

# 不同来源高度免疫缺陷小鼠微卫星 DNA 遗传检测的分析

范涛, 王洪, 魏杰, 周舒雅, 岳秉飞, 李保文

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

**【摘要】目的** 对不同来源的高度免疫缺陷小鼠进行遗传背景的检测分析,旨在发现经遗传修饰的小鼠遗传背景是否符合近交系遗传特征。**方法** 对收集到的4种不同来源以NOD为背景的高度免疫缺陷小鼠,选取30个微卫星DNA位点进行PCR检测,通过凝胶电泳结果和STR扫描确定基因型,进行遗传分析。**结果** 4组20个样本中共有17个位点呈现多态性,A、B两组小鼠30个微卫星位点表现为纯和,其他两组小鼠中不同位点均出现杂合个体;A、B两组遗传距离最小,保持着较高的遗传相似度。**结论** 研究表明,不同来源高度免疫缺陷小鼠遗传背景有差异。

**【关键词】** 免疫缺陷小鼠;微卫星;遗传质量

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 08-0091-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.08.015

## Genetic monitoring and analysis of highly immunodeficient mice from different sources by microsatellite DNA markers

FAN Tao, WANG Hong, WEI Jie, ZHOU Shu-ya, YUE Bing-fei, LI Bao-wen.

National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

**【Abstract】 Objective** To test and analyze the genetic background of highly immunodeficient mice from different sources. **Methods** Four highly immunodeficient mouse strains from different sources of NOD background were collected. 30 microsatellite DNA sites were detected, and the genotype can be displayed by gel electrophoresis and STR scanning. **Results** 17 microsatellite sites exhibit polymorphism in 20 mice of the four groups. There were 30 homozygous loci in the mice of groups A and B, and heterozygous in the other two groups. The genetic distance is minimum between groups A and B, showing a higher genetic similarity. **Conclusions** The genetic backgrounds are different in highly immunodeficient mice from different sources.

**【Key words】** Immunodeficient mice; Microsatellite; Genetic quality; Mice

高度免疫缺陷小鼠“NSG”是在NOD(non-obese diabetic)小鼠的背景下,发生重症联合免疫缺陷Prkdc<sup>scid</sup>(protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide, Prkdc; severe combined immune deficiency, SCID)和白细胞介素2受体 $\gamma$ 链

(interleukin 2 receptor gamma chain, Il2rg)缺失突变产生的。该小鼠模型表现为成熟T、B淋巴细胞、功能性NK细胞缺失,细胞因子信号缺少。由于其免疫缺陷程度相对于其他品系更高,能更好地适用于人类造血干细胞、外周血单核细胞和肿瘤的异种移

[作者简介] 范涛(1983-),男,技师,专业:实验动物保种。E-mail: crvchinaft@126.com。

[通讯作者] 李保文(1967-),男,副主任技师。E-mail: libaowen2003@aliyun.com。

植,而成为一种理想的人源化免疫缺陷小鼠模型。不同来源的高度免疫缺陷小鼠有不同的建立方法:一种方法是同源导入,通过回交获得以受体小鼠品系为背景的双基因突变型小鼠;另一种是利用基因编辑技术直接在背景品系小鼠上进行改造,更快、更直接地获得目标动物。微卫星又称短串联重复序列(short tandem repeat, STR),作为分子标记在实验动物的遗传质量检测中具有良好的适用性,被广泛应用<sup>[1-4]</sup>。具有高度多态性的简单重复序列可以用于区分不同近交系小鼠,而在同品系内不同个体间,微卫星 DNA 则呈单态性<sup>[5,6]</sup>,可以用于近交系遗传质量评价。本实验通过选择 30 个微卫星位点对收集到的 4 种不同来源,不同制作方法的“NSG”小鼠进行遗传检测,旨在发现这些遗传工程小鼠从制作之初背景品系的选取,到后期建系保种的过程,在遗传质量方面是否符合近交系特点。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

4 种不同来源的“NSG”小鼠由本单位收集保存并提供,生产许可证号【SCXK(京)2014-0013】。4 种小鼠中有两种是在背景品系上做的基因敲除,两种为同源导入。每品系 5 只,4~6 周龄,雌雄在选择时不做限制,SPF 级环境饲养,选择 1 只 B6 小鼠作为参照。

