

微卫星 DNA 标记对 BALB/c 突变卷毛小鼠遗传特性的分析

李晓娟¹, 孙兆增², 冯帆¹, 姜棋予¹, 孙慧伟¹, 李润¹, 柴燕涛¹, 侯俊^{1*}, 李瑞生^{1*}

(1. 解放军第302医院临床研究管理中心, 北京 100039; 2. 军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071)

【摘要】 目的 利用微卫星 DNA 标记技术对 BALB/c 突变卷毛小鼠与正常 BALB/c 小鼠进行遗传检测, 旨在分析 BALB/c 突变卷毛小鼠与正常小鼠之间存在的遗传差异。**方法** 选取 38 个微卫星 DNA 位点结合荧光 PCR 技术和 STR 扫描基因型来检测 BALB/c 突变卷毛小鼠、无毛小鼠与正常小鼠三个群体的遗传变异情况。**结果** 38 个微卫星位点在 BALB/c 突变卷毛小鼠与正常小鼠之间有 27 个微卫星位点相同, 有 11 个位点存在差异, 其突变率为 28.9% (11/38); BALB/c 突变无毛小鼠与正常小鼠之间有 30 个位点完全相同, 8 个位点存在差异, 其突变率为 21.1% (8/38); 而 BALB/c 突变卷毛小鼠与无毛小鼠间也有 12 个位点存在差异。**结论** BALB/c 突变卷毛小鼠的突变率较高, 且明显高于无毛小鼠, 证明了卷毛小鼠突变与无毛小鼠突变是两个完全不同的突变系, 为今后研究和开发应用 BALB/c 突变卷毛小鼠提供可靠的理论数据。

【关键词】 BALB/c 突变卷毛小鼠; STR; 荧光 PCR

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 02-0080-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.02.014

Analysis of genetic characteristics of BALB/c mutant curly mice by microsatellite DNA markers

LI Xiaojuan¹, SUN Zhaozeng², FENG Fan¹, JIANG Qiyu¹, SUN Huiwei¹, LI Run¹, CHAI Yantao¹,
HOU Jun^{1*}, LI Ruisheng^{1*}

(1. Research Center for Clinical Medicine, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China; 2. Laboratory Animal Center, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

【Abstract】 Objective BALB/c mutant curly mice and normal BALB/c mice were genetically detected by microsatellite DNA marker analysis to detect the differential microsatellite loci between BALB/c mutant curly mice and normal mice. **Methods** 38 microsatellite DNA loci were selected and their variation in the BALB/c mutant curly mice, BALB/c mutant hairless mice and normal BALB/c mice were detected by multiplex fluorescence PCR and STR scanning genotyping. **Results** There were 27 the same microsatellite loci between the 38 microsatellite loci in BALB/c mutant curly mice and normal mice, and there were 11 differential loci, with a mutation rate of 28.9% (11/38). There were 30 the same sites between BALB/c mutant hairless mice and normal mice, and there were 8 different loci, with a mutation rate of 21.1% (8/38). There were also 12 differential loci between BALB/c mutant curly mice and hairless mice. **Conclusions** BALB/c mutant curly mice have a higher mutation rate and are significantly higher than those of hairless mice,

【基金项目】 军队实验动物专项基金面上项目 (SYDW(2016) - 005)。

【作者简介】 李晓娟 (1980—), 女, 博士研究生。E-mail: sxlily55@163.com

【通信作者】 李瑞生 (1969—), 男, 博士, 副研究员, 主要从事人类疾病动物模型研究。E-mail: lrsheng@sohu.com。

侯俊 (1973—), 女, 博士, 副主任技师。E-mail: houjun5757@sina.com。* 共同通信

demonstrating that the mutations in curly mice and hairless mice are two completely different mutations. These results provide reliable theoretical data for the future study and development of BALB/c mutant curly mice.

