

实验大鼠的生化多态性及在遗传监测中的应用

邢瑞昌 刘双环

(中国药品生物制品检定所)

苏祖训

(中国中医研究院动物室)

利用生化标记基因 (biochemical marker-gene) 对近交系小鼠的遗传纯度进行检测, 目前已成为各国实验动物遗传监测的主要方法^[1,2,7]。随着大鼠在生物医学研究中应用的日益广泛, 目前世界上育成的近交系大鼠数目已逾百个, 我国近年来引进及自己育成的至少也有十几个品系。为了建立近交系大鼠遗传质量监测的生化方法, 根据近年来国际上大鼠生化遗传学方面的进展, 我们利用同工酶电泳方法, 对 Wistar 等两个远交封闭群和 ACI 等两个近交系大鼠在九个生化位点的遗传多态性进行了检查, 现报告如下:

材 料 和 方 法

大鼠的来源及遗传背景见表 1。

表 1 所用大鼠的遗传背景

种群 \ 背景	近交系 或 远交系	毛色	保持者	来 源
Wistar	远交	白化	中国药品生物 制品检定所	1983 年引自中国 医科院药物研究所
S. D	远交	白化	中国中医研究院	1984 年引自上海 细胞生物研究所
Wistar*	近交	白化	中国中医研究院	1984 年引自上海 细胞生物研究所
ACI	近交	野生色	中国中医研究院	1980 年引自日本

* 该品系名称在引种中传抄有误, 文中只是沿用现饲养单位所用名称。

对每个种群检查动物的数目不少于 10 只, 皆为成年鼠。除 Es-6, Es-9 和 Es-10 三个位点要用雄性鼠外, 其它位点对动物无性别要求。

表2 大鼠同工酶电泳方法

方法	试样	电泳条件				显色液
		支持物	缓冲液	方向	电压(V)	
同工酶	肾匀浆	醋酸纤维素膜	0.015M Tris-MgCl ₂ pH 7.8	—→+	200	0.1M Tris-HCl, pH 8.6 2ml β-Naphthyl acid phosphate 10mg 亚固蓝 0.2M MnCl ₂ 0.1ml
		琼脂糖凝胶	Veronal buffer pH 8.6	+→+	200	1% 淀粉 Veronal buffer pH 8.6 100ml 0.02N I ₂ -KI 溶液 2ml
	溶血	醋酸纤维素膜	Tris-EDTA-H ₃ BO ₃ pH 8.4	—→+	350	0.03 H ₂ O ₂ 5ml 1% FeCl ₃ + 1% K ₃ Fe(CN) ₆ 2ml
	小肠匀浆	醋酸纤维素膜	Tris-EDTA-H ₃ BO ₃ pH 8.4	—→+	200	2% β-Naphthyl acetate 丙酮溶液 0.5ml 亚固蓝 50mg 磷酸缓冲液 pH 6.8 10ml
	小肠匀浆	醋酸纤维素膜	Tris-EDTA-H ₃ BO ₃ pH 8.4	—→+	200	0.3M 磷酸缓冲液 pH 6.8 4.5ml 0.01M K ₃ Fe(CN) ₆ 0.4ml 0.01M K ₄ Fe(CN) ₆ 0.4ml 5-Bromoindoxyl acetate 2mg 二甲亚砜 0.2ml
	睾丸匀浆	醋酸纤维素膜	Tris-EDTA-H ₃ BO ₃ pH 8.4	—→+	200	0.1M 磷酸缓冲液 pH 6.8 4.5ml 亚固蓝 20ml
	睾丸匀浆	醋酸纤维素膜	Tris-EDTA-H ₃ BO ₃ pH 8.4	—→+	200	α-Naphthyl butyrate 10ul 二甲亚砜 0.5ml
	溶血	琼脂糖凝胶	Tris-EDTA-H ₃ BO ₃ pH 8.4	+→—	180	Pomceau S

