



小鼠冷冻胚胎和精子 SNP 遗传鉴定方法的建立

徐伟¹, 晁天柱¹, 刘丽均², 李凯¹, 肖君华^{1*}

(1. 东华大学生物科学与技术研究所, 上海 201620; 2. 上海斯莱克实验动物有限责任公司, 上海 201615)

【摘要】 目的 建立小鼠冷冻胚胎和精子 SNP (single nucleotide polymorphism) 分型方法, 用于冷冻胚胎和精子快速遗传鉴定方案。方法 以中科院上海实验动物中心 (国家啮齿类实验动物种子中心上海分中心) 提供的小鼠冷冻胚胎和精子为样本, 采用全基因组扩增技术和 PCR-LDR 分型技术建立小鼠冷冻物 SNP 遗传鉴定方法。结果 全基因组扩增技术能大幅度增加冷冻胚胎样本的 DNA 总量; PCR-LDR 分型方法适用于小鼠全基因组 45 个 SNPs 的分型; 分型确定 C57BL/6, BALB/c, FVB/NJ 等胚胎和精子各 10 种近交系, SNP 位点信息与测序结果一致; 小鼠冷冻胚胎个数与 SNPs 检出个数成正比, 当胚胎数达到 12 以上时 SNP 检出率 100%。结论 实现近交系小鼠冷冻胚胎和精子快速 SNP 基因分型及遗传质量鉴定。

【关键词】 小鼠; 冷冻胚胎和精子; 全基因组扩增; PCR-LDR 分型; SNP 遗传鉴定

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016) 02-0169-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.02.011

Establishment of a SNP genetic identification method for frozen embryos and sperm of inbred mice

XU Wei¹, CHAO Tian-zhu¹, LIU Li-jun², LI Kai¹, XIAO Jun-hua^{1*}

(1. Institute of Biological Sciences and Biotechnology, Donghua University, Shanghai 201620, China;

2. SLAC Laboratory Animal Co. Lit. Shanghai 201615)

【Abstract】 Objective To establish a rapid SNP (single-nucleotide polymorphism) genetic identification method for the frozen samples, such as frozen embryos and sperm of inbred mice. **Methods** In this study, the frozen embryos and sperm of inbred mice were provided by Shanghai Lab. Animal Research Center. Whole genome amplification and PCR-LDR genotyping system were used to get the rich DNA sample. Forty-five SNP were genotyped by multiple polymerase chain reaction and ligase detection reaction (PCR-LDR). **Results** The electrophoresis results showed that the whole genome amplification technique could highly increase the total DNA of frozen embryos. PCR-LDR typing method was suitable for the mouse genome typing of 45 SNPs. Ten strains of inbred frozen embryos and sperms of C57BL/6, BALB/c, FVB/NJ mice were genotyping identified, and their SNP loci data obtained by PCR-LDR were as the same as those of database. The number of frozen mouse embryos was proportional to the number of SNPs detected, and when the embryo number reached more than 12, the detection rate of SNP was 100%. **Conclusions** This method can be used to the genetic quality identification, and rapidly identify the inbred frozen mouse embryos and sperms.

【Key words】 Mouse; Frozen embryos and sperms; Genetic identification; Polymerase chain reaction and ligase detection reaction (PCR-LDR); Single-nucleotide polymorphism (SNP)

Corresponding author: XIAO Jun-hua, Email: xiaojunhua@dhu.edu.cn

模式动物小鼠已建立超过 32 000 个品系^[1], 美国^[2]、欧洲^[3]和日本^[4]先后建立冷冻胚胎和精子保

存库代替传统的连续繁殖方式, 以保护、保存小鼠这一重要遗传资源, 并预防小鼠资源流失和重复性工

[基金项目] 上海市科学技术委员会科研项目 (编号: 14140900502, 15140900500)。

[作者简介] 徐伟 (1990 -), 男, 硕士研究生, 研究方向: 小鼠遗传学。Tel: 021-67792650; E-mail: xuweidhu@163.com

