

研究简报

体细胞克隆山羊微卫星 DNA 分析*

郭泽坤 郭继彤 安志兴 张 涌**

(西北农林科技大学生物工程研究所, 杨陵 712100)

柴玉波 陈南春 陈苏民

(第四军医大学全军分子生物学重点实验室, 西安 710021)

摘要 用 10 对山羊微卫星 DNA 多态性引物对 2 只体细胞克隆济宁青山羊、青山羊供体细胞、受体奶山羊母羊以及具有亲缘关系的 3 只对照济宁青山羊进行微卫星 DNA 分析. 结果表明有 5 对山羊微卫星 DNA 多态性引物, 即 SR-CRSP1, SR-CRSP5, SR-CRSP6, SR-CRSP7 和 SR-CRSP24, 扩增产物有明显的多态性. 扩增产物经过 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后银染, 结果 2 只体细胞克隆山羊的微卫星 DNA 指纹与供体细胞完全相同, 而且不同于其受体母亲也不同于其他所有同品种不同个体的对照青山羊. 证明体细胞克隆山羊基因组来源于供体细胞.

关键词 体细胞, 克隆山羊, 微卫星 DNA, PCR, 聚丙烯酰胺, 电泳, 银染

学科分类号 S827, S852

微卫星 DNA 是一些简单的核苷酸重复序列, 在哺乳动物进化中以不同的多态性位点存在于每一动物个体. 通过不同的微卫星引物, 就可以用 PCR 方法扩增出每一个体相应于这些引物的多态性片段^[1]. 利用这一技术, 人们进行了大量的研究, 以评估物种与物种之间、不同种群之间、不同个体之间的遗传距离^[2~7]. 在体细胞克隆哺乳动物获得成功以后, 人们用微卫星 DNA 分析的方法对克隆动物进行鉴定^[8~13]. 鉴定结果表明, 哺乳动物微卫星 DNA 技术是一项简单而有效的亲子鉴定方法. 哺乳动物微卫星 DNA 的多态性常常表现出无种间特异性, 即同一微卫星 DNA 引物在不同家畜种中都表现出多态性. 目前, 这一方法都是用于克隆绵羊和克隆牛的鉴定. 有关山羊特异性微卫星 DNA 位点的报道很少^[14, 15], 还未见用此方法进行体细胞克隆山羊鉴定的报道.

本实验室在 2000 年 6 月成功诞生两只体细胞克隆山羊 (SC1 和 SC2), 其供体细胞为一只济宁青山羊的皮肤成纤维细胞, 受体母羊分别为一只关中奶山羊和一只西农莎能奶山羊, 其中 SC1 在出生后 36 h 死亡. 本研究的目的是筛选在青山羊个体具有明显差异的微卫星 DNA 引物, 利用这些引物扩增微卫星 DNA, 通过个体多态性比较鉴定体细胞克隆山羊基因组 DNA 的来源.

1 材料和方法

1.1 微卫星 DNA 引物合成

山羊微卫星 DNA 引物^[16~18]: 由上海博亚生物技术有限公司合成. SR-CRSP1: 5'-TGCAAGA-AGTTTTTCCAGAG-3', 5'-ACCCTGGTTTCAGAAAAGG-3'; SR-CRSP3: 5'-CGGGGATCTGTTCTATGAAG-3', 5'-TGATTAGCTGGCTGAATGTCC-3'; SR-CRSP5: 5'-GGACTCTACCAACTGAGCTACAAG-3', 5'-TGAAATGAAGCTAAAGCAATGC-3'; SR-CRSP6: 5'-CATAGTTCATTCAATATGGCA-3', 5'-CATGGAGTCACAAAGAGTTGAA-3'; SR-CRSP7: 5'-TCTCAGGACCTTAATTGCTCT-3', 5'-GGTCAACACTCCAATGGTGAG-3'; SR-CRSP8: 5'-TGCGGTCTGGTTCTGATTTTAC-3', 5'-CCTGCATGAGAAAGTCCATGCTTAG-3'; SR-CRSP9: 5'-AGAGGATCTGGAAATGGAATG-3', 5'-GCACTCTTTTCAGCCCTAATG-3'; SR-CRSP10: 5'-ACCAAGTTTGAGTATCTTGCTTGGG-3', 5'-AGGAAGTTTATTGGACAG-

* 国家自然科学基金资助项目 (39830280).

