



微卫星 DNA 分析国内 24 个近交系小鼠遗传状况

李银银¹, 吴绍亮², 王洪³, 萧晓琴⁴, 张双悦⁴, 郭萌¹, 李长龙⁴, 吕建祎⁴,
刘欣⁴, 陈振文⁴, 杜小燕^{1*}

(1. 首都医科大学基础医学院实验动物学系, 北京 100069; 2. 山东省临沭县人民医院, 山东 临沂 276700;
3. 中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所, 北京 100050; 4. 首都医科大学基础医学院遗传学系,
北京 100069)

【摘要】 目的 利用微卫星位点对国内 24 种近交系小鼠进行遗传状况分析。方法 用前期筛选的富含多态性和等位基因数多的 30 个小鼠微卫星位点, 合成荧光标记引物, 对近交系小鼠基因组 DNA 进行 PCR 的扩增, 经 STR 扫描对各近交系小鼠品系进行基因分型。结果 在 24 个近交系小鼠品系中, 有 16 个品系在品系内在 30 个位点上均具有相同基因型。而在不同品系间同一位点具有多态性, 可初步对不同品系进行鉴别区分。其余品系内个别动物存在多态性。结论 所选位点可以参考用于近交系小鼠遗传质量检测分析, 并进行初步品系检测鉴定。

【关键词】 近交系小鼠; 遗传质量分析; 微卫星 DNA

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 08-0043-07

doi: 10.3969.j.issn.1671-7856.2017.08.009

Genetic quality analysis of 24 domestic inbred mouse strains by microsatellite DNA

LI Yin-yin¹, WU Shao-liang², WANG Hong³, XIAO Xiao-qin⁴, ZHANG Shuang-yue⁴, GUO Meng¹, LI Chang-long⁴,
LV Jian-yi⁴, LIU Xin⁴, CHEN Zhen-wen⁴, DU Xiao-yan^{1*}

(1. Department of Laboratory Animal, School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China; 2. People's Hospital of Linshu County, Shangdong Linyi 276700; 3. Institute of Laboratory Animal Resources, National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050; 4. Department of Genetics, School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069)

【Abstract】 **Objective** To analyze the genetic quality of 24 domestic inbred strains mice using microsatellite loci panel. **Methods** Previously selected 30 microsatellite loci of mouse with high polymorphism and more allele numbers were used to synthesize corresponding fluorescently-labeled primers. Then the genomic DNA samples of each mouse were amplified by PCR and the products were analyzed by STR scanning to genotype the inbred strains of mice. **Results** Out of the 24 inbred strains, 15 inbred strains showed the same genotype within one strain at 30 loci. Among different strains, microsatellite loci indicated polymorphism which could be used to distinguish different strains. However, the rest 9 strains demonstrated polymorphism within strains. **Conclusions** Our study provides a useful microsatellite panel to detect genetic quality of inbred mice and distinguish different strains with the optimized microsatellite loci.

【Key words】 Inbred strains; Mice; Genetic quality; Microsatellite DNA

[基金项目] 国家科技支撑计划(2015BAI07B01); 国家自然科学基金(31372272, 31572341)。

[作者简介] 李银银(1989-), 女, 硕士研究生, 专业: 实验动物学。E-mail: yyl7590@163.com

[通讯作者] 杜小燕(1971-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 实验动物教学和研究。E-mail: duduyan@ccmu.edu.cn

