′-CTGAGTCCAAGCATCCCCAA-3′

$P_4$: 5′-CGCGCATATAAGCAGGTAAA-3′

分别扩增 mtDNA D-loop($P_1$、$P_2$), D-loop 5′端($P_1$、$P_3$)和 D-loop 3′端($P_2$、$P_4$),但该引物在本实验室扩增效果差,通过 Primer引物设计软件分析,部分引物自身有二级结构形成,成对引物间同源序列较多,直接影响了合成效率。本文设计三对引物对猪 mtDNA D-loop、D-loop 5′端和 3′端进行扩增,扩增片段长度与已知该区域长度一致,证明引物设计合理、扩增程序正确,为深入进行猪 mtDNA-loop PCR-RFLP、5′端 SSCP、3′端 SSCP和 PCR直接测序等多态分析奠定基础。本实验正是为这些后续工作设计实施的。

## 参考文献

1 Mackay S L D, Oliver P D, Laipis P J, *et al*. Template-directed arrest of mammalian mitochondrial DNA synthesis. Mol Cell Biol, 1986, 6(3): 1261

2 Ghivizzani S C, Mackay S L, Madsen C S, *et al*. Transcribed heteroplasmic repeated sequences in the porcine mitochondrial DNA D-loop region. J Mol Evol, 1993, 37(1):

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

36
3 Takeda K, Onishi A, Ishida N, *et al*. SSCP analysis of pig mitochondrial DNA D-loop region polymorphism. Animal Genetics, 1995, 26(5): 321
4 Davoli R, Costosi E, Costs N, *et al*. HincII and Hae III RFLPs in the porcine mtDNA D-loop region. Animal Genetics, 1995, 26(3): 201
5 赵兴波, 李 宁, 吴常信. 猪线粒体 DNA D-loop的遗传变异分析. 遗传, 1997, 19(增刊): 23
6 Lan H, Shi L M. The origin and genetic differentiation of native breeds of pigs in southwest China approach from mtDNA polymorphism. Biochem Genet, 1993, 31(1-2): 51
7 劳为德, 曲善乐, 陈受宜. 线粒体基因组的研究: 猪肝线粒体基因组的限制性内切酶图谱. 生物化学与生物物理学报, 1981, 13(2): 175
8 刘中禄, 王 勇, 朱富旭, 等. 3种保存血样方法对猪总 DNA制备的影响. 第三军医大学学报, 1999, 21(1): 25

(收稿: 1999-03-18; 修回: 1999-07-22)
(编辑 王 红)

# Establishment of PCR to amplify D-loop and its 5′and 3′ends of porcine mitochondrial DNA*

Liu Zhonglu, Wei Hong (Center of Laboratory Animals, Third Military Medical University, Chongging, 400038)

**Abstract** Objective: To establish the PCR technique for the amplification of the D-loop and its 5′and 3′ends of porcine mitochondrial DNA (mtDNA). Methods: Three pairs of primers were designed to amplify the D-loop and its 5′and 3′ends of mtDNA of Xishuangbanna small-ear pig of the inbred stain, Guizhou Miniature fragrant pig, Guangxi Bama miniature pig, Rongchang pig, large Yorkshire pig and Landrace pig. The amplification products were detected with electrophoresis on 1.2% agarose gel. Results: Clearly visible amplification bands were obtained and the fragment length was the same as that reported previously. Conclusion: Our findings suggest that the design of the primers is reasonable and the procedures are reliable. The PCR technique we have established can be used in PCR-RFLP to study of D-loop of mtDNA, in SSCP to study the 5′and 3′ends of the D-loop of mtDNA, in SSCP to study the 5′and 3′ends of the D-loop and in direct sequencing.

**Key words** PCR; mitochondral DNA D-loop; 5′end of D-loop; 3′end of D-loop; pig

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39830190

# 腹泻脱水婴儿肌注小诺霉素后致急性肾衰 1例报告 个案与短篇

# A case of acute renal failure caused by intramuscular injection of Micronomicin Sulfate for treating dehydration after diarrhea in infants

唐红梅* (第三军医大学附属西南医院小儿科) 重庆, 400038

## 1 临床资料

患儿, 男, 8个月。因"腹泻 4 d,发热 1 d,昏迷 30 min"收入院。入院时诊断为"婴儿腹泻伴重度脱水"。入院前 1 d曾在一私人诊所肌注小诺霉素,剂量不详。入院时肾功: 钠 144 mmol/L, 钾 4.03 mmol/L, 氯 106 mmol/L, 二氧化碳结合力 30 mmol/L, 血糖 4.5 mmol/L, 尿素氮 6.9 mmol/L。给以补液等治疗,脱水纠正,尿量增加。但于入院后 18 h,出现急性肾功能衰竭,表现为纳差、烦躁,心率 180次/min,呼吸 50次/min,进行性少尿、进行性浮肿等,血液检查: 钠 139.9 mmol/L, 钾 3.14 mmol/L, 氯 109.98 mmol/L, 二氧化碳结合力 24 mmol/L, 尿素氮 109.98 mmol/L, 肌酐 287.08μmol/L, 血糖 12.8 mmol/L, 渗透压 324.9 mOsm/L, 尿酸 1 425μmol/L, 磷 2.23 mmol/L, 经过结肠透析、持续呼气末正压供氧、速尿、地塞米松等治疗,尿素氮、肌酐进行性增高至 34.73 mmol/L及 371.4μmol/L, 抢救无效,于入院后 95 h死亡。

(下转 626页)

* 唐红梅, 女, 30岁, 护师, 大专

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