** 通讯联系人.

Tel: 029-7092176, E-mail: zhangyl@public.xa.sn.cn

收稿日期: 2001-12-28, 接受日期: 2002-01-31

TGCTGG-3'; SR-CRSP23: 5'-TGAACGGGTAA-AGATGTG-3', 5'-TGTTTTTAATGGCTGAGTA-G-3'; SR-CRSP24: 5'-AGCAAGAAGTGCTCACT-GACAG-3', 5'-TCTAGGTCCATCTGTGTTATT-GG-3'.

1.2 山羊不同个体总 DNA 的提取

总 DNA 的提取方法根据材料来源的不同方法有所不同.

体细胞克隆山羊“SC1”的基因组 DNA 用 UNIQ-10 柱式基因组提取试剂盒 (上海生工公司) 从肝脏提取. 核移植供体体细胞的基因组 DNA 用 TAKARA 基因组提取试剂盒 (大连宝生物公司) 从培养传代的体细胞中提取. 体细胞克隆山羊“SC2”、“SC1”的受体母羊、“SC2”的受体母羊、对照济宁青山羊母羊、济宁青山羊公羊和济宁青山羊雌性羔羊 (母、父和子) 的基因组 DNA 用 TAKARA 基因组提取试剂盒 (大连宝生物公司)

从血液中提取.

1.3 微卫星 DNA PCR 产物聚丙烯酰胺凝胶电泳

电泳检测采用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶, 制胶方法参见郭泽坤等^[19]的方法. 染色方法为银染.

2 结 果

在本实验条件下从 10 对引物中选择出 5 对具有显著多态性差异的引物——SR-CRSP1, SR-CRSP5, SR-CRSP6, SR-CRSP7, SR-CRSP24. 电泳结果表明, 2 只克隆山羊和供体细胞以不同引物扩增的 DNA 片段多态性完全相同, 而与受体母羊和同种对照山羊都存在明显差异. 因此微卫星 DNA 多态性分析结果证实体细胞克隆山羊基因组 DNA 来源于培养的体细胞. 这一结果也表明, 这 5 对引物 PCR 扩增的产物在同种不同个体青山羊之间存在多态性差异.

