

王洪,戴方伟,王静,等. 实验动物遗传质量控制微卫星标记检测法重复性研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(1): 84-89,118.
Wang H, Dai FW, Wang J, et al. Reproducibility of microsatellite detection for the genetic quality control of laboratory animals [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(1): 84-89,118.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.01.015

实验动物遗传质量控制微卫星标记检测法重复性研究

王洪¹,戴方伟²,王静³,魏杰¹,杜江涛²,黄树武³,贾松华¹,岳秉飞^{1*}

(1. 中国食品药品检定研究院,北京 102629;2. 浙江省医学科学院,杭州 310013;
3. 广东省实验动物监测所,广州 510663)

【摘要】 目的 验证团体标准中微卫星标记检测法应用于实验动物遗传质量检测,在3家实验室是否具有较好的重复性。**方法** 3家实验室同时应用12个微卫星位点对6份实验小鼠DNA进行PCR扩增,扩增产物经琼脂糖电泳和测序。**结果** 北京实验室获得清晰电泳条带,获得等位基因数72个;浙江实验室获得清晰电泳条带,获得等位基因数72个;广东实验室获得清晰电泳条带,获得等位基因数72个。测序结果表明3家实验室获得片段大小一致的等位基因。**结论** 微卫星标记检测法可以实现对实验动物的遗传质量评价,并在不同实验室获得较好的重复性。

【关键词】 微卫星;实验动物;遗传检测;重复性

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019)01-0084-06

Reproducibility of microsatellite detection for the genetic quality control of laboratory animals

WANG Hong¹, DAI Fangwei², WANG Jing³, WEI Jie¹, DU Jiangtao²,
HUANG Shuwu³, JIA Songhua¹, YUE Bingfei^{1*}

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China. 2. Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013. 3. Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangzhou 510663)

【Abstract】 Objective To verify the reproducibility of microsatellite detection for the genetic quality control of laboratory animals in three different laboratories. **Methods** DNA of six laboratory mice was amplified using 12 microsatellites in three laboratories. PCR products were analyzed by electrophoresis and sequencing. **Results** Clear electrophoresis bands and 72 alleles were obtained in the Beijing laboratory of National Institutes for Food and Drug Control (NIFDC), the Zhejiang laboratory, and the Guangdong laboratory. Sequencing results showed that the alleles identified were the same in the three different laboratories. **Conclusions** Microsatellites can be used for the genetic quality control of laboratory animals, with a good reproducibility between different laboratories.

【Keywords】 microsatellites; laboratory animals; genetic monitoring; reproducibility

微卫星 (microsatellites), 也叫做短串联重复心序列和相对保守的侧翼序列组成。根据侧翼序列 (short tandem repeat, STR)。该序列由2~6 bp的核列设计引物,扩增结果能够反映出不同品系或不同

【基金项目】 国家重大专项(2017ZX10304402002006)重大及突发传染病动物模型研制及关键技术研究。

【作者简介】 王洪(1977—),女,硕士,研究员,研究方向:实验动物遗传学。Email: littstar@163.com

【通信作者】 岳秉飞(1960—),男,博士,研究员,研究方向:实验动物遗传学。Email: y6784@126.com

个体的实验动物的核心序列重复个数的差异。对不同品系或不同群体在微卫星核心序列上的差异进行统计分析,获取实验动物的遗传背景信息。参照实验动物国家标准 GB 14923-2010^[1],“可选用 DNA 多态性检测法进行群体遗传质量检测”。我们国家的实验动物遗传质量检测标准 GB/T 14927.1-2008^[2]仍采用生化标记检测法,而美国 Jackson 实验室和 Charles River 实验室均采用微卫星标记以及 SNP 标记等分子生物学方法^[3-4]。

实验动物的遗传质量控制是所有其他质量控制的基础,只有在遗传质量满足标准要求的前提下,其他方面的质量控制才有意义。为了满足送检单位的需求,提升检测能力,满足国际合作与交流的需要,急需建立微卫星标记方法的检测标准,为实验动物遗传质量控制提供检测依据。本研究针对团体标准^[5]中微卫星标记检测法,在 3 家实验室进行方法验证,证实该方法能否用于实验动物遗传质量检测,在不同的实验室是否具有较好的重复性^[6]。

1 材料和方法

1.1 实验动物

6 只 C57BL/6J 实验小鼠,SPF 级,8 周龄,雌雄

各半,体重 20~22 g,来源于国家啮齿类实验动物种子中心[SCXK(京)2014-0013]。小鼠取材于中国食品药品检定研究院动物实验设施[SYXK(京)2016-0004],并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

