

稀有鮡鲫近交系微卫星多态性分析

邵燕^{1,2,3} 王剑伟¹ 何勇凤^{1,2} 曹文宣¹ 童金苟¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039; 3. 滨州学院, 滨州 256603)

摘要:利用 17 对微卫星引物对稀有鮡鲫 (*Gobiocypris rarus*) 野生群体和近交系 F20 和 F22 进行了遗传分析。结果表明在野生群体中 17 个微卫星位点均为多态位点, 但在 F20 中仅有 6 个多态位点, F22 中则仅有 4 个多态位点。在野生群体中共检测到 64 个等位基因, F20、F22 分别为 26、21 个。近交系的平均基因纯合率均较高, 其中 F20 为 86.18%, F22 达 91.96%, 而野生群体平均基因纯合率为 46.84%。近交系平均杂合度和平均多态信息含量均较野生群体低。在近交系 F20 和 F22 中, 群体间遗传相似性指数最大, 其遗传距离最小, 说明二者之间的亲缘关系最近。HAN 系遗传多样性明显降低, 已具有较高的遗传纯度。

关键词:稀有鮡鲫; 微卫星标记; 近交系; 遗传质量检测

中图分类号: Q346+.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2009)04-0649-07

随着科研水平的提高, 科学实验对实验动物的等级和质量要求更加严格, 提供合格的高等级、高质量实验动物已成为科研活动中极其重要的一项工作。实验动物近交系因具有遗传上的基因纯合性、表型一致性等特点, 能够提高许多实验的重复性和稳定性, 因此广泛地应用于各领域的研究中。近交系鉴定及遗传质量监测的方法包括形态学检测、细胞遗传标记检测、生化标记检测、免疫标记检测、分子遗传标记检测等, 各种方法都有其优点和局限。我国《实验动物 哺乳类实验动物的遗传质量控制》规定生化标记检测和皮肤移植法为必检项目^[1]。对于鱼类实验动物, 目前尚没有统一的方法及标准。

稀有鮡鲫 (*Gobiocypris rarus*) 是我国特有的小型鲤科鱼类, 它具有许多作为实验动物的优点, 有望成为我国乃至世界通用的一种鱼类实验动物^[2,3]。目前, 本实验室采用兄妹交配的方式培育的近交系已至 23 代。参照国家标准《实验动物 哺乳类实验动物的遗传质量控制》中近交系的命名法则, 作者将该近交系命名为 HAN 系。HAN 取名于“汉”的拼音, 包括三层含义: 一是该品系的原种采自稀有鮡鲫的模式产地四川省汉源县, 取汉源之“汉”音; 二是

该品系是中国科学院水生生物研究所在武汉培育的, 取武汉之“汉”音; 三是稀有鮡鲫是我国特有的物种, 是我国自主开发的鱼类实验动物, 取中文汉字之“汉”音。为了获取近交系的遗传背景资料库, 检测近交系的遗传纯度, 建立稀有鮡鲫品系鉴定的方法, 作者从鱼体外部形态、骨骼形态、免疫学标记、生化标记、分子遗传标记等层次对 HAN 系的遗传质量进行了检测^[4], 本文报道了利用微卫星技术进行分子遗传标记检测的研究结果。

1 材料与方法

1.1 材料 实验所用稀有鮡鲫共 80 尾。其中, 野生个体于 2006 年 1 月采于四川省汉源县, 30 尾; 近交 HAN 系为实验室培育近交至第 20 代个体 (F20) 20 尾, 第 22 代个体 (F22) 30 尾。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取和检测 背部肌肉组织中 DNA 的提取方法参照标准平衡酚-氯仿抽提程序进行^[5]。紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的质量和浓度, 置于 -20℃ 冰箱中保存备用。

1.2.2 微卫星 PCR 扩增及产物检测 选用 19 对

收稿日期: 2007-11-19; 修订日期: 2008-12-16

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (编号: KSCX-SW-125); 湖北省科技基础条件平台专项资助

