

近交系小鼠微卫星 DNA 多态性的研究

张树辉¹, 魏泓², 史景泉¹

(1. 第三军医大学西南医院病理学研究所, 2. 第三军医大学训练部实验动物中心, 重庆, 400038)

摘要 随机选择位于小鼠不同染色体上的微卫星引物 42 对, 用 PCR 技术对 C3H, C57, BALB/c, DBA, TA2, T739, B615, BACB/c-nu-nu 和 SCID 等 9 种实验室常用近交系小鼠微卫星 DNA 多态性进行了研究。结果显示有信息的 40 对引物中, 9 种近交系小鼠在各基因座上均出现一条清晰条带, 28 个基因座表现为多态性。其中 *D3Mit22*、*D7Nds1*、*D11Mit12*、*D12Nds2*、*D15Mit17*、*D16Mit3*、*D16Mit4* 基因座表现为显著多态性。T739、B615 和 TA2 的遗传背景相近, 其相似系数分别为 90% 和 85%; 其次为 TA2、SCID 和 B615, 其相似系数分别为 80% 和 82.5%。结果表明所检测的小鼠符合近交要求, 筛选出的引物能典型地反映 9 个近交系小鼠的品系特异性和遗传背景, 可用于常规检测小鼠品系来源和遗传背景等。

关键词 微卫星 DNA 近交系小鼠 遗传检测

中图分类号: Q963

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2000)06-0375-04

Microsatellite DNA Polymorphisms in Inbred Strain Mice

ZHANG Shu-hui¹, WEI Hong², SHI Jing-quan¹

(1. Research Institute of Pathology, Southwest Hospital; 2. Laboratory Animal Centre, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

Abstract Forty-two microsatellites DNA loci on different chromosomes in nine kinds of inbred strain mice including C3H, C57, BALB/c, DBA, TA2, T739, B615, BALB/c-nu-nu and SCID were investigated by PCR analysis. It showed that all these mice tested display single allelic gene band with forty pairs of informative primers. Twenty-eight loci are polymorphisms, among which the polymorphisms of *D3Mit22*, *D7Nds1*, *D11Mit12*, *D12Nds2*, *D15Mit17*, *D16Mit3*, and *D16Mit4* loci are significant. The genetic background of T739 was similarity with that of B615 and TA2, the similarity indices were 90% and 85% respectively; and that of TA2 was similarity with SCID and B615, the similarity indices were 80% and 82.5%. These results suggest that these mice tested meet the request of inbred strain. Screened primers showing marked polymorphisms topically reflect the speciality of strains and genetic backgrounds, which could be used in determining the strains' origin and genetic background of mice.

Key words: microsatellite DNA; inbred strain mice; genetic monitoring

微卫星 DNA (microsatellite DNA) 是由 2~6 个核苷酸组成, 具有高度多态性的简单串联排列而成的 DNA 重复序列, 广泛存在于原核及真核细胞基因组中。位于很多基因的内含子、基因间隔区, 甚至启动子中。微卫星 DNA 的这种遗传学稳定性已作为衡量人类和动物基因组整体稳定性的良好指标^[1,2]。研究

发现, 在近交系动物, 不同品系间的微卫星 DNA 具有明显多态性, 而同一品系的不同个体不具有多态性^[3]。迄今为止, 对国内实验室常用近交系小鼠微卫星多态性的研究尚未见报道。因此我们随机选择 42 对微卫星多态性引物对 9 种实验室常用近交系小鼠微卫星 DNA 多态性进行了研究。

收稿日期: 2000-04-21; 修回日期: 2000-07-27

基金项目: 本课题受国家重点基础研究发展规划项目(批准号: G2000016106); 国家自然科学基金(批准号: 39600079, 39900173); 全军九五医学卫生科研基金(No. 96M083) 和重庆市攻关项目资助

作者简介: 张树辉(1964-), 男, 江苏省淮安市人, 医学博士, 主治医师, 主要从事肿瘤分子病理学方面的研究, 发表论文 15 篇, 现在济南军区总医院病理科。魏泓(1963-), 男, 教授, 博士生导师, 医学博士。通讯作者: 魏泓 E-mail: weihong@mail.tmmu.com.cn。

