

猪单个卵母细胞体外转录体系的建立

杨小淦 江明生 卢晟盛 刘红波 任子利 吕培茹 张明 陆阳清 卢克焕*

(广西亚热带生物资源保护利用重点实验室 广西大学 南宁 530004)

摘要: 利用 switching mechanism at 5' end of RNA transcript (SMART) 技术对猪单个体外成熟培养的 M_{II} 期卵母细胞进行了扩增,在此基础上,利用 T7 体外转录技术进行体外转录, aRNA 浓度达到 1.962 μg。通过联合 SMART 技术和 T7 体外转录技术, mRNA 浓度扩增了 2.3×10^4 倍左右,这个数量级已基本能满足 cDNA array 等高通量筛选研究的需求。本研究为珍贵和微量的生物材料进行高通量筛选研究提供了一个有效的体系。

关键词: 猪卵母细胞; SMART 技术; T7 体外转录技术

中图分类号: Q952 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2008)01-31-07

In Vitro Transcription of Single Porcine Oocyte

YANG Xiao-Gan JIANG Ming-Sheng LU Sheng-Sheng LIU Hong-Bo REN Zi-Li

LÜ Pei-Ru ZHANG Ming LU Yang-Qing LU Ke-Huan*

(Guangxi Key Laboratory of Subtropical Bio-Resource Conservation and Utilization, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: By means of switching mechanism at 5' end of RNA transcript (SMART) technology, single matured porcine M_{II} oocyte cDNAs were amplified. Meanwhile, the mRNA was amplified from the single porcine oocyte cDNA products using T7 RNA polymerase based *in vitro* transcription technology (IVT), and the aRNA concentration reached 1.962 μg. Smart technology combined with IVT technology, mRNA has augmented 2.3×10^4 times, and this amount could meet the cDNA array and other high throughput screening requirements. Based on this research, a feasible platform has been established to carry out high throughput screening researches for precious and rare biological materials.

Key words: Porcine oocytes; SMART technology; T7 RNA polymerase based *in vitro* transcription technology (IVT)

现代的生物科学已经开始关注细胞和生命个体基因的整体表达状况,系统生物学成了主流研究方向,基因组、表观基因组和转录组等组学研究方兴未艾。然而对于起始物质极少的材料进行此类研究存在很大困难,组学研究大多需要大量的起始物质,通过激光显微捕捉、哺乳动物核移植等技术要得到如此多的材料非常困难,同时对一些珍贵的物种,材料来源极其有限,要用这些材料直接进行此类研究几乎很难实现。利用这些材料进行相关研究,往往先要进行体外扩增来得到足够的起始物质,手段主要有两种:一种是通过 PCR 技术对原始微量材料进行指数扩增;一种是通过体外转录进行线

性扩增。这两个技术单独使用,要对单个细胞的起始物质进行相关的组学研究都存在一定缺陷,同时,PCR 扩增次数过多,往往使丰度信息产生偏差^[1]。本研究拟联合指数扩增的 SMART 技术和线性扩增的 T7 RNA 聚合酶体外转录技术,探讨不提取 RNA,而是利用缓和裂解液裂解细胞的方法对单个卵母细胞直接进行

基金项目 国家自然科学基金项目(No. 30660127),广西科学基金项目(桂科青 0447006);

* 通讯作者, E-mail: khlu@gxu.edu.cn;