作者简介: 邵燕 (1979—), 女, 山东省莱阳市人; 博士; 主要从事鱼类学研究。E-mail: shaoyan79@163.com

通讯作者: 王剑伟, 副研究员, 博士; E-mail: wangjw@ihb.ac.cn

引物进行 PCR 扩增,其中 4 对为本实验室设计的稀有鮎鲫特异性引物 (GR08-GR25), 15 对由廖小林等设计 (Gra01-Gra30)^[6]。引物序列及其 PCR 扩增条件 (表 1)。PCR 反应总体积为 10 μ L,其中 10 \times PCR buffer 1 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 0.8 μ L,上游引物 (5 pmol/ μ L) 1 μ L,下游引物 (5 pmol/ μ L) 1 μ L,

Taq 酶 (2 U/ μ L) 0.25 μ L, DNA 模板 (0.2 mg/ μ L) 0.1 μ L,灭菌双蒸水 4.95 μ L。PCR 反应程序: 94 预变性 5 min, 94 变性 30s,退火 40s, 72 延伸 40s, 35 个循环, 72 充分延伸 10min。反应产物经 10% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后 Gene Genius 凝胶成像系统扫描、拍照。

表 1 19 对微卫星引物的名称、序列及 PCR 反应条件

Tab. 1 Primer sequence and conditions of PCR of 19 microsatellite loci

位点 Locus	基因库登录号 Genbank Accession No.	重复序列 Repeat motif	引物序列 (5'-3') Primer sequence	退火温度 Annealing temperature ()
GR08	EFF555327	(TCAA) ₁₄ TCA (ATCC) ₆	F: AA TC TCCAA TCCCAA TACTGTCTG R: CACACTA GCAA TAA TGCAA GTAA GC	58
GR09	EFF555328	(GT) ₅	F: TTTTACCCTAGTGGICTTT R: TGA TA TGA TCAAACAGTGC TGC	58
GR22	EFF555331	(AC) ₁₁	F: AACCCA GTTTTGA GCAACCTG R: CTCTGTGACTTCCACCA TACGC	59
GR25	EFF555332	(GATA) ₂₈	F: TGAA TGCTGGGTC TCA TTTG R: CAGGAA GA TTGCAA GTAA GCA	58
Gra01	DQ490140	(CA) ₁₀ CG (CA) ₄	F: TGGATCTAA TGCTCCCCA TTT R: GCACA GCAA TGAAA GCA TGA	63
Gra02	DQ490141	(CA) ₁₇	F: GGTTC TGGGA GA TTC TTTGGA R: GCGGTTC TCTTCAAAA TGAGC	63
Gra03	DQ490142	(CA) ₉	F: CGCA GTAAA GGGGTGACACT R: CGAA TCA TGCCCTCAA TTTT	63
Gra04	DQ490143	(GT) ₁₄	F: TTGACCTCTCACCC TGCTTT R: CACGGCTCTTCTCTCTTGC	55
Gra06	DQ490145	(GT) ₁₀	F: A TTTTGC GGGGTTA TGACA G R: TGGTTTCCGACA GTGTICA	55
Gra08	DQ490146	(GT) ₁₂	F: GCCCTGACAA TTTGA TTGGT R: GCTGGGCTAACA TA TGTGCTG	52
Gra15	DQ490147	(CA) ₅ TA (AC) ₁₇	F: CGCCCTGTTGTGTTACCTTT R: TGGCCCA TCAA GCA TACA TA	50
Gra16	DQ490148	(AC) ₁₁	F: GGTTA GGACCA GTGGCAAAA R: TTAA TGCA GCTCCCC TA GA	50
Gra17	DQ490149	(TG) ₃ TT (TG) ₈	F: CTCA TGCTTCCA TTGTGA TAGG R: GGAA TCA GGGTCAAAA GCA G	54
Gra19	DQ490150	(TG) ₁₁	F: AAA GCCCA TCCA GTCA TCTG R: AGCTGTGCCA GCA GACA GT	55
Gra20	DQ490151	(CA) ₁₀	F: TTGTGA GA GGC T TCA TGTGC R: GAA GGGGTCA GCA GGA TACA	55
Gra21	DQ490152	(CA) ₁₀	F: TCCTTCGTAAA GCCTCTCTGA R: CCA GA GGCAA TAA TCA TTTGAA	55
Gra25	DQ490154	(TG) ₉	F: CTGGA GGGTCCGGACTTAT R: GCA GCA GAACTGAACCCACT	55
Gra27	DQ490156	(TG) ₈ TA (TG) ₈	F: GAAAA GCCAAAA TCCACGTC R: TGCAAAA TGGTGTGA GCGA GA	54
Gra30	DQ490157	(AC) ₁₁	F: TTA GCACACGCAAA GGAA TG R: CAATGCA TCTGTACAT CCTG	55

