



徐平, 研究员, 现任上海吉辉实验动物饲养有限公司首席科学家/研发总监。长期从事实验动物资源开发、保存和资源共享工作, 擅长实验动物遗传育种和实验动物设施的运行管理。主持或承担国家科技攻关项目、国家科技支撑计划项目、国家科技基础条件平台建设项目以及上海市科研计划项目等30余项; 发表论文80余篇, 主编出版实验动物著作4部, 副主编3部; 获得国家专利16项、软件著作权1项; 获市级科技进步奖和攻关奖4项。曾担任中国科学院上海实验动物中心主任, 国家啮齿类实验动物种子中心、国家兔类实验动物种子中心项目负责人。曾多次赴日本和美国进修及合作研究, 并受聘为日本鹿儿岛大学、新日本科学株式会社访问学者, 日本熊本大学高级访问学者、客座教授。



肖君华, 复旦大学遗传学博士, 美国德州大学人类遗传中心博士后。先后在北京博宁生物科技有限公司、华东理工大学任教。目前担任东华大学生物科学与技术研究所分子遗传课题组长、教授、博士生导师。同时兼任中国遗传学会理事、动物遗传专业委员会委员、产业促进委员会委员; 上海市遗传学会副理事长、科普专业委员会主任委员; 上海翼和应用生物技术有限公司首席科学家。研究方向包括小鼠遗传学, 即利用野生小鼠遗传资源构建染色体替换系品系, 并进行功能基因的定位与克隆; 二代测序技术的开发, 即利用二代测序平台, 开展大规模的SNP、STR分型、高通量候选基因重测序、高通量候选基因表达水平检测等。曾主持4个国家自然科学基金, 2个重点研发计划的子课题, 10多项上海市重点项目。发表SCI论文30多篇, 获批专利10多项。

BALB/cA. Cg. SHJH^{hr}小鼠的培育及其相关遗传学特性分析

谈小倩¹, 杨 颢², 唐慧青¹, 瞿 伟¹, 李 亮¹, 钱 珍¹, 顾坚忠¹, 肖君华², 徐 平¹

(1. 上海吉辉实验动物饲养有限公司, 上海201611; 2. 东华大学生物科学与技术研究所, 上海201620)

[摘要] **目的** 将自发突变培育的SHJH^{hr}小鼠的突变Hr基因导入到遗传背景清晰的BALB/cAShjh近交系小鼠, 通过突变基因筛查和遗传学特性分析为后续研究Hr基因突变导致异常表型的分子机制以及该模型的推广应用提供依据。**方法** 采用在表型监测指导下回交-互交的育种方法, 将自发突变培育的SHJH^{hr}小鼠的突变基因以同源突变导入方式导入到近交系BALB/cAShjh小鼠, 经10代后培育成BALB/cA.Cg.SHJH^{hr} (简称C.Cg.SHJH^{hr}) 小鼠。通过多重PCR建库后二代测序的方法, 分析C.Cg.SHJH^{hr}小鼠中随机分布于基因组上的90个单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 检测位点基因型。然后按照GB/T 14927.1—2008的方法, 对C.Cg.SHJH^{hr}小鼠中14个生化位点标记基因进行检测。最后利用全基因组外显子测序技术, 检测该小鼠的突变基因。**结果** 自2018年5月至2022年3月, 共进行了10代的回交-互交, 完成了C.Cg.SHJH^{hr}小鼠品系的构建。在检测的90个SNP位点中, 除了rs13484115、rs13484116两个位点不同外, C.Cg.SHJH^{hr}小鼠的其他位点基因型均与受体小鼠BALB/cAShjh相同; 生化位点标记基因检测结果显示, C.Cg.SHJH^{hr}小鼠的14个位点全部与受体小鼠相同; 全基因组外显子测序发现, 该小鼠相比受体小鼠品系存在109个位点突变, 包括同义突变71个, 终止密码子增加1个, 错义突变37个, 涉及蛋白质序列改变的基因20个 (包括已报告的Hr基因)。**结论** 成功培育了突变导入系C.Cg.SHJH^{hr}小鼠, 通过全基因组外显子测序分析发现了3个主要引起表型变异的Hr突变基因及关联突变基因, 为该小鼠在生物医学研究中的拓展应用提供了基础数据。

[关键词] BALB/cA.Cg.SHJH^{hr}小鼠; 外显子测序; 突变基因; 遗传学特性

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)04-0363-08



[基金项目] 上海市科技创新行动计划项目“自发性早衰小鼠的种群建立及相关机制研究”(21140909100)

[第一作者] 谈小倩(1982—), 女, 执业兽医师, 研究方向为实验动物模型和实验动物疾病。E-mail: xiaoqian_tan@163.com

[通信作者] 徐平(1964—), 男, 研究员, 研究方向为实验动物资源和低温生物学。E-mail: pingxu@jh-labanimal.com。ORCID: 0000-0001-6744-8908;

肖君华(1968—), 男, 教授, 研究方向为小鼠遗传学。E-mail: xiaojunhua@dhu.edu.cn。ORCID: 0000-0002-1977-372X

Creation and Analysis of Related Genetic Characteristics of BALB/cA.Cg.SHJH^{hr} Mice

