中国KM小鼠亚群遗传变异的研究*

史顺娣　王汉荣**　崔秉春***　赵宏旭　李巧帆**
杨丽萍***　王　丹　陈天培**

（中国医学科学院实验动物研究所，北京）

摘　要　应用电泳方法和Festing下颌骨形态分析法对北京、上海、长春三大地区的四个中国KM小鼠的主要群体展开调查，并与近年从美国引进Swiss来源的NIH小鼠群体进行比较。结果显示：1.中国KM与NIH小鼠群体在Es-3，Es-10，Got-2，Glo-1，Gpt-1，和Mpl-1座位的等位基因组成存在显著差异；两者间遗传距离为0.131±0.011，证实中国KM小鼠为非Swiss来源的另一亚种。2.KM小鼠各亚群间等位基因分布无明显差异，亚群间遗传距离为0.008～0.027，与群体封闭时间成正相关。3.对群体生化和下颌骨形态学数据聚类分析表明S：KM在四个KM亚群中为特殊的一类，提示不同地区KM亚群存在的遗传差异可能对实验重复性产生影响。

关键词　KM小鼠　蛋白质多态性　下颌骨分析　群体遗传

中国KM（昆明）小鼠在我国封闭饲养近40年，交配繁殖达140代，广泛地应用于生物、医学研究和药品生物制品检定，是我国用量最大的实验小鼠。但由于对其遗传背景缺乏完整了解，对KM亚群间存在的遗传差异认识不清，至使该品系长期以来未得到国际公认。为确定其遗传来源及亚群间变异关系，本文采用生化电泳法和Festing下颌骨形态分析法对北京、上海和长春三大地区的四个KM亚群进行调查，并与Swiss来源的NIH小鼠群体进行比较，现将结果报道如下：

材料与方法

一、实验动物群体的选择　KM群体来自不同地域和气候条件的单位，各群体封闭繁殖时间不同。为区分各群体，按ICLAS远交系实验动物命名规则[1]对实验群体重新命名。各KM群体的隶属关系及历史（见图1）。NIH群体为北京生物制品研究所动物室提供，1981年引自美国国立卫生院NIH。被测群体雌种数均在2000只以上，除A：KM为1：6（雄：雌）循环交配繁殖外，其余群体均采用1：1永久同居方式繁殖。

二、群体抽样数目和样品制备　每个群体随机抽取90只成年动物，雌雄各半。其统计学意义为允许误差1%，群体代表性95%。电泳样品制备见本实验室方法[2]。下颌骨取样每个群体雌雄各100只，年龄为三月龄左右，下颌骨制备方法见另文[3]。

三、电泳及染色方法　见前文[4]。

• 本文受国家自然科学基金0387018号项目资助

• • 上海生物制品所
• • • 长春生物制品所

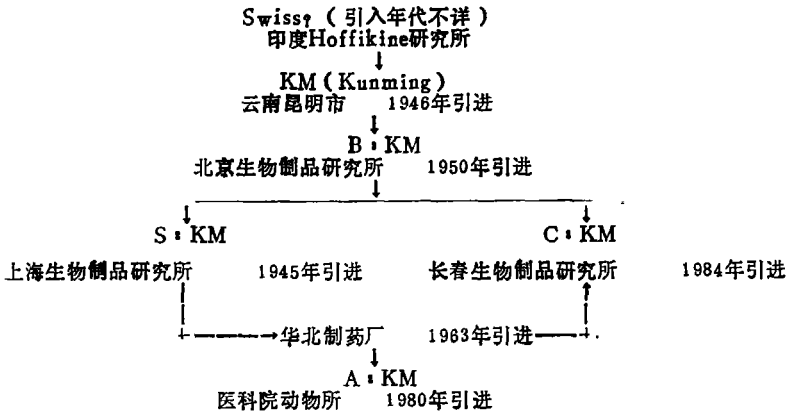

图1 中国KM小鼠的历史及各亚群间的相互关系

四、数据处理[5] 分子群体遗传学数据以哈代—温伯格定律验证。群体间遗传距离采用Nei's遗传距离公式计算。下颌骨数据分析采用Festing法[3, 6]。最后采用类平均聚类分析法对各群体聚类。上述计算均以BASIC语言编成程序，经微机处理完成。

