

# 微卫星 DNA 监控大鼠近交系的培育

李瑞生<sup>1</sup>,董 罡<sup>1</sup>,吴晓燕<sup>1</sup>,王 鹏<sup>1</sup>,王晓辉<sup>2</sup>,陈振文<sup>2</sup>

(1. 军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071; 2. 首都医科大学实验动物科学部, 北京 100054)

**摘要:**采用微卫星 DNA 技术来监控大鼠仔代基因状况,选择性地进行交流繁殖,使基因快速纯合,缩短培育新的近交系动物周期。利用 PCR 扩增 30 个微卫星 DNA 位点对封闭群 SD 和 Wistar 大鼠交配繁殖的仔代鼠进行微卫星 DNA 多态性分析,仔代中与母代 SD 大鼠相似系数高的与中的进行定向交配繁殖。 $F_2$  代大鼠均为杂合多态的位点,没有纯合位点;到  $F_9$  代时基因纯合位点达 27 个,纯合基因位点率为 90%。每代相似系数具有不断上升的趋势,上升率为 6%~20%。采用皮肤移植方法验证了  $F_9$  代大鼠间无排斥反应。从而建立了一种新的快速培育近交系动物的方法。

**关键词:**微卫星 DNA;大鼠,封闭群;近交系培育

中图分类号:Q953

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2006)07-0821-04

## Microsatellite DNA Monitoring in Inbred Cultivation of Outbred Rats

LI Rui-Sheng<sup>1</sup>, DONG Gang<sup>1</sup>, WU Xiao-Yan<sup>1</sup>, WANG Peng<sup>1</sup>,

WANG Xiao-Hui<sup>2</sup>, CHEN Zhen-Wen<sup>2</sup>

(1. Laboratory Animal Center, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China;

2. Department of Laboratory Animal Science, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100054, China)

**Abstract:** Microsatellite DNA was used to monitor the gene inheritance of successive generations of rats. It is useful in selective breeding to quickly bring genes to homozygosity and to shorten the cultivation periods of new inbreeding of rats. Thirty microsatellite DNA loci were PCR amplified to analyze the DNA polymorphism in generational crosses between the outbred Wistar and SD rats. Rats in F generations with a moderate to high coefficient of similarity with the female  $F_0$  SD rats were crossed. All loci in the  $F_2$  generation were heterozygous and polymorphic. By  $F_9$ , 27 loci have become homozygous, with a homozygosity rate of 90%. The coefficient of similarity tended to increase at a rate of 6%~20% with each successive generation. Skin grafting confirmed no rejection among the  $F_9$  generation of rats. Therefore we have established a novel method for rapid cultivation of inbred rats.

**Key words:** microsatellite DNA; rats, outbred; inbred cultivation

传统近交系动物的培育方法是采用全同胞兄妹连续交配 20 代以上,这种方法费时费力,常常由于繁殖不当或出现近交衰退而使近交培育中断<sup>[1]</sup>。本实验选择微卫星 DNA (Microsatellite DNA) 标记技术对封闭群 SD 大鼠和 Wistar 大鼠交配所繁殖的每代动物进行遗传监测,通过基因的纯合状况,计算仔代

鼠与父母代的相似系数,有目的地选择纯合位点多、单态性好的动物进行下一代的定向繁殖,从而快速地提高群体动物的基因纯度,建立一种快速培育近交系动物的新方法,为进一步研究动物间的血缘关系和遗传距离提供可靠的依据。

收稿日期:2005-06-20;修回日期:2005-11-02

基金项目:北京市自然科学基金课题资助(编号:5012012)[Supported by Beijing Natural Science Foundation of China(No. 5012012)]

作者简介:李瑞生(1969—)男,副研究员,研究方向:动物分子遗传。E-mail:lrsheng@sohu.com

通讯作者:陈振文(1959—)男,研究员,研究方向:实验动物科研与教学。E-mail:czwen@sohu.com

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

选取军事医学科学院实验动物中心 6~8 周龄的封闭群 SD 和 Wistar 大鼠各 2 只, 体重为 180~230 g, 雌雄各 1 只, 均为 SPF 级, 实验动物质量合格证为军-2002-01。每代大鼠剪尾冻存备用。