[通讯作者] 肖君华 (1968 -), 男, 教授, 研究方向: 小鼠遗传学。Tel: 021-67792652; E-mail: xiaojunhua@dhu.edu.cn

作^[5]。美国杰克逊实验室具有世界上最丰富的小鼠资源和最大的冷冻胚胎保存库^[6],我国也先后成立国家啮齿类实验动物种子中心和国家遗传工程小鼠资源库^[7],并建立了大型低温冷冻库。低温保存过程中,冷冻物遗传特征的稳定性是影响小鼠遗传质量的重要影响因素之一,但国内尚缺乏小鼠冷冻胚胎和精子的遗传鉴定方法。主要是因为样本有限且十分珍贵,相应的 DNA 量又远低于常规的个体,因此就需要对少量的 DNA 进行全基因组的扩增以实现 SNP 遗传鉴定。

遗传质量鉴定旨在保持实验小鼠的遗传稳定性,检测小鼠品系是否发生随机的遗传漂变、遗传突变和基因污染等现象,以确保被检测的品系符合其本身的要求^[8]。迄今,针对实验小鼠个体的遗传检测方法主要包括传统的形态学、细胞学以及同功酶和 DNA 分子标记检测方法^[9],其中 DNA 分子标记检测法已成为趋势^[10-13]。DNA 分子标记检测法包括长度多态性、随机遗传扩增多态性、STR、SB-ASA、SNP 等。虽然 STR 具有杂合度高、多态性好、易于检测和利于实现分型标准化、自动化等优点,并应用于遗传连锁图谱的构建、有关疾病基因的定位、法医学亲子鉴定等领域,但是 STR 在分型中侧翼序列易发生变异,且不适用于大规模基因组研究^[11]。因此,具有高通量、可自动操作、费用相对低廉的第三代遗传标记 SNP 被广泛应用于小鼠的遗传检测^[14]。

基于高温连接酶的连接检测反应 (ligase detection reaction, LDR),是一种高通量灵敏度与特异性的 SNP 分型方法^[15-18]。本研究以上海实验动物研究中心提供的近交系小鼠冷冻胚胎和精子为样本,采用直接裂解法、全基因组扩增技术和 PCR-LDR 技术,实现近交系小鼠冷冻物基因组上 45 个 SNPs 的基因分型和遗传质量鉴定。

1 材料与方 法

1.1 DNA 抽提及全扩

SPF 级 C57BL/6、BALB/c、SJL/J、NOD、DBA1、Scid、EG、KKTA、FVB/NJ、ACA 小鼠冷冻胚胎和 C57BL/6、NOD、129S3、C3H-Scid、C3H/ORL、MRL/MPJ、NOD-Scid、Tuskuba、B10A、Scid-BG 精子由中科院上海实验动物中心(国家啮齿类实验动物种子中心上海分中心)【SCXK(沪)2012-0002】提供,每个品系各取两只,雌鼠周龄 4 周、雄鼠周龄 10 周,体重 20~30 g,冷冻胚胎和精子均来自以上小鼠,且其冷

冻时间为二周或一月。冷冻精子的 DNA 提取采用动物基因组 DNA 快速抽提试剂盒(上海生工生物工程有限公司),操作步骤依说明书进行。冷冻胚胎的细胞裂解和 DNA 扩增,显微镜下挑出二细胞期冷冻胚胎(19~40 个),清洗后加入 1.5 μ L 裂解液(200 mmol/L KOH, 50 mmol/L 二硫苏糖醇)65 $^{\circ}$ C 10 min,添加 1.5 μ L 中和液(900 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 300 mmol/L KCl, 200 mmol/L HCl)^[19]4 $^{\circ}$ C 静置 1 h 后, DNA 扩增采用 illustraTM Ready-To-GoTM GenomiPhiTM V3 (GE Healthcare) 全基因组扩增试剂盒,操作步骤依说明书进行。以 1% 的琼脂糖凝胶电泳确定 DNA 质量和浓度, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2 引物和探针设计