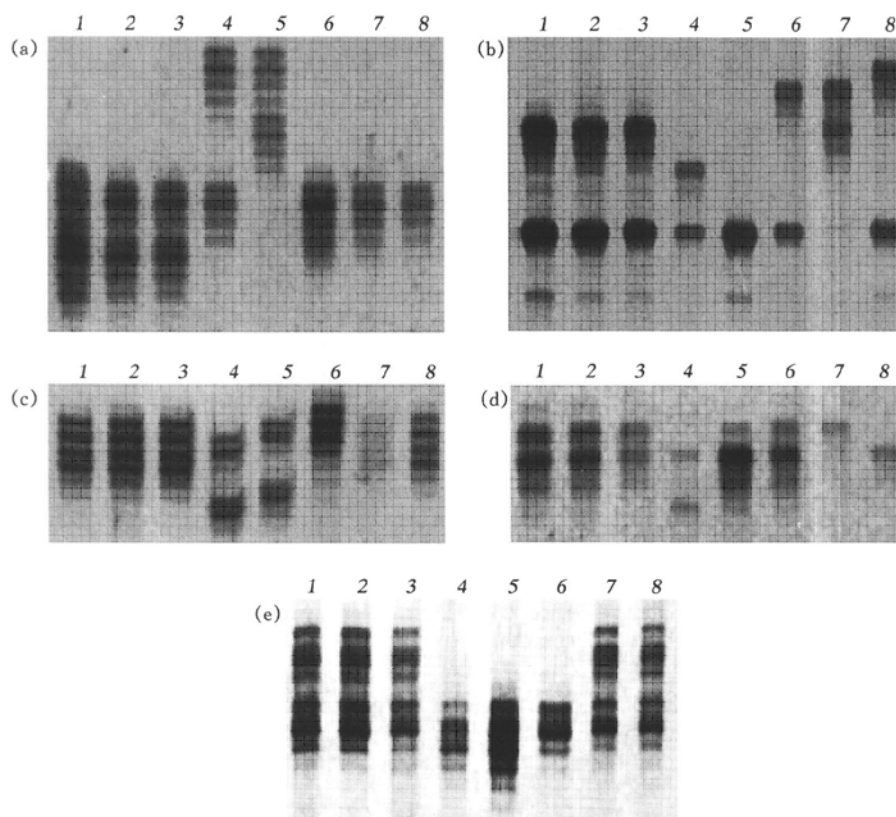


Fig. 1 DNA polymorphism with five microsatellite primers

(a) SR-CRSP1, (b) SR-CRSP5, (c) SR-CRSP6, (d) SR-CRSP7, (e) SR-CRSP24. 1: clone goat SC1; 2: clone goat SC2; 3: somatic cell; 4: recipient of SC1; 5: recipient of SC2; 6: control grey goat (mother); 7: control grey goat (father); 8: control grey goat (daughter).

3 讨 论

本研究的实质是山羊种间和个体间的多态性鉴定, RAPD (random amplification polymorphism DNA) 和微卫星 DNA 分析是其中最常用的两种方法. RAPD 需要大量的随机引物筛选工作, 但是能够产生较丰富的多态性, 而微卫星 DNA 分析则主要针对种间和个体间变异较大的微卫星位点, 应用方便. 本研究的主要目的是为了证明体细胞克隆山羊 SC1 和 SC2 的基因组 DNA 来自于实验室传代培养的山羊皮肤成纤维细胞, 从而在 DNA 水平上证明其来自于体细胞克隆. 随机挑选了 10 对山羊微卫星引物进行实验, 结果表明 2 只体细胞克隆山羊与供体细胞具有完全相同的片段多态性, 图 1 显示的结果为其中能够产生显著多态性差异的 5 对引物.

本研究所筛选的微卫星引物要说明两个问题: 第一, 要在体细胞克隆山羊 SC1 和 SC2 (青山羊) 与其代孕母亲 (关中奶山羊和西农莎能奶山羊) 之间存在明显的多态性差异, 以证明克隆山羊与其代孕母亲没有亲缘关系; 第二, 要在不同的青山羊个体之间产生差异, 以证明克隆山羊和供体细胞的基因组来自于同一只山羊. 图 1 的结果表明筛选到的 5 对微卫星引物能够很好地证明以上两点.

总之, 实验结果证明了山羊 SC1 和 SC2 来自体细胞克隆.