【Key words】 BALB/c mutant curly mice; STR; fluorescence PCR

实验动物遗传背景的一致性和多样性,是衡量实验动物品质的一个重要因素,因此在实验动物的饲养与繁育中,发现和培育具有特殊生物学性能的动物品系是非常重要的^[1]。本实验室于 2012 年发现的 BALB/c 卷毛小鼠,通过五年多的近交培育现已完全成为一个遗传稳定的近交系突变卷毛小鼠品系^[2]。微卫星又称短串联重复序列(short tandem repeat,STR),作为分子标记在实验动物的遗传质量检测和科学研究中已得到了广泛地应用^[3-6]。本研究将高通量的荧光 PCR 技术应用到小鼠微卫星 DNA 遗传检测中,利用筛选出的 38 个微卫星位点标记对 BALB/c 正常小鼠、突变卷毛小鼠和突变无毛小鼠等三个品系进行检测分析,旨在了解 BALB/c 突变卷毛小鼠与正常近交系 BALB/c 小鼠的遗传背景是否存在差异以及差异的程度,以期建立近交系 BALB/c 突变卷毛小鼠种质资源的遗传特性,为后期建系保种、品系培育以及科学研究提供重要的科学依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选取近交培育的 SPF 级 BALB/c 突变卷毛小鼠(来源解放军第 302 医院动物实验室)、BALB/c 正常小鼠和突变无毛小鼠(来源军事医学科学院实验动物中心[SCXK(军)2012-0004])各 10 只,雌雄各半,体重 18~20 g。本实验室使用许可证[SYXK(军)2012-0010],并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 样本制备

取小鼠尾巴剪成米粒大小,加入 DNA 提取液和蛋白酶 K 过夜消化,采用酚/氯仿抽提法提取基因组 DNA,最终稀释成 50~100 ng/ μ L 作为 DNA 模板^[7]。

1.2.2 微卫星位点的选择及荧光标记

本研究选 D1Mit365、D2Mit15、D2Mit30、D3Mit29、D3Mit51、D4Mit235、D5Mit48、D6Mit8、D6Mit15、D6Mit102、D7Mit12、D7Mit281、D8Mit14、D8Mit33、D8Mit113、D9Mit21、D9Mit23、D10Mit12、D10Mit180、D11Mit4、D11Mit128、D12Mit7、D12Nds11、D12Mit147、

D13Mit3、D14Mit3、D14Mit102、D15Mit5、D15Mit15、D16Mit9、D16Mit145、D17Mit36、D17Nds3、D18Mit9、D18Mit19、D18Mit94、D19Mit3 和 DXMit16 等 38 个微卫星位点参考 MMDBJ 数据库(Mouse Microsatellite Data Base of Japan)及文献^[8],以在不同小鼠品系间多态信息丰富的位点为主,均匀分布于 19 条常染色体和 X 染色体上,引物由北京睿博兴科生物技术有限公司合成,各微卫星位点上游 PCR 引物的 5' 端均用 FAM 荧光染料进行标记。

1.2.3 荧光引物 PCR 扩增

PCR 反应体系为 10 μ L; 2 $\times$ Type-it Multiplex PCR Master Mix 5 μ L,上下游引物(10 μ mol/L)各 0.1 μ L,模板 DNA 0.5 μ L,RNase-free water 补足 10 μ L。PCR 反应程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s;退火温度 58 $^{\circ}$ C 和 53 $^{\circ}$ C,30 s;72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s;20 个循环;72 $^{\circ}$ C 继续延伸 10 min;扩增产物 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.4 PCR 产物检测及 STR 扫描

四种 PCR 产物各取 0.3 μ L、分子量内标 0.5 μ L 和去离子甲酰胺 9.5 μ L 混合加入 PCR 板,95 $^{\circ}$ C 变性 5 min,4 $^{\circ}$ C 冷却后离心,1 $\times$ buffer 缓冲液上机检测。将荧光标记的 PCR 产物通过 ABI3730 测序仪的毛细管凝胶电泳进行扫描检测,用 Genemarker 2.2.0 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。

2 结果

2.1 三个品系小鼠间 STR 扫描相同微卫星位点结果分析

对三个品系小鼠的 38 个微卫星位点 STR 扫描检测结果显示:BALB/c 突变卷毛小鼠与正常小鼠间有 27 个位点的 DNA 片断完全相同,且突变卷毛雌雄鼠间也完全相同,如 D2Mit30 位点(见图 1),与无毛突变鼠间有 26 个位点相同;而无毛突变鼠与正常小鼠间有 30 个位点相同(见表 1)。

