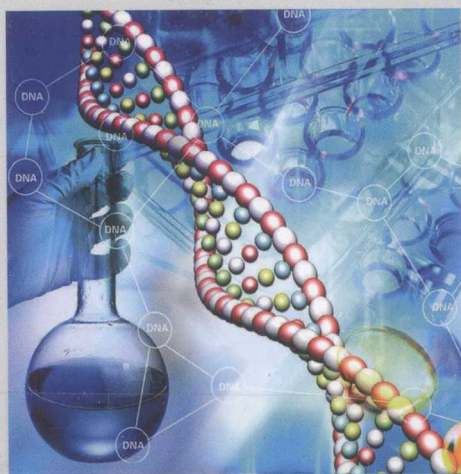


遗传标记 YICHUAN BIAOJI 在实验动物遗传质量 控制中的应用

ZAI SHIYAN DONGWU YICHUAN ZHILIANG
KONGZHIZHONG DE YINGYONG

宋国华/著

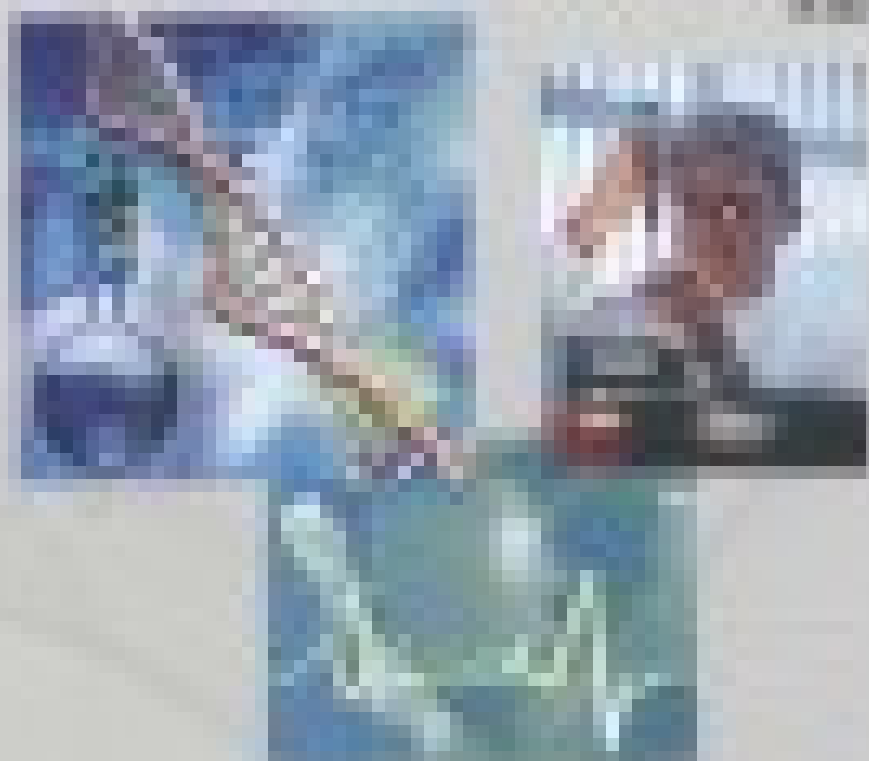


 军事医学科学出版社

遗传标记 YICHUAN BIADU 在实验动物遗传质量 控制中的应用

主编 王恩祥 副主编 王恩祥 王恩祥 王恩祥
副主编 王恩祥 王恩祥 王恩祥 王恩祥

王恩祥 主编



王恩祥 主编

遗传标记在实验动物遗传 质量控制中的应用

宋国华 著

军事医学科学出版社

· 北 京 ·

图书在版编目(CIP)数据

遗传标记在实验动物遗传质量控制中的应用/宋国华著.