结 果

一、各群体等位基因分布的比较 KM小鼠各亚群被测基因座位的等位基因分布基本一致。24个基因座位中多态性基因座位比例为40～46%明显高于NIH小鼠群体，后者为25%。为比较KM与其它Swiss来源小鼠的差别，文中引用美国学者对另外三个Swiss来源群体研究的部分资料（见表1）[7]。KM与Swiss来源的小鼠群体在Es-3，Es-10，Got-2，Glo1，Gpt-1，Mpi-1六个基因座位上存在着明显的差异。

表1 KM亚群与Swiss来源各群体24个基因座位的等位基因组成

Tabile 1 Allelic Composition of KM and Swiss Outbred Mice Populations

		KM Subcolonies				Swiss Colonies*			
Loci	Chr.	A:KM	B:KM	C:KM	S:KM	NIH	N:NIH	CD-1	Eppley
Akp-1	(1)	b	b	b	b	b	—	—	—
Amy-1	(3)	a	a	a	a	a	—	—	—
Amy-2	(3)	a	a	a	a	a	—	—	—
Car-2	(3)	a,b	a,b	a,b	a,b	b	—	—	—
Es-1	(8)	b	b	b	b	b	b	b	b
Es-2	(8)	b	b	b	b	b	b	b	b
Es-3	(11)	a,b,c	a,b,c	b,c,	a,b,c	c	c	c	c
Es-10	(14)	a,b,c	a,b,c	a,b,c	a,b,c	a	a	a	a
Es-11	(8)	a	a	a	a	a	—	—	—
Gpd-1	(4)	a,b	a,b	a,b	a,b	a,b,c	—	—	—
Glo-1	(17)	a	a	a	a	a,b	a,b	a,b	a,b
Got-1	(19)	a	a	a	a	a	a	a	a
Gpi-1	(7)	a,b	a,b	a,b	a,b	b	b	a,b	a,b
Got-2	(8)	b	b	b	b	a	a,b	a,b	a,b
Gpt-1	(15)	a,b	a,b	a,b,c	a,b,c	a,b	a,c	a,c	a,c
Hbb	(7)	d,s	d,s	d,s	d,s	d,s	d,s	d,s	d,s
Mod-1	(9)	a,b,	a,b	a,b	a,b	a,b	a,b	a,b	a,b
Mod-2	(7)	b	b	b	b	b	b	b	b
Pep-3	(1)	a,b	b	b	b	b	b	b	b
Pgm-1	(5)	a,b,	a,b	a,b	a,b	a,b	a,b	a,b	a,b
Pgm-2	(4)	a	a	a	a	a	a	a	a
Mpi-1	(9)	a,b	a,b	a,b	a,b	b	b	b	b
Trf	(9)	b	b	b	b	b	—	—	—
Idh-1	(1)	a,b	a,b	a,b	a,b	a	a,b	a,b	a,b

* NIH this study, N：NIH, CD-1 and Eppley-Swiss see refs. 7

二、各群体等位基因频率的分布 一般认为：在频率最高的等位基因频率为95%或99%以下时该基因具有多态性。我们对14个多态性基因座位的等位基因频率进行计算并用哈代—温伯格定律验证（见表2-1，2-2）。含有两个等位基因的座位其df＝1，X^2＜3.84时处于平衡状态；含有三个等位基因座位其df＝2，X^2＜5.99时处于平衡状态；在C：KM群体中有多个座位处于不平衡状态。

