



应用微卫星和下颌骨形态分析法对不同昆明小鼠种群进行遗传分析

韩喜彬¹, 王立辛², 苏玉虹², 巴彩凤¹

(1. 辽宁医学院实验动物中心, 锦州 121001; 2. 辽宁医学院畜牧兽医学院, 锦州 121001)

【摘要】 目的 为丰富昆明小鼠的遗传学数据, 探究其遗传监测方法, 应用微卫星和下颌骨形态分析法对不同昆明小鼠种群进行遗传分析。**方法** 从辽宁省两个种群选择 SPF 级昆明小鼠各 30 只, 选取小鼠不同染色体上 10 个多态信息丰富的微卫星位点, 以 PCR 扩增和 PAGE 电泳分型技术测定两个种群的杂合度 (h_e)、多态信息含量 (PIC)、遗传距离 (D_A) 等遗传参数; 常规方法测定下颌骨 11 项形态变异参数。**结果** 两个昆明小鼠种群共检测出 28 个等位基因, 31 个基因型, h_e 为 0.472, PIC 为 0.382; A 种群共检出 27 个等位基因, 28 个基因型, h_e 为 0.525, PIC 为 0.402, B 种群共检出 26 个等位基因, 27 个基因型, h_e 为 0.418, PIC 为 0.361, 两个种群遗传距离为 0.076, A 种群的遗传多样性略高于 B 种群。两个种群下颌骨形态存在差别, 有 5 项参数达到差异显著或极显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 两个昆明小鼠种群的遗传距离相近, 存在微弱的遗传分化。

【关键词】 昆明小鼠; 微卫星; 遗传分析; 遗传距离; 遗传分化; 下颌骨形态

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 04-0038-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.004.009

Genetic analysis of different populations of Kunming mice by microsatellite markers and mandible morphology

HAN Xi-bin¹, WANG Li-xin², SU Yu-hong², BA Cai-feng¹

(1. Experimental Animal Center, 2. Husbandry and Veterinary College,
Liaoning Medical University, Jinzhou Liaoning 121001, China)

【Abstract】 Objective To study the genetic features of different populations of Kunming mice in order to enrich their genetic data and explore the method for genetic quality control. **Methods** SPF KM mice from two populations of Liaoning province (30 mice in each group, male:female = 1:1) were used in this study. Ten microsatellite loci on different chromosomes with rich polymorphism information were chosen, and the heterozygosity (h_e), polymorphism information content (PIC) and genetic distance (D_A) were analyzed by PCR amplification and PAGE electrophoresis. Eleven morphological parameters of the mandible were determined. **Results** Twenty-eight alleles and 31 genotypes were found in the two mouse populations, with a h_e of 0.472 and PIC of 0.382. Twenty-seven alleles and 28 genotypes were found in the population A, with a h_e of 0.525 and PIC of 0.402. Twenty-six alleles and 27 genotypes were found in the population B, with a h_e of 0.418 and PIC of 0.361. D_A between the two populations was 0.076. The genetic diversity of group A was slightly higher than that of the group B. There were some differences in the mandibular morphology between the two

【基金项目】 辽宁省科技厅 2013 年自然科学基金项目: 封闭群实验动物遗传监测方法的建立 (项目编号: 2013022033); 辽宁省科技厅 2011 年计划项目: 重大疾病实验动物模型制备级动物实验研究 (项目编号: 2011408004)。

【作者简介】 韩喜彬 (1979 -), 男, 讲师, 硕士学位, 从事实验动物学相关教学和科研工作, Email: hanxibin007@126.com。

【通讯作者】 巴彩凤 (1951 -), 女, 教授, 博士学位, 硕士生导师, 研究方向: 实验动物学、人体寄生虫学, E-mail: bacai Feng@163.com。

populations, among them, 5 parameters had significant differences ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The genetic distance of the two Kunming mouse populations is approximate, with a weak genetic differentiation between the two populations.

