

# DNA 指纹在近交系动物遗传污染检测中的应用

张小为

(北京医科大学第三医学院妇产科 北京 100083)

孟艳 蔡有余

(中国协和医科大学实验动物学部遗传室 北京 100020)

**摘要** 在用 DNA 指纹为建立葡萄胎动物模型选择动物的过程中,发现“三种”不同来源的 BALB/C 小鼠(分别称为 B、B<sub>1</sub> 和 B<sub>2</sub>,B 为保种培养的无污染 BALB/C)的 DNA 指纹出现了明显差别。与标准的保种品系 B 相比,B<sub>1</sub> 和 B<sub>2</sub> 在 12kb 各缺失了一条 DNA 片段,B<sub>1</sub> 还缺失了 6.6kb 的片段,而在 6kb 处 B<sub>1</sub> 和 B<sub>2</sub> 都增加了一条 DNA 片段。根据 Jeffreys 的统计,每个小卫星 DNA 位点发生 DNA 指纹可观测性突变的概率为 10<sup>-3</sup>,而本文结果为 5 个片段发生变化,如视为突变,其概率为(10<sup>-3</sup>)<sup>5</sup>,即 10<sup>-15</sup>,可能性近乎 0,所以,可以完全排除这些带纹的差异是由突变造成的,而将这样的差异确定为遗传污染更有道理,而且是亲缘关系较近的品系间的污染。

**关键词** DNA 指纹 小卫星 DNA 小鼠 遗传污染

动物实验在医学的发展和进步中所起的作用是无法估量的,而无品系间遗传污染的纯种动物的选择是保障实验结果准确可靠的重要因素。我们在制备葡萄胎动物模型的动物选择中,用 DNA 指纹分析了多种小鼠,意外地观测到异处喂养的“三种”BALB/C 小鼠出现了 DNA 指纹的明显变化(共 5 个位点变化),突变成这些变化的概率为 10<sup>-15</sup>,趋近于 0,故只能是由于品系间遗传污染所致。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** “三种”近交系 BALB/C 小鼠分别命名为 B(来自中国医学科学院实验动物研究所)、B<sub>1</sub> 和 B<sub>2</sub>(分别来自其他动物繁育场),人类肌红蛋白基因内含子重复序列多聚体(Myo)由日本人本间正充制备合成,限制性内切酶 HinfI 为美国 Biolabs 产品, Taq DNA 聚合酶为中国科学院遗传研究所生产, α-<sup>32</sup>P-dCTP (α 位<sup>32</sup>P 脱氧三磷酸胞苷)为北京福瑞公司产品。

**1.2 方法** 1. 鼠 DNA 的提取:将小鼠脱臼处死,解剖提取脾脏,将脾脏的一半放入玻璃匀浆器中,加入 0.5 ml TNE(含 15 mmol/L Tris-Cl, 100 mmol/L NaCl, 50 mmol/L EDTA, pH7.5),冰浴中研磨匀浆,取出 0.5 ml 放入 1.5 ml 离心管中,加入 SDS(十二烷基硫酸钠)和蛋白酶 K(终浓度分别为 0.5% 和 100 μg/

ml),56℃ 中消化 3 小时,饱和酚、氯仿抽提去蛋白,乙醇沉淀 DNA<sup>[1]</sup>,干燥后溶于 TE[含 10mmol/L Tris 和 1mmol/L EDTA(乙二胺四乙酸二钠),pH7.5];2. DNA 的限制性内切酶消化、电泳和 Southern 吸印;见本文参考文献[2];3. 探针制备:Myo 片段大小约 0.5kb(千碱基对),两端分别为 BamHI 和 EcoRI 酶切断端。将其克隆入 PBR322 BamHI 和 EcoRI,转化 DH5α 并扩增,提取和鉴定重组质粒。用 EcoRI 位点测序引物 4ng,1 U Taq DNA 聚合酶、50 μci α-<sup>32</sup>P-dCTP 标记经 BamHI 线性化的 PBR322-Myo,经葡聚糖凝胶 G-50 分离第一个放射峰(>10<sup>9</sup>cpm/μg DNA);4. 预杂交和杂交:见本文参考文献[2]。