-北京:军事医学科学出版社,2011.11

ISBN 978-7-80245-891-8

I. ①遗… II. ①宋… III. ①实验动物-遗传控制:
质量控制-研究 IV. ①Q95-331

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 018504 号

策划编辑:李霞 责任编辑:蔡美娇 责任印制:丁爱军

出版人:孙宇

出版:军事医学科学出版社

地址:北京市海淀区太平路 27 号

邮编:100850

联系电话:发行部:(010)66931049

编辑部:(010)66931127,66931039,66931038

86702759,86703183

传真:(010)63801284

网址:<http://www.mmsp.cn>

印装:中煤涿州制图印刷厂北京分厂

发行:新华书店

开本:710mm×1000mm 1/16

印张:15

字数:235 千字

版次:2011 年 11 月第 1 版

印次:2011 年 11 月第 1 次

定价:45.00 元

本社图书凡缺、损、倒、脱页者,本社发行部负责调换

前 言

实验动物被公认是生命科学研究的基础和重要的支撑条件,是不可缺少的“活的精密仪器”。随着医学生物学的发展,科学研究中对实验动物质量的要求也越来越高。应用高质量的标准化实验动物进行医学、生物学、药学等实验研究,不仅能排除实验动物本身对实验研究的影响,而且也能得到可靠、准确、重复性好的实验结果。因此,实验动物质量好坏直接关系到实验研究的成败。由于科学研究对实验动物的均一性和实验结果的重复性有较高要求,因而,对实验动物遗传物质的稳定性和一致性也就提出了更高要求。

目前,实验动物的品系已达数千个之多,尽管在实验动物的培育、保种及繁殖过程中都有严格的要求;但由于影响遗传变异的因素很多,仍然存在着发生遗传变异或污染的可能。为保证动物的品种、品系的遗传质量与标准一致,使之在长期的繁殖过程中保持遗传质量稳定不变,实验动物质量监测是评定和保证实验动物质量必不可少的重要手段。采用先进的遗传检测技术是进行遗传监测的必要条件,因此研究和应用遗传质量检测技术对遗传质量控制具有重要意义。

本书主要对实验动物的遗传质量控制内容、检测技术进行概述,并结合实验室研究,对细胞遗传标记、随机扩增多态 DNA 标记(RAPD)、微卫星 DNA 遗传标记以及线粒体标记等开发和应用进行了总结。主要以中国地鼠为例进行了初步研究,取得了一些有价值的结果。在研究工作中先后得到科技基础性工作专项:实验动物的保存和利用(项目编号:2002DEA10010)以及中国地鼠微卫星 DNA 遗传标记检测体系的建立(项目编号:2005K01)、中国地鼠近交系遗传分析和生物学性状研

究(项目编号:20051087)、近交系中国地鼠核型分析和畸变率的研究(项目编号:2001623)、中国地鼠与金黄地鼠线粒体基因组全序列比较研究(项目编号:2009K02)等山西省科技厅和卫生厅项目的资助。

全书共九章。第一章主要阐述实验动物遗传质量控制的重要性及质量检测的方法;第二章主要介绍实验动物细胞遗传学标记以及中国地鼠专题研究的主要结果;第三章介绍实验动物生化标记的研究及其在实验动物遗传检测中的应用情况;第四章为 RAPD 遗传标记及其在实验动物遗传检测中的应用;第五章对微卫星遗传标记的开发及其在实验动物遗传检测中的应用进行了总结;第六章阐述 SNP 遗传标记在实验动物研究中的应用;第七章介绍实验动物 EST 遗传标记的研究;第八章为实验动物线粒体基因组研究,重点介绍中国地鼠线粒体基因组的研究成果;第九章总结了遗传标记研究常用的生物信息学技术。

在本书撰写的过程中,得到山西省科技厅、山西医科大学等部门及同行的热忱鼓励与支持,在此对他们以及书中参考资料的作者致以崇高的敬意和感谢。本书许多资料也是作者多年相关课题研究成果的总结,由于作者水平有限和时间仓促,本书中的疏漏和不妥之处难以避免,恳请读者批评指正。