根据 MGI 数据库中 C57BL/6、FVB、BALB/c、DBA1、NOD 等 10 个近交系品系中已知的 SNP 遗传标记,挑选各品系间存在差异的 45 个 SNPs 位点,建立 PCR-LDR 分型方案。针对各 SNP 位点,设计引物和探针。用 Primer3 在线软件设计引物(<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>)^[20],并由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。设计的探针^[21]由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.3 测序反应

PCR 产物纯化后均用双脱氧终止法进行测序(美国 ABI 3730XL 测序仪),测序引物与 PCR 扩增引物相同。所有测序反应由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

1.4 PCR-LDR

PCR 反应终浓度体系为(15 μ L)包括 10 \times PCR buffer 1.5 μ L, dNTPs 1.5 μ L, 45 对引物分为 4 组,每组分别为 12、11、10、12 对 1.5 μ L, BSA 0.2 μ L, HotStarTaq DNA polymerase 1 μ L, DEPC 水 7.8 μ L, DNA 模版 1.5 μ L,同时设阴性对照。PCR 反应程序为:94 $^{\circ}$ C 变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 1 min 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。反应产物经琼脂糖凝胶电泳检测特异性。

LDR 反应体系终浓度(5 L)包括 10 \times ligase buffer (NEB) 0.5 L, 探针各 0.05 mol/L, TaqDNAi-gase 1 unit, PCR 产物 10 ng/L,同时设阴性对照 LDR 反应程序为:95 $^{\circ}$ C 变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 50 $^{\circ}$ C 复性延伸 2 min, 30 个循环。

LDR 连接产物用标准 5% 变性 PAGE 胶进行电泳通过 ABI 377A 测序仪进行 (Applied Biosystems)

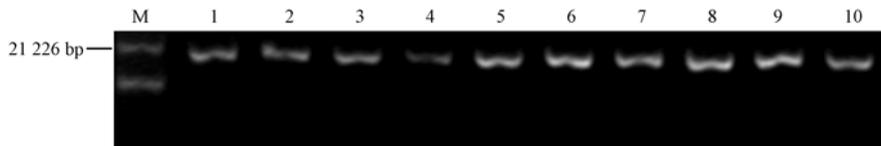
数据采集与分析使用 GeneScanTM 672 和 GeneMapper 软件 (Applied Biosystems)。

2 结果

2.1 小鼠冷冻精子、胚胎全基因组扩增 DNA 电泳

图 1 表示 10 种近交系小鼠冷冻精子抽提 DNA

在 1% 的琼脂糖凝胶中电泳检测结果,10 个泳道对应着不同的品系,从电泳图谱可以看出,DNA 条带清晰明亮、无降解现象,可保证后续实验顺利进行。图 2 表示胚胎全基因组扩增 DNA 在 1% 的琼脂糖凝胶中电泳检测结果。图中 DNA 的条带大小范围在 2027 ~ 21 226 bp,且条带清晰。

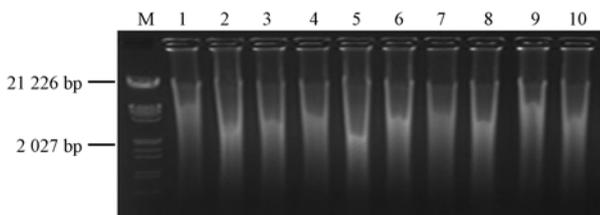


注:M:Marker, 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 分别表示 C57BL/6、NOD、129S3、C3H-Scid、C3H/ORL、MRL/MPJ、NOD-Scid、Tuskuba、B10A 和 Scid-BG 品系的 DNA 电泳图。

图 1 10 种小鼠冷冻精子全基因组扩增 DNA 电泳结果

Note. Lane 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10 represent the electrophoresis of samples of frozen sperm whole genome DNA amplification of C57BL/6, NOD, 129S3, C3H-Scid, C3H/ORL, MRL/MPJ, NOD-Scid, Tuskuba, B10A and Scid-BG mice. M: Marker

Fig.1 The electrophoresis results of whole genome DNA amplification of 10 kinds of mouse sperms.



