

寡聚核苷酸探针在近交系小鼠遗传检测中的应用

王芳 孙以方* 段天林 张文慧 安蓓

(兰州大学医学实验中心 兰州 730000)

摘要 :用两个非放射性标记的寡聚核苷酸探针($(GGAT)_4$ 和 $(GTG)_3$)制作 BALB/c、C57BL/6J、DBA/2、C3H 等 4 种近交系小鼠的 DNA 指纹图,比较了两种探针在近交系小鼠遗传检测应用中的重复性和稳定性。结果表明,两种探针对上述 4 种近交系小鼠产生的 DNA 指纹图的图带数均为 8~12 条,具有良好的多态性。品系内的平均 DNA 指纹图相似系数(\bar{x})在 0.92~1.00 的范围内,具有相同指纹图的概率(P)均在 0.31 以上,极显著地高于品系间的相似系数(0.22~0.39)和相同指纹图的概率($P < 1.07 \times 10^{-4}$)。说明($(GGAT)_4$ 和 $(GTG)_3$)两种寡聚核苷酸探针均可用于制作近交系小鼠的 DNA 指纹图,以对其进行遗传检测。用两种不同的探针进行 DNA 指纹分析,可以检出基因组中更多的个体特异性信息,结果更加可靠。

关键词 :DNA 指纹技术;寡聚核苷酸探针;近交系小鼠;遗传检测

中图分类号 S813.23 Q78 文献标识码 A 文章编号 0250-3263(2007)04-28-05

The Application of Oligonucleotide Probes in the Genetic Monitoring of Inbred Strain Mice

WANG Fang SUN Yi-Fang* DUAN Tian-Lin ZHANG Wen-Hui AN Bei

(Center for Medical Experiment, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract :This study aimed to draw the DNA fingerprints of BALB/c, C57BL/6J, DBA/2, C3H inbred strain mice generated by two different non-radioactive labeled oligonucleotide probes ($(GGAT)_4$ and $(GTG)_3$), and compared the reproducibility and stability of these two probes used in DNA fingerprinting for genetic monitoring. The results showed that there were 8-12 distinguishable bands on every DNA fingerprinting map generated by two probes and each map had polymorphism. The similarity coefficient (\bar{x}) within breeds was 0.92-1.00, and the probability of an identical DNA fingerprinting (P) was above 0.31, significantly higher than that between breeds ($\bar{x} = 0.22-0.39$, $P < 1.07 \times 10^{-4}$). It was indicated that the oligonucleotide probes ($(GGAT)_4$ and $(GTG)_3$) could be used in DNA fingerprinting for genetic monitoring in inbred strain mice. Meanwhile, when we made DNA fingerprinting with two different probes, more individually specific information could be detected and the results were more reliable.

Key words :DNA fingerprinting; Oligonucleotide probe; Inbred strain mice; Genetic monitoring

近交系小鼠在生物医学领域发挥着越来越重要的作用,因此对近交系小鼠进行遗传质量监测,可以保证其质量,提高相关实验的重复性和可信度。自 1985 年 Jeffreys 等报道了人类基因组高变区小卫星 DNA 和 DNA 指纹技术以来^[1,2],DNA 指纹图谱技术因其高变异性、多位点性、简单而稳定的遗传性等优点在法医学、临床医学^[3,4]、实验动物的遗传监测^[5~8]中得到了

越来越广泛的应用。指纹技术中用到的探针及其标记和检测方法也随着大量高水平微卫星探针、寡聚核苷酸探针的出现、计算机分析软件的

* 通讯作者, E-mail: ylsunyf@126.com;

第一作者介绍 王芳,女,硕士研究生,研究方向:实验动物遗传学, E-mail: wangf@lzu.edu.cn.