宋国华
2011 年 11 月

目 录

第一章 实验动物遗传质量控制	(001)
第一节 实验动物遗传质量监控的原因	(001)
第二节 实验动物的遗传学分类	(007)
第三节 近交系实验动物遗传学质量控制	(009)
第四节 封闭群实验动物的遗传学质量控制	(013)
第五节 杂交 F1 代动物遗传学质量控制	(018)
第六节 实验动物遗传质量检测	(019)
第二章 实验动物细胞遗传标记的研究	(029)
第一节 实验动物细胞遗传学的研究内容	(029)
第二节 染色体的带型分析	(033)
第三节 细胞学标记技术在动物研究中的应用	(038)
第四节 近交系中国地鼠染色体核型分析和畸变率的研究	(041)
第三章 实验动物生化标记的研究	(045)
第一节 生化标记研究进展	(045)
第二节 生化标记在实验动物遗传检测中的应用实例	(049)
第四章 实验动物 RAPD 遗传标记的研究	(056)
第一节 RAPD 分子标记及其应用	(056)
第二节 RAPD 实验中可能发生的问题及解决方法	(062)
第三节 近交系中国地鼠山医群体遗传结构的随机扩增多态分析	(069)

第五章 实验动物微卫星 DNA 遗传标记的研究	(077)
第一节 微卫星 DNA 分子标记及其应用	(077)
第二节 中国地鼠基因组微卫星富集文库的建立	(089)
第三节 中国地鼠微卫星引物的筛选	(109)
第四节 山医群体中国地鼠微卫星遗传检测体系的建立	(120)
第六章 实验动物 SNP 遗传标记的研究	(126)
第一节 单核苷酸多态性的研究进展	(126)
第二节 SNP 标记技术的应用	(131)
第三节 SNP 标记技术用于遗传检测的应用实例	(134)
第七章 实验动物 EST 遗传标记的研究	(138)
第八章 实验动物线粒体基因组的研究	(148)
第一节 线粒体基因组与遗传进化进展	(148)
第二节 中国地鼠线粒体全基因组测序	(154)
第三节 啮齿类 5 种动物 mtDNA 序列的变异及比较进化研究	(175)
第四节 常用啮齿类实验动物 Cyt b 的比较以及系统进化关系分析	(191)
第九章 遗传标记研究常用的生物信息学技术	(200)
第一节 常用的生物学网站	(200)
第二节 常用的生物信息软件	(203)
参考文献	(222)
中英文对照	(229)

第一章

实验动物遗传质量控制

第一节 实验动物遗传质量监控的原因

一、实验动物的概念

实验动物是指经人工饲养,对其携带的微生物、寄生虫控制,遗传背景明确或者来源清楚,用于科学研究、教学、生产、检定及其他科学实验的动物。实验动物虽是动物,但它不同于人们常说的野生动物(animals obtained from nature)、经济动物[家畜(禽)(domestic animals and fowls)]和观赏动物(如宠物)。由于实验动物种类和数量有限,某些遗传背景不十分清楚,对其携带的微生物、寄生虫未做净化处理的动物也在用于科学实验,但它们只能称做实验用动物(animal for research 或 experimental animal)。实验用动物是指能用于科学实验的动物,包括实验动物和某些野生动物、经济动物和观赏动物中一些用于实验的动物。其中有的动物未经严格的遗传学控制和微生物寄生虫学控制,标准化控制程度很低。

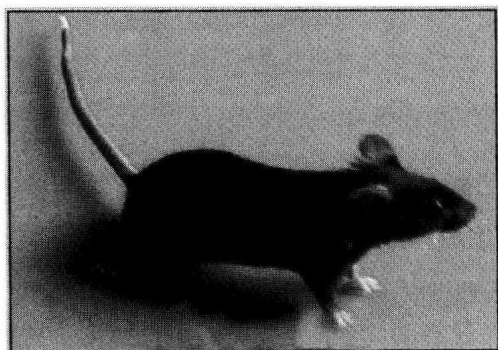
二、实验动物资源多样化

在现代医学生物学的研究中,实验动物及动物实验的支撑地位更加突出。实验动物是现代医学生物学研究不可缺少的支撑条件,新型实验动物品系与模型动物的培育为医学生物学研究提供了新动力。实验动物在农药、兽药、药物、食品等安全性评价工作中起到极为重要的作用。