### 1.2 药品与生化试剂

Taq DNA 聚合酶、三羟甲基胺基甲烷、硝酸银、无水碳酸钠、冰醋酸、过硫酸铵、溴酚蓝、过硫酸氢。

### 1.3 引物合成

选取大鼠不同染色体上的 30 个位点, 位点名称分别为: ACPH、ACRM、AFP、AGT、APOC3、CAT、CKB、CPB、CRYG、CSNA、ENO2、GH、GJA1、GLUTB、HP、KAL、MBPA、MYC、PERF、PKC、PKL、PLANH、PRPS2、SCN2A、SMST、SVS2P、THY1、TNF、TTR 和 UCP。30 对引物序列均来自文献[2], 由上海博雅生物技术有限公司合成。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 基因组 DNA 的提取

取动物尾巴约 1 cm, 剪碎后放入 1.5 mL EP 管中, 加入 400  $\mu$ L DNA 提取缓冲液和 30  $\mu$ L 蛋白酶 K, 充分混匀后, 置 37°C 水浴过夜, 待消化溶解后用 Tris 饱和酚/三氯甲烷提取基因组 DNA<sup>[3]</sup>。

#### 1.4.2 PCR 扩增与电泳

PCR 扩增反应体系为 25  $\mu$ L, 35 个循环, 加入载样液 10  $\mu$ L, 扩增样品电泳用 8% 非变性凝胶。采用 200 V 电压电泳 0.5~1 h, 电泳完毕后取下凝胶进行银染染色。

#### 1.4.3 银染染色

凝胶于固定液中固定 20 min, 用去离子水洗涤 2 次, 每次 2 min; 然后凝胶于银染溶液中染色 30

min, 用去离子水冲洗 2 次, 每次 10 s 左右。最后凝胶于显色液中显色, 待条带清晰后, 加终止液, 用扫描仪分析储存图片。

#### 1.4.4 结果判读与统计

根据聚丙烯酰胺凝胶上 DNA 泳动距离进行结果判读, 依据泳动距离长短带设定英文字母 A、B、C、D..., 如果是双带则设定为 AB、CD、EF...。样品 DNA 泳动距离一致的, 即表现为单态性, 若有差异即为多态性<sup>[4]</sup>。计算每代仔鼠基因位点相同图带的数目, 按 Lynch 氏法  $F = 2N_{ab} / (N_a + N_b)$  计算其相似系数, 其中,  $N_{ab}$  为两个个体相同谱带数,  $N_a$ 、 $N_b$  为二者分别扩增结果, 若无扩增结果记为“-”。

#### 1.4.5 微卫星 DNA 监控下的近交系繁殖

每代仔鼠选取 13 只(7 只雌性和 6 只雄性), 剪取 1.5 cm 尾提取基因 DNA, 从 GenBank 中选取 30 个微卫星 DNA 位点与  $F_0$  代 SD 大鼠进行 DNA 多态性分析, 将仔代雌雄与  $F_0$  代 SD 大鼠的相似系数分别计算出高、中、低 3 种, 有目的地选择纯合位点多、单态性好的动物, 依次来进行高对中定向交配繁殖。对所繁殖的下一代进行有选择地监测交配繁殖, 待繁殖第 9 代后, 采用皮肤移植方法验证是否符合近交系动物要求。

## 2 结果

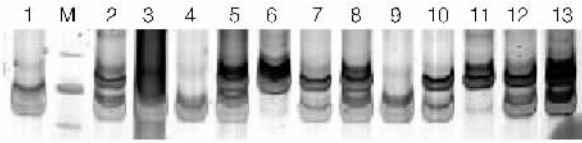
### 2.1 每代大鼠微卫星 DNA 相似系数的分析

利用 30 个微卫星 DNA 位点对每代仔鼠进行 DNA 多态性分析, 计算每代仔鼠与  $F_0$  代 SD 母鼠的相似系数, 其分布情况(表 1)。随着近交代数的不断上升, 其基因位点也不断纯合。其中 UCP 位点在  $F_2$  代时处于杂合多态(图 1),  $F_4$  代时为杂合单态(图 2), 到  $F_7$  代时成为单态纯合位点(图 3)。