Tris 饱和酚,氯仿,异戊醇,采购于国药集团化学试剂有限公司;Takara HS Taq 酶(R007B),100 bp DNA ladder(3422A),DL500 DNA marker 购自 TaKaRa(A701A 和 A801C),琼脂糖(5260)和 6× loading buffer(A6101)均购自北京六合通经贸有限公司。所用 PCR 仪为美国 ABI VeritiTM96;微量分光光度计为美国 Thermo Nanodrop 2000;凝胶成像系统为美国 Kodak GL212Pro;基因测序仪 ABI3730xl。

1.3 实验方法

1.3.1 微卫星位点选取

本研究随机选取团体标准^[5]中 12 个微卫星位点,所用引物信息见表 1。

1.3.2 模板 DNA 提取^[7]

实验小鼠尾尖组织样本 5 mm,用酚/氯仿抽提法提取基因组 DNA。经微量分光光度计检测,将所有 DNA 浓度均稀释为 50 ng/μL。

表 1 微卫星位点引物序列

Table 1 Primers used for microsatellite detection

序号 No.	微卫星位点 Microsatellites	引物(5'→3') Primers	退火温度(°C) Annealing temperature	片段长度(bp) Product length
1	D2Mit15	CTTGAAAAACACATCAAAAATCTGC ATGCCITTAGAAGAATTTGTTC	54	139
2	D6Mit102	GTATACCCAGTTGTAATCTTGTGTG CCATGTGGATATCTTCCCTTG	54	141
3	D7Mit281	GCCACAAGGAAGACACCATT TTCCTTACCTCCTGAGCCA	60	110
4	D15Mit5	GTTTCATTGGTCAATGAACTTA CTTCTAATTCCTGTCAAGCAAAT	54	95
5	D16Mit9	CCTCCTTGCCAGCTAAAC TCTTGCTCTGGTATCAACTACAGG	55	143
6	D18Mit19	ATGCACAATAGCTCATAGTTCT ATTGGGTGTTACAGTGCAG	55	151
7	D19Mit16	TGGTAAATGTAAACTGAAGCATG TCTTAGGTAATCTCCCTTAGGGG	54	132
8	DXMit16	CCGGAGTACAAAGGGAGTCA CTGCAATGCCTGCTGTTTA	58	110
9	D9Mit21	TATAGTCCATTGTGGCAGAGGAGT CAGTCCCTGGTTAATAACAACAAC	59	194
10	D9Mit24	CTGATGATCACCTCATTCTGAG CCTTCTAAACACAGGCTTTTGTGAG	60	130
11	D12Nds11	GGAACCTTCATGCAGTACTAG CATTTGAGGACAGTCAGGATC	54	174
12	D15Mit15	AATAAATACCAGAGAAGCACCGTG AGCATACACTCTCTTGTTCCTGCT	60	158

1.3.3 PCR 体系和反应条件^[7]

PCR 反应体系为 20 μL , 其中含 10 \times PCR buffer; 2 μL , 上下游引物 (10 pmol/ μL): 各 1 μL , dNTP (100 $\mu\text{mol/L}$): 1.2 μL , Taq 酶 (5 U/ μL): 1 μL , 50 ng/ μL 基因组 DNA: 1 μL , 镁离子终浓度 1.5 mmol/L, 无菌蒸馏水补齐 20 μL 。反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性, 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性, 30 s; 退火温度 (见表 1), 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸, 30 s; 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 继续延伸 8 min; 扩增产物 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

PCR 扩增产物在 2.5% 琼脂糖凝胶电泳, 120 V, 30 min。

分别位于北京、浙江、广东的 3 家实验室用同样的 12 个微卫星位点对 6 份实验小鼠 DNA 模板进行 PCR 扩增和电泳。北京实验室电泳使用 100 bp DNA ladder, 浙江和广东实验室电泳使用 DL500 DNA marker。

1.3.4 测序^[7]

对 PCR 扩增结果进行 STR 扫描测序。

1.4 统计学方法

对测序结果进行统计分析。所用软件 POPGENE 1.32 和 PIC Calc 0.6。

2 结果

北京、浙江和广东的 3 家实验室分别获得清晰电泳条带, 获得等位基因数 72 个。其中 D16Mit9 位点在 6 只 C57BL/6 J 小鼠获得一致的 143 bp 的等位基因片段。D12Nds11 位点在 6 只 C57BL/6 J 小鼠获得一致的 174 bp 的等位基因片段。详见图 1A~1F, 图 2A~2F 和图 3A~3F 测序结果表明 3 家实验室获得片段大小一致的等位基因。12 个微卫星位点在 6 只实验小鼠的等位基因片段长度见表 2。

