

文章编号:1000-0615(2007)03-0280-07

微卫星标记在 RR-B 系剑尾鱼遗传监测中的应用

刘宇飞^{1,2}, 白俊杰¹, 李凯彬¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所,
中国水产科学研究院热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室, 广东 广州 510380;
2. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090)

摘要:采用 49 对微卫星引物对 RR-B 系剑尾鱼和红眼红体的非选育系剑尾鱼进行 PCR 扩增, 有 46 个微卫星座位能获得稳定的扩增产物, 7 个微卫星座位能区分 RR-B 系与非选育群体剑尾鱼。7 个微卫星座位在选育系剑尾鱼为单态纯合, 而在非选育群体具有多态性, 座位 Msa014 鉴定 RR-B 系剑尾鱼排除概率最高, 为 98.75%, 座位 Msd003 排除概率最低达到了 87.50%, 其余 5 个座位排除概率介于两者之间。为方便今后的遗传监测, 对 RR-B 系剑尾鱼样品的 7 个微卫星座位进行了测序, 确定了其大小和具体的微卫星结构。本实验建立了 RR-B 系剑尾鱼分子检测方法, 为实验动物剑尾鱼的遗传监测奠定了基础。

关键词:剑尾鱼; 近交系; 微卫星标记; 遗传监测

中图分类号:S 917 **文献标识码:**A

Application of microsatellite markers in genetic monitoring of RR-B strain *Xiphophorus helleri*

LIU Yu-fei^{1,2}, BAI Jun-jie¹, LI Kai-bin¹

(1. Key Lab of Tropical & Subtropical Fish Breeding & Cultivation, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;
2. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: The RR-B swordtail fish strain and wild swordtail fish were checked by microsatellite DNA PCR in 49 microsatellite loci. The results show that it had stable affection in 46 microsatellite loci. The RR-B swordtail fish strain were distinguished from wild swordtail fish in 7 microsatellite loci. Both 7 microsatellite loci displayed no polymorphism in inbred strain, and polymorphism among the wild swordtail fish. The highest exclusion probability of Msa014 locus is 98.75%, the lowest exclusion probability of Msd 003 locus is 87.50%, and the exclusion probability of the other loci between these two numbers. In order to establish method for heredity monitoring of RR-B swordtail fish strain, the alleles of RR-B swordtail fish were sequenced, the length and structure of the alleles were determined. The method established was found the base for genetic monitor of laboratory animal swordtail fish.

Key words: *Xiphophorus helleri*; inbred strain; microsatellite marker; genetic monitoring

收稿日期: 2006-10-08

资助项目: 广东省科技计划项目(2005B20301014); 国家科技基础条件平台工作项目(2005DK21103)

作者简介: 刘宇飞(1982-), 男, 河南洛阳人, 硕士研究生, 从事水产动物遗传育种研究。Tel: 020-81616127, E-mail: liuyufei001@sina.com

通讯作者: 白俊杰, Tel: 020-81616129, E-mail: baijj2005@21cn.com

剑尾鱼 (*Xiphophorus helleri*) 为 鱈形目、花 鱈科、剑尾鱼属的小型热带淡水鱼类,具有繁殖周期短、繁殖力强和易饲养等特点。20 世纪 80 年代起,中国水产科学研究院珠江水产研究所开始对剑尾鱼进行实验动物化培育,其中 RR-B 系(红眼红体)已通过全国水产原种和良种审定委员会审定,可作为水生实验动物推广应用。目前 RR-B 系已近交繁殖达 27 代,在遗传学研究、水环境污染监测、细菌性疾病研究方面初步显示出较好的应用前景^[1-3]。

无品系间遗传污染是近交系实验动物的基本要求,是保证实验结果准确可靠的必要因素,因此有必要对近交系实验动物进行长期定时的遗传监测^[4]。目前国家标准推荐的监测方法主要是生化标记分析法。生化标记分析法应用广泛,相对其它方法有自身的优势,但此方法实质是检测同工酶或异构蛋白的变化来推测相应的基因变化,因此存在着一些缺点,例如精确度不高、检测座位及反映遗传概貌有限等不足,建立新的遗传检测方法势在必行。