第一作者介绍 杨小淦,男,博士研究生;研究方向:动物胚胎分子生物学; E-mail: xyang0315@163.com。

收稿日期: 2007-07-12, **修回日期:** 2007-11-11

体外扩增 mRNA 并进行体外转录。本研究希望建立一个可操作的技术体系,为单细胞进行组学等系统生物学研究提供一个有效的平台。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 Superscript 逆转录酶 (SuperScript reverse transcriptase) 购自 Invitrogen 公司。RNA 酶抑制剂 (SUPERase In) 购自 Ambion 公司。T4 DNA 聚合酶 (T4 DNA polymerase)、绿豆芽核酸酶 (Mung bean nuclease)、T7 RNA 聚合酶 (T7 RNA polymerase) 和 LA Taq 酶购自 Takara 公司。r Taq 酶购自博日 (Bioready) 公司。PCR 产物纯化试剂盒 (QIAquick PCR purification kit) 和少量 RNA 提取试剂盒 (RNeasy[®] mini kit) 购自 Qiagen 公司。液相 RNA 酶清除剂 (Erasol⁻) 购自天净沙 (Tandz) 公司。乙基苯基聚乙二醇 (NP-40)、链酶蛋白酶及链酶蛋白酶消化液和改良 TL-Hepes-PVA 液中相关的细胞培养级一般化学纯试剂均购自 Sigma 公司。核糖核酸酶 H (Ribonuclease H, *E. coli*) 和 dNTPs 购自 MBI 公司。本研究所使用的引物皆由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

裂解液组成: 5 × First-strand buffer 1 μl, DTT (0.1 mol/L) 0.1 μl, 3 SMART CDS Primer IIA (5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CT (30) N₁ N-3') (12 μmol/L) 0.5 μl, SMART7 IIA Oligonucleotide (5'-TGA ACA GGG TAT CAA CGC GAG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAC GCG GG -3') (10 μmol/L) 0.5 μl, dNTPs (10 mmol/L) 0.5 μl, NP-40 (10%) 0.25 μl, Erasol⁻ 0.25 μl, SUPERase In (20 U/μl) 0.1 μl, DEPC H₂O 1.8 μl。使用前,裂解液在 60 °C 温浴 20 min,以去除 RNA 酶的污染。

链酶蛋白酶消化液^[2]: NaCl 8.00 g/L, KCl 0.40 g/L, CaCl₂ 0.14 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.10 g/L, MgCl₂ · 6H₂O 0.10 g/L, KH₂PO₄ 0.06 g/L, Na₂HPO₄ 0.06 g/L, NaHCO₃ 0.35 g/L, 葡萄糖 1.00 g/L, 链酶蛋白酶 (0.2%) 2.00 g/L, 酚红 0.02 g/L。

改良 TL-Hepes-PVA 液^[3]: NaCl 114.00

mmol/L, KCl 3.20 mmol/L, NaH₂PO₄ 0.34 mmol/L, NaLactate 10.00 mmol/L, MgCl₂ · 6H₂O 0.50 mmol/L, Hepes 10.00 mmol/L, NaPyruvate 0.20 mmol/L, Sorbitol 12.00 mmol/L, Na₂HCO₃ 2.00 mmol/L, CaCl₂ · 2H₂O 2.00 mmol/L, PVA 0.01%。

1.2 猪卵母细胞的体外成熟培养、消化及 cDNA 第一链合成 猪卵母细胞的体外成熟培养方法按卢晟盛等叙述的方法进行^[4]。用 0.3% 的透明质酸酶轻微吹打经体外成熟培养的 M 期卵母细胞,去除表面颗粒细胞,取光滑的没有吸附颗粒细胞的卵母细胞,用链酶蛋白酶消化液消化 30 s 左右,去除透明带,迅速用改良 TL-Hepes-PVA 液洗涤 2 次,再用 PBS 液洗涤 2 次,用捡卵针将质膜完整的单个卵母细胞移入装有 5 μl 裂解液的 200 μl PCR 管,带入的 PBS 液不要超过 0.2 μl,迅速置于冰上。65 °C 温浴 5 min,冰浴 2 min。把 PCR 管转移到预热到 55 °C 的 PCR 仪中,温浴 3 min;温度缓慢降至 37 °C,在此温度下温浴 2 min;温度缓慢上升到 42 °C,温浴 5 min。加入 0.3 μl 200 U/μl 的 Superscript 逆转录酶,45 °C 反应 90 min。