3 讨论

微卫星标记检测法是国内外通用的实验动物

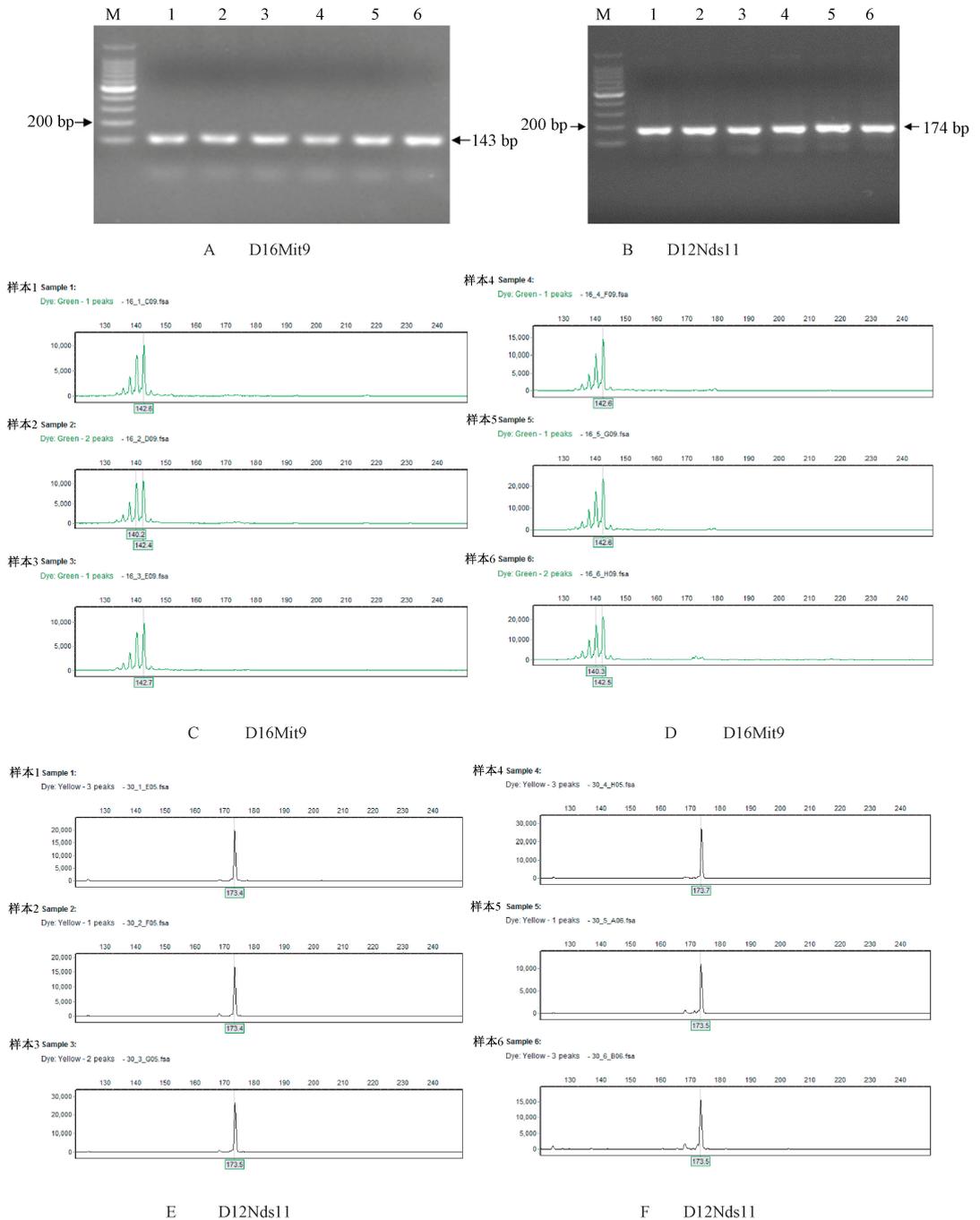
遗传质量评价手段。国外实验室对于实验动物遗传质量的控制主要采取微卫星 DNA 标记检测法和 SNP 方法^[8-9], 为满足国际合作与交流的需要, 本研究验证了本实验室建立的微卫星标记检测法在实验动物遗传质量检测领域应用的可行性以及可重复性。

