

构建基于荧光多重 cPCR 的小鼠基因拷贝数检测方法

晁天柱,李鹏翔,徐福意,李凯,周宇荀,肖君华*

(东华大学生物科学与技术研究所,上海 201620)

【摘要】 目的 建立基于竞争性聚合酶链式反应(competitive polymerase chain reaction, cPCR)小鼠基因拷贝数变异(copy number variations, CNVs)的检测方法,用于检测野生小家鼠来源一号染色体替换系群体(population of specific chromosome 1 substitution strains, PCSSs)的CNVs。方法 选取小鼠一号染色体上11个CNVs位点,及7、9和X染色体上各1个内对照位点,分别构建克隆质粒为竞争性模板,应用cPCR技术,建立荧光通用引物多重cPCR检测方法。结果 多重cPCR方案适用于小鼠一号染色体上11个CNV位点的拷贝数检测,且能准确检测X染色体的拷贝数。结论 实现小鼠快速、高通量的CNVs检测,可准确检测小鼠1号染色体中11个CNV位点的拷贝数变异。

【关键词】 拷贝数变异;竞争性模板;通用荧光引物;cPCR;小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015)06-0591-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.06.009

Establishment of a universal fluorescent multiplex cPCR method for detection of copy number variations in mice

CHAO Tian-zhu, LI Peng-xiang, XU Fu-yi, LI Kai, ZHOU Yu-xun, XIAO Jun-hua*

(Institute of Biological Sciences and Biotechnology, Donghua University, Shanghai 201620, China)

【Abstract】 Objective To establish a high throughput general multiple competitive polymerase chain reaction (cPCR) detecting method of copy number variations (CNVs) for the population of chromosome 1 substitution strains from wild mice. **Method** The selected 14 loci, including 11 CNVs on chromosome 1 and internal control loci on other three chromosomes (Chr 7, Chr 19 and Chr X), were detected based on the universal fluorescent primer multiple competitive polymerase chain reaction. All specific cloned plasmids were constructed as competitors. **Results** Altogether 11 CNVs were designed in one panel, and the copy of Chr X accurately reflects the gender. **Conclusions** A rapid and high-throughput fluorescent multiplex cPCR assay is established which can be used for detection of copy number variations on chromosome 1 in mice.

【Key words】 Copy number variations, CNVs; Competitive template; Universal fluorescence primers; cPCR; Mice

小鼠是多基因复杂性状研究的重要模式动物,但利用遗传多样性缺乏的近交系小鼠只鉴定出小部分基因^[1-3]。以具有丰富遗传多样性野生小家鼠^[4]为供体建立的PCSSs群体,是QTL精确定位、基因鉴定的新策略^[5],是近交系品系的有益补充。但迄今,野

生小家鼠和PCSSs群体的CNVs遗传多态性研究甚少。拷贝数变异(CNVs)是人^[6]和小鼠^[7]基因组中一种丰富、重要的遗传多态性^[8-10]。广泛研究发现,CNV不仅影响哺乳动物表型差异^[11],同时与许多人类疾病相关^[12,13]。在41个近交系小鼠中,已鉴定

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(编号:31371257);上海市科委关键项目(编号:12140900404)。

【作者简介】 晁天柱(1982-),男,博士研究生,研究方向:医学分子遗传学, E-mail: chaotianzhu@126.com

【通讯作者】 肖君华(1968-),男,教授,研究方向:医学分子遗传学, E-mail: xiaojunhua@dhu.edu.cn

2096 个 CNVs, 共发现 53 个与人类疾病相关的基因^[14]。且通过解析 CNVs 多样性, 能揭示近交系小鼠种群历史, 基因功能, 指导建立人类疾病模型, 并理解 CNV 发生机制和其潜在的生物功能^[14]。

以芯片技术为基础的 CNV 检测方法, 虽适用于 CNVs 的高通量检测, 但其费用高, 敏感性、操作性和重复性上存在较大问题^[15]。简单多重荧光 PCR 方法成功检测 *FCGR3A* 和 *FCGR3B* 的拷贝数, 却需要与靶基因相似的内源 DNA 重复序列为内对照^[16]。结合外源竞争模板的 cPCR 技术, 能够精确定量 DNA, 检测 DNA 拷贝数^[17,18]。质谱与 cPCR 技术相结合成功定量 mRNA, 具有极佳的准确性和重复性^[19]。而单碱基延伸与 cPCR 结合的方法, 适用于所有序列和基因及基因内相似 CNVs, 甚至是微小缺失和重复的检测, 但操作繁琐^[15,20]。因此, 廉价、简单的 cPCR 技术是检测 PCSSs 群体 CNV 多样性的合适选择。

