

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

韩喜彬¹, 苏玉虹², 巴彩凤¹, 贺宝军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 利用微卫星技术对辽宁省6种近交系小鼠进行遗传质量分析。方法 根据 Mouse Genome Database 和相关文献选取10个多态信息丰富的位点和引物, 进行PCR扩增和PAGE电泳, 对小鼠的遗传多态性进行研究。结果 不同品系小鼠同一位点的扩增结果表现出多态性, 同一品系同一位点表现单态性, 所有小鼠的10个位点都处于纯合状态; 遗传距离分析表明, C57BL/10与C57BL/6J小鼠之间的遗传距离最近, 为0.1021, 遗传距离最远的是BALB/c与C57BL/10、C57BL/6J, 分别为0.1635和0.1614。结论 运用所筛选的10个微卫星位点可以对近交系小鼠进行遗传质量检测, 说明该方法具备可行性。

【关键词】 近交系小鼠; 遗传质量检测; 微卫星

【中图分类号】 Q75; R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)05-0022-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.05.006

A Genetic Monitoring Report for Ten Microsatellites DNA Loci of Six Inbred Mice Strains Used in Liaoning Province

Han Xi-bin¹, Su Yu-hong², Ba Cai-feng¹, He Bao-jun¹

(1. Experimental Animal Center of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, China;

2. Husbandry and Veterinary Academy of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, China)

【Abstract】 Objective To study the genetic quality for six strains of inbred mice in Liaoning Province by microsatellites technology. **Methods** Ten microsatellites DNA loci and primers were selected in Mouse Genome Database and pertinent literature, and its polymorphism information content was rich, to analyzed on genetic polymorphism of mouse by PCR Amplification and PAGE electrophoresis. **Results** The same site results of PCR amplification showed polymorphism in different strains, and showed monomorphism in same strains, ten microsatellites DNA loci were homozygous state for all mouse. The genetic distance among C57BL/10 and C57BL/6J was 0.1021, and it was 0.1635 and 0.1614 between BALB/c with C57BL/10 and C57BL/6J. **Conclusions** It was a feasible way to analyzed genetic monitoring among inbred mouse strains by ten microsatellites DNA locis.

【Key words】 Inbred mice; Genetic monitoring; Microsatellites

实验动物要求具有明确的遗传背景, 实验动物质量直接影响到动物实验结果的准确性、重复性和科学性, 遗传检测是保证实验动物遗传质量的重要

措施。目前, 国际所规定的遗传检测方法是生化标记分析法, 即通过检测同工酶或异构蛋白酶的变化来推测相应基因变化的方法, 我国采用皮肤移植试

[作者简介] 韩喜彬(1979-), 男, 讲师, 从事实验动物教学和科研工作。

[通讯作者] 苏玉虹(1965-), 女, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 动物分子遗传育种。

验和生化标记分析相结合的方法 (GB/T 14927—2001) , 而通过表型推断基因变化是不可靠的。20 世纪 80 年代以后随着分子生物学的飞速发展, 遗传标记的研究开始转向遗传物质—DNA 分子, 由于各种遗传信息都蕴藏在 DNA 中, 因而 DNA 是更为可靠的遗传标记。微卫星 DNA 是一种寡核苷酸串联重复序列, 重复单位为 2~6 bp, 重复次数在 10~60 次, 又称为短小串联重复序列 (short tandem repeats, STR), 其特点是位点多、多态性高、扩增片段短, 在小鼠品系区分和近交系的纯度鉴定中应用价值较高。近交系小鼠已发现的 STR 位点有 7300 多个^[1], 于是对其进行有效的筛选和利用成为难题, 目前国内外学者选取的位点及数量各不相同, 检测的品系也各异, 处于摸索阶段, 距离其标准化还有很多工作要做。本实验选取多态信息丰富、数量较少的位点, 利用扩增的方法检测辽宁省常用的近交系小鼠, 旨在为遗传质量检测新方法的建立提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

6~10 周龄 BALB/c、C57BL/10、C57BL/6J、DBA/2、FVB/N 及 129 小鼠各 5 只, 来源于中国医科大学实验动物中心 [SCXK (辽) 2008-0005]、大连医科大学实验动物中心 [SCXK (辽) 2008-0002] 和辽宁医学院实验动物中心 [SYXK (辽) 2009-0004], 三所单位所提供的小鼠覆盖辽宁全省, 可以代表辽宁省近交系小鼠的遗传质量。所有小鼠为 SPF 级。

