

微卫星技术在大耳白黑眼兔近交系培育中的监测分析

陈民利*, 朱 亮, 蔡月琴, 余 佳, 徐孝平, 屠 珏, 肖 慧, 潘永明

(浙江中医药大学 动物实验研究中心/比较医学研究中心, 浙江 杭州 310053)

摘要: 利用微卫星技术监测大耳白黑眼兔 (white hair black eyes rabbits, WHBE 兔) 近交培育中第五代 (F_5)、第六代 (F_6) 和第七代 (F_7) 的遗传多样性。选取 21 个微卫星座位, 筛选出扩增产物稳定并且具有多态性的 11 对微卫星引物用于本研究。结果表明, F_5 代 WHBE 兔在每个座位上的等位基因数 (N_a) 为 3~9 个不等, 11 个座位的平均有效等位基因数 (N_e) 为 1.81 个, 平均观察杂合度 (H_o) 和平均多态信息含量 (PIC) 分别为 0.381 和 0.524, 累积个体识别率 (CDP) 达到 100%, 累积非父排除概率 (CPE) 在双亲信息都是未知情况下的为 0.926, 而在得知任一亲本信息的情况下, CPE 值为 0.993。 F_6 代 WHBE 兔在每个座位上的 N_a 为 3~8 个不等, 11 个座位的平均 N_e 为 1.68 个, 平均 H_o 和 PIC 值分别为 0.356 和 0.548, CDP 达到 100%, CPE 在双亲信息都是未知情况下的为 0.931, 而在得知任一亲本信息的情况下, CPE 值为 0.994。 F_7 代 WHBE 兔在每个座位上的 N_a 为 2~6 个不等, 11 个座位的 N_e 为 1.51 个, 平均 H_o 和 PIC 值分别为 0.287 和 0.498, CDP 达到 100%, CPE 在双亲信息都是未知情况下的为 0.891, 而在得知任一亲本信息的情况下, CPE 值为 0.986。在近交系培育过程中, 从 F_5 代到 F_7 代, WHBE 兔的平均 N_e 和平均 H_o 都呈下降趋势, 提示随着近交代数的增加, WHBE 兔的基因纯合度越来越高。

关键词: 大耳白黑眼兔; 近交系培育; 微卫星; 遗传多态性

中图分类号: Q959.836; Q311.8; Q953.3

文献标志码: A

文章编号: 0254-5853-(2010)04-0401-07

Monitoring Inbreeding of WHBE Rabbits Using Microsatellites

CHEN Min-Li, ZHU Liang, CAI Yue-Qin, YU Jia, XU Xiao-Ping,

TU Jue, XIAO Hui, PAN Yong-Ming

(Laboratory Animal Research Center, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

Abstract: Microsatellite polymorphisms were analyzed in F_5 , F_6 and F_7 WHBE rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) to monitor inbreeding. Out of 21 microsatellite loci, 11 were successfully amplified and showed polymorphic. For the F_5 WHBE rabbits, the number of alleles per locus (N_a) ranged from 3 to 9 and the mean effective number of alleles (N_e) was 1.81. The mean value of observed heterozygosity (H_o) and polymorphism information content (PIC) of the 11 polymorphic loci were 0.381 and 0.524, respectively. The power of cumulative discrimination (CDP) was 1.0. The value of cumulative exclusion probability of the 11 polymorphic loci in the absence ($CPE-1$) or in the presence of genetic information on the first parent ($CPE-2$) was 0.926 and 0.993, respectively. For the F_6 WHBE rabbits, N_a per locus ranged from 3 to 8 and the mean value of N_e was 1.68. The mean value of H_o , PIC , CDP , $CPE-1$, $CPE-2$ of the 11 polymorphic loci were 0.356, 0.548, 1.0, 0.931, 0.994 respectively. For the F_7 WHBE rabbits, N_a per locus ranged from 2 to 6 and the mean value of N_e was 1.51. The mean value of H_o , PIC , CDP , $CPE-1$, $CPE-2$ of the 11 polymorphic loci were 0.287, 0.498, 1.0, 0.891, 0.986 respectively. The average number of effective alleles and the average observed heterozygosity were decreasing continuously in F_5 , F_6 and F_7 , suggesting that the purity of WHBE rabbits was increasing continuously.

