

利用多重荧光 STR 技术分析上海地区 7 品系 常用近交系小鼠核心群的遗传特性

倪丽菊¹, 赵丽亚², 赵立虎³, 赵莹², 高诚^{1*}

(1. 上海实验动物研究中心, 上海 201203; 2. 上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 上海 201203;
3. 上海斯莱克实验动物有限责任公司, 上海 201615)

【摘要】 目的 比较上海地区 7 品系常用近交系小鼠核心群的遗传特性。**方法** 将筛选到的 48 对多态性丰富的微卫星引物组合优化, 形成 11 组多重荧光 PCR 引物混合体系, 对来自上海地区两大实验小鼠供应商的 7 品系近交系小鼠核心群的 DNA 样进行分型检测。利用遗传分析软件进行数据分析。**结果** 来自两大供应商的 7 品系近交系小鼠在 48 个微卫星位点上都为纯合子。同一种群内小鼠的 STR 位点结果均一致; 不同种群小鼠无论品系是否相同, 相互间均存在 STR 位点差异。但相同品系不同种群近交系小鼠间的遗传距离与不同品系小鼠种群间的遗传距离相比均较近。在 UPGMA 聚类树中, 相同品系的不同种群均首先两两聚成一类。C57BL/6 小鼠与其他 6 品系小鼠的亲缘关系均较远。**结论** 上海地区不同供应商的 7 品系近交系小鼠核心群间均存在 STR 位点差异。

【关键词】 近交系小鼠; 微卫星; 多重 PCR; 遗传特性

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016) 01-0072-08

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.01.013

Genetic characteristics of seven inbred mouse strains in core colonies from Shanghai analyzed using fluorescent multiplex STR

NI Li-ju¹, ZHAO Li-ya², ZHAO Li-hu³, ZHAO Ying², GAO Cheng^{1*}

(1. Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai 201203, China;

2. Sino-British SIPPR/BK Laboratory Animal Ltd. Co.,

Shanghai 201203; 3. Shanghai SLAC Laboratory Animal Ltd. Co., Shanghai 201615)

【Abstract】 Objective To analyze the genetic characteristics of seven frequently-used inbred mouse strains in core colonies from Shanghai suppliers. **Methods** 48 pairs of microsatellite primers with high polymorphism were screened out and combined into 11 sets of multiplex PCR primer mix labelled with two dyes (FAM and HEX). By these primer mix, the DNA samples of the seven strains were genotyped. The genotyping data were analyzed using statistical software. **Results** All the 48 microsatellite loci were homozygous for all inbred mice of the seven strains. On each microsatellite locus, the PCR results of the mice in the same population showed monomorphism, and that of the mice in different populations showed polymorphism, whether the populations were of the same strain or not. But the genetic distances between the populations of the same strain were all closer than that of different strains. The phylogenetic tree showed that the populations of the same strain were first get into one cluster. The genetic relationship between the strains of C57BL/6 and other six strains were all far. **Conclusions** Genetic differences exist on 48 microsatellite loci between the core colonies of seven inbred mouse strains from two suppliers in Shanghai.

[基金项目] 上海市科委基金项目 (No. 12140900402)。

[作者简介] 倪丽菊, 副研究员, 研究方向: 实验动物遗传学。E-mail: niliju@163.com

[通讯作者] 高诚, 研究员, E-mail: gaochengdgb@126.com

【Key words】 Inbred mice; Microsatellite; Multiplex PCR; Genetic characteristics

Corresponding author: GAO Cheng, E-mail: gaochengdgb@126.com

近交系小鼠作为一种重要的实验动物因具有高度的遗传同一性,被广泛应用于现代生物医学研究中,其遗传质量直接影响到动物实验的准确性、重复性和科学性。定期对其进行遗传监测是保证其遗传质量的重要措施。利用微卫星标记对小鼠进行遗传检测近年来国内有较多报道^[1-7],但各位学者所选微卫星位点的位置和数量各不相同,检测方法也有所不同,尚处于摸索阶段。对微卫星的有效筛选和高效利用是微卫星检测技术的关键。本研究将高通量的多重荧光 PCR 方法应用到小鼠微卫星检测技术中,利用筛选到的 48 个微卫星标记对上海地区两大实验小鼠供应商的 7 品系常用近交系小鼠核心群进行比较分析,以了解目前上海地区近交系小鼠种质资源的遗传特性。