1 材料和方法

1.1 材料

近交小鼠 BALB/c、DBA、TA2、T739、B615、BACB/c-nu-nu 和 SCID 均来源于第三军医大学实验动物中心, C3H、C57 购自上海西普尔必凯实验动物有限公司, 6~10 周龄, SPF 级, 每种小鼠各 5 只。

1.2 方法

1.2.1 小鼠基因组 DNA 的提取

取上述小鼠新鲜肝组织 0.3~0.5cm³, 去除血水、结缔组织和脂肪, 在水浴条件下用消毒后的剪刀剪成小碎块后研磨成匀浆, PBS 洗 2 次, 加入 DNA 抽提缓冲液 (10mmol/L Tris-HCl, 10mmol/L EDTA, 1.0% SDS, 200μg/ml 蛋白酶 K, 10mmol/L NaCl, pH8.0) 混合均匀, 置 56℃ 至完全消化, 苯酚-氯仿-异戊醇抽提基因组 DNA, 加入适当体积 TE 缓冲液 (10mol/L Tris-HCl, pH8.0, 1mmol/L EDTA) 溶解, 混合每种小鼠 DNA, 组成 DNA 池, 紫外分光光度法定量后, 20℃ 冻存备用。

1.2.2 微卫星 DNA 的 PCR 扩增

随机选择位于小鼠 3、4、7、11、12、15 和 16 号染色体上的微卫星引物 42 对, 引物基因座名称如下: D3Mit15、D3Mit16、D3Mit17、D3Mit18、D3Mit19、D3Mit21、D3Mit22、D3Nds2、D4Mit1、D4Mit2、D7Mit10、D7Mit12、D7Mit13、D7Mit14、D7Mit15、D7Mit16、D7Mit17、D7Mit18、D7Mit19、D7Mit20、D7Nds1、D11Mit1、D11Mit2、D11Mit4、D11Mit5、

D11Mit7、D11Mit8、D11Mit10、D11Mit11、D11Mit12、D11Mit13、D12Nds2、D15Mit17、D15Nds1、D15Nds2、D16Mit1、D16Mit2、D16Mit3、D16Mit4、D16Mit5、D16Mit6、D16Mit7。引物序列均来自文献^[4], 由中国科学院上海细胞生物研究所合成。

每个 PCR 反应体系共 25μl, 其中 10× buffer 2.5μl, 1.5mmol/L Mg²⁺, 上、下游引物 100pmol/L, 4× dNTP 100μmol/L, Taq 酶 1U, 100ng 基因组 DNA。反应条件: 94℃ 预变性 3min, 94℃ 变性 1min, 50~64℃ 复性 1min, 72℃ 延伸 1~2min, 循环 30~35 次, 最后一个循环后置 72℃ 继续延伸 7~10min, 扩增产物 4℃ 保存。10μl 产物行 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 硝酸银染色。

1.2.3 结果判读

根据聚丙烯酰胺凝胶上 DNA 泳动距离进行结果判读, 泳动距离最长的带设为英文字母 a, 依次分型。9 个品系 DNA 泳动距离一致的, 即表现为单态性, 若有差异即为多态性。统计 9 个小鼠品系在研究基因座上表现出的多态性带数目, 确定等位基因数目。扩增结果按 Lynch 氏法^[5]计算相似系数并分析其相似性 $F = 2N_{AB} / (N_A + N_B)$, 其中, N_{AB} 为两个品系相同谱带数, N_A 、 N_B 为二者分别扩增结果, 若无扩增结果记为“-”。

2 结果

2.1 等位基因分型

等位基因分型依据聚丙烯酰胺凝胶电泳上 DNA 泳动速度, 依泳动速度距离最长者设定为 a, 依次分

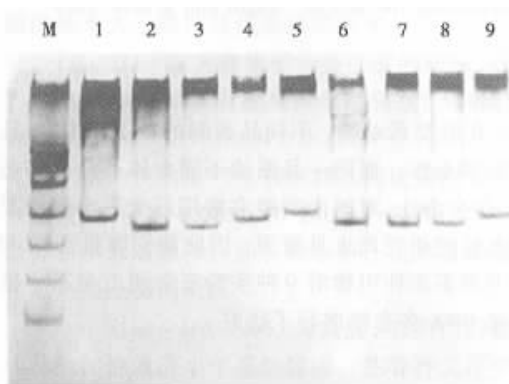


图 1a 基因座 D3Mit22 PCR-SSLP

1. C3H ; 2. BALB/c ; 3. BALB/c-nu-nu ; 4. DBA ; 5. TA2 ; 6. SCID ; 7. T739 ; 8. B615 ; 9. C57 M. marker。BALB/c = BALB/c-nu-nu = SCID = T739 = B615 < DBA = C57 < C3H = TA2。

