DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.02.009

应用α-珠蛋白 3′-HVR探针进行小鼠的 DNA指纹分析*

陈丙波** 魏 泓 罗 刚 牛 荣 (第三军医大学实验动物中心)重庆,400038
刘 春 唐晓喻 修崇贤 (重庆市公安局刑侦所 DNA实验室)重庆,400042

提 要 目的:探讨 3′-HVR探针及 Southern杂交技术应用于实验小鼠遗传质量监测的可行性。方法:采用人源α-珠蛋白 3′-HVR探针,应用 ECL试剂盒,以 HRP标记进行 Southern杂交,以化学发光法进行检测,对 5种近交系小鼠(BALB/c、DBA/2、T739、TA1、615)、1种封闭群小鼠(KM)及 2种免疫缺陷小鼠(BALB/c-nu/nu及 C.B-17SCID)进行 DNA指纹分析。结果:其不同近交小鼠的 DNA指纹图各异,而同种近交系的不同个体的 DNA指纹图相同,封闭群 KM小鼠不同个体之间的 DNA指纹图存在一定差异。BALB/c-nu/nu小鼠、CB-17SCID小鼠不同个体之间的 DNA指纹图相同,并且与 BALB/c小鼠的一致。结论:该探针及其 Southern杂交技术可用于实验小鼠的遗传质量监测。

关键词 DNA指纹分析;遗传监测;实验小鼠
中图法分类号 Q523

实验动物遗传质量监测是保证实验动物遗传质量的主要途径及方法。常规实验动物遗传质量监测方法主要有:毛色基因检测、下颌骨形态测量、皮肤移植、生化标志分析等,这些方法均是遗传表型监测,不能反映遗传物质本身。分子生物学技术的发展为实验动物遗传质量监测提供了新的直接的监测方法。特别是多位点小卫星探针 DNA指纹技术,国际上已越来越多地应用于实验动物的遗传质量监测,但国内在这方面的研究刚刚起步。本研究采用 HRP标记多位点人源α-珠蛋白 3′-HVR探针和 Southern杂交技术,对 8种近交系、封闭群及突变系小鼠进行 DNA指纹分析,以便建立其遗传监测方法。

1 材料与方法

1.1 动物

选用第三军医大学实验动物中心生产的 2月龄、体重约 20 g的 SPF级 BALB/c、615、DBA/2、TA1、T739、C.B-17SCID、BALB/c-nu/nu、KM等品系小鼠各 3只,颈椎脱臼法处死,取肺组织备用。

1.2 基因组 DNA的制备

取各品系小鼠肺组织(100 mg左右),以 SDS和蛋白酶 K 56℃水浴消化 5 h,以酚、酚:氯仿:异戊醇和氯仿:异戊醇分三步提取 DNA;以冰冻无水乙醇沉淀 DNA,70%冰冻乙醇洗涤,TE溶解。

1.3 基因组 DNA的浓度测定

以 3 ml 0.4 mol/L NaOH作空白对照,另于装有 3 ml 0.4 mol/L NaOH的比色杯中加入 3μl基因组 DNA液,使其稀释 1 000倍,采用 752分光光度计于 260 nm和 280 nm处分别测定 $D_λ$ 值,DNA浓度 = D_{260} × 40 μg/ml × 1 000;纯度 = D_{260}/D_{280}。

1.4 酶切

以 HaeⅢ酶酶切 12μg DNA样品,反应体系为 60μl,酶切后以冰冻乙醇进一步沉淀、纯化 DNA,加入 TE溶解,用于电泳[1,2]。

1.5 电泳

制做 0.6%的 25 cm × 20 cm的琼脂胶,取 20μl DNA样品和 2μl载样缓冲液(0.25%溴酚蓝,0.25%二甲基青蓝,25% Ficoll 400),加入凝胶点样孔中,50V,电泳 24 h[3]。

1.6 转膜

采用真空转移法进行。DNA的脱嘌呤、碱变性、中和及转移等过程均在真空转移器中完成。用 20× SSC真空转移 1 h,将电泳分离后凝胶中的 DNA片段原位转移至带正电荷的尼龙膜上[4]。