收稿日期:2007-02-08, 修回日期:2007-05-11

使用、实验技术的提高以及统计方法的改进而日益完善。本文用非放射性标记人工合成的寡聚核苷酸探针($(GGAT)_4$ 以及 $(GTG)_3$) 制作了近交系小鼠的 DNA 指纹图,探讨了将这两种探针应用于这一领域的可行性。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 SPF 级 BALB/c、C57BL/6J、DBA/2 近交系小鼠 30 只,由兰州大学实验动物中心提供,动物质量合格证号分别为:医动字 14-005、14-003、14-004。SPF 级 C3H 近交系小鼠 30 只,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,合格证号:SCXK(沪)2003-0003。体重 18 ~ 22 g。每个品系每次实验各随机抽取两只,雌雄各一。颈椎脱臼处死后,采集脑、肝组织备用。

1.2 主要试剂与仪器 DNA 提取试剂盒, Axygen 公司; *Hae* III 核酸限制性内切酶,大连 TaKaRa 公司;带正电荷的尼龙膜,Amersham 公司;生物素标记的探针 5' biotin- $(GGAT)_4$ 、5' biotin- $(GTG)_3$, TaKaRa 公司合成;链亲和素-碱性磷酸酶标记偶联物(SA-AP),Promega 公司; NBT/BCIP, Promega 公司。LYY-III 2B 型三恒多用电泳仪,北京市六一仪器厂。岛津 2550 型紫外分光光度计,日本岛津公司。

1.3 方 法

1.3.1 基因组 DNA 的提取 将实验鼠颈椎脱臼处死后,取 1 ~ 20 mg 动物肝或脑组织,移入冰浴预冷的组织匀浆器中,快速、用力研磨成匀浆,然后按美国 Axygen 公司生产的 Multisource Genomic DNA Mini-prep kit 说明进行操作。用紫外分光光度计测得提取 DNA 样品的浓度和纯度, OD_{260}/OD_{280} 值均在 1.8 ~ 2.0 之间。

1.3.2 DNA 的酶切、电泳和转移 用 *Hae* III 酶切基因组 DNA,将完全酶切产物以 1 V/cm 电压在 0.8% 的琼脂糖凝胶上电泳 13 ~ 15 h,将凝胶脱嘌呤、碱变性、中和后在 $20 \times SSC$ (3 mol/L NaCl 0.3 mol/L 柠檬酸钠, pH 7.0) 中用虹吸法转移至尼龙膜上,转膜完成后在 $2 \times SSC$ 中漂洗,吸干, $80^\circ C$ 烘烤 2 h 固定 DNA。

1.3.3 探针标记 由 TaKaRa 公司在合成探针的同时于 5' 端标记生物素。

1.3.4 杂交和显色

(1) 探针 $(GGAT)_4$ 的杂交:将膜装入杂交袋,加入适量预杂交液($5 \times SSC$, 1% SDS, pH 7.0, 0.5% BSA),排尽气泡, $43^\circ C$ 水浴预杂交 10 min;弃去预杂交液,加入适量杂交液(50 $\mu l/cm^2$, 成分同上),同时加入适量生物素标记的探针 5' biotin- $(GGAT)_4$ (0.1 ~ 10 pmol/ml),排尽气泡,在 $43^\circ C$ 下杂交 45 min;用 10 ml 洗膜液($1 \times SSC$, 0.1% SDS, pH 7.0),在 $38^\circ C$ 温和搅拌洗膜 10 min;加入 10 ml $1 \times SSC$,在室温下温和搅拌洗膜 10 min;在一新的杂交袋中,加入 5 ml 3% BSA,室温封闭 15 min;弃去封闭液,加入 5 ml 含 1 $\mu g/ml$ SA-AP 的 3% 的 BSA (SA-AP 0.5 μl , 溶于 30 mg/ml BSA),室温孵育 13 min;弃去上述反应液,用 5 ml 洗膜缓冲液(0.05 mol/L Tris-HCl, pH 7.4, 0.2 mol/L NaCl, 6% Tween-20)洗 3 次,每次 5 min;将尼龙膜取出装入另一新的杂交袋中,加入 5 ml NBT/BCIP 底物工作液(0.15 mol/L NaCl, 0.1 mol/L Tris-Cl, pH 9.5, 1 mmol/L $MgCl_2$, 330 $\mu g/ml$ NBT, 165 $\mu g/ml$ BCIP),混匀,排尽气泡,室温下避光显色 15 min 至 2 h;显色适度后水冲终止反应。