近交系小鼠具有遗传均一性的特点,以及对各种反应的一致性、可再现性、敏感性等均比较好的特点,广泛应用于医学生物学各项研究中。其遗传的同源性、稳定性和可辨性使不同地区的研究结果具有更高的可比性。对近交系小鼠的遗传质量控制,直接影响着动物实验结果的准确性、可重复性和科学性^[1]。而遗传检测是保证实验动物遗传质量的重要措施。对近交系的遗传监测检测主要是通过测定其基因的纯合性和表型品系内的一致性,证实该品系是否保持原来的遗传特性,是否发生基因突变或基因污染^[2]。目前我国实验动物遗传检测国标中主要对生化位点检测近交系遗传状况的方法有较为详细的规定,对分子生物学的方法如微卫星 DNA 标记(microsatellite marker)等方法没有推荐的位点和操作标准。微卫星一般由 1~6 bp 核苷酸的串联重复片段构成,重复 10~60 次左右,广泛存在于真核细胞基因组中。平均每 10 kb 就出现一个 STR(short tandem repeat)^[3]。微卫星因数量多、分布广、多态性丰富、呈共显性遗传方式以及检测快速方便等优点而备受推崇^[4],已作为衡量人类和动物基因组整体稳定性的良好指标,且在近交系小鼠遗传监测中得到广泛应用。国内关于利用微卫星方法检测近交系小鼠的报道也有很多,涉及到的品系包括 BALB/c、C57BL6、TA1、TA2、T739、SCID、M615、C3H 和 DBA 等,选取的微卫星位点也从几个至几十个不等^[5-8]。为了进一步开展近交系小鼠遗传检测的标准化研究,本试验选取分布于小鼠 20 条染色体上的 30 个微卫星位点对国内包括常用品系和基因修饰品系共 24 个近交系小鼠品系进行遗传检测,以期对近交系小鼠微卫星检测技术进行较系统的研究,为该方法在近交系小鼠遗传质量检测中的广泛应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

选取国内较常用的近交系小鼠品系和部分基因修饰小鼠品系共 24 个近交系小鼠品系,分别来自北京(4 家单位)、天津、上海、广州 4 个地区,均为清洁级或 SPF 级。样品来源、编号、品系名称、性别及

动物数目等信息见表 1。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠基因组 DNA 的制备

取上述 24 个小鼠品系动物的肝脏组织或者鼠尾 0.1 g,加入 DNA 裂解抽提缓冲液 2 mL,加入 20 mg/mL 蛋白酶 K 20 μ L,RNA 酶 10 μ L,45 $^{\circ}$ C~55 $^{\circ}$ C 消化过夜,酚-氯仿法提取组织 DNA,沉淀后,加入 TE 缓冲液进行溶解。经 Nanodrop 2000 C 微量分光光度计检测吸光度 A260/A280 比值在 1.8~2.0 之间,检测样品合格。取 DNA 原液适量稀释成 50~100 ng/ μ L 作为 DNA 模版,于 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 微卫星位点的选择与引物的合成

本研究所用 30 个微卫星位点从相关文献中选取^[9],位点的选择尽量均匀分布于小鼠的 1~20 号染色体上,且具有较高的多态性。荧光引物委托上海生工有限公司合成。位点 PCR 条件前期已经过优化。其中 30 个位点名称、引物标记荧光名称、等位基因数及等位基因范围如表 2 中所示。

1.2.3 PCR 扩增

PCR 反应体系:总反应体系 20 μ L,其中:10 \times PCR buffer 2 μ L,dNTP Mg²⁺ plus(100 μ mol/L)1.2 μ L,上下游引物(100 μ mol/ μ L)各 0.1 μ L,Taq 酶(5 U/ μ L)0.1 μ L,50~100 ng/ μ L 基因组 DNA 1 μ L,双蒸水(ddH₂O)15.5 μ L。

PCR 反应程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s;不同位点 54 $^{\circ}$ C~64 $^{\circ}$ C 不同温度退火 30 s;72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s;35 个循环;72 $^{\circ}$ C 继续延伸 8 min;扩增产物于 4 $^{\circ}$ C 保存。^[9]

1.2.4 PCR 产物 STR 扫描

扩增产物应用 STR 扫描仪进行扫描,一次扫描可以同时扫描三个微卫星位点,三个位点分别用三种荧光 FAM、HEX、TAMRA 进行标记^[10],这三个位点对同一个小鼠样品的 PCR 扩增产物按照 1:3:5 体积比混合后取 1 μ L 上样,进行 STR 扫描。