2.2 三个品系小鼠间 STR 扫描不同微卫星位点结果分析

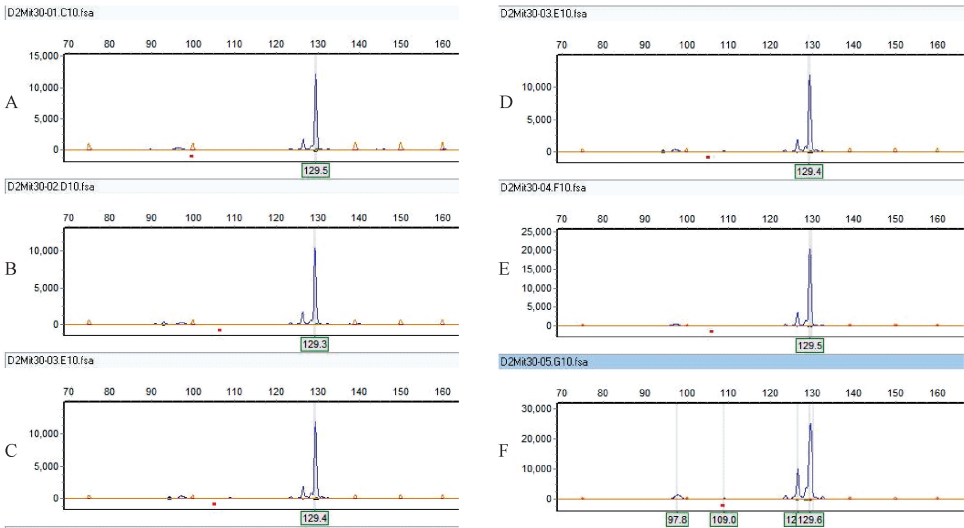
STR 扫描检测结果显示:BALB/c 突变卷毛小鼠与正常小鼠间有 11 个位点存在差异,而突变卷毛雌雄鼠间完全相同,如 D6Mit15 位点(见图 2),与无毛小鼠间有 12 个位点存在差异,且卷毛鼠与其他两

个品系间有 5 个位点交叉存在差异;而正常 BALB/c 鼠与无毛鼠间有 8 个位点存在差异(见表 1)。

2.3 三个品系小鼠间差异性位点的数量及遗传突变率的分析

38 个位点中 BALB/c 突变卷毛鼠与正常小鼠间有 11 个位点发生突变,其突变率为 28.9%,与无

毛小鼠间有 12 个位点存在差异,其突变率为 31.6%;而 BALB/c 突变无毛小鼠与正常鼠间有 8 个位点发生突变,其突变率为 21.1%。结果表明 BALB/c 突变卷毛鼠的突变率明显高于无毛小鼠(见表 2)。