本研究以“野生小家鼠来源一号染色体替换系”群体构建过程中的 N7 代染色体工程小鼠为样本, 利用 cPCR 技术, 根据 aCGH 检测结果选择 11 个 CNVs 位点, 构建克隆质粒竞争模板及荧光多重 cPCR 检测方案, 以期实现野生小家鼠来源 1 号染色体上 CNVs 的高通量检测。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

8 周龄 SPF 级 C57BL6/J (B6) 小鼠 (雌、雄各 10 只), 体重 18 ~ 26g, 购自上海斯莱克实验动物有限公司 [SCXK (沪) 2012 - 0002]。动物实验遵守 1988 年动物管理条例。实验在东华大学生物科学与技术研究所屏障动物实验设施进行 [SYXK (沪) 2014 - 0022]。收集 14 个 PCSSs 品系构建过程中的 F1 和 N7 代鼠尾组织, -20℃ 保存备用。

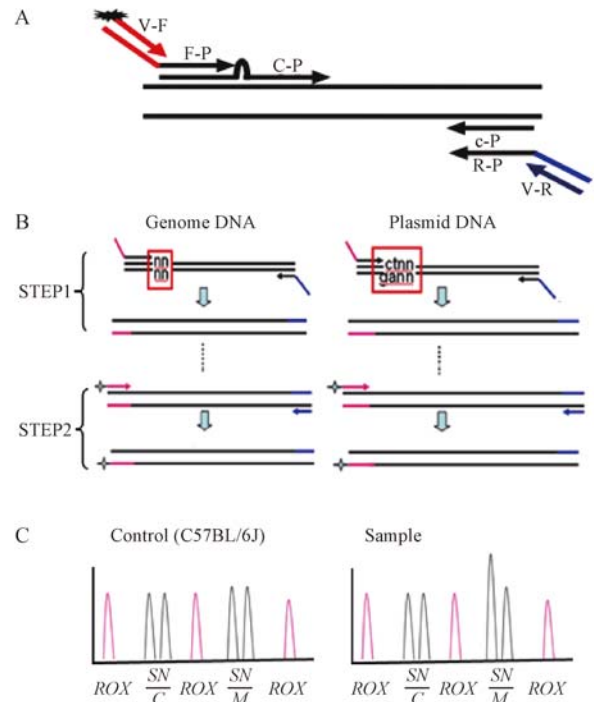
1.2 DNA 提取和酶切

DNA 提取采用 Axygen (爱思进生物技术有限公司) 基因组 DNA 抽提试剂盒。以 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 全自动紫外与可见光分析仪 FR-200A (上海复日科技实验技术研究所) 和 NanoDrop 2000c 超微量分光光度计 (Thermo Fisher Scientific, 美国) 确定 DNA 质量和浓度。基因组 DNA 经限制性内切酶 BamH I (NEB) 酶切。

1.3 引物设计

利用棋盘法设计通用荧光引物: 上游 FAM-

TTCATCCGTTTCGTCTAC; 下游: ACAGCGT-CAATCTCGTTC。14 个位点的 DNA 序列信息来源于 NCBI。所有引物用 Oligo6 设计, 并由上海生物工程技术有限公司合成。图 1A 示意引物设计原则, 所有 cPCR 特异引物和质粒构建用特异引物的序列信息, 分别见表 1 和表 2。



注: A 为检测位点侧翼引物示意图; V-F 和 V-R 表示 cPCR 通用引物, V-F 引物 5' 末端为 FAM-荧光标记; F-P 和 R-P 表示 cPCR 特异性引物; C-P 和 c-P 表示质粒构建用特异引物, C-P 为插入 2 个碱基 (凸起处) 的嵌合体特异引物。B 和 C 为 cPCR 原理示意图 (B: 混合模板两步 cPCR 反应; C: 3730 电泳图)。

图 1 检测位点侧翼引物和 cPCR 原理示意图

Note. A and a represent cPCR general primers (A carries a FAM-fluorescein). B and b represent cPCR specific primers. C and c represent primers for the construction of cloned plasmid competitors, C represents chimeric primers which have two extra bases in the bulge. B and C represent the cPCR diagram.