表 1 每代大鼠相似系数的比较

Table 1 Comparison of coefficients of similarity in every generation of rats

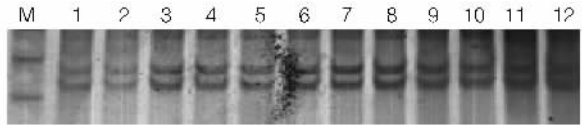
代数	雌 1	雌 2	雌 3	雌 4	雌 5	雌 6	雌 7	雄 1	雄 2	雄 3	雄 4	雄 5	雄 6
Generation	Female1	Female2	Female3	Female4	Female5	Female6	Female7	Male1	Male2	Male3	Male4	Male5	Male6
$F_2$	0.533	0.467	0.433	0.400	0.433	0.467	0.567	0.500	0.533	0.467	0.500	0.400	0.400
$F_3$	0.467	0.500	0.433	0.533	0.500	0.633	0.400	0.533	0.600	0.433	0.433	0.400	0.633
$F_4$	0.533	0.467	0.467	0.667	0.433	0.700	0.533	0.500	0.567	0.567	0.667	0.700	0.833
$F_5$	0.767	0.700	0.833	0.700	0.867	0.867	0.633	0.667	0.867	0.833	0.833	0.800	0.733
$F_6$	0.800	0.833	0.800	0.733	0.833	0.833	0.867	0.700	0.733	0.800	0.867	0.833	0.867
$F_7$	0.767	0.800	0.800	0.767	0.833	0.833	0.833	0.833	0.767	0.767	0.833	0.800	0.833
$F_8$	0.800	0.833	0.800	0.800	0.800	0.833	0.767	0.767	0.800	0.800	0.833	0.833	0.833
$F_9$	0.833	0.867	0.833	0.867	0.867	0.867	0.800	0.800	0.833	0.833	0.800	0.833	0.800

图 1 F<sub>2</sub> 代 UCP 多态杂合位点图

M:Marker; 1~7: 雌性大鼠; 8~13: 雄性大鼠。

Fig.1 Polymorphism and heterozygosity at the UCP locus in F<sub>2</sub> generation

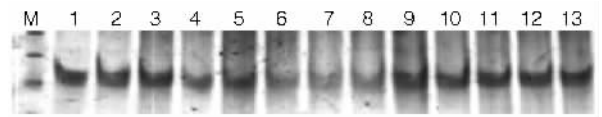
M:Marker; 1~7:Female rats; 8~13: Male rats.

图 2 F<sub>4</sub> 代 UCP 单态杂合位点图

M:Marker; 1~7: 雌性大鼠为 AB; 8~12: 雄性大鼠为 AB。

Fig.2 Monomorphic hybrid UCP locus in F<sub>4</sub> generation

M:Marker; AB genotype for female rats 1~7 and male rats 8~12.

图 3 F<sub>7</sub> 代 UCP 单态纯合位点图

M:Marker; 1~7: 雌性大鼠为 A; 8~13: 雄性大鼠为 A。

Fig.3 Monomorphic homozygotic UCP locus in F<sub>7</sub> generation

M:Marker. Genotype A for female rats 1~7 and male rats 8~13.

## 2.2 微卫星 DNA 位点在不同代中的多态性

利用 30 个微卫星位点对封闭群 SD 和 Wistar 大鼠交配繁殖的各代动物的微卫星 DNA 位点进行了统计分析(表 2),结果 F<sub>2</sub> 代仔鼠所有位点全部是杂合多态性位点,到 F<sub>9</sub> 代时纯合位点上升达到 27 个,基因纯合率为 90%,相似系数达到了 0.933。个体间进行皮肤移植证明 F<sub>9</sub> 代大鼠并不产生排斥。

