

河南地方野生小鼠与近交系小鼠的 RAPD 分析

雷 建¹, 华欣欣², 周 鑫², 柴保国², 赵卫东¹, 郑振宇^{1,2*}

(1. 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002; 2. 河南农业大学 生命科学学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 选用 120 个随机引物, 对河南地方野生小鼠及其他 4 个近交系小鼠品系进行 RAPD 分析, 筛选出 36 个多态性引物, 检测到 380 条扩增片段, 其中多态性片段 304 条, 且野生小鼠具有若干特异条带, 反映出野生小鼠与 4 个近交系小鼠品系间存在遗传差异。多态性分析表明, 野生小鼠与 PWK 之间的遗传距离指数为 0.009 24, 遗传关系最近; 与 DDK 遗传距离指数为 0.011 30, 遗传关系最远。试验结果表明, 河南地方野生小鼠与 4 个近交系小鼠品系之间有遗传相似性, 也存在差异, 同时也证明 RAPD 技术可以很好地用于检测小鼠品系间的遗传变异及区分不同的小鼠品系。

关键词: 野生小鼠; 近交系; RAPD; 遗传距离; 河南省

中图分类号: Q95-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2010)05-0105-04

RAPD Analysis of the Wild Mice from Henan and Inbred Strains of Mouse

LEI Jian¹, HUA Xin-xin², ZHOU Xin², CHAI Bao-guo²,
ZHAO Wei-dong¹, ZHENG Zhen-yu^{1,2*}

(1. College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The RAPD analysis of Henan wild mouse and other four inbred strains of mouse were shown in this study. A total of 304 polymorphic fragments were achieved from 380 amplified fragments using 36 polymorphic primers which were selected from 120 random primers. Several specific bands possessed by wild mouse reflected that the RAPD polymorphisms exist among the four inbred strains of mouse and wild mice. The results of statistical analysis of RAPD bands showed that the genetic similarity between wild mice and PWK is 0.009 24, which indicated that wild mice had the closest relationship to PWK. However, the genetic similarity between wild mice and DDK is 0.011 30, which showed the wild mice were clearly apart from DDK. These results indicated that there were genetic similarities and variations between wild mouse and inbred strains of mouse. Thus, as a molecular marker, RAPD can be used to detect the variations and distinguish the mouse strains.

Key words: Wild mouse; Inbred strain; RAPD; Genetic distances; Henan province

近交系小鼠作为现代生物医学研究的理想试验材料之一, 具有基因型和遗传特征一致, 个体之间差异极小, 反应性一致等优点。随着医学科学研究对实验动物质量要求的提高, 近交系小鼠的培育及应用愈来愈被人们所重视, 具有特定生物学特性的近

交系小鼠品系越来越多。目前世界上已有小鼠近交品系 300 多个, 广泛应用于遗传、免疫、肿瘤、代谢、内分泌等各方面的研究^[1]。随着遗传学研究的不断发展和继续深入, 现有近交系小鼠品种愈来愈显现出 DNA 结构单一、生物多样性不足等缺陷, 不利于

收稿日期: 2010-02-12

基金项目: 转基因生物新品种培育科技重大专项(2009ZX08009-157B); 河南省科技创新杰出人才计划项目(094200510010)