Fig. 1 Schematic diagram of the primers and cPCR principle

1.4 制备竞争性模板

将嵌合体引物的 PCR 产物连接到 pMD18-T Vector 载体 [宝生物工程 (大连) 有限公司] 并转化到大肠埃希菌。质粒抽提采用 SanPrep 柱式质粒小量抽提试剂盒 (上海生工生物工程技术服务有限公司)。提取的质粒经限制性内切酶 HindIII 和 EcoR I [宝生物工程 (大连) 有限公司] 酶切为线性 DNA, 以 1% 的琼脂糖凝胶电泳和 FR-200A 确定质量。采

用 Tiagen(天根生化科技有限公司)质粒小提试剂盒纯化酶切质粒,使用 NanoDrop 2000c 确定酶切质粒的质量和浓度。

表 1 11 个 CNV 位点和 3 个内对照位点的 cPCR 特异引物

Tab. 1 The specific primers of 11 CNVs and 3 internal control loci for cPCR

染色体 Chr.	位置 Position	上游引物(5' - 3') Upstream primers	下游引物(5' - 3') Downstream primers	产物大小 Product size/bp
19	27915739 - 27916361	TTCGTCCGTTCCGTCTACCTGCTCTTTAGTGGGTCCGTCAT	GTTCCGTCATCGTTCGCTCTGGGTGCTCTGTGATTACTCTG	132
1	175175127 - 175176148	TTCGTCCGTTCCGTCTACCTTTCTCCAAACCCTTTATCTAC	GTTCCGTCATCGTTCGCTCTGGGCTTAAAGTCATATCAAT	149
1	141954657 - 141955281	TTCGTCCGTTCCGTCTACCTTAGAAGAAGTCGTGCGGCAATAG	GTTCCGTCATCGTTCGCTCTGCTGGCGTTGTAAGGTAATG	161
X	103039160 - 103039780	TTCGTCCGTTCCGTCTACCTTTATGTGCATAGGCGGAGAA	GTTCCGTCATCGTTCGCTCTGCATAAAGGCTTGGGTTCACT	176
1	105432160 - 105432782	TTCGTCCGTTCCGTCTACCTCATCCAAGTTGGCATCCCGTTAT	GTTCCGTCATCGTTCGCTCTTACTGGCAGTGTTCACGCTCAAA	186
1	168146833 - 168147454	TTCGTCCGTTCCGTCTACCTAATGAACAAGCCCTGATACAGA	GTTCCGTCATCGTTCGCTCTACGCTGCTTACATCCGTG	215
7	99758205 - 99758827	TTCGTCCGTTCCGTCTACCTCTCTGTGCTCCTTTGGTTGTTGT	GTTCCGTCATCGTTCGCTCTATGTGGTGAGGCAATGGTT	232
1	137195154 - 137195775	TTCGTCCGTTCCGTCTACCTGGACTATGTTGGGCTATGACTC	GTTCCGTCATCGTTCGCTCTAGTTCCTTTGATTTCTGATTCCGATG	240
1	175354538 - 175355160	TTCGTCCGTTCCGTCTACCTAATTTGGTTGGGTTGCTAGGCTA	GTTCCGTCATCGTTCGCTCTATTCTACAACGAAGCCGTACGTA	251
1	141896999 - 141897619	TTCGTCCGTTCCGTCTACCTCTGGGCTAGTGAAGTACACGA	GTTCCGTCATCGTTCGCTCTGGGCACAAGACTTCAATCACT	285
1	38162123 - 38162746	TTCGTCCGTTCCGTCTACCTAGCCAAACATCTCTATCAAGCAC	GTTCCGTCATCGTTCGCTCTTACTGCTCTGGCCCTATCA	295
1	173496351 - 173496972	TTCGTCCGTTCCGTCTACCTCTTCTCACTCAGGCGCATGA	GTTCCGTCATCGTTCGCTCTTCTGGGCACCTGGGTTGTA	312
1	112484891 - 112485514	TTCGTCCGTTCCGTCTACCTCATTTGACTGGCACAACCTTAGACC	GTTCCGTCATCGTTCGCTCTTTAGTCTCTGGCCCTCTATGG	331
1	90003704 - 90004326	TTCGTCCGTTCCGTCTACCTTCAACCTGCCCTCTGCTACTCT	GTTCCGTCATCGTTCGCTCTCATGATTGGCCCTGGGATATTC	354