(2) 探针 $(GTG)_3$ 的杂交:预杂交和杂交均在 $45^\circ C$ 下进行,杂交完毕用洗膜液在 $40^\circ C$ 温和搅拌洗膜 10 min;其余均与上述探针相同。

2 结 果

2.1 寡聚核苷酸探针产生的小鼠 DNA 指纹图

$(GGAT)_4$ 与 $(GTG)_3$ 两种探针都能与 4 个品系近交系小鼠的 *Hae* III 酶切 DNA 片段杂交,产生具有个体特异性的 DNA 指纹图(图 1)。同一品系内两个体图带分布基本一致,而品系间存在显著差异。 $(GGAT)_4$ 探针产生的指纹图的平均图带数为 10.8 ~ 12.4 ($(GTG)_3$ 探针产生的平均图带数为 8.6 ~ 11.2,均主要分布在 2 kb 以上。

2.2 品系内指纹图的变异性 同一品系内不

同个体的 DNA 指纹图进行两两配对比较,通过

$$\bar{x} = \sum \frac{x_i}{n}$$

计算平均相似系数,式中 n 为两两配对比较数目, x 是相似系数, $x = 2 N_{ab} / (N_a + N_b)$,式中 N_a 和 N_b 分别为个体 A 和 B 的总带数, N_{ab} 为同一品系两个个体的共有带数,共有带是指在图中的位置相同、强度较一致的带,通过 $\bar{q} = 1 - \sqrt{1 - \bar{x}}$ 计算平均等位基因频率,显示 4 个品系小鼠 DNA 指纹图的平均相似系数(\bar{x}) 在

0.95 左右,平均等位基因频率(\bar{q}) 在 0.72 ~ 1.00 之间,说明不太可能存在遗传污染或遗传突变(表 1)。

2.3 品系间的变异性 对同一图上不同品系的 DNA 指纹图进行两两配对比较,求得平均相似系数见表 2。可以看出,不同品系间 DNA 指纹图的相似系数仅为 0.22 ~ 0.39,大大低于各品系内相似系数(表 1),说明各品系间的遗传物质有较大差异。

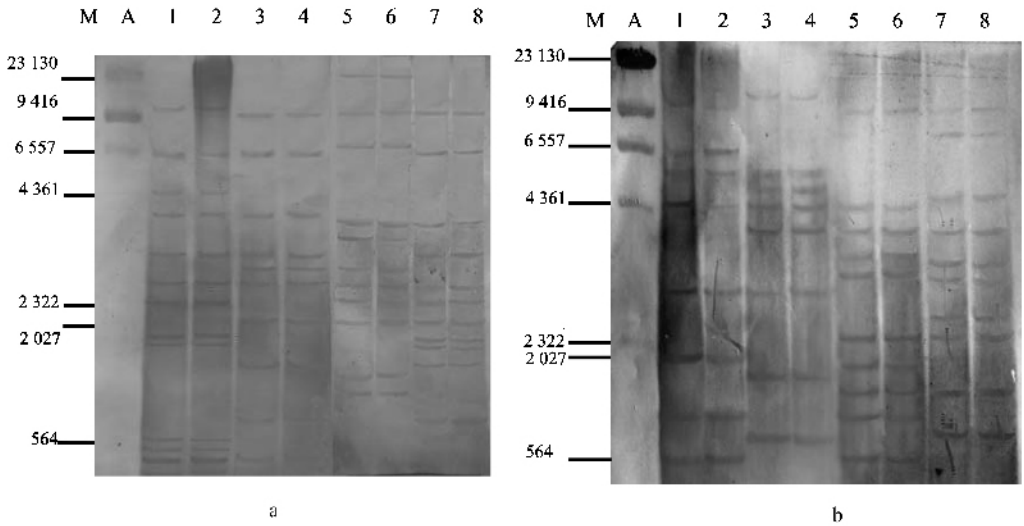


图 1 不同探针产生的 4 个品系小鼠的 DNA 指纹图

Fig. 1 DNA fingerprint of four inbred strain mice generated by different probes

a (GGAT)₄ 探针; b (GTG)₅ 探针; M λ-Hind III digest DNA; A 能与探针杂交的条带。

a (GGAT)₄ probe; b (GTG)₅ probe; M λ-Hind III digest DNA maker; A bands which could hybrid with probes. 1 :C57BL/6J♀; 2 :C57BL/6J♂; 3 :C3H♀; 4 :C3H♂; 5 :BALB/c♀; 6 :BALB/c♂; 7 :DBA/2♀; 8 :DBA/2♂.