整个反应设置阴性对照和阳性对照,阴性对照处理方式与实验组一致,只是在裂解液中加入相同体积的 PBS 代替卵母细胞。阳性对照裂解处理与实验组一致,只是不加入 Superscript 逆转录酶和不进行随后的 RT-PCR 反应,裂解后直接加入 DEPC H₂O 至 100 μl,用于随后的 G3PDH 检测。

1.3 cDNA 第二链合成 在上述实验组和阴性对照组合成的第一链中加入以下组分: 10 × PCR buffer (LA Taq) 10 μl, dNTPs (10 mmol/L) 2 μl, 核糖核酸酶 H (5 U/μl) 0.5 μl, LA Taq (5 U/μl) 2 μl, 5 PCR primer IIA (5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT-3') (10 μmol/L) 2 μl, ddH₂O 78.5 μl。反应参数: 37 °C 温浴 10 min; 95 °C 变性 1 min; 19 个循环: 95 °C 变性 5 s, 65 °C 退火 5 s, 68 °C 延伸 6 min。取 13 μl,继续扩增, 95 °C 变性 1 min; 11 个循环: 95 °C 变性 5 s, 65 °C 退火 5 s, 68 °C 延伸 6 min。

从实验组 30 个循环的产物和阴性对照组产物中各取出 1 μl ,用引物 G3PDH 5 (5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3') 和 G3PDH 3 (5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3') 进行 PCR,电泳检测 G3PDH。同时,从实验组 30 个循环的产物中取 5 μl 用于电泳,检测 ds cDNA 的分子量分布。另取 cDNA 产物 6 μl 用于随后的基因表达检测。

1.4 cDNA 纯化 在实验组 cDNA 第二链产物中加入 T4 DNA 聚合酶 5 U,37 反应 15 min;在上述反应产物中加入 11 μl 10 \times 绿豆芽核酸酶 buffer,0.3 μl 绿豆芽核酸酶(45 U/ μl),37 反应 10 min。用 QIAquick PCR purification kit 纯化产物,按试剂盒的说明操作,纯化产物真空浓缩至 5 μl 左右。

1.5 用 T4 DNA 聚合酶合成 aRNA 在 DEPC 处理过的 200 μl PCR 管中配制下列反应液:10 \times T7 RNA 聚合酶 buffer 2 μl ,DTT (50 mmol/L) 2 μl ,NTP mixture (each 2.5 mmol/L) 4 μl ,SUPERase In (20 U/ μl) 0.5 μl ,cDNA 5 μl ,T7 RNA 聚合酶 0.5 μl ,补 DEPC 水至 20 μl ,37 反应 5 h;加入 10 U 的 DNase I,37 反应 10 min;用 RNeasy^R mini kit 纯化产物,按试剂盒说明进行。取出 2 μl 产物,稀释至 100 μl ,用 Beckman DU800 蛋白核酸分析仪测定 OD 值,计算产物浓度。同时取出 1 μl aRNA 作为下面实验的阴性对照。

1.6 aRNA 的 cDNA 合成 cDNA 第一链合成:aRNA 模板 8 μl ,3 SMART CDS Primer II A (12 $\mu\text{mol/L}$) 1 μl ,SMART IIA oligonucleotide (5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CGC GGG-3') (12 $\mu\text{mol/L}$) 1 μl ,Erasor⁺ 1 μl 。65 温浴 5 min,然后迅速放到冰上,冰浴 2 min。在上述反应体系中继续加入以下组分:5 \times First-strand buffer 4 μl ,DTT (0.1 mol/L) 1 μl ,dNTPs (10 mmol/L) 1 μl ,SUPERase In (20 U/ μl) 0.5 μl ,DEPC H₂O 2.5 μl 。室温温浴 3 min 后,42 温浴 5 min,加入 Superscript 逆转录酶(200 U/ μl) 1 μl ,45 反应 90 min。

