

王洪,魏杰,冯育芳,等. 实验小鼠、大鼠微卫星 DNA 检测法标准的编制 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(9): 97-102.
Wang H, Wei J, Feng YF, et al. Establishment of a standard method for detecting microsatellite markers of laboratory mice and rats [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(9): 97-102.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.09.015

实验小鼠、大鼠微卫星 DNA 检测法标准的编制

王洪[#], 魏杰[#], 冯育芳, 付瑞, 王淑菁, 岳秉飞^{*}

(中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

【摘要】 实验动物的遗传质量直接影响生物医药研究结果的可信性,遗传质量控制手段的多样性直接决定实验动物的遗传质量水平。本标准制定的目的是为实验小鼠和实验大鼠的遗传质量控制提供 DNA 检测方法,弥补现行方法的局限性,填补我国在该领域的空白,推动我国实验动物遗传质量检测水平的提高。

【关键词】 实验小鼠;实验大鼠;微卫星;DNA;标准

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 09-0097-06

Establishment of a standard method for detecting microsatellite markers of laboratory mice and rats

WANG Hong[#], WEI Jie[#], FENG Yufang, FU Rui, WANG Shujing, YUE Bingfei^{*}

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

【Abstract】 The genetic quality of laboratory animals directly influences the credibility of biomedical research results. The diversity of the genetic quality control methods directly affect the level of genetic quality assessment. The purpose of this study was to provide a monitoring method for genetic quality control of laboratory mice and rats that will overcome the limitations of the current method and the gap in the field. This method will improve the genetic quality monitoring level of laboratory animals in China.

【Keywords】 laboratory mice; laboratory rats; microsatellite; DNA; standard

实验动物遗传质量是决定科研数据可重复性的关键因素,我国目前急需在该领域建立分子生物学方法,实现对实验动物遗传质量的有效控制。结合实际工作需求,中国实验动物学会提出了小鼠、大鼠微卫星 DNA 标记检测方法团体标准的研究和建立,由中国食品药品检定研究院、首都医科大学和浙江省医学科学院共同完成。本文重点介绍了该标准编制的背景和标准内容,旨在强化该团体标准的宣传和实施,促进我国实验动物遗传质量标准

化建设,为实验动物遗传质量国家标准的修订提供依据。

1 编制背景

实验动物遗传质量控制是实验动物质量控制中的关键环节。生物医学研究中必须使用遗传背景明确,符合其品系遗传特征实验动物,才能获得可信的、可重复的科研数据。在我国,实验动物的遗传质量控制主要应用国家标准 GB/T 14927.1-

【基金项目】 国家重大专项(2017ZX10304402002006)艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治专项。

【作者简介】 王洪(1977—),女,研究员,主要研究方向:实验动物遗传质量控制。E-mail: littstar@163.com

魏杰(1982—),女,副研究员,主要研究方向:实验动物遗传质量控制。E-mail: jane3040320@163.com [#]共同第一作者

【通信作者】 岳秉飞(1960—),男,研究员,博士,主要研究方向:实验动物质量控制。E-mail: y6784@126.com

2008 中推荐的生化标记检测法,该方法自上世纪 90 年代投入使用,一直沿用至今,该方法在实验动物遗传质量控制方面发挥着至关重要的作用。在国际上,越来越多的实验室应用微卫星标记,SNP 标记等 DNA 标记方法进行实验动物的遗传质量检测。在美国,Jackson Lab 采用 SNP 方法(28 个位点)作为实验动物的遗传质量控制手段^[1]。我国国家标准 GB 14923-2010 哺乳类实验动物的遗传质量控制中也对封闭群实验动物的遗传质量监测提出明确规定,并推荐使用 DNA 标记方法。

目前,我国实验动物遗传质量控制方面急需解决的问题主要是:①现行的生化标记检测法存在一定的局限性:位点数量少,位点多态性低,位点未能实现全基因组覆盖,完成检测需要处死实验动物;②DNA 标记方法在我国实验动物遗传质量控制方面的应用尚属空白;③缺少 DNA 检测方法的标准。