## 2 结果

结果见图 1。

**2.1** 图中 B 为中国医学科学院实验动物研究所保种的 BALB/C 小鼠。在 4~23kb 间出现了 16 条 DNA 指纹谱带,其中在 23~9kb 间为 3 条,9~6kb 为 4 条,6~4kb 为 9 条。

**2.2** 图中 B<sub>1</sub> 和 B<sub>2</sub> 为分别来自其他单位实验动物场的 BALB/C 小鼠。两者在 23~4kb 间

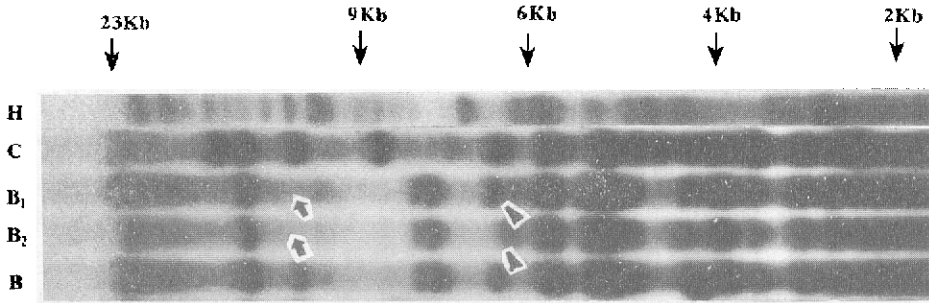


图1 遗传污染的BALB/C小鼠DNA指纹变化(Changes of DNA fingerprint of BALB/C mice Genetic contaminated genetic contaminated)

B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 分别为两种被污染的 BALB/C 小鼠, ↓和 ▲分别表示缺失和增加的带纹(B<sub>1</sub>和 B<sub>2</sub> Two strains BALB/C 小鼠, ↓ and ▲ lost and added fragments, respectively); B 为保种的 BALB/C 小鼠(maintain seed BALB/C); C 和 H 分别为 C57 和人的 DNA 指纹(C and H: C57 and human DNA fingerprints).

出现的 DNA 指纹谱带分别为 15 条和 16 条, 其中在 23~9kb 间均出现 2 条谱带, 在 9~6kb 间也均为 4 条, 6~4kb 分别为 9 条和 10 条。

2.3 将 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 和 B 进行比较: B<sub>1</sub> 在 12kb 处与 B<sub>1</sub> 一样缺失了一条带纹, 在 6.5kb 处增加了一条带纹; B<sub>2</sub> 缺失了两条带纹, 增加了一条带纹, 缺失的两条分别为 12kb 和 6.5kb, 增加的一条约为 7kb。除这些差异外, B、B<sub>1</sub> 和 B<sub>2</sub> 的 DNA 指纹谱带分布与带纹密度完全一致。

2.4 根据文献[3], 每个小卫星位点出现可观测的 DNA 指纹变化的概率为 10<sup>-3</sup>, 本文中出现的变化共为 5 个位点, 发生的概率为 (10<sup>-3</sup>)<sup>5</sup>, 即 10<sup>-15</sup>, 那么, B<sub>1</sub> 和 B<sub>2</sub> 与 B 是同一品系的概率为 1~10<sup>-15</sup>, 所以, 完全可以肯定是由于遗传污染形成杂交品系所致。

2.5 图中 C 和 H 分别代表 C57 和人的 DNA 指纹, 供实验中对比如, 其带纹分布与 B、B<sub>1</sub> 和 B<sub>2</sub> 均有明显差异。

### 3 讨论

DNA 指纹技术由英国的 Jeffreys 创立于 1985 年<sup>[3]</sup>。由于它能够同时分析几十个小卫星 DNA 位点而完全鉴别出除同卵双生外的不同个体, 这一技术的出现对遗传学的进步起到了巨大的推动作用。首先是在法庭科学中得到了创造性的应用, 因为以往的技术只能对犯罪嫌疑人作出排除或不排除, 在不排除的情况下无法作出认定, 而 DNA 指纹技术却可以直接

排除或认定罪犯, 从一滴血或极少量的精液中作出结论, 真正成为法庭科学的一场革命, 成为刑事犯罪侦察技术发展中的里程碑<sup>[3]</sup>。随之, 该技术迅速被用于众多领域的研究, 如肿瘤的基因重排和突变、移民争端、动植物的亲缘关系分析及遗传监测等<sup>[4~7]</sup>。这期间人们还开发出了多种有价值的 DNA 指纹探针, 如 33.15, 33.6, M13 和 Myo 等, 除 Myo 外, 其他探针都曾在动物的研究中得到应用, 如 Jeffreys 等用 33.15、33.6 和 M13 先后分析了小鼠同一品系和亚系的 DNA 指纹, 同一品系内的小鼠是无差别的, 而“系”与“亚系”则有明显的差异<sup>[8]</sup>。但 Myo 在目前的文献中尚未见有用于动物研究的。