TAN Xiaoqian¹, YANG Hao², TANG Huiqing¹, QU Wei¹, LI Liang¹, QIAN Zhen¹, GU Jianzhong¹, XIAO Junhua², XU Ping¹

(1. Shanghai Jihui Laboratory Animal Care Co., Ltd., Shanghai 201611, China; 2. Institute of Biological Science and Technology, Donghua University, Shanghai 201620, China)

Correspondence to: XU Ping (ORCID: 0000-0001-6744-8908), E-mail: pingxu@jh-labanimal.com;

XIAO Junhua (ORCID: 0000-0002-1977-372X), E-mail: xiaojunhua@dhu.edu.cn

[ABSTRACT] Objective To introduce the *Hr* gene of spontaneously mutated SHJH^{hr} mice into BALB/cASHjH inbred mice with clear genetic background, and provide a basis for study on the molecular mechanism of *Hr* gene mutation-induced abnormal phenotype and the application of this model. **Methods** Using a backcross-intercross breeding method guided by phenotypic monitoring, mutant genes from SHJH^{hr} mice bred by spontaneous mutation were introduced into inbred BALB/cASHjH mice by homozygous mutation introgression, and the mice were bred into BALB/cA.Cg.SHJH^{hr} (abbreviated as C.Cg.SHJH^{hr}) mice after 10 generations. The genotypes of 90 single nucleotide polymorphism (SNP) detection sites were analyzed in C.Cg.SHJH^{hr} mice by multiplex PCR library construction followed by next generation sequencing. Then 14 biochemical locus marker genes were detected in C.Cg.SHJH^{hr} mice according to the method of GB/T 14927.1-2008. Finally, whole genome exon sequencing was utilized to detect the mutated genes in this mouse. **Results** From May 2018 to March 2022, a total of 10 generations of backcross-intercross were conducted to complete the construction of the C.Cg.SHJH^{hr} mouse line. Among the 90 SNPs loci detected, except for rs13484115 and rs13484116, all the other loci had the same genotype as the recipient mice BALB/cASHjH. The results of biochemical marker gene detection showed that all the 14 loci of the mouse were the same as those of the recipient mouse. Whole genome exon sequencing found that the mouse had 109 site mutations compared with the recipient mouse strain, including 71 synonymous mutations, 1 stopgain, 37 missense mutations, and 20 genes involved in protein sequence alterations (including the reported *Hr* gene). **Conclusion** C.Cg.SHJH^{hr} mice were created. Through exon sequencing and genetic analysis, three *Hr* mutated genes and associated mutated genes that mainly cause phenotypic variations were identified, which provides a basis for expanding the application of C.Cg.SHJH^{hr} mice in biomedical research.

[Key words] BALB/cA.Cg.SHJH^{hr} mice; Exon sequencing; Mutation; Genetic characteristics

无毛 (*Hr*) 基因中现有的等位基因突变形成了一系列动物模型, 这些模型通过多种哺乳动物部分或完全丧失 *Hr* 功能而出现脱毛^[1-7], 为皮肤病、衰老、毛囊生物学研究等提供了丰富的资源。本课题组于2017年10月在远交群ICR小鼠生产群中偶然发现一种表型与 *Hr* 突变体 (*Hr*^{hr-R}) 犀牛型小鼠^[8] 惊人相似的无毛突变小鼠, 通过突变鼠与亲代ICR小鼠回交, 建立了无毛远交群小鼠 (SHJH: ICR-*Hr*^{hr}) 并定名为 SHJH^{hr}。将 SHJH^{hr} 小鼠的核心群分成16组, 采用完全循环交配的方式保持一定的基因杂合度, 维持基因多态性。在随后的群体表型观察中发现, SHJH^{hr} 小鼠的体重明显低于ICR小鼠, 生存期比正常小鼠缩短近一半, 另外

还存在繁育性能降低、部分血液生理生化指标以及骨与软骨组织病理变化等表型特征^[9-10]。为了弄清基因突变与表型改变相关的机制, 本研究试图通过回交-互交的方式将 SHJH^{hr} 小鼠的突变基因导入到遗传背景清晰的近交系 BALB/cASHjH 小鼠中, 培育成 BALB/cA.Cg.SHJH^{hr} (简称 C.Cg.SHJH^{hr}) 小鼠并对其进行突变基因筛查和遗传学检测分析, 为后续研究 *Hr* 基因突变导致的一系列异常表型的分子机制以及该模型的推广应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级 SHJH^{hr} 小鼠和 BALB/cASHjH 小鼠, 均来自上

海吉辉实验动物饲养有限公司 [SCXK (沪) 2022-0009], 饲养在大型隔离器内, 环境温度 20~24 °C, 相对湿度 50%±10%, 12 h 明暗交替, 饲喂上海吉辉 JH-MD01 配方 γ 线辐照 (35 kGy) 饲料 [委托上海舟虞生物技术有限公司生产, 沪饲证 (2021) 04027], 自由采食和饮水。本研究在上海吉辉实验动物饲养有限公司的屏障环境中进行, 研究方案经上海吉辉实验动物饲养有限公司实验动物组织与管理委员会审核批准 (批号 SHJH-YF-2020-002), 相关检测委托第三方进行。