表2-1 KM和NIH小鼠群体多态性基因座位的等位基因频率（一）

Enzyme (chromosome)	NIH			S:KM			A:KM		
	Allele frequency	2pq	HWE X^2	Allele frequency	2pq	HWE X^2	Allele frequency	2pq	HWE X^2
Car-2(3)	b=1.0			a=0.64	0.46	2.22	a=0.48	0.50	0.19
				b=0.36			b=0.52		
Es-3(11)				a=0.02	0.01	1.53	a=0.02	0.01	1.04
				b=0.26	0.03		b=0.33	0.03	
	c=1.0			c=0.72	0.37		c=0.65	0.43	
Es-10(14)	a=1.0			a=0.55	0.41	0.28	a=0.32	0.32	0.78
				b=0.37	0.09		b=0.49	0.12	
				c=0.08	0.08		c=0.19	0.18	
Got-2(8)	a=1.0								
				b=1.0			b=1.0		
Gpd-1(4)	a=0.37	0.42	0.05	a=0.74	0.38	0.39	a=0.52	0.50	0.73
	b=0.57	0.04		b=0.26			b=0.48		
	c=0.06	0.07							
Gpi-1(7)				a=0.66	0.44	0.61	a=0.84	0.26	0.44
	b=1.0			b=0.34			b=0.16		
Hbb(7)	s=0.91	0.17	0.98	s=0.88	0.21	0.63	s=0.61	0.48	0.20
	d=0.09			d=0.12			d=0.39		
Gpt-1(15)	a=0.66	0.45	1.57	a=0.53	0.48	0.42	a=0.45	0.50	0.57
	b=0.34			b=0.46	0.02		b=0.55		
				c=0.02	0.02				
Idh-1(1)	a=1.0			a=0.83	0.28	1.29	a=0.83	0.28	0.06
				b=0.17			b=0.17		
Mod-1(9)	a=0.86	0.25	3.28	a=0.81	0.31	1.15	a=0.63	0.47	2.45
	b=0.14			b=0.19			b=0.37		
Pep-3(1)							a=0.03	0.06	0.11
	b=1.0			b=1.0			b=0.37		
Pgm-1(5)	a=0.26	0.39	1.04	a=0.06	0.10	2.11	a=0.27	0.39	0.74
	b=0.74			b=0.94			b=0.73		
Mpi-1(9)				a=0.18	0.29	0.69	a=0.29	0.41	0.06
	b=1.0			b=0.82			b=0.71		
Glo-1(17)	a=0.67	0.44	0.45	a=1.0			a=1.0		
	b=0.33								

表2-2 KM和NIH小鼠群体多态性基因座位的等位基因频率（二）

Enzyme (chromosome)	B·KM			C·KM		
	Allele frequency	2pq	HWE x^2	Allele frequency	2pq	HWE x^2
Car-2(3)	a=0.47	0.50	0.20	a=0.39	0.46	0.51
	b=0.53			b=0.61		
Es-3(11)	a=0.08	0.06	1.07			
	b=0.39	0.08		b=0.24	0.36	
		0.46	1.73	c=0.76		
Es-10(14)	c=0.53	0.42				
	a=0.36	0.36	0.06	a=0.42	0.35	31.06
	b=0.50	0.10		b=0.42	0.13	
	c=0.14	0.14		c=0.16	0.14	
Got-2(8)						
	b=1.0			b=1.0		
Gpd-1(4)	a=0.34	0.45	0.38	a=0.48	0.50	15.96
	b=0.66			b=0.52		
Gpi-1(7)	a=0.53	0.50	3.47	a=0.88	0.21	0.41
	b=0.47			b=0.12		
Hbb(7)	s=0.57	0.49	2.80	s=0.67	0.44	0.23
	d=0.43			d=0.33		
Gpt-1(15)	a=0.57	0.49	2.31	a=0.77	0.23	58.22
	b=0.43			b=0.15	0.12	
				c=0.08	0.02	
Idh-1(1)	a=0.94	0.11	1.49	a=0.91	0.16	26.76
	b=0.06			b=0.09		
Mod-1(9)	a=0.79	0.33	3.58	a=0.77	0.35	10.20
	b=0.21			b=0.23		
Pep-3(1)						
	b=1.0			b=1.0		
Pgm-1(5)	a=0.37	0.46	1.73	a=0.14	0.24	3.98
	b=0.63			b=0.86		
Mpi-1(9)	a=0.43	0.49	3.09	a=0.31	0.43	12.85
	b=0.57			b=0.69		
Glo-1(17)	a=1.0			a=1.0		