注:M:Marker, 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 分别表示 C57BL/6、BALB/c、SJL/J、NOD、DBA1、Scid、EG、KKTA、FVB/NJ 和 ACA 品系的全扩 DNA 电泳图。

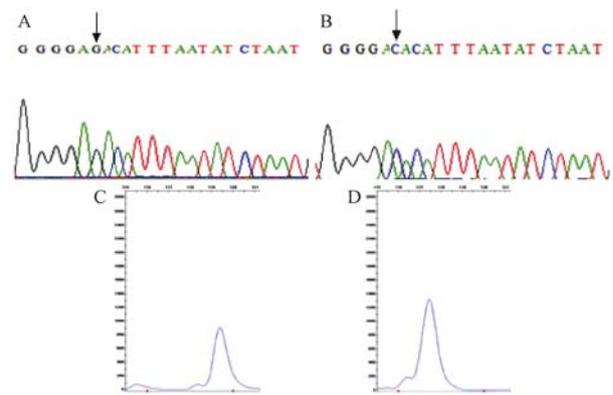
图 2 10 种小鼠冷冻胚胎全基因组扩增 DNA 电泳结果

Note. Lane 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10 represent the electrophoresis of samples of frozen embryo whole genome DNA amplification of C57BL/6, BALB/c, SJL/J, NOD, DBA1, Scid, EG, KKTA, FVB/NJ and ACA mice. M: Marker

Fig.2 The electrophoresis results of whole genome DNA amplification of 10 kinds of mouse frozen embryos

2.2 SNP 位点验证

测序结果表明,NCBI 和 MGI 数据库中近交系小鼠 C57BL/6、BALB/c、SJL/J、NOD、DBA1、Scid、EG、KKTA、FVB/NJ、ACA、129S3、C3H-Scid、C3H/ORL、MRL/MPJ、NOD-Scid、Tuskuba、B10A 和 Scid-BG 45 个 SNPs 遗传标记的基因型与 PCR-LDR 分型结果一致,未出现杂峰和双峰,说明小鼠的来源都是纯系。以品系 C57BL/6、FVB 冷冻胚胎第 II 组 rs13477094 位点为例,该处对应的 PCR-LDR 分型结果基因型分别是 G、C,经过测序验证后(图 3)箭头处标出,测序结果与分型结果一致。



注:A. C57BL/6 冷冻胚胎在 rs13477094 的序列信息;B. FVB 冷冻胚胎在 rs13477094 的序列信息;C. C57BL/6 冷冻胚胎在 rs13477094 的 377 聚丙烯酰胺凝胶电泳图;D. FVB 冷冻胚胎在 rs13477094 的 377 聚丙烯酰胺凝胶电泳图。

图 3 rs13477094 位点测序和 PCR-LDR

Note. A represents the sequencing chart of frozen embryos of C57BL/6 mouse strain in rs13477094 point. B represents the sequencing chart of VB mouse strain frozen embryos in rs13477094 point. C represents 377 electrophoretogram of G homozygosity C57BL/6 mouse strain frozen embryos in rs13477094 point. D represents 377 electrophoretogram of C homozygosity FVB mouse strain frozen embryos in rs13477094 point.