1.2.3 数据统计与分析 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“1”,依此类推。DNA 泳动距离一致的,即表现为单态性,若有差异即为多态性。参考分子量大小,统计每个个体在所研究基因位点上表现出的多态性条带数目,确定等位基因数目。

统计各群体的等位基因组成,利用 POP-GENE3.0 软件计算各微卫星位点在群体中的基因频率分布情况,计算基因纯合率、各群体的平均杂合度和平均多态信息含量^[7,8]和各群体间的遗传距离^[9]。根据遗传距离,运用 TFPGA 软件采用非加权组平均法(Unweighted Pair Group method using arithmetic Average, UPGMA)进行聚类分析。

2 结果

2.1 等位基因组成

本研究选用了 19 对引物对野生和近交稀有鮡鲫进行了遗传变异分析。其中,引物 Gra17、Gra21 的扩增效果较差,剩余的 17 对引物具有稳定的扩增效果,均能稳定重复地扩增出相应的 PCR 产物。部分扩增图谱(图 1)。

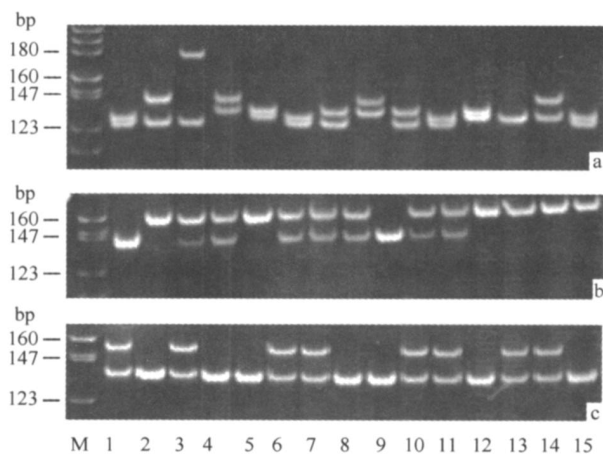


图 1 野生和近交稀有鮡鲫在 GR08 基因位点上的遗传差异

Fig. 1 Genetic diversity of locus GR08 in wild and inbred *Gobiocypris rarus*

a: 野生群体 Wild population; b: HAN 系 F20 the 20th generation of inbred strain HAN; c: HAN 系 F22 the 22nd generation of inbred strain HAN

稀有鮡鲫 17 个微卫星位点的等位基因数和基因频率(表 2)。17 对微卫星引物在野生群体中共

检测到 64 个等位基因,在 HAN 系 F20、F22 中检测到的等位基因数各为 26、21。在野生群体中每个位点的等位基因数从 2 个到 6 个不等,而在 HAN 系 F20、F22 中等位基因数为 1—2 个。其中,11 对引物在 HAN 系 F20 中检测到的等位基因数均为 1,而在 HAN 系 F22 中则发现有 13 对引物在其所有个体中只扩增出一条 DNA 带。GR09、Gra03、Gra08、Gra15、Gra19、Gra25、Gra27、Gra30 的扩增图谱在 HAN 系 F20、F22 之间无差异,呈现了高度的一致性,且所有的个体都只扩增出一条带,基因呈现纯合。

2.2 遗传变异分析

根据微卫星位点的基因分型结果,稀有鮡鲫不同群体的平均基因纯合率(表 3)。17 个微卫星位点的平均基因纯合率分别为野生群体 46.84%、HAN 系 F20 86.18%、HAN 系 F22 91.96%。HAN 系 F20、F22 的基因纯合率明显高于野生群体的,说明稀有鮡鲫经过长期的近交已达到了很高的近交程度,近交对基因的纯化具有明显的效果。遗传杂合度能够反映群体在各位点的遗传变异情况,是度量群体遗传变异的一个理想参数。从表 3 中可以看出,野生群体的平均杂合度为 0.5744,明显高于 HAN 系 F20、F22,说明其遗传多样性较丰富。在所研究的 17 个微卫星位点中,野生群体、HAN 系 F20、近交 F22 的平均多态信息含量分别为 0.5252、0.3838、0.3837。野生种群的平均多态信息含量最高,说明野生种群存在较大的变异度,具有丰富的遗传多态性。