【Key words】 Kunming mice; Microsatellite; Genetic analysis; Genetic distance; Genetic differentiation; Mandible morphology

昆明(KM)小鼠中国应用广泛的封闭群实验小鼠,在科研、教学和检定实验中被大量使用,经过多年繁育不同单位的种群携带着或多或少改变的基因位点,这种变化位点的累计最终会导致具体的性状改变,使实验数据的重复性大大降低,所以急需对 KM 小鼠乃至所有封闭群动物建立遗传学标准,通过遗传监测使其保持遗传稳定性^[1]。国内实验动物学界已经意识到昆明小鼠的遗传质量问题,较早的报道证明了不同来源的 KM 小鼠在体型特征、血液指标和实验反应特性等方面存在差别^[2-4];而近年以 STR 分析 KM 小鼠遗传特征的报道较多,研究结果发现不同种群之间存在中等或较大程度的遗传背景差异^[5-7]。遗传控制的关键在于遗传的稳定性,即群体基因的数量和基因型频率始终保持不变,从而贮藏现存的遗传杂合性,从这一角度考量基因水平的监测必不可少,另外,动物实验是针对个体表型的测量和观察,遗传控制的结果是表型稳定,所以必须测量宏观指标。本研究选择微卫星法和下颌骨形态法对 KM 小鼠进行遗传分析,将遗传的内因、外因相结合,以期对封闭群动物的遗传学标准建立提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

昆明小鼠 60 只, (20 ± 1) g, 雌雄各半, SPF 级。30 只购自中国医科大学实验动物部 8 周龄昆明小鼠(SCXK(辽)2008-0005, 简称 A 种群); 30 只购自大连医科大学实验动物中心(SCXK(辽)2008-0002, 简称 B 种群)。两个昆明小鼠种群都引种自北京国家啮齿类实验动物种子中心, 封闭时间 8 年以上。实验完成于辽宁医学院实验动物中心(SYXK(辽)2008-0004)。

1.2 实验方法

1.2.1 下颌骨形态分析: 下颌骨测量位点参照 Festing^[8]建立的方法, 共利用 11 个变异函数, 1~6 为高度测量点, 7~11 为长度测量点, 均为右侧下颌骨(支); 标本制作过程为煮沸 3 min, 胰酶 37℃ 消化 24 h, 清水洗净, 拔掉门齿, 以黑色背景扫描成图像,

再以 Photoshop 8.0 分析图像获得数据(图 1)。



(1~6 为高度变量, 7~11 为长度变量)

图 1 下颌骨形态分析图

1~6; height variables; 7~11; length variables.

Fig. 1 Morphological analysis of the mouse mandible.

1.2.2 微卫星检测: 常规酚氯法提取基因组 DNA, 参考小鼠基因组数据库 (<http://www.informatics.jax.org>) 及本实验室之前的研究结果^[9], 选取 10 个分布在不同染色体的微卫星位点, 每个位点多态信息丰富, 引物序列见表 1。优化 PCR 反应体系, PCR 产物进行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, AgNO₃ 染色, 根据泳动距离进行结果判读, 泳动距离最长的带设为英文字母 a, 依次为 b、c 等, 泳动距离一致的为单态性(单一条带), 若有差异即为多态性(多个条带)。所用试剂均购自大连宝生物公司。平均杂合度(h_e)、平均多态信息含量(PIC)和遗传距离(D_A)分析分别按 Nei(1974)、Bosein(1980)和 Nei(1983)计算(如下)。

1.2.2.1 平均杂合度、多态信息含量

$$h_e = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i p_j^2$$

式中 n 为特定基因位点上的等位基因数, P_i 、 P_j 分别等于等位基因的频率, h_e 为杂合度。

1.2.2.2 遗传距离

$$D_A = 1 - \frac{1}{r} \sum_{j=1}^r \sum_{i=1}^{m_j} \sqrt{x_{ij} y_{ij}}$$

式中:

X_{ij} — X 群体中第 j 个座位上第 i 个等位基因的
频率;

Y_{ij} — Y 群体中第 j 个座位上第 i 个等位基因的

表 1 微卫星位点引物序列及反应条件
Tab.1 Sequences of primers of the microsatellite loci and reaction conditions