cDNA 第二链合成:10 \times PCR buffer (LA

Taq) 10 μl ,dNTPs (10 mmol/L) 2 μl ,核糖核酸酶 H (5 U/ μl) 0.5 μl ,LA Taq (5 U/ μl) 2 μl ,5 PCR primer IIA (10 $\mu\text{mol/L}$) 2 μl ,ddH₂O 63.5 μl 。反应参数:37 温浴 10 min;95 变性 1 min;15 个循环:95 变性 5 s,65 退火 5 s,68 延伸 6 min。取产物 1 μl ,用引物 G3PDH 5 和 G3PDH 3 进行 PCR,电泳检测 G3PDH。同时设置阴性对照(加 1 μl aRNA,其他组分与实验组相同)。另取 6 μl cDNA 进行随后的基因表达检测。

1.7 M 期卵母细胞基因的表达 在 NCBI 中结合 GenBank 和 Unigene,筛选出猪 M 期卵母细胞中特异表达基因,用 Oligo 6 设计引物,引物相关参数见表 1。分别取 mRNA 和 aRNA 合成的 cDNA 产物进行基因表达检测。

表 1 猪 M 期卵母细胞部分特异表达基因引物

Table 1 Primers for porcine M oocyte expressed genes

基因 Gene	引物 Primer	扩增长度 The length of PCR products (bp)
PCNA	F 5'-CTG CGG TCT GAG GGC TTC GA-3'	521
	R 5'-ACC GGT GAA GAG AGT GGA GT-3'	
Annexin	F 5'-GAA CTG TCC AAC GCT AAG AT-3'	358
	R 5'-CAA TGG AAG TCA TTA TTC AG-3'	
RPL7	F 5'-TTG ATC TAC AAG CGT GGT TA-3'	243
	R 5'-CAG CAT CTC CCC CTT CTA CA-3'	
RPL23	F 5'-GAA AGT CAT ACC GGA GAA AA-3'	160
	R 5'-GCT ACC AGC ATT GGA TGC AA-3'	
RPS21	F 5'-CGG GCG AGT TCG TGG ACC TA-3'	183
	R 5'-TCT GAC TCT CCC ATC CTG CG-3'	

F:正向引物;R:反向引物。

F:Forward primer;R: Reverse primer.

2 结果与分析

2.1 单个猪卵母细胞 SMART 扩增 单个卵母细胞 SMART 扩增后产物进行 G3PDH 检测,结果见图 1,实验组中扩增出 G3PDH(452 bp)产物,而阴性对照和阳性对照中都没有相应产物,说明通过 SMART 技术单个细胞成功进行了扩增,体系没有出现 DNA 污染。