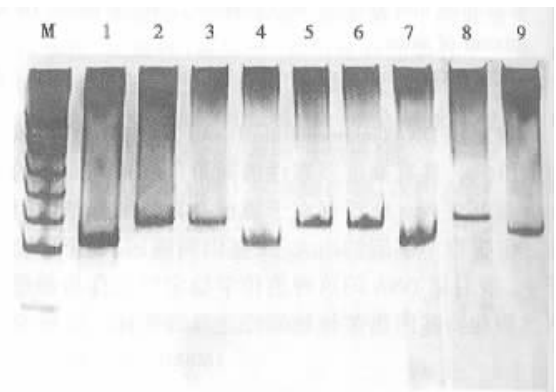


图 1b 基因座 D16Mit4 PCR-SSLP

1. C3H ; 2. BALB/c ; 3. BALB/c-nu-nu ; 4. DBA ; 5. TA2 ; 6. SCID ; 7. T739 ; 8. B615 ; 9. C57 M. marker。BALB/c = BALB/c-nu-nu = SCID = T739 = B615 < DBA = C57 < C3H = TA2。

型 其结果见表 1。在 42 对引物中, 40 对引物具有稳定扩增效果。其中 12 个微卫星基因座表现为单态性, 28 个基因座表现为多态性。在具有多态性的基因座中, *D3Mit22*、*D7Nds1*、*D11Mit12*、*D12Nds2*、*D15Mit17*、*D16Mit3*、*D16Mit4* 基因座表现为显著多态性(图 1)。

2.2 9 种近交系小鼠的相似系数

9 种近交系小鼠之间的相似系数见表 2。由表 2 可知, T739 与 B615 和 TA2 的遗传背景相近, 其相似系数分别为 90% 和 85%; 其次为 TA2 与 SCID 和 B615, 其相似系数分别为 80% 和 82.5%。

3 讨 论

实验动物质量对医学生物学研究中动物实验结果的准确性、重复性及科学性有重要影响。随着生物医学科学的发展, 对实验动物和实验材料的标准化要求越来越高。实验动物遗传监测是评定和保证实验动物质量必不可少的措施。预先了解实验材料的遗传背景, 对于实验结果的准确性、科学性和可重复性提供可靠的保证。目前在实验动物遗传监测中常用的方法主要是利用动物的免疫标志、生化标志、形态特征等进行表型监测, 存在明显的局限性^[6]。近几年的研究表明, 利用 PCR 技术分析微卫星基因座的多态性在小鼠的基因制图、连续分析、基因定位和疾病诊断等的研究中是一种极其有效的、重要的研究手段。选择微卫星 DNA 重复序列两侧的侧翼序列设计引物, 进行锚定 PCR 扩增, 重复性高, 可比性强, 在 DNA 水平上, 利用 DNA 多态性测定种系或种系间差异, 要比

其他标记更稳定。因此, 在人类基因组多样性研究及动物多态检测中发挥着愈来愈重要的作用, 成为目前最为重要以及广泛应用的 DNA 多态性标记系统^[7]。

Dietrich 等在 1992 年构建了由 317 个 SSLP 基因座组成的 4.3cM 小鼠遗传图谱^[4], 1996 年该研究小组发表的小鼠基因组遗传图谱中, 包含了 6580 个高信息容量的简单重复序列多态性标记物, 平均间隔

