



微卫星与生化位点法对 BALB/c 小鼠遗传检测比较分析*

覃辉艳 陈华凤 王芳 杨慧 李彬 张洁宏

(广西壮族自治区疾病预防控制中心, 南宁 530028)

摘要:目的 应用微卫星 DNA 标记检测 BALB/c 小鼠的遗传质量,并与现行国家标准生化标记法进行比较,探讨其在近交系小鼠遗传监测中的应用,为建立微卫星 DNA 检测方法奠定基础。**方法** 采用 20 个微卫星基因位点和毛细管电泳技术对 BALB/c 小鼠进行遗传质量检测,同时采用现行国家标准生化标记法进行检测比较分析。**结果** 各样品 20 个微卫星基因位点 DNA 片段大小相同,没有新的等位基因出现;生化标记检测结果亦显示 Akp1 等 14 个生化标记基因均为纯合,个体间生化标记表型均一致,根据国家标准符合品系特征。微卫星 DNA 标记检测结果与生化标记检测结果一致。**结论** 微卫星 DNA 标记可准确可靠、方便快捷地检测近交系小鼠遗传质量,本研究所选的 20 个微卫星基因位点可用于 BALB/c 小鼠遗传质量监测。

关键词: BALB/c 小鼠;微卫星 DNA 标记;生化标记

中图分类号: Q956 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)04-0014-04

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.04.004

实验动物在生命科学研究中占有重要地位,实验动物的质量,特别是遗传质量,直接影响实验结果的准确性、科学性和重复性。近交系小鼠因其在实验中所表现出的一致性、再现性和敏感性,在科学研究中尤其是遗传学、肿瘤学研究有着不可替代的重要地位^[1]。一直以来,对近交系小鼠的遗传质量监测常以生化标记法、免疫标记法等为主,大多为以检测表型变异推测基因变异,存在一定局限性。随着生物技术的发展,对近交系小鼠直接进行基因检测,则能更直接更有效地反应其遗传质量。微卫星 DNA (microsatellite DNA), 又称短串联重复序列 (short tandem repeat, STR) 或简单重复序列 (simple sequence repeats, SSR), 是均匀分布于真核生物基因组中的简单重复序列,由 2~6 个核苷酸的串联重复片段构成。具有分布广泛、多态性丰富、易于检测、呈共显性遗传、结果稳定可靠等特点,被认为是各类遗传标记检测中最有价值的一种。目前,国内已有学者利用微卫星标记检测技术开展近交系小鼠遗传质量分析研究,但与传统国家标准检测方法进行比较分析尚少见报道。因此,本研究应用 20 个微卫星位点对近交系 BALB/c 小鼠进行检测,同时采用现行国家标

准生化标记法进行检测比较分析,验证微卫星遗传检测方法的可靠性,为该技术的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

BALB/c 小鼠共 10 只,为 BALB/cAn 亚系,雌雄各半,由广西医科大学实验动物中心繁殖,生产许可证号:SCXK(桂)2014-0002。

1.2 主要仪器与试剂

仪器:Sigma 高速冷冻离心机;Bio-Rad 电泳仪;GelDoc-It² 凝胶成像分析仪;ABI 梯度 PCR 仪;ABI 3730XL 测序仪等。

试剂:Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit 核酸提取试剂盒;Takara Premix Ex TaqTM Hot Start Version PCR 反应试剂盒;实验小鼠遗传检测试剂盒等。

1.3 方法

1.3.1 微卫星 DNA 检测

1.3.1.1 核酸样品制备:用灭菌剪刀剪取小鼠长约 0.6 cm 的尾尖组织,剪碎,置于 1.5 mL 的无菌离心管中。使用 Qiagen 公司货号为 69504 的试剂盒 DNeasy Blood & Tissue Kit(50)提取核酸。核酸提取

收稿日期:2019-01-09

* 基金项目:广西科学研究与技术开发计划(桂科能 1598025-25)

作者简介:覃辉艳(1981—),女,副主任技师,研究方向:实验动物质量检测.E-mail:qinhuian123@sina.com

通信作者:张洁宏(1969—),男,主任技师,研究方向:实验动物质量检测.E-mail:Zhjh510@126.com

2.2 生化标记检测

Akp1 等 14 个生化标记基因均为纯合,个体间生化标记表型均一致,且根据国家标准,符合品系特征,见表 3。

表 3 各样品各生化标记位点检测结果
Table 3 The biochemical marker results of each sample

检测位点	标记基因类型									
	1 号	2 号	3 号	4 号	5 号	6 号	7 号	8 号	9 号	10 号
Akp1	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
Car2	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
Ce2	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Es1	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
Es3	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Es10	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Gpd1	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
Gpi1	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Hbb	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
Idh1	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Mod1	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Pep3	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Pgm1	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Trf	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b

注:a 表示:在 Ce2、Mod1、Pgm1 位点为快带,在 Es3、Es10、Gpi1、Idh1、Pep3 位点为慢带;b 表示:在 Car2、Gpd1 位点为快带,在 Akp1、Es1、Trf 位点为慢带;d 表示:在 Hbb 位点为慢带。

Note:a represent fast band at loci Ce2, Mod1 and Pgm1, and slow band at loci Es3, Es10, Gpi1, Idh1 and Pep3.b represent fast band at loci Car2 and Gpd1, and slow band at loci Akp1, Es1 and Trf. d represent fast band at locus Hbb.