扫描结果由 GeneMarker V2.2.0 软件判读 141 个样本在 30 个微卫星位点的扩增片断大小。每个位点的等位基因根据扩增片断大小从大到小顺序排列记录为 A、B、C、D 等,每个样本的基因型即可记录为 AA、BC、AC 等形式。^[9]

表 1 24 个小鼠近交品系样品来源、编号、品系名称、性别、数目
Tab.1 The sources, grades, names, gender and numbers of the 24 inbred strains

样品来源	编号	品系名称	性别和数目
Source	Grades	Names	Gender and numbers
北京 1 Beijing1	1	NCPC/2	6(雌雄各 3 只) 6(3 males and 3 females)
	2	db/db	6(雌雄各 3 只) 6(3 males and 3 females)
北京 2 Beijing2	3	615	6(雌雄各 3 只) 6(3 males and 3 females)
	4	NOD/LtJ	3(雌性 1 只, 雄性 2 只) 3(2 males and 1 females)
	5	CBA/J	6(雌雄各 3 只) 6(3 males and 3 females)
北京 3 Beijing3	6	SAMP8	6(雌雄各 3 只) 6(3 males and 3 females)
	7	DBA/1	3(雌性 3 只) 3(3 females)
	8	129	3(雌性 3 只) 3(3 females)
北京 4 Beijing4	7	DBA/1	3(雄性 3 只) 3(3 males)
	8	129	3(雄性 3 只) 3(3 males)
天津 Tianjin	9	TA1	6(雌雄各 3 只) 6(3 males and 3 females)
	10	TA2	6(雌雄各 3 只) 6(3 males and 3 females)
	11	NOD-SCID	6(雌雄各 3 只) 6(3 males and 3 females)
	12	MRL/LPR	6(雌雄各 3 只) 6(3 males and 3 females)
	13	C3H/HeJ	6(雌雄各 3 只) 6(3 males and 3 females)
	14	BALB/c-NU	6(雌雄各 3 只) 6(3 males and 3 females)
	15	BALB/c	6(雌雄各 3 只) 6(3 males and 3 females)
上海 Shanghai	16	SCID	6(雌雄各 3 只) 6(3 males and 3 females)
	17	C57BL/6J	6(雌雄各 3 只) 6(3 males and 3 females)
	18	DBA/2	6(雌雄各 3 只) 6(3 males and 3 females)
	19	SCID-BG	6(雌雄各 3 只) 6(3 males and 3 females)
	20	FVB	6(雌雄各 3 只) 6(3 males and 3 females)
广州 Guangzhou	21	A2A-2-B6	6(雌雄各 3 只) 6(3 males and 3 females)
	22	EGFP-B6	6(雌雄各 3 只) 6(3 males and 3 females)
	23	EYFP-B6	6(雌雄各 3 只) 6(3 males and 3 females)
	24	C 系-FVB	6(雌雄各 3 只) 6(3 males and 3 females)

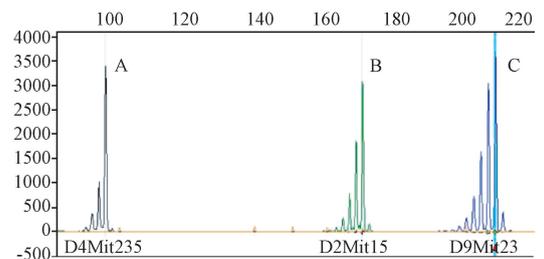
表 2 30 个微卫星位点名称、引物标记的荧光名称、在 24 个近交系中检测到的等位基因数及等位基因范围**Tab. 2** Fluorescent-labeled primers, numbers of alleles and allele range of 30 microsatellite loci of 24 inbred strains