1 材料与方法

1.1 DNA 样本

选择常用的 7 品系近交系小鼠, DBA/2Slac、BALB/cAnSlac、C3H/HeJSlac、C57BL/6JSlac、CBA/JSlac、FVB/NJSlac、129/S3Slac 的 DNA 样由上海斯莱克实验动物有限责任公司【SCXK(沪)2012-0002】提供, DBA/2Bkl、BALB/cBkl、C3H/HeBkl、C57BL/6Bkl、CBA/CaBkl、FVB/NJBkl、129/SvEvBrd/Bkl 的 DNA 样由上海西普尔-必凯实验动物有限公司【SCXK(沪)2013-0016】提供。将各 DNA 样浓度稀释至 25~50 ng/ μ L, -20℃ 冷冻保存

备用。所用近交系小鼠均为核心群动物, SPF 级。各单位每品系各选 6~8 只,雌雄各半。

1.2 微卫星位点的选取

参考 MMDBJ 数据库 (Mouse Microsatellite Data Base of Japan) (<http://www.shigen.nig.ac.jp/mouse/mmdbj/top.jsp>) 及文献^[8,9],选取在不同小鼠品系间多态信息丰富的位点,均匀分布于 19 条常染色体和 X 染色体,每条染色体选 2~3 位点。

1.3 试剂

微卫星扩增试剂 Type-it™ Microsatellite PCR Kit 购自 Qiagen 公司。各微卫星位点上游 PCR 引物的 5' 端用 FAM 或 HEX 荧光染料标记,所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成与标记,具体引物信息见表 1。

1.4 基因组 STR 的 PCR 分型

将筛选的 48 个 STR 位点根据产物大小、引物扩增效率和荧光标记的不同,组合成 11 组 3~5 重荧光 PCR 分型方案对两家单位的 7 品系小鼠 DNA 共计 111 份样品(必凯 56 份,斯莱克 55 份)进行分型。PCR 反应体系为 10 μ L: 2 $\times$ Type-it Multiplex PCR Master Mix 5 μ L,多重引物混合液适量,5 $\times$ Q-Solution 2 μ L,模板 DNA 75 ng, RNase-free water 补足 10 μ L。反应程序: 95℃ 热激活 5 min, 95℃ 变性 30 s, 60℃ 复性 90 s, 72℃ 延伸 30 s, 循环 28 次,最后 60℃ 延伸 30 min。

表 1 48 个小鼠微卫星位点的荧光标记引物信息

Tab. 1 The primer information of 48 mouse microsatellites

序号 No.	位点 Loci	MGI 位置 (cM) MGI position (cM)	引物序列 (5'—3') Primer sequence (5'—3')	染料 Dye
1	D1Mit58	8.30	GGACTGGCAATCCTCTTGTC GCACGTTAGAGAGTGGGCTC	HEX
2	D1mit22	32.8	TCTGTTCCCTCTACACACATGC CTACCATGCTTACCTAGGTCCTG	HEX
3	D1Mit206	95.80	TGAGGCACCTTTGTATTTCAGC CCAGATGCTTTGAACATTCTCC	HEX
4	D2Mit367	26.2	GCCTGTGCTAAAAAGAGGTG GCCCTGAGAACTACCCTCCT	FAM
5	D2Mit101	52.5	ATAATTCCTGATTGCTGTTTGTC ACATGAAGCCTAGAGGGTGC	FAM
6	D2Nds3	73.0	CCAAGCTTCCTTGTCGAAGTA AAGCCCAAAGTCCATCAGTGG	FAM
7	D3Mit22	33.7	AAGGATTGAAGAATGGTTGGG AATCAGCGATTTCAGCACG	FAM