扩增的双链 cDNA 分子量分布情况见图 2。在本实验中,双链 cDNA 分子量主要分布在

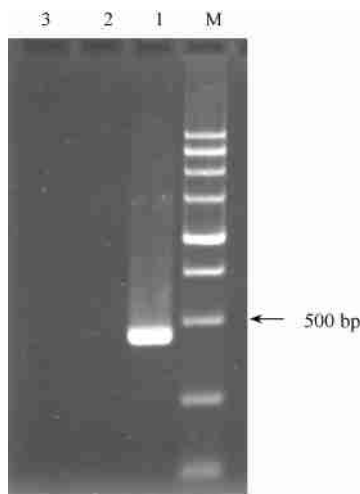


图 1 M 期猪卵母细胞 SMART 扩增产物 G3PDH 检测

Fig. 1 G3PDH SMART amplified products in porcine M oocytes

M. DL5000 DNA 分子量标准; 1. M 期卵母细胞;
2. 阳性对照; 3. 阴性对照。

M. DL5000 DNA marker; 1. Porcine M oocytes;
2. Positive control; 3. Negative control.

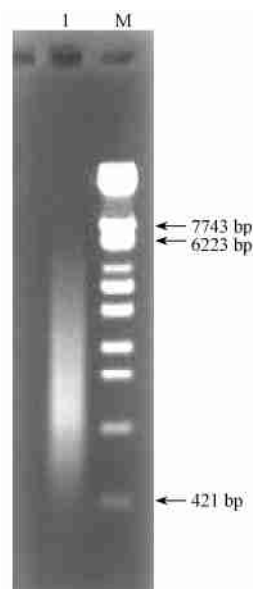


图 2 猪 M 期卵母细胞 ds cDNA 分子量分布

Fig. 2 ds cDNA molecular weight distribution in porcine M oocytes

M. DNA/ Eco130I (Sty) Marker; 1. ds cDNA.

450 bp ~ 6 kb 之间,而哺乳动物合成的 cDNA 库分子量分布一般在 0.5 ~ 6 kb 之间 (CLONTECH Super SMART PCR cDNA Synthesis Kit user manual),情况基本吻合。传统的单个细胞建库技术,得到的 cDNA 库分子量分布一般在 300 bp ~ 1 kb 之间^[5]。引入 SMART 技术后,mRNA 扩增的保真度有了很大的提高。

2.2 体外转录 体外转录的 aRNA 合成的 ds cDNA, G3PDH 检测出现产物,阴性对照没有出现产物,说明体外转录成功 (图 3)。同时,测定其 OD 值为 0.047 1, $OD_{260}/OD_{280} = 1.93$,其含量达到 98.125 ng/μl, 20 μl 则达到 1.962 μg。按每个卵母细胞 mRNA 83 pg 计算^[6],通过联合 SMART 技术和 T7 技术,体外转录后,mRNA 扩增了 2.3×10^4 倍左右。这个数量级的 RNA 基本能满足 SSH 和 cDNA array 等高通量筛选基因基本起始物质的要求。

2.3 M 期卵母细胞的基因表达 分别用 mRNA 和 aRNA 合成的 cDNA 进行相关基因检测,引物见表 1,电泳结果见图 4、5。GAPDH 和

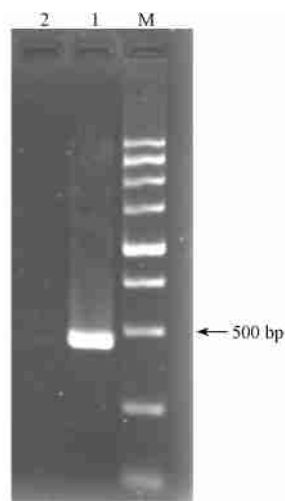


图 3 aRNA 转录产物 G3PDH 检测

Fig. 3 G3PDH in aRNA transcript products

M. DL5000 DNA 分子量标准;

1. aRNA 合成的双链 cDNA; 2. 阴性对照。

M. DL5000 DNA marker;

1. ds cDNA from aRNA; 2. Negative control.