三、群体间的遗传分化 我们根据各群体等位基因频率计算了群体间的遗传距离D值（见表3），NIH群体与各KM亚群间的D值较大，平均在1.3×10^{-1}水平；各KM亚群间的D值较小，平均在1.5×10^{-2}水平。

同时，在KM亚群间如以群体封闭繁殖时间为纵座标，一群体与其它各群体间遗传距离平均值为横座标，可看到群体封闭时间与遗传距离成正相关。（见图2）

表3　NIH与KM小鼠各亚群间的遗传距离

D	A:KM	B:KM	C:KM	S:KM
NIH	0.147	0.126	0.129	0.121
S:KM	0.014	0.027	0.016	•
C:KM	0.008	0.015	•	
B:KM	0.012	•		
A:KM	•			

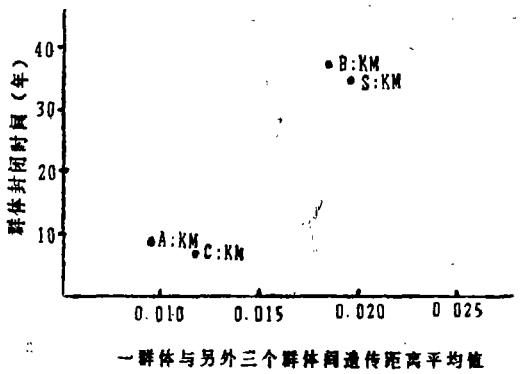

图2　遗传距离与群体封闭时间的关系

四、下颌骨测量分析结果　KM与NIH小鼠部分DF值超出±2SD界限呈弥散分布，而近交系对照动物$C_{57}BL/6$ DF值全部在±2SD界限内。以各群体的DF值在立体直角坐标系上构象，NIH群体与四个KM亚群均不发生重叠。KM亚群间S：KM与另三个KM亚群也不发生重叠（见图3-1，3-2），Festing遗传距离也反映了这种关系，NIH与四个KM群体的Di^2值和S：KM与其它三个KM群体的Di^2值均大于12，具有显著性差异。（见表4）