序号 No.	位点 Loci	MGI 位置 (cM) MGI position (cM)	引物序列 (5'—3') Primer sequence (5'—3')	染料 Dye
8	D3Mit311	45.2	CGCCTGCTGCTAGTGCTG CAGTGACTTAAGTACCCCTGACTCC	HEX
9	D3Mit18	76.2	GAACAGTTCCCAGGTCCTCA CTGCCTTTAAATTCTGTCAACC	HEX
10	D4Mit166	44.5	AGTTTCCTTTCTTCTACTTGTGTG AGGGCATAGGAACTTTCAGG	HEX
11	D4Mit37	56.5	GGAAGACAAACAGTAGTGTTGG TGCCATAACAACCATGGCTA	HEX
12	D5Mit387	15.0	CCCCATGTATCTCTAGATTAACAATG GCACTCGTGTACATAACCAAATAC	FAM
13	D5Mit20	52.0	TGAATCTGTGGCCAAATGAA CTTTGCCAGAGCAGCCAT	HEX
14	D5Mit101	81.0	GGGATGACGTTTGAGTTGT CTGCTGGGATGTGGGTC	HEX
15	D6Mit166	0.6	CATTTATTTTATTGATGGATGTGTG GTTGTCTTATGGCTGCCATG	FAM
16	D6Mit304	75.0	TGGATATTCAAACACAAGTGAAGC ATTCTCTTTAAGGACCTCTATTATCG	FAM
17	D7Mit84	28.4	AACTTGCCAGCCATGGTAAG AGTTAGAAGACCCACCTAAATCC	FAM
18	D7Mit262	49.9	TCTCTAGATAGAGAGCCTTAAACGTG CTCTCTTGAGTCTGTTGTTTGTAGTG	FAM
19	D7Mit259	72.0	CCCCTCCTCTGACCTCTT GTCTCCATGGGAACCACACT	FAM
20	D8Mit4	14.0	CCAACTCATCCCCAAAGGTA GTATGTTCAAGGCTGGGCAT	FAM
21	D8Mit11	46.0	GCAGCAGTGGTAGCAAATAGC CTTAATCAGCAATCCTTGACACC	HEX
22	D8Mit245	72.0	TCCTAGGATTTGTCTAAGTTAGGTCC TCTGATATTGTTACTGGGTAAAGTGC	FAM
23	D9Mit224	17.0	AATAAATGAATGCTTACAGGAGCA TGGGGCTCAGAAAATGATTG	FAM
24	D9Mit110	48.0	CCAGAAGGGGTGTGTTTTCG CTACCCCTCCTTTCTAGTTTTGTCC	HEX
25	D10Mit279	2.0	ACAATATTGGCTATCCTCTTACACC TTCTGCAGTGCATCACAACA	FAM
26	D10Mit15	35.0	ATGCGTACAGGCAAAACACC GCTACATTGGTCTGTGACGC	FAM
27	D11Mit71	11.0	GCCATACCTGGTAGCGTGT AATTTTCAGATGTAGCCATAAGCC	HEX
28	D11Mit4	37.0	CAGTGGGTCATCAGTACAGCA AAGCCAGCCCAGTCTTCATA	FAM
29	D11Mit124	57.8	CCGGGATGAGAGACCTAACA CTGTGGGCTGTGGAAGACTT	FAM
30	D12Mit136	13.0	TTTAATTTTGTAGTGGGTTTGGC TTGCTACATGTACACTGATCTCCA	FAM
31	D12Mit141	55.0	TAGGCAAATTCATTCTCTTACTTTAGG GTGAGTCCATTGTCTGTAAGATGG	HEX
32	D13Mit117	19.0	TGGTGAACCTGATGGACG TTGCCTGCAAAGTACCCTCT	FAM
33	D13Mit30	52.0	TTTTTGATGTGTATGCTTGTGG AAAGAGAAGACGGGAGGAG	FAM
34	D14Nds1	2.5	TGCTGGCTAGGAATAAACAGA AGGGAATTCATGTTTCAGGATA	HEX

序号 No.	位点 Loci	MGI 位置 (cM) MGI position (cM)	引物序列 (5'—3') Primer sequence (5'—3')	染料 Dye
35	D14Mit62	18.5	AGGACTCAATGAGCAGGGAA ACTCTCCTGCCACCCCTC	HEX
36	D15Mit270	28.4	ATGAGGCTCAATAAGATAAGATGTG GTTGCTACTGTAAATGTCTCCTGTG	HEX
37	D15Mit241	50.2	TCCATCTACCTCATGTGCACA AAAGATTTTCATTCTTCAAATGCA	FAM
38	D15Mit79	66.2	CGAAACATTTGGGCACCTTG CCCCATTCTGAGTCTCTTG	FAM
39	D16Mit38	28.5	GGGAGGTAGACTAGCAACATGG AATGAAATACACATACCCACATGC	FAM
40	D16Mit51	66.75	CCTCAGGTCACTCAGGATTTAA CCTGTTCAACCCTCTCCACAT	FAM
41	D17Mit31	18.8	TGTTGGAGCTGAATACACGC CCCCAAATTGATCTGGTGCT	HEX
42	D17Mit123	56.7	CACAAGGAGGGAGCCTGTAG CACCGTAAGAGTCTAATAATAAGGGG	HEX
43	D18Mit31	4.0	AGCAGGAAGACCATGAGTATAAGG TGCTGGCATGAGACAAGTTC	FAM
44	D18Mit51	37.0	AACATGGTGGAAACCAACTACC AAGGGAAAGTCACCACATGC	HEX
45	D19Mit7	48.0	TCCCTTCCCACAGATAACATG CTCATGCTFGCACGCATAGT	HEX
46	D19Mit119	27.5	CACCCACATACCTTGATT CTCTCTTTATCTCTCTCTCTCT	FAM
47	DXMit48	14.2	ACCTCCCCCTGCATTACTCT TTCTCCAGAATCCATGCTCC	FAM
48	DXMit220	66.6	AGGATAAGACAATTTAGGGACTGG CTTAGGTTCTTGTTTTATTGAACACA	HEX