作者简介: 雷 建(1983-), 男, 河南兰考人, 在读硕士研究生, 研究方向: 动物遗传育种。

* 通讯作者: 郑振宇(1962-), 男, 吉林龙井人, 教授, 博士, 主要从事分子遗传学和动物遗传育种学研究。

E-mail: cbuniv@126.com

分子生物学方法在基因检测方面的应用^[2]。为了丰富小鼠品系的基因类型,野生小鼠近交系的培育受到了世界范围的关注。

RAPD (random amplified polymorphic DNA) 即随机扩增多态性 DNA 技术,是 1990 年由 Williams 等^[3]和 Welsh 等^[4]领导的 2 个小组同时发展起来的一项分子生物学技术。该技术研究分析的是遗传物质 DNA 本身,克服了从表型水平、染色体水平和蛋白质水平研究物种遗传多样性所固有的缺点。DNA 携带了生物体丰富的遗传信息,记录了生物进化的历史,生物的亲缘关系越近,基因组 DNA 就表现出较大的相似性,同源序列就会越多,使用相同引物扩增出的共有产物就越多。因此,用 RAPD 技术得到的有关信息,在一定程度上可以反映出物种间亲缘关系的远近程度及生物基因组 DNA 的共享度,得出的遗传距离在一定程度上也能反映出物种间亲缘关系的远近程度^[5-8]。

本研究利用 RAPD 技术对河南地方野生小鼠进行分析,并与 4 个近交系小鼠品系 DDK、BALB/c、PWK、B6 进行比较,在基因水平上研究该野生小鼠与实验室近交系小鼠之间的差异,为野生小鼠的属种划分以及新野生来源的近交系小鼠品系培育提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

野生小鼠为在河南兰考地区捕捉所得。B6、BALB/c 小鼠源自河南省实验动物中心,DDK、PWK 小鼠源自日本理化学研究所,所用近交系小鼠均经生化位点检测为合格近交系。每种小鼠 10 只,雌雄各 5 只。

1.2 基因组 DNA 的提取

取小鼠鼠尾 1 cm,加 0.5 mL SN ET,加入蛋白酶 K (20 g/L)至其最终质量浓度为 400 mg/L,55℃水浴振荡过夜。离心(12000 r/min, 5 min)取上清液,加入等体积酚/异戊醇/氯仿,室温振荡 5 min,离心(12000 r/min, 5 min)取上清,加入等体积的异丙醇,离心(12000 r/min, 5 min)取上清,加入等体积乙醇(体积分数为 70%),离心。室温干燥,加 TE 4℃溶解过夜,-20℃保存备用。

1.3 试剂和仪器

随机引物、Taq DNA 聚合酶 (5×10^6 U/L)、10×PCR 缓冲液、MgCl₂ (25 mmol/L)、dNTP (每种 10 mmol/L)、6×电泳上样缓冲液、Marker (DL2000,大

连宝生物公司);生化试剂(郑州隆鑫化玻设备公司);梯度 PCR 仪(Eppendorf 美国基因有限公司);DYY-6C 电泳仪、DYCP-31D 水平式电泳槽(北京市六一仪器厂);UVP 凝胶成像系统(美国基因有限公司)。

1.4 RAPD 反应条件及扩增程序

用 120 个引物分别对 5 种小鼠 DNA 进行扩增,从中筛选出具有多态性的引物,重新优化反应条件,用每个引物对个体基因组 DNA 进行 PCR 扩增,每个反应至少 2 次重复,并且设立不含模板的阴性对照。25 μL 反应体系中含 2.5 μL 10×PCR 缓冲液(含有 Mg²⁺)、2 mmol/L dNTP、15 ng 引物、4~5 ng 模板 DNA 和 1.5 U Taq DNA 聚合酶。反应程序为:94℃预变性 2 min;94℃1 min, 50℃1 min, 72℃2 min, 30 个循环;72℃延伸 10 min。扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测结果。

1.5 数据处理

统计扩增结果,根据公式计算出随机扩增多态 DNA 片段的遗传相似指数 F (也称共享度)和不同品系间的平均遗传距离指数 P , $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, $P = (1 - F)$ 。其中 N_{xy} 表示 X 、 Y 两个体共有条带数, N_x 、 N_y 表示 X 和 Y 个体分别拥有的条带数。根据遗传距离,利用 PHYLIP 软件进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 引物的筛选及 RAPD 扩增结果