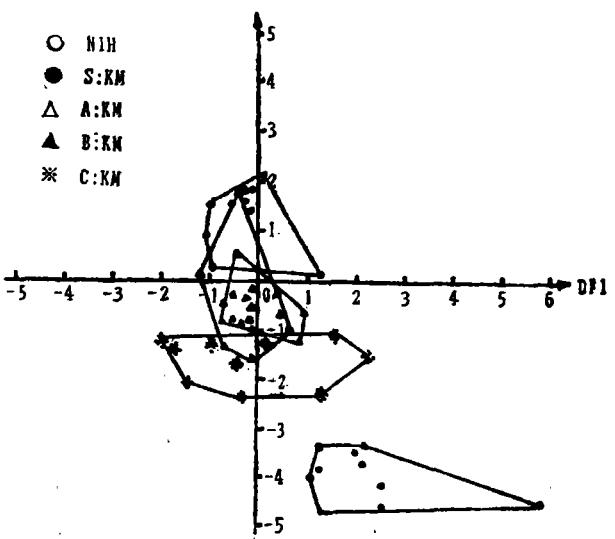

图3-1　NIH与KM亚群下颌骨DF值的构象图

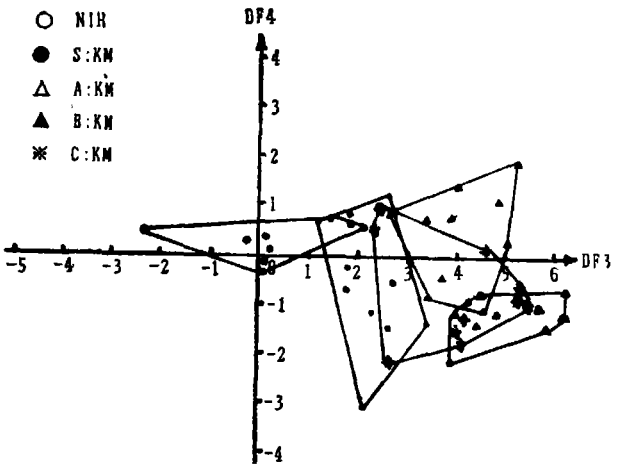

图3-2 NIH与KM亚群下颌骨DF值构象图

表4 NIH与KM亚群下颌骨遗传距离（Di^2）

Di^2	A:KM	B:KM	C:KM	S:KM
NIH	26.57	17.90	23.25	39.63
S:KM	26.10	22.41	14.78	·
C:KM	2.35	2.51	·	
B:KM	3.67	·		
A:KM	·			

五、KM亚群间的聚类分析 为清楚显示KM亚群间遗传关系，我们分别根据分子群体遗传学数据和下颌骨统计数据对KM亚群聚类(见图4)。从聚类分析结果看，A:KM，B:KM，C:KM三个群体比较接近为一类；S:KM为另一类。

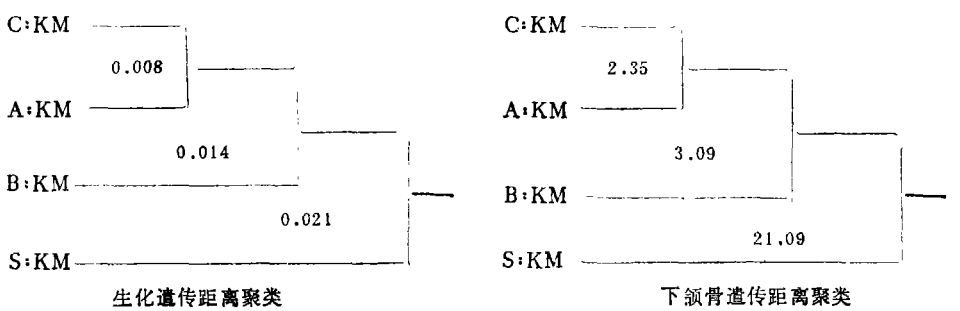

图4 四个KM亚群类平均聚类分析树枝样图

讨　论

一、KM小鼠为另一有特色的封闭群亚种　关于中国KM小鼠的遗传来源，众说纷纭，比较权威的说法认为该鼠来源于印度Hoffikine研究所，为Swiss小鼠。1980年 Catherine〔7〕等人对来源于Swiss小鼠的N：NIH，CD-1，Eppely-Swiss三株远交系小鼠进行了调查，发现这些群体中各基因座位的等位基因分布基本一致，群体间平均遗传距离为0.023。我们对KM小鼠亚群调查亦发现各群体间等位基因分布也趋于一致，但与Swiss来源的NIH等群体比较在Es-3，Es-10，Got-2，Glo-1，Gpt-1，Mpi-1六个基因座位上等位基因分布存在着明显差异。其中KM小鼠携带的$Mpi\text{-}1^a$和$Es\text{-}10^c$等位基因为罕见基因，仅存于MA/J和BUB/BnJ两个近交品系中，有关研究还证实在东南亚一带包括中国某些地区的野鼠*M.m.castaneus*，*M.m.molossinus*带有这两个等位基因〔9〕。而Swiss群体中携带的$Got\text{-}2^a$和$Glo\text{-}1^b$为KM亚群所缺失。比较KM和Swiss群体间的遗传距离平均值为0.131±0.011，明显大于Swiss来源各群体间的遗传距离。同时，此次下颌骨分析结果也表明KM与NIH小鼠存在较大差异，形态遗传距离平均值为26.16±6.9，具有显著性差异。这些研究均从不同侧面证实KM小鼠与Swiss小鼠遗传组成不同，为一有特色的小鼠亚种，值得广大生物工作者进一步发掘和利用。