1.7 杂交

采用 ECL试剂盒(Enhanced Chemiluminescene, Amersham Life Science公司产品,RPN3000)进行探针标记及检测。ECL试剂盒主要采用 HRP进行探针标记,化学发光法进行检测。

1.7.1 标记探针 采用α-珠蛋白 3′-HVR人源探针(公安部刑侦所提供)放入沸水中 5 min,然后立即置入冰水中 5 min,再加入等体积的标记试剂 HRP和戊二醛,混匀,振荡,置 37℃水浴 15 min。

1.7.2 杂交 将转膜完毕的尼龙膜正面朝里卷成筒状装入预杂交管中,倒入预杂交液,放入杂交箱中,42℃预杂交 1 h,然后倒入标记好的探针,42℃杂交 12 h。

* 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 重庆市攻关项目
** 陈丙波,男,34岁,副教授,硕士
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.8 洗膜

取出杂交完毕的膜于干净瓷盘中,用 6 mol/L尿素、0.5× SSC、0.4% SDS的混合液洗涤 2次,每次 25 min,然后用 2× SSC洗涤两次,每次 5 min[5]。

1.9 显影

采用化学发光法进行显影检测。取出洗完的膜于干净滤纸上吸干,置于调平的水平平台上,将 ECL显影液Ⅰ和Ⅱ各 10 ml混匀后,倒入膜中,停留 2~3 min,吸干,用保鲜膜包好,置于暗盒中,在暗室内放好 ECL胶片。2 h后取出胶片,显影,定影。

2 结果

从图 1可以看出,3′-HVR探针在各品系小鼠中均产生了具有多态性的 HaeⅢ酶切 DNA指纹图谱。不同品系间的 DNA指纹图谱存在差异,品系内基本相同。

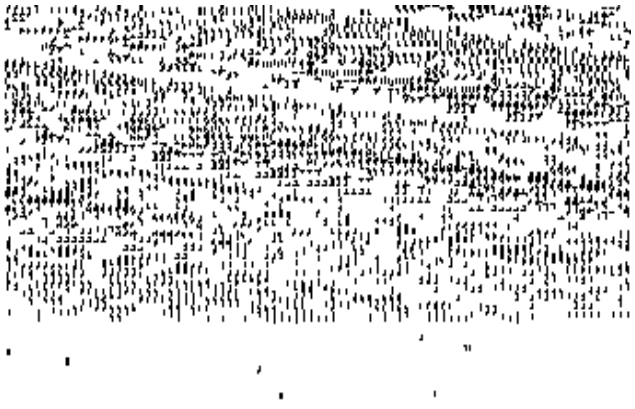


图 1 8种品系小鼠α-珠蛋白 3′-HVR探针 Southern杂交 DNA指纹图

1~3号: TA1小鼠; 4~6号: DBA/2小鼠; 7~8号: BALB/c-nu/nu裸鼠; 9~10号: T739小鼠; 11~12号: C.B-17-SCID小鼠; 13~15号: BALB/C小鼠; 16~18号: KM小鼠; 19号: 615小鼠。

Fig 1 DNA fingerprint map of Southern hybridization by α-globin 3′-HVR probe for 8 strains of mice

No. 1~3 TA1 mouse; No. 4~6 DBA/2 mouse; No. 7~8 BALB/c-nu/nu nude mouse; No. 9~10 T739 mouse; No. 11~12 C.B-17-SCID Immuological deficient mouse; No. 13~15 BALB/c mouse; No. 16~18 KM mouse; No. 19 615 mouse