PCNA 作为一般的内参物,都有较高水平的表达;Annexin 是 M 期卵母细胞特异表达的基因^[7];RPL7、RPL23 和 RPS21 为核糖体蛋白基

因,表达量相对比较低。

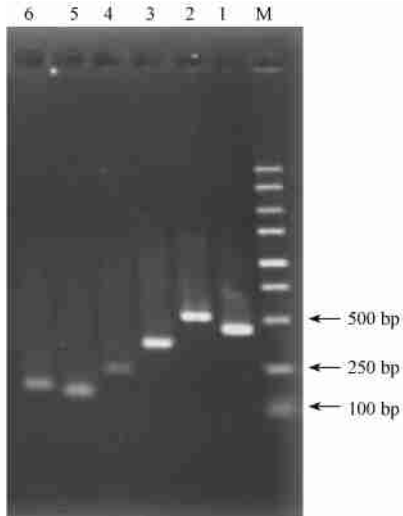


图4 猪 M 期卵母细胞基因表达

Fig. 4 Genes expressed in porcine M oocytes

M. DL5000 DNA marker; 1. GAPDH; 2. PCNA;
3. Annexin; 4. RFL7; 5. RFL23; 6. RPS21.

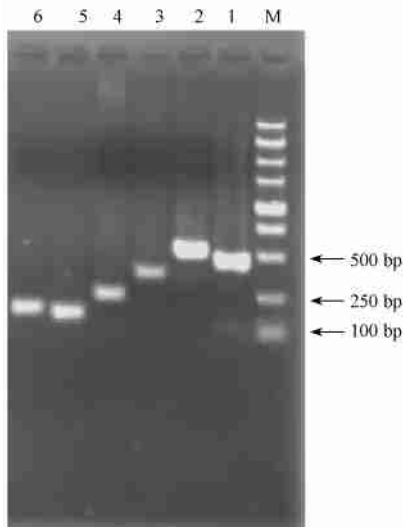


图5 体外转录后猪 M 期卵母细胞基因表达

Fig. 5 Genes expressed in porcine
M oocytes after IVT

M. DL5000 DNA marker; 1. GAPDH; 2. PCNA; 3. Annexin;
4. RFL7; 5. RFL23; 6. RPS21.

3 讨 论

缺乏足够的实验材料和有效的技术手段,一直阻碍着人们从整体水平上对材料珍贵和稀

少的生物进行分子机理的深入研究。长期以来,人们在方法上不断探索。1993年,Brady等详细阐述了单细胞建库的方法^[8],他们认为,使用 NP-40 缓和裂解液裂解细胞,只会破坏细胞膜,而不会破坏核膜,所以体系基本不会产生 DNA 污染。本实验的结果中,阳性对照中没有出现 G3PDH,基本证实了这个假设。之后单细胞建库的方法得到了不断优化,Kramer 和 Shimono 等对这些方法进行详尽的说明^[5,9]。但是这些方法由于纯粹建立在指数扩增技术的 PCR 基础之上,如果在材料极其微量的情况下,要扩增出大量的能满足高通量筛选的材料,必须增加 PCR 反应的循环参数,有可能导致基因表达丰度信号的失真^[1]。这样就限制了这些方法的广泛使用。

1997年,Kulpa 等探讨了 mRNA 反转录过程中的 5'末端转移机制^[10],在 MMLV 逆转录酶作用下的 mRNA 反转录,到达 5'末端时会发生变异,导致在末端额外增加几个碱基。他们的发现,导致了 SMART 技术的产生。2001年,Zhu 等对这个技术体系进行了说明^[11]。这个技术体系对于扩增出 cDNA 全长具有很大的优势。Clontech 已经开发了系列产品,大量的文献已经显示出了这个技术体系的优越性能。但是使用 SMART 技术时,PCR 循环参数依然不能过大,否则基因表达的丰度信息仍然会受到影响。2002年,Iscove 等发展起来一种快速的高度优化的普通 RT-PCR 技术,可以在扩增 3×10^{11} 情况下,能保持基因表达丰度,同时该技术可以从 10 pg 总 RNA 开始进行扩增,得到能满足 cDNA array 需要的起始物质。该技术通过严格的条件限制,来控制 3'末端的第一链转录,使其产物基本都控制在几百个碱基左右,这保证了这些几乎相同长度的碱基能达到同步扩增^[1]。由于这个技术体系所扩增出来的 cDNA 长度限制在 3'端的有限序列,限制了其在某些高通量筛选技术领域的应用,比如抑制消减杂交技术。

T7 体外线性转录扩增技术是 Eberwine 实验室在 1990 年首先建立起来的^[12]。T7 RNA 聚合酶对 T7 启动子具有依赖性,必须与 T7 启动