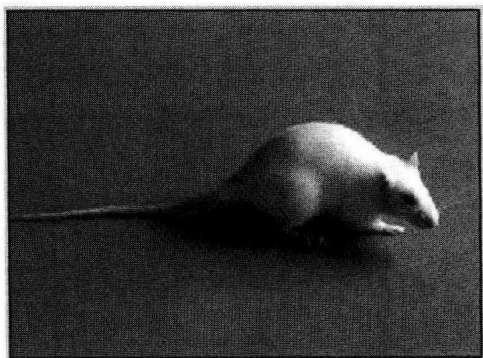
现代科学的发展要求应用更多种类、品系、高质量的实验动物以及各种疾病动物模型,作为应用学科的实验动物学必然以科学的需求为自身的发展方向。野生动物的实验动物化研究一直与实验动物学科同步发展,加强对实验动物科学技术

的研究,还可为野生动物资源开辟新的利用途径。

我国潜在的实验动物资源极其丰富,具备一个巨大的实验动物原始资源库和基因库。开发和保护实验动物资源也是一项重要的工作。目前,已开展了许多种类的动物(部分实验动物见图 1-1),哺乳动物如沙鼠、白化高原鼠兔、小型猪、树鼩、中国地鼠、斑马鱼、小型猪、土拨鼠等非人灵长类的实验动物化研究;水生动物如剑尾鱼、斑马鱼、红鲫等实验动物化研究等。基因治疗药物的研制,生物反应器的研制与开发,各种新的疾病如 SARS 的治疗与预防都有赖于新的动物模型的开发。因此,实验动物资源多样性是必然趋势。