微卫星序列(microsatellite DNA)又称为简单序列重复(simple sequence repeats, SSR)或简单序列(simple sequences),是指以 1~6 个核苷酸为基本重复单位的串联重复序列,其长度大多在 100 bp 以内。微卫星作为多态 DNA 标记在群体进化研究、核基因研究、遗传连锁分析和进行基因组作图及基因定位等方面已得到广泛应用^[5]。微卫星也是群体遗传结构和遗传纯度分析的有效手段,在近交系的遗传监测中有着广泛应用。谢建云等^[6]应用 25 个微卫星座位鉴别不同品系的近交系小鼠。李瑞生等^[7]用微卫星 DNA 对 8 个近交系大鼠进行了分析,结果能明显地区分这 8 个品系。陈振文等^[8]用微卫星 DNA 对我国 BALB/c 系鼠 11 个群体的遗传质量进行了分析,验证了已建立的微卫星标记遗传检测方法的可靠性。本文试图通过微卫星标记建立实验动物 RR-B 系剑尾鱼的鉴定方法,为建立实验动物分子水平的遗传监测标准奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 实验鱼

RR-B 系剑尾鱼 36 尾(雌雄各 18 尾),取自本

所水生实验动物培育基地。红眼红体的非选育系剑尾鱼(简称非选育群体)80 尾,分别来自广东的广州、佛山和南海观赏鱼市场,其中广州 30 尾,佛山 30 尾,南海 20 尾。

1.2 剑尾鱼基因组 DNA 样品的制备

取剑尾鱼背部鳍条 10 mg 左右,参考《分子克隆试验指南》^[9]方法提取。电泳检测 DNA 的完整性和纯度并估计其浓度,4 ℃冰箱保存备用。

1.3 微卫星引物设计合成、PCR 扩增及电泳

参考文献^[10]及剑尾鱼中心网站数据(www.xiphophorus.org/microsats/microsat.htm),选取有多态性的微卫星座位共 49 个,引物送上海英骏公司合成,引物序列和扩增参数详见表 1。PCR 反应总体积为 10 μL ,含有 10 \times Buffer 1.0 μL , MgCl_2 (25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.3 ~ 0.6 μL , dNTPs (10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.2 μL ,上、下游引物(20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)各 0.5 μL , Taq 酶 0.5 U,模板 DNA 50 ng 左右。PCR 反应程序为 94 ℃预变性 3 min 后进入循环体系 94 ℃变性 30 s,各引物退火温度 50 ~ 59 ℃,退火时间 30 s,72 ℃延伸 45 s,25 个循环,最后 72 ℃延伸 7 min。取 3 μL PCR 扩增产物进行 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳后进行硝酸银染色,染色方法参照文献^[11]。

1.4 微卫星座位初步筛选

随机选取 RR-B 系剑尾鱼 4 尾、非选育群体 8 尾(广州 3 尾,佛山 3 尾,南海 2 尾),进行温度梯度 PCR,同时调节镁离子浓度(镁离子最终浓度从 0.5 ~ 1.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,每次间隔 0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$),使之达到最佳扩增效果。挑选能稳定扩增,并且非选育群体中出现 RR-B 系基因型的频率小于 30% 的微卫星座位。

1.5 数据统计与分析

电泳凝胶染色后用扫描仪扫描存图,用 Gel-pro analyzer 4.5 软件分析条带大小。根据凝胶上 DNA 泳动距离进行判断,如果电泳条带表现为 1 条,且泳动距离一致,则认为所检测的样本在该基因座是纯合的;如果为两条带则认为此样本在该座位为杂合。不同个体间,如果泳动距离一致则为单态,若条带泳动距离不一致,则该座位具多态性,根据泳动距离定义微卫星片段从大到小为 a、b、c、...