子结合才能开始启动转录^[13]。所以在构建引物时必须考虑到这个因素。本研究设计的引物 SMART7 IIA Oligonucleotide 是在 SMART IIA Oligonucleotide 引物的基础上设计的,在共有序列后多增加了一个 T7 启动子,这样在进行后续反应中,就可以把 SMART 技术和 T7 体外转录技术整合起来。本研究的技术策略如图 6 所示。

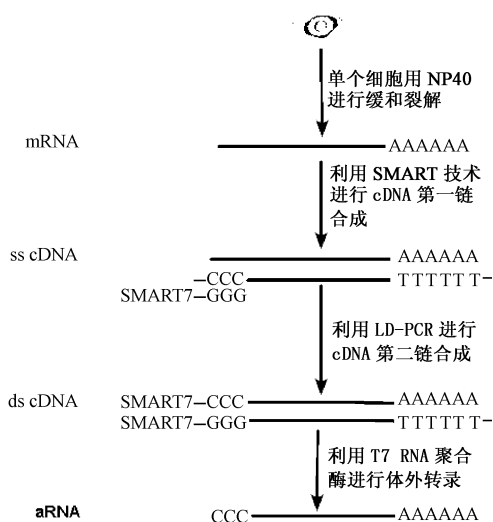


图 6 单细胞体外转录流程

Fig. 6 Flow chart of single cell in vitro transcription

已经有学者尝试结合 SMART 技术和 T7 体外转录技术的特点,把两种技术有效地整合起来^[14,15]。本研究的目的也在于发掘两个技术体系整合的优势,并应用于单个卵母细胞的研究,以解决目前哺乳动物胚胎分子生物学研究材料限制的瓶颈。在传统的体外转录体系中引入 SMART 技术,反转录的单链 cDNA 更能代表原始 mRNA 的信息,使这个技术体系扩增出来的 aRNA 与以往传统转录体系扩增出来的 aRNA 具有更广泛的应用性。单细胞体外转录体系对于反应体系的微环境要求比较严格,所以在单个胚胎进行第一链合成的时候最好使用两种不同的 RNA 酶抑制剂,使各种 RNA 酶能得到有效抑制。本实验联合 ambion 公司的 SUPERase In 和天净沙公司的液相 RNA 酶清除剂 Erasol- 取得了较好的效果。本实验在进行

体外转录之前,使用 T4 DNA 聚合酶对双链 cDNA 进行末端平滑处理,使用绿豆芽核酸酶去除其中单链,这些都利于体外转录的高效进行。本研究在体外转录后对 M 期卵母细胞的一些特异表达基因进行检测,高丰度和低丰度的基因都获得了表达,说明体外转录是成功的。本研究所正在利用这个体系展开各种胚胎组学的研究,这些实验将进一步验证这个体系的有效性。本研究确立的技术体系将为附植前胚胎的胚胎组学等系统生物学研究和珍贵的、极微量的生物材料进行高通量筛选等研究提供一个简单有效的平台。