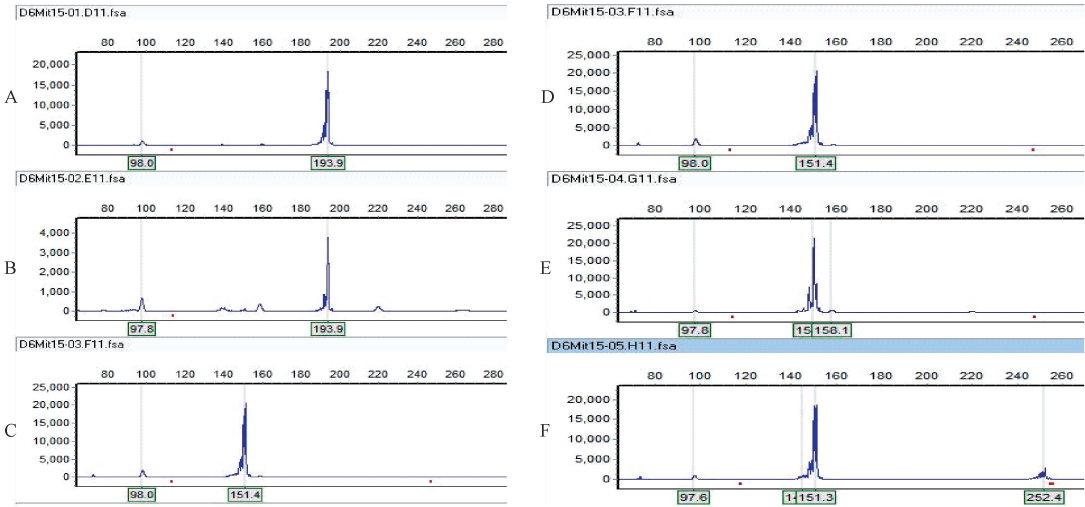


注:A;BALB/c 正常鼠(♂);B: BALB/c 无毛鼠(♂);C~D: BALB/c 卷毛鼠(♂);E~F: BALB/c 卷毛鼠(♀);A~F 波峰值全部相同;纵坐标为波峰高度,横坐标为扫描时间。

图 1 D2Mit30 位点的微卫星扫描波形

Note. A: BALB/c mouse (♂). B: Mutant hairless mouse (♂). C-D: Mutant curly mice (♂). E-F: Mutant curly mice (♀). The peaks are all the same in A-F. Y-axis is the peak height, X-axis is the scan time.

Fig. 1 The waveforms of loci D2Mit30 in STR scanning



注:A;BALB/c 正常鼠(♂);B: BALB/c 无毛鼠(♂);C~D: BALB/c 卷毛鼠(♂);E~F: BALB/c 卷毛鼠(♀);A~B 与 C~F 的波峰值不同;纵坐标为波峰高度,横坐标为扫描时间。

图 2 D6Mit15 位点的微卫星扫描波形

Note. A: BALB/c mouse (♂). B: Mutant hairless mouse (♂). C-D: Mutant curly mice (♂). E-F: Mutant curly mice (♀). The peaks in A-B are different from that in C-F. Y-axis is the peak height. X-axis is the scan time.

Fig. 2 The waveforms of loci D6Mit15 in STR scanning

表 1 38 个微卫星标记在三个种群小鼠中的分型结果 (bp)

Tab.1 Results of 38 microsatellites in genotyping of the 3 strains of inbred mice