表 2 不同代大鼠纯合基因位点的状况

Table 2 Status of locus homozygosity in different generations of rats

位点 Site	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>	F <sub>6</sub>	F <sub>7</sub>	F <sub>8</sub>	F <sub>9</sub>
多态位点 Polymorphic site	16	14	10	7	5	4	3	2
单态位点 Monomorphic site	14	16	20	23	25	26	27	28
相似系数 Coefficient of similarity	0.467	0.500	0.667	0.767	0.833	0.933	0.900	0.933
杂合位点 Heterozygotic site	30	27	25	19	14	8	6	3
纯合位点 Homozygotic site	0	3	5	11	16	22	24	27
纯合基因率 Rate of homozygosity	0%	10%	16.7%	36.6%	53.3%	73.3%	86.7%	90.0%

## 2.3 不同代近交培育大鼠的基因纯合度

利用 30 个微卫星位点对所繁殖培育的不同代仔鼠纯合基因位点进行分析,在 F<sub>2</sub> 代时其纯合基因位点为 0 个, F<sub>3</sub> 代为 3 个、其基因纯合率 10%, F<sub>4</sub> 代为 5 个、其基因纯合率 16.7%, F<sub>5</sub> 代为 11、其基因纯合率 36.6%, F<sub>6</sub> 代为 16 个、其基因纯合率 53.3%, F<sub>7</sub> 代为 22 个、其基因纯合率 73.3%, F<sub>8</sub> 代为 24 个、其基因纯合率 86.7%, 到 F<sub>9</sub> 代时达到了 27 个,其基因纯合率达到了 90%(表 2 和图 4)。

## 3 讨论

传统的近交系培育方法是采用全同胞兄妹连续交配 20 代,每一代动物按  $F_n = 1 - (1 - \Delta F)^n$  来计算其近交系数,理论上到 F<sub>20</sub> 代时其近交系数为

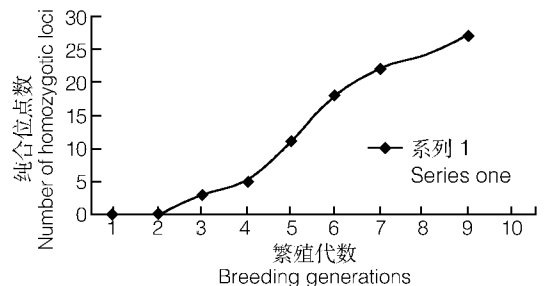


图 4 不同繁殖代数纯合基因位点分布图

Fig.4 Distribution of homozygotic sites in different generations

98.96%。随着每代动物近交系数的不断上升,它的血缘系数也在不断地上升。但是近交系动物在本质上应该是等位基因纯合,基因位点表现为一致性的

动物。如果使用某些培育方法能使基因纯合一致,就可以培育成近交系<sup>[5]</sup>。微卫星 DNA 技术具有高度的灵敏性、特异性和多态性,该技术方法简便快捷,已广泛应用于近交系大小鼠遗传监测、法医鉴定和人类的亲子鉴定当中,可有效地运用于种群个体间的基因型和遗传距离的分析<sup>[6]</sup>。本实验选取 30 个多态性微卫星位点,采用微卫星 DNA 技术对封闭群 SD 大鼠和 Wistar 大鼠交配产生的每代仔鼠进行 DNA 多态性分析,选择与母代 SD 大鼠相似系数高的对中的进行有选择性地定向交配繁殖,这样不仅可以清晰地了解每代大鼠的基因纯合度,而且还可以有意地培育携带父母代基因的仔鼠。在培育初期杂合多态位点较高,但随着近交代数的不断增加,其基因纯合度和相似系数呈上升趋势,到 F<sub>9</sub> 代时纯合基因位点达 27 个,基因纯合率为 90%,相似系数为 0.933,其上升率在 6%~20% 之间。说明采用监控培育可大大地提高仔代大鼠的近交系数和基因纯合度,这对于分析推断动物个体间血缘关系和遗传距离具有十分重要的意义。