Key words: WHBE rabbit; Inbreeding; Microsatellite; Polymorphism analysis

微卫星 DNA, 亦称为简单序列重复, 是指以 2~6 个核苷酸为基本序列串联重复的短片段。

国标中规定的实验动物遗传质量监测方法主要是生化标记, 它是通过蛋白质的变化来推测相应基因

收稿日期: 2009-09-12; 接受日期: 2010-05-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(30770322); 浙江省卫生高层次创新人才培养工程项目

*通讯作者 (Corresponding author), 陈民利 (1963 -), 女, 教授, 研究方向: 实验动物与比较医学。Email: minlichen01@yahoo.com.cn

的变化。而微卫星 DNA 标记是对 DNA 的直接监测, 要比生化标记更准确、更可靠, 目前被广泛应用于大小鼠、仓鼠、沙鼠、家兔、犬、猴和猪等常用实验动物的遗传监测中。如: Niu & Liang (2008) 和 Xie et al (2007) 报道了应用微卫星遗传标记对近交系小鼠进行遗传分析的研究; Shang et al (2008) 应用微卫星标记对大鼠封闭群的遗传质量进行检测和评估; Li et al (2006) 利用微卫星 DNA 监控大鼠近交系的培育; Liu et al (2008) 利用 17 个微卫星位点对长爪沙鼠 3 个封闭群进行遗传检测。兔分子生物学标记的研究起步较晚, 利用微卫星标记来研究兔群体遗传特性是 2003 年才开始的, Yin et al (2003) 使用 8 对微卫星引物对高原鼠兔血样中的 DNA 微卫星位点进行扩增, 结果每个位点都具有明显的多态性。Zhu et al (2004) 等选用欧洲野兔 6 个微卫星位点分析了 5 个品种(系)家兔群体的遗传变异, 并进行了聚类分析。Han et al (2008) 选用了 13 个微卫星位点对吉戎兔的遗传品质进行检测。Xie et al (2008) 选择 16 个微卫星标记检测了福建黄兔的遗传变异及多态性。相比较而言, 国外则开展得较早, 技术较成熟, 研究也相对较深入, 如 Rico et al (1994) 通过克隆获得 4 个微卫星标记(Sol03、Sol08、Sol28 和 Sol30); Surridge et al (1997) 从欧洲野兔基因组文库中选取 5 个引物(Sol33、Sol44、Sol51、Sol62 和 Sol74), 获得 2 个微卫星标记(Sol33 和 Sol44); Mougél et al (1997) 用寡核苷酸混合物作为探针, 筛选基因组文库获得 9 个微卫星标记(Sat2、Sat3、Sat4、Sat5、Sat7、Sat8、Sat12、Sat13 和 Sat16), Celine et al (2005) 从欧洲兔基因组文库分离出 305 个可能的微卫星序列 (INRACDDV0001 等); Korstanje et al (2003) 等通过对富含微卫星的染色体组数据库的标记扫描, 在 3、5、6、7、12 和 19 号染色体上发现了 50 多个具有多态性的微卫星位点。

WHBE 兔(*Oryctolagus cuniculus*), 是我们中心于 1998 年 9 月在实验用日本大耳白兔生产群中发现了一只雄性大耳白黑眼兔后, 通过与雌性日本大耳白兔的交配保种培育而建立的一个新实验兔种群, 目前通过 WHBE 兔同胞、母子交配进行 WHBE 兔近交系的培育, 已经培育到第七代(Cai et al, 2009)。本实验选择微卫星技术对 WHBE 兔近交系培育过程中所繁殖的第五代、第六代和第七代动物进行遗传监测, 通过基因的纯合状况, 有目的地选

择纯合座位多、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。

1 材料与方法

1.1 样品采集

WHBE 兔近交第五代 (F_5) 30 只、近交第六代 (F_6) 30 只和近交第七代 (F_7) 20 只都由浙江中医药大学实验兔生产基地提供。采集耳廓皮肤样品, -20°C 保存。

1.2 基因组 DNA 提取

取 F_5 、 F_6 和 F_7 代 WHBE 兔耳廓皮肤组织, 分别在 1.5 mL 离心管中用消毒后的剪刀剪成小碎块后, 参照 Sambrook et al (2002) 的方法用酚氯仿进行 DNA 抽提。

1.3 微卫星座位的选择

根据文献资料选择 21 个在兔科动物中表现多态的微卫星座位用于本实验(Chantry-Darmon et al, 2005; Mougél et al, 1997; Rico et al, 1994; Surridge et al 1997), 引物由上海生工合成。微卫星座位的序列号、引物序列、特征重复序列和退火温度见表 1。