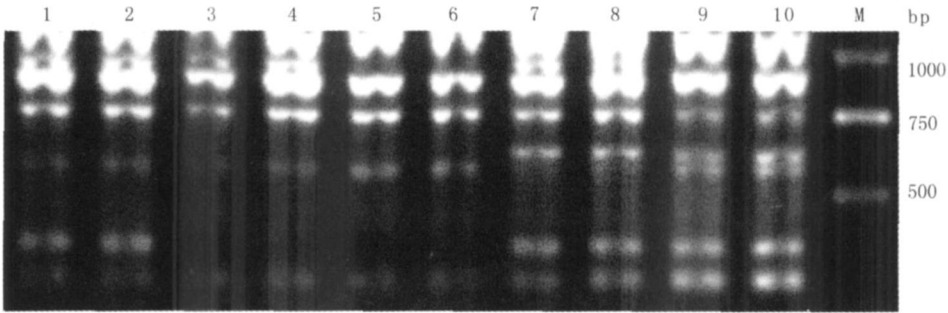
在合成的 120 个随机引物中有 36 个引物产生了不同程度的多态性标记,其余引物均为单一型 RAPD 带型。筛选出的 36 个随机引物共产生 380 条扩增片段,其中多态性条带 304 条,占总条带数的 80.0%。单个引物的标记数在 2~18 个,平均每个引物 10.6 个,扩增片段大小在 100~2000 bp。表 1 列出了 5 种小鼠所有个体的基因组 DNA 进行的 PCR 扩增情况。图 1 为引物 SC2 的 RAPD 扩增电泳图谱。

2.2 野生小鼠与 4 个小鼠品系的亲缘关系

根据 36 个多态性引物的扩增结果计算出 5 种小鼠的带纹相似系数和遗传距离指数,其结果如表 2 所示。为了更直观地体现小鼠亲缘关系,对它们进行了聚类分析,结果如图 2 所示:5 种小鼠共聚为 2 类,野生小鼠与 PWK 聚为一类而区别于其他 3 个品系,由此可见该野生小鼠与 PWK 亲缘关系最近,与 B6、BALB/c、DDK 亲缘关系相对较远。

表 1 36 个随机引物 PCR 扩增的总条带与多态位点

引物	碱基序列(5'→3')	扩增产物 条带数/条	多态 位点/条	引物	碱基序列(5'→3')	扩增产物 条带数/条	多态 位点/条
SC1	TGAGCGGACA	15	6	SC21	CAGCTCACGA	15	17
SC2	GATGACGGCC	9	6	SC22	ACCCGCCCAA	17	18
SC4	CTCTCAGCCA	10	12	SC23	AGGCCCAATC	12	12
SC5	AGCGTCCTCC	10	8	SC24	CCAAGAGGCA	16	8
SC6	ACGACGGACA	10	12	SC25	ACGCGCCTTC	10	6
SC7	AGGGCCGTCT	10	12	SC26	GGCAGCGGTT	11	4
SC8	GGTCAATGTG	10	4	SC27	TGCTCTGCC	11	6
SC9	AGACGTCCAC	9	8	SC28	GGGCGACTAC	8	4
SC10	GGAAGTCGCC	10	16	SC29	GGACCCAACC	8	4
SC11	CTGACGTAC	7	8	SC30	TGGCAGCGG	7	6
SC12	GAATCGGCCA	13	14	SC31	GTCCACACGG	11	9
SC13	TGGAGAGCAG	15	4	SC32	TGCGCCCTTC	6	6
SC14	CACCCGGATG	13	4	SC33	TGCTTGGGTG	7	6
SC15	AAGGCGGCAG	13	12	SC34	GGTGACGCAG	15	8
SC16	CTGGGACTC	15	12	SC35	CTGCTGGGAC	14	6
SC17	CCGATATCCC	7	4	SC36	CCGCCTAGTC	10	6
SC18	GGACCCAACC	12	14	总计		380	304
SC19	TTGGCAGGG	10	14	平均		10.6	0.8
6SC20	AGCGCATTTG	14	8	多态频率/%			80.0