Fig.3 The sequencing and PCR-LDR results of rs13477094 points

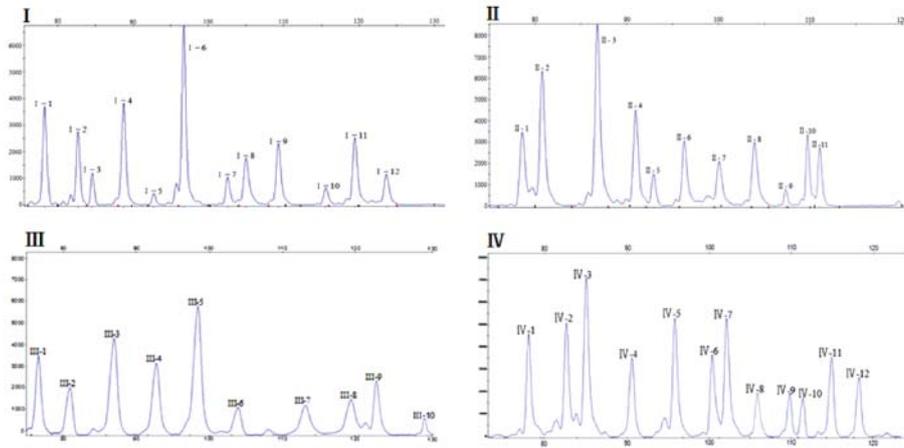
2.3 四组标准 PCR-LDR 方案

图 4 是以 FVB 为模版的四组多重 PCR-LDR 结果。第 I 组和第 IV 组出 12 个峰,第 II 组出 11 个峰,第 III 组出 10 个峰。LDR 连接产物长度与设定探针

长度一致。如 I-1 峰 (图 4) 的大小为 79, 与 rs 4177540 的纯合子的连接探针长度一致, 因此该 SNP 位点为 G, 并与 MGI 上的数据相同。

表 1 表示的 BALB/c、FVB/NJ、NOD 胚胎和

129S3、C3H/ORL、Scid-BG10 精子近交系小鼠的 PCR-LDR 检测结果, 10 种胚胎和精子的检测结果 (见表 2), 胚胎和精子 45 个位点的基因型与 MGI 和 NCBI 数据库中的信息完全一致。



注:模版为 FVB。图中 I ~ IV 的每个峰 (I-1 ~ IV-12) 表示 SNPs 377 聚丙烯酰胺凝胶电泳图。

图 4 FVB 小鼠胚胎四组 PCR-LDR 分型方案的 377 聚丙烯酰胺凝胶电泳

Note. The templates present FVB. Each I-IV peak (I-1 to IV-12) represents SNPs 377 electrophoretogram.

Fig. 4 Polyacrylamide gel 377 electrophoresis of frozen embryos of FVB mice in the four panels

2.4 SNP 位点在同一冷冻胚胎细胞中的梯度差异分析

为了探索 SNP 的检出率与胚胎细胞个数的关系,本研究以 C57BL/6 小鼠的 2 细胞期冷冻胚胎作为实验对象,检测在不同个数胚胎细胞下 SNPs 的分型情况。从图 5 可以看出随着细胞个数的增多,SNPs 位点被检出的点是逐渐递增的,其中当小鼠冷冻胚胎小于等于 2 个 2 细胞期时,未鉴定出 SNPs;当 2 细胞期细胞个数为 4 时,SNPs 为 5;当 2 细胞期细胞个数为 6 时,SNPs 为 18;当 2 细胞期细胞个数为 8 时,SNPs 为 27;当 2 细胞期细胞个数为 10 时,SNPs 为 38;当大于等于 12 个 2 细胞期时,SNPs 为 45,检出率 100%。

3 讨论

随着国内各地大型低温冷冻库的建立,其中小鼠的冷冻胚胎和精子在长期低温的状态下,是否能一直有效的保证其遗传特性完整值得关注。然而,一直以来因冷冻样本十分珍贵、DNA 含量又远低于常规个体样本,导致小鼠的冷冻胚胎和精子的遗传鉴定方案仍旧缺乏。本实验建立的冷冻物遗传鉴定