1.2 方法

1.2.1 小鼠基因组 DNA 的提取: 取上述 5 种小鼠尾端约 5 mm, 剪碎, 利用 DNAiso Reagent 试剂盒 (大连宝生物工程有限公司) 提取基因组 DNA 备用。

1.2.2 微卫星位点的选取: 参考 Mouse Genome Database (<http://www.informatics.jax.org>) 及部分文献^[2], 选取 10 个微卫星位点, 选取的要求为各位点分散于不同染色体, 且多态信息丰富, 不同品系扩增长度差别较大。引物序列见表 1, 由沈阳联星基因有限公司合成。

1.2.3 PCR 反应: 总体系为 20 μL, 其中各成分终浓度分别为 Mg²⁺ 1.5 mmol/L, 上、下游引物 100 pmol/L, 4 × dNTP 100 pmol/L, Taq 酶 1.5 U, 基因组 DNA 100 ng。反应条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 40 s, 55℃ 复性 40 s, 70℃ 延伸 35 s, 循环 35 次;

70℃ 继续延伸 8 min, 4℃ 保存。

1.2.4 结果判读:

取 10 μL PCR 产物进行 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, AgNO₃ 染色^[3], 根据聚丙烯酰胺凝胶上 DNA 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 等等。5 个品系泳动距离一致的, 即表现为单态性, 若有差异即为多态性。

1.2.5 遗传距离分析: 各品系小鼠之间的遗传距离分析根据 Nei 公式计算:

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

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 个等位基因的频率;

m_j —第 j 个座位上的等位基因数;

r—检测的座位数。

2 结果

2.1 各品系小鼠微卫星检测结果

本实验共选取 6 种近交品系, 每种 5 只, 结果显示, 所有品系小鼠 10 个微卫星位点的扩增片段显示为纯合子, 同一品系在各位点表现为单态性, 不同品系小鼠间表现多态性, D8Mit113 和 D2NDS3 等位基因数最少, D4Mit54、D11Mit4、D12Mit136、D13Mit13 和 D17NDS3 等位基因数最多 (表 1)。C57BL/6J 与 C57BL/10 属同一品系, 只在一个位点上有差异 (D17NDS3), 而其他品系之间的差异都在 4 个位点以上 (图 1~4)。

