

尾分析法检测北极狐自咬症关联的 RAPD 标记

王慰慰 杜智恒 白秀娟*

(东北农业大学动物科技学院 哈尔滨 150030)

摘要:以健康北极狐 (*Alopex lagopus*) 和患自咬症北极狐个体为研究对象,运用尾分析法,采用 RAPD 技术在分子水平上分析北极狐自咬症病因,并初步找到与自咬症相关联的 RAPD 标记,将该标记片段克隆测序,得到了北极狐自咬症特异序列,序列长 658 bp。

关键词:北极狐;自咬症;尾分析法;RAPD 标记

中图分类号:Q781 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2010)03-154-05

Detection of the Linkage between RAPD Markers and the Self-Biting Syndrome in Arctic Fox by Tail Analysis Method

WANG Wei-Wei DU Zhi-Heng BAI Xiu-Juan*

(Department of Animal Science, Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China)

Abstract: Healthy Arctic Foxes (*Alopex lagopus*) and those with self-biting syndrome were used to analyze the cause of the disease by using tail analytical method and RAPD technology. The RAPD marker related to self-biting syndrome was found, and then the marker DNA was cloned and sequenced. The specific sequence, 658 bp in length, was obtained.

Key words: Arctic Fox; Self-biting syndrome; Tail analysis; RAPD mark

北极狐 (*Alopex lagopus*) 又名蓝狐,其毛皮质量优良,毛色变异较多,是具有重要经济价值的养殖动物。自咬症是肉食动物常见的一种慢性经过的疫病,病兽自己咬自己身体的某一部位^[1]。该病春秋两季多发,不传染,症状轻的一般不发生死亡,重的多数因感染败血症而死亡^[2]。患有自咬症的狐狸临床表现为神经兴奋性增高,啃咬自己的尾巴、后肢、臀部等处,咬破皮肤、肌肉,严重时咬掉尾巴,甚至撕破腹部皮肤、肌肉感染而死亡^[3]。自咬症发病原因有很多,近年来对自咬症的防治主要集中在营养和环境上,但是自咬行为仍然发生,有观察表明种公狐有自咬症,仔狐一般全部都可能患上自咬症,种母狐有自咬症,仔狐一般呈散发^[4]。狐狸自咬会导致皮张不完整,皮张质量差而难以销售,母狐空怀和不护理仔狐,给养狐业造成

了巨大的经济损失^[5]。为了减少自咬症的发生,加强北极狐的育种工作,我们采用 RAPD 技术,两尾分析的原理对健康北极狐和患病北极狐样本分别进行了遗传结构分析,在分子水平对自咬症发病的遗传因素进行了初步的论证,为今后北极狐的免疫育种和抗病育种及其疾病的早期诊断提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 大兴安岭图强林业局狐貉养殖基地,从饲养条件一致的北极狐群体中随机采取 42 只个体的耳部皮肤样品,其中健康个体

* 通讯作者 E-mail:bxj630306@163.com;

第一作者介绍 王慰慰,女,硕士;研究方向:特种经济动物生产学;E-mail:jingjinniao18@163.com。

收稿日期:2009-08-05,修回日期:2009-12-22

30 个,自咬症个体 12 个,分别放入 EP 管中, -20℃ 保存。

1.2 实验试剂 DL 2000 DNA 分子量标准、dNTP(dATP、dTTP、dCTP、dGTP)、*Taq* 酶、克隆载体 pMD18-T Vector、限制性内切酶 *Hind* III、*Bam*H I 等均购自宝生物工程(大连)有限公司;胶回收(小量)试剂盒和质粒 DNA(小量)抽提试剂盒,购自上海华舜生物工程有限公司;转化宿主细胞 JM109 大肠杆菌,由东北农业大学动物遗传育种实验室制备;氨苄青霉素购自哈尔滨宝泰克司。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 提取及 DNA 池的制备 用酚-氯仿抽提法提取 DNA,稀释至 50 ng/μl 备用。然后取健康组每个个体 DNA 10 μl 混合,制成 DNA 池,自咬组 DNA 池制备方法相同。

1.3.2 随机引物的选取 由上海英骏生物技术有限公司合成 A1~A20、B1~B20、C1~C20、D1~D20、E1~E20 共 100 个 RAPD 引物。

1.3.3 PCR 扩增 PCR 扩增体系 25 μl,其中灭菌去离子水 16.2 μl,50 ng/μl 的 DNA 模板 2.0 μl,10 × Buffer 2.5 μl,2.5 mmol/L 的 dNTP 2.0 μl,5 pmol/μl 的引物 2 μl,2.5 U/μl 的 *Taq* DNA 聚合酶 0.3 μl。PCR 反应循环参数:94℃ 预变性 7 min;94.0℃ 变性 1 min,40.0℃ 复性 1 min,72.0℃ 延伸 2 min,40 个循环;最后 72.0℃ 延伸 10 min。