位点 Locus	荧光标记 Fluorescent labeled primers	等位基因数目 Numbers of alleles	等位基因范围 Allele range
D9Mit21	FAM-1	2	178 ~ 192
D3Mit29	HEX-1	4	144 ~ 202
DXMit16	TAMRA-1	3	90 ~ 114
D10Mit12	FAM-2	3	216 ~ 240
D6Mit102	HEX-2	9	123 ~ 173
D1Mit365	TAMRA-2	3	98 ~ 109
D11Mit4	FAM-3	5	246 ~ 296
D13Mit3	HEX-3	8	159 ~ 197
D15Mit5	TAMRA-3	3	100 ~ 128
D9Mit23	FAM-4	5	202 ~ 211
D2Mit15	HEX-4	5	140 ~ 170
D4Mit235	TAMRA-4	2	96 ~ 113
D8Mit33	FAM-5	3	216 ~ 224
D12Nds11	HEX-5	3	172 ~ 178
D12Mit7	TAMRA-5	3	107 ~ 123
D14Mit3	FAM-6	2	227 ~ 237
D6Mit8	HEX-6	6	164 ~ 187
D7Mit281	TAMRA-6	4	115 ~ 146
D6Mit15	FAM-7	5	150 ~ 252
D19Mit16	HEX-7	4	113 ~ 129
D5Mit48	FAM-8	8	159 ~ 208
D17Nds3	HEX-8	10	114 ~ 159
D19Mit3	FAM-9	4	198 ~ 222
D16Mit9	HEX-9	4	124 ~ 144
D7Mit12	FAM-10	5	200 ~ 231
D18Mit19	HEX-10	4	134 ~ 159
D8Mit14	HEX-11	3	136 ~ 163
D15Mit15	HEX-12	5	140 ~ 156
D17Mit11	HEX-13	6	148 ~ 177
D18Mit9	HEX-14	4	155 ~ 165

2 结果

2.1 STR 扫描结果

PCR 产物在 STR 扫描仪上扫描,不同荧光标记显示不同颜色的扫描图形。FAM 荧光标记的显示蓝色峰形,HEX 荧光标记的显示绿色峰形,TAMRA 标记的显示黑色峰形。同一个 DNA 样品用三个不同位点扩增的 PCR 产物即可同时检测,在 30 bp 左右大小间隔。显示如图 1。在 24 个近交品系中基因分型得到的等位基因数和等位基因片段大小见表 2。在品系间 30 个位点都呈现了多态性,位于小鼠 17 号染色体上的 D17Nds3 位点具有 10 个等位基因,D6Mit102、D13Mit3、D5Mit48 三个位点分别具有 9、8、8 个等位基因,同样具有较高的多态性。等位基因数目最少的是 D9Mit21、D4Mit23、D14Mit3 等 3 个位点,只有 2 个等位基因型。



注:(A) D4Mit235 位点的 TAMRA 标记的峰形图;(B) D2Mit15 位点的 HEX 标记的峰形图;(C) D9Mit23 位点的 FAM 标记的峰形图。

图 1 三个不同位点不同荧光标记 PCR 产物同时检测的峰形图

Note. (A) TAMRA of D4Mit235; (B) HEX of D2Mit15; (C) FAM of D9Mit23.

Fig. 1 The peak forms of PCR products in a 3-plex fluorescent-PCR of 3 loci

2.2 各品系小鼠微卫星检测结果

30 个微卫星位点引物对 141 只近交系小鼠样本的 PCR 扩增产物,经 STR 扫描后都出现了典型的波形。通过判读 STR 扫描结果,对不同样品进行等位基因分型。其等位基因分型结果如表 3 中所示。从表中可以看出,在 24 个近交品系中,有 16 个品系 17 个群体(分别是 NCPC/2、db/db、615、NOD/LtJ、CBA/J、DBA/1(北京 4)、129(北京 3)、129(北京 4)、TA1、MRL/LPR、C3H/HeJ、BALB/c、SCID、DBA/