2.3 遗传相似性指数和遗传距离分析

依据 17 个微卫星位点 PCR 扩增结果,计算出群体间的遗传相似性指数和遗传距离(表 4)。从表可见,群体间遗传相似性指数最大的为 HAN 系 F20 和 F22 的 0.8104,其遗传距离最小为 0.2102,说明二者的亲缘关系最近;野生群体和 HAN 系 F22 的遗传距离最大,遗传相似性指数最小,说明二者的遗传变异程度是群体中最大的,亲缘关系较远;而野生群体和 HAN 系 F20 的遗传距离和遗传相似性指数介于上述二者之间。

2.4 聚类分析

根据遗传距离,用 UPGMA 法对稀有鮡鲫进行了聚类分析(图 2)。3 个群体明显的分为近交和野生两种类型。

表 2 稀有鮎鲫 17 个微卫星位点的等位基因频率

Tab. 2 Allele frequencies of 17 microsatellite loci in *Gobiocypris rarus*

位点 Locus	等位 基因 Allele	群体 Populations			位点 Locus	等位 基因 Allele	群体 Populations		
		Wild	F20	F22			Wild	F20	F22
GR08	1	0.0333	0.0000	0.0000	Gra08	1	0.1167	0.0000	0.0000
	2	0.0000	0.6500	0.2500		2	0.1167	1.0000	1.0000
	3	0.2667	0.0000	0.0000		3	0.7667	0.0000	0.0000
	4	0.1667	0.3500	0.7500	Gra15	1	0.2500	0.0000	0.0000
	5	0.3000	0.0000	0.0000		2	0.0400	1.0000	1.0000
	6	0.2333	0.0000	0.0000		3	0.0335	0.0000	0.0000
GR09	1	0.0500	0.0000	0.0000	4	0.3167	0.0000	0.0000	
	2	0.3500	0.0000	0.0000	Gra16	1	0.0333	0.0000	0.0000
	3	0.1667	0.0000	0.0000		2	0.0333	0.5000	0.5667
4	0.4333	1.0000	1.0000	3		0.1000	0.0000	0.0000	
GR22	1	0.3667	0.4750	0.0000	4	0.7167	0.5000	0.4333	
	2	0.6333	0.5250	1.0000	5	0.1167	0.0000	0.0000	
GR25	1	0.6000	1.0000	0.0000	Gra19	1	0.2333	0.0000	0.0000
	2	0.4000	0.0000	1.0000		2	0.1000	0.0000	0.0000
Gra01	1	0.2337	0.0000	0.0000	3	0.0333	0.0000	0.0000	
	2	0.2337	0.0000	0.0000	4	0.6333	1.0000	1.0000	
	3	0.2337	0.0000	0.0000	Gra20	1	0.3167	0.0000	0.0000
	4	0.2667	1.0000	0.7667		2	0.5833	0.2000	0.0000
	5	0.0333	0.0000	0.2333		3	0.0667	0.0000	0.0000
Gra02	1	0.6333	0.2500	0.4833	4	0.0333	0.8000	1.0000	
	2	0.1667	0.7500	0.5167	Gra25	1	0.2333	0.0000	0.0000
	3	0.0167	0.0000	0.0000		2	0.3667	1.0000	1.0000
	4	0.1000	0.0000	0.0000		3	0.2167	0.0000	0.0000
	5	0.0833	0.0000	0.0000	4	0.1833	0.0000	0.0000	
Gra03	1	0.1833	0.0000	0.0000	Gra27	1	0.1000	0.0000	0.0000
	2	0.6833	1.0000	1.0000		2	0.5333	0.0000	0.0000
	3	0.1333	0.0000	0.0000		3	0.3333	1.0000	1.0000
Gra04	1	0.1833	1.0000	0.0000	4	0.0333	0.0000	0.0000	
	2	0.2500	0.0000	1.0000	Gra30	1	0.0167	0.0000	0.0000
	3	0.5667	0.0000	0.0000		2	0.0500	0.0000	0.0000
1	0.5667	0.5250	0.0000	3		0.2167	0.0000	0.0000	
Gra06	2	0.4333	0.4750	1.0000	4	0.7167	1.0000	1.0000	