文中检查大鼠的9种同工酶或异构蛋白的名称及电泳、显色方法见表2。

结果与讨论

(一) 实验大鼠 Akp-1 等 9 种标记同工酶的电泳图谱:

1. Akp-1^[3] 见图 1。

大鼠 Akp-1 位点有 a, b 两个等位基因。用碱性磷酸酶特异显色后, Akp-1 B 型具有两条酶带 Akp-1 A 型缺失泳动度较快的一条酶带。

2. Amy-1^[9] 见图 2。

大鼠淀粉酶-1 存在于胰脏, 血清和尿等组织中, 以胰脏中活性最高。Amy-1 A 型为双带, Amy-1 B 型只有一条泳动度较快的带。

3. Cat^[12] 见图 3。

大鼠 Cat 位点有 a, b 两个等位基因。CatA 和 CatB 均为一条弥散的宽带, 前者较后者的泳动度快。

4. Es-1^[4] 见图 4。

大鼠 Es-1 酶存于血清, 小肠等组织中。Es-1 A 具有酶活性, Es-1 B 表现为缺失酶活性。血清中的 Es-1 A 表现为一条酶带, 小肠中的 Es-1 A 具有单带和双带两种形式。血清中 Es-1 A 酶带与小肠 Es-1 A 双带中较快的泳动度相同。

5. Es-3^[12] 见图 4。

大鼠 Es-3 酶活性主要表现于小肠、肝、舌等组织中。根据酶活性的有无或电泳泳动度的不同, Es-3 同工酶有 4 种形式: Es-3A 泳动最

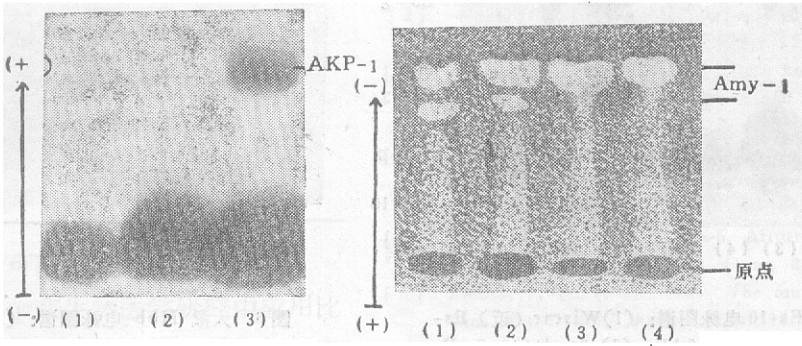


图 1

图 2

图 1 大鼠 Akp-1 电泳图谱: (1) Wistar (近), Akp-1A; (2) S. D., Akp-1A; (3) ACI, Akp-1B;
图 2 大鼠 Amy-1 电泳图谱: (1) Wistar (近), Amy-1A; (2) S. D., Amy-1A; (3) Wistar (近), Amy-1B; (4) ACI, Amy-1B.