微卫星 DNA 是动物基因组中的简单重复序列,该重复序列比小卫星 DNA 短,所以叫作微卫星 DNA(microsatellite DNA)。微卫星 DNA 的核心序列是以二个核苷酸为重复单位,AC 和 TG 最为多见,核心序列的重复次数是可变的,一般为 10 ~ 20 次左右,这就是微卫星 DNA 多态性的基础。不同个体因为核心序列重复次数的差异,而形成各自特有的遗传结构。微卫星 DNA 两端的侧翼序列是相对保守的单拷贝序列,可以根据两侧的特异序列合成引物。微卫星 DNA 标记可以应用于实验小鼠和实验大鼠进行遗传质量监测,同时开展遗传组成分析和品系鉴别。在国家标准 GB/T 14927.1-2008 近交系小鼠、大鼠生化标记检测法中,是生化标记方法的具体操作内容,目前国内缺乏 DNA 标记方法相应标准。本标准参考了我国、美国、日本等国家的微卫星 DNA 标记检测法^[2-7],本标准的编制可以作为国家标准 GB 14927.1-2008 的补充。

2 内容编制

2.1 微卫星位点的选择

微卫星方法和 SNP 方法均可用于实验小鼠和实验大鼠的遗传质量评价的常用的 DNA 标记方法。SNP 方法检测实验动物单核苷酸的差异,能够提供的动物的遗传背景信息不如微卫星方法丰富。微卫星方法的优点是:数量多,在基因组中均匀分布;具有丰富的多态性;操作简便,重复性好^[8]。本标准中的微卫星位点的选择参考国内外相关文献,切

合我国国内实际现状,并可持续完善。标准中选用的微卫星位点经过严格的筛选和优化。优化原则包括:①选择多态性丰富的位点,摒弃在多个品系间无多态性的位点;②选择覆盖实验小鼠和实验大鼠的全部染色体的微卫星位点,力求全面客观体现动物品系的遗传背景;③选择电泳条带清晰,界限明确,杂带少的位点,减少非特异性扩增对检测结果的影响。该标准中的微卫星检测法经过广东、浙江和北京的三家实验室对其重复性进行验证,结果表明三家实验室获得完全一致的检测结果,证明该方法具备可行性和良好的重复性。通过参加国际实验动物科学理事会(International Council for Laboratory Animal Science, ICLAS)开展的遗传标准品项目(Genetic Reference Program),应用 12 个品系近交系小鼠的 DNA 标准品完成对微卫星检测法的适用性研究。结果表明,该标准方法是国际通用的实验动物遗传质量评价方法。标准中采用 30 个小鼠微卫星位点用于近交系小鼠的遗传质量检测和封闭群小鼠的群体遗传结构分析,具体位点信息见表 1。标准中采用 6 个大鼠的微卫星位点用于近交系大鼠的遗传质量检测,采用 25 个大鼠的微卫星位点用于封闭群大鼠的群体遗传结构分析,具体位点信息见表 2 和表 3。

2.2 近交系小鼠和近交系大鼠遗传质量评价

近交系实验动物是指经过 20 代以上连续全同胞或亲子交配,近交系数达到 98.6% 以上的动物群体。近交系动物同一品系中不同个体的遗传背景完全相同,所有遗传标记都是纯合的。近交系小鼠的品系数量多,每一个品系拥有自身特有的遗传背景。当进行近交系小鼠的遗传质量检测时,应根据检测目的选取微卫星位点,如果仅用于区别少数近交系小鼠,可选择 10 个微卫星位点;如果待检测近交系品系数量多,可选择 20 个微卫星位点。原则上需选取覆盖小鼠 20 条染色体的 20 个微卫星位点。参见表 4 所示 7 个近交系小鼠品系的遗传背景。

近交系大鼠的品系数量较少,用表 2 中的 6 个微卫星标记,可以区分常见的 3 个品系的近交系大鼠。

结果判定:近交系小鼠和近交系大鼠同一品系的所有个体在所有微卫星位点均应表现为纯合,该品系即为遗传质量合格的实验动物。如果同一品系内出现杂合位点,该品系即为遗传质量不合格的实验动物。

表 1 实验小鼠 30 个微卫星位点的扩增条件和染色体分布

Table 1 Amplification conditions and chromosome distribution of 30 microsatellite loci in laboratory mice