表 2 构建竞争性质粒模板的特异引物

Tab. 2 The primers for the construction of cloned plasmid competitors

染色体 Chr.	位置 Position	上游嵌合体引物(5' - 3') Upstream chimeric primers	下游引物(5' - 3') Downstream primers	产物大小 Product size/bp
19	27915739 - 27916361	GCTTCTTTAGTGGGTCCGTCAT ₁₉ CATAGCCCTGGTTTTATTG	CTGGGTGCTCTGTGATTACTCTG	94
1	175175127 - 175176148	TTCTCCAAACCCTTTATCTACA ₁ TGGTGTACTTCTACAAT	TGGGCCTTAAGTCATATCAAT	111
1	141954657 - 141955281	TAGAAGAAGTCGTGCTGGCAATAGGA ₁ CAAGATATGCTAATATC	GTCGTGGCGTTCTAAGGTAATG	123
X	103039160 - 103039780	CTCTGTGCTCCTTTGGTTGTTGT _X TTCTTCACTGCTCTGTTCT	ATGTGGGTGAGGCAATGGTT	138
1	105432160 - 105432782	CATCCAAGTTGGCATCCCGTTATGA ₁ CTACCGGGAACGCTATTTTC	TACTTGGCAGTGTTCACGCTCAAA	148
1	168146833 - 168147454	AATGAACAAGCCCTGATACAGAG ₁ TacACAACCTACTGAATAAAA	CAGCCTGGTCTACATCCGTG	177
7	99758205 - 99758827	TTATGTGCATAGGCGGAGAA ₇ CTCACCTTAACTTCTGTAT	GCATAAGCCTTGGGTTCACT	194
1	137195154 - 137195775	GGACTATGTTGGGCTATGACTCT ₁ AatATCTCAGTACTCAGGAAG	AGTTCCTTTGATTTCTGATTCGGATG	202
1	175354538 - 175355160	AATTGTGTTGGGTTGCTAGGCTAG ₁ AgaGAACCTGATAGGAATCTATC	ATTCTACAACCTGAAGCCGTACCTGTA	213
1	141896999 - 141897619	CTGGGCTAGTGAAGTACACGA ₁ CTcTACATGGGGCCCATGGG	GGGCACAAGACTTCAATCACT	247
1	38162123 - 38162746	AGCCAACATTTCTATCAACCACTG ₁ aTATCTTTCAAACAGTTCC	TTGACTGTCTGGCCCTATCA	257
1	173496351 - 173496972	CTTCTCACTCAGGCGCATGTA ₁ gCGACGGAGGTTTTCFAA	TCTGGGCACCTGGCGGTGA	274
1	112484891 - 112485514	CATTGACTGGCACAACCTTTAGAC ₁ TTgTGCCATGAGAAAGAACAT	CITTAGTCTCTGGCCCTCTATGG	293
1	90003704 - 90004326	TCAAACCTGCCCTCTGCTACTCT ₁ CTcTACAGAGTTTCCCATGCT	CATGATGGCCCTGGGATATTC	316

1.5 aCGH 分析

选用 SurePrint G3 Bovine CGH Microarray (Agilent) 芯片,对样本进行 CNV 检测。用 Agilent Genomic Workbench 软件采集并分析数据。所有微阵列比较基因组杂交 (Array-CGH) 检测反应由复旦大学生命科学学院张峰课题组完成。

1.6 两步法 cPCR

特异引物 PCR 体系 (20 μL) 包括 10 × PCR buffer (30 mmol/L Mg²⁺) 2 μL, dNTP mix (2.5 mmol/L) 3 μL, 上下游引物 0.05 μm/L, BSA (10 mg/mL) 0.28 μL, 竞争性质粒模板, DNA 模板 10 ng/μL, Taq DNA Polymerase 0.5 unit。反应条件: 95°C 2 min; 94°C 30 s, 57°C 90 s, 65°C 60 s, 28 个循环; 68°C 2 min (图 1B-Step1)。