表 3 稀有鮎鲫 17 个微卫星位点的平均基因纯合率、平均杂合度和平均多态信息含量

Tab. 3 Mean rate of homozygote, mean heterozygosity and mean polymorphic information content for 17 microsatellites of *Gobiocypris rarus*

	野生种群 Wild population	HAN系 F20 F20 of inbred strain HAN	HAN系 F22 F22 of inbred strain HAN
平均基因纯合率 Mean rate of homozygote (%)	48.64	86.18	91.96
平均杂合度 Mean heterozygosity	0.5744	0.1597	0.1031
平均多态信息含量 Mean polymorphic information content	0.5252	0.3888	0.3837

表 4 稀有鮎鲫群体间的遗传距离(左下)及遗传相似性指数(右上)

Tab. 4 The genetic distances (lower-left triangle) and genetic similarity indices (upper-right triangle) among wild population and inbred strain of

<i>Gobiocypris rarus</i>			
	野生种群 Wild population	HAN系 F20 F20 of inbred strain HAN	HAN系 F22 F22 of inbred strain HAN
野生种群 Wild population	—	0.6409	0.6107
HAN系 F20 F20 of inbred strain HAN	0.4449	—	0.8104
HAN系 F22 F22 of inbred strain HAN	0.4931	0.2102	—

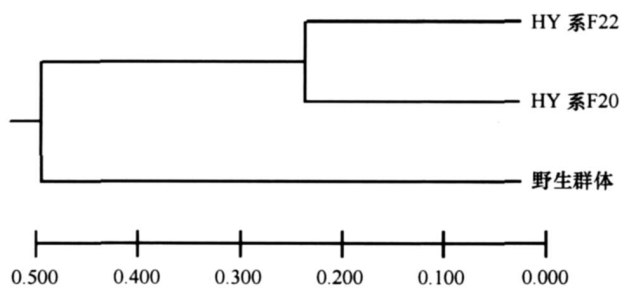


图2 稀有鮡鲫三个群体的聚类分析图

Fig. 2 Cluster dendrogram among three populations of *Gobiocypris rarus*

3 讨论

3.1 关于稀有鮡鲫群体内的遗传变异分析

近交使基因趋于纯合,平均基因纯合率在很大程度代表一个群体的近交程度。稀有鮡鲫 HAN系 F20、F22的平均基因纯合率都远远大于野生种群,这与近交系的近交程度均较高有关。由于长期的近交,某些基因不断地被淘汰,基因型也渐趋于纯合;并且在长期的室内培育过程中,由于没有外来血缘的加入,从而也导致了遗传基因多样性的低水平。

Botstein, *et al.* 首先提出了衡量基因变异程度高低的多元信息含量指标:当 $PIC > 0.5$ 时,该位点为高度多态位点; $0.25 < PIC < 0.5$ 时,该位点为中度多态位点;当 $PIC < 0.25$ 时,该位点为低度多态位点^[8]。本研究中 HAN系 F20和 F22在 17个微卫星位点的平均 PIC 均低于 0.5,明显低于野生群体(高度多态),属于中度多态,表明可能由于长期的近交使部分等位基因已丢失,因而基因位点多态性降低,多元信息含量明显降低。在本研究中,野生群体平均杂合度为 0.5744,远远高于 HAN系 F20、F22,其遗传多样性较高。这与王剑伟等^[10]利用 RAPD 技术进行稀有鮡鲫野生和近交群体的遗传多样性分析的研究中所取得的结果是一致的。

综上所述,稀有鮡鲫经过长期的近交已经达到较高的近交程度,与野生种群相比遗传多样性明显降低,较低的平均杂合度和平均多元信息含量以及较高的平均基因纯合率,都表明近交系内大多数为纯合位点,近交对稀有鮡鲫的遗传纯化已产生了明显的作用。类似的结果在很多研究中都有报道。利用微卫星技术对 20代兄妹连续交配的 SLA 猪进行研究,大量高度多态性位点的基因多样性降低,而个体间的相似性却很高^[11];对 23个近交系鸡 MHC 基因的研究,结果发现 42个微卫星位点的条带共享率为 0.74—0.96,说明群体的一致性很