方案,能快速实现样本的基因分型和品系鉴定。

在遗传鉴定检测中,分子生物学标记检测技术具有对各发育时期的个体、组织甚至细胞进行检测,不仅不受环境、基因表达等的限制,而且数量丰富、遗传稳定、操作简单快捷,同时能检测基因组上多个位点,有丰富的多态性^[22]。

本研究建立了针对特定区段、极微量样本的前处理和扩增方案,以及进一步的 PCR-LDR 的 DNA 分子分型检测,能准确判断出样本的遗传背景和品系。其中因冷冻胚胎(2 细胞期)样本仅含有 19 ~ 40 个细胞,为此本研究采用全基因组扩增的方法直接对冷冻胚胎获得的微量 DNA 进行扩增,DNA 条带大小在 2027 ~ 21 226 bp,出现该现象的原因可能是由于胚胎冷冻保存使 DNA 部分降解,但仍旧不影响分型结果。

本研究中建立的 PCR-LDR 对于 10 种近交系小鼠胚胎和精子的 45 个 SNPs 分型方案,能够快速、准确的鉴别出该 SNP 位点的基因型,并且测出的部分数据与 MGI 和 NCBI 上的数据库 SNP 信息一致,另外,部分品系的 SNP 信息数据库中没有与之相对应,这需要我们补充。因此,在建立标准化的 SNP 分型方案前,应有准确而且完整的 SNP 数据可供查阅。

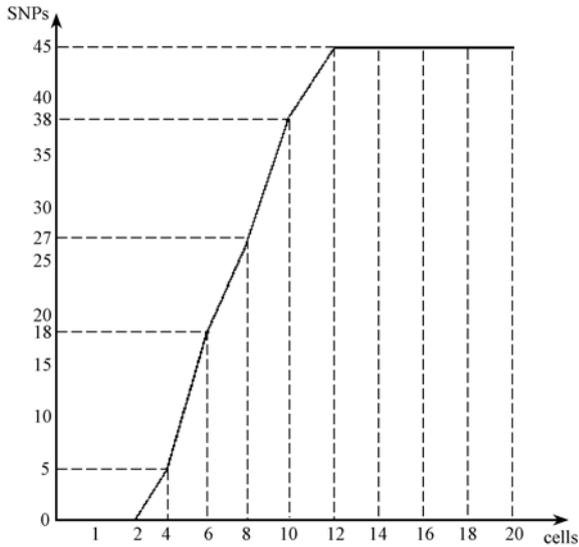
表 1 PCR-LDR 对近交系小鼠胚胎和精子的分型结果

Tab. 1 Genotyping results of frozen embryos and sperms of inbred mouse strains by PCR-LDR