1.4 微卫星标记的 PCR 扩增

20.0 μL PCR 反应体系包含: DNA 模板 10~50 ng, $1\times$ buffer, MgCl_2 1.75 mmol/L 或 2.25 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L, 引物 0.2 mmol/L, Taq 酶 0.6 U。PCR 反应条件: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 适宜温度退火 30 s (退火温度因不同座位而异, 表 1), 72°C 延伸 30 s, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。

1.5 等位基因分离

扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 若有目的条带, 则利用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳对 PCR 扩增产物进行等位基因分离, 恒压 250 V, $0.5\times$ TBE 缓冲液中电泳 3~4 h, 经 GelRed 染色, UVP 凝胶成像系统拍照。根据相对分子质量标记 pUC19 DNA/MspI Marker 对等位基因电泳图谱进行分析。

1.6 数据分析

在 Cervus 3.0 遗传分析软件上, 根据 Bostein 的公式, 计算微卫星座位的多态信息含量 (polymorphic information content, PIC); 根据 Chakraborty 的公式, 分别计算单座位非父排除概率 (exclusion probability, PE) 和非父累积排除概率 (cumulative exclusion probability, CPE)。根据

表 1 本实验所用的 21 对微卫星引物序列
Tab. 1 The information of 21 microsatellite primers

座位 Locus	GenBank 序列号 Accession no.	引物序列 Primer sequence (5'-3')	重复序列 Repeat array	退火温度 Annealing temp (°C)
Sat2	M77195	GCTCTCCTTGGCATACTCC GCTTTGGATAGGCCAGATC	(TC) ₁₅ (TG) ₁₀	55
Sat3	J03744	GGAGAGTGAATCAGTGGGTG GAGGAAAGAGAGACAGG	(TC) ₂₂	n/a
Sat4	M33582	GGCCAGTGCCTTACATTTGG TGTTGCAGCGAATTGGGG	(TC) ₁₃ (N) ₅ (TC) ₂ TG(TC) ₇	60
Sat5	X99887	GCTTCTGGCTTCAACCTGAC CTTAGGGTGCAGAATTATAAGAG	(TC) ₂₃ TTT(CT) ₅	60
Sat7	X99888	GTAACCAACCCATGCACACTC GCACAATACCTGGGATGTAG	(TG) ₁₄	60
Sat8	X99889	CAGACCCGGCAGTTGCAGAG GGGAGAGAGGGATGGAGGTATG	(CT) ₁₄ (GT) ₈ TT(GT) ₅	60
Sat12	X99891	CTTGAGTTTTAAATTCGGGC GTTTGGATGCTATCTCAGTCC	(CTAT) ₁₀	55
Sat13	X99892	CAGTTTTGAAGGACACCTGC GCCTCTACCTTTGTGGGG	(GT) ₁₃	55
Sat16	X99890	AATCAGCCTCTATGAATTCCTC AATGCTACATGGTAACCAAGC	(TG) ₁₅	55
Sol03	—	TACCGAGCACCAGATATTAGTTAC GTTACCTGTGTTTTGGAGTTCTTA	(TC) ₁ (T) ₄ (TC) ₆	n/a
Sol28	—	ATTGCGGCCCTGGGAATGAACC TTGGGGGATATCTTCAATTCAGA	(TC) ₂₃ (N) ₃ (TC) ₄	n/a
Sol30	—	CCCGAGCCCCAGATATTGTTACCA TGCAGCACTTCATAGTCTCAGGTC	(TC) ₁₄ A(T) ₄ (TC) ₅	n/a
Sol33	X94683	GAAGGCTCTGAGATCTAGAT GGCCATAGTACTGATCCATGT	(TG) ₅ CG(TG) ₁₈	55
Sol44	X94684	GGCCCTAGTCTGACTCTGATTG GGTGGGGCGGGTCTGAAAC	(GT) ₁₇	60
Sol51	X94685	CTGCATGTAGGTTTGTGTGT AACGGAAGAAGACACTATCTCTG	(GT) ₁₆	n/a
Sol62	X94686	TGCCTTTAGGATTGGTCTATCTCTG GCGGGAGAGGGGAGAGGGGAGAG	(CT) ₁₈	n/a
Sol74	X94687	AATGGCTTAGTGCTAACTAGAC GCTCGGTACCCCTCATGTTTG	(AT) ₅ (GT) ₁₂	n/a
INRACDDV0001	AJ874368	CATTCGCTGTCTCAATCCAA ACATGGGTACATGCCAACTG	(CA) ₁₄	n/a
INRACDDV0003	AJ874369	GATCAGCGAGCGCCTCTC TCCATCTGAATGAGGCACAA	(CT) ₁₄	60
INRACDDV0005	AJ874371	GTGAACCAACGAAAAGGAA TTCCACTGCCACAATTTCTT	(CA) ₁₉	n/a
INRACDDV0007	AJ874373	CTGCTAGCTCTGGGTGGAAG TGTGTGACCTTGTGGCCTTA	(CA) ₁₅	n/a