1.3.4 PCR 产物检测 PCR 扩增产物通过 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。点样后,以 5 V/cm 电泳 20~30 min,电泳结果在凝胶成像系统下观察拍照。

1.3.5 统计与分析 通过北极狐健康组和自咬组 RAPD 扩增条带对比分析,某一条带只在健康组或自咬组中出现则认为该标记与性状相关联。

1.3.6 目的片段克隆测序 将 PCR 扩增的目的片段从琼脂糖凝胶上割下放入 1.5 ml EP 管中,经胶回收试剂盒纯化后与 pMD18-T Vector

载体连接,然后将 10 μl 连接产物转化到 100 μl 的 JM109 感受态宿主细胞中,取 150 μl 转化产物涂在含氨苄青霉素(质量浓度 100 mg/L)的 LB 平板上 37℃ 恒温培养 10~15 h。蘸取经 PCR 鉴定后的单菌落放入液体培养基中 37℃ 振荡培养 12~15 h,然后用小量质粒提取纯化试剂盒提取质粒。最后选择内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 鉴定重组质粒,取 1 ml 阳性菌液于 EP 管中,封口膜密封,邮寄到北京华大生物技术有限公司测序。

1.3.7 序列分析 使用 DNAMAN 生物软件对测序结果进行拼接,序列同源性分析通过 NCBI 数据库上的 Nucleotide Blast 搜索软件完成。

2 结果与分析

2.1 DNA 池对随机引物的筛选结果 用 100 个随机引物对 DNA 池筛选,通过北极狐健康组和自咬组 RAPD 扩增条带对比分析,初步筛选出 14 个引物,即 A9、A11、A15、B3、B16、B20、C3、C9、C12、C13、C15、C16、D3。其中部分筛选结果见图 1。

2.2 单个 DNA 扩增结果 将 DNA 池筛选出的 14 个引物分别对 42 个单个模板扩增,经 3 次重复扩增,并与 DNA 池扩增结果比较,发现引物 A15 在健康组和自咬组单个个体扩增中稳定出现差异条带,扩增结果见图 2。由图 2 可知,引物 A15 一共扩增出 4 条带,我们逐一标记为 1、2、3、4。可见 3、4 条带与自咬性状紧密连锁。最后选出稳定性高,特异性强的引物 A15 为最终鉴别健康与自咬个体的引物。

2.3 特异片段测序结果 特异片段 3 回收稳定性较差,因此只克隆测序了特异片段 4,该片段长为 658 bp,序列结果见图 3。将所测序列经 GenBank 中的 Blast 序列比较分析,没有找到同源序列,推测此序列可能是患病北极狐基因组中的特异序列。

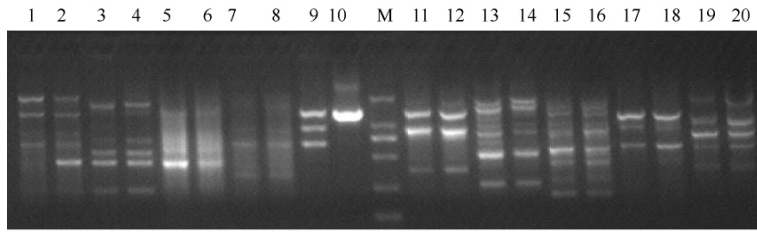


图 1 随机引物 A11 ~ A20 对健康组和自咬组北极狐 DNA 池的 PCR 扩增结果

Fig.1 The PCR results of DNA pooling in healthy and self-biting arctic foxes by using the random primers A11 - A20

1 ~ 20:奇数孔为自咬组 DNA 池扩增结果 ,偶数孔为健康组 DNA 池扩增结果; M:DL 2000 DNA 分子量标准。
1 - 20:Odd numbers for health group , and even numbers for self-biting group; M:DL 2000 DNA marker.