1、2. B6; 3、4. BALB/C; 5、6. DDK; 7、8. PWK; 9、10. 野生小鼠; M. 分子标记

图 1 引物 SC2 的扩增图谱

表 2 5 种小鼠间遗传相似系数和遗传距离指数

种类	B6	BALB/c	DDK	PWK	野生小鼠
B6		0.00883	0.01145	0.01134	0.01046
BALB/c	0.99117		0.00889	0.01128	0.01000
DDK	0.98855	0.99111		0.01257	0.01130
PWK	0.98866	0.98872	0.98743		0.00924
野生小鼠	0.98954	0.99000	0.98870	0.99176	

注:上三角数字为遗传距离指数 下三角数字为品系群体间遗传相似系数

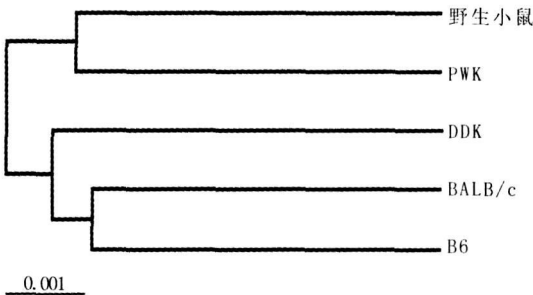


图 2 5 种小鼠聚类分析结果

3 讨论

RAPD 检测及聚类分析结果在一定程度上反映了野生小鼠的种质特性差异和地理分布状况。目前

世界上存在 4 个小鼠亚种类群: *Mus musculus domesticus*、*M. m. musculus*、*M. m. castaneus*、*M. m. molossinus*^[9,10]。我国分布着 *M. m. musculus* 和 *M. m. castaneus* 2 个亚种, 试验所用野生小鼠捕获于河南兰考地区, 属 *M. m. musculus* 类群。本研究表明, 试验所用野生小鼠与 PWK 遗传距离最小, 其亲缘关系最近, 而 PWK 属于 *M. m. musculus*^[11], 这与该种野生小鼠的地域分布相吻合。所以, 该种野生小鼠可能属于 *M. m. musculus* 亚种, 具体的分类还需要更精确的深入研究。

遗传学研究表明, 欧美培育的近交系小鼠品种大都是起源于 *domesticus* 亚种系列^[12-13], 导致现有实验小鼠品系之间的遗传构成极为相似, 无法应用这些有限的基因类型进行更加广泛的研究。因此, 通过野生小鼠来丰富现有基因库成为解决该问题的重要方法。国际上已经培育建立了数个野生来源的近交小鼠品系, 通过对它们的深入研究发现, 野生来源近交系小鼠的基因组与实验室常用小鼠品系差异较大, 其中包括许多生化、线粒体 DNA 和核 DNA

的多态性。在中国广泛分布着 *M. m. musculus* 和 *M. m. castaneus* 2 个亚种, 由于这 2 个小鼠亚种在基因构成上与现行通用实验小鼠品系存在极大差异, 使它们成为改进实验小鼠品系遗传状况的好材料^[14]。国内近年来成功培育出多个近交系小鼠品系, 但野生来源的近交系小鼠品系极少。因此, 加强我国野生小鼠资源的研究和应用, 从而培育出更多野生来源的近交系小鼠品系, 对于我国实验动物科学研究将产生深远的影响。

参考文献:

- [1] 章金涛, 杜春燕, 王纯耀. 豫医无毛小鼠分离近交系的繁殖学特征及 HLC 小鼠近交系的建立[J]. 中国兽医学报, 2005, 25(5): 550-552.
- [2] Moriwaki K, Shiroishi T, Yonekawa H, *et al.* Genetics in wild mice; its application to biomedical research [M]. Tokyo: Japan Scientific Press and Karger, 1994: 156-158.
- [3] Williams J G K, Kubelik A R, Libak J *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(22): 6531-6535.
- [4] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(24): 7213-7218.
- [5] Singh R V, Sharma D. Within and between strain ge-

netic variability in White Leghorn population detected through RAPD markers[J]. British Poultry Science, 2002, 43(1): 33-37.