2、SCID-BG、A2A-2-B6 和 EGFP-B6 品系,占总检测品系数的 66.7%) 在 30 个位点上均表现为纯合基因型,在 6 只样品间呈单态性。而其余品系的 9 个群体(分别是 SAMP8、DBA/1(北京 3)、TA2、NOD-SCID、BALB/c-NU、C57BL/6J、FVB、EYFP-B6 和 C 系-FVB),在个别位点上出现了杂合基因型,或/且在 6 只样品间呈多态性,例如 BALB/c-NU 在 D13Mit3 位点上有 2 只动物基因型为杂合的 BC 型,而且在 6 只动物间是多态性的。

表 3 24 个品系 30 个微卫星位点等位基因 STR 扫描结果

Tab.3 The results of STR scanning of 30 microsatellite loci for the 24 inbred strains

品系 Strains	D9Mit21	D3Mit29	DXMit16	D10Mit12	D6Mit102	D1Mit365	D11Mit4	D13Mit3	D15Mit5	D9Mit23
NCPC/2	AA	CC	BB	BB	II	CC	AA	AA	BB	DD
db/db	AA	BB	AA	BB	DD	CC	CC	HH	CC	CC
615	AA	CC	AA	CC	II	CC	DD	HH	BB	DD
NOD/LtJ	BB	BB	AA	BB	CC	AA	CC	BB	BB	EE
CBA/J	BB	CC	BB	CC	II	CC	AA	BB	BB	AA
SAMP8	AA	CC	BB	AA(2AC)	GG(FF)	CC	BB	GG	BB	BB
DBA/1-北京 3	BB(AA)	BB	AA(CC)	BB	CC(BB)	AA(BB)	CC(AA)	BB(DD)	BB	EE(BB)
DBA/1-北京 4	BB	BB	AA	BB	CC	AA	CC	BB	BB	EE
129-北京 3	BB	CC	AA	BB	AA	CC	AA	/	AA	EE
129-北京 4	BB	CC	AA	BB	AA	CC	AA	/	AA	EE
TA1	BB	BB	CC	BB	BB	BB	EE	GG	BB	CC
TA2	AA(BB)	BB	CC(AA)	BB	BB(CC)	BB(AA)	AA(CC)	DD(BB)	BB	BB(EE)
NOD-SCID	BB	DD	BB	CC	HH(II)	AA	DD	EE	BB	DD
MRL/LPR	AA	CC	BB	BB	EE	CC	EE	AA	CC	DD
C3H/HeJ	AA	CC	BB	CC	II	CC	EE	AA	BB	DD
BALB/c-NU	AA	AA	BB	BB	GG	AA	EE	CC(2BC)	CC	DD
BALB/c	AA	AA	BB	BB	GG	AA	EE	BB	CC	DD
SCID	AA	AA	BB	BB	GG	AA	EE	CC	CC	DD
C57BL/6J	AA	CC	AA	BB	DD	CC	DD	FF	CC	CC
DBA/2	BB	BB	AA	BB	BB	AA	CC	AA	BB	DD
SCID-BG	AA	AA	BB	BB	GG	AA	EE	CC	CC	DD
FVB	BB	CC	BB	CC	AA	CC	DD	DD	BB	BB
A2A-2-B6	AA	CC	AA	BB	DD	CC	DD	HH	CC	CC
EGFP-B6	AA	CC	AA	BB	DD	CC	DD	GG	CC	CC
EYFP-B6	AA	CC	AA	BB	DD	CC	DD	HH(FF)	CC	CC
C 系-FVB	BB	CC	BB	CC	AA	CC	DD	DD	BB	BB
动物内出现多态的品系数目 Numbers of polymorphic strains	2	0	2	1	4	2	2	4	0	2