n/a: 无扩增(no amplification)。

Fisher 的公式: $DP_i = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$, 计算单座位个体识

别率 (discrimination power, DP), 其中, n 表示某座位的基因型数, p_i 表示该座位第 i 个基因型的频率; 根据公式: $CDP = 1 - \prod_{i=1}^m (1 - DP_i)$, 计算累积个体识别率 (cumulative DP), 其中, m 表示微卫星座位数, DP_i 表示第 i 个座位的个体识别率。

用 GENEPOP 软件计算每个微卫星座位的等位基因数 (number of alleles per locus, Na)、观测杂合度 (observed heterozygosity, Ho)。根据公式:

$1 / \sum_{i=1}^n p_i^2$ 计算有效等位基因数 (effective number of alleles, Ne)。

2 结果

2.1 微卫星座位等位基因的分型

用 F_5 、 F_6 和 F_7 代 WHBE 兔 DNA 对 21 对微卫星引物进行筛选, 其中 Sat2、Sat4、Sat5、Sat7、Sat8、Sat12、Sat13、Sat16、Sol33、Sol44、INRACCDDV0003 共 11 对引物在 PCR 扩增中得到了较好的产物, 有清晰的目的条带。再用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳对以上 11 对引物的 PCR 扩增产物进行等位基因分型。

2.2 近交 WHBE 兔在 11 个微卫星座位上的等位基因数和杂合度分析

对 11 个微卫星座位在 F_5 、 F_6 和 F_7 代 WHBE 兔中表现出的多态性 (Na 、 Ne 和 Ho) 进行统计分析, 结果见表 2。 F_5 代 WHBE 兔在每个座位上的 Na 为 3~9 个不等, Ho 为 0~0.750 之间, 11 个座位的 Ne 平均值为 1.81 个, Ho 平均值为 0.381; F_6 代 WHBE 兔在每个座位上的 Na 为 3~8 个不等, Ho 为 0~0.689 之间, 11 个座位的 Ne 平均值为 1.68 个, Ho 平均值为 0.356; F_7 代 WHBE 兔在每个座位上的 Na 为 2~6 个不等, Ho 为 0~0.667 之间, 11 个座位的 Ne 平均值为 1.51 个, Ho 平均值为 0.287。以上结果可以得出, 在 F_5 、 F_6 和 F_7 代 WHBE 兔中, 各座位的平均有效等位基因数和平均杂合度呈下降趋势。

2.3 近交 WHBE 兔在 11 个微卫星座位上的 PIC 、 DP 及 PE 统计

F_5 代在 11 个多态性微卫星座位中, Sat5 座位的 PIC 值最低, 为 0.303; 而 Sat4 座位最高, 达到了 0.817。其中 Sat4、Sat8、Sat13、Sol33 和 INRACCDDV0003 五个座位的 PIC 值均在 0.5 以上, 平均值为 0.524。单个微卫星座位的 DP 在 0.529~0.954 之间, 而 11 个微卫星座位的 CDP 达到 100% (表 3); 利用所选择的微卫星座位进行父权鉴定时, CPE 值在双亲遗传信息均是未知情况下为 0.926, 而当已知双亲中的任一个的遗传信息时, CPE 值达到 0.993 (表 3)。

F_6 代在 11 个多态性微卫星座位中, Sat5 座位的 PIC 值最低, 为 0.339; 而 INRACCDDV0003 座位最高, 达到了 0.715。其中 Sat2、Sat4、Sat7、Sat8、Sol33 和 INRACCDDV0003 六个座位的 PIC 值均在 0.5 以上, 平均值为 0.548。单个微卫星座位的 DP 在 0.578~0.899 之间, 而 11 个微卫星座位的 CDP 达到 100% (表 3); 利用所选择的微卫星座位进行父权鉴定时, CPE 值在双亲遗传信息均是未知情况下为 0.931, 而当已知双亲中的任一个的遗传信息时, CPE 值达到 0.994 (表 3)。