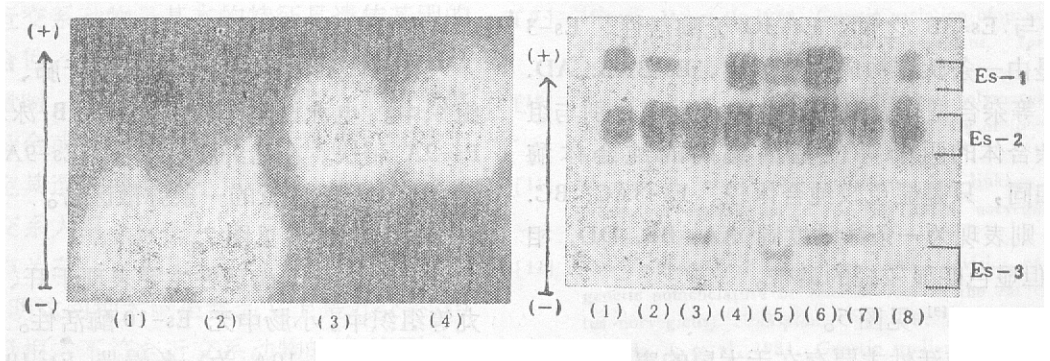


图 3

图 4

图 3 大鼠 Cat 电泳图谱: (1) S. D CatB; (2) Wistar (近), CatB; (3, 4) ACI, CatA; 图 4 大鼠 Es-1, Es-3 电泳图谱: (1) Wistar (近) Es-1A, Es-3AB; (2) S. D., Es-1A, Es-3A; (3) ACI, Es-1B, Es-3A, (4) Wistar (远) Es-1A, Es-3AC; (5) Wistar (远), Es-1A, Es-3BD; (6) ACI, Es-1A, Es-3A, (7) Wistar (近), Es-1B, Es-3A; (8) Wistar (远), Es-1A, Es-3C.

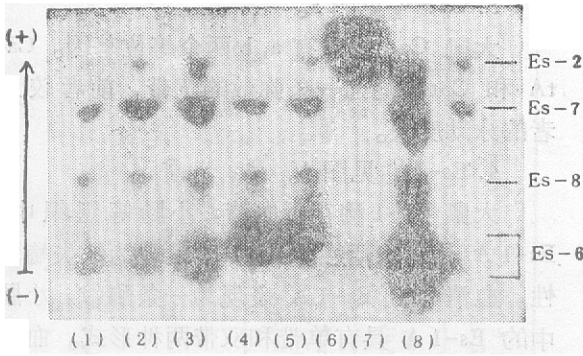


图5 大鼠 Es-6 电泳图谱: 样品除(6)为小肠匀浆外, 其余均为睾丸匀浆。(1) Wistar (近), Es-6s; (2) S. D, Es-6s; (3) S. D, Es-6S; (4) Wistar (近), Es-6F; (5) Wistar (远) Es-6F; (6) ACI, 小肠匀浆; (7) ACI, Es-6S; (8) ACI, Es-6S.

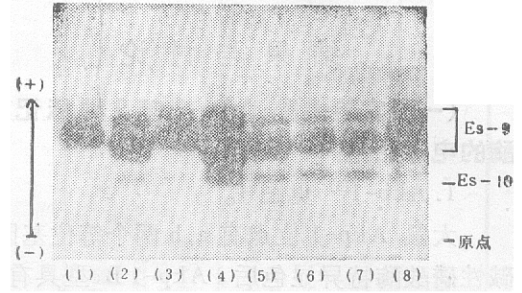


图6 大鼠 Es-9 电泳图谱: (1) S. D, Es-9B; (2) S. D, Es-9A; (3) Wistar (远), Es-9B; (4) ACI, Es-9A, (5) ACI, Es-9A; (6) Wistar (近), Es-9A; (7) Wistar (近) Es-9, (8) Wistar (远), Es-9AB.

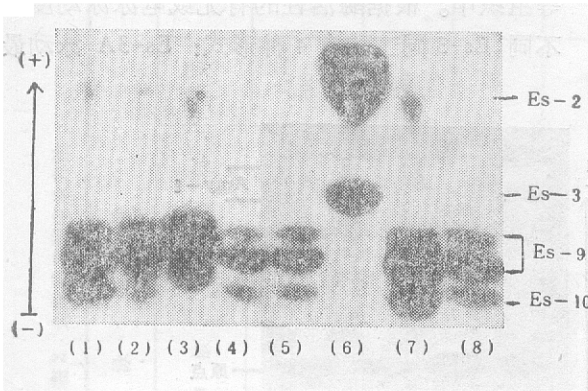


图7 大鼠 Es-10 电泳图谱: (1)Wistar (近) Es-10A; (2) S. D, Es-10AB; (3) S. d (3) S. D, Es-10B; (4) Wistar (近), Es-10A; (5) Wistar (远), Es-10A; (6) ACI, 小肠匀浆; (7) ACI, Es-10A; (8) ACI, Es-10A.