二、小鼠亚群间存在着不同程度的差异　由于我国地域辽阔，KM小鼠已在各地安家落户形成许多亚群。它们间的遗传差异直接影响到使用该种动物进行实验的重复性。此次对不同地区的亚群调查结果表明，群体间遗传距离与封闭时间成正相关，该现象国外学者也有报道。

KM亚群间生化遗传距离为0.015±0.008，小于Swiss来源各群体间的遗传距离，属地方小种间范围〔8〕。但群体聚类分析发现位于长江以南的S：KM与长江以北的A：KM，B：KM，C：KM亚群间差异较大，且下颌骨数据具有显著差异。日本一些学者在研究果蝇群体时发现基因频率分布随群体栖息环境不同而存在差异〔8〕。鉴于我们所检查的基因多数是编码与代谢紧密相关的酶类。而S：KM群体又是唯一生活在长江以南的群体，是否可推测它们间的差异为地理气候条件所致。当然，这种推测还需大量研究来证实。

三、下颌骨分析法在监测封闭群体小鼠中的作用　长期以来由于生化遗传监测费用过高，封闭群体中动物基因呈多态性分布，一直无法分析比较我国封闭实验小鼠的遗传状况。本项研究首次采用生化电泳法和下颌骨测量法同时对四个KM亚群进行调查。获得平行一致结果。中国KM小鼠在我国用量居首，尚有许多亚群本被追踪调查。下颌骨分析法既可准确显示各个亚群间有无显著遗传差异，又可连续追踪同一群体稳定状况。在今后对封闭群体和远交群体小鼠的遗传质量控制工作中值得推广。

（本文获中国实验动物学会第一届论文评比二等奖）

参考文献

1. Poiley SM. Laboratory Animal Care 1970；20：903
2. 史顺娣，等. 中国医学科学院学报　1986；8（5）：407
3. 王汉荣，等. 上海实验动物科学　1989；9（4）：201

4. Shi shundi, et al. Proc CAMS 1937; 2(3): 168
5. 向日辉美(隋文红译).群体遗传学(日).长春: 吉林科学技术出版社. 1984: 1～12
6. Virginia E Papaioannou and Festing MFM, Laboratory Animal 1980; 14: 11
7. Catherine RM, et al. Nature 1980; 283(10): 157
8. 大羽滋.(赵敏等译).群体遗传(日), 北京: 科学出版社, 1983: 104～114
9. Nichois EA, et al. Biochem Genet) 1973; 8: 47

Study on Genetic Variants of Chinese KM Mouse Subcolonies

Shi Shundi, et al

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing)

This paper presents the results of study on genetic variants of 4 KM subcolonies maintained in Beijing, Shanghai, Changchun and compares it with that of one NIH colony introduced from U.S.A. by methods of eletrophoresis and mandible analysis. The results revealed that: (1) There are significant differences between KM and Swiss derivative colony NIH on allelic constitutions of Es-3, Es-10, Glo-1, Gpt-1, Got-2, and Mpi-1 loci and mandible shape. Genetic distance between NIH and KM subcolonies is 0.131, 0.011, which is a proof that KM mice is non-Swiss derivative subspecies. (2) The allelic constitutions of KM subcolonies is same and genetic distance is 0.008, 0.027 positively related with the time of colony closed. (3) The unique position of S: KM mouse was shown in phylogenetic diagram of 4 KM subcolonies from both biochemical and morphological data, which prompts that some variants existed in KM subcolonies may influence the reproductivity of experiment.

Key words Mouse Protein polymorphism Mandible analysis Population genetics