1.5 PCR 产物检测

将多重荧光 PCR 产物通过 ABI3730 测序仪的毛细管凝胶电泳进行扫描检测, ROX 标记的标准分子量片段^[10]为内参, 用 Gene Scan 3.1 软件收集测序仪毛细管凝胶电泳的数据, 用 Gene Mapper 软件分析各位点的片段大小。

1.6 统计分析

根据 Nei 的公式计算各品系小鼠间的遗传距离。

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

其中: r: 微卫星座位数目; m_j: 第 j 微卫星座位所具有的等位基因数目; x_{ij}、y_{ij}: 分别为 x 群体、y 群体第 j 微卫星座位第 i 等位基因的基因频率。最后, 用 MEGA 软件中的非加权组平均法 (unweighted pair group method with arithmetic means, UPMGA) 进行聚类分析, 构建聚类关系树。

2 结果

2.1 微卫星多重荧光 PCR 产物的毛细管凝胶电泳

将 48 个微卫星位点组合成 11 组多重荧光 PCR 分型方案对 7 品系 111 只近交系小鼠 DNA 样进行扩增, 产物经毛细管凝胶电泳扫描检测。图 1 为 1 只 C3H/HeBkl 小鼠在 D18Mit31、D16Mit38、D11Mit4、D5Mit20、D8Mit11 等 5 个微卫星位点上的多重 PCR 产物的扫描结果。

2.2 48 个微卫星位点的 PCR 分型结果

本实验选取的两家单位 7 品系近交系小鼠在 48 个微卫星位点的扩增结果 (见表 2) 显示都为纯合子。不同品系的近交系小鼠在各位点上表现出良好的多态性, 等位基因数为 2-7 个。同一单位的同品系小鼠在 48 个微卫星位点上的扩增结果均一致, 在种群内表现为单态性。同品系小鼠在不同单位种群间存在差异, 其中差异最大的是 CBA/CaBkl 和 CBA/JSlac, 两种群 CBA 小鼠在 16 个微卫星位点上存在差异; 其次是 C57BL/6Bkl 和 C57BL/6JSlac, 两种群 C57BL/6 小鼠在 10 个位点上存在差异; 差异最小的是 FVB/NJBkl 和 FVB/NJSlac, 两种群 FVB 小鼠只在 1 个微卫星位点上有差异。

表 2 48 个微卫星标记在各品系小鼠种群中的分型结果(bp)