位点 Locus	引物序列(5'→3') Primer sequences	染色体 Chromosome	镁离子浓度 (mmol/L) Mg ²⁺ concentration	退火温度 (℃) Annealing temperature
D1Mit365	ATCACCTGCAATAGTACCCCC TTAATCAGTCATCATAGGCTTTTCC	1	1.5	54
D2Mit15	ATGCCTTAGAAGAATTTGTTCCC CTTGAAAAACACATCAAAATCTGC	2	1.5	54
D3Mit29	GATGAGAGATTCTGATGTGGAGG CCAGCCTCAGTATCTCAAAACC	3	1.5	64
D4Mit235	AGGCCAAAGTTGGATTTCT GAGACTTGAAATGAAGCATTTAGG	4	1.5	55
D5Mit48	GACTATCATCCAAGCCAAGACC AAAAGACACTTTCCTGACATAGC	5	1.5	60
D6Mit102	CCATGTGGATATCTTCCCTTG GTATACCCAGTTGTAATCTTGTGTG	6	1.5	54
D6Mit8	TGCACAGCAGCTCATTTCTCT GGAAGGAAGGAGTGGGGTAG	6	1.5	60
D6Mit15	CACTGACCCTAGCACAGCAG TCCTGGCTTCCACAGTACT	6	1.5	60
D7Mit281	TTCTCTACCTCCTGAGCCA GCCACAAGGAAGACACCATT	7	1.5	60
D7Mit12	GCTGGGTTTATTTCATTGCAA TCCAGCTCATGGGTAGAAGA	7	1.5	58
D8Mit33	TTTGAGCAAAGGACTTGCCT TTATTCTGCCTCAACACCACC	8	1.5	60
D8Mit14	TTTTCACACTCACGTGTGCG GTCTCTCCTTCTCTGGCGCTG	8	1.5	63
D9Mit23	AAGAAGTTTCCATGACATCATGAA AGAAGAAAATTCTTGACAGCTCTG	9	1.5	65
D9Mit21	CAGTCCCTGGTTAATAACAACAAC TATAGTCCATTGTGGCAGAGGAGT	9	1.5	59
D10Mit12	ATGTCCAAAACACCAGCCAG GGAAGTGATGGAGCTCTGTT	10	1.5	54
D11Mit4	CAGTGGGTCA TCAGTACAGCA AAGCCAGCCAGCTTTCATA	11	1.5	54
D12Mit7	CCGGGGATCTAAAAC TACAT TCTAATCTCAGCCCAATGGT	12	1.5	60
D12Nds11	CATTGAGGACAGTCAGGATC GGAAC TT CATGCAGTACTAG	12	1.5	54
D13Mit3	TCAGGCTCATCCAGATACC TTTTGCAGAGAACACACACC	13	1.5	60
D14Mit3	GCAATTACACCTCCTCGGAG CACAAGGGCATATGGTACCC	14	1.5	54
D15Mit5	CTTCCTAATTCTGTCAAGCAAAT GTTTCATTGCTCAATGGAAACTTA	15	1.5	54
D15Mit15	AGCATACACTCTCTTGTTCCTGCT AATAAATACCAGAGAAGCACCGTG	15	1.5	60
D16Mit9	TCTTGCTCTGGTATCAACTACAGG CCTCCTTGCCAGCTAAAC	16	1.5	55
D17Mit11	TGAATTTATGAGGGGGGTCA TGTCCCATATCTCTCTTTATACACA	17	1.5	54
D17Nds3	TTCTGTGGCGGCCTTATCAG AGACAATGGGTAACAGAGGCA	17	1.5	58
D18Mit19	ATTGGGTGTT CAGGTGCAG ATGCACAATAGCTCATAGCTTCT	18	1.5	55
D18Mit9	AGAGGCATTGCACACACAAG GCCCC TTGGAGAGTTGGT	18	1.5	60
D19Mit16	TCTTAGGTAATCTCCCTTAGGGG TGGTAAATGTAAAACTGAAGCATG	19	1.5	54
D19Mit3	CTTCCCC TACTGCAGTGCTC TTGCATAGTTGGCCAAAGTG	19	1.5	60
DXMit16	CTGCAATGCCTGCTGTTTTA CCGGAGTACAAAAGGGAGTCA	20	1.5	58