参 考 文 献

- Weber J L, May P E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet*, 1989, **44** (3): 388~396
- Bowcock A M, Rulz-Linares A, Tomfohrde J, *et al.* High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature*, 1994, **368** (6470): 455~457
- Arranz J J, Bayon Y, Primivo F. Comparison of protein markers and microsatellites in differentiation of cattle population. *Anim Genet*, 1996, **27** (6): 415~419
- Barker J S F, Moore S S, Hetzel D J S, *et al.* Genetic diversity of Asian water buffalo: microsatellite variation and a comparison with protein coding loci. *Anim Genet*, 1997, **28** (2): 103~115
- Buchanan F C, Adams L J, Littlejohn R P, *et al.* Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellites. *Genomics*, 1994, **22** (2): 397~403
- Ciampolini R, Moazami-Goudarzi K, Vaiman D, *et al.* Individual multilocus genotypes using microsatellite polymorphisms to permit the analysis of the genetic variability within and between Italian beef cattle breeds. *J Anim Sci*, 1995, **73** (11): 3259~3268
- Forbes S H, Hogg J T, Buchanan F C, *et al.* Microsatellite evolution in congeneric mammals: domestic and bighorn sheep. *Mol Biol Evol*, 1995, **12** (6): 1106~1113
- Campbell K H, McWhir J, Ritchie W A, *et al.* Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 1996, **380** (6569): 64~66
- Ashworth D, Bishop M, Campbell K, *et al.* DNA microsatellite analysis of Dolly. *Nature*, 1998, **394** (6691): 329
- Shiga K, Fujita T, Hirose K, *et al.* Production of calves by transfer of nuclei from cultured somatic cells obtained from Japanese black bulls. *Theriogenology*, 1999, **52** (3): 527~535
- Wells D N, Misica P M, Tervit H R. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod*, 1999, **60** (4): 996~1005
- Zakhartchenko V, Durcova-Hills G, Stoikovic M, *et al.* Effects of serum starvation and re-cloning on the efficiency of nuclear transfer using bovine fetal fibroblasts. *J Reprod Fertil*, 1999, **115** (2): 325~331
- Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, *et al.* Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (3): 990~995
- Saitbekova N, Gaillard C, Obexer-Ruff G, *et al.* Genetic diversity in Swiss goat breeds based on microsatellite analysis. *Anim Genet*, 1999, **30** (1): 36~41
- Yang L, Zhao S H, Li K, *et al.* Determination of genetic relationships among five indigenous Chinese goat breeds. *Anim Genet*, 1999, **30** (3): 452~455
- Arevalo E, Holder D A, Derr J N, *et al.* Caprine microsatellite dinucleotide repeat polymorphisms at the SR-CRSP-1, SR-CRSP-2, SR-CRSP-3, SR-CRSP-4, and SR-CRSP-5 loci. *Anim Genet*, 1994, **25** (3): 202
- Bhebhe E, Kogi J, Holder D A, *et al.* Caprine microsatellite dinucleotide repeat polymorphisms at the SR-CRSP-6, SR-CRSP-7, SR-CRSP-8, SR-CRSP-9, and SR-CRSP-10 loci. *Anim Genet*, 1994, **25** (3): 203
- Yeh C C, Kogi J K, Holder M T, *et al.* Caprine microsatellite dinucleotide repeat polymorphisms at the SR-CRSP21, SR-CRSP22, SR-CRSP23, SR-CRSP24, SR-CRSP25, SR-CRSP26 and SR-CRSP27 loci. *Anim Genet*, 1997, **28** (5): 380~381
- 郭泽坤, 张 涌. 一种改进的蛋白质超薄凝胶电泳方法. *生物化学与生物物理进展*, 2000, **27** (1): 98~101
- Guo Z K, Zhang Y. *Prog Biochem Biophys*, 2000, **27** (1): 98~101

Microsatellite DNA Analysis of Somatic Cloned Goats^{*}

GUO Ze-Kun, GUO Ji-Tong, AN Zhi-Xing, ZHANG Yong^{**}

(*Institute of Bioengineering, Northwestern Science-technology University of Agriculture & Forestry, Yangling 712100, China*)

CHAI Yu-Bo, CHEN Nan-Chun, CHEN Su-Min

(*PLA Key Laboratory of Molecular Biology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710021, China*)

Abstract Microsatellite DNA analysis was performed using ten pairs of goat microsatellite polymorphic DNA primers on two somatic cloned Jining grey goats, donor grey goat, recipient goats and three related control Jining grey goats. The result suggests that the amplification products are remarkably polymorphic in five pairs of goat microsatellite polymorphic DNA primers: SR-CRSP1, SR-CRSP5, SR-CRSP6, SR-CRSP7 and SR-CRSP24. The amplification products were silver stained after running on the 6% SDS-PAGE. The microsatellite DNA fingerprints of the two somatic cloned goats are the same as the donor, but are different from the recipient goat and all the control grey goats. It proves that the genomes of the two somatic cloned goats come from the donor cells.

Key words somatic cell, cloned goat, microsatellite DNA, PCR, polyacrylamide, electrophoresis, silver staining

^{*} This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (39830280).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-29-7092176, E-mail: zhangyl@public.xa.sn.cn

Received: December 28, 2001 Accepted: January 31, 2002