3 讨论

不同品系小鼠的基因型不同,同一近交系小鼠的不同个体基因型相同,封闭群小鼠个体间具有一定遗传差异[6],本实验采用人源α-珠蛋白 3′-HVR探针,应用 ECL试剂盒,以 HRP标记进行 Southern杂交,以化学发光法进行检测,其结果表明,近交系小鼠间的 DNA指纹图不同,同一近交系不同个体间的 DNA指纹图相同,同一封闭群小鼠的个体间的 DNA指纹图具有差异,与其不同遗传类别小鼠的基因型变化相符,表明该方法可应用于实验小鼠的遗传质量监测,同时表明所检测的 5种近交系小鼠未发生遗传污染或基因突变。

T细胞缺陷的 BALB/c-nu/nu无胸腺裸小鼠、T-B细胞联合免疫缺陷的 C.B-17SCID小鼠,与 BALB/c小鼠具有相似遗传背景,BALB/c裸小鼠是将 nu/nu基因,通过回交导入普通 BALB/c小鼠体内所致,而 C.B-17SCID小鼠是 BALB/c小鼠的同源近交系 C.B-17的单个隐性突变基因 Scid所致。因此,BALB/c-nu/nu小鼠、C.B-17SCID小鼠与 BALB/c小鼠相比较,除突变基因不同外,其遗传背景基本相同[6]。应用α-珠蛋白 3′-HVR探针进行检测,未能发现三品系间的 DNA指纹差异,说明三品系的遗传背景及基因型基本相同。

人源 3′-HVR探针位于人α-珠蛋白基因族 3′-端的高变区(3′-Hypervariable region, HVR),由一系列 17bp长的重复序列串联而成,其核心序列为 5′-GNGGG(N)ACAG-3′,估计重复次数在 70~450之间,使得 3′-HVR多态信息量(Polymorphism information content, PIC)高达 90%,是人类第 16号染色体最重要的遗传标志之一[7]。本实验采用的核心序列探针用于公安系统刑侦检定已有多年[8]。首次将其用于小鼠的 DNA指纹分析,实验结果也说明 3′-HVR探针同样适用于小鼠的 DNA指纹图分析。

本试验进行了 HaeⅢ和 HinfⅠ两种限制性内切酶的筛选,尽管两种酶均适宜于小鼠 DNA指纹分析,但以 HaeⅢ限制性内切酶为佳,与 Kunieda的结果一致[1]。

对于 DNA指纹图分析国内外报道多应用 ^{32}P标记探针,由于放射性同位素有一定危害,实验防护条件要求较严,实验周期长。本实验的 ECL(加强化学发光)标记方法为非同位素标记,不需要实验保护,操作方法简便,探针标记 20 min可以完成,不需要纯化可直接使用,且能保存很长时间,不仅避免了同位素污染和半衰期短等缺点,灵敏度接近 ^{32}P标记检测,且谱带比 ^{32}P标记探针的 DNA指纹图更加清楚、图带精细、易判定[7]。

参考文献

1 Kunieda T, Nomura N, Ishizaki R, *et al*. Identification of inbred rat strains by using DNA fingerprinting method. Lab Anim Sci, 1995, 43(6): 603

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

2 薄　侃,蔡有余,蓝　翎,等. DNA指纹在近交系小鼠中的应用与研究.遗传,1997,19(增刊): 39
3 Russell R J, Festing M F, Deeny A A, *et al*. DNA fingerprinting for genetic monitoring of inbred laboratory rats and mice. Lab Anim Sci, 1993, 43(5): 460
4 孟安明,齐顺章,丁汝染,等.枫泾猪、香猪和长白猪的 DNA指纹图分析.遗传,1995,17(3): 19
5 卢圣栋.现代分子生物学技术.北京:高等教育出版社,1993. 198~206
6 魏　泓.医学实验动物学.成都:四川省科学技术出版社,1998. 412~416
7 鲁晓宣,茅一萍,张　军,等.中国人 α珠蛋白基因 3′-HVR多态分布的研究.遗传,1995,17(3): 13
8 公安部二所编.法医物证检验技术及应用.北京:人民法院出版社,1997. 250~308

(收稿: 1998-04-16;修回: 1998-10-16)
(编辑　汪勤俭)