小鼠



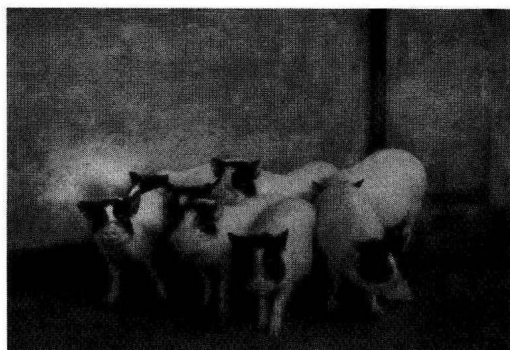
大鼠



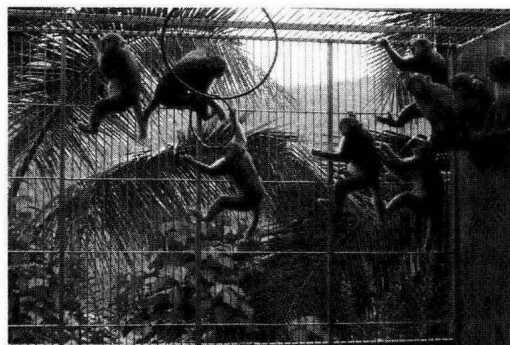
家兔



树鼩



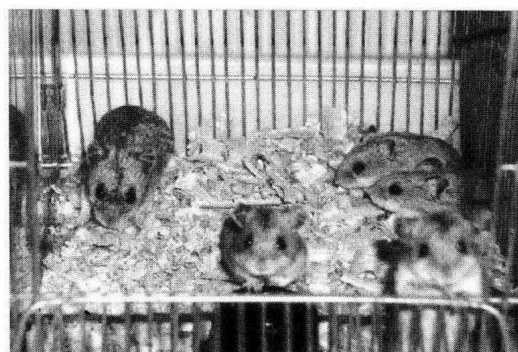
小型猪



猴子



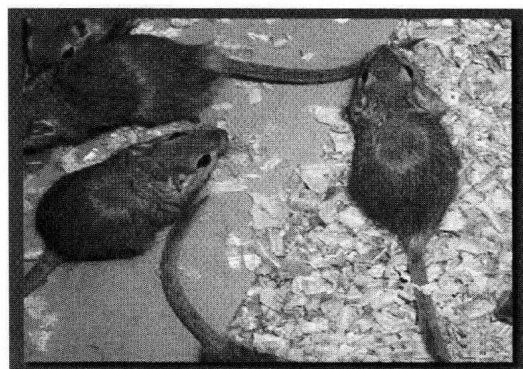
金黄地鼠



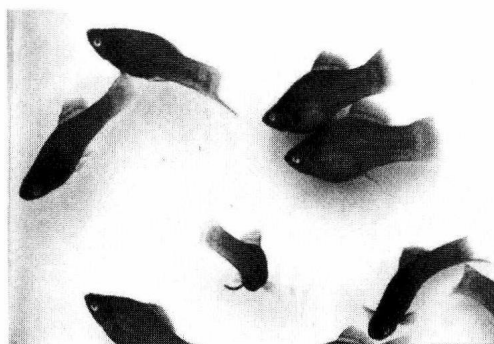
中国地鼠



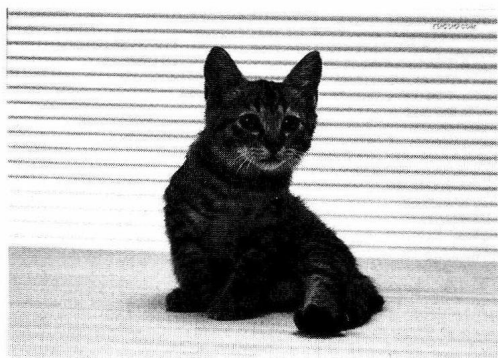
豚鼠



沙鼠



剑尾鱼



猫

图 1-1 在生物研究中应用的各种实验动物

三、实验动物遗传质量控制内容

实验动物在生命科学研究中被公认是不可缺少的“活的精密仪器”。要保证科学实验结果的可靠性、精确性和可重复性,实验动物必须满足科学实验的要求,即:①对实验处理表现出极高的敏感性;②模型性状具有遗传上的稳定性;③对实验处理的个体反应表现出极强的均一性;④动物来源具有易获得性。因此,要求实验动物必须是其先天的遗传性状、微生物和寄生虫携带状况、繁育条件、营养需求以及环境等方面受到全面控制的动物。

实验动物遗传质量监测是实验动物标准化管理一个极其重要的内容。每个品种和品系都有各自的遗传特点。在实验动物的生产、繁殖、应用过程中,这些遗传特点可能发生改变,但都必须符合其定义之规定的标准遗传组成。

实验动物遗传质量控制包括两方面:一是有目的地改造和繁育新的具有特定遗传背景的动物。二是运用各种科学手段去监测、维持动物的遗传性状。前者是指实验动物的育种,后者是指实验动物的保种及遗传监测。

1. 实验动物育种 指通过控制和改变原种的遗传物质、个体的发育过程和动物生活的必需环境,以及选择特殊的性状表现范围等手段人为地筛选、改变和重建某些生物学特性,并采用不同的交配方式使之固定和维持。其目的一是育成各种各样的动物品种和品系,筛选突变性状,扩大遗传变异或特征差异。二是育成具有

高度遗传性状均一的动物,使实验动物的实验结果具有较高的可信性和重复性。

2. 实验动物保种 由于已育成的实验动物品系易受到内部和外部各种因素的影响而导致其生物学特征发生改变,因此,实验动物保种就是根据不同对象,采用近亲交配、杂交、随机交配等不同的保种方法,以保持动物品系的遗传组成特征长期稳定不变。