微卫星位点 Microsatellites	引物序列 Sequences of primers (5' - 3')		退火温度 Annealing temperature	Mg ²⁺
	上游引物 Upstream	下游引物 Downstream		
2NDS3	CCAAGCTTCCTTGTGCAAGTA	AAGCCCCAAGTCCATCAGTGG	55	1.5
D4Mit54	CTGCCATCCTGTAGTTTCACTG	ACCCCCACATATGTCTCCCT	55	1.2
D6 Mit 8	TGCACAGCAGCTCATTTCTCT	GGAAGGAAGGAGTGGGGTAG	55	1.5
D8 Mit 113	GGTCACATAATAAGAAAGCCCG	AACCCGTTAGGAGGACCG	57	1.5
D10 Mit 15	ATGCGTACAGGCAAAACACC	GCTACATTGGTCTGTGACGC	55	1.2
D11 Mit 4	CAGTGGGTCATCAGTACAGCA	AAGCCAGCCCCAGTCTTCATA	55	1.5
D12Mit136	TTTAATTTTGAGTGGGTTTGG	TTGCTACATGTACACTGATCTCCA	57	1.5
D13 Mit 13	CTGTGGTAAGTCCAGATTTG	GGAAAGAGTAGGAAGATGCC	55	1.5
D14NDS1	TGCTGGCTAGGAATAAACAGA	AGGGAATTCATGTTTCAGGATA	55	1.5
D17NDS3	TTCTGTGGCGGCCTTATCAG	AGACAATGGGTAACAGAGGCA	55	1.5

频率;

m_j —第 j 个座位上的等位基因数;

r — 检测的座位数。

1.2.3 数据处理:采用 SPASS 13.0 统计软件处理数据。

2 结果

2.1 下颌骨形态分析结果

下颌骨变量测量结果见表 2、图 2。两单位 KM 小鼠种群 11 项参数中有 5 个参数差别明显,B 种群 2 项高度参数 X_4 、 X_5 ,2 项长度参数 X_9 、 X_{10} 都大于 A 种群,差异极显著 ($P < 0.01$),A 种群只有高度参数 X_6 大于 B 种群,达到差异显著 ($P < 0.05$),说明两个种群小鼠的下颌骨形态存在一定差别。

表 2 KM 小鼠下颌骨参数测量结果
Tab.2 Measurements of the mouse mandible parameters

变量 Variables	A 种群 Population A	B 种群 Population B	P
X_1	0.76 ± 0.04	0.78 ± 0.05	
X_2	1.99 ± 0.11	1.98 ± 0.13	
X_3	2.78 ± 0.08	2.76 ± 0.09	
X_4	4.79 ± 0.18	5.89 ± 0.21	**
X_5	5.14 ± 0.25	5.87 ± 0.27	* *
X_6	6.28 ± 0.21	6.01 ± 0.17	*
X_7	8.78 ± 0.22	8.73 ± 0.28	
X_8	9.30 ± 0.28	9.32 ± 0.27	
X_9	10.11 ± 0.24	11.30 ± 0.20	**
X_{10}	11.24 ± 0.30	11.88 ± 0.23	* *
X_{11}	12.44 ± 0.25	12.46 ± 0.20	

注: ** 表示 $P < 0.01$, 差异极显著; * 表示 $P < 0.05$, 差异显著。
Note: * indicates $P < 0.01$, ** indicate $P < 0.05$. The variables $X_1 - X_{11}$: see Fig 1.

2.2 微卫星检测结果

10 个微卫星位点检测结果见表 3、图 3。两家单位共检测出 28 个等位基因、31 个基因型,最多等位基因数 4 个,最少 1 个,平均杂合度 (h_e) 0.472,平均多



图 2 KM 小鼠下颌骨扫描图像
Fig.2 Scanning images of the mouse mandibles

态信息含量 (PIC) 0.382。A 种群 KM 小鼠共检出 27 个等位基因、28 个基因型、平均杂合度 0.525、平均多态信息含量 0.402;B 种群 KM 小鼠共检出 26 个等位基因、27 个基因型、平均杂合度 0.418、平均多态信息含量 0.361。两个种群在 D2NDS3 等 5 个位点基因型分布不同,A 种群的遗传多样性略高于 B 种群,两个种群遗传距离为 0.076。