表 2近交系大鼠 6 个微卫星引物序列及常见品系带型

Table 2Six microsatellite primer sequences and common strain bands of inbred rats

引物名称 Primer name	序列(5'→3') Sequences	常用品系带型 Bands of common stains		
		Lewis	BN	F344
D3Wox9	TTCAGGTATGATTCTGGGAAC	b	b	a
	ATTGGCGATATCATTCTACTAAC			
APOC3	GATTTGAAGCGATTGTCCAT	b	a	b
	GTCTAGCTGCCCACAGGAG			
D11mgh3	GGAGCTGAAATACGAGAGAAATAA	a	c	b
	CTCCTGCTGGCTGTGCAT			
D12Mit2	GTGGCTCTTTTCCTTAGGGA	b	b	a
	TCGGCTTCTGAATGTATTGG			
RATIL6G	ACTCTACAAGGACCAGAAAGTG	a	a	b
	GCATCTTAGCTGGGCTGACC			
PA2S	AGTGTTCGCCTCTATGCATAC	a	b	b
	AGAACATGCTGTTGTCAGGCTC			

注:按泳动快慢将条带按 a、b、c 依次命名,泳动最快的条带命名为“a”。

Note. The name of the bands (a, b, c) indicates the band migration speed; the fastest band is named ‘a’.

表 3封闭群大鼠 25 个微卫星位点序列和染色体分布

Table 3Primer sequences and chromosome distribution of 25 microsatellite loci in outbred rats

位点 Locus	引物序列(5'→3') Primer sequences	染色体 Chromosome
D1Rat345	TTCACACAAATGCCACCACT	1
	CAAAGAGATAGGGCGACAGG	
D1Mgh14	CCGCACTGAGCTCTCAGAG	1
	CCCAACCATTGAGCTAGTAAGG	
D2Wox15	GGTGCTAGTAGACAATAAGATAGAT	2
	TTCATGAGTTTCACTGTTGC	
D2Mgh26	ATTGGTGATCAGATTTTTTCTCC	2
	CCCAACCATTGAGCTAGTAAGG	
D3Wox9	TTCAGGTATGATTCTGGGAAC	3
	ATTGGCGATATCATTCTACTAAC	
D4Arb10	ACTCATCTTCTGAGGAGTAGCG	4
	TTCACAGTCTATTGCTAGGGC	
D4Mit15	CCTAATGACAGCAATAGAAACTACG	4
	TTTITGCTACTGGAGAAAGTTGG	
D5Hmgc2	ATGTTCCCTGATGTCCCTTC	5
	AAACCATGCCACGTGAAC	
D6Mit1	TTAGGAGAGAACTGAAAGTTGTCC	6
	ATGGTGCACTATGGTGCTCA	
D7Mgh3	CGGCATGTGTCTCTGTGTG	7
	TGACTTCTGGTGTCTCTCAGC	
D8Rat14	GGCCGGTCTAATTATTTCTTCA	8
	GCCCATACGTTGCATCAAGT	
D9Mit2	TGACCAGTTAGCCCTTTCCA	9
	GGGAGCAGGGTTCTACACAG	
D10Wox12	CGCTGGGAGGAAAAGAGAG	10
	AGGCTTGCACTCTGTGTTTG	
D11Mgh3	GGAGCTGAAATACGAGAGAAATAA	11
	CTCCTGCTGGCTGTGCAT	
D11Wox3	CACTTTGAGGCCATTCTGAA	11
	CCTTCTCTTTGTGAAAAATAAACTC	
D12Mit2	GTGGCTCTTTTCCTTAGGGA	12
	TCGGCTTCTGAATGTATTGG	

(续表 3)