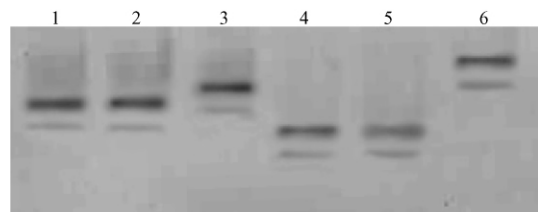


图 1 微卫星位点 D12Mit136 扩增结果

Fig. 1 PCR result of D12Mit136 in six inbred mouse strains

1. 129 2. FVB/N 3. DBA/2 4. C57BL/6J
5. C57BL/10 6. BALB/c
C57BL/6J = C57BL/10 < 129 =
FVB/N < DBA/2 < BALB/c

2.2 各品系之间遗传距离分析

各品系小鼠之间的遗传距离见表 2, 由表 2 可

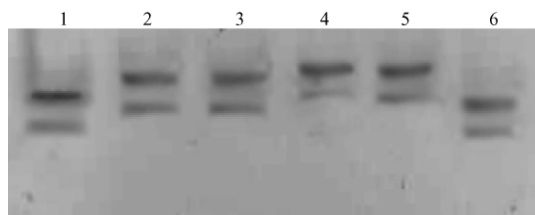


图 2 微卫星位点 D13Mit13 扩增结果

Fig. 2 PCR result of D13Mit13 in six inbred mouse strains

1. 129 2. FVB/N 3. DBA/2 4. C57BL/6J
5. C57BL/10 6. BALB/c
BALB/c < 129 < FVB/N =
DBA/2 < C57BL/6J = C57BL/10

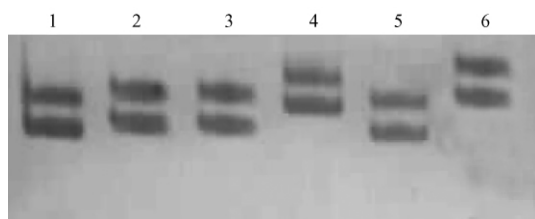


图 3 微卫星位点 D11Mit4 扩增结果

Fig. 3 PCR result of D11Mit4 in six inbred mouse strains

1. BALB/c 2. C57BL/10 3. C57BL/6J
4. DBA/2 5. FVB/N 6. 129
BALB/c = FVB/N < C57BL/10 =
C57BL/6J < DBA/2 < 129

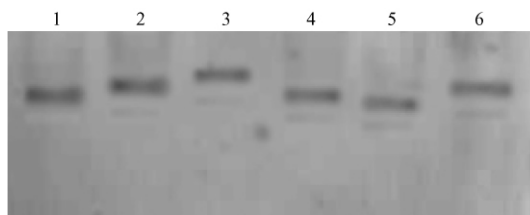


图 4 微卫星位点 D17NDS3 扩增结果

Fig. 4 PCR result of D17NDS3 in six inbred mouse strains

1. BALB/c 2. C57BL/10 3. C57BL/6J
4. DBA/2 5. FVB/N 6. 129
FVB/N < BALB/c = DBA/2 <
C57BL/10 = 129 < C57BL/6J

知, C57BL/10 与 C57BL/6J 小鼠之间的遗传距离最近, 为 0.1021, FVB/N 与 BALB/c、FVB/N 与 DBA/2、FVB/N 与 129 之间的遗传距离也较近, 分别为 0.1135、0.1175、0.1147, 遗传距离最远的是 BALB/c 与 C57BL/10、BALB/c 与 C57BL/6J, 分别为 0.1635 和 0.1614。

3 讨论

目前国标规定的生化标记法只检测 13 个位点, 分布在 10 条染色体上, 不能反映动物的整个遗传概貌, 而且利用表型变化来推测基因变异在理论上具有局限性, 同时也面临着结果判读困难和需要处死动物等实际问题^[4]。小鼠的 7300 多个微卫星位点均

表 1 6 种近交系小鼠间微卫星 DNA 多态性
Tab. 1 Microsatellite DNA polymerases of six inbred mouse strains

| 基因座 Microsatellite | 引物序列 Primer sequence | BALB/c | C57BL/10 | C57BL/6J | DBA/2 | FVB/N | 129 |
|-----------------------|---|--------|----------|----------|-------|-------|-----|
| D2NDS3 | CCAAGCTTCCTTGTGCAAGTA AAGCCCAAAGTCCATCAGTGG | b | a | a | a | a | a |
| D4Mit54 | CTGCCATCCTGTAGTTTCACTG ACCCCCACATATGTCTCCCT | d | a | a | d | c | b |
| D6 Mit 8 | TGCACAGCAGCTCATTCTCT GGAAGGAAGGAGTGGGGTAG | c | a | a | a | c | b |
| D8 Mit 113 | GGTACATAATAAGAAAGCCCG AACCCGTTAGGAGGACCG | b | a | a | b | b | b |
| D10 Mit 15 | ATGCGTACAGGCCAAAACACC GCTACATTGGTCTGTGACGC | a | b | b | c | c | b |
| D11 Mit 4 | CAGTGGGTCATCAGTACAGCA AAGCCAGCCCAGTCTTCATA | a | b | b | c | a | d |
| D12Mit136 | TTTAATTTGAGTGGGTTTGCTTGCTACATGTACTGATCTCCA | d | a | a | c | b | b |
| D13 Mit 13 | CTGTGGTAAGTCCAGATTG GGAAGAGTAGGAAGATGCC | a | d | d | c | c | b |
| D14NDS1 | TGCTGGCTAGGAATAAACAGA AGGGAATTCATGTTCAGGATA | b | a | a | c | b | b |
| D17NDS3 | TTCCTGTGGCGCCTTATCAG AGACAATGGGTAACAGAGGCA | b | c | d | b | a | c |

注: 泳动距离最大者记为“a”, 依次为“b”、“c”、“d”...