表1 剑尾鱼微卫星座位的引物序列及扩增参数
Tab.1 Microsatellite primers in *Xiphophorus helleri*

| 座位 locus | 引物序列(5' - 3') primer sequences | 退火 温度(°C) ann. temp | Mg ²⁺ (mmol·L ⁻¹) |
|---------------|---|------------------------------|---|
| Msa002 | F:TCACGATGTCTTTCTCTATCTGCTG R: TGTTGGTTCAGACTCATCTCATGAG | 50 | 1 |
| Msa005 | F:TCATTGGCCTTCAGTGTATGTGT R: ACGGCTTCCACAGCGTGT | 57 | 1.5 |
| Msa006 * | F:AGGAGCACTGCTTGTGCCA R: CATGAGCATCAATCTGATTCAGACT | 53 | 1 |
| <u>Msa007</u> | F:CGCAAAGGAAGTTTGTTC R: CAGCAGGTAAACTTATTCCTGC | 53 | 0.8 |
| <u>Msa008</u> | F:AACCTGCAGTGTCTGAGCACA R: AACCTGCAGTGTCTGAGCACA | 55 | 0.8 |
| <u>Msa010</u> | F:TTCTTGTGCTATATTTCTGTTTCATGG R: CTTGGAGCTAGTGAAGGCTGATC | 58 | 0.8 |
| <u>Msa012</u> | F:GCTCCATTGAGAACTAAGGTGTAA R: CACCATGGAGCAGTGCTCCT | 55 | 1 |
| <u>Msa014</u> | F:TGAGGAGGAATCTGTGCTAGG R: ATACCCCTGTCTCCACTCACGA | 55 | 1.5 |
| <u>Msa017</u> | F:ACTGCCCTGCACGTGAACA R: AGTCATCCAGCGATTGGACG | 53 | 1 |
| Msa020 | F:GTAGCTTCTTTATGAGCAGCAGGA R: GGAGTCTTGGCTTCGTACGA | 58 | 1 |
| Msa030 | F:TGTCCTCTATATGATGCAATATACAAGCTCAC R: CACTCTGAATTTTACTGAGTTTCGT | 59 | 1 |
| Msa032 | F:CCTCCGCCGACCAGC R: CGGATCCCCGTGATCATC | 55 | 1 |
| <u>Msa033</u> | F:AATTCACAAAGACCAGACCTTGG R: TCCTCGTCCGCCACA | 55 | 1.5 |
| <u>Msa034</u> | F:TTAACTGGTATTCATGCTGCCAA R: GCAAAGTAGGTGGGATCTGCA | 55 | 1 |
| Msa040 | F:ACCCTGAACGCTCCGTCA R: TGTTCTGTGGAGATCACAGTT | 55 | 1.5 |
| <u>Msa044</u> | F:CAGCTTACAGAGCGTTACTG R: GCCTTCGGTGTGAGACATGA | 55 | 1 |
| <u>Msa067</u> | F:AAAAGTATTACACCCGAGTTACCA R: CACAAGCATCCAGACGTTTCGT | 55 | 1.5 |
| <u>Msa089</u> | F:CCCTGCTGCTCGTTCAAAAT R: TCCCCTTTAAGTGACACGGACT | 55 | 1 |
| <u>Msa095</u> | F:GCTCAGGAAGGAAGAAAAGAGGA R: CAGAAGCTCCGCTGCTC | 58 | 1 |
| <u>Msa100</u> | F:GGTGGAGGATGTAAGGACCG R: CGCAAGCATTTTTTGTGCTTATA | 57 | 1 |
| <u>Msa102</u> | F:ACCTGCTGCACGTTGAGCTA R: CCATGTGGAAGTAAATGAACACT | 58 | 1.5 |
| <u>Msa115</u> | F:AGCAGTGAGTAATGGATGGGA R: GTGCACAGCAAAATCAATGGA | 56 | 1.5 |
| <u>Msb004</u> | F:CTCTGGCTCAATCTGCTGGAG R: TGTGTTTCTGGCTGCATTGTT | 53 | 1 |
| <u>Msb007</u> | F:GCTACCTCTGGGTGATTGTGG R: GCCGTAAAGAGTTTGTGATTCTCC | 57 | 1 |