通用荧光引物 PCR 体系 (5 μL) 包括 10 × PCR buffer (30 mmol/L Mg²⁺) 0.5 μL, dNTP mix (2.5 mmol/L) 0.75 μL, 上下游引物 0.05 μm/L, BSA (10 mg/mL) 0.07 μL, Taq DNA polymerase 0.5 unit。反应条件: 94°C 30 s, 57°C 90 s, 65°C 60 s, 5 个循环; 68°C 20 min (图 1B-Step2)。

1.7 毛细管电泳

PCR 产物 1 μL, 加入 8.6 μL 的 Hi-Di 和 0.4 μL 的 DNA 分子标准, 振荡混匀变性。通过 ABI 测序仪 3730 (Applied Biosystems) 分析样本。用 GeneScan Analysis[®] 3.0 和 GeneMapper[®] ID software v3.2 软件分析数据 (图 1C)。

1.8 CNV 位点拷贝数

每个 CNV 位点的 R 值 (样本峰/质粒峰), 通过

内对照(7 号和 19 号染色体上的检测位点)和质控样本(B6)纠正,最终反映每个 CNV 位点的拷贝数变异。例图 1C, C 位点为内对照, M 为检测位点, 相对拷贝数 $[RR = (S^C/N^C) / (S^M/N^M)]$, 所有值均为 3730 电泳峰高。质控样本 $RR = 1.0$, 检测样本 $RR = 1.5$ 。

2 结果

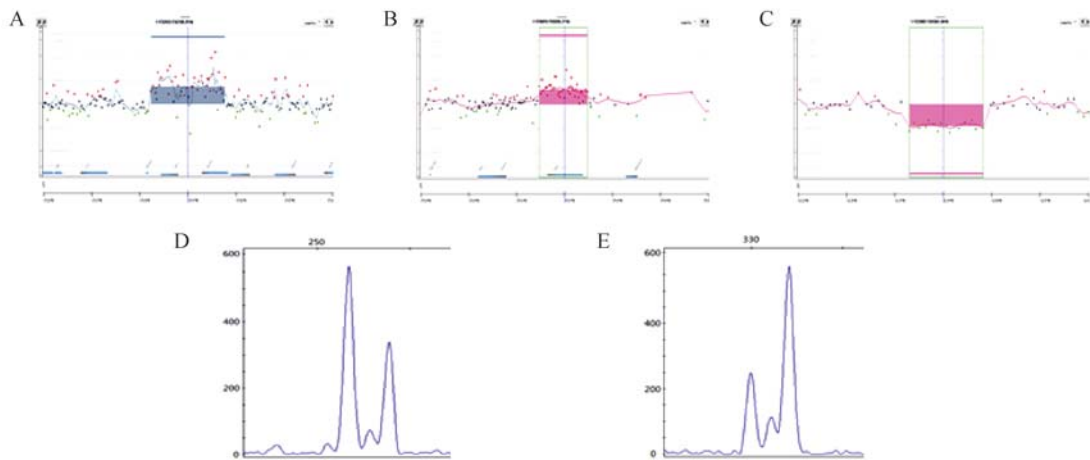
2.1 CNV 位点验证

aCGH 检测结果表明, 11 个 CNV 位点全部存在于染色体工程小鼠中。例如, 1qE2.1-1qE2. 位点,

在大新和三门峡 F1 代中为重复(图 2A 和 B), 1qH2.3-1qH4 位点在大新样本是缺失(图 2C)。cPCR 结果显示, 重复为样本峰高于质粒峰(图 2D), 缺失为样本峰低于质粒峰(图 2E)。

2.2 多重 cPCR 检测方案

11 个 CNV 位点的通用荧光引物多重 cPCR 检测方案结果表明, 相对质控样本 B6 小鼠 DNA 在目标区段位置 cPCR 产物样本峰和质粒峰高度比值, 能检测样本拷贝数变异。例如图 3 中 1qE2.1-1qE2.3 和 1qH2.3-1qH4 位点(N1 和 N2)RR 为 1, 在大新 F1 样本中 RR 分别为 0.5 和 1.5(图 2)。