表 1 品系内 DNA 指纹图的变异程度

Table 1 Intra-breed variabilities of DNA fingerprinting map

品系 Breeds	参数 Parameter	探针 Probe	
		(GGAT) ₄	(GTG) ₅
C57BL/6J	测试个体数 Testing number	20	30
	$\bar{x} \pm SD(n)$	0.93 ± 0.01(45)	0.96 ± 0.01(105)
	\bar{q}	0.74	0.80
C3H	测试个体数 Testing number	20	30
	$\bar{x} \pm SD(n)$	0.92 ± 0.05(45)	0.98 ± 0.01(105)
	\bar{q}	0.72	0.86
BALB/c	测试个体数 Testing number	20	30
	$\bar{x} \pm SD(n)$	0.94 ± 0.02(45)	1.00 ± 0.00(105)
	\bar{q}	0.76	1.00
DBA/2	测试个体数 Testing number	20	30
	$\bar{x} \pm SD(n)$	0.95 ± 0.03(45)	0.99 ± 0.01(105)
	\bar{q}	0.78	0.90

表 2 不同品系之间 DNA 指纹图的相似系数

Table 2 Interbreed similarity coefficient of DNA fingerprinting map

品系 Breeds	探针 Probe	
	(GGAT) ₄	(GTG) ₃
C57BL/6J 与 C3H	0.26 ± 0.05(40) ^a	0.37 ± 0.06(60)
C57BL/6J 与 BALB/c	0.28 ± 0.12(40)	0.33 ± 0.04(60)
C57BL/6J 与 DBA/2	0.34 ± 0.07(40)	0.22 ± 0.13(60)
C3H 与 BALB/c	0.36 ± 0.01(40)	0.23 ± 0.08(60)
C3H 与 DBA/2	0.38 ± 0.04(40)	0.22 ± 0.07(60)
BALB/c 与 DBA/2	0.35 ± 0.03(40)	0.39 ± 0.02(60)

a 括号中的数字为配对比较的数目。

a The numbers in the bracket are obtained by paired comparison.

表 3 同一品系、不同品系个体之间具有相同 DNA 指纹图的概率

Table 3 The probability of an identical DNA fingerprinting within and between breeds

品系 Breeds		相同 DNA 指纹图的概率 P	
		Probability of an identical DNA fingerprinting P (GGAT) ₄	(GTG) ₃
C57BL/6J	1		
	2	4.1×10^{-1}	7.0×10^{-1}
C3H	1		
	2	4.1×10^{-1}	8.2×10^{-1}
BALB/c	1		
	2	5.1×10^{-1}	10.0×10^{-1}
DBA/2	1		
	2	5.7×10^{-1}	3.1×10^{-1}
C57BL/6J 与 C3H		1.64×10^{-7}	1.07×10^{-4}
C57BL/6J 与 BALB/c		3.40×10^{-7}	2.67×10^{-5}
C57BL/6J 与 DBA/2		3.29×10^{-6}	3.09×10^{-7}
C3H 与 BALB/c		1.45×10^{-5}	3.58×10^{-7}
C3H 与 DBA/2		2.63×10^{-5}	1.25×10^{-7}
BALB/c 与 DBA/2		9.65×10^{-6}	3.83×10^{-5}

2.4 两种探针的多态性

2.4.1 品系特异性带数 根据某个品系的 DNA 指纹图带是否出现于另外 3 个品系的图中,计算各品系的特异性带数及占该品系总带数的百分比。百分比数越大,表明该探针的多态性越好。(GTG)₃ 探针产生的品系特异性带数(8~10)及占该品系总带数的百分比(30.0%~50.0%)要比(GGAT)₄ 探针产生的品系特异性带数(6~8)及占该品系总带数的百分比(30.0%~36.4%)高,表明(GTG)₃ 探针的多态