Note: The maximal electrophoresis distance was “a”, others were in sequence of “b”, “c” and “d”

表 2 6 种近交小鼠之间的遗传距离
Tab. 2 The genetic distance among six strains of inbred mice

| 品系 | BALB/c | C57BL/10 | C57BL/6J | DBA/2 | FVB/N | 129 |
|----------|--------|----------|----------|--------|--------|-----|
| BALB/c | | | | | | |
| C57BL/10 | 0.1635 | | | | | |
| C57BL/6J | 0.1614 | 0.1021 | | | | |
| DBA/2 | 0.1231 | 0.1246 | 0.1352 | | | |
| FVB/N | 0.1135 | 0.1521 | 0.1538 | 0.1175 | | |
| 129 | 0.1423 | 0.1223 | 0.1367 | 0.1343 | 0.1147 | |

匀地分布于全部染色体上,经过恰当的选择可直接反映遗传基因的变化,样品采集不需处死动物,检测结果简单明了,可信度大大提高。张树辉等^[4]用 42 个位点对 9 种近交系小鼠 DNA 多态性进行了研究,谢建云等^[5]用 24 个位点检测 14 个品系近交系小鼠,王洪等^[2]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,可用于常规检测小鼠遗传质量。欧阳兆和等^[6]利用 14 个微卫星基因座对国内所有 BALB/c 小鼠的遗传质量进行了分析,了解了国内 BALB/c 小鼠遗传质量状况,并且发现微卫星可有效区分各亚系。本实验检测了辽宁省 6 种常用的近交系小鼠,检测结果全部合格,10 个微卫星位点也基本反映了品系的遗传概貌,其中仅有的近缘品系 C57BL/10 和 C57BL/6J 在 D17NDS3 位点也表现出差异,D2NDS3、D8Mit113 在品系间多态性不高,D4Mit54、D11Mit4、D12Mit136、D13Mit13 和 D17NDS3 等 5 个位点多态性显著,可用于品系鉴别和质量鉴定;在检测遗传质量的同时,本试验进行了各个品系的遗传距离分析,结果表明 C57BL/10 与 C57BL/6J 小鼠之间亲缘关系最近,BALB/c 与 C57BL/10、BALB/c 与 C57BL/6J 亲缘关系最远;本试验银染方法参考张春峰等^[3]的改进方法,染色背景较浅,但影子带干扰明显,个别影子带与目的条带灰度相同,参考数据库信息将下侧条带判读为影子带。

虽然近年关于利用微卫星基因座位点检测近交系小鼠遗传质量的报道很多^[7-9],灵敏的微卫星基因座位点被不断报道,近交系实验动物的遗传监测从蛋白质水平上升到 DNA 分子水平也将是一次巨大的飞跃,但是此种方法与实际应用还有很大距离,如各个位点的 PCR 反应条件需要逐个摸索,银染后影子带干扰等,最关键问题是位点的选择,已经发现的位点中 90% 以上具有丰富的多态性,现有报道中检测对象和所用位点又各不相同,如何做到工作量小而又检测准确值得研究。现我们可以发现和总结一些研究思路或倾向,如分析各品系、亚

系的遗传距离,即确定亲缘远近,将近交系小鼠划分成几个分支;确定品系特异性位点,这样就可以根据需要检测的小鼠聚类特征确定采用的位点,建立一种灵活的方法。

随着微卫星多态性研究的深入,统一的评估指标将逐步建立,微卫星检测技术将势必取代生化标记分析法,并广泛应用于近交系小鼠的遗传监测当中。

致谢:感谢中国医科大学动物部、大连医科大学实验动物中心部提供样品。

参考文献:

- [1] 李瑞生,赵爽,曾林等. 国内实验动物微卫星 DNA 标记的研究进展[J]. 传染病信息. 2008, 21(5):279.
- [2] 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)3:136-137.
- [3] 张志峰,史洪才,武坚. 微卫星 DNA 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)银染法的改良[J]. 生物技术, 2005, 15(3):51.
- [4] 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.
- [5] 谢建云,邵伟娟,胡建华,等. 小鼠 SNP 遗传检测方法的建立及生化标记位点的分子生物学研究[J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(9):512-513.
- [6] 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)2:72-73.
- [7] Basta P V, Whitmore S P, Basham K B, et al. Microsatellite analysis in FVB/N mice [J]. Comp Med. 2004, 54(5):524-7.
- [8] Tolwani R J, Varma S, Otto G. Use of molecular methods for genetic monitoring of an institutional mouse breeding colony [J]. Contemp Top Lab Anim Sci. 2002, 41(4):23-9.
- [9] Benavides F, Glasscock E, Coghlan L G, et al. PCR-based microsatellite analysis for differentiation and genetic monitoring of nine inbred SENCAR mouse strains [J]. Lab Anim. 2001, 35(2):157-62.

(修回日期)2010-11-05