- [6] 甘丽萍, 王生荣. 甘肃省中西部小麦白粉菌生理小种 RAPD 分析[J]. 河南农业科学, 2009(2): 64-67.
- [7] Xie Jian-yun, Shao Wei-juan, Wang Sheng-chang, *et al.* RAPD analysis and comparative study on three inbred strains of rats [J]. Shanghai Laboratory Animal Science, 2003, 23(1): 23-25, 34.
- [8] 刘恩岐, 王亚文, 尚荣军. 近交系小鼠 RAPD 标记的观察[J]. 动物医学进展, 2003, 24(2): 67-68.
- [9] Yonekawa H, Moriwaki K, Gotoh O, *et al.* Hybrid origin of Japanese mice “*Mus musculus molossinus*”: evidence from restriction analysis of mitochondrial DNA [J]. Mol Biol Evol, 1988, 5: 63-78.
- [10] 李菁菁, 张亚平. 小家鼠的遗传与进化研究进展[J]. 动物学研究, 2001, 22(5): 406-412.
- [11] Von Deimling O H, Forejt J, Wienker T F. Allelic profile at 37 biochemical loci of two inbred strains of the house mouse derived from wild *Mus musculus musculus* [J]. Lab Animal, 1988, 22: 61-66.
- [12] Festing M F W. Inbred strains of mice[J]. Mouse Genome, 1994, 92: 373-495.
- [13] Nishioka Y. The origin of common laboratory mice [J]. Genome, 1995, 38: 1-7.
- [14] 管彤, 王凤山, 于国德, 等. 野生来源 TW 小鼠近交系培育及其生物学特性的研究[J]. 中国实验动物学报, 2004, 12(2): 71-75.

(上接第 104 页) 可用 DNS 法测出还原性糖的量, 但是经过测定, 银耳和木耳中还原性糖的含量很少, 在 620nm 处其最大吸光值(OD 值)几乎为 0, 故可忽略。

研究表明, 黑木耳中多糖含量较高, 具有较高的医疗保健价值。目前, 国内外对食用菌多糖的研究及开发利用进展迅速, 在食用菌多糖的分离提取、化学组成、结构分析、生物活性等方面做了大量的工作, 发现了许多具有独特功能的多糖。因此, 食用菌多糖产品的研制已成为一个热点。但是, 目前对各种食用菌多糖的作用机制不很明确, 还需要进一步加强研究, 了解食用菌多糖的化学结构、生物活性和结构关系, 将使其在食品工业、发酵工业、医疗保健等领域得到广泛的应用。

参考文献:

- [1] 张翼仲. 多糖的结构与功能[J]. 生物学通报, 1992, 1(1): 3-4.
- [2] 曹培让, 吴祖道. 金针菇子实体多糖 PA5DE 的提取及性质研究[J]. 生物学杂志, 1990, 6(2): 176.
- [3] 刘美琴, 李建中. 香菇菌丝体多糖的分离鉴定与免疫功能研究[J]. 生物化学与生物物理学报, 1999, 3(11): 16.
- [4] 严茂祥, 陈芝云, 项伯康, 等. 金针菇多糖对小鼠血清溶液血素产生及抗体形成细胞的影响[J]. 中医药信息, 2003, 20(5): 56-57.
- [5] 李绍平, 黄赵刚, 张平, 等. 蒽酮-硫酸法测定亮菌糖浆中多糖的含量[J]. 中草药, 2002, 33(3): 233-235.
- [6] 陈平, 陈新, 张长春, 等. 硫酸-蒽酮法测定鄂产竹节参多糖含量[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 12(3): 1654-1656.