F_7 代在 11 个多态性微卫星座位中, Sat5 座位的 PIC 值最低, 为 0.305; 而 INRACCDDV0003 座位最高, 达到了 0.718。其中 Sat2、Sat4、Sat7、Sat8、Sol33、Sol44 和 INRACCDDV0003 七个座位的 PIC 值均在 0.5 以上, 平均值为 0.498。单个微卫星座位的 DP 在 0.539~0.903 之间, 而 11 个微卫星座位的 CDP 达到 100% (表 3); 利用所选择的微卫星座位进行父权鉴定时, CPE 值在双亲遗传信息均是未知情况下为 0.891, 而当已知双亲中的任一个的遗传信息时, CPE 值达到 0.986 (表 3)。

3 讨论

WHBE 兔是本中心保种培育而建立的一个新实验兔群, WHBE 兔近交系正在培育过程中, 目前已培育到第七代。Chen et al (2005)、Pan et al (2008) 和 Xu et al (2009) 研究发现, WHBE 兔的肠道结构、心血管解剖及功能、血液生化等方面与目前常用的实验兔日本大耳白兔和新西兰兔存在显著差异, WHBE 兔具有特定的生物学特性和特殊的应用价值, 是用于医药研究理想的实验动物。本次研究,

我们选取了 21 个微卫星座位对 WHBE 兔的近交系培育进行遗传监测, 这些微卫星座位分布在不同的染色体上, 并且在以往对其他品系兔科动物的检测中表现出较高的多态性, 能够提供丰富的遗传信息, 充分地反映种群的遗传概貌。从表 3 中可以看出, F₅、F₆ 和 F₇ WHBE 兔在 11 个微卫星座位上的

PIC 平均值分别为 0.5241、0.5478 和 0.4977, 11 个微卫星座位的 *DP* 以及 *CPE* 值都比较高, 且 *CDP* 值均达到 100%。这些结果均表明, 本文所筛选的 11 个微卫星座位能够提供丰富的遗传信息, 是分析 F₅、F₆、F₇ 代 WHBE 兔遗传多样性的理想标记。

从表 2 看出, 在 11 个座位中, 其中 Sol144 座位,

表 2 F₅、F₆ 和 F₇ 代 WHBE 兔在 11 个微卫星座位上的遗传多态性
Tab. 2 Measures of genetic diversity at 11 microsatellite loci in F₅, F₆ and F₇ WHBE rabbits

座位 Locus	遗传多态性 Measures of genetic diversity	F ₅ 代 F ₅ generation	F ₆ 代 F ₆ generation	F ₇ 代 F ₇ generation
Sat2	等位基因数(<i>Na</i>)	5	6	4
	观察杂合度(<i>Ho</i>)	0.375	0.342	0.214
	有效等位基因数(<i>Ne</i>)	1.60	1.52	1.27
Sat4	等位基因数(<i>Na</i>)	9	8	6
	观察杂合度(<i>Ho</i>)	0.424	0.372	0.267
	有效等位基因数(<i>Ne</i>)	1.74	1.59	1.36
Sat5	等位基因数(<i>Na</i>)	3	3	2
	观察杂合度(<i>Ho</i>)	0.364	0.356	0.214
	有效等位基因数(<i>Ne</i>)	1.57	1.55	1.27
Sat7	等位基因数(<i>Na</i>)	5	5	4
	观察杂合度(<i>Ho</i>)	0.394	0.370	0.333
	有效等位基因数(<i>Ne</i>)	1.65	1.59	1.50
Sat8	等位基因数(<i>Na</i>)	5	5	4
	观察杂合度(<i>Ho</i>)	0.469	0.465	0.400
	有效等位基因数(<i>Ne</i>)	1.88	1.87	1.67
Sat12	等位基因数(<i>Na</i>)	4	4	3
	观察杂合度(<i>Ho</i>)	0.467	0.409	0.300
	有效等位基因数(<i>Ne</i>)	1.88	1.69	1.43
Sat13	等位基因数(<i>Na</i>)	4	3	3
	观察杂合度(<i>Ho</i>)	0.485	0.415	0.286
	有效等位基因数(<i>Ne</i>)	1.94	1.71	1.40
Sat16	等位基因数(<i>Na</i>)	4	4	2
	观察杂合度(<i>Ho</i>)	0.370	0.409	0.400
	有效等位基因数(<i>Ne</i>)	1.59	1.69	1.67
Sol33	等位基因数(<i>Na</i>)	4	4	4
	观察杂合度(<i>Ho</i>)	0.091	0.087	0.071
	有效等位基因数(<i>Ne</i>)	1.10	1.10	1.08
Sol44	等位基因数(<i>Na</i>)	3	4	3
	观察杂合度(<i>Ho</i>)	0.00	0.00	0.00
	有效等位基因数(<i>Ne</i>)	1.00	1.00	1.00
INRACCDDV0003	等位基因数(<i>Na</i>)	5	5	5
	观察杂合度(<i>Ho</i>)	0.750	0.689	0.667
	有效等位基因数(<i>Ne</i>)	4.00	3.21	3.00
平均杂合度 Mean value of <i>Ho</i>		0.381	0.356	0.287
平均有效等位基因数 Mean value of <i>Ne</i>		1.81	1.68	1.51