性较好。由于本研究比较的个体数较少,某些品系特异性图带实际上可能不是特异性的,而只是在不同品系内的频率不同。

2.4.2 相同指纹图概率 由于近交系动物在遗传上仍存在一定的杂合性,因此其 DNA 指纹图谱不可能完全一致,必将显现一定的差异,这种差异的大小可由相同指纹图概率(P)来表示。P 值越大,表明两个体间的遗传差异越小,当 P = 1 时,表明两个体完全相同^[9]。我们通过计算 P 值($P = x^n$, x 是相似系数, n 为个体平均图带数)分析同一品系、不同品系两个体之间具有相同指纹图的概率(表 3),得出同一品系内相同指纹图的概率均在 0.31 以上,极显著地高于品系间的相同指纹图的概率($P < 1.07 \times 10^{-4}$)。P 不但可反映出动物个体间的亲缘关系,而且还反映出动物群体间的遗传距离^[10]。还可利用 P 值大小判断探针的多态性, P 值越小,探针的多态性越好。

3 讨论

在近交系动物的遗传监测中,国家标准采用的是生化位点法,该法因其反映遗传位点有限,准确度受到影响。一个好的遗传检测方法所用的遗传标记必须是既遵循简单的孟德尔遗传方式,亲子间稳定遗传,又在生物的进化过程中具有一定的变异而表现出足够的多态性。DNA 指纹技术以基因组中广泛存在的高度可变串联重复序列(VNTRs)为遗传标记,恰好具有上述优点^[11]。

用于 DNA 指纹技术的探针种类较多,包括人源的克隆探针 33.6、33.15、MYO^[12]、3'HVR^[13] 探针,野生型或重组的 M13 噬菌体探针^[14],以及从某些动物的基因组中分离克隆的一些小卫星探针和微卫星探针,这些探针都较长,结构复杂,来源困难,很少出现在基因组的编码区,绝大多数分布在基因的端粒和着丝粒等部位。本文使用的两种寡聚核苷酸探针都较短(< 20 bp),可直接合成,成本低,随机分布于整个基因组中,并且杂交过程很快,操作简便,同时避免了放射性同位素的污染。国外 Epplen^[15~17]曾

用 (GTG)₃ / (CAC)₃ 研究人类及近交系动物的 DNA 指纹图,而国内尚未见到用 (GTG)₃ / (CAC)₃ 寡核苷酸探针进行近交系小鼠遗传检测的报道。故本文利用 (GGAT)₄ 和 (GTG)₃ 寡核苷酸探针及非放射性标记技术对 4 个近交品系小鼠进行遗传检测,获得了多态性好、清晰易辨的 DNA 指纹图,这种方法简单易行、判定直观、结果可信性强、特异性高,可反映出个体间的变异程度、亲缘关系及遗传距离。同时试验发现同一动物的 DNA 不同次试验结果具有一致性,同一动物不同组织(脑和肝)产生 DNA 指纹图的结果也完全相同,表明 (GGAT)₄ 和 (GTG)₃ 探针稳定性、重复性好,适合于小鼠的基因指纹分析,是近交系小鼠遗传检测的又一手段。另外,通过对品系特异性带数及占该品系总带数的百分比以及相同指纹图概率的研究,发现 (GTG)₃ 探针的多态性、稳定性比 (GGAT)₄ 探针略好一些。