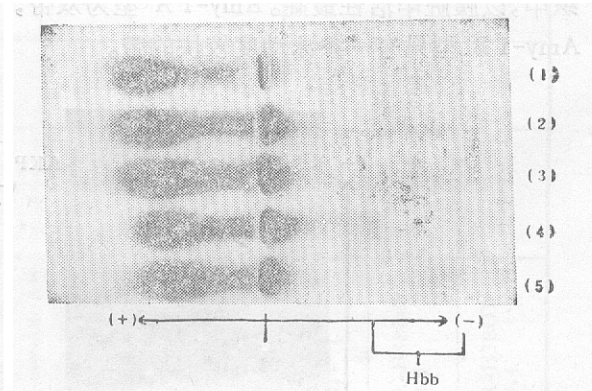


图8 大鼠 Hbb 电泳图谱: (1) S. D, HbbA; (2) Wistar (远) HbbAB; (3) Wistar (近) HbbAB; (4) ACI, HbbB; (5) ACI, HbbA.

快, Es-3B 泳动最慢, Es-3D 泳动度介于 Es-3A 与 Es-3B 之间, Es-3C 无酶活性。Es-3 酶是由一条肽链构成的单体酶, Es-3AB. AD. BD 等杂合型均表现为双带, 泳动度分别与组成杂合体的两个等位基因编码的纯合体酶带相同, 只是显色较纯合体轻。Es-3AC. BC. DC 则表现为一条泳动度同 AA, BB, DD, 相同, 但显色明显较轻的谱带。

6. Es-6^[21] 见图 5。

Es-6 酶活性主要存在于大鼠的睾丸、卵巢等组织中。小肠中无 Es-6 酶活性(见图 5)。电泳型为两条谱带组成, 泳动较慢的一条为主带, 前面还有一条次带。Es-6F 型泳动快于 Es-6S

型。

7. Es-9^[20] 见图 6。

大鼠 Es-9 酶活性主要表现为于肺、睾丸等组织中。电泳谱型为双带。Es-9B 泳动度较 Es-9A 稍快。在醋酸纤维膜电泳中, Es-9AB 表现为占据 A. B 位置的一条弥散区带。

8. Es-10^[21] 见图 7。

大鼠 Es-10 酶活性主要表现为于肝、肺和睾丸等组织中, 小肠中无 Es-10 酶活性。在醋酸纤维膜电泳中, Es-10A 为一条慢带, Es-10B 为一条快带, Es-10AB 为泳动度分别同 Es-10A. B 相同的两条轻带, 表明 Es-10 为一典型的单体酶。

9. Hbb^[6] 见图 8。

按照本文中给定的实验条件, 点样于琼脂糖凝胶中部, 大鼠 Hbb 等位基因异构蛋白变异主要表现于负极端。HbbA 型较 HbbB 型更靠近负极端。HbbAB 型则表现为弥散型双带。

(二) 对四个大鼠种群在 Akp-1 等九个生化位点的检查结果

文中检查的四个大鼠种群在 Akp-1 等九个生化多态性位点的等位基因分布见表 3。

表 3 四个种群大鼠在九个生化位点的等位基因分布

位点 \ 种群	Wistar (近交系)	ACI (近交系)	Wistar (远交系)	S. D. (远交群)
Akp-1	a	a	ab	a
Amy-1	ab	b	ab	ab
Cat	ab	a	b	ab
Es-1	ab	ab	ab	a
Es-3	ab	ab	abcd	ab
Es-6	sf	s	sf	sf
Es-9	a	a	ab	ab
Es-10	a	ab	a	ab
Hbb	ab	ab	ab	a

从表 3 结果中可以看出:

1. 所检查的几个在生物医学研究中应用比较广泛的大鼠种群中, 我们选择的 Akp-1 等九个生化位点皆在种群内部或之间存在生化基因型的变异。因此, 可以将这九个位点做为检测近交系大鼠纯度的标记基因位点。

2. 近交系动物最基本的特征是遗传基因的高度纯合性。当用生化方法检测近交系动物的遗传质量时, 若一个品系在两个以上的遗传位点发现杂合或标记等位基因发生改变, 基本上可以判定其遗传纯度是不可靠的。本文检查的两个近交系大鼠“Wistar”(近)在 Amy-1 等六个位点为杂合, ACI 在 Es-1 等四个位点为杂合, 说明这两种大鼠虽然名义上是近交系, 但实际上已根本不符合近交系动物的遗传要求。如此严重的遗传杂合, 可以肯定是遗传污染(Gentic Contimination), 即与非本品系动物发

生混交的结果。

3. Wistar 和 S. D. 两个远交封闭群相比较, 在九个生化位点中, Wistar 具有两个以上等位基因的杂合位点的数目比 S. D 多, 而且在十几只动物中, Wistar 在 Es-3 位点上可以发现 a. b. c. d 4 个等位基因, 这都说明 Wistar 封闭群比 S. D. 封闭群的基因多态性更为显著。其原因 1) 是从两个种群的起源及历史分析, Wistar 种群比 S. D 种群遗传背景广泛, 基因库更丰富^[8]。2) Wistar 大鼠用量大、种群也较大, 随着种群繁殖世代的增加而形成的近交系数的提高率较小。

参 考 文 献

- [1] 邢瑞昌等 1983 用蛋白质及同功酶谱纤维膜电泳法对近交系小鼠进行遗传监测, 遗传学报 10 (1): 63—72.
- [2] ——1984 不同来源 C₅₇BL/6J 小鼠遗传纯度的生化检验结果. 上海实验动物科学 4(3): 159—163.
- [3] Adams, M. et al. 1984 Enzyme markers in inbred rat strains Genetics of new markers and strain profiles. *Biocem. Genet* 22: 611—629.
- [4] Augustinsson, K. B. et al. 1966 A genetically controlled esterase in rat plasma. *Biochem. Biophys. Acta* 124: 323—331.
- [5] Bender, K., et al. 1982 Es-6, Affurther polymorphic esterases in the rat. *Biochem. Genet.* 20: 221—228.
- [6] French, E. A., et al 1965 The multiple hemoglobins of the rat. *J. Physiol.* 180: 16.
- [7] Hedrich, H. J. 1981 Genetic monitoring, in “The Mouse in Biomedical Research”, Vol. 1. ed. Foster, H. J., et al. Academic Press. New York. 159—173.
- [8] Lindsey, J. R., 1979 Historical foundations. in “The Laboratory Rat” Vol. 1. ed. Baker, J. H. et al. Academic PRESS. New York 2—30.
- [9] Mizuno, M., et al. 1978 Genetic variation of pancreatic α -amylases in the rat, *Rattus norvegicus*. *Jpr. J. Genet.* 53: 137—142.
- [10] Moutier, R., et al 1973 Biochemical polymorphism in the rat, *Rattus norvegicus*: genetic study of four markers. *Biocem. Genet.* 8: 321—328.
- [11] Moutier, R., et al. 1973 Evidence for linkage between four esterases loci in the rat (*Rattus norvegicus*). *Biocem. Genet.* 9: 109—115.
- [12] Van Zupphen, L. F. M., et al. 1983 Revision of the genetic nomenclature of esterase loci in the rat (*Rattus norvegicus*). *Transplant. Proc.* 15: 1687—1688.
- [13] Yamada, J. et al. 1981 Genetic studies of RBC catalase in the rat (*Rattus norvegicus*). *Jap. J. Genet.* 56: 447.