表 1 9 个近交系小鼠微卫星 DNA 等位基因表型

| 基因座 | C3H | BALB/c | BALB/C - nu | DBA | TA2 | SCID | T739 | B615 | C57 |
|-----------------|-----|--------|-------------|-----|-----|------|------|------|-----|
| <i>D3Mit15</i> | a | a | a | b | a | a | a | a | a |
| <i>D3Mit16</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>D3Mit17</i> | a | a | a | a | a | a | a | a | b |
| <i>D3Mit18</i> | a | a | a | b | a | a | a | a | b |
| <i>D3Mit19</i> | b | b | b | b | b | b | b | b | a |
| <i>D3Mit21</i> | a | b | b | a | a | b | a | a | b |
| <i>D3Mit22</i> | d | b | b | c | c | a | a | a | a |
| <i>D3Nds2</i> | a | a | a | b | a | a | a | a | b |
| <i>D4Mit1</i> | b | a | a | b | a | a | a | a | b |
| <i>D4Mit2</i> | b | a | a | b | a | a | a | b | b |
| <i>D7Mit10</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>D7Mit12</i> | a | a | a | b | a | a | a | a | a |
| <i>D7Mit13</i> | a | a | a | a | a | a | a | a | a |
| <i>D7Mit14</i> | b | a | a | b | b | b | b | b | b |
| <i>D7Mit15</i> | b | a | a | b | b | b | b | b | b |
| <i>D7Mit16</i> | a | a | a | a | a | a | a | a | a |
| <i>D7Mit17</i> | b | a | a | b | a | a | a | a | b |
| <i>D7Mit18</i> | a | a | a | a | a | a | a | a | a |
| <i>D7Mit19</i> | a | a | a | a | a | a | a | a | a |
| <i>D7Mit20</i> | a | a | a | a | a | a | a | a | a |
| <i>D7Nds1</i> | c | d | d | b | d | d | a | a | a |
| <i>D11Mit1</i> | a | b | b | a | a | b | a | a | a |
| <i>D11Mit2</i> | a | a | a | c | a | a | a | a | b |
| <i>D11Mit4</i> | a | a | a | c | a | a | a | a | b |
| <i>D11Mit5</i> | a | a | a | a | a | a | a | a | a |
| <i>D11Mit7</i> | a | a | a | a | a | a | a | a | a |
| <i>D11Mit8</i> | b | a | a | b | b | a | b | b | b |
| <i>D11Mit10</i> | a | a | a | a | a | a | a | a | a |
| <i>D11Mit11</i> | a | a | a | a | a | a | a | a | a |
| <i>D11Mit12</i> | c | b | b | a | a | a | a | b | a |
| <i>D11Mit13</i> | a | a | a | a | a | a | a | a | a |
| <i>D12Nds2</i> | c | b | b | a | d | d | b | c | d |
| <i>D15Mit17</i> | b | b | b | b | b | a | c | c | c |
| <i>D15Nds1</i> | a | a | a | a | a | a | a | a | b |
| <i>D15Nds2</i> | b | a | a | a | a | a | a | a | b |
| <i>D16Mit1</i> | a | a | a | a | a | a | a | a | a |
| <i>D16Mit2</i> | a | a | a | a | a | a | a | a | a |
| <i>D16Mit3</i> | a | c | c | a | c | c | c | c | b |
| <i>D16Mit4</i> | a | c | c | a | c | c | a | c | c |
| <i>D16Mit5</i> | b | a | a | a | b | a | b | b | b |
| <i>D16Mit6</i> | a | a | a | a | b | a | a | a | b |
| <i>D16Mit7</i> | a | b | b | a | a | b | a | a | a |

表 2 任意两个品系间微卫星基因座相同等位基因数目及相似系数

| | C3H | BALB/c | BALB/c - nu | DBA | TA2 | SCID | T739 | B615 | C57 |
|-------------|----------|--------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|
| C3H | - | 23* | 23 | 30 | 30 | 28 | 31 | 31 | 25 |
| BALB/c | 0.575* * | - | 40 | 19 | 28 | 23 | 18 | 30 | 16 |
| BALB/c - nu | 0.575 | 1.00 | - | 19 | 28 | 23 | 18 | 30 | 16 |
| DBA | 0.75 | 0.475 | 0.475 | - | 24 | 21 | 25 | 24 | 23 |
| TA2 | 0.75 | 0.700 | 0.700 | 0.600 | - | 32 | 34 | 33 | 23 |
| SCID | 0.700 | 0.575 | 0.575 | 0.525 | 0.800 | - | 33 | 30 | 19 |
| T739 | 0.775 | 0.450 | 0.450 | 0.625 | 0.850 | 0.825 | - | 36 | 23 |
| B615 | 0.775 | 0.750 | 0.750 | 0.600 | 0.825 | 0.750 | 0.90 | - | 23 |
| C57 | 0.625 | 0.400 | 0.400 | 0.575 | 0.575 | 0.475 | 0.575 | 0.575 | - |