Tab. 2 Results of 48 microsatellites in the 7 strains of inbred mice

位点 Loci	DBA/ 2Bkl	DBA/ 2Slac	BALB/ cBkl	BALB/ cAnSlac	C3H/ HeBkl	C3H/ HeJSlac	C57BL/ 6Bkl	C57BL/ 6JSlac	CBA/ CaBkl	CBA/ JSlac	FVB/ NJBkl	FVB/ NJSIac	129/Sv EvBrdBkl	129/ S3Slac
D1Mit58	258	258	262	262	258	258	256	256	258	258	262	262	262	262
D1mit22	132	132	138	138	134	134	132	132	132	132	132	132	132	132
D1Mit206	109	109	113	113	113	113	117	123	113	109	113	113	113	113
D2Mit367	158	158	145	145	145	145	145	148	145	145	158	158	145	145
D2Mit101	188	188	188	188	213	213	190	190	213	213	190	190	218	218
D2Nds3	262	262	421	421	262	262	262	262	262	262	259	259	259	259
D3Mit22	231	231	219	219	237	237	237	237	237	231	219	219	219	219
D3Mit311	121	121	111	111	113	113	113	121	113	113	121	121	113	113
D3Mit18	232	232	218	220	220	218	234	232	220	216	214	214	220	218
D4Mit166	200	200	185	185	185	185	198	200	200	185	200	200	174	174
D4Mit37	217	217	225	225	225	225	235	235	225	225	225	225	235	235
D5Mit387	174	174	181	181	181	181	174	174	181	183	181	181	176	176
D5Mit20	139	139	126	126	139	139	151	151	126	139	126	126	142	142
D5Mit101	128	128	114	114	114	114	128	128	128	128	114	114	126	126
D6Mit166	118	118	110	114	112	110	99	99	114	114	118	118	114	114
D6Mit304	113	113	105	105	113	113	113	113	103	103	103	103	105	105
D7Mit84	184	184	184	184	172	172	166	166	172	172	166	166	172	172
D7Mit262	92	92	107	107	92	92	107	107	92	92	107	107	92	92
D7Mit259	150	150	128	128	150	150	146	146	150	150	148	148	144	144
D8Mit4	191	191	197	197	191	191	158	158	197	197	197	197	158	158
D8Mit11	217	217	219	219	217	215	219	221	217	217	219	219	219	219
D8Mit245	101	101	103	103	103	103	101	101	101	101	101	101	101	101
D9Mit224	89	89	93	93	95	93	104	104	93	100	93	93	93	93
D9Mit110	152	152	159	159	159	165	150	150	146	146	154	154	148	148
D10Mit279	277	277	269	269	277	277	271	271	269	277	271	271	274	274
D10Mit15	182	182	170	170	174	174	170	174	174	170	178	178	174	174
D11Mit71	211	211	225	225	235	235	211	211	211	211	241	241	NULL	241
D11Mit4	287	287	244	244	244	244	250	250	297	244	250	250	297	297
D11Mit124	121	121	123	123	121	121	116	116	123	123	121	121	121	121
D12Mit136	185	185	210	215	206	210	142	142	210	215	195	191	193	193
D12Mit141	149	149	137	137	135	135	137	137	135	135	137	137	137	137
D13Mit117	119	119	125	125	125	125	133	119	125	125	100	100	100	100
D13Mit30	152	152	152	152	152	152	147	147	152	152	152	152	152	152
D14Nds1	192	192	186	186	178	178	176	176	194	194	186	186	186	186
D14Mit62	134	134	137	137	137	137	122	122	137	137	141	141	137	137
D15Mit270	189	191	177	177	177	177	197	197	177	177	197	197	197	197
D15Mit241	90	90	94	94	98	98	98	98	100	98	90	90	94	94
D15Mit79	103	103	112	112	105	105	108	108	105	105	103	103	112	112
D16Mit38	187	187	187	187	179	179	185	185	181	179	179	179	179	179
D16Mit51	160	160	160	160	158	158	160	158	162	162	166	166	160	160
D17Mit31	164	164	164	164	135	135	156	156	135	135	156	156	156	156
D17Mit123	150	148	134	134	148	148	131	129	148	136	144	144	148	148
D18Mit31	116	116	112	112	112	112	114	114	112	112	116	116	110	110
D18Mit51	194	194	152	152	200	198	198	198	200	NULL	198	198	194	194
D19Mit7	114	114	114	114	114	114	116	116	114	114	116	116	114	114
D19Mit119	266	266	274	274	266	266	256	256	266	266	266	266	270	270
DXMit48	103	103	99	99	103	103	105	105	99	103	99	99	99	99
DXMit220	120	120	127	125	120	120	122	122	120	120	120	120	120	120

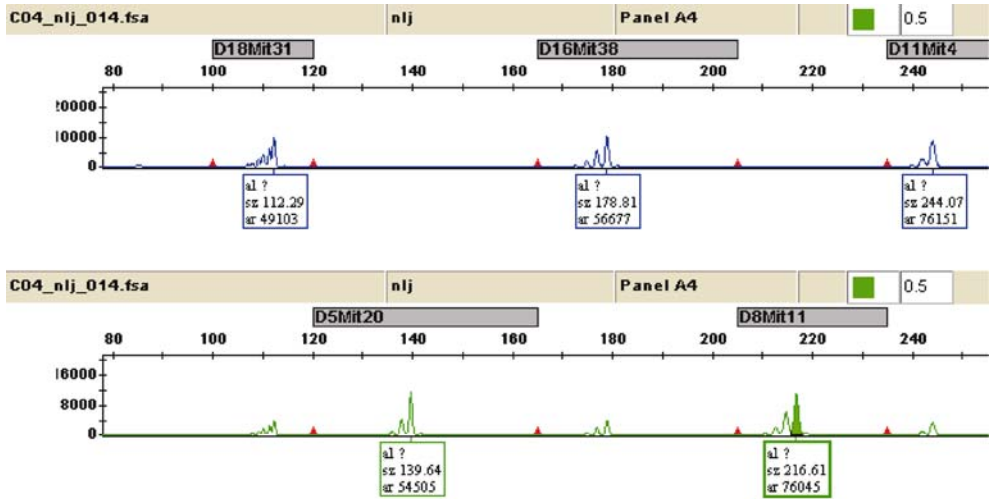


图 1 C3H/HeBkl 小鼠的一个 5 重荧光 PCR 产物的电泳扫描结果

Fig. 1 The electrophoresis results of C3H/HeBkl mouse prouducts in a 5-plex fluorescent-PCR

2.3 各种群近交系小鼠间的遗传距离分析

基于等位基因频率计算出来自两单位的 7 品系近交系小鼠共计 14 个种群间的 Nei 遗传距离,如表 3 所示。不同单位种群的同品系小鼠间的遗传距离均较近,最近的是 FVB/NJBkl 与 FVB/NJSlac 之间,