| <u>Msb008</u> | F:CACAATAGCAATGTTTCTGCAATG R: TTGTAGATTTAATACTTATGTCTTTGCGG | 58 | 1.5 |
| Msb023 | F:CTGCTGTCTCCATTCCTGAAGG R: GCGAGCTGAGGCAGAAGATC | 52 | 1.5 |
| <u>Msb025</u> | F:CACAAACCTTACCCCAAATGAAAC R: TCCATCGTTGAAAGGTGAACC | 50 | 1 |
| Msb028 | F:CCAGAGGTACATGTCGCTCATC R: TGGAATGGAGAAATGACATGGAG | 55 | 1 |
| Msb030 | F:TGTTAGCTGTGAGGGCAGAAAC R: GGACATGCAGAGGCCAAAGAG | 55 | 1.5 |
| Msb031 * | F:AAGCCGAAGCTGACACTGA R: TCGCTCTGGACTGTGACCAC | 52 | 1.5 |
| <u>Msb032</u> | F:GGAGCAGTGTGAGTAAAAATAGG R: TGATCGCACCCGGATGAGA | 55 | 1.5 |
| <u>Msb040</u> | F:CTGCATGTAAAATCCAGCAGTTC R: CTGAAACAGAGCAGAAGTCAGCA | 55 | 1.5 |
| Msb043 | F:TCGTTTAAAGAATCGTTTCAAAGTTC R: TGAATGAAGAATGTTGAGCATCTGT | 51 | 1.5 |
| <u>Msb058</u> | F:TGACCGCCGACAACCTGC R: TCAAACGGAAAGAAGCACCG | 52 | 1.5 |
| Msb059 * | F:ACTTTTGTATCTTTATGTGTTTGAATAA R: GACTCACACAGTGTCTGCATAGT | 57 | 1.5 |
| <u>Msb063</u> | F:GCAGTTTGTGTGCATCCAG R: CAGTTTGCACCCAGGACCTTC | 55 | 1 |
| <u>Msc014</u> | F:GTGTTTCTTTAGCTGTAAGCCATA R: CAGAGCTGCTAGCTCTTGAATAAGC | 55 | 1 |
| <u>Msc016</u> | F:GGTCTGATTTAATTCAGCCTGAGA R: GCCCACCCTAAGACAGGCTT | 55 | 1 |
| <u>Msc036</u> | F:GTTTGGTAATTGCCGTGACATC R: CAGGCGCCGATGACAT | 55 | 0.75 |
| <u>Msc040</u> | F:AGCACGTGGCACACTTTGC R: TCAGCCCTATTCTGCCAAG | 59 | 1 |
| <u>Msc044</u> | F:TGTAACTTTTTGGCAAACATACAAATG R: AGCATGATGCTTACCAACACCTT | 55 | 1 |
| <u>Msc048</u> | F:TGGTCCATTATTCATTGACTTTAATCA R: TCCTCACTTCAACACATGAATGC | 55 | 1 |
| <u>Msd003</u> | F:GCAAAGGGTAAGTAATACATGGACA R: GGTCAGCTAATGAAACACAGGACTC | 55 | 1 |
| <u>Msd022</u> | F:TCCTTTTGCATCAAGTCTTCCA R: PGCAGTATTTAAAGTATTTAGGCCAA | 55 | 1 |
| <u>Msd032</u> | F:GTCCTGTCTGTGGAGGGA R: GGTGCTCTGATGGATGAGTAGACA | 55 | 0.8 |
| <u>Msd034</u> | F:AGCAAATATCTGAGAAGAGGACTGGA R: ACTTTAAGGAAGAAGGAGCCAAACT | 55 | 1 |
| <u>Msd050</u> | F:CACGTGCTGGAGGACAAGG R: GAGAAGTTAGGGATTATATAGGAGAAACAAT | 59 | 1 |
| <u>Msd051</u> | F:GCATCCCCACAGTATAATTTCTGCT R: CACGTGGTTTGAAAATGTCGAA | 55 | 1 |
| <u>Msd060</u> | F:GATCTCAGTTTAAACCACAACAGGGT R: CCCTGTGTTTCTGCTTGG | 55 | 1 |