基于微卫星标记检测法的重要性, 近些年来, 已有科研人员在微卫星方法的建立及应用方面开展过一些研究。周建华等人^[10]采用 14 个微卫星 DNA 标记技术对福建猕猴与河南猕猴遗传多样性进行分析。刘丽等人^[11]利用微卫星分子标记技术, 分析祁连山东段高寒草甸区小尺度下 4 个高原鼯鼠种群的遗传多样性和遗传结构特点。卫振等人^[12]从 400 对微卫星引物中筛选得到 51 对分辨率高的引物用于豚鼠的常规检测研究。李银银等人^[13]利用 30 个微卫星位点对国内 24 个近交系实验小鼠进行遗传状况分析。范涛等人^[14]应用 30 个微卫星位点对 4 种不同来源高度免疫缺陷小鼠微卫星 DNA 遗传检测的分析。郭羽等人^[15]应用微卫星技术对两个来源的 NIH 实验小鼠进行群体遗传结构分析。微卫星技术在实验动物品系鉴定和群体结构分析方面应用广泛。

但是之前建立的方法, 没有进行方法重复性研究, 极大地限制了微卫星方法在实验动物遗传质量控制方面的应用。本研究侧重于微卫星标记检测法在 3 家实验室的重复性研究。选择位于北京、浙江和广东的 3 家实验室应用 12 个微卫星位点对 6 只实验小鼠进行遗传质量检测, 研究结果表明, 扩增条带与标准规定一致, 微卫星标记检测法可以实现对实验动物的遗传质量评价, 并在不同实验室获得较好的重复性。本研究成果丰富了我国的实验动物遗传质量监测手段, 为团体标准^[5]升级为国家标准提供合理依据, 保障国际交流与合作的顺利开展。

表 2 6 只小鼠在 12 个微卫星位点的等位基因片段大小
Table 2 Length of alleles of the six mice using 12 microsatellites

小鼠编号 No. of mice	D2Mit15	D6Mit102	D7Mit281	D15Mit5	D16Mit9	D18Mit19	D19Mit16	DXMit16	D9Mit21	D9Mit24	D12Nds11	D15Mit15
1	139	141	110	95	143	151	132	110	194	130	174	158
2	139	141	110	95	143	151	132	110	194	130	174	158
3	139	141	110	95	143	151	132	110	194	130	174	158
4	139	141	110	95	143	151	132	110	194	130	174	158
5	139	141	110	95	143	151	132	110	194	130	174	158
6	139	141	110	95	143	151	132	110	194	130	174	158