### 1.2 方法

1.2.1 小鼠 DNA 提取:将 4 种不同来源高度免疫缺陷小鼠顺序编为 A、B、C、D 四个组。剪取小鼠尾尖 3~5 mm 放入 EP 管中,加蛋白酶 K 缓冲液裂解过夜,酚/氯仿法提取 DNA,浓度稀释至 50~100 ng/ $\mu$ L,4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.2 微卫星位点的选择:根据文献报道<sup>[7]</sup>,选择 30 个多态性较高的微卫星位点,覆盖小鼠 1~20 号染色体,引物序列详见表 1,引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。

1.2.3 PCR 扩增:反应体系:总反应体系 20  $\mu$ L,其中:10 $\times$  PCR buffer 2  $\mu$ L,上、下游引物各 1  $\mu$ L, dNTP 1.2  $\mu$ L,镁离子 1.5  $\mu$ L, Taq 酶 0.2  $\mu$ L,基因组 DNA 1  $\mu$ L,纯水 12.1  $\mu$ L。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s;退火温度(54~64 $^{\circ}$ C) 30 s;72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s;35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min;扩增产物 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.4 电泳:2.5% 琼脂糖凝胶,电泳。溴化乙锭染色,用紫外可见分析仪查看结果并记录。

1.2.5 STR 扫描:将 21 个样本扩增产物放入 STR 扫描仪,用 GeneMarker V2.2.0 读取各样本在各位点扩增片段的大小。每个位点按照片段大小顺序记为 a、b、c、d,根据等位基因分型的不同,各微卫星位点的基因型以 aa、ab、ac 等方式记录,基因型全部纯和,判断为符合近交系特征;反之出现杂合基因型则不符合近交系遗传特点。

1.2.6 数据结果:用 Lynch 法计算组间相似系数,同时将数据放入 PopGen1.32 进行统计分析。

## 2 结果

### 2.1 PCR 检测分析结果

30 个微卫星位点均能扩增出条带。根据电泳结果进行初步筛查,可观察到多态性位点,以 D5Mit48 位点为例(图 1),C 组 1、2、4、5 号小鼠在该位点上与其他组别个体间有差别,呈现多态性。通过与 B6 PCR 结果的比较, D7Mit12、D14Mit3、D18Mit19、D19Mit3、D19Mit16 位点两种品系的扩增片段长度一致,表现为单态性。

### 2.2 STR 扫描及结果

琼脂糖凝胶电泳肉眼难以观察区别小于 10 bp 的片段,STR 扫描可以精确检测片段的具体长度,区分相差 1 bp 的 DNA 片段。根据 STR 扫描结果,可以更准确地判断各位点的多态性,同时判断位点为纯合还是杂合,判读方法如图 2 所示。C 组在 D12Mit7 位点出现了两种片段长度,经扫描,1、4、



图 1 4 组小鼠在 D5Mit48 位点 PCR 凝胶电泳结果

Fig. 1 PCR gel electrophoresis at loci D5Mit48 of mice in the four groups

5 号样本出现 106 bp 和 122 bp 两个波形,说明该小鼠在这个位点为杂合状态,基因型记录为 ab;2 号样本和 3 号样本各在 122 bp 和 106 bp 出现了一个波形,说明这两只小鼠在该位点为纯和型并表现出多态性,记录为 bb、aa,以此类推。4 组 20 个实验样本判读结果(表 1)。

根据 STR 扫描结果,参照样本 B6 所有微卫星位点都为纯合状态;A、B 组的 10 只小鼠 30 个微卫星位点均为纯合状态;C 组的 5 个样本中在 D2Mit15、D8Mit33、D9Mit21、D9Mit23、D11Mit4、D12Mit7、D17Nds3、D17Mit11、D18Mit9、D19Mit16 等 10 个位点上,出现多个杂合型个体;D 组的样本仅有一只小鼠在 D19Mit6 位点上表现为杂合型。4 组 20 个样本中共有 17 个位点呈现出多态性,包括: D1Mit365、D2Mit15、D3Mit29、D5Mit48、D6Mit8、D6Mit102、D8Mit33、D9Mit21、D9Mit23、D11Mit4、D12Mit7、D16Mit9、D17Nds3、D17Mit11、D18Mit9、D19Mit16、DXMit16。

### 2.3 4 种小鼠相似系数

按 Lynch 法计算相似系数其结果(表 2)。A 组与 B 组小鼠相似度最高,其次是 B 组与 D 组;C、D 两组相似性最低。C 组与其他三组都有较低的相

似性。

### 2.4 4 种小鼠遗传距离比较

通过 PopGen1.32 软件分析 Nei' (1978) 遗传距离、遗传相似度指标结果(表 3)。通过计算可以看出 A 组与 B 组遗传距离最小,保持着较高的遗传相似度。