序号 No.	位点 Loci	正常鼠 ♂ Normal mouse ♂	卷毛鼠 ♂ Curly mouse ♂	卷毛鼠 ♂ Curly mouse ♂	卷毛鼠 ♂ Curly mouse ♂	卷毛鼠 ♀ Curly mouse ♀	卷毛鼠 ♀ Curly mouse ♀	卷毛鼠 ♀ Curly mouse ♀	无毛鼠 ♀ Hairless mouse ♀	正常鼠 ♀ Normal mouse ♀
1	D2Mit15	140	140	140	140	140	140	140	140	140
2	D2Mit30	130	130	130	130	130	130	130	130	130
3	D3Mit51	256	256	256	256	256	256	256	256	256
4	D4Mit235	93	93	93	93	93	93	93	93	93
5	D6Mit8	187	187	187	187	187	187	187	187	187
6	D6Mit102	132	132	132	132	132	132	132	132	132
7	D7Mit12	198/200	198/200	198/200	198/200	198/200	198/200	198/200	198/200	198/200
8	D7Mit281	137	137	137	137	137	137	137	137	137
9	D8Mit33	222	222	222	222	222	222	222	222	222
10	D8Mit113	159	159	159	159	159	159	159	159	159
11	D9Mit23	205	205	205	205	205	205	205	205	205
12	D10Mit12	238	238	238	238	238	238	238	238	238
13	D11Mit4	246	246	246	246	246	246	246	246	246
14	D12Mit7	119/121	119/121	119/121	119/121	119/121	119/121	119/121	119/121	119/121
15	D14Mit102	133	133	133	133	133	133	133	133	133
16	D14Mit3	228	228	228	228	228	228	228	228	228
17	D15Mit5	96	96	96	96	96	96	96	96	96
18	D16Mit145	115/129	115/129	115/129	115/129	115/129	115/129	115/129	115/129	115/129
19	D16Mit9	124	124	124	124	124	124	124	124	124
20	D17Mit36	111	111	111	111	111	111	111	111	111
21	D17Nds3	123	123	123	123	123	123	123	123	123
22	D18Mit9	155	155	155	155	155	155	155	155	155
23	D19Mit3	198	198	198	198	198	198	198	198	198
24	DXMit16	93	93	93	93	93	93	93	93	93
25	D9Mit21	192	192	192	192	192	192	<u>192</u>	<u>214</u>	<u>192</u>
26	D12Nds11	178	178	178	178	178	178	<u>178</u>	<u>176</u>	<u>178</u>
27	D15Mit15	156	156	156	156	156	156	<u>156</u>	<u>146</u>	<u>156</u>
28	D1Mit365	<u>106</u>	<u>94</u>	94	94	94	94	94	<u>94</u>	<u>106</u>
29	D11Mit128	<u>125</u>	<u>127</u>	127	127	127	127	127	<u>127</u>	<u>125</u>
30	D3Mit29	<u>203</u>	<u>145</u>	145	145	145	145	<u>145</u>	<u>147</u>	<u>203</u>
31	D6Mit15	<u>194</u>	<u>152</u>	152	152	152	152	<u>152</u>	194	194
32	D8Mit14	<u>163</u>	<u>139</u>	139	139	139	139	<u>139</u>	163	163
33	D10Mit180	<u>148</u>	<u>128</u>	128	128	128	128	<u>128</u>	148	148
34	D12Mit147	<u>189</u>	<u>149</u>	149	149	149	149	<u>149</u>	189	189
35	D13Mit3	<u>189</u>	<u>165</u>	165	165	165	165	<u>165</u>	189	189
36	D18Mit19	<u>154</u>	<u>152</u>	152	152	152	152	<u>152</u>	<u>158</u>	<u>154</u>
37	D18Mit94	<u>140</u>	<u>124</u>	124	124	124	124	<u>124</u>	140	140
38	D5Mit48	<u>194</u>	<u>202</u>	202	202	202	202	<u>202</u>	<u>226</u>	<u>194</u>

表 2 38 个微卫星位点在三个小鼠种群中的突变率

Tab.2 The mutation rate of 38 microsatellite loci in the three mouse populations

品系 Inbred strains	BALB/c 小鼠 BALB/c mouse	无毛小鼠 Hairless mouse	卷毛小鼠 Curly mouse
BALB/c 小鼠 BALB/c mouse	—	21.1% (8/38)	28.9% (11/38)
无毛小鼠 Hairless mouse	21.1% (8/38)	—	31.6% (12/38)
卷毛小鼠 Curly mouse	28.9% (11/38)	31.6% (12/38)	—

3 讨论

微卫星 DNA 标记主要具有分布广、多态性高、遗传稳定、数量多和片段短容易扩增等优势,而被作为一种非常重要、成熟的遗传工具广泛应用于各类实验动物的遗传检测和科学研究中^[9]。小鼠基因组图谱已包含了 7377 个微卫星 DNA,其中有 6580 个具有显著的多态性^[10],能够更全面地反映出基因组的遗传特性及变异情况。目前应用微卫星标记方法不但可以进行纯合位点的判定,而且还能对基因位点的变异情况进行统计分析^[11]。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起来的一种新技术,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,而更精确地计算出微卫星位点的等位基因片段大小,是遗传检测研究的主要发展方向^[12]。