表 3 F₅、F₆和 F₇代 WHBE 兔在 11 个微卫星座位的多态信息含量、个体识别率以及非父排除概率
 Tab. 3 PIC, DP, PE-1 and PE-2 at 11 microsatellite loci in F₅, F₆ and F₇ WHBE rabbits

座位 Locus	PIC, DP, PE	F ₅ 代 F ₅ generation	F ₆ 代 F ₆ generation	F ₇ 代 F ₇ generation
Sat2	多态信息含量 (PIC)	0.455	0.653	0.615
	个体识别率 (DP)	0.705	0.863	0.839
	非父排除概率 1 (PE-1)	0.128	0.288	0.246
	非父排除概率 2 (PE-2)	0.283	0.461	0.418
Sat4	多态信息含量 (PIC)	0.817	0.696	0.582
	个体识别率 (DP)	0.954	0.890	0.820
	非父排除概率 1 (PE-1)	0.507	0.338	0.222
	非父排除概率 2 (PE-2)	0.676	0.514	0.408
Sat5	多态信息含量 (PIC)	0.303	0.339	0.305
	个体识别率 (DP)	0.529	0.578	0.539
	非父排除概率 1 (PE-1)	0.060	0.078	0.070
	非父排除概率 2 (PE-2)	0.162	0.183	0.152
Sat7	多态信息含量 (PIC)	0.459	0.512	0.521
	个体识别率 (DP)	0.708	0.753	0.763
	非父排除概率 1 (PE-1)	0.144	0.184	0.183
	非父排除概率 2 (PE-2)	0.273	0.311	0.322
Sat8	多态信息含量 (PIC)	0.567	0.599	0.576
	个体识别率 (DP)	0.805	0.829	0.809
	非父排除概率 1 (PE-1)	0.209	0.235	0.214
	非父排除概率 2 (PE-2)	0.381	0.411	0.378
Sat12	多态信息含量 (PIC)	0.466	0.490	0.406
	个体识别率 (DP)	0.716	0.738	0.656
	非父排除概率 1 (PE-1)	0.135	0.156	0.118
	非父排除概率 2 (PE-2)	0.287	0.305	0.225
Sat13	多态信息含量 (PIC)	0.512	0.435	0.325
	个体识别率 (DP)	0.755	0.684	0.555
	非父排除概率 1 (PE-1)	0.179	0.143	0.064
	非父排除概率 2 (PE-2)	0.313	0.241	0.182
Sat16	多态信息含量 (PIC)	0.389	0.479	0.365
	个体识别率 (DP)	0.633	0.728	0.614
	非父排除概率 1 (PE-1)	0.091	0.144	0.115
	非父排除概率 2 (PE-2)	0.230	0.300	0.182
Sol33	多态信息含量 (PIC)	0.577	0.645	0.510
	个体识别率 (DP)	0.806	0.856	0.751
	非父排除概率 1 (PE-1)	0.223	0.273	0.183
	非父排除概率 2 (PE-2)	0.373	0.443	0.309
Sol44	多态信息含量 (PIC)	0.499	0.464	0.551
	个体识别率 (DP)	0.743	0.714	0.786
	非父排除概率 1 (PE-1)	0.166	0.134	0.194
	非父排除概率 2 (PE-2)	0.296	0.288	0.339
INRACCDDV0003	多态信息含量 (PIC)	0.720	0.715	0.718
	个体识别率 (DP)	0.903	0.899	0.903
	非父排除概率 1 (PE-1)	0.356	0.348	0.355
	非父排除概率 2 (PE-2)	0.534	0.526	0.535
	平均多态信息含量 (PIC)	0.524	0.548	0.498
	累积个体识别率 (CDP)	1.00	1.00	1.00
	累积非父排除概率 1 (CPE-1)	0.926	0.931	0.891
	累积非父排除概率 2 (CPE-2)	0.993	0.994	0.986