目前,在人类及其他哺乳动物的基因组中又发现了不少的高变区 (HVRs) 或可变串联重复序列,其产生机理及应用仍然是研究的热点^[18,19]。同时,DNA 指纹技术与目前的生化标记分析方法相比尚存在一些问题,操作繁琐、判定上缺乏标准,以及无确切的 x 和 P 值等来衡量近交系动物个体间、群体间与不同品系间的差异及不能区分杂合体和纯合体等,因此如何进一步简化操作、如何根据 DNA 指纹图谱确定个体在该位点上的基因型、如何掌握特异性的探针、如何建立统一的标准用于实验室间的使用和参考等问题都有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Jeffreys A J, Wilson V, Thein S L. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature*, 1985, **314**: 67 ~ 74.
- [2] Jeffreys A J, Wilson V, Thein S L. Individual Specific "fingerprinting" of human DNA. *Nature*, 1985, **316**: 76 ~ 82.
- [3] Inamori H, Takagi S, Tajima R, et al. Frequent and multiple mutations at minisatellite loci in sporadic human colorectal and gastric cancers-possible mechanistic difference from microsatellite instability in cancer cells. *Jpn J Cancer Res*, 2002, **93**(4): 382 ~ 388.
- [4] Singh K P, Poy D. Identification of novel breast tumor specific mutation(s) in the q11.2 region of chromosome 17 by RAPD/AP-PCR fingerprinting. *Gene*, 2001, **269**(1-2): 33 ~ 43.
- [5] 陈振文, 李瑞生, 王冬平等. DNA 指纹图与生化标记分析对近交系小鼠遗传检测的比较. *中国兽医学报*, 2001, **21**(6): 41 ~ 43.
- [6] 李瑞生, 梁蓉晖, 张嘉保等. 近交系大鼠 DNA 指纹图稳定性的研究. *动物医学进展*, 2002, **23**(1): 46 ~ 48.
- [7] 刘德立. DNA 指纹图谱法在哺乳动物和鸟类遗传研究中的应用. *动物学杂志*, 1991, **26**(4): 53 ~ 55.
- [8] 段天林, 孙以方, 张文慧等. DNA 指纹技术在近交系动物遗传检测中的研究. *中国兽医科技*, 2005, (3): 24 ~ 26.
- [9] Siger E, Kuenzle C C, Thomann P E. Modified gel electrophoresis for higher resolution of DNA fingerprints. *Nuc Acids Res*, 1988, **16**(15): 7 739.
- [10] Kan B. DNA fingerprint research in inbred BALB/c and hereditary cataract mutant BALB/c Bk Cat mice. *Hereditas*, 1995, **17**(3): 7 ~ 8.
- [11] Sudo T, Goto N, Hanne H. Identification and minisatellite lineage analysis of SMXA recombinant inbred strain of mice by DNA fingerprinting. *Exp Anim*, 1995, **44**: 87 ~ 93.
- [12] 本间正充, 石山昱夫. DNA フンインガ-ナリントモの法医学的利用. *日法医志*, 1987, **41**(2): 236 ~ 239.
- [13] Higgs D R, Goodbourn S E, Wainscoat J S, et al. Highly variable regions of DNA flank the human alpha globin gene. *Nucleic Acids Res*, 1981, **9**: 4 213 ~ 4 224.
- [14] Vassart G, George M, Monsieur R, et al. M13 phage DNA as a universal maker for DNA fingerprinting. *Science*, 1987, **235**: 683 ~ 684.
- [15] Benecke M, Epplen J T, Schierenberg E. (GTG)₃ allows the distinction between different isolates of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Electrophoresis*, 1996, **17**(7): 1 194.
- [16] Hundrieser J, Numberg P, Czeizel A E, et al. Characterization of hypervariable locus-specific probes derived from a (CAC)₃ / (GTG)₃ multilocus fingerprint in various Eurasian populations. *Hum Genet*, 1992, **90**(1-2): 27 ~ 33.
- [17] Poche H, Wrobel G, Schneider V, et al. Oligonucleotide fingerprinting using (GTG)₃ and (GACA)₄ probes for the differentiation of body fragments. *Arch Kriminol*, 1990, **186**(1-2): 37 ~ 42.
- [18] Dubrova Y E. Germline mutation induction at mouse and human tandem repeat DNA loci. *Adv Exp Med Biol*, 2003, **518**: 115 ~ 129.
- [19] Kauppi L, Jefferys A J, Keeney S. Where the crossovers are: recombination distributions in mammals. *Nat Rev Genet*, 2004, (5): 413 ~ 424.