1.2 C.Cg.SHJH^{hr}小鼠育种方案

参照 Flaherty 等^[11] 的 NX system 育种流程 (1981 年出版), 通过将来自同一窝的 3 只雄性 SHJH^{hr} 隐性纯合子小鼠 (*hr/hr*) 与 6 只来自核心群的雌性近交系 BALB/cAShjh 小鼠 (+/+) 交配 (*hr/hr*3 δ ×+/+6 δ), 得到的杂合子小鼠 (+/*hr*) 并进行互交, 产生回交-互交一代 (N1) 子鼠; 然后选择 N1 的雄性隐性纯合子小鼠 (*hr/hr*), 继续与雌性近交系 BALB/cAShjh 小鼠 (+/+) 交配, 并依次回交-互交 10 代 (N10), 育成 BALB/cA.Cg.SHJH^{hr} (简称 C.Cg.SHJH^{hr}) 小鼠; 最后采用近交系的 5 笼保种法建立核心群。具体的培育方案示意图 1。

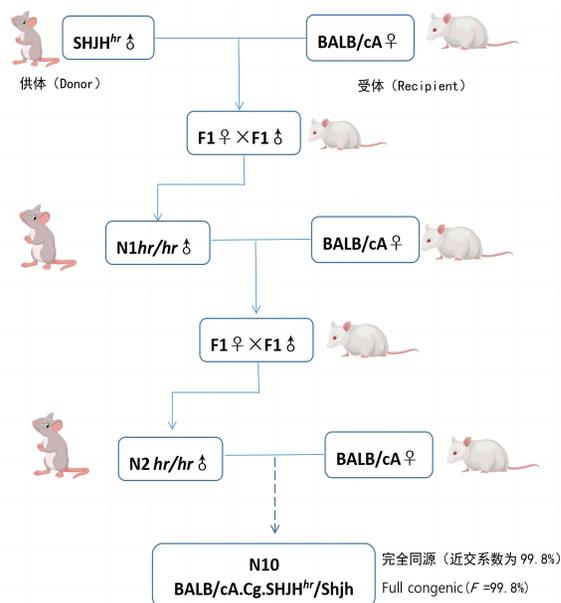


图1 C.Cg.SHJH^{hr}小鼠的培育方案示意图

Figure 1 Creation schemes of C.Cg.SHJH^{hr} mouse

1.3 SNP分型

用 N10 代 C.Cg.SHJH^{hr} 纯合子小鼠 (*hr/hr*) 和 BALB/cAShjh 小鼠各 6 只 (均雌雄各半), 参考文献 [12],

从 SNP 公共数据库中挑选分布于每条常染色体和性染色体的 90 个 SNP 位点 (这些是受体小鼠的特异位点), 使用动物基因组 DNA 快速提取试剂盒 [天根生化 (北京) 有限公司] 提取基因组 DNA, 吸取 1 μ L 抽提好的 DNA, 在 1% 琼脂糖凝胶电泳中检测其浓度, 然后将所有的 DNA 样本标准化到质量浓度为 30 ng/ μ L, -20 °C 储存备用。多重引物 Mix 配置购自上海翼和应用生物技术有限公司, 并委托该公司进行多重 PCR 扩增, 检测目的片段 DNA 序列, 然后在 Illumina 测序仪上分析 PCR 产物, 确定各 SNP 检测位点的基因型, 并进行两种小鼠之间的比较。

1.4 生化位点标记基因检测

用 N10 代 C.Cg.SHJH^{hr} 纯合子小鼠 (*hr/hr*) 和 BALB/cAShjh 小鼠各 2 只 (均雌雄各半), 按照 GB/T 14927.1—2008 《实验动物 近交系小鼠、大鼠生化标记检测法》, 委托上海市实验动物质量监督监测站对 14 个生化位点标记基因 *Car2*、*Ce2*、*Es1*、*Es3*、*Es10*、*Gpd1*、*Gpi1*、*Hbb*、*Idh1*、*Mod1*、*Akp1*、*Pgm1*、*Trf* 和 *Pep3* 进行检测, 并进行两种小鼠之间的比较。

1.5 外显子区段捕获测序

用 N10 代 C.Cg.SHJH^{hr} 纯合子小鼠 (*hr/hr*) 和 BALB/cAShjh 小鼠各 6 只 (均雌雄各半), 提取基因组 DNA; 电泳检测合格后经 Covaris 随机打断成 150~220 bp 的片段, 采用 SureSelectXT 试剂盒和 SureSelect 鼠全外显子 V6 试剂盒 [购自安捷伦科技 (中国) 有限公司] 进行建库和捕获; DNA 片段经过末端修复、加 ployA 尾、加测序接头、纯化、磁珠捕获、PCR 扩增等步骤, 完成文库构建。文库检验合格后委托上海欧易生物医学科技有限公司利用测序仪进行双端测序, 获得的测序序列比对到参考基因组上, 比对结果使用 GATK4 软件的 Haplotypecaller 模块进行 SNP 和 InDel (插入与缺失) 变异检测; 用 CNVkit 软件检测样本的拷贝数变异 (copy number variation, CNV), 用 Lumpy 软件对样本进行结构变异 (structure variations, SVs) 信息检测, 用 PolyPhen-2 软件预测基因突变是否有害 (可自动计算得分, 0~1 数字表示碱基变化可能引起突变表型的关联度, 数据越大关联度越大), 综合分析和解读样本的变异信息。