3 讨论

在 KM 小鼠等封闭群动物的繁育过程中,遗传污染、基因突变和选择压都能造成遗传差异,这种差异体现在异地种群间,也体现在同一种群相隔较远的代次间,遗传监测的价值在于及时、尽早地发现这些变化,在这些变化固定下来之前对种群进行调整,避免基因分布的改变。本研究以微卫星法和下颌骨分析法获得了两个单位 KM 小鼠的遗传学数据,两个种群的个别位点和形态参数差别明显,说明两个种群的分化是存在的,根据此结果无法说明种群合格与否,因为至今没有形成 KM 小鼠封闭群的定性或定量标准,检测结果只能说明其遗传特征。在国内的相关报道中,能够对封闭群动物的遗传学指标做出明确说明的不多,其中吴艳花等、李薇等以微卫星技术对国内遗传背景明确的几个小型猪、长爪沙鼠的种群遗传特征进行了分析,

表 3 KM 小鼠 10 个微卫星位点检测结果
Tab.3 Measurements of 10 microsatellite loci in the Kunming mice

基因座 Gene loci	A 种群 Population A				B 种群 Population B			
	基因型/数量/频率 Genotype/number/ frequency	等位基因频率 Allele frequency	h_e	PIC	基因型/数量/频率 Genotype/number/ frequency	等位基因频率 Allele frequency	h_e	PIC
D2NDS3	aa/6/0.200	a/0.250	0.645	0.452	aa/25/0.833	a/0.917	0.152	0.141
	ab/11/0.367	b/0.450			ab/5/0.167	b/0.083		
	bc/10/0.333	c/0.300						
	bb/3/0.100							
D4Mit54	aa/13/0.433	a/0.717	0.406	0.323	aa/18/0.600	a/0.800	0.32	0.269
	ab/17/0.567	b/0.283			ab/12/0.400	b/0.200		
D6 Mit 8	ab/30/1.0	a/0.500	0.5	0.375	aa/5/0.167	a/0.583	0.486	0.368
		b/0.500			ab/25/0.833	b/0.417		
D8 Mit 113	aa/11/0.367	a/0.617	0.514	0.434	aa/7/0.233	a/0.467	0.613	0.532
	ab/15/0.500	b/0.317			ab/14/0.467	b/0.383		
	bc/4/0.133	c/0.066			bc/9/0.300	c/0.150		
D10 Mit 15	aa/9/0.300	a/0.650	0.491	0.351	aa/2/0.067	a/0.533	0.498	0.374
	ab/21/0.700	b/0.350			ab/28/0.933	b/0.467		
D11 Mit 4	aa/13/0.433	a/0.683	0.491	0.463	aa/11/0.367	a/0.683	0.460	0.391
	ab/8/0.267	b/0.167			ab/16/0.533	b/0.267		
	ac/7/0.233	c/0.117			ac/3/0.100	c/0.050		
	bd/2/0.067	d/0.033						
D12Mit136	aa/3/0.100	a/0.300	0.706	0.674	aa/1/0.033	a/0.250	0.743	0.710
	ad/5/0.167	b/0.250			ad/11/0.367	b/0.267		
	ac/7/0.233	c/0.367			bc/16/0.533	c/0.300		
	bc/15/0.500	d/0.083			ac/2/0.067	d/0.183		
D13 Mit 13	aa/17/0.567	a/0.783	0.706	0.282	aa/17/0.567	a/0.783	0.362	0.332
	ab/8/0.267	b/0.217			ab/8/0.267	b/0.133		
					ac/5/0.166	c/0.083		
D14NDS1	aa/18/0.600	a/0.800	0.34	0.314	aa/20/0.667	a/0.800	0.335	0.303
	ab/6/0.200	b/0.100			bb/2/0.067	b/0.150		
	ac/6/0.200	c/0.100			ab/5/0.166	c/0.050		
					ac/3/0.100			
D17NDS3	aa/16/0.534	a/0.650	0.455	0.351	aa/23/0.767	a/0.883	0.207	0.185
	ab/7/0.233	b/0.350			ab/7/0.233	b/0.117		
	bb/7/0.233							