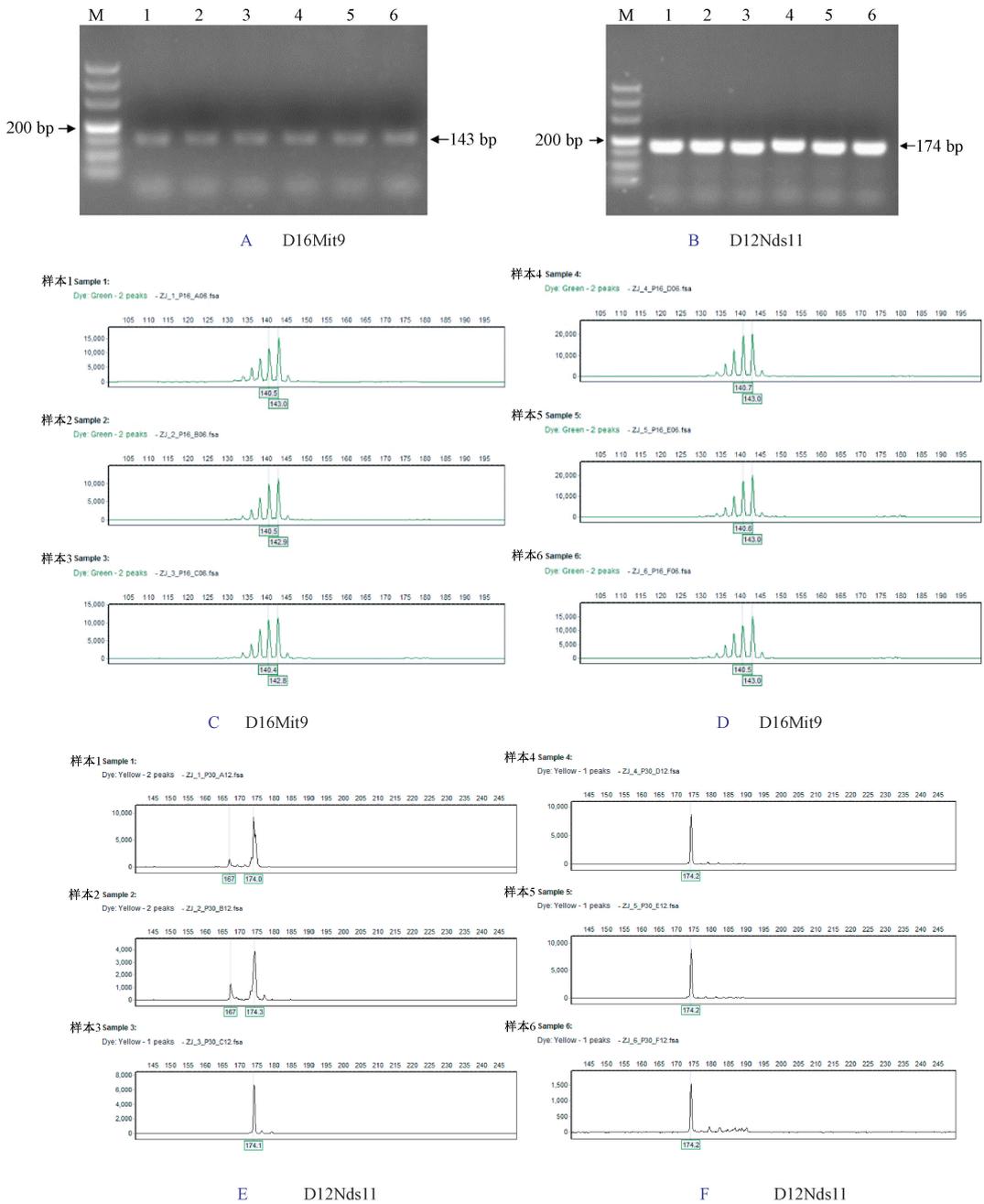


注:A: D16Mit9 位点电泳结果; B: D12Nds11 位点电泳结果; C: 小鼠样本 1~3 的 D16Mit9 位点测序结果; D: 小鼠样本 4~6 的 D16Mit9 位点测序结果; E: 小鼠样本 1~3 的 D12Nds11 位点测序结果; F: 小鼠样本 4~6 的 D12Nds11 位点测序结果。

图 1 北京实验室在 D16Mit9 和 D12Nds11 位点电泳结果图和测序结果图

Note. A: Electrophoresis result of D16Mit9; B: Electrophoresis result of D12Nds11; C: Sequencing result of D16Mit9 in samples 1-3; D: Sequencing result of D16Mit9 in samples 4-6; E: Sequencing result of D12Nds11 in samples 1-3; F: Sequencing result of D12Nds11 in samples 4-6.

Figure 1 Electrophoresis images and sequencing results of D16Mit9 and D12Nds11 in the Beijing laboratory