3. 遗传监测 其目的是对近交系通过测定其基因的纯合性以及表型证实该品系是否保持原来的遗传特性,是否发生基因突变或基因污染;对远交系则是测定其基因的杂合度以及基因频率以证实该品系是否在既定的范围内波动。由此可见,遗传监测是遗传质量控制的“眼睛、天平、望远镜”。

只有当实验动物具有明确的遗传背景资料、并符合其定义之规定、保种及生产的繁谱及记录卡清楚完整、繁殖方法科学合理、经遗传监测质量合格,才能称之为符合遗传标准要求的实验动物。因此必须做好以下工作:①管理实验动物种质资源;②合理规范实验动物引种;③掌握正确繁育品系品种的方法;④加强科学的饲养管理;⑤经常或定期开展遗传监测;⑥做好遗传质量监测的其他工作。

实验动物的遗传学特征对动物实验的结果有着更深刻的影响。动物实验结果首先取决于动物本身的生物学特征、病理生理特点及其对实验因素的反应性,而动物实验结果的重复性、可比性又取决于动物个体差异的程度。无论是实验动物本身的生物学特征,还是其个体差异程度,都主要受基因的控制。其次,在相对恒定的饲养环境中,实验动物对外源微生物感染的敏感性与其遗传特征密切相关,故实验动物的遗传学状况也在一定程度上影响着其微生物学状况。因此,实验动物的遗传特征对动物实验结果有着根本性的影响。已有大量资料表明,不同基因型动物其生物学特征有明显差异,显著影响着其对实验因素的反应性。因此,必须提高实验动物遗传质量的标准化程度,推广应用遗传学质量标准化的动物,才能保证动物实验的准确性、重复性及其可比性。

四、实验动物遗传质量控制意义

在生物医学研究中,经常出现此实验室做出的实验结果不能在彼实验室得以重复,或同一实验室实验结果不能重复。此种现象的产生大都可归结于实验动物的遗传组成不同,即遗传特性不同所导致。随着科学技术的发展,医学、生物学研究领域都广泛运用具有一定特征的实验动物,并要求特征均匀一致,以确保实验中

反映出来的差异能够代表实验条件下的差异,而不是因为实验动物遗传背景不同而造成反应性的不同。

在医学研究中,人们进行动物实验的目的是为人类的健康服务。虽然近交系动物遗传特征均一,但由于人类群体是一个较为接近远交的大群体,因此,医学家们争先采用远交系实验动物。目前我国广泛使用的远交系小鼠为昆明小鼠(来源于 Swiss 小鼠);小鼠由于来源不同,选留方式不同,加上育成年代的区别,即使利用同名的瑞士小鼠,实验结果也是大相径庭。如美国生物制品局(1981, Foster)用两个不同来源的瑞士小鼠测定鸭胚狂犬病疫苗,试验结果明显不同,一组 3 批制品全部合格,一组 3 批制品只有 1 批合格。Foster 又用 6 种不同来源的瑞士小鼠,对仙台病毒之敏感性进行比较,差别同样是显著的。这是因为瑞士小鼠属于封闭群或远交系小鼠,其遗传特性变异频率较大,应有严格的遗传质量控制。

综上所述,必须加强实验动物品种、品系的遗传质量控制,并根据各类实验动物品种、品系的遗传组成特征,按照国际规定的封闭群动物的繁殖制度和近交系动物繁殖系统进行保种和生产,加强遗传质量监测,为科学研究提供标准的合格的实验动物,以确保实验结果的可信度。

五、国家实验动物法规建设

国家科技部先后制定并颁布了一系列法规,如《关于“九五”期间实验动物发展的若干意见》、《实验动物质量管理办法》(1997)、《国家实验动物种子中心管理办法》(1998)、《国家啮齿类实验动物种子中心引种、供种实施细则》(1998)、《省级实验动物质量检测机构技术审查准则》和《省级实验动物质量检测机构技术审查细则》(1998)、《关于当前许可证发放过程中有关实验动物种子问题的处理意见》(1999)、《实验动物许可证管理办法》(2002)。