组别 Groups	位点系号 No	位点 rs 号 Primer ID	标准品系	冷冻胚胎				精子	
			Standard	Frozen embryos				Sperms	
			C57BL/6	BALB/c	FVB/NJ	NOD	129S3	C3H/ORL	Scid-BG
I	I-1	rs4177540	G	G	G	G	G	A	A
	I-2	rs13483732	T	T	T	T	T	G	G
	I-3	rs13483736	A	A	A	A	A	C	A
	I-4	rs13484115	A	A	A	A	A	G	A
	I-5	rs13480972	A	A	A	A	A	C	C
	I-6	rs31281387	A	G	A	A	G	G	A
	I-7	rs29581676	A	G	G	A	G	G	G
	I-8	rs13482740	A	A	A	G	G	G	G
	I-9	rs8237229	A	A	A	T	A	A	A
	I-10	rs29171198	A	A	G	G	G	G	G
	I-11	rs29687299	C	C	G	C	G	G	G
	I-12	rs29518789	G	G	G	G	G	A	G
II	II-1	rs13475728	G	G	G	G	A	G	G
	II-2	rs13477094	G	C	C	C	G	C	C
	II-3	rs30307865	G	T	T	G	G	T	T
	II-4	rs29669790	T	C	T	C	C	C	C
	II-5	rs32123873	G	G	G	C	G	G	G
	II-6	rs13480075	G	G	G	G	G	G	T
	II-7	rs13476543	T	T	C	C	C	T	T
	II-8	rs8261944	G	C	G	G	G	G	G
	II-9	rs13480491	G	A	G	G	G	A	A
	II-10	rs29395004	G	C	G	G	G	G	G
	II-11	rs29528790	G	G	A	G	G	G	A
III	III-1	rs13484116	T	T	G	T	T	G	G
	III-2	rs13483212	G	C	C	G	C	C	C
	III-3	rs13482069	A	A	A	A	G	G	A
	III-4	rs29660436	G	A	A	G	G	G	G
	III-5	rs30666086	G	C	C	G	G	G	C
	III-6	rs3699531	C	T	C	C	T	T	C
	III-7	rs4177203	G	C	G	C	C	C	C
	III-8	rs29176743	A	A	G	A	G	A	A
	III-9	rs8249644	C	A	C	C	A	C	C
	III-10	rs8254500	T	T	T	T	T	T	G
IV	IV-1	rs13475716	C	T	T	T	T	C	C
	IV-2	rs13476971	G	G	T	G	T	G	G
	IV-3	rs13476538	G	G	A	G	A	G	A
	IV-4	rs27687437	A	C	C	C	C	C	C
	IV-5	rs30521859	G	G	G	G	G	G	G
	IV-6	rs6373756	A	G	G	G	G	G	G
	IV-7	rs32390670	G	T	G	G	G	G	G
	IV-8	rs13478622	C	C	C	T	T	C	C
	IV-9	rs13480113	G	G	T	T	T	G	T
	IV-10	rs13476973	G	G	C	G	C	G	G
	IV-11	rs29315008	C	A	A	C	A	A	A
	IV-12	rs8271367	A	A	A	T	A	A	A

本研究建立的多重 PCR-LDR 每组分布的位点多达 10 组以上,四组总共含有 45 个 SNPs 位点,表 1 中 C57BL/6 分别与胚胎和精子中两两比对差异位点数中值为 20,冷冻胚胎 3 个品系间两两比对差异

位点中值为 19,精子 3 个品系间两两比对差异位点中值为 21,由此可见 45 个 SNP 位点在检测的冷冻胚胎和精子近交系小鼠品系中的鉴定效果较高,可以避免只通过几个 SNP 区分品系的情况。



注:横坐标表示 2 细胞期的细胞个数,
纵坐标表示检出 SNP 的个数。

图 5 C57BL/6 小鼠胚胎 2 细胞期不同数目
相对应的 SNPs 数目

Note. The numbers of cells in the 2-cell stage embryos is represented by the horizontal coordinates, and the longitudinal coordinates represent the number of expressed SNPs.

Fig. 5 SNPs number corresponding to different number of
2-cell stage embryos of C57BL/6 mice

本研究以 C57BL/6 小鼠的 2 细胞期冷冻胚胎来探索 SNPs 的检出率与胚胎细胞个数的关系,从结果中可以看出随着冷冻胚胎个数的增加 SNPs 检出个数也增加,当胚胎数大于等于 12 时,检出率达到峰值 100%。虽然全基因组扩试剂盒能扩增冷冻胚胎 DNA 的量,但是由于 PCR-LDR 分型系统对于 DNA 的量需求比较大,因此有可能才会出现冷冻胚胎个数 ≤ 2 或 ≤ 10 时,SNP 分型检测不出或者检测率不到 100% 的现象。

PCR-LDR 方案在本实验室作为一种常规的 SNP 高通量分型方案已经进展多年,该方案技术成熟、易操作、费用低,相信该方案在冷冻胚胎、精子遗传鉴定,能确保大型冷冻库的可靠、稳定运行,并为实现实验动物行业长期稳定的繁荣发展提供保证。