2 结果

2.1 C.Cg.SHJH^{hr}小鼠品系成功建立

由于 SHJH^{hr} 小鼠和 BALB/cAShjh 小鼠的杂交后代

无法区分, 因此利用突变等位基因 Hr 纯合时的特殊表型 (脱毛→无毛), 通过回交-互交的育种方案, 使变异等位基因在交替世代中产生纯合子 (hr/hr)。根据 Snell 等^[13] 建议的近交系数计算公式 ($F = [1 - (1/2)^{N-1}]$) 可知, N10 代小鼠的近交系数 $F = [1 - (1/2)^{N-1}] = [1 - (1/2)^{10-1}] = 99.81\%$, 提示回交-互交至第 10 代时, 除了所选的突变等位基因外, 后代基因组绝大部分与受体小鼠相同 (图 2)。

2.2 C.Cg.SHJH^{hr}小鼠表型

观察培育至 N10 代的子代表型, 发现 C.Cg.SHJH^{hr} 小鼠已经稳定了等位基因 Hr 纯合时的特殊表型, 其脱毛→无毛、皮肤随年龄增大而快速老化并出现丘疹等特征与供体小鼠相同; 但该鼠的指甲, 随着年龄增加, 其指甲长度增加迅速, 约 6 个月龄时指甲过度生长, 10 月龄后指甲长度不一, 且无序卷曲, 该特征与供体鼠、受体鼠均不同 (图 3)。

2.3 C.Cg.SHJH^{hr}小鼠的 SNP 位点基因型

SNP 位点基因型检测结果显示, N10 代的 C.Cg.SHJH^{hr} 小鼠基因分型无杂合子, 在检测的 90 个 SNP 位

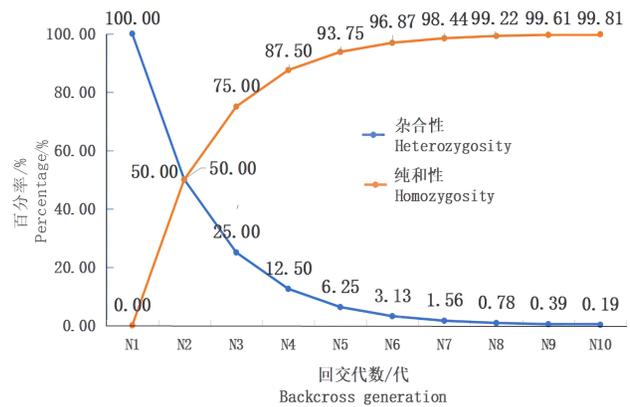


图 2 C.Cg.SHJH^{hr}小鼠培育过程中每代的基因组纯合度与杂合度

Figure 2 Genomic homogeneity and heterogeneity during the creation of C.Cg.SHJH^{hr} mice

点中, 除了 rs13484115 (A→G)、rs13484116 (T→G) 两个位点不同外, 其他位点基因型均与受体 BALB/cASHj 小鼠相同。结果表明来自远交群 SHJH^{hr} 小鼠的 Hr 突变基因已导入受体 BALB/cASHj 小鼠, 建立了近交系 C.Cg.SHJH^{hr} 小鼠。



注: A, SHJH^{hr}小鼠 2 月龄; B, SHJH^{hr}小鼠 6 月龄; C, BALB/cASHj 小鼠 2 月龄; D, BALB/cASHj 小鼠 4 月龄; E, C.Cg.SHJH^{hr}小鼠 2 月龄; F, C.Cg.SHJH^{hr}小鼠 6 月龄; G, C.Cg.SHJH^{hr}小鼠 12 月龄。

Note: A, 2-month-old SHJH^{hr} mice; B, 6-month-old SHJH^{hr} mice; C, 2-month-old BALB/cASHj mice; D, 4-month-old BALB/cASHj mice; E, 2-month-old C.Cg.SHJH^{hr} mice; F, 6-month-old C.Cg.SHJH^{hr} mice; G, 12-month-old C.Cg.SHJH^{hr} mice.

图 3 C.Cg.SHJH^{hr}小鼠与供体小鼠、受体小鼠不同年龄段的表型比较

Figure 3 Comparison of phenotype of C.Cg.SHJH^{hr} and SHJH^{hr}, BALB/cASHj at different ages

2.4 C.Cg.SHJH^{hr}小鼠的生化标记基因

为了进一步验证 N10 代 C.Cg.SHJH^{hr} 小鼠的主要基因组来自受体 BALB/cASHj 小鼠, 对 N10 代 C.Cg.SHJH^{hr} 小鼠和 BALB/cASHj 小鼠的 14 个生化标记基因

进行检测, 结果显示 C.Cg.SHJH^{hr} 小鼠的 14 个生化标记基因与近交系 BALB/cA 小鼠完全相同 (表 1)。

2.5 C.Cg.SHJH^{hr}小鼠的全基因组外显子突变情况

全基因组外显子检测发现, 与 BALB/cASHj 小鼠

表1 C.Cg.SHJH^{hr}小鼠与BALB/cAShjh小鼠生化标记基因的
差异

Table 1 Differences in biochemical marker genes between
C.Cg.SHJH^{hr} mice and BALB/cAShjh mice