为了保证实验动物的质量,提高其标准化程度,首先必须建立实验动物标准化的法规体系,为实验动物标准化的实施提供法制保障。1988 年 10 月,我国颁布了第一部实验动物法规——《实验动物管理条例》,该条例明确规定:“应用实验动物应根据不同的实验目的,选择相应合格的实验动物。申报科研课题和鉴定科研成果,应当把使用合格的实验动物作为基本条件,应用不合格的实验动物所取得的检定和安全评价结果无效,所生产的制品不得使用。”1994 年 11 月,国家技术监督局正式颁布了中华人民共和国实验动物质量的国家标准;2001 年进行了修订,包括

《GB 14923-2001 实验动物哺乳类实验动物的遗传质量控制》、《GB 14922. 2-2001 实验动物微生物学等级及监测》、《GB 14922. 1-2001 实验动物寄生虫学等级及监测》、《GB 14924. 1-2001 实验动物配合饲料通用质量标准》、《GB 14924. 2-2001 实验动物配合饲料卫生标准》、《GB 14925-2001 实验动物环境及设施》。2010 年修订更新的 3 项实验动物国家标准《GB 14923-2010 实验动物哺乳类实验动物的遗传质量控制》、《GB 14924. 3-2010 实验动物配合饲料营养成分》、《GB 14925-2010 实验动物环境及设施》获得了国家质量监督检验检疫总局和国家标准化管理委员会批准,于 2011 年 10 月 1 日起实施,新批准的将替代现行的 3 项实验动物国家标准。

上述实验动物标准化的颁布、修订和完善是我国实验动物标准化工作的理论依据及实施保证,使我国的实验动物工作从此步入了规范化、法制化的健康发展轨道。

第二节 实验动物的遗传学分类

一、遗传学分类

从遗传学的观点来看,实验动物是遗传限定的动物。根据遗传特点的不同,实验动物分为近交系、封闭群和杂交群。

按基因纯合程度,实验动物可分为相同基因类型和不同基因类型两大类。相同基因类型包括近交系、突变系和杂交 F1 代动物,其中突变系严格来说是带有突变基因的近交系,而杂交 F1 代动物属于杂交群。不同基因类型包括封闭群、杂交群中除杂交 F1 代动物以外的其他动物种群,其中如果封闭群中携带某一突变基因,我们称为突变种。

一般来说,近交系、突变系、杂交 F1 代动物种群内个体之间生物学特性非常一致,而封闭群内动物个体之间差异较大。近交系动物又包括普通近交系、重组近交系、重组同类系、同源突变近交系、同源导入近交系等。大量资料表明,不同基因型的动物,其生物学特性具有明显差异,对外来刺激呈不同反应。如:解剖学上同龄的近交系 BALB/c 小鼠与 A 系小鼠相比,BALB/c 小鼠脊椎较大,脑重/体重比较高,脾及胸腺的重量也较重。

随着生物工程技术的进步,新型实验动物不断涌现,如嵌合体动物、单亲纯合

双倍体动物、转基因动物等,这些动物不能简单地归类到上述分类中去,应根据各自遗传组成进行归类或单独归为一类。如单亲纯合双倍体动物可以归入近交系动物,而嵌合体动物只能单独归为一类。转基因动物因其遗传背景的不同、转基因技术的不同,其遗传组成各种各样,目前尚无明确的分类方法,而归于转基因动物一类。

二、实验动物品种、品系的概念

1. 种 (species) 是生物学分类的最基本单位,是一群形态相似、能相互交配的自然群体,它们在生殖上与其他群体相隔离。种以下还可有进一步小的分类,如品种(stock)、品系(strain)。在实验动物分类系统中,品种和品系是基本分类单位。