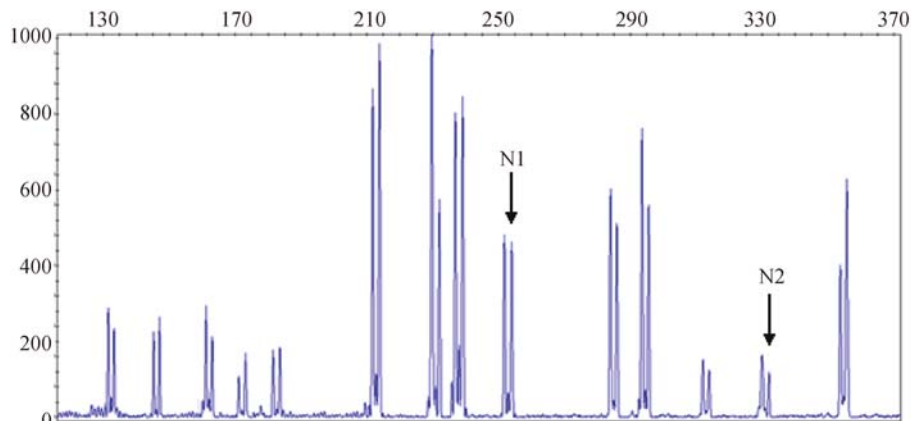


注:A 和 B. 三门峡和大新 F1 样本 1qH2.3-1qH4(重复)位点 aCGH 检测结果;C. 大新 F1 样本在 1qE2.1-1qE2.3(缺失)位点 aCGH 检测结果;D. 重复 3730 电泳图;E. 大新 1qE2.1-1qE2.3 缺失 3730 电泳图。

图 2 aCGH 和 cPCR 结果

Note. A and B are the aCGH results of F1 mouse from Daxin and Sanmenxia strains at 1qH2.3-1qH4 (gain). C is the aCGH results of F1 mouse from Daxin at 1qE2.1-1qE2.3 (deletion). D is the 3730 electrophoretogram of gain; E is the electrophoretogram of F1 mice deletion from Daxin strain.

Fig. 2 The results of aCGH and cPCR assays



注:14 个位点 cPCR 产物的 3730 电泳图。

图 3 通用 cPCR 方案的分离胶电泳

Note. Every adjacent two peaks represent one CNV point (the prepeak is the sample peak, and the post-peak is the plasmid peak). Electrophoretogram of 14 cPCR products.

Fig. 3 Electrophoretogram of POP-6 products of the versatile cPCR

2.3 N7 代样本检测

13 个品系的 N7 代样本检测结果显示,有 5 个 CNV 位点在 60% 以上野生小鼠中具有拷贝数差异,4 个 CNV 位点具有拷贝数变异的比例小于 46%,1 个 CNV 位点和 2 个内对照位点无拷贝数变异。在 44 个样本的 cPCR 检测结果中,Chr. X:103039160 - 103039780 位点拷贝数差异能准确反映样本性别。

3 讨论

模式动物小鼠是研究遗传致病因素 CNV 的重要资源。且在近交系小鼠中,已发现与精神病^[21,22]、焦虑^[23]等多种复杂疾病相关的 CNVs,促进了小鼠基因组的 CNV 变异情况的研究。目前 CNV 检测方法包括芯片技术、测序技术和 PCR 技术^[24-26]。CGH 和 SNP 芯片技术具有快速、高通量和自动化的优点,但 CGH 技术难以检测平衡相互异位及倒位,aCGH 技术的敏感性和操作性亟待提高,SNP 芯片技术不适用于重复序列和复杂 CNV 区域。基于测序技术的 CNV 检测方法,其速度快、分辨率高、重复性高等优点,但费用高昂。以 PCR 为基础的 CNV 检测方法中:实时荧光定量 PCR 技术,通量低,稳定性和准确性不高;多重连接探针扩增技术(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA),灵敏度和特异性较高,重复性强,检测不到平衡异位和倒位突变。针对染色体工程小鼠一号染色体上少量 CNV 位点的检测,需要一简便、准确的技术方法。

本研究结果揭示,利用根据低 TM 值,二级结构的自由能数值 ΔG (单位 kcal/mol) > -4 等原则获得的通用荧光引物,成功构建的基于荧光通用引物多重 cPCR 方案,适用于染色体工程小鼠一号染色体 11 个 CNVs 的拷贝数检测工作。染色体工程小鼠在 2 个位点 Chr. 19:27915739 - 27916361 和 Chr. 7:99758205 - 99758827 无拷贝数变异,是合适的内对照位点。