品系 Strains	D2Mit15	D4Mit235	D8Mit33	D12Nds11	D12Mit7	D14Mit3	D6Mit8	D7Mit281	D6Mit15	D19Mit16
NCPC/2	CC	BB	AA	BB	AA	BB	AA	CC	AA	AA
db/db	EE	BB	AA	AA	CC	BB	FF	CC	CC	CC
615	EE	BB	BB	CC	AA	BB	BB	DD	EE	AA
NOD/LtJ	EE	BB	CC	AA	BB	BB	FF	CC	CC	CC
CBA/J	DD	BB	CC	AA	CC	BB	FF	CC	CC	CC
SAMP8	BB	BB	AA	AA	AA	BB	DD	CC	AA	BB
DBA/1-北京 3	EE(DD)	BB	CC(BB)	AA	BB(CC)	BB	FF(CC)	CC(DD)	CC(EE)	CC(AA)
DBA/1-北京 4	EE	BB	CC	AA	BB	BB	FF	CC	CC	CC
129-北京 3	EE	BB	BB	AA	AA	AB	CC	CC	DD	CC
129-北京 4	EE	BB	BB	AA	AA	AB	CC	CC	DD	CC
TA1	DD	BB	CC	BB	CC	AB	DD	CC	BB	DD
TA2	DD(EE)	BB	BB(CC)	BB	CC(BB)	BB	CC(FF)	DD(CC)	EE(CC)	AA(CC)
NOD-SCID	EE	BB	CC	AA	AA	BB	BB	CC	EE	AA

MRL/LPR	DD	BB	BB	BB	AA	BB	DD	CC	AA	BB
C3H/HeJ	DD	BB	CC	AA	CC	BB	FF	CC	CC	CC
BALB/c-NU	EE	BB	BB	AA	AA	BB	AA	CC	DD	AA
BALB/c	EE	BB	BB	AA	AA	BB	AA	CC	DD	AA
SCID	EE	BB	BB	AA	CC	BB	AA	CC	DD	AA
C57BL/6J	EE	AA	AA	CC	CC	BB	EE	AA(DD)	AA	AA
DBA/2	EE	BB	CC	AA	BB	BB	FF	CC	CC	CC
SCID-BG	EE	BB	BB	AA	CC	BB	AA	CC	DD	AA
FVB	AA	BB	AA	AA	CC	BB	BB	BC(2CC)	EE	BB
A2A-2-B6	EE	AA	AA	CC	CC	BB	FF	DD	AA	AA
EGFP-B6	EE	AA	AA	CC	CC	BB	FF	DD	AA	AA
EYFP-B6	EE	AA	AA	CC	CC	BB	FF	DD	AA	AA
C 系-FVB	AA	BB	AA	AA	CC	BB	BB	CC(3BC)	EE	BB
动物内出现多态的品系数目 Numbers of polymorphic strains	2	0	2	0	2	0	3	5	2	2

品系 Strains	D5Mit48	D17Nds3	D19Mit3	D16Mit9	D7Mit12	D18Mit19	D8Mit14	D15Mit15	D17Mit11	D18Mit9	位点多态数目 Numbers of polymorphic loci
NCPC/2	EE	FF	BB	BB	BB	BB	CC	CC	BB	DD	0
db/db	CC	GG	DD	DD	CC	DD	BB	AA	FF	AA	0
615	CC	AA	DD	BB	EE	DD	AA	AA	BB	BB	0
NOD/LtJ	CC	JJ	DD	DD	DD	BB	BB	DD	DD	DD	0
CBA/J	BB	CC	DD	DD	BB	BB	BB	AA	BB	DD	0
SAMP8	CC	DD	CC	BB	CC	EE	BB	DD	BB	AA	2
DBA/1-北京 3	CC(DD)	JJ(EE)	DD	DD	CC(AA)	BB(DD)	BB	DD	DD(FF)	DD	19
DBA/1-北京 4	CC	JJ	DD	DD	CC	BB	BB	DD	DD	DD	0
129-北京 3	GG	EE	BB	DD	EE	EE	AA	AA	CC	CC	0
129-北京 4	GG	EE	BB	DD	EE	EE	AA	AA	CC	CC	0
TA1	DD	FF	AA	DD	EE	DD	CC	EE	FF	AA	0
TA2	DD(CC)	EE(JJ)	DD	DD	AA(CC)	DD(BB)	BB	DD	FF(DD)	DD	19
NOD-SCID	HH	FF	DD	DD	EE	DD	CC	DD	AA	DD	1
MRL/LPR	AA	AA	DD	DD	BB	EE	CC	DD	BB	DD	0
C3H/HeJ	CC	BB	DD	CC	EE	AA	CC	AA	BB	DD	0
BALB/c-NU	DD	HH	DD	DD	EE	AC(AA+CC)	AA	AA	EE	DD	2
BALB/c	EE	HH	DD	DD	EE	CC	AA	AA	FF	DD	0
SCID	FF	II	DD	DD	EE	AA	AA	AA	FF	DD	0
C57BL/6J	CC	EE	DD	AA	EE	DD	BB	AA	BB	AA	1
DBA/2	CC	HH	DD	DD	CC	AA	BB	DD	FF	DD	0
SCID-BG	DD	II	DD	DD	EE	AA	AA	AA	FF	DD	0
FVB	DD	JJ	DD	DD	EE	BB	CC	DD	AA	AA	1
A2A-2-B6	CC	EE	DD	AA	EE	DD	BB	BB	BB	AA	0
EGFP-B6	BB	EE	DD	AA	EE	DD	BB	AA	BB	AA	0
EYFP-B6	CC	EE	DD	AA	EE	DD	BB	AA	BB	AA	1
C 系-FVB	DD	JJ	DD	DD	EE	BB	CC	EE	AA	AA	1
动物内出现多态的品系数目 Numbers of polymorphic strains	2	2	0	0	2	3	0	0	2	0	