位点 Locus	引物序列(5'→3') Primer sequences	染色体 Chromosome
LCA	TACAGAGCAAGCTCCAGGAC TGTTTCTAATCCATAGGAAGTGC	13
ALB	TTTTCGTAGTAACGGAAGCC TAAGGATTCTCAGATGCAAATG	14
D15Mit3	GACCTGACCTGTTGTGGGAT GTTGCTCTCTGGCCTCCTC	15
MBPA	ACCTACACGGACACATGGTG GTTGTACTTCTGATTTCCCTTT	16
ACRM	AGGAAATTAAGAGAAGTTGGGACT TATGCTCTTTGGGCAGCTTA	17
TILP	AATCACTGGATGCTGGAAGA AGGGAGCAGAACTACTAAAGATACA	18
AGT	TATGTAACTCAACGCCAGCC TAAGGATTCTCAGATGCAAATG	19
TNF	AGGAAATGGGTTTCAGTTCC CAGGATTCTGTGGCAATCTG	20
PRPS2	GTTTCCCGCTTCACCAG AGAAGGAGAAAGCGACCG	X

表 4 常见近交系小鼠在 30 个微卫星位点的片段大小
Table 4 Fragment size of 30 microsatellites in the common inbred mice

位点 Locus	片段大小(bp) Fragment size						
	C57BL/6 J	BALB/cJ	T739	SCID	DBA/2	FVB	NCPC/2
D1Mit365	92	92	104~108	104	104	92	92
D2Mit15	140	140	158	140	140	170	160
D3Mit29	144	196	144	144~202	180	144	144
D4Mit235	112	96	96	96	96	96	96
D5Mit48	202	196	208	198	204	198	196
D6Mit102	141	131	139	131	121	171	135
D7Mit281	110	136	136	136	136	136	136
D8Mit33	224	222	222	226	216	224	224
D9Mit23	206	204	208	204	204	208	204
D10Mit12	237	237	237	237	237	215	237
D11Mit4	251	245	251	245	285	251	295
D12Mit7	106	122	106~122	106	106~120	106	106~122
D13Mit3	162	188	172	188	196	188	196
D15Mit5	95	95	111	95	111	111	111
D16Mit9	143	123	131	123	123	123	111~131
D17Mit11	169	145	169	145	145	173	169
D18Mit19	154	160	154	152	156	158	158
D19Mit16	132	132	132~135	132	114	128	132
DXMit16	111	89	93	93	107	93	93
D6Mit8	163	185	173	185	143~185	143~185	149~185
D6Mit15	252	194	152	194	152	152	252
D7Mit12	201	201	233	201	207	201	211
D8Mit14	138	162	138	138~162	162	134	134
D9Mit21	193	193	193	193	179	179	193
D12Nds11	169~174	179	179	174~179	179	179	179
D14Mit3	226	226	226	226	226	226	226
D15Mit15	158	158	158	158	144	144	150
D17Nds3	136	114	156~158	118	122	114	132
D18Mit9	166	156	164	156	156	166	156
D19Mit3	197~201	197~201	197	197~201	197~207	197~201	215

2.3 封闭群小鼠和封闭群大鼠群体遗传质量评价

不同类型的实验动物有独特的遗传检测需求。必须选择适当的遗传质量检测方式。与近交系实

验动物不同,封闭群实验动物同一品系不同个体具有多样化的基因型,所有遗传标记都是杂合的。对于近交系动物,可以对一个个体进行遗传质量检

测;对于封闭群动物,至少应采用 25 只动物进行检测,才能获得相对准确的检测结果。而微卫星位点的选择,封闭群小鼠在表 1 中选择 25 个微卫星位点,原则上需覆盖小鼠的 20 条染色体。封闭群大鼠选取表 3 中 25 个微卫星位点进行扩增,原则上需覆盖大鼠的 21 条染色体。通过提取 DNA,PCR 反应,电泳和测序获取检测数据,应用软件 POPGEN 1.32 和 PIC_CALC 0.6 对数据进行分析处理。获取能够体现封闭群群体遗传多样性特征的指标。