相比于近交系 C57BL/6J 小鼠,N7 代染色体工程小鼠的一号染色体在 10 个 CNV 位点具有拷贝数变异,如 CNV 位点 Chr 1:141896999 - 141897619 在 13 个品系中具有较大拷贝数差异(1 - 4 个重复),CNV 位点 Chr 1:175354538 - 175355160 在群体中无拷贝数变异。单一亲本起源,导致染色体工程小鼠群体中 CNV 位点的突变类型一致。而因亲本来

源不同,致使 Chr. 1:173496351 - 173496972 和 Chr. 1:168146833 - 168147454 位点分别在枣庄 1 品系 N7 代群体内和三门峡的 F1 代与 N7 代样本间存在拷贝数差异。三门峡 F1 代和 N7 代个体间其余 10 个 CNV 位点拷贝数一致无突变发生,说明一般性传代并不会改变 CNV 拷贝数。

总之,利用竞争性质粒模板结合通用荧光引物的多重 cPCR 方法是一种廉价、准确的 CNV 检测方案。能准确检测小鼠一号染色体上 11 个 CNV 位点的拷贝数变异,适用于少量小鼠样本的快速、高效的 CNV 检测工作。

参 考 文 献

- [1] Mott R, Flint J. Prospects for complex trait analysis in the mouse [J]. *Mamm Genome*, 2008, 19(5): 306 - 308.
- [2] Flint J, Valdar W, Shifman S, et al. Strategies for mapping and cloning quantitative trait genes in rodents [J]. *Nat Rev Genet*, 2005, 6(4): 271 - 286.
- [3] Churchill GA, Airey DC, Allayee H, et al. The collaborative cross, a community resource for the genetic analysis of complex traits [J]. *Nat Genet*, 2004, 36(11): 1133 - 1137.
- [4] Laurie CC, Nicker son DA, Nachman MW, et al. Linkage disequilibrium in wild mice [J]. *PLoS Genet*, 2007, 3(8): e144.
- [5] Xiao J, Liang Y, Li K, et al. A novel strategy for genetic dissection of complex traits: the population of specific chromosome substitution strains from laboratory and wild mice [J]. *Mamm Genome*, 2010, 21(7-8): 370 - 376.
- [6] Redon R, Ishikawa S, Fith KR, et al. Global variation in copy number in the human genome [J]. *Nature*, 2006, 444: 444 - 454.
- [7] Egan C, Sridhar S, Wigler M, et al. Recurrent DNA copy number variation in the laboratory mouse [J]. *Nat Genet*, 2007, 39: 1384 - 1389.
- [8] Jakobsson C, Ozaki H, Nakajima T, et al. Genotype, haplotype and copy number variation in worldwide human populations [J]. *Nature*, 2008, 451: 998 - 1003.
- [9] She X, Cheng Z, Zollner S, et al. Mouse segment duplication and copy number variation [J]. *Nat Genet*, 2008, 40: 909 - 941.
- [10] Watkins-Chow DE, Pavan WJ. Genomic copy number and expression variation within the C57BL/6J inbred mouse strains [J]. *Genome Res*, 2008, 18: 60.
- [11] Freeman JL, Perry GH, Feuk L, et al. Copy number variation: new insights in genome diversity [J]. *Genome Res*, 2006, 16: 949 - 961.
- [12] Gonzalez E, Kulkarni H, Bolivar H, et al. The influence of CCL3L1 gene-containing segment duplications on HIV-1/AIDS susceptibility [J]. *Science*, 2005, 307: 1434 - 1440.
- [13] Aitman TJ, Dong R, Vyse TJ, et al. Copy number polymorphism in Fcgr3 predisposes to glomerulonephritis in rats and humans