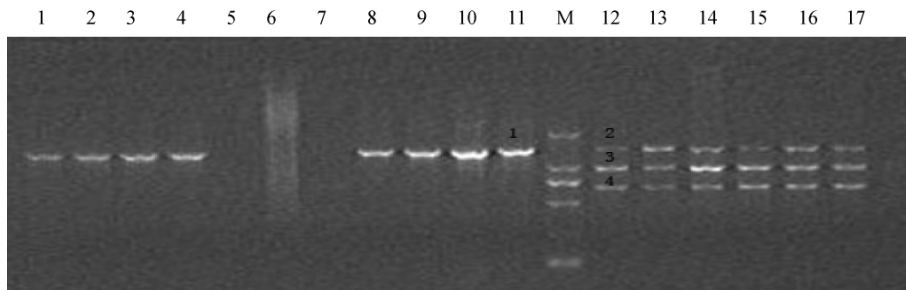


图 2 随机引物 A15 对北极狐健康个体和自咬个体 PCR 扩增结果

Fig.2 The PCR results of healthy and self-biting arctic foxes by using the random primer A15

1 ~ 11:健康组个体扩增结果; 12 ~ 17:自咬组个体扩增结果; M:DL 2000 DNA 分子量标准。
1 - 11:The PCR results of health arctic foxes; 12 - 17:The PCR results of self-biting arctic foxes; M: DL 2000 DNA marker.

TTCCGAACCCATTTCAAACAAGCAAAAAACCCCTGAAATATCCAGTTGCTCCCCCTCTGTCC¹TCCTGATGCATGAA
ATCTTTAAGAAAGCTTTGCATTTACGGTAAGGCAGTTTTTGATCTGTGTTTCTGCTTCTTTATTTTCTCCTGTTAATC
TTATGTGTTGTTACTGGAAAAGTTGGGGTGATGTCACGTGGGCCCTCTTCATAGGTAGTTCCTTTCTTTCCAGGAT
GTCCCAAGAGACCTCTCTGGGCTTGGTATCCACCTCCTCTAGTATGCTACACACCGGTCTTTGGGAAAAAGCTCT
TAGGCCTCTGGAGCGTAAACTAGAGTCTTGATGTGTTGTGCATGTCAGTGAGCAATGCTCAGTGAGCTTCGTGGTG
TTCCATTTATCAAGAAGCTGGGGTATCTCTTCAGGGTTCTTAGGAGGTGCTGGCACCAGATGTTTCAGGACATTTA
TATTTGTCCACTTATTTTTTTTTTTTTTAAACAACATCACGCCAGGGATTGGACCCATAGTATCCCCTGGGTCAGG
GGACGAAGAGTGACAGCAGTGAGTGAAGCGGTGACATGGGCCATAGGCCTCTGTTGTATTTTCTCTCTGGTGTG
CCATTGGCTTCAGTTGCAAGGCTATTTCTCTCCTCTGGGTTCCGGAA

图 3 特异片段 4 全序列

Fig.3 The whole sequence of the idio-fragment 4

下划线部分为引物 A15 序列。The underlined part is the sequence of primers A15.

3 讨论

尾分析法是研究性状表型值位于两个极端 (两尾)的个体基因型标记。这种方法不仅适用于质量性状,同样适用于数量性状,当数量性状高表型值与低表型值之间存在分子标记基因

频率的显著性差异时,表示标记与性状关联。Darvasi 等研究发现分离群体中只有性状表型值最高与最低的个体部分 (占群体总数的 25%) 带有连锁信息,而表型居中的个体部分对连锁分析几乎没有作用^[6]。Lander 等证实对于连续变异的性状,当用群体中性状表型值

位于两尾的个体进行分析时,其效率将显著提高^[7]。

在进行两尾分析时,每尾中个体 DNA 混合后用 RAPD 标记进行全基因组扫描,通过对比两尾池 DNA 扩增产物差异,初步找到与目标性状相关联的 DNA 片段,再针对两尾的单个个体进行分析,最终确定与目标性状相关联的目的片段。DNA 池是将具有某一共同特征群体的部分个体 DNA 提取后,经过定量后稀释成一定浓度,按比例或等量混合构成一个池。选择 DNA 池分析可以很大程度上降低实验花费,DNA 池中个体组成没有严格的要求,如 Khatib 等将实验对象来航鸡 (*Gallus gallus domesticus*) 设计成由两个个体的 DNA 构成的二样品池、由 6~7 个个体的 DNA 构成的多样品池,以及有共同具有某种特征的个体 DNA 构成的选择性基因池等几组,其中每组中两池个体数相等。这种混合 DNA 样品的某些多态性位点经 PCR 扩增、绘制等位基因图谱、估算等位基因频率,最终确定该多态位点某一等位基因与目标基因的相关性^[8]。杜智恒等以 18 只梅花鹿 (*Cervus nippon*) 为实验对象,将其按产茸量分为高、低 2 组,提取每组单个个体血样的 DNA 后,对该 DNA 模板进行 PCR 扩增,发现混合 DNA 所扩增出的条带包含了所有单个个体 DNA 扩增的条带,说明混合 DNA 可替代单个 DNA 进行群体遗传结构分析;另外,比较性状表型值高、低组的混合 DNA 扩增片段后发现,在高、低产茸量的鹿群里分别发现了 4 个 RAPD 标记可能与性状关联^[9]。