遗传距离为 0.0208;最远的是 CBA/CaBkl 和 CBA/JSlac 之间,遗传距离为 0.3333。不同品系小鼠种群间的遗传距离均较远,最远的是 C57BL/6JSlac 与 BALB/cBkl 之间和 C57BL/6JSlac 与 BALB/cAnSlac 之间,遗传距离均为 0.9583。

表 3 14 个近交系小鼠种群间的遗传距离及等位基因有差异的微卫星位点数目

Tab. 3 The genetic distance (below diagonal) and number of microsatellite loci with different alleles (above diagonal) between the 14 populations of inbred mice

位点 Loci	DBA/ 2/Bkl	DBA/ 2Slac	BALB/ c/Bkl	BALB/ cAnSlac	C3H/ He/Bkl	C3H/ HeJSlac	C57BL/ 6/Bkl	C57BL/ 6JSlac	CBA/ Ca/Bkl	CBA/ JSlac	FVB/ NJ/Bkl	FVB/ NJSlac	129/SvEv Brd/Bkl	129/S3 Slac
DBA/2/Bkl	—	2	41	41	33	34	40	37	34	30	35	35	39	39
DBA/2Slac	0.0417	—	41	41	32	33	40	37	33	30	35	35	38	30
BALB/c/Bkl	0.8542	0.8542	—	3	33	30	42	46	31	35	33	33	32	31
BALB/cAnSlac	0.8542	0.8542	0.1042	—	32	33	42	46	30	33	33	33	30	31
C3H/He/Bkl	0.6875	0.6667	0.6875	0.6667	—	7	42	42	20	20	39	39	34	35
C3H/HeJSlac	0.7083	0.6875	0.6250	0.6875	0.1458	—	41	41	21	21	37	37	34	33
C57BL/6/Bkl	0.8333	0.8333	0.8750	0.8750	0.8750	0.8542	—	10	30	39	35	35	37	37
C57BL/6JSlac	0.7708	0.7708	0.9583	0.9583	0.8750	0.8542	0.2083	—	40	42	34	34	40	40
CBA/Ca/Bkl	0.7083	0.6875	0.6458	0.6250	0.4167	0.4375	0.8333	0.8333	—	16	34	34	30	31
CBA/JSlac	0.6250	0.6250	0.7292	0.6875	0.4167	0.4375	0.8125	0.8750	0.3333	—	39	39	36	36
FVB/NJ/Bkl	0.7292	0.7292	0.6875	0.6875	0.8125	0.7708	0.7292	0.7083	0.7083	0.8125	—	1	30	29
FVB/NJSlac	0.7292	0.7292	0.6875	0.6875	0.8125	0.7708	0.7292	0.7083	0.7083	0.8125	0.0208	—	30	29
129/SvEvBrd /Bkl	0.8125	0.7917	0.6667	0.6250	0.7083	0.7083	0.7708	0.8333	0.6250	0.7500	0.6250	0.6250	—	2
129/S3Slac	0.8125	0.7917	0.6458	0.6458	0.7292	0.6875	0.7708	0.8333	0.6458	0.7500	0.6042	0.6042	0.0417	—

2.4 各种群近交系小鼠的聚类分析

根据 Nei 遗传距离,用 UPGMA 法构建的聚类树结果如图 2 所示,不同单位种群的同品系近交系小鼠均因亲缘关系最近,首先聚成一类。不同品系的近交系小鼠间,FVB 与 129 首先聚在一起,再与 BALB/c 聚成一支;C3H 与 CBA 聚在一起后,再与 DNA/2 聚成一支;两组分支聚在一起后,最后与 C57BL/6 聚类,由此可见,C57BL/6 小鼠与其他 6

品系小鼠的亲缘关系均较远。

3 讨论

近年来,微卫星标记因具有分布广、数量多、多态性高、具共显性等优点,被作为一种重要、成熟的遗传工具广泛应用于各类实验动物的遗传检测研究中。

目前,微卫星 DNA 扩增产物的电泳分型方法有琼脂糖电泳、聚丙烯酰胺电泳、毛细管凝胶电泳等。

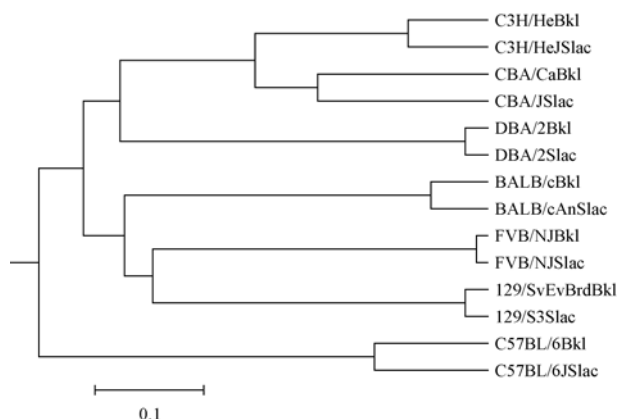


图 2 基于 Nei 遗传距离构建的 14 个近交系小鼠种群的 UPGMA 聚类树

Fig. 2 The UPGMA clustering tree based on Nei's genetic distance for 14 populations of the inbred mice