### 3 讨论

Jackson 实验室发布的高度免疫缺陷小鼠是通过将 NOD. CB17-Prkdc<sup>scid</sup>/J 与 B6.129S4-Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/J 两品系杂交,产生同时具备 Prkdc<sup>scid</sup> 和 Il2rg 基因型的 F1 代后,与 NOD. CB17-Prkdc<sup>scid</sup>/J 回交 8 代,产生的杂合子相互交配得到 Prkdc<sup>scid</sup> 和 Il2rg 双纯合型 (Il2rg 是 X-link 基因,雄性为半合子) 的 NSG 小鼠<sup>[8]</sup>。国内不少实验室和基因工程公司则使用基因编辑技术,在 NOD 或 NOD/SCID (NOD. CB17-Prkdc<sup>scid</sup>) 小鼠上进行基因改造而获得同样的动物模型。不论哪种方式,最终获得的目标动物都应符合近交系特点。根据实验结果,A、B 两组中所包含的 10 只小鼠样本 30 个位点均处于纯和状态,符合近交系特点;C 组的 5 只小鼠样本中,在 10 个位点上出现多个个体的基因型为杂合,可以判定其不符合近交系遗传特征。D 组有一只小鼠在 1 个位点上出现杂合基因型,可将其本身及其后代淘汰,不进入繁育体系。

根据报道<sup>[9]</sup>,不同近交系在 D7Mit12、D19Mit3 两个微卫星位点呈单态性,实验证明 NOD 小鼠也符合该特点。不同组别的小鼠在同一位点上也具有多态性。例如 A 组全部样本在 D1Mit365 位点、C 组在 D6Mit8 位点上都出现了与其他三组不一致的 DNA 片段长度,但都为纯合的基因型,这可能是在小鼠模型构建之初选择了不同的亚系而导致的。又如 A 组在 D3Mit29、D17Nds3 两个位点各出现了 1 只与组内其他 4 只不同的基因型,如果该样本处在基础群或核心群中,可以在日后的繁育管理中将其淘汰,避免在该位点出现杂合等位基因。

近交系小鼠的遗传质量直接影响着实验结果的可靠性<sup>[10,11]</sup>,大多数基因工程小鼠都是以近交系为背景进行基因改造而来。遗传质量的改变可能发生在建立时选用的小鼠自身发生遗传变异,遗传背景不符合近交系特点;也可能发生在后续的建立系保种过程中,如回交倒入品系不合格,回交未超过 5 代(N5),未严格按照全同胞兄妹繁殖等。

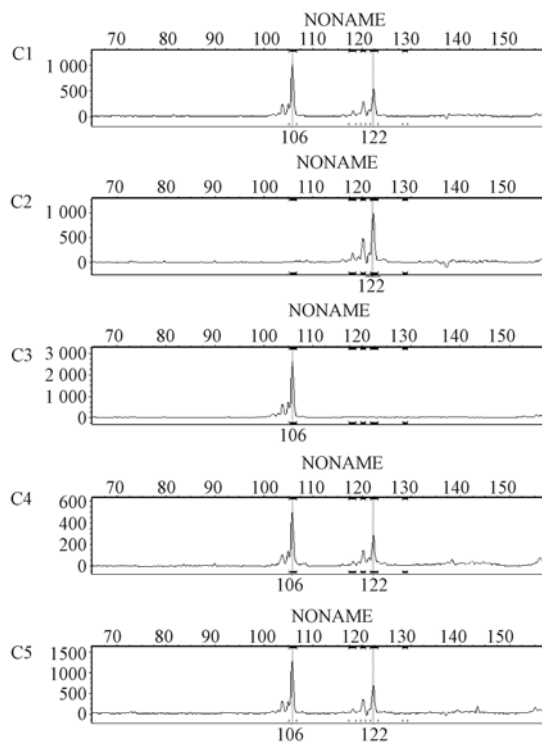


图 2 C 组样本在 D12Mit7 位点的微卫星扫描波形  
Fig. 2 The waveforms of loci D12Mit7 in STR scanning of samples of the group C

表 1 30 个微卫星座位的引物序列、扩增条件及各组基因型结果

Tab. 1 The primer sequence and optimal conditions amplification of 30 microsatellites loci and genotype results