注:泳动距离最大者记为“a”,依次为“b”、“c”和“d”。



1:ab;2:aa;3:ac;4:ac;5:ac;6:ab

图 3 D12Mit136 电泳图

Fig.3 Electrophoresis of the D12Mit136

并以群体平均杂合度或平衡状态做为群体合格与否的指标^[10,11]。其他以微卫星技术检测实验大鼠或小鼠遗传结构的报道并不罕见,检测结果不但能说明群体遗传概貌,也能区分一些品系^[12,13];以遗传监测为目的的下颌骨形态学检测方面的报道很少,陈哲等通过对 3 种白化小鼠下颌骨变量的研究,探讨了其在品系鉴别中的应用价值^[14],吴宿慧等探

讨了下颌骨测量技术在性别鉴定中的作用^[15],这些研究丰富了封闭群实验动物的遗传学数据,虽然未能建立标准,也具备一定参考价值。

现今世界范围内被承认的通用标准封闭群有美国 Charles River Laboratories CD-1 种群(ICR 小鼠和 SD 大鼠)以及日本 CLEA 的 Wistar 大鼠种群,两个机构基础群的建立方法相同,都取自遗传背景明确的多个种群,力求建立该品系完整基因库,再选择恰当的监测方法,在长期的繁育过程中确定具体的监测指标和操作规程,并以此方法指导选种、留种和迁移等。KM 小鼠在我国分布广泛,各地种群遗传差异大,分化明显,更为重要的是遗传背景不明确,所以,目前各个单位有必要对各自种群进行连续的监测,完善基础数据,为 KM 小鼠遗传学监测

标准的建立打下基础,让这个具有中国特色的品系稳定延续,并可促进我国实验动物标准化事业的发展。

4 结论

两个 KM 小鼠种群存在基因结构和表型特征的差异,群间轻度遗传分化。

参考文献:

- [1] 朱玉峰,王元占,杨培梁,等. 封闭群大小鼠国际遗传标准化 [C]. 第五届中南地区实验动物科技交流年会, 2005.
- [2] 张周,徐永平,夏春梅. 不同来源 KM 小鼠在药物抑瘤作用重复实验中的结果差异原因初探 [J]. 上海实验动物科学, 2000, 20(4):240-241.
- [3] 李洪涛,杜春燕,章金涛,等. 两个昆明小鼠封闭群部分生物学特性的比较[J]. 河南医科大学学报, 2000, 35(4):318-319.
- [4] 赵国际,陈国强,朱冬琴,等. 中国 6 个 KM 小鼠群体外形形态特征调查 [J]. 上海实验动物科学, 2001, 21(4):239-240.
- [5] 班建荣,胡芹宝,张新创. 两个封闭群 SPF 级昆明小鼠遗传背景调查[J]. 微生物学免疫学进展, 2013, 41(5):6-9.
- [6] 商海涛,魏泓,岳秉飞,等. 应用微卫星标记对三个昆明小鼠封闭群的遗传学研究[J]. 实验动物科学, 2009, 26(2):1-6.
- [7] 张建琴,申士小,任连生,等. 微卫星座位对 KM 封闭群小鼠的遗传分析[J]. 四川动物, 2008, 27(5):791-793.
- [8] Festing M, Staats J. Standardized nomenclature for inbred strains of rats. Fourth listing [J]. Transplantation, 1973, 16:221-245.
- [9] 王立辛,韩喜彬,苏玉虹. KM 小鼠和 ICR 小鼠遗传特征分析[J]. 安徽农业科学, 2012, 28(35):19-24.
- [10] 吴艳花,徐玲玲,杜小燕,等. 封闭群实验用小型猪遗传标准的建立[J]. 实验动物科学, 2010, 27(6):33-35.
- [11] 李薇,江其辉,杜小燕,等. 封闭群长爪沙鼠遗传标准的建立[J]. 实验动物科学, 2010, 28(2):31-34.
- [12] 谢建云,冯洁,胡建华. 微卫星标记在近交系及封闭群小鼠遗传质量检测中的初步应用[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2008, 26(4):290-295.
- [13] 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, 3(16):136-137.
- [14] 陈哲,赵琳,陈晓,等. KM、BALB/c 和 ICR 小鼠下颌骨形态变量的初步探讨[J]. 上海实验动物科学, 2004, 24(4):221-224.
- [15] 吴宿进,赵晓进,胡春红,等. KM、ICR、BALB/c 小鼠下颌骨形态变量性差分析[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2005, 33(4):126-128.

[修回日期]2014-02-25