注: AA(CC)表示多态位点,括号内为多态等位基因型;基因型前面的数字表示多态样品数目,没有数字表示只有一个多态样品。

Note. AA(CC) means the polymorphic loci and the letters between the brackets represent the polymorphic alleles. The number before allele represents the times that polymorphic loci occurs. No number after allele means only one sample is polymorphic.

3 讨论

目前使用微卫星位点对小鼠遗传检测的研究较多,张树辉等^[11]用 42 个位点对 9 种近交系小鼠 DNA 的多态性进行了研究,谢建云等^[12]用 24 个位

点检测 14 个品系近交系小鼠,王洪等^[5]用 20 个位点检测 11 种近交系小鼠,结果都证实了分子遗传标记比生物化学法更准确、可靠,可用于常规检测近交系小鼠遗传质量^[13]。与已有研究相比,本实验所选的微卫星位点数和检测的近交系品系数均比

较多,而且本研究用的 30 个微卫星位点,分布在小鼠的 1~20 号染色体上,在本实验中对近交系小鼠进行检测的结果说明,能够较好的反映近交系小鼠的遗传特性。在这 30 个微卫星基因位点上,共检测到 135 条条带,即 135 个等位基因型,比用封闭群检测得到的等位基因型数量少^[9],但是等位基因片段的范围有所扩大,如在 D6Mit102 位点由 131~177 扩大到 123~173 片段大小。

从理论上讲,品系间多态性越好的位点越适合进行品系鉴定,从表 3 的结果也可以看出,用这 30 个位点可以对 24 个品系进行区分,如用 D6Mit102 位点就可以将 FVB、TA1、NOD/LtJ、C57BL/6J、MRL/LPR、SAMP8、BALB/c、NOD-SCID、C3H/HeJ 等 9 种品系从分子水平进行鉴定,因为这些品系在该位点具有特有的基因型。用具有 10 个等位基因型的 D17Nds3 位点也可以对多个品系进行鉴定。即使对基因修饰动物与背景动物也可以用这微卫星进行鉴别,例如以 3 个基因修饰近交品系 A2A-2-B6、EGFP-B6、EYFP-B6 在 D13Mit3 和 D6Mit8 这两个位点的基因型和背景品系 C57BL/6J 不同,由此将它们和背景动物区分开来。