参 考 文 献

- [1] Mouse Genome Informatics[EB/OL]. <http://www.informatics.jax.org>.
- [2] The Jackson Laboratory (USA);<http://www.jax.org/resources/index.html>.
- [3] MRC, Mammalian Genetics Unit, Harwell (UK); <http://www.mgu.har.mrc.ac.uk/stock/stock.html>.
- [4] CARD, Kumamoto University; <http://cardb.cc.kumamoto.ac.jp/transgenic>.
- [5] 徐平. 实验动物资源开发、保存和共享利用[J]. 中国比较医学杂志, 2011, 10: 48 - 56.
- [6] 柯贤福. 浙江省实验动物发展现状及对策研究[D]. 浙江大学, 2012 年(万方数据, 2013, 10: Q95 - 33.)
- [7] 黄韧, 薛成, 王晓明, 等. 中国实验动物生物学特性数据库的建设与共享[J]. 实验动物科学, 2008, 25(2): 27 - 32.
- [8] 方喜业, 邢瑞昌, 贺争鸣. 实验动物质量控制[M]. 北京: 中国标准出版社, 2007: 154.
- [9] 刘先菊, 王艳蓉, 魏强. 常用实验动物遗传质量检测方法概述[J]. 医学动物防制, 2013, 29(8): 864 - 869.
- [10] 谢建云, 邵伟娟, 高诚. 多重 PCR 在几个近交系小鼠遗传检测中的应用初探[J]. 中国实验动物学报, 2003, 11: 93 - 95.
- [11] 胡培丽, 范昌发, 岳秉飞, 等. 4 个近交系小鼠 SNP 位点的测定[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 5: 278 - 280.
- [12] Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation[J]. Nucl Acid Res, 2001, 29: 308 - 311.
- [13] Peters LL, Robledo RF, Bult CJ, et al. The mouse as a model for human biology: A resource guide for complex trait analysis[J]. Nat Rev Genet, 2007, 8: 58 - 69.
- [14] Petkov PM, Cassell MA, Sargent EE, et al. Development of a SNP genotyping panel for genetic monitoring of the laboratory mouse[J]. Genomics, 2004, 83: 902 - 911.
- [15] Xiao Z, Xiao J, Jiang Y, et al. A novel method based on ligase detection reaction for low abundant YIDD mutants detection in hepatitis B virus[J]. Hepatol Res, 2006, 34: 150 - 155.
- [16] Xiao Z, Cao H, Luan X, et al. Effects of additives on efficiency and specificity of ligase detection reaction[J]. Mol Biotechnol, 2007, 35: 129 - 133.
- [17] 晁天柱, 陈国强, 赵莹, 等. 用于野生小家鼠来源一号染色体替换系构建的 PCR-LDR 分型系统[J]. 中国实验动物学报, 2011, 19: 372 - 376.
- [18] 谢雯, 鲍世民, 谢建云, 等. 基于 PCR-LDR 平台的近交系小鼠遗传质量快速检测方法[J]. 中国实验动物学报, 2012, 20: 1 - 8.
- [19] Cui X, Li H, Goradia JM, et al. Single-sperm typing: determination of genetic distance between the G γ -globin and parathyroid hormone loci by using polymerase chain reaction and allele-specific oligomers[J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989, 86: 9389 - 9393.
- [20] Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers[M]. In: Krawetz S, Misener S (eds). Bioinformatics Methods and Protocols. Methods Mol Biol, 2000, 132: 365 - 386.
- [21] 王刚, 李凯, 周宇荀, 等. 新型通用探针 LDR 分型技术的开发及细胞色素 P450 基因多位点分型[J]. 华东理工大学学报, 2008, 34: 503 - 508.
- [22] 周光兴, 杨斐, 杨萍. 医学实验动物学[M]. 复旦大学出版社, 2012: 23 - 24.

[收稿日期] 2015-11-16