3 讨论

近交系是经至少连续 20 代的全同胞兄妹或亲代与子代交配培育而形成的具有稳定性状特征和繁殖能力的实验动物品系。按照国家标准要求,近交系动物近交系数应大于 99%。BALB/c 小鼠是目前生命科学中最广泛应用的近交系之一,各国均有生产和应用。我国于 1985 年从美国 NIH 引进到中国医学科学院实验动物研究所,为 BALB/c 第 180 代,历经多年培育,至今已在国内形成几十个群体。因群体数量较多,对相应群体进行遗传检测分析,不仅可了解其遗传质量,建立其遗传背景资料,且可阐明使用不同 BALB/c 小鼠群体进行实验的重复性和可比性。

微卫星 DNA 标记是继 RFLP(限制性内切酶片

段长度多态性)技术之后发展起来的新一代分子遗传标记技术,自 20 世纪 80 年代以来,经过 30 年的不断发展,微卫星标记技术已被广泛应用于亲缘关系鉴定、人类疾病诊断、实验动物遗传质量分析、生物群体遗传结构与物种资源保护等多领域^[3]。目前,微卫星 DNA 的 PCR 产物分型检测方法主要有琼脂糖凝胶电泳法、聚丙烯酰胺电泳法、荧光标记引物毛细管电泳法、基于扩增子测序的分型法等^[4]。王洪等^[1]、刘先菊等^[5]与王越甲等^[6]分别采用琼脂糖凝胶电泳法优选近交系小鼠微卫星基因位点分析了国内常用近交系小鼠的遗传概貌。陈振文等^[7]、欧阳兆和等^[8]与韩喜彬等^[9]分别运用微卫星标记和聚丙烯酰胺电泳法对国内近交系小鼠进行了遗传质量分析。近年来,倪丽菊等^[2]和李银银等^[10]分别利用微卫星标记和毛细管电泳法分析了国内多个品系近交系小鼠的遗传状况。毛细管电泳又称高效毛细管电泳,是一种高效液相分离法,是经典电泳技术与现代微柱分离相结合的产物,离子或荷电粒子以电场为驱动力,在毛细管中按其淌度或和分配系数不同进行高效快速分离。与传统电泳法操作繁琐,分离率低、定量困难相比,毛细管电泳具有易自动化、分析速度快、分离效率高、定量准确、操作方便等优点。本研究采用 20 个多态性含量丰富的微卫星位点,采用荧光标记引物毛细管电泳法对 BALB/c 小鼠进行遗传质量分析,研究结果显示,各样品 20 个微卫星位点 DNA 片段大小相同,没有新的等位基因出现,生化标记检测结果亦显示 Akp1 等 14 个生化标记基因均为纯合,个体间生化标记表型均一致,且符合国家标准确定的品系特征。微卫星 DNA 检测结果与传统的生化标记检测结果一致,比对结果显示,微卫星 DNA 检测可应用于实验动物遗传质量评价,且微卫星 DNA 检测比生化标记检测覆盖面更广,荧光标记引物毛细管电泳法检测结果更准确,更能直接有效地反应实验动物的遗传质量。近年来的研究也表明微卫星 DNA 标记可区分近交系小鼠不同品系和亚系,可有效运用于近交系小鼠遗传检测^[1-2,5-10]。但目前,微卫星 DNA 标记技术仍存在一些问题,如无效等位基因的出现,在纯合体个体上,无效等位基因表现为无可见的扩增条带,通常会被认为是因 PCR 技术或 DNA 模板质量问题而被忽视^[11];此外,由于使用引物的不同,有时会导致所得试验结果差异较大。因此,在行业内,选定相应引物,并形成相关标准非常必要。

参 考 文 献

- [1] 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):135-138.
- [2] 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.
- [3] 瞿陆峰,潘伟荣,曾养志.微卫星 DNA 标记及其应用[J].畜牧与饲料科学,2010,**31**(4):6-8.
- [4] 方治伟,李论.SSR 分型技术研究进展[J].生物化工,2018,**4**(1):118-121.
- [5] 刘先菊,王艳蓉,高子琪,等.近交系小鼠微卫星 DNA 引物的筛选和 Tm 值优化研究[J].实验动物科学,2012,**29**(1):9-13.
- [6] 王越甲,杨炜峰,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.
- [7] 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.
- [8] 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):11-14.
- [9] 韩喜彬,苏玉虹,王洪,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.
- [10] 李银银,吴绍亮,王洪,等.微卫星 DNA 分析国内 24 个近交系小鼠遗传状况[J].中国比较医学杂志,2017,**27**(8):43-49.
- [11] 文亚峰,韩文军,谢伟东,等.微卫星标记中的无效等位基因[J].生物多样性,2013,**21**(1):117-126.

Genetic Analysis of BALB/c Mice by Using Microsatellite DNA Markers and Biochemical Markers

QIN Huiyan, CHEN Huafeng, WANG Fang, YANG Hui, LI Bin, ZHANG Jiehong

(Guangxi Autonomous Regional Center for Disease Control and Prevention, Nanning 530028, China)

Abstract: Microsatellite DNA marker is one of the most valuable genetic marker, in order to discuss it's applicability in genetic monitor of BALB/c mice, and lay the foundation for establishing STR genetic quality monitor method, 20 microsatellite DNA markers and capillary electrophoresis were adopted to genetic detect BALB/c mice, and compared with biochemical marker analysis in current national standards. The result showed that the DNA fragments of 20 microsatellite loci of each sample were the same, there were no new alleles. Biochemical marker analysis also showed that fourteen biochemical marker genes were homozygous, the phenotypes of biochemical markers were consistent, according to current national standards, the sample conformed to strain characteristics. The STR method result were coincident with that of Biochemical marker analysis. The microsatellite DNA marker method is more accurate, reliable, rapid and convenient, and the 20 microsatellite DNA markers selected in this study could be used to monitor genetic quality of BALB/c mice.

Key words: BALB/c mice; Microsatellite DNA marker; Biochemical marker