从位点特性分析的结果显示,有一些位点是容易发生突变或呈现多态性的,有 20 个位点在至少 1 个品系的动物间出现了多态性,最高的为 D7Mit281 位点,在 5 个品系动物间均出现了多态性的特征,分别是 FVB、C 系-FVB、TA2、DBA/1(北京 3)、C57BL/6J。其次是 D6Mit102 和 D13Mit3 位点分别在 4 个品系的动物间出现了多态性的特征,D6Mit9 和 D18Mit19 两个位点分别在 3 个品系的动物间出现了多态性的特征,这些位点在用微卫星进行近交系遗传质量检测时要引起注意和适当选择。

本研究所用 30 个微卫星位点是本团队进行封闭群小鼠群体遗传分析时筛选到的位点^[9],从表 3 中可以看出,在 24 个所检测的品系(来源于 26 个群体)中,大多数品系内的 6 只动物间都保持了单一基因型的特征,但是有几个品系在品系内有两个基因型,出现同一品系内部存在多态性的结果,表明该品系在保种育种过程中可能出现基因污染,或传代过程中可能发生变异。如 TA2 和 DBA/1(北京 3)在多个位点上是多态的,且这两个品系中都是同一只动物出现多态的等位基因型,表明这品系内的这只动物可能发生了遗传突变或基因污染。因此,在筛选微卫星位点进行小鼠遗传检测时,要综合考虑近交系动物本身的特征来进行选择。在以 B6 为背景的突变系中,A2A-2-B6 品系在 D10Mit12、

D15Mit15 两个位点与背景不同,EGFP-B6 品系在 D10Mit12、D13Mit3、D5Mit48 这 3 个位点与背景不同,而 EYFP-B6 品系在 D10Mit12 位点与背景不同,在 D13Mit3 位点出现 6 个样品中有一个与背景不同。表明这些突变系可能与背景存在微卫星多态性差异。在以 FVB 为背景的突变系小鼠中,C 系-FVB 品系在 D7Mit281 和 D15Mit15 两个位点中也出现多态性。这些位点既可以参考作为基因修饰动物与背景动物的鉴别,也说明这几个位点可能在制备基因修饰动物的过程中可能发生变异的概率较大,不易维持原有等位基因。而在不同单位来源的同一品系可能由于亚系出现而产生差异,如来自北京 3 和北京 4 两个单位的 DBA/1 出现多态性,可能就是长期分开繁殖而产生了差异。

综上所述,本研究所选取的 30 个位点可参考用于国内常用和基因修饰近交系小鼠的遗传检测,对其遗传质量进行适当的评价,也可针对多个品系进行品系检测鉴定。

参考文献:

- [1] 刘先菊,王艳荣.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.
- [2] 蔡武卫.实验动物的遗传质量控制及其意义[J].海峡预防医学杂志,1997,3(3):68-69.
- [3] 杨卫红,王纯耀.近交系小鼠微卫星位点的多态性观察[J].郑州大学学报(医学版),2007,42(1):84-86.
- [4] 储明星,王吉振,工爱国,等.小尾寒羊五个微卫星基因座遗传多态性研究[J].遗传学报,2002,29(6):502-505.
- [5] 王洪,岳秉飞,刘双环,等.小鼠 11 个品系 20 个微卫星基因位点的遗传分析[J].中国比较医学杂志,2006,16(3):135-138.
- [6] 陈振文,欧阳兆和.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.
- [7] 欧阳兆和,陈振文.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.
- [8] 吴宝金,茅慧华,朱红,等.小鼠 39 个微卫星的 PCR 条件及其运用[J].中国实验动物学报,2003,11(4):216-220.
- [9] 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.
- [10] 刘洋,姜丽华,汪运山.微卫星 DNA 的测定方法[J].中国误诊学杂志,2003,3(7):994-995.
- [11] 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.
- [12] 谢建云,邵伟娟,胡建华,等.微卫星技术对近交系小鼠遗传质量的分析[J].中国比较医学杂志,2007,17(9):511-515.
- [13] 韩喜彬,苏玉虹.辽宁省 6 种常用近交系小鼠 10 个微卫星位点的遗传质量检测报告[J].中国比较医学杂志,2011,21(5):22-25.