由于 BALB/c 突变卷毛小鼠和无毛小鼠均是由正常 BALB/c 小鼠突变产生的^[13],因此本研究结合荧光 PCR 检测方法和毛细管凝胶电泳法应用到微卫星的分型检测中,将筛选的 38 个微卫星位点对正常 BALB/c 小鼠、BALB/c 突变卷毛小鼠与 BALB/c 突变无毛小鼠这三个群体的遗传背景进行检测分析,结果发现 38 个微卫星位点在 BALB/c 突变卷毛小鼠和正常小鼠之间有 27 个微卫星位点是完全相同的,有 11 个位点存在差异,其突变率为 28.9% (11/38)接近三分之一,显示其突变率较高。而 BALB/c 无毛小鼠与正常小鼠之间有 30 个位点相同,8 个位点存在差异,其突变率为 21.1% (8/38),相比发现突变卷毛小鼠其突变率明显高于无毛小鼠。而 BALB/c 突变卷毛小鼠与无毛小鼠之间也有 12 个位点存在差异,证明了卷毛小鼠突变与无毛小鼠突变是两个完全不同的突变系。突变无毛小鼠的生理生化指标、染色体定位以及皮肤结构的差异都已得到了证实^[13]。实验前期本实验室也证实了 BALB/c 突变卷毛小鼠的血液生化指标、皮肤组织结构以及生长发育指标均与正常小鼠存在差异^[14-15],从而说明了 BALB/c 突变卷毛小鼠是一个非常宝贵难得的突变系小鼠。

总之,本实验应用 38 个微卫星位点结合荧光 PCR 微卫星标记检测技术,对 BALB/c 突变卷毛小鼠的变异情况进行遗传检测分析,旨在发现 BALB/c

c 突变卷毛小鼠与正常小鼠之间存在的差异以及差异的程度,为今后进一步研究 BALB/c 突变卷毛小鼠的遗传特性和未来开发应用该突变系小鼠模型提供可靠的理论参考。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 李晓娟,张巧云,李蓓,等. BALB/c 突变卷毛小鼠部分生长发育指标[J].中国比较医学杂志,2013,23(11):36-39.
- [3] Basta PV, Whitmore SP, Basham KB, et al. Microsatellite analysis in FVB/N mice [J]. Comp Med, 2004, 54(5): 524-527.
- [4] Katoh H, Yoshino S, Inui Y, et al. Microsatellite genotyping for genetic quality testing using sperm cells in the mouse [J]. Exp Anim, 2005, 54(4): 373-376.
- [5] 陈振文,欧阳兆和,董罡,等.用微卫星标记技术对国内 BALB/c 小鼠遗传质量的分析[J].遗传,2004,26(6):845-848.
- [6] 王纯耀,杨卫红,宋国英,等.微卫星 DNA 在近交系小鼠遗传监测中的应用[J].中国兽医学报,2008,28(3):333-335.
- [7] 崔智,李晓娟,白云峰,等. PLC ϵ 基因敲除小鼠微卫星 DNA 遗传监测分析[J].中国比较医学杂志,2012,22(10):19-22.
- [8] Nitzki F, Kruger A, Reifenberg K, et al. Identification of a genetic contamination in a commercial mouse strain using two panels of polymorphic markers [J]. Lab Anim, 2007, 41(2): 218-228.
- [9] 范涛,王洪,魏杰,等.不同来源高度免疫缺陷小鼠微卫星 DNA 遗传检测的分析[J].中国比较医学杂志,2016,26(8):91-95.
- [10] Dietrich WF, Miller J, Steen R, et al. A comprehensive genetic map of the mouse genome [J]. Nature, 1996, 380(6570): 149-152.
- [11] Morin PA, Wallis J, Moore JJ, et al. Paternity exclusion in a community of wild chimpanzees using hypervariable simple sequence repeats [J]. Mol Ecol, 1994, 3(5): 469-477.
- [12] 倪丽菊,赵丽亚,赵立虎,等.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[J].中国实验动物学报,2016,24(1):72-79.
- [13] 仇志华,王冬平,李瑞生,等. BALB/c 突变无毛小鼠研究概况[J].实验动物科学与管理,2004,21(3):42-46.
- [14] 李晓娟,李硕,白冰珂,等. BALB/c 突变卷毛小鼠皮肤组织结构的分析[J].中国比较医学杂志,2014,24(4):47-50,4.
- [15] 李瑞生,李晓娟,汤紫荣,等. BALB/c 突变卷毛小鼠血液学指标的检测分析[J].中国比较医学杂志,2014,24(11):41-44.

[收稿日期]2017-07-24