位点 Loci	C.Cg.SHJH ^{hr}	BALB/cA
<i>Car2</i>	b	b
<i>Ce2</i>	a	a
<i>Es1</i>	b	b
<i>Es3</i>	a	a
<i>Es10</i>	a	a
<i>Gpd1</i>	b	b
<i>Gpi1</i>	a	a
<i>Hbb</i>	d	d
<i>Idh1</i>	a	a
<i>Mod1</i>	a	a
<i>Akp1</i>	b	b
<i>Pgm1</i>	a	a
<i>Trf</i>	b	b
<i>Pep3</i>	a	a

注：每个位点的a和b所表示的生化标记是不一样的，具体解释请见GB/T 14927.1—2008《实验动物 近交系小鼠、大鼠生化标记检测法》。

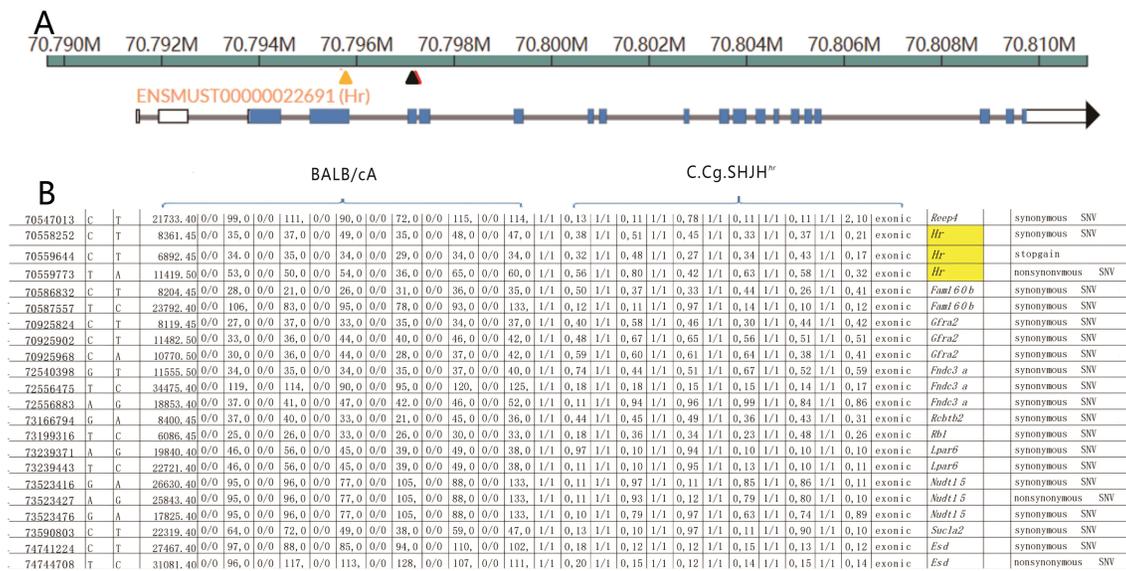
Note: The biochemical markers represented by a and b at each site are different, and their specific explanations can be found in the Chinese standard GB/T 14927.1-2008 "Laboratory Animals: Methods for Biochemical Markers of Inbred Mice and Rats".

比对，C.Cg.SHJH^{hr}小鼠共测到109个突变位点，涉及32个基因。生物信息学分析发现，这些突变集中位于14号染色体上从70547013到99302109的区段。其中，

同义突变 (synonymous) 71个，错义突变 (nonsynonymous) 37个，引起蛋白质氨基酸序列变化的位点涉及20个基因 (表2)，终止密码子增加 (stopgain) 1个。测序分析检测发现C.Cg.SHJH^{hr}小鼠中与脱毛相关的*Hr*基因共有3个突变，分别为同义突变 (70558252 C>T)、错义突变 (70559773 T>A) 和无义突变 (70559644 C>T) 各1个 (图4)。

3 讨论

表型的变异通常是因为基因的改变。将一个特异性等位基因导入到一个遗传背景非常清晰的近交系后进行基因组测序是鉴定突变基因的重要手段。本研究将远交群ICR小鼠中发现的无毛小鼠的无毛基因，按照NX system育种方案^[11]，通过与近交系BALB/cAShjh小鼠回交-互交10代，在每一代中只有那些在差异位点上获得供体等位基因的后代才被选择进行下一轮回交。根据孟德尔遗传分离定律，这些回交后代动物基因位点的50%随机携带受体等位基因，剩余的50%随机携带供体等位基因，即每一代中杂合性水平降低约50%。依据Snell等^[13]的公式 $[1 - (1/2)^{N-1}]$ ，在N5代，仅经过4次回交-互交后，其子代中约94%的基因组与受体近交系完全相同；到N10代时，近交系数已增加到99.81%。也就是说除了0.19%来自供体，其他等位基因均与受体相同，即完成突变导入系



注：A，*Hr*基因测序得到3个位点；B，C.Cg.SHJH^{hr}小鼠和BALB/cAShjh小鼠位于外显子区段的差异化位点（部分）。

Note: A, Three locations obtained from *Hr* gene sequencing; B, Differentiated locations in exon regions of C.Cg. SHJH^{hr} mice and BALB/cAShjh mice.