随机扩增多态性 DNA (randomly amplified polymorphic DNA, RAPD) 方法是建立在 PCR 基础上的检测基因组多态性的基因分型技术,它利用随机选择的单条或多条引物经 PCR 扩增基因组 DNA 片段,然后通过凝胶电泳分析其 DNA 指纹图谱,其结果既表现种系发育过程的相互联系,也反映了不同克隆之间存在的差异。RAPD 的一个显著优点是可在模板 DNA 序列未知的情况下随机设计引物,长度不等,多为 8~10 bp,一般为单个使用,G+C 含量一般在

50% 以上。RAPD 退火温度较低,多为 35~36℃,以增加引物与模板的配对,允许适当的碱基错配^[10]。缺点就是 RAPD 标记为显性标记,不能鉴别纯合体与杂合体,另外,结果的重复性和稳定性差。由于具有相同遗传背景的两尾 DNA 池中包含了很多个体所特有的差异,在进行 RAPD 标记时,每次扩增都至少重复一次,增加实验的稳定性和可重复性。

龚道清等以肉仔鸡为研究对象,测定肉仔鸡体重和屠体肥度性状,利用快捷、简单的随机扩增多态性 DNA 技术,采用尾分析法,分析各类标记基因型间体重和肥度性状的差异,寻找与肥度性状位点相关联的 RAPD 标记^[11]。张龙超运用尾分析法筛选出了与哈氏单位和蛋壳强度有关的分子遗传标记,并对每个标记的等位基因进行了分析^[12]。毛皮动物自咬症的致病原因众说纷纭,在健康个体与自咬症个体基因上是否存在差异,目前没有更深入的研究,只有患自咬症水貂 (*Mustla vison*) 与健康水貂在某些基因上有较明显的差异(标记效果很稳定)^[13]。本实验通过分析健康北极狐与自咬北极狐两 DNA 池,找到与自咬性状连锁的标记。引物 A15 扩增出了自咬北极狐个体与健康北极狐的差异条带,并测序得到了目的片段序列。说明引物 A15 能很好的区分健康和患病的个体。本实验自咬北极狐个体较少,尽管选取极端表型值个体用于研究,但性状表型值差异未必能真正代表遗传上的差异。今后为了验证多态性标记的稳定性,应增加样本量,将个体差异最小化,以期建立北极狐自咬症早期快速诊断方法,减少北极狐饲养业的经济损失。

参 考 文 献

- [1] 佟煜人. 中国毛皮兽饲养技术大全. 吉林:中国农业科学院特产研究所,1990,610-612.
- [2] 李明. 珍兽北极狐高效益饲养技术. 北京:中国农业科学技术出版社,2000,118-120.
- [3] 侯国. 狐狸自咬症的诊治. 河北畜牧兽医,2003,19(9):49.
- [4] 张冬玲. 狐狸自咬症的防治. 新疆畜牧业,2008,(1):45-46.

- [5] 白秀娟. 养狐手册(2版). 北京: 中国农业大学出版社, 2006, 328 - 331.
- [6] Darvasi B A, Soller M. Selective genotyping for determination linkage between a marker locus and a quantitative trait locus. *Theor Appl Genet*, 1992, 85: 353 - 359.
- [7] Lander E S, Botstein D. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, 1989, 121: 185 - 199.
- [8] Khatib H, Darvasi A, Plotski Y, et al. Determining relative microsatellite allele frequencies in Pooled DNAs Plus. *PCR Methods and Applications*, 1994, 4: 13 - 18.
- [9] 杜智恒, 刘培源, 白秀娟. 尾分析法检测梅花鹿产茸量性状关联的 RAPD 标记. *中国畜牧兽医*, 2008, 35(7): 63 - 65.
- [10] Hoey B K, Crowe K R, Jones V M, et al. A Phylogenetic analysis of *Pisum* based on morphological characters, and allozyme and RAPD markers. *Theor Appl Genet*, 1996, 92(1): 92 - 100.
- [11] 龚道清, 张军, 李辉, 等. 尾分析法检测肉鸡肥度性状关联的 RAPD. *扬州大学学报*, 2002, 23(3): 21 - 24.
- [12] 张龙超. 矮小型蛋鸡蛋品质性状遗传分析及相关分子标记的研究. 北京: 中国农业大学硕士学位论文, 2004, 32 - 37.
- [13] 李玉梅. 水貂体重、皮长性状相关基因研究及自咬症病因分子遗传研究. 哈尔滨: 东北农业大学博士学位论文, 2008, 91 - 99.