琼脂糖电泳操作简单,但由于 STR 扩增产物多数集中在 100 ~ 200 bp 之间而且某些等位基因大小比较接近,随着电泳时间的增加,一些小片段扩增产物的条带易模糊,琼脂糖凝胶的分辨率低,不能准确区分不同大小的等位基因。聚丙烯酰胺电泳是应用较多的微卫星产物分型检测方法,分辨率高,可以分辨出长度差为 1 ~ 2 bp 的 DNA 片段,但制胶和染色操作步骤繁琐,耗时、耗力、非自动化,在大规模多批次的数据收集和分析时存在相当大的难度,而且经常会有影子带的产生干扰结果的判断。DNA 全自动测序仪的毛细管凝胶电泳技术是近年来快速发展和具有广泛应用前景的新技术,该技术将荧光标记的 PCR 产物和标准分子量样品(内参)在同一毛细管中进行电泳,DNA 分析仪将结果自动记录在计算机上,利用片段分析软件进行图像收集和分析,精确计算出微卫星等位基因片段的大小。毛细管凝胶电泳检测 PCR 产物具有微量、高度自动化、结果更加准确等明显优势,是今后微卫星检测的发展方向。本研究将多重荧光 PCR 检测方法和毛细管凝胶电泳应用到了到微卫星的分型检测中,将筛选到的 48 个微卫星位点组合成 11 组多重 PCR 分型方案。该方案是在同一个 PCR 反应体系中对同一样本采用 3 ~ 5 种引物同时进行扩增检测,将实验成本降低至近四分之一,同时减少了操作时间,提高了实验效率。微卫星的多重荧光 PCR 检测技术可以有效降低成本、提高通量,使小鼠微卫星遗传检测更为简单、经济、高效和准确,可满足规模化检测的需要。

本研究建立的微卫星多重荧光 PCR 分型方案含 48 个微卫星位点,覆盖了小鼠 1 - 19 号常染色体和

X 染色体,能够较全面地从分子水平反映各品系独特的遗传概貌,可用于常用近交系小鼠种群的遗传特性分析、日常遗传质量监测、品系鉴定等。如用于品系鉴定,一组含 5 个微卫星位点的多重 PCR 反应(如图 1)即可将这 7 品系区分开。

对上海地区两大实验小鼠供应商的 7 品系近交系小鼠核心群的微卫星分析发现,两家单位各自的 7 品系小鼠种群在 48 个微卫星位点上的基因纯合度都为 100%,说明这些品系的核心群动物保持着良好的遗传稳定性。比较两家单位的 7 品系近交系小鼠共计 14 个核心群在 48 个微卫星位点上的扩增结果发现,各种群之间都有部分位点的结果存在差异,具有差异的位点数在 2 - 46 个之间。同品系近交系小鼠的不同单位种群间有差异的位点数均较少、遗传距离均较近,其中差异最大的是 CBA/CaBkl 和 CBA/JSlac,其次是 C57BL/6Bkl 和 C57BL/6JSlac,这与本课题组其他研究人员用 51 个 SNP 位点分析相同 DNA 样本的结果(另文发表)一致。作者认为,同品系不同单位种群近交系小鼠间 STR 位点存在差异的原因,一是由亚系不同导致,如 CBA/CaBkl 和 CBA/JSlac;二是由两家单位同一品系小鼠的引种单位不同引起,两个引种单位的小鼠在长期的培育过程中出现了遗传分化。不同品系的近交系小鼠种群在这 48 个位点上有着丰富的多态性,等位基因数为 2 - 7 个,以含 3 - 4 个等位基因的位点居多,达三分之二以上。不同品系的近交系小鼠中, C57BL/6JSlac 与 BALB/cBkl、BALB/cSlac 间差异最大,均有 46 个位点存在差异,遗传距离亦最远,表明 C57BL/6 小鼠与 BALB/c 小鼠间的亲缘关系最远,这与韩喜彬等^[1]用 10 个微卫星位点对辽宁省 BALB/c、C57BL/6、C57BL/10、DBA/2、FVB/N、129 等 6 品系常用近交系小鼠进行遗传质量分析时发现的结果一致。C3H/HeBkl 与 CBA/CaBkl、CBA/JSlac 间差异最小,遗传距离最近。