图4 C.Cg.SHJH^{hr}小鼠和BALB/cAShjh小鼠的基因组外显子测序所得突变

Figure 4 Mutations resulting from genomic exon sequencing between C.Cg.SHJH^{hr} mice and BALB/cAShjh mice

表2 C.Cg.SHJH^{hr}小鼠外显子测序发生错义突变的基因分析Table 2 Analysis of genes with missense mutations by exon sequencing in C.Cg.SHJH^{hr} mice

突变位置 Mutation position	碱基变化 Base alteration	基因 Gene	涉及疾病/细胞功能 Related diseases/cell functions	下游信号通路调控 Signal pathway regulation	PolyPhen-2 计 算得分 PolyPhen-2 scores
70559773	C→T	<i>Hr</i>	全身性脱毛,伴有丘疹性病变的心房颤动	是	1.000
73523427	A→G	<i>Nudet15</i>	造血干细胞和祖细胞急性损失	是	0.000
74744708	T→C	<i>esd</i>	甲醛分解代谢	是	0.505
74811692	T→C	<i>Lrch1</i>	细胞对趋化因子的反应	否	0.047
74813612	T→C				
75031916	G→A	<i>5031414D18Rik</i>	自噬体成熟、糖原、脂质代谢过程的调节	否	0.022
75032403	C→A				
75036145	A→G				
75125178	A→G	<i>Lrrc63</i>	膜蛋白	否	-
75224148	C→T	<i>Lcp1</i>	肌动蛋白丝束组件	否	0.166
78510551	C→G	<i>Akap11</i>	体型缩小,活动能力减退	否	0.997
79401743	G→A	<i>Mtrf1</i>	线粒体翻译终止;耳聋,痉挛性共济失调	否	0.959
79401763	G→T	<i>Mtrf1</i>			
79406608	A→G				
79427505	C→G	<i>Kbtbd</i>	蛋白酶体介导的泛素依赖蛋白的分解代谢	是	0.006
79452831	G→C				
79573278	A→G	<i>Elf1</i>	RNA聚合酶 II 转录的正调控	是	0.000
79595387	G→A	<i>Sugt1</i>	参与动粒功能	是	0.000
79637996	C→G	<i>Lect1</i>	内皮细胞增殖负调控	否	0.005
79656659	A→G				
79656692	T→C				
86966512	G→A	<i>Diaph3</i>	遗传性听神经病变,先天性造血障碍性贫血	是	0.958
96201334	G→T	<i>Klhl1</i>	肌动蛋白结合蛋白	否	0.001
88469236	C→G	<i>Pcdh20</i>	细胞黏附	否	0.000
99046045	G→C	<i>Mzt1</i>	微管蛋白复合体组成	是	-
99061539	G→C	<i>Bora</i>	蛋白激酶活性的激活,细胞周期过程的调控,蛋白质定位的调节	是	0.995
99068023	C→T	<i>Bora</i>			
99068337	G→C				
99068407	C→G				
99068529	A→G				
99068542	A→G				
99072637	T→A				
99072704	G→A				
99084109	C→A	<i>Dis3</i>	CUT分解代谢, RNA加工, rRNA分解代谢	是	0.000
99099549	G→T				
99101172	A→G	<i>Pibf1</i>	有丝分裂核分裂,细胞因子产生,蛋白质磷酸化	否	0.982

的培育。

为了验证突变基因导入近交系后的遗传学特性,本研究从SNP公共数据库中挑选90个分布于每条常染色体和性染色体的SNP位点,对小鼠进行SNP位点检测。结果显示,N10代C.Cg.SHJH^{hr}小鼠的90个SNP位点中,除rs13484115(A→G)、rs13484116(T→G)两个位点不同外,其他位点基因型均与BALB/cAShjh小鼠相同。同时,采用生化标记检测法对该小鼠的14个

生化位点标记基因进行检测,结果进一步验证了C.Cg.SHJH^{hr}小鼠的纯合性,并与受体BALB/cAShjh小鼠完全一致。以上结果证明突变基因完全导入到了受体近交系小鼠。

同源突变导入近交系C.Cg.SHJH^{hr}小鼠的建立,为皮肤、毛发等相关的药物、化妆品、护肤品等药理学、毒理学研究提供了一个新的研究工具,同时与SHJH^{hr}小鼠系列延伸品系等一起,后续或可广泛地应用于肿

瘤学、生理学、免疫学、核医学、衰老等研究。

全外显子组测序是一种广泛使用的新一代测序方法,涉及基因组蛋白质编码区域的测序。哺乳类动物外显子组所占基因组的比例为1.0%~1.5%,但它包含了约85%的已知与疾病相关的变异^[14-15]。C.Cg.SHJH^{hr}小鼠的全基因组外显子检测共获得了109个突变位点,相对于受体BALB/cASHjh小鼠,共筛选到20个发生错义/无义突变的基因。因为这些突变引起了编码氨基酸的改变,有可能导致基因功能的改变。除了已经报道过的直接影响毛发生长和犀牛样皮肤病变的Hr基因外^[16-22],本研究中生物信息学分析发现,部分基因如Akap11、Mtrf1、Diaph3、Bora、Pibf1等的PolyPhen-2得分均大于0.9,说明可能引起突变表型的关联度较大,涉及突变小鼠疾病表型,这与前期测得的生理生化数据^[10-11]相关;进一步的外显子测定中,一系列突变基因均涉及下游信号通路,并通过模拟计算提示突变小鼠表达谱与受体小鼠转录组存在差异。