位点	引物序列 (5' - 3')	染色体	退火温度	A 组	B 组	C 组	D 组
Locus	Primer sequence (5' - 3')	Chr.	Temp (°C)	Group A	Group B	Group C	Group D
D1Mit365	ATCACCTGCAATAGTACCCCC TTAATCAGTCATCATAGCTTTTCC	1	54	bb 5/5	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5
D2Mit15	ATGCCTTAGAAGAATTTGTTCCC CTTGAAAAACACATCAAAATCTGC	2	54	aa 5/5	aa 5/5	aa 1/5 ab 4/5	aa 5/5
D3Mit29	GATGAGAGATTCTGATGTGGAGG CCAGCCTCAGTATCTCAAAACC	3	64	aa 1/5 bb 4/5	aa 1/5 bb 4/5	bb 5/5	aa 5/5
D4Mit235	AGGCCAAAGGTTGGATTCT GAGACTTGAAATGAAGCATTAGG	4	55	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5
D5Mit48	GAATATCATCCAAGCCAAGACC AAAAGACACTTCCCTGACATAGC	5	60	aa 5/5	aa 5/5	aa 1/5 bb 4/5	aa 5/5
D6Mit102	CCATGTGGATATCTTCCCTTG GTATACCCAGTTGTAATCTTGTGTG	6	54	bb 5/5	aa 1/5 bb 4/5	bb 5/5	bb 5/5
D6Mit8	TGCACAGCAGCTCATTCTCT GGAAGGAAGGAGTGGGGTAG	6	60	aa 5/5	aa 5/5	bb 5/5	aa 5/5
D6Mit15	CACTGACCCTAGCACAGCAG TCCTGGCTTCCACAGGTA	6	60	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5
D7Mit281	TTCTCTACCTCTGAGCCA GCCACAAGGAAGACACCATT	7	60	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5
D7Mit12	GCTGGGTTTATTTCATTGCAA TCCAGCTCATGGGTAGAAGA	7	58	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5
D8Mit33	TTTGAGCAAAGGACTTGCCT TTATCTGCCTCAACACCACC	8	60	aa 5/5	aa 5/5	aa 2/5 ab 3/5	aa 5/5
D8Mit14	TTTTACACTCAGTGTGCG GTCTCTCCTTCTGGCGCTG	8	63	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5
D9Mit23	AAGAAGTTTCCATGACATCATGAA AGAAGAAAATTCTTGACAGCTCTG	9	65	aa 5/5	aa 5/5	aa 1/5 ab 4/5	aa 5/5
D9Mit21	CAGTCCCTGGTTAATAACAACAAC TATAGTCCATTGTGGCAGAGGAGT	9	59	aa 5/5	aa 5/5	aa 1/5 ab 4/5	aa 5/5
D10Mit12	ATGTCCAAAACACCAGCCAG GGAAGTGATGGAGCTCTGTT	10	54	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5
D11Mit4	CAGTGGGTATCAGTACAGCA AAGCCAGCCCAGTCTTCATA	11	54	cc 5/5	cc 5/5	ac 4/5 cc 1/5 aa 1/5	bb 5/5
D12Mit7	CCGGGATCTAAAACACTACAT TCTAATCTCAGCCCAATGGT	12	60	bb 5/5	bb 5/5	bb 1/5 ab 3/5	bb 5/5
D12Nds11	CATTTGAGGACAGTCAGGATC GGAACTTTCATGCCACTACTAG	12	54	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5
D13Mit3	TCAGGCTCATCCAGATACC TTTTGAGAGAAACACACACC	13	60	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5
D14Mit3	GCAATTACACCTCCTCGGAG CACAAGGCATATGGTACCC	14	54	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5
D15Mit5	CTTGCTAATTCCTGTCAAGCAAAT GTTTCATTGGTCAATGGAACTTA	15	54	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5
D15Mit15	AGCATACTCTCTTTGCTCTGCT AATAAATACCAGAGAAGCACCGTG	15	60	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5
D16Mit9	TCTTGCTCTGGTATCAACTACAGG CCTCCTTGCCCAGCTAAAC	16	55	bb 5/5	bb 4/5 cc 1/5	aa 5/5	aa 4/5 cc 1/5
D17Mit11	TGAATTTATGAGGGGGTCA TGTCATATCTCTCTTTATACACA	17	54	bb 5/5	bb 5/5	ab 4/5 bb 1/5	bb 5/5
D17Nds3	TTCTGTGGGGCCTTATCAG AGACAATGGGTAACAGAGGCA	17	58	bb 1/5 cc 4/5	cc 5/5	ac 4/5 cc 1/5 aa 1/5	cc 5/5
D18Mit9	AGAGGCATTGCACACAAG GCCCTTGGAGAGTTGGT	18	60	aa 5/5	aa 5/5	ab 1/5 bb 3/5	aa 5/5
D18Mit19	ATTGGCTGTTCAAGTGCAG ATGCACAATAGCTCATAGCTTCT	18	55	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5 bb 3/5
D19Mit16	TCTTAGGTAATCTCCCTTAGGGG TGCTAAATGTAAAAGTGAAGCATG	19	54	bb 5/5	bb 5/5	ab 2/5 bb 3/5	bc 1/5 dd 1/5
D19Mit3	CTCCCTACTGCAGTGCTC TTGCATAGTTGGCCAAAGTG	19	60	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5
DXMit16	CTGCAATGCCTGCTGTTTTA CCGGAGTACAAAAGGAGTCA	X	58	aa 5/5	bb 5/5	aa 1/5 bb 1/5 cc 3/5	cc 5/5