参 考 文 献

- [1] Iscove NN, Barbara M, Gu M, et al. Representation is faithfully preserved in global cDNA amplified exponentially from sub-picogram quantities of mRNA. *Nat Biotech*, 2002, 20: 940 ~ 943.
- [2] 严云勤,李光鹏,郑小民编著.发育生物学原理与胚胎工程.哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1995,285.
- [3] 卢晟盛,卢克焕.早期胚胎无蛋白质培养液的建立.广西农业生物科学,2003,22(1):41 ~ 45.
- [4] 卢晟盛,张明,黎宗强等.不同成熟液对猪卵母细胞体外成熟和体外受精后早期胚胎发育的影响.广西农业生物科学,2003,22(4):297 ~ 301.
- [5] Kramer P R. cDNA library construction from single cells. In: Gerfen C, Holmes A, Rogawski M, et al. eds. *Current Protocols in Neuroscience*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2002, 27: 1 ~ 19.
- [6] De Leon V, Johnson A, Bachvarova R. Half-lives and relative amounts of stored and polysomal ribosomes and poly(A) + RNA in mouse oocytes. *Dev Biol*, 1983, 98: 400 ~ 408.
- [7] Cui X S, Song H, Kim N H. Identification of metaphase II-specific gene transcripts in porcine oocytes and their expression in early stage embryos. *Reprod Fertil Dev*, 2005, 17(6): 625 ~ 631.
- [8] Brady G, Niscope N. Construction of cDNA libraries from single cells. *Methods Enzymol*, 1993, 225: 611 ~ 623.
- [9] Shimono A, Behringer R R. Differential screens with subtracted PCR-generated cDNA libraries from subregions of single mouse embryos. *Methods Mol Biol*, 2000, 136: 333 ~ 344.
- [10] Kulpa D, Topping R, Telesnitsky A. Determination of the site of first strand transfer during Moloney murine leukemia virus reverse transcription and identification of strand transfer-associated reverse transcriptase errors. *Embo J*, 1997, 16: 856

- ~ 865.
- [11] Zhu Y Y, Machleder E M, Chenchik A, *et al.* Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction. *Biotechniques*, 2001, **30**:892 ~ 897.
- [12] Van Gelder R N, von Zastrow M E, Yool A, *et al.* Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *PNAS*, 1990, **87**:1 663 ~ 1 667.
- [13] Ujvári A, Martin C T. Evidence for DNA bending at the T7 RNA polymerase promoter. *Journal of Molecular Biology*, 2000, **295**:1 173 ~ 1 184.
- [14] Wang E, Miller L D, Ohnmacht G A, *et al.* High-fidelity mRNA amplification for gene profiling. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**:457 ~ 459.
- [15] Zeng F, Schultz R M. Gene expression in mouse oocytes and preimplantation embryos: Use of suppression subtractive hybridization to identify oocyte- and embryo-specific genes. *Biol Reprod*, 2003, **68**:31 ~ 39.

北松鼠华北亚种在北京的新纪录

2005 年冬季及 2006 年春季和秋季,在北京香山玉皇顶附近多次发现北松鼠华北亚种 (*Sciurus vulgaris chiliensis*) (图 1,邓涛 2006 年 9 月 16 日摄于香山玉皇顶)在落叶林和常绿林中活动。北松鼠在此地多呈两只一组在松树、槭树和栗树上活动,采食种子和坚果,有时发出咔嚓的叫声。行动敏捷活泼,据观察其视觉和听觉相当发达,对人的活动非常警觉。在香山公园内新建的松鼠观赏平台有时也能见到北松鼠活动。



图 1 北松鼠

北松鼠华北亚种具有长而蓬松的尾,不常向背上反转,运动时尾后拖,站立枝头时尾下垂。耳尖具有撮毛,冬季毛更多更长。夏季毛色黑褐色,冬季灰黑色,下部皆纯白。没有白眼圈。前后肢长短相近,体长约 24 cm,尾长约 20 cm。

查阅有关北松鼠华北亚种记载的文献资料,有记录的省份是河北、河南、山西和陕西,北京没有记录。该亚种的模式标本原来记载产自“北京东陵”,实际上是河北省遵化市的清东陵地区,在北京东面 125 km 处。北松鼠在中国共有 4 个亚种,东北亚种 (*S. v. manchuricus*) 分布于黑龙江、吉林、辽宁和内蒙古东部,阿尔泰亚种 (*S. v. altaicus*) 分布于新疆北部和内蒙古西部,鄂毕亚种 (*S. v. exalbidus*) 分布于新疆西部。

目前香山地区已知有 3 种松鼠:北松鼠、花松鼠 (*Tamias swinhoi vestitus*) 和岩松鼠 (*Sciurotamias davidianus davidianus*),其中后两种较为常见。

邓 涛

(中国科学院古脊椎与古人类研究所 北京 100044)