本研究还发现,与供体SHJH^{hr}小鼠相同,C.Cg.SHJH^{hr}小鼠出生后12~14 d时首先从鼻尖部开始脱毛,然后扩散至全身,除触须正常外,全身毛发在30~35 d完全脱落,这是所有Hr等位基因突变小鼠的共同特征^[23]。但随着年龄的增长,C.Cg.SHJH^{hr}小鼠的指甲长度增加迅速,约6月龄时指甲过度生长,至10月龄后指甲长度不一并有序卷曲,这与SHJH^{hr}小鼠有所不同,但与Liu等^[8]描述的犀牛样小鼠表型完全相同。此外,大体观察发现C.Cg.SHJH^{hr}小鼠在表皮皱褶、活动状态、繁殖性能等方面(尚未发表)也与Gao等^[10]和Li等^[24]报道的SHJH^{hr}小鼠特性有一定差异,这有待于进一步研究。

综上,本研究通过将SHJH^{hr}突变小鼠和BALB/cASHjh近交系小鼠回交-互交的繁育方式,经过10代的同源突变导入,培育了C.Cg.SHJH^{hr}小鼠;通过生化标记基因和SNP检测分析,确认其基因的纯合度以及与受体小鼠基因的一致性;通过全外显子测序发现了引起表型变异的突变基因及关联的系列突变基因,为进一步研究该小鼠在生物医学研究中的作用奠定了基础。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物实验均已通过上海吉辉实验动物饲养有限公司实验动物组织与管理委员会(IACUC)审核批准(No. SHJH-YF-2020-002)。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。

All animal experiments involved in this study have been

approved by Experimental Animal Ethics Committee of Shanghai Jihui Laboratory Animal Care Co, Ltd (Approval Letter No. SHJH-YF-2020-002). All experiments were carried out in accordance with China's laws and regulations on experimental animals.

[作者贡献 Author Contribution]

谈小倩收集资料,并负责数据分析及论文撰写;
杨颢收集资料,并负责全基因外显子测序、多重PCR建库后二代测序及数据分析;
唐慧青负责生化位点标记基因检测及数据分析;
瞿伟和李亮负责动物繁育;
钱珍负责动物繁育及种群建立;
顾坚忠收集资料,并负责突变小鼠模型培育指导;
肖君华负责外显子测序方案设计及把控;
徐平负责课题实验设计及本论文的审核把关。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- AHMAD W, FAIYAZ UL HAQUE M, BRANCOLINI V, et al. Alopecia universalis associated with a mutation in the human hairless gene[J]. *Science*, 1998, 279(5351): 720-724. DOI: 10.1126/science.279.5351.720.
- AHMAD W, RATTERREE M S, PANTELEYEV A A, et al. Atrichia with papular lesions resulting from mutations in the rhesus macaque (*Macaca mulatta*) hairless gene[J]. *Lab Anim*, 2002, 36(1):61-67. DOI: 10.1258/0023677021911777.
- BALE S J. Of hairless mice and men: the genetic basis of congenital alopecia universalis/congenital atrichia[J]. *J Cutan Med Surg*, 1999, 3(6): 309-311. DOI: 10.1177/120347549900300607.
- BERGMAN R, SCHEIN-GOLDSMID R, HOCHBERG Z, et al. The alopecias associated with vitamin D-dependent rickets type IIA and with hairless gene mutations: a comparative clinical, histologic, and immunohistochemical study[J]. *Arch Dermatol*, 2005, 141(3): 343-351. DOI: 10.1001/archderm.141.3.343.
- PANTELEYEV A A, PAUS R, AHMAD W, et al. Molecular and functional aspects of the hairless (hr) gene in laboratory rodents and humans[J]. *Exp Dermatol*, 1998, 7(5): 249-267. DOI: 10.1111/j.1600-0625.1998.tb00295.x-i1.
- SUNDBERG J P, PRICE V H, KING L E Jr. The hairless gene in mouse and man[J]. *Arch Dermatol*, 1999, 135(6):718-720. DOI: 10.1001/archderm.135.6.718.
- ZLOGORSKI A, HOCHBERG Z, MIRMIRANI P, et al. Clinical and pathologic correlations in genetically distinct forms of atrichia[J]. *Arch Dermatol*, 2003, 139(12): 1591-1596. DOI: 10.1001/archderm.139.12.1591.
- LIU Y, SUNDBERG J P, DAS S, et al. Molecular basis for hair loss in mice carrying a novel nonsense mutation (Hr^{th-R}) in the hairless gene (Hr)[J]. *Vet Pathol*, 2010, 47(1):167-176. DOI: 10.1177/0300985809352970.
- 唐慧青,常书福,于志锋,等. SHJH^{hr}小鼠部分生物学特性及衰老表型的测定与分析[J]. *实验动物与比较医学*, 2023, 43(1):44-52.

- DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2022.069.
TANG H Q, CHANG S F, YU Z F, et al. Investigation on biological characteristics and aging phenotype of SHJH^{hr} mice[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(1): 44-52. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.069.
- [10] GAO J F, LI Y C, GUAN Y L, et al. The accelerated aging skin in rhino-like SHJH^{hr} mice[J]. Exp Dermatol, 2022, 31(10): 1597-1606. DOI: 10.1111/exd.14632.
- [11] FOSTER H L, DAVID SMALL J, FOX J G. The Mouse in biomedical research[M]. New York: Academic Press, 1981.
- [12] 钱强, 徐园, 王亚恒, 等. 基于多重PCR靶向二代测序的近交系小鼠遗传质量监测方法建立[J]. 实验动物与比较医学, 2019, 39(2): 111-117. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2019.02.008.
QIAN Q, XU Y, WANG Y H, et al. Mouse genetic quality monitoring method establishment based on next-generation sequencing through multiplex PCR[J]. Lab Anim Comp Med, 2019, 39(2): 111-117. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2019.02.008.
- [13] SNELL G D. Congenic resistant strains of mice[M]//Origins of inbred mice. Amsterdam: Elsevier, 1978:119-156. DOI: 10.1016/b978-0-12-507850-4.50016-0.
- [14] POSEY J E, O'DONNELL-LURIA A H, CHONG J X, et al. Insights into genetics, human biology and disease gleaned from family based genomic studies[J]. Genet Med, 2019, 21(4): 798-812. DOI: 10.1038/s41436-018-0408-7.
- [15] LUPSKI J R. Clinical genomics: from a truly personal genome viewpoint[J]. Hum Genet, 2016, 135(6): 591-601. DOI: 10.1007/s00439-016-1682-6.
- [16] KURAMOTO T, KUWAMURA M, TAGAMI F, et al. Kyoto rhino rats derived by ENU mutagenesis undergo congenital hair loss and exhibit focal glomerulosclerosis[J]. Exp Anim, 2011, 60(1):57-63. DOI: 10.1538/expanim.60.57.
- [17] CICHON S, ANKER M, VOGT I R, et al. Cloning, genomic organization, alternative transcripts and mutational analysis of the gene responsible for autosomal recessive universal congenital alopecia[J]. Hum Mol Genet, 1998, 7(11):1671-1679. DOI: 10.1093/hmg/7.11.1671.
- [18] ZLOTOGORSKI A, AHMAD W, CHRISTIANO A M. Congenital atrichia in five Arab Palestinian families resulting from a deletion mutation in the human hairless gene[J]. Hum Genet, 1998, 103(4):400-404. DOI: 10.1007/s004390050840.
- [19] HSIEH J C, SISK J M, JURUTKA P W, et al. Physical and functional interaction between the vitamin D receptor and hairless corepressor, two proteins required for hair cycling[J]. J Biol Chem, 2003, 278(40): 38665-38674. DOI: 10.1074/jbc.M304886200.
- [20] PANTELEYEV A A, CHRISTIANO A M. The Charles River hairless rat mutation is distinct from the hairless mouse alleles[J]. Comp Med, 2001, 51(1):49-55.
- [21] POTTER G B, BEAUDOIN G M, DERENZO C L, et al. The hairless gene mutated in congenital hair loss disorders encodes a novel nuclear receptor corepressor[J]. Genes Dev, 2001, 15(20):2687-2701. DOI: 10.1101/gad.916701.
- [22] THOMPSON C C, BOTTCHE M C. The product of a thyroid hormone-responsive gene interacts with thyroid hormone receptors[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(16):8527-8532. DOI: 10.1073/pnas.94.16.8527.
- [23] SUNDBERG J P, DUNSTAN R W, COMPTON J G. Hairless mouse, HRS/J^{hr/hr}[M]//Integument and mammary glands. Berlin, Heidelberg: Springer, 1989:192-197. DOI: 10.1007/978-3-642-83749-4_32.
- [24] LI Y C, GAO J F, GUAN Y L, et al. Novel rhino-like SHJH^{hr} mice with thyroid dysfunction[J]. Zool Res, 2021, 42(6):734-738. DOI: 10.24272/j.issn.2095-8137.2021.211.

(收稿日期:2023-04-28 修回日期:2023-06-08)
(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁,姜怡欣)

【引用本文】

谈小倩, 杨颖, 唐慧青, 等. BALB/cA.Cg.SHJH^{hr}小鼠的培育及其相关遗传学特性分析[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(4): 363-370. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.055.
TAN X Q, YANG H, TANG H Q, et al. Creation and analysis of related genetic characteristics of BALB/cA.Cg.SHJH^{hr} mice[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(4): 363-370. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.055.

《实验动物与比较医学》被国际数据库EBSCO收录

2023年2月,《实验动物与比较医学》(Laboratory Animal and Comparative Medicine, LACM) (ISSN 1671-5817, CN 31-1954/Q) 被美国EBSCO学术数据库预收录;同年8月,编辑部收到其正式收录证书,收录起始时间为2023年第1期。

EBSCO Information Services是全球最大的出版物搜索平台之一。目前,EBSCO收录全球期刊8万多种,选用EBSCO产品及服务的全球机构(包括知名学府)超11.5万家,其平台上每天检索数可达1.8亿次。其中,与EBSCO签约合作的国内期刊约400种。

借助EBSCO等国际数据库,本刊发表的论文会有更高的国际显示度及传播广度,相关作者及单位在国际上的学术知名度和影响力将有更大提升,这将有助于推动中文优秀学术成果的国际认可与交流。



(《实验动物与比较医学》编辑部)