2. 品种 品种一般系指具有一些容易识别和人们所需要的性状,而且可以基本稳定的遗传的动物群体。如新西兰白兔、青紫兰兔、Wistar 大鼠、KM 小鼠等。

3. 品系 在实验动物学中把基因高度纯合的动物称作品系动物。例如,C57BL/6 是近交系动物中的一个品系,属低癌组、高补体活性的动物。又如,肌萎缩症小鼠是带有突变基因(dy/dy)的品系动物。

三、作为品种、品系的条件

作为一个品种或品系,应具备以下条件:

1. 相似的外貌特征 例如 C57BL/6 品系小鼠的毛色是黑色的,DBA/2 品系的毛色是灰色的,KM 品种的毛色是白色的。当然,相似的外貌特征只是品系、品种应具备的条件之一。不同品系、品种的动物也有外貌相似的,例如 A、KM 等十几个品种、品系动物的毛色都是白色,但它们在其他特征上是有区别的。

2. 独特的生物学特性 独特的生物学特性是一个品系、品种存在的基础。在长期的研究过程中,科学工作者在一些动物身上发现了所需要的不同于其他动物的生物学特性,进行定向选择,将这些特性保留下来,成为今天为数众多的品系、品种。就白化小鼠而言有多达几十种,但每个品系、品种的生物学特性都有或多或少的差别。例如 A 品系,在经产鼠中高发乳腺肿瘤,对致癌物质敏感,易产生肺癌,老年鼠多有肾脏病变;AKR 品系自发淋巴细胞白血病;ICR 品种繁殖能力强。

3. 稳定的遗传性能 作为一个品系,不仅要有相似的外貌特征、独特的生物学特性,更重要的是要有稳定的遗传性能,即在品系、品种自群繁殖时,能将其特性稳定地传给后代。换言之,就是一个品系、品种必须具有一定的育种价值。

4. 具有共同遗传来源和一定的遗传结构 任何品系、品种都可追溯到其共同的祖先,并由此分支经选育而成,其遗传结构也应是独特的。例如 KM 小鼠 Glo-1 位点为 a 基因单一型,而 NIH 小鼠在该基因呈多态分布,a、b 型基因频率分别为 67% 和 33%。如果将上述两个品种建立基因概貌就发现它们在基因概貌上的差异,而品种内这种差异是有限的。

第三节 近交系实验动物遗传学质量控制

一、基本概念

近交系(inbred strain)是指经至少连续 20 代的全同胞兄妹交配培育而成,品系内所有个体都可追溯到起源于第 20 代或以后代数的一对共同祖先。经连续 20 代以上亲代与子代交配与全同胞兄妹交配有等同效果。

近交系的近交系数(inbreeding coefficient)应大于 99%。

这种动物在自然界里并不存在,是经人工专门培育而成。

以上定义对于小鼠是非常严格的,但是对于其他物种的动物有时需要加以区别。在某些情况下“近交系”的名称仅仅说明了该品系内的遗传差异性降低了。这种情况出现在品系的近交代数在各繁殖线上少于 20 代。但是该系的某一条繁殖线上所有个体间的异体植皮获得成功。两代之间间隔时间特别长的动物也许只要通过几代的兄妹交配繁殖就能使用“近交系”这个名称。

近交系的亚系(substrain)分化是指一个近交系内各个分支的动物之间,已经发现或十分可能存在遗传差异。通常下述 3 种情况会发生亚系分化:

1. 在兄妹交配代数达 40 代以前形成的分支(即分支发生于 F20 ~ F40)。
2. 一个分支与其他分支分开繁殖超过 100 代。
3. 已发现一个分支与其他分支存在遗传差异。产生这种遗传差异的原因可能是残留杂合、突变或遗传污染(genetic contamination)(即一个近交系与非本品系动物之间杂交引起遗传改变)。由于遗传污染形成的亚系,通常与原品系之间遗传差异较大,因此对这样形成的亚系应重新命名。

二、近交系动物遗传特征

近交系动物具有同基因性、遗传组成均一、长期遗传稳定性、个体性、背景资料