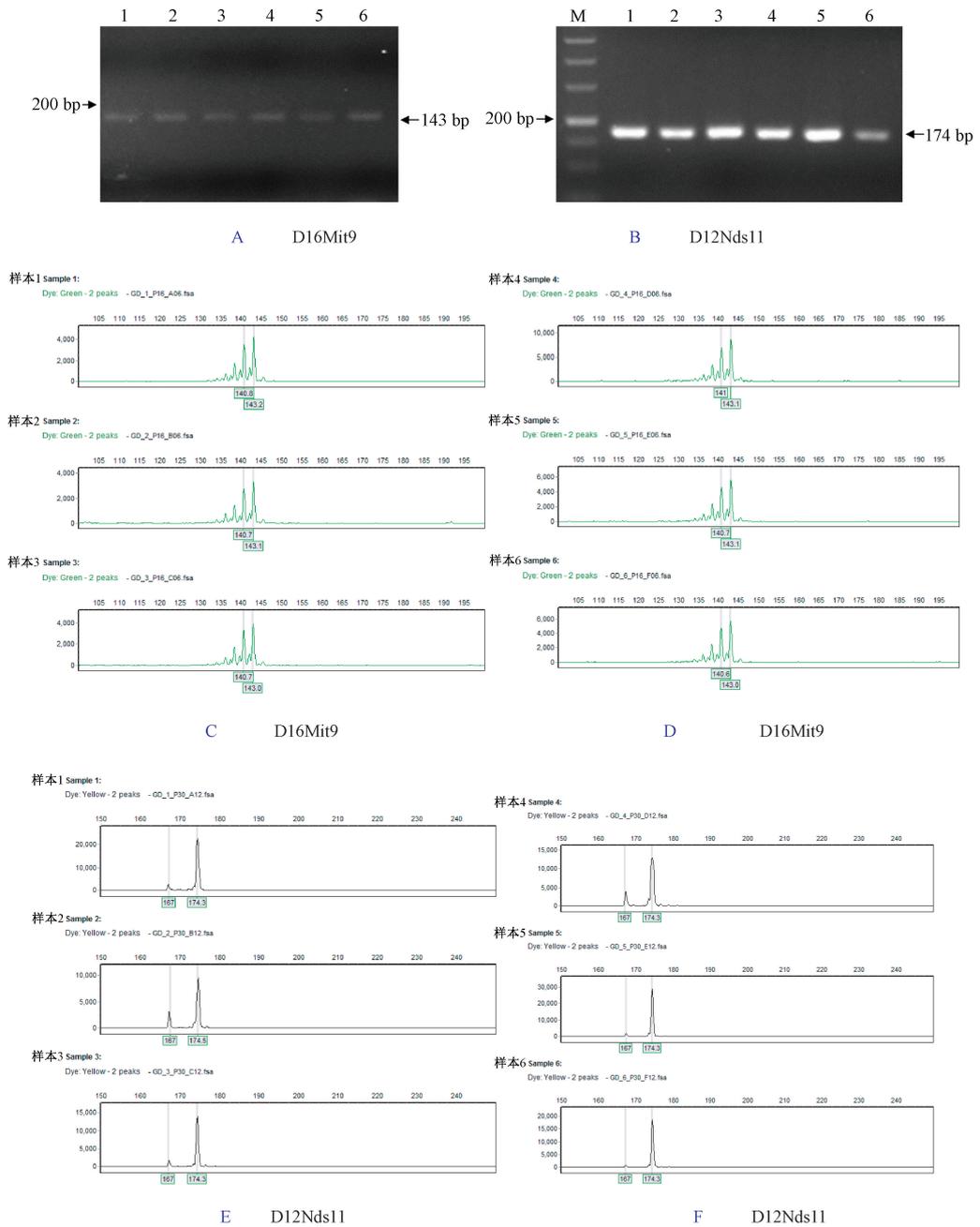


注: A: D16Mit9 位点电泳结果; B: D12Nds11 位点电泳结果; C: 小鼠样本 1~3 的 D16Mit9 位点测序结果; D: 小鼠样本 4~6 的 D16Mit9 位点测序结果; E: 小鼠样本 1~3 的 D12Nds11 位点测序结果; F: 小鼠样本 4~6 的 D12Nds11 位点测序结果。

图 2 浙江实验室在 D16Mit9 和 D12Nds11 位点电泳结果图和测序结果图

Note. A: Electrophoresis result of D16Mit9; B: Electrophoresis result of D12Nds11; C: Sequencing result of D16Mit9 in samples 1-3; D: Sequencing result of D16Mit9 in samples 4-6; E: Sequencing result of D12Nds11 in samples 1-3; F: Sequencing result of D12Nds11 in samples 4-6.

Figure 2 Electrophoresis images and sequencing results of D16Mit9 and D12Nds11 in the Zhejiang laboratory



注:A:D16Mit9 位点电泳结果;B:D12Nds11 位点电泳结果;C:小鼠样本 1~3 的 D16Mit9 位点测序结果;D:小鼠样本 4~6 的 D16Mit9 位点测序结果;E:小鼠样本 1~3 的 D12Nds11 位点测序结果;F:小鼠样本 4~6 的 D12Nds11 位点测序结果。

图 3 广东实验室在 D16Mit9 和 D12Nds11 位点电泳结果图和测序结果图

Note. A: Electrophoresis result of D16Mit9; B: Electrophoresis result of D12Nds11; C: Sequencing result of D16Mit9 in samples 1-3; D: Sequencing result of D16Mit9 in samples 4-6; E: Sequencing result of D12Nds11 in samples 1-3; F: Sequencing result of D12Nds11 in samples 4-6.

Figure 3 Electrophoresis images and sequencing results of D16Mit9 and D12Nds11 in the Guangdong laboratory