高^[12,13]。对连续近交 6代猪的微卫星基因杂合度进行了研究,结果发现基因杂合度由 0世代的 0.616下降到 5世代的 0.284。

需要说明的是 HAN系 F22中还有一小部分微卫星位点未纯合,表现出一定的多态性。郑康等对草鱼连续两代雌核发育群体基因组 DNA 进行微卫星比较分析发现,一代人工诱导雌核发育草鱼群体中个体之间的基因型还不完全一致,表现出一定的多态性,连续两代诱导后不仅所检测个体的基因位点已完全纯合,并且各个体的基因型也完全一致^[14]。因此,今后还需要对稀有鮡鲫继续进行近交培育和繁殖,并定时进行检测。

3.2 关于稀有鮡鲫群体间的遗传变异分析

从各群体的等位基因组成可以评价其遗传背景。17对引物在野生个体中共检测到 65个等位基因,在 HAN系中只检测到 26个,表明近交过程中已有大量等位基因丢失。其中,有 18个等位基因为三者所共有,这些等位基因可能在整个基因组中比较保守。HAN系中有较多的单态位点,其中 F20有 11个, F22有 13个,而它们共有的单态位点有 8个。近交谱系分析发现,实验所采用的 F20和 F22并非完全同支,它们的前 18代是相同的,但从第 19代起属于不同的分支,因此基因纯合的速率(与亲本基因型是否纯合有关)以及纯合的基因位点都会有差异,但是随着近交世代的增加,杂合基因型将进一步淘汰,基因纯合程度越来越高。

此外,在微卫星位点 GR08中, HAN系 F20、F22在 147—164 bp 之间有一个等位基因,但在野生个体中没有。近期研究表明,在对 1997年、2006年采自汉源的各 30尾标本的检测中也未发现该等位基因(内部资料),因此推测近交过程中发生了基因突变。如果该等位基因在今后的近交培育中得以保留并纯合,可以作为 HAN系的一个鉴别标记。

3.3 应用微卫星标记进行稀有鮡鲫近交系的遗传检测

近交系动物是基因高度纯合的动物群体,其等位基因纯合度理论上可达到 99.8%,基因纯合性和同基因性是近交系的显著特点。以微卫星的侧翼序列设计的引物进行 PCR 扩增,然后用聚丙烯酰胺凝胶分离 PCR 产物,可以从分子水平上直接反映近交系的基因纯合度及同基因性。

生化标记检测是近交系遗传质量控制中最为常用的方法,这一方法是检测同工酶或异构蛋白的变化来推测的基因变化。由于同工酶基因位点是编码

区,受环境的选择压力较大,不易发生变异,可以检测的多态位点较少,在很大程度上低估了整个基因组的遗传变异水平。Asahida, *et al.* 利用 PCR-RFLP^[15]和 Fujio, *et al.* 利用同工酶标记都没有检测到牙鲈自然群体间的遗传差异^[16],而 Sekino, *et al.* 利用 11 个微卫星引物成功的检测到不同地理种群间的遗传差异^[17]。因而,生化标记与直接从 DNA 分子水平进行检测的微卫星标记相比,明显存在着许多弊端,如准确度、灵敏度低,反映的遗传概貌有限等。利用微卫星标记对近交系动物的检测不仅简便、快捷^[18],而且微卫星标记具有高度的多态性和丰富的可供个体识别标志的微卫星位点,能够比较全面的反映基因组的遗传及变异情况,近年来已在水生动物家系鉴定、哺乳类实验动物品系鉴定上得到应用^[7, 13, 19, 20]。如在小鼠的基因图谱中已包含了 7337 个微卫星 DNA,其中有 6580 个具有多态性^[19]。因此,随着微卫星 DNA 多态性研究的不断深入,微卫星 DNA 将会被广泛应用于近交系的遗传检测中。在本研究中选用 17 个微卫星位点对稀有^鮠近交系进行遗传检测,发现近交系的遗传组成与野生群体相比已发生了较大的变化,通过近交稀有^鮠的遗传纯度已有了很大的提高。利用微卫星分子标记可以对稀有^鮠近交系的近交程度进行评价,而且为进一步的品系培育提供了遗传学资料,同时也为其实验动物化提供了遗传学依据。

参考文献:

- [1] General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China Laboratory animal-Genetic quality control of mammalian laboratory animals [S]. GB 14923—2001 [中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 实验动物 哺乳类实验动物的遗传质量控制. GB 14923—2001]
- [2] Wang J W, Cao W X. *Gobiocypris rarus* and fishes as laboratory animals *Transactions of the Chinese Ichthyological Society*, No. 6 Beijing: Science Press 1997, 144—152 [王剑伟,曹文宣. 稀有^鮠与鱼类实验动物. 鱼类学论文集(第 6 辑). 北京: 科学出版社. 1997, 144—152]
- [3] Cao W X, Wang J W. Rare minnow: a new laboratory animal in China [J]. *Laboratory Animal Science and Management*, 20 (Supplementary Issue): 2003, 96—99 [曹文宣,王剑伟. 稀有^鮠——一种新的鱼类实验动物. 实验动物科学与管理, 2003, 20(增刊): 96—99]
- [4] Shao Y. Genetic quality control of an inbred strain of *Gobiocypris rarus* [D]. Doctoral dissertation, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 2007 [邵燕. 稀有^鮠近交系的遗传质量检测. 博士学位论文, 中国科学院水生生物研究所, 武汉. 2007]
- [5] Sambrook J, Rusll D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd Ed). Beijing: Science Press 2002 [萨姆布鲁克, 拉塞尔. 分子克隆实验指南(第 3 版). 北京: 科学出版社. 2002]
- [6] Liao X L, Wang D, Yu X M, *et al* Characterization of novel microsatellite loci in rare minnow (*Gobiocypris rarus*) and amplification in closely related species in Gobioninae [J]. *Conservation Genetics*, 2007, 8: 1003—1007
- [7] Niu R, Shang H T, Wei H, *et al* Genetic analysis of 35 microsatellite loci in 5 lineages of Xishuangbanna miniature pig inbred line [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2001, 28(6): 518—526 [牛荣, 商海涛, 魏泓, 等. 版纳小耳猪近交系 5 家系 35 个微卫星座位的遗传分析. 遗传学报, 2001, 28(6): 518—526]
- [8] Botstein D, White R L, Skolnick M, *et al* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32: 314—331
- [9] Nei M. Genetics distance between populations [J]. *American Naturalist*, 1972, 106: 283
- [10] Wang J W, Wang W, Cui Y S Genetic diversity of three *Gobiocypris rarus* populations and one breeding stock [J]. *Chinese Biodiversity*, 2000, 8(3): 241—247 [王剑伟, 王伟, 崔迎松. 野生和近交稀有^鮠的遗传多样性. 生物多样性, 2000, 8(3): 241—247]
- [11] Singer E N, Jeffreys A J, Licence S, *et al* DNA profiling reveals remarkable low genetic variability in a herd of SLA homozygous pigs [J]. *Research in Veterinary Science*, 1999, 67: 207—211
- [12] Zhou H, Lamont S J. Genetic characterization of biodiversity in highly inbred chicken lines by microsatellite markers [J]. *Animal Genetics*, 1999, 30: 256—264
- [13] Wu X L, Li X, Merete F. Association of microsatellite genomic heterozygosity with inbred pig performance under successive inbreeding [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2001, 28(1): 20—28 [吴晓林, 李桐, Merete Fredholm. 连续近交小家猪微卫星基因组杂合度与经济性状的相关性研究. 遗传学报, 2001, 28(1): 20—28]
- [14] Zheng K, Lin K D, Liu Z H, *et al* Comparative microsatellite analysis of grass carp genomes of two gynogenetic groups and the Xiangjiang River group [J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2007, 34(4): 321—330 [郑康, 林凯东, 刘正华, 等. 草鱼连续两代的雌核发育群体及湘江流域群体基因组 DNA 的微卫星比较分析. 遗传学报, 2007, 34(4): 321—330]
- [15] Asahida T, Saitoh K, Yamashita Y, *et al* Genetic variation in the Japanese flounder based on analysis of mitochondrial DNA by restriction endonucleases [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1998, 64: 377—383
- [16] Fujio Y, Park J, Tabata K. Genetic differences between natural and released populations of plaice. In: Genetic Assessment Project Report in 1985—1988. 1989, 419—435
- [17] Sekino M, Hara M. Application of microsatellite markers to population genetics studies of Japanese flounder *Panulichthys olivaceus* [J]. *Marine Biotechnology*, 2001, 3: 572—589