- [J]. *Nature*, 2006, 439(7078): 851–855.
- [14] Culter G, Kassner PD. Copy number variation in the mouse genome; implications for the mouse as a model organism for human disease [J]. *Cytogenet Genome Res*, 2008, 123: 297–306.
- [15] Kim HK, Hwang HL, Park SY, et al. Simple and versatile molecular method of copy-number measurement using cloned competitors [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(7): e69414.
- [16] Hollox EJ, Detering JC, Dehngara T, et al. An integrated approach for measuring copy number variation at the FCGR3 (CD16) locus [J]. *Hum Mutat*, 2009, 30: 477–483.
- [17] Sestini R, Orlando C, Zentilin L, et al. Measuring c-erbB-2 oncogene amplification in fresh and paraffin-embedded tumors by competitive polymerase chain reaction [J]. *Clin Chem*, 1994, 40: 630–636.
- [18] Okuyama N, Hatano Y, Park Y, et al. Quantitation of c-erbB-2 gene amplification in breast cancer tissue by competitive PCR [J]. *Tumour Biol*, 1999, 20: 153–161.
- [19] Ding C, Cantor CR. A high-throughput gene expression analysis technique using competitive PCR and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight MS [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100: 3059–3064.
- [20] Stofanko M, Han JC, Elsea SH, et al. Rapid and inexpensive screening of genomic copy number variations using a novel quantitative fluorescent PCR method [J]. *Dis Markers*, 2013, 35(6): 589–596.
- [21] Avrabos C, Sotnikov SV, Dine J, et al. Real-time imaging of amygdalar network dynamics in vitro reveals a neurophysiological link to behavior in a mouse model of extremes in trait anxiety [J]. *J Neurosci*, 2013, 33(41): 16262–16267.
- [22] Brenndörfer J, Altmann A, Widner-Andrä R, et al. Connecting anxiety and genomic copy number variation: a genome-wide analysis in CD-1 mice [J]. *Plos ONE*, 2015, 10(5): e0128465.
- [23] Gonik M, Frank E, KeBler MS, et al. The endocrine stress response is linked to one specific locus on chromosome 3 in a mouse model based on extremes in trait anxiety [J]. *BMC genomics*. 2012, 13: 579.
- [24] Takahashi N, Tsuyama N, Sasaki K, et al. Segmental copy-number variation observed in Japanese by array-CGH [J]. *Ann Human Genet*, 2008, 72: 193–204.
- [25] Kamath BM, Thiel BD, Gai X, et al. SNP array mapping of chromosome 20p deletions: genotypes, phenotypes, and copy number variation [J]. *Human Mutat*, 2008, 30: 371–378.
- [26] Goossens D, Moens LN, Nelis E, et al. Simultaneous mutation and copy number variation (CNV) detection by multiplex PCR-based GS-FLX sequencing [J]. *Human Mutat*, 2009, 30: 472–476.

[收稿日期] 2015–06–19

(上接第 590 页)

- [3] 高秀莹, 周迎生. 2 型糖尿病鼠类模型的研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22(4): 71–76.
- [4] Madeddu P, Emanuelli C, Spillmann F, et al. Murine models of myocardial and limb ischemia; diagnostic end-points and relevance to clinical problems [J]. *Vascul Pharmacol*, 2006, 45(5): 281–301.
- [5] Couffignal T, Silver M, Zheng LP, et al. Mouse model of angiogenesis [J]. *Am J Pathol*, 1998, 152(6): 1667–1679.
- [6] 王增涛, 郝丽文, 李桂石, 等, 主编. *WISTAR 大鼠解剖图谱* [M]. 山东: 山东科学技术出版社, 2009.
- [7] 杨盛家, 陈兵, 罗涛, 等. 大鼠后肢急性缺血模型的构建及评估 [J]. *中国普通外科杂志*, 2009, 18(6): 580–583.
- [8] Pu L Q, Jackson S, Lachapelle KJ, et al. A persistent hindlimb ischemia model in the rabbit [J]. *J Invest Surg*, 1994, 7(1): 49–60.
- [9] Biscetti F, Straface G, De Cristofaro R, et al. High-mobility group box-1 protein promotes angiogenesis after peripheral ischemia in diabetic mice through a VEGF-dependent mechanism [J]. *Diabetes*, 2010, 59(6): 1496–1505.
- [0] Lau TW, Sahota DS, Lau CH, et al. An in vivo investigation on the wound-healing effect of two medicinal herbs using an animal model with foot ulcer [J]. *Eur Surg Res*, 2008, 41(1): 15–23.
- [1] Kawai K, Suzuki S, Tabata Y, et al. Accelerated wound healing through the incorporation of basic fibroblast growth factor-impregnated gelatin microspheres into artificial dermis using a pressure-induced decubitus ulcer model in genetically diabetic mice [J]. *Br J Plast Surg*, 2005, 58(8): 1115–1123.
- [2] Masaki I, Yonemitsu Y, Yamashita A, et al. Angiogenic gene therapy for experimental critical limb ischemia; acceleration of limb loss by overexpression of vascular endothelial growth factor 165 but not of fibroblast growth factor-2 [J]. *Circ Res*, 2002, 90(9): 966–973.

[收稿日期] 2015–07–12