封闭群动物是一个杂合体动物,它们的基因型具有一定的杂合性,所以每个基因位点扩增出来的图带均为双带,这完全符合封闭群动物的基本原理<sup>[7]</sup>。但随着近交代数的上升,杂合多态位点不断被淘汰,选择单态纯合位点进行定向交配繁殖,大大地提高了基因纯合度和相似系数<sup>[8]</sup>。采用微卫星 DNA 监控技术来培育近交系大鼠,改变了传统需要培育 20 代的方法,节省了大量的人力物力和财力,缩短了近交培育的周期。对 F<sub>9</sub> 代大鼠进行了皮肤移植实验证实没有发现排斥反应,说明该群体已基本达到了近交程度,但是否真正成为近交系动物还需要进一步采用其他方法来验证<sup>[9]</sup>。

## 参 考 文 献 (References):

- [1] CHEN Zhen-Wen, OUYANG Zhao-He, DONG Gang, LI Rui-Sheng. Analyzing genetic quality of BALB/c mouse strains in China by microsatellite marking. *Hereditas* (Beijing), 2004, 26(6): 845~848.  
陈振文, 欧阳兆和, 董 罡, 李瑞生. 用微卫星标记技术对国内 BALB/c 小鼠遗传质量的分析. *遗传*, 2004, 26(6): 845~
- [2] Serikawa T, Kuramoto T, Hilbert P, Mori M, Yamada J, Dubay C J, Lindpainter K, Ganten D, Guenet J L, Lathrop G M, Beckmann J S. Rat gene mapping using PCR-analyzed microsatellites. *Genetics*, 1992, 131(3): 701~721.
- [3] CHEN Zhen-Wen, LI Rui-Sheng, WANG Cheng-Li, ZHAO Lin-Shan, SONG De-Guang, WANG Da-Peng. Analysing genetic distance of national Wistar rat with DNA fingerprinting. *Hereditas* (Beijing), 2002, 24(3): 275~278.  
陈振文, 李瑞生, 王承利, 赵林山, 宋德光, 王大鹏. 用 DNA 指纹图技术分析 Wistar 大鼠的遗传距离. *遗传*, 2002, 24(3): 275~278.
- [4] Kunieda T, Kobayashi E, Tachibana M, Ikadai H, Imamichi T. Polymorphic microsatellite loci of the rat (*Rattus norvegicus*). *Mamm Genome*, 1992; 3(10): 564~567.
- [5] LI Rui-Sheng, CHEN Zhen-Wen, ZHANG Jia-Bao, SUN Yan-Song. Analysis of polymorphism for inbred rat using STR-PCR. *Progress in Veterinary Medicine*, 2004, 25(3): 107~109.  
李瑞生, 陈振文, 张嘉保, 孙岩松. 近交系大鼠 STR 复合扩增 DNA 多态性的分析. *动物医学进展*, 2004, 25(3): 107~109.
- [6] OUYANG Zhao-He, CHEN Zhen-Wen, LI Rui-Sheng, ZHAN Da-Wei, WANG Cheng-Li. Analysis of microsatellite DNA polymorphisms and genetic monitoring of ten inbred mouse strains. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2004, 14(2): 71~74.  
欧阳兆和, 陈振文, 李瑞生, 战大伟, 王承利. 微卫星 DNA 多态性在十种近交系小鼠遗传监测中的应用研究. *中国比较医学杂志*, 2004, 14(2): 71~74.
- [7] Walder R Y, Garrett M R, McClain A M, Beck G E, Brennan T M, Kramer N A, Kanis A B, Mark A L, Rapp J P, Sheffield V C. Shot tandem repeat polymorphic markers for the rat genome from marker-selected libraries. *Mammalian Genome*, 1998, 9: 1013~1021.
- [8] LI Rui-Sheng, CHEN Zhen-Wen, SONG De-Guang, REN Wen-Zhi, LUAN Rong-Hui. Rat gene polymorphism using PCR-Analyzed microsatellites. *Hereditas* (Beijing), 2001, 23(6): 539~543.  
李瑞生, 陈振文, 宋德光, 任文陟, 栾蓉晖. PCR 扩增近交系大鼠微卫星位点 DNA 多态性的研究. *遗传*, 2001, 23(6): 539~543.
- [9] Benavides F, Glasscock E, Coghlan L G, Stern M C, Weiss D A, Conti C J. PCR-based microsatellite analysis for differentiation and genetic monitoring of nine inbred SENCAR mouse strains. *Laboratory Animals*, 2001, 35: 157~162.