F₅、F₆、F₇代 WHBE 兔的杂合度均为 0，为纯合座位；在 Sat2、Sat4、Sat5、Sat7、Sat8、Sat12、Sat13、Sol33 和 INRACCDDV0003 9 个座位上，F₅、F₆和 F₇代的单座位杂合度和有效等位基因数均呈下降

趋势。F₅代 11 个座位的平均有效等位基因数为 1.8132 个，平均杂合度为 0.3808；F₆代的平均有效等位基因数为 1.6839 个，平均杂合度为 0.3557；F₇代的平均有效等位基因数为 1.5135 个，平均杂合度

为 0.2866。这说明在近交系培育过程中, 从 F₅ 代到 F₇ 代, WHBE 兔的平均有效等位基因数和平均杂合度都呈下降趋势, 表明随着近交代数的增加基因纯合度越来越高, 这与 Cai et al (2009) 利用 RAPD 技术对 WHBE 兔近交系的遗传分析结果相一致。随着 WHBE 兔近交培育代数的增加, 遗传相似度呈

上升趋势。

这 11 对微卫星引物能够反映 WHBE 兔近交系培育过程中遗传结构的变化, 也能反映出 WHBE 兔的遗传特征。微卫星 DNA 标记技术可以作为培育 WHBE 兔近交系的一种新的辅助方法, 以加快近交系培育的速度。

参考文献:

- Cai YQ, Tu J, Yu J, Xiao H, Pan YM, Lu T, Chen ML. 2009. RAPD analysis used in monitoring the genetic profile of WHBE rabbit in inbred cultivation [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, **17**(5): 326-329. [蔡月琴, 屠珏, 余佳, 肖慧, 潘永明, 鲁挺, 陈民利. 2009. RAPD 标记技术在 WHBE 兔近交系培育中的遗传分析. 中国实验动物学报, **17**(5): 326-329.]
- Chantry-Darmon C, Urien C, Hayes H, Bertaud M, Chadi-Taourit S, Chardon P, Vaiman D, Rogel-Gaillard C. 2005. Construction of a cytogenetically anchored microsatellite map in rabbit [J]. *Mamm Genom*, **16**(6): 442-459.
- Chen ML, Zhao WC, Ying HZ, Wang DJ, Xu XP. 2005. RAPD analysis of the genetic specificity of WHBE rabbit [J]. *J Zhejiang Univ: Agric & Life Sci*, **31**(4): 493-498. [陈民利, 赵伟春, 应华忠, 王德军, 徐孝平. 2005. WHBE 兔遗传特异性的 RAPD 分析. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, **31**(4): 493-498.]
- Han CM, Zhang JB, Gao QH, Li HJ. 2008. Genetic polymorphism identified by microsatellite markers in Jirong rabbit [J]. *Chn J Vet Sci*, **28**(4): 438-441. [韩春梅, 张嘉保, 高庆华, 李宏建. 2008. 吉戎兔微卫星 DNA 中国兽医学报, **28**(4): 438-441.]
- Korstanje R, Gillissen GF, Versteeg SA, van Oost BA, Bosma AA, Rogel-Gaillard C, van Zutphen LF, van Lith HA. 2003. Mapping of rabbit microsatellite markers using chromosome-specific libraries [J]. *J Hered*, **94**(2): 161-169.
- Li RS, Dong G, Wu XY, Wang P, Wang XH, Chen ZW. 2006. Microsatellite DNA monitoring in inbred cultivation of outbred rats [J]. *Hereditas*, **28**(7): 821-824. [李瑞生, 董罡, 吴晓燕, 王鹏, 王晓辉, 陈振文. 2006. 微卫星 DNA 监控大鼠近交系的培育. 遗传, **28**(7): 821-824.]
- Liu YH, Ke XF, Ma WF, Guo HG, Sha XY. 2008. Duplex-PCR analysis of the microsatellite structure in Mongolian Gerbil [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, **16**(4): 282-288. [刘月环, 柯贤福, 马伟峰, 郭红刚, 萨晓雯. 2008. 利用双重 PCR 技术研究长爪沙鼠的微卫星结构. 中国实验动物学报, **16**(4): 282-288.]
- Mougel F, Mounolou JC, Monnerot M. 1997. Nine polymorphic microsatellite loci in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus* [J]. *Anim Genet*, **28**: 58-71.
- Niu YD, Liang SL. 2008. Microsatellite variation within three populations of inbred C57BL/6J strain [J]. *Zool Res*, **29**(6): 599-602. [牛屹东, 梁蜀龙. 2008. 三个近交系 C57BL/6J 小鼠群体微卫星遗传变异分析. 动物学研究, **29**(6): 599-602.]
- Pan YM, Zhang LZ, Chen ML, Xu JQ, Chen L, Peng DG, Wang DJ, Ying HZ. 2008. Study on irritable bowel syndrome model of spleen deficiency type in WHBE rabbits [J]. *Lab Anim Comp Med*, **28**(5): 313-317. [潘永明, 张利棕, 陈民利, 徐剑钦, 陈亮, 彭定国, 王德军, 应华忠. 2008. WHBE 兔脾虚型肠易激综合征模型的研究. 实验动物与比较医学, **28**(5): 313-317.]
- Rico C, Rico I, Webb N, Smith S, Bell D, Hewitt G. 1994. Four polymorphic microsatellite loci for the European wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus* [J]. *Anim Genet*, **25**(5): 367.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 2002. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 3rd ed. Beijing: Science Press, 463-483. [萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T. 2002. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 463-483.]
- Shang HT, Wei H, Yue BF, Xu P. 2008. Microsatellite analysis in Wistar and Spague-Darley outbred rats [J]. *J Mol Cell Biol*, **41**(1): 28-33. [商海涛, 魏泓, 岳秉飞, 徐平. 2008. 应用微卫星 DNA 标记对 Wistar 和 SD 大鼠封闭群的遗传学研究. 分子细胞生物学报, **41**(1): 28-33.]
- Surridge AK, Bell DJ, Rico C, Hewitt GM. 1997. Polymorphic microsatellite loci in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) are also amplified in other lagomorph species [J]. *Anim Genet*, **28**(4): 302-305.
- Xie JY, Shao WJ, Hu JH, Gao C. 2007. Microsatellite markers for analysis the genetic polymorphism of inbred mice [J]. *Chn J Comp Med*, **17**(9): 511-515. [谢建云, 邵伟娟, 胡建华, 高诚. 2007. 微卫星技术对近交系小鼠遗传质量的分析. 中国比较医学杂志, **17**(9): 511-515.]
- Xie XP, Chen YF, Sun SK, Wu XS, Wang LH, Zheng ZZ. 2008. Determination of genetic characteristics of Fujian yellow rabbit population using microsatellite markers [J]. *Fujian J Agri Sci*, **23**(3): 239-243. [谢喜平, 陈岩峰, 孙世坤, 吴信生, 王丽辉, 郑真珠. 2008. 福建黄兔微卫星标记的遗传多样性分析. 福建农业学报, **23**(3): 239-243.]
- Xu JQ, Chen ML, Zhang LZ, Chen L, Pan YM, Xu XP. 2009. Weight of main organs and organ coefficient in WHBE rabbits [J]. *Lab Anim Comp Med*, **29**(4): 266-268. [徐剑钦, 陈民利, 张利棕, 陈亮, 潘永明, 徐孝平. 2009. WHBE 兔主要脏器重量及脏器系数的测定. 实验动物与比较医学, **29**(4): 266-268.]
- Yin BF, Wei WH, Zhang YM, Wang JL, Cao YF. 2003. Application of microsatellite technology in reproductive behavior of Plateau Pika, *Ochotona curzoniae* [J]. *Zool Res*, **24**(6): 401-406. [殷宝法, 魏万红, 张堰铭, 王金龙, 曹伊凡. 2003. 微卫星技术在高原鼠兔繁殖行为研究中的应用. 动物学研究, **24**(6): 401-406.]
- Zhu YF, Ren WZ, Zhang JB, Wang YZ, Guo XM, Zhou LB. 2004. Construction of the speedy method to analyse the population genetic variation of domestic rabbit [J]. *Chn J Comp Med*, **14**(6): 363-367. [朱玉峰, 任文陟, 张嘉保, 王元占, 郭雄明, 周立波. 2004. 家兔微卫星标记群体遗传变异快速分析方法的建立. 中国比较医学杂志, **14**(6): 363-367.]