注:带*的座位没能扩增出结果,有下划线的座位为多态

Notes: * means no result, underline means polymorphism

在单个座位上,RR-B 系剑尾鱼的特异等位基因型在非选育群体中的分布频率,计算公式如下:分布频率(C_x)=非选育群体中出现 RR-B 系特异基因型个体数/鉴定非选育群体总个体数,用单个座位鉴定 RR-B 系剑尾鱼的排除概率:排除概率(E_x)=1- C_x

联合多个座位的排除概率,参照 Jamieson 和 Taylor^[12]计算排除概率的算法: $E = 1 - (1 - E_1)(1 - E_2) \cdots (1 - E_x)$

用 Pop-gene 进行数据处理,计算非选育群体各座位的杂合度,各座位的多态信息含量。参照 Botstein 等^[13]的方法计算多态信息含量:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2$$

其中, P_i, P_j 分别是第 i 和第 j 个等位基因在群体中的频率。

1.6 RR-B 系特异基因型的测序分析

RR-B 系剑尾鱼在微卫星座位 Msa012, Msa014, Msa033, Msb025, Msc036, Msd003, Msd051

上 PCR 产物经 PCR Clean up Kit 纯化后,在 ABI PRISM377 全自动荧光测序仪上测序, DNA 分析软件 vector NTI suite8.0 分析测序结果。

2 结果

2.1 微卫星座位初步筛选及 PCR 扩增结果

用 49 对引物对 12 个体的基因组进行初步筛选,有 11 个座位呈单态,35 个座位有多态性,3 个座位扩增不出条带,详细信息见表 1,部分结果见图 1。35 个多态性座位共找到等位基因 114 个,平均每个座位等位基因数为 3.25 个,部分结果见图 2。

2.2 RR-B 系剑尾鱼与非选育群体的鉴定

从 35 个座位中挑选非选育群体中出现 RR-B 系剑尾鱼特有基因型频率小于 30% 的微卫星座位。初步筛选到 7 个座位,对 116 个样品进行 PCR 扩增,7 个座位在 RR-B 系剑尾鱼都为单态,非选育群体都为多态,部分结果见图 2。计算 7 个座位鉴定 RR-B 系剑尾鱼的排除概率,结果见表 2。

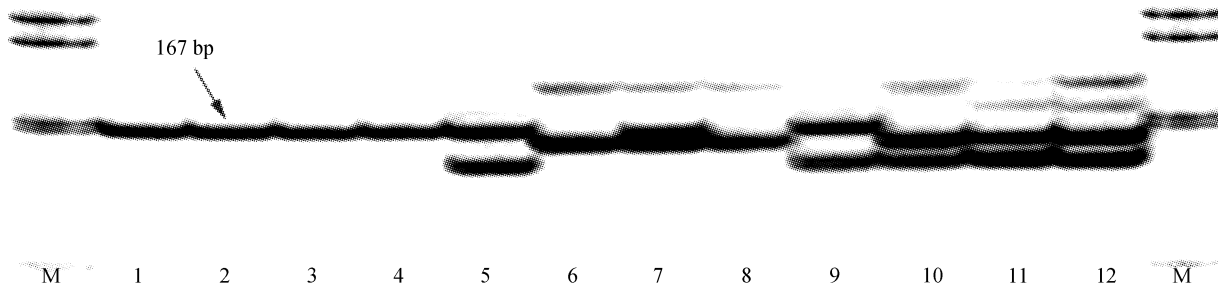


图 1 Msa012 座位的检测结果

Fig.1 Locus Msa012 amplified in RR-B and wild swordtail fish

1~4 为 RR-B 近交系;5~7 为广州群体;8~10 为佛山群体;11~12 为南海群体;M 为北京鼎国 ssr markeII

1-4. RR-B;5-7. wild swordtail fish in Guangzhou;8-10. wild swordtail fish in Foshan;11-12. wild swordtail fish in Nanhai; M is ssr marker II in Dingguo