研究表明,上海地区两大供应商的 DBA/2、BALB/c、C3H/He、C57BL/6、CBA、FVB/NJ、129 等 7 品系小鼠核心群的遗传特性是有差异的,本研究为相关小鼠品系积累了遗传背景资料,建立的多重荧光 STR 技术可以从 DNA 水平对实验小鼠进行快速高通量的遗传监测。

(致谢:感谢上海斯莱克实验动物有限责任公司、上海西普尔 - 必凯实验动物有限公司为本研究提供近交系小鼠 DNA 样品。)

参 考 文 献

- [1] 韩喜彬, 苏玉虹, 巴彩凤, 等. 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.
- [2] 薛敬礼, 金玫蕾, 祝庆蕃. 近交系小鼠核心群和生产群遗传质量监测 [J]. 郑州大学学报(医学版), 2006, 41(5): 859–861.
- [3] 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.
- [4] 吴宝金, 茅慧华, 朱洪, 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.
- [5] 王越甲, 杨伟峰, 车路平, 等. 利用优选的微卫星标记建立常用大小鼠品系的遗传监测体系 [J]. 实验动物科学, 2014, 31(3): 5–9, 14.
- [6] 牛屹东, 梁署龙. 三个近交系 C57BL/6J 小鼠群体微卫星遗传变异分析 [J]. 动物学研究, 2008, 29(6): 599–602.
- [7] 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.
- [8] Schalkwyk LC, Jung M, Daser A, et al. Panel of microsatellite markers for whole-genome scans and radiation hybrid mapping and a mouse family tree [J]. Genome Res, 1999, 9: 878–887.
- [9] Nitzki F, Kruger AK, Wojnowski L, et al. Identification of a genetic contamination in a commercial mouse strain using two panels of polymorphic markers [J]. Lab Animals, 2007, 41: 218–228.
- [10] De Woody AJ, Schupp J, Kenefic L, et al. Universal method for producing ROX-labeled size standards suitable for automated genotyping [J]. Biotechniques, 2004, 37(3): 348–352.

[收稿日期] 2015-07-24

(上接第 58 页)

关系,三种小鼠的死亡与心脏系统传导阻滞引起的心律失常等有关,且 Tg(+)型小鼠对药物引起的心脏毒性比 WT 型小鼠更为敏感,而 sTg(+)型小鼠则是一个很好的心脏保护模型。

基因修饰动物模型是国内外实验室研究的热点,本实验中 Tg(+)型小鼠不仅可以更真实地评价药物的毒性作用,而且相对于 WT 型小鼠,在具有潜在心脏毒性作用的药物毒性评价中灵敏性更高,有望在心血管系统的药物安全性评价中广泛应用,提高药物临床前评价结果与临床的相关性,减少临床用药风险。

参 考 文 献

- [1] Knockaert L, Descatoire V, Vadrot N, et al. Mitochondrial CYP2E1 is sufficient to mediate oxidative stress and cytotoxicity induced by ethanol and acetaminophen [J]. Toxicol in Vitro, 2011, 25(2): 475–484.
- [2] Neafsey P, Ginsberg G, Hattis D, et al. Genetic polymorphism in CYP2E1: population distribution of CYP2E1 activity [J]. Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2009, 12(5–6): 362–388.
- [3] Pugsley MK, Gallacher DJ, Towart R, et al. Methods in safety pharmacology in focus [J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2008, 58(2): 69–71.
- [4] Foster WR, Chen SJ, He A, et al. A retrospective analysis of toxicogenomics in the safety assessment of drug candidates [J]. Toxicol Pathol, 2007, 35(5): 621–635.
- [5] O'Shea D, Davis SN, Kim RB, et al. Effect of fasting and obesity in humans on the 6-hydroxylation of chlorzoxazone: a putative probe of CYP2E1 activity [J]. Clin Pharmacol Ther, 1994, 56(4): 359–367.
- [6] Kathirvel E, Chen P, Morgan K, et al. Oxidative stress and regulation of anti-oxidant enzymes in cytochrome P4502E1 transgenic mouse model of non-alcoholic fatty liver [J]. Gastroenterol Hepatol, 2010, 25(6): 1136–1143.
- [7] Scheen AJ. Controversy about the cardiovascular safety of sibutramine [J]. Drug Safety, 2010, 33(7): 615–618.
- [8] Scheen AJ. Sibutramine on cardiovascular outcome [J]. Diabetes Care, 2011, 34(Suppl 2): S114–119.
- [9] Chen GL, Li L, Yan SX, et al. Anti-obesity effect of sibutramine hydrochloride in alimentary obesity rats [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2003, 8(1): 55–58.
- [10] Kieken F, Mutsaers N, Dolmatova E, et al. Structural and molecular mechanisms of gap junction remodeling in epicardial border zone myocytes following myocardial infarction [J]. Circ Res, 2009, 104(9): 1104–1112.

[收稿日期] 2015-09-09