注: * 表示 C3H 与 BALB/c 在同一基因座具有的相同碱基数的基因座数 * * 表示 C3H 与 BALB/c 两品系之间相似系数。

为 0.2cM, 大大高于该研究小组在 1994 年所报道的 4006 个微卫星基因座建立的遗传图 (平均间隔 1.1cM) 的精确度, 该图的建立标志小鼠遗传连锁图已经完成。截止 1999 年已发现 7377 个微卫星多态性引物^[1,10]。小鼠遗传图谱的建立对于基因分析和基因操作 (包括一些具有生物学特征的突变基因的制图、克隆基因的染色体定位、具有特定基因型动物的制成), 构建具有排列有序的克隆基因的基因图谱, 以及研究哺乳动物的基因进化、人类疾病的小鼠模型具有重要意义。本实验为我们开展国内近交系小鼠的遗传作图、及基因定位和实验动物的遗传背景提供了重要的信息。与其他 DNA 多态标记一样, 微卫星 DNA 呈孟德尔共显性方式遗传, 选择微卫星基因座侧翼序列设计引物进行 PCR 扩增时, 引物特异性结合到一对染色体上, 上游沿引物 5'→3' 单向逐个将核苷酸单体加上去, 下游沿引物 3'→5' 单向逐个加上, 合成至相对另一条引物的 3' 端结束, 扩增的微卫星片段在聚丙烯酰胺凝胶电泳时, 如表现为一条片段则为纯合子, 两条片段则为杂合子。本研究结果显示, 40 对有信息的引物, 9 种近交系小鼠在各基因座上均出现一条清晰条带, 说明所检测的小鼠在研究的基因座上表现为纯合。结合以往实验的研究结果, 进一步证实这些近交系小鼠是符合近交要求的。

近交系小鼠品系间差异虽然明显小于动物种属间差异, 但微卫星 DNA 在生物基因组基因座中相对较保守, 所以各品系间具有特异性。如果采用“地毯式轰炸”般的筛选, 肯定会找到具有品系差异性和特异性的基因座。本研究采用 42 对微卫星引物对 9 个近交系小鼠品系的多态性研究, 发现 28 个微卫星基因

座具有多态性, 其中基因座 *D3Mit22*、*D7Nds1*、*D11Mit12*、*D12Nds2*、*D15Mit17*、*D16Mit3* 和 *D16Mit4* 表现出显著多态性, 筛选出 *D3Mit22*、*D7Nds1*、*D11Mit12*、*D12Nds2*、*D15Mit17* 和 *D16Mit4* 基因座, 能典型地反映出 9 个近交系小鼠的品系特异性和遗传背景, 可用于常规检测小鼠品系来源和遗传背景等。

参 考 文 献:

- [1] O'Brien S J, Menotti-Raymond M, Murphy W J, et al. The promise of comparative genomics in mammals[J]. Science, 1999, 286(5439): 458 ~ 462; 479 ~ 481.
- [2] Copeland N G, Jenkins N A, Gilbert D J, et al. A genetic linkage map of the mouse: current applications and future prospects[J]. Science, 1993, 262(5130): 57 ~ 66.
- [3] Dietrich W F, Copeland N G, Gilbert D J, et al. Mapping the mouse genome: current status and future prospects[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(24): 10849 ~ 10853.
- [4] Dietrich W, Katz H, Lincoln S E, et al. A genetic map of the mouse suitable for typing intraspecific crosses[J]. Genetics, 1992, 131(2): 423 ~ 447.
- [5] Lynch M. The similarity index and DNA finger printing[J]. Mol Biol Evol, 1990, 7(2): 478 ~ 484.
- [6] 魏泓. 医学实验动物学 [M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1998, 52 ~ 55.
- [7] Smouse P E, Chevillon C. Analytical aspects of population-specific DNA fingerprinting for individuals[J]. J Hered, 1998, 89(2): 143 ~ 150.
- [8] Dietrich W F, Miller J, Steen R, et al. A comprehensive genetic map of the mouse genome[J]. Nature, 1996, 380(6570): 149 ~ 152.
- [9] Dietrich W F, Miller J C, Steen R G, et al. A genetic map of the mouse with 4,006 simple sequence length polymorphisms[J]. Nat Genet, 1994, 7(2 Spec No): 220 ~ 245.
- [10] Van Etten W J, Steen R G, Nguyen H, et al. Radiation hybrid map of the mouse genome[J]. Nat Genet, 1999, 22(4): 384 ~ 387.