- [18] Remmers E F, Goldmuntz E A, Zha H, *et al* Linkage map of seven polymorphic markers on rat chromosome 18 [J]. *Mammalian Genome*, 1993, 4: 265—270
- [19] Wang H X, Zang X J, Li F H, *et al* Kinship analysis in the Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) based on microsatellite DNA markers [J]. *Acta Hydrobiologia Sinica*, 2008, 32 (1): 42—46 [王鸿霞, 张晓军, 李富花, 等. 应用微卫星标记分析野生中国明对虾的亲权关系. 水生生物学报, 2008, 32(1): 42—46]
- [20] Dong S R, Kong J, Zhang T S, *et al* Microsatellite markers simulation and application for parentage determination on *Fenneropenaeus chinensis* [J]. *Acta Hydrobiologia Sinica*, 2008, 32 (1): 96—101 [董世瑞, 孔杰, 张天时, 等. 中国对虾微卫星家系鉴定的模拟分析与应用. 水生生物学报, 2008, 32(1): 96—101]

THE APPLICATION OF MICRO SATELLITE MARKERS ON GENETIC QUALITY CONTROL OF AN INBRED STRAIN OF GOBIOCYPRIS RARUS

SHAO Yan^{1,2,3}, WANG Jian-Wei¹, HE Yong-Feng^{1,2}, CAO Wen-Xuan¹ and TONG Jin-Gou¹

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072;

2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039; 3. Binzhou University, Binzhou 256603)

Abstract: Genetic homogeneity is the basic demand for an inbred strain of laboratory animal, which could be detected in multi-levels, including morphology, cytogenetics, biochemistry, immunogenetics, molecular genetics and so on. Biochemical markers and skin grafting were recommended methods for genetic quality control of mammalian animals in the national standard GB14923—2001. However, no prescriptive methods were destined for monitoring genetic quality of aquatic laboratory animals. *Gobiocypris rarus* is an endemic cyprinid fish in China, distributed only in Sichuan Province. Because this species has many attractive attributes, including sensitivity to chemicals, small size, eurythmal, easily to be cared in laboratory, short life cycle (about 4 months) and so on, it has been widely used in many researches of fish pathology, genetics, toxicology, embryology, and physiology in China. An inbred strain of *Gobiocypris rarus*, named HAN strain, has been established by brother-sister mating to the 23rd generation in the laboratory since 1990. In order to investigate the genetic background of the HAN strain and to monitor its genetic quality, we examined the inbred strain on external morphometric and meristic characters, skeletal morphometrics, survival of scale transplantation, electropherogram of isozymes and microsatellite polymorphism. The present study was a part of these series works on the examination of molecular genetic homogeneity. A total of 17 microsatellite markers were used to analyze on 30 individuals of F22, 20 individuals of F20 of the HAN strain in contrast with 30 individuals of wild type which were caught in Hanyuan County in 2006. All the 17 microsatellite markers exhibited to be polymorphic in wild populations, yet only six of them were polymorphic in F20 and four polymorphic in F22. Overall 64 alleles were detected in the wild population, and the number of alleles per locus ranged from 2 to 6. But in HAN, only 1 or 2 alleles could be detected in each locus, while totally 26 and 21 alleles were found in F20 and F22, respectively. The average homozygosities of these microsatellite loci were 91.96%, 86.18% and 46.84% in F22, F20 and wild population, respectively. The average heterozygosity was 0.5744 in wild population, significantly higher than those of F22 and F20, which showed its high levels of genetic diversity. The average polymorphism information content was 0.5252, 0.3838 and 0.3837 in wild population, F20 and F22, respectively. Therefore, in contrast to wild population, the high homozygosity and low heterozygosity were found in inbred HAN strain. Among all populations, the genetic similarity index between F20 and F22 was the largest one, which showed the closest genetic distance and the nearest relationship between them. The genetic distance between wild population and F20 was larger than one between F20 and F22, and smaller than one between wild population and F22. On the whole, the present study indicated that genetic diversity of inbred strain was much lower than wild population, and high genetic purity resulted from long-time inbreeding was existed in HAN strain. Microsatellite markers were sensitive and effective methods for monitoring genetic quality of laboratory fish. The HAN strain maintained by brother-sister mating should be periodically monitored by microsatellite markers for the unpurified loci needed to be homozygosis.

Key words: *Gobiocypris rarus*; Microsatellite marker; Inbred strain; Control of genetic quality