**表 2** 任意两组间相同等位基因数量与相似系数**Tab.2** The number of the same alleles and similarity index between any two groups

	A 组	B 组	C 组	D 组
A 组	—	28	20	24
B 组	0.933	—	18	26
C 组	0.667	0.600	—	17
D 组	0.800	0.867	0.567	—

注: 对角线以上部表示两组间相同位点数量, 对角线以下为两组间相似系数。

Note. The number of the same alleles (above the diagonal) and similarity index (below the diagonal)

**表 3** 任意两组间遗传相似度和遗传距离**Tab.3** Genetic identity and genetic distance between any two groups

	A 组	B 组	C 组	D 组
A 组	—	0.9288	0.7921	0.8444
B 组	0.0739	—	0.8311	0.885
C 组	0.2331	0.185	—	0.8195
D 组	0.1692	0.1221	0.1991	—

注: 对角线以上部表示两组间遗传相似度, 对角线以下为两组间遗传距离。

Genetic identity (above the diagonal) and genetic distance (below the diagonal)

微卫星 DNA 具有位点充足, 遗传稳定, 多态性高, 片段短容易扩增等优势, 非常适合用于近交系的遗传监测。近交系遗传修饰小鼠在保种、扩繁的过程中除目的基因的检测外, 定期对基础群和核心群的繁殖个体进行遗传背景的筛查很有必要, 及时发现不合格的个体并不作选留, 可维护整个种群的纯合性。本文通过微卫星 DNA 分子标记对不同来源高度免疫缺陷小鼠的遗传质量进行检测, 为近交系小鼠微卫星位点的筛选提供数据支撑, 同时, 对建立动物模型质量评价提供参考。对于今后的保种和繁殖以及使用的意义和社会价值的重要性进行阐述。

**参考文献:**

- [1] Basta PV, Whitmore SP, Basham KB, et al. Microsatellite analysis in FVB/N mice [J]. *Comp Med*, 2004, 54(5): 524-527.
- [2] Katoh H, Yoshino S, Inui Y, Honda S, et al. Microsatellite genotyping for genetic quality testing using sperm cells in the mouse [J]. *Exp Anim*, 2005, 54(4): 373-376.
- [3] 陈振文, 欧阳兆和, 董罡, 等. 用微卫星标记技术对国内 BALB/c 小鼠遗传质量的分析 [J]. *遗传*, 2004, 26(6): 845-848.
- [4] 李芳芳, 魏杰, 王洪, 等. 应用微卫星标记对两个豚鼠封闭群的遗传学研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(12): 33-38.
- [5] 欧阳兆和, 陈振文, 李瑞生, 等. 微卫星 DNA 多态性在十种近交系小鼠遗传监测中的应用研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2004, 14(2): 71-74.
- [6] 王纯耀, 杨卫红, 宋国英, 等. 微卫星 DNA 在近交系小鼠遗传监测中的应用 [J]. *中国兽医学报*, 2008, 28(3): 333-335.
- [7] 王洪, 杜小燕, 徐平, 等. 上海 KM 小鼠种子群体遗传状况分析 [J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(12): 27-32.
- [8] JAX Mice, JAX Mice & Services, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME. World Wide Web (<http://www.jax.org/strain/005557>)
- [9] 刘先菊, 王艳蓉, 高子琪, 等. 近交系小鼠微卫星 DNA 引物的筛选和 Tm 值优化研究 [J]. *实验动物科学*, 2012, 29(1): 9-13.
- [10] 张树辉, 魏泓, 史景泉. 近交系小鼠微卫星 DNA 多态性的研究 [J]. *遗传*, 2000, 22(6): 375-378.
- [11] 刘先菊, 王艳蓉, 张丽芳, 等. 常用近交系小鼠微卫星 DNA 多态性的分析研究 [J]. *实验动物科学*, 2010, 27(5): 1-4.

[修回日期]2016-04-28