封闭群实验动物群体的遗传结构,通过群体的平均杂合度,群体的多态信息含量和哈代-温伯格(Hardy-Weinberg)平衡来体现。如果群体的平均杂合度在 0.5~0.7 时,群体为合格的封闭群群体;如果群体的平均杂合度小于 0.5 时,认为该群体趋于近交;如果群体的平均杂合度在大于 0.7 时,认为该群体趋于野生。遗传多样性分析采用国际上通用的多态性信息量(polymorphism information content, PIC)。PIC 是指一个标记依靠其可检测的等位基因数和它们的分布频率,从而得到该标记在一个群体中检测的多态性大小值^[9]。PIC 值的大小在 0~1 之间,0 表示无多态性,1 表示具有非常高的多态性。PIC > 0.5 为高度多态性;0.25 < PIC < 0.5 为中度多态性;PIC < 0.25 为低度多态性^[10]。亦可以利用哈代-温伯格(Hardy-Weinberg)定律判断封闭群实验动物群体的遗传质量合格与否。群体内一个位点上的基因型频率和基因频率保持不变,处于遗传平衡状态,这一平衡状态就称之为 Hardy-Weinberg 平衡。经过软件分析可以获知群体在微卫星位点是否处于 Hardy-Weinberg 平衡。平衡即判定为遗传质量合格,不平衡即判定为遗传质量不合格。

3 应用前景

近交系动物微卫星位点的选取不一定拘泥于 20 个微卫星位点,可根据需要灵活调整。如果仅用于区分两个品系的近交系小鼠,选取 10 个微卫星位点即可满足需求。初次应用微卫星方法获得的近交系小鼠的遗传数据可以作为该品系后续遗传质量检测的依据。封闭群的动物进行群体遗传结构分析时,应采用基础群实验动物,动物的数量不应小于 25 只。动物数量少和非基础群的动物获得的数据将对分析结果带来偏差。

生物医学的发展离不开实验动物,实验动物的发展离不开质量控制。实验动物的遗传质量是所

有质量控制的基础。团体标准 T/CALAS 21-2017 小鼠、大鼠微卫星 DNA 标记检测方法的建立弥补了现行国家标准中生化标记检测法的局限性,微卫星方法的位点数量多且多态性丰富,位点实现了全基因组覆盖^[11]。微卫星方法最突出的优点是,仅需要提取少量血液样本的 DNA 即可实现实验动物的遗传质量检测,无需安乐死实验动物,符合动物福利和 3R 原则^[11]。标准的制定表明我国的实验动物遗传质量控制手段迈上了一个新台阶,并且逐步与国际水平接轨,有利于我国实验动物质量整体水平的提升。

参考文献:

- [1] 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(5): 902-911.
- [2] Erhart MA, Kim T, Crews GM, et al. The use of unilateral PCR to identify prominent heteroduplexes formed during PCR of the mouse microsatellite locus D17Mit23 [J]. *Mol Biotechnol*, 2006, 33(1): 37-48.
- [3] Suda T, Oyanagi M, Wakana S, et al. Novel mouse microsatellites: primer sequences and chromosomal location [J]. *DNA Res*, 1994, 1(4): 169-174.
- [4] Fowles GA, Adelman S, Knight AM, et al. PCR-analyzed microsatellites of the mouse genomic polymorphisms among ten inbred mouse strains [J]. *Mamm Genome*, 1992, 3(4): 192-196.
- [5] Kondo Y, Sato K, Kitada K, et al. Application of mouse microsatellite markers to rat genome mapping [J]. *Transplant Proc*, 1997, 29(3): 1766-1767.
- [6] Slingsby JH, Hogarth MB, Simpson E, et al. New microsatellite polymorphisms identified between C57BL/6, C57BL/10, and C57BL/KsJ inbred mouse strains [J]. *Immunogenetics*, 1996, 43(1-2): 72-75.
- [7] 王迎,崔静,陈振文,等.转基因小鼠和基因突变小鼠微卫星不稳定性分析[J]. *中国实验动物学报*, 2013, 21(5): 5-9.
- [8] 刘榜,张庆德,李奎,等.微卫星 DNA 作为遗传标记的优点及前景[J]. *湖北农业科学*, 1997(2): 49-51.
- [9] Anderson JA, Churchill GA, Autrique JE, et al. Optimizing parental selection for genetic linkage maps [J]. *Genome*, 1993, 36(1): 181-186.
- [10] 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.
- [11] 王洪,魏杰,刘月环,等. T/CALAS 21-2017. 小鼠、大鼠微卫星 DNA 标记检测方法[S]. 中国实验动物学会, 2017.