我们曾应用 Myo 探针作小鼠亲缘关系的研究, 以期探索新的遗传监测方法, 筛选出亲缘关系较远的小鼠来制备人类葡萄胎的模型。在证实 Myo 序列在小鼠中有广泛的分布(约数百个位点)后, 对 9 种以上的小鼠(包括 3 种来自不同单位的 BALB/C 小鼠)作了分析(结果将另文发表), 其中的 3 种来自不同单位的 BALB/C 小鼠出现了遗传异质性, 见图 1, 其中 B 为确定的保种 BALB/C 小鼠, B<sub>1</sub> 和 B<sub>2</sub> 为非严格保种的 BALB/C 小鼠。与 B 比较, 除结果中提及 2~3 条带纹变化外, 其余的带纹三者完全一致。这种情况的产生, 只有两种可能, 即突变和遗传污染。文献[1]记载的可分辨大片段小卫星 DNA 位点的突变率为 10<sup>-3</sup>, 而 5 个位点同时突变的概率为 10<sup>-15</sup>, 这样的小概率事

件是不可能发生的,所以完全有理由排除突变而确定为遗传污染所致,而且是亲缘关系较近品系的污染。

实验动物的保种育种和定期的遗传监测排除污染是一项极其重要的工作,标志着实验动物的培育和管理水平。使用传统的形态学和生物化学方法费时费力,已远远不能满足实际工作的需要,而 DNA 指纹可一次作出结论,可见近年迅速发展的分子生物学技术的介入,为遗传监测提供了新的手段。我们相信 DNA 指纹技术的成熟和广泛的应用将会为实验动物学的发展和管理水平的提高起到划时代的作用。

### 参 考 文 献

- 1 Jeffreys, A. J., V. Wilson. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature*, 1985, **316**:76~79.
- 2 Zhang Xiao-wei. Restriction fragment length polymorphism

- analysis of forensic science casework in the People's Republic of China. *J. Forensic Science*, 1991, **36**:531~536.
- 3 Jeffreys, A. J., V. Wilson. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 1985, **314**:67~73.
- 4 Pakkala, S. DNA fingerprinting in the detection of residual disease in acute leukemia. *Leukemia*, 1991, **5**:437~440.
- 5 王 黛,辛德莉,张小为,史秀芬.用 DNA 指纹技术检测儿童急性粒细胞白血病的基因重排.北京医科大学学报, 1997, **29**: (2):129~133.
- 6 Hill, W. G. DAN fingerprint analysis in immigration test-cases. *Nature*, 1987, **322**:290~291.
- 7 Georges, A. S. DNA fingerprinting in domestic animals using four different minisatellite probes. *Cytogenet Cell Genet*, 1988, **47**:127.
- 8 Jeffreys, A. J., V. Wilson, R. Kelly. Mouse DNA 'fingerprints': analysis of chromosome localization and germ-line stability of hypervariable loci in recombinant inbred strains. *Nucleic Acids Res.*, 1987, **15**:2823~2835.

## THE FUNCTION AND THE VALUE OF DNA FINGERPRINTS IN THE DETECTION OF INBRED MICE WITH GENETIC CONTAMINATION

ZHANG Xiaowei

(Department of Obstetrics and Gynecology, The Third Hospital, Beijing Medical University Beijing 100083)

MENG Yan CAI Youyu

(Genetics Department of the Institute of Experimental, Chinese Academy of Medical Science Beijing 100020)

**ABSTRACT** Human minisatellite probe, consisting of the core sequence in tandem, can detect many highly polymorphic minisatellites simultaneously to provide a set of genetic markers in human genetic analysis, as well as can crosshybridize to mouse DNA and detect multiple variable loci to producing DNA fingerprint becoming of powerful tool for identifying the genetic relationship and genetic contamination among/between strains of mice. Here it is reported that using the Myo probe and southern blotting the variations of DNA fingerprint of three BALB/C mice from different units were detected in mice selection for establishing animal model of Hydatidiform Mole(HM).

In comparison with the maintain seed BALB/C from The Institute of Experimental Animal of Chinese Academy of Medical Science, the two "BALB/C" B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> from the other units have five loci changes. B<sub>1</sub> lost two and added one fragment with the length of 12kb, 6.6kb and 6kb, respectively. B<sub>2</sub> lost one and added one fragments with the length of 12kb and 6.5kb, respectively. According to the information from Jeffreys, the allele mutation rate of a very large hypervariable fragment of minisatellite is about 10<sup>-3</sup>. Thus, the chance of mutation simultaneous of five fragments is about 10<sup>-15</sup>. The event with such a low probability impossible happened. Therefore, this result is in much reasonable agreement with genetic contamination of BALB/C by a strain with near genetic relationship to BALB/C.

**KEY WORDS** DNA fingerprint Minisatellite DNA Mice Genetic contamination