Use of probe α-globin 3′-HVR in fingerprinting in laboratory mice*

Chen Bingbo, Liu Chun, Wei Hong, Luo Gang, Niu Rong, Tang Xiaoyu, Xiu Chongxian (Laboratory Animal Center, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To explore the possibility of using the probe α-globin 3′-HVR and Southern blot hybridization in monitoring genetic quality of laboratory mice. Methods: Fingerprinting of 5 strains of inbred mice (BALB/c, DBA/2, T739, TA1 and 615), 1 closed colony KM mice and 2 immunological deficient mice (BALA/c-nu/nu mice and C.B-17SCID mice) was conducted using a nonisotopically HRP labeled human origin minisatellite probe α-globin 3′-HVR and southern blot hybridization. Results: Typical hypervariable patterns of DNA fingerprint were obtained in inbred mouse strains. The patterns were completely different among the 5 strains of mice and those of the samples from the same strain were completely identical. The patterns obtained from various individuals of closed colony KM mice had some variations. BALA/c-nu/nu mice and C.B-17SCID mice produced the same DNA fingerprint patterns with BALA/c mice. Conclusion: HRP labeled human origin minisatellite α-globin 3′-HVR probe and southern blot hybridization are useful to monitor genetic quality of laboratory mice

Key words DNA fingerprinting; genetic monitoring; laboratory mouse

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

(上接 96页)

全缓解,1~2疗程后自动出院。余 18例患者联合化疗后可达完全缓解,缓解率: 72.0%,但停药后复发,复发时间 11 d至 8.5月,平均复发 3.42月,生存期 6月至 5年,超过 2年者仅 5例,其中 1例达 5年,近期死亡。

2 讨论

淋巴瘤近年发病呈上升趋势,发病者男性居多,年龄不定,分别在 20~24岁,75~79岁有两个发病高峰[2],但各有其临床特点。通过对 28例分析,发现青少年患者有如下特点:① NHL占多数,其中以 B细胞源型中小淋巴细胞型居多;② 起病症状表现较重,82.14%患者有全身症状,提示预后不良;③ Ⅲ~Ⅳ期患者占 82.14%,常伴随肝脾肿大,胸腹水,并发结外浸润(胸膜、颅内、椎骨、骨髓);④ 治疗缓解率 72.0%,但维持缓解时间短、复发率高、复发后治疗效果差。目前,淋巴瘤治疗(放化疗)缓解率达 73.0%~84.0%[3],5年生存率达 35.6%~55.0%[4]。对于青少年患者特点,总结不多,其缓解率 72.0%接近于一般患者,但复发率高,5年生存率低,可能与以下因素有关:① 未能早期诊断、及时治疗:由于未尽早行淋巴结活检,部分患者曾在院外抗炎或抗痨治疗,贻误了病情;② B细胞源型 NHL易并发结外浸润,其预后亦差;③ 颅内浸润,化疗药物不易透过血-脑屏障,鞘内注射效果欠佳,4例颅内浸润者,3例死亡,1例因病情重自动出院;④ 反复多次化疗,药物耐药性产生。因此,多次化疗后的药物敏感性测定,多种化疗药物联合应用对治疗有帮助,化疗中,可予常规鞘内注射 MTX+Dex(每周 2~3次)以预防颅内浸润。但对青少年患者,早期诊断对治疗及预后有重要意义。

关键词　淋巴瘤;治疗
中图法分类号　R733.11

参考文献

1 戴自英,陈灏珠,丁训杰 主编.实用内科学.第 9版.北京:人民卫生出版社,1993. 1738~1739
2 丁训杰 主编.实用血液病学.上海:上海医科大学出版社,1992. 312~314
3 Klino P, Connors J M. Chemotheropy for the treatment of difuse large-cell lymphoma. Aun Inter Med, 1985, 12(5): 596
4 Nielsen H. Salvage therapy with Promace in relapsed non-Hodgkin malignant lymphoma. Eur J Haematol, 1991, 46(2): 123

(收稿: 1998-03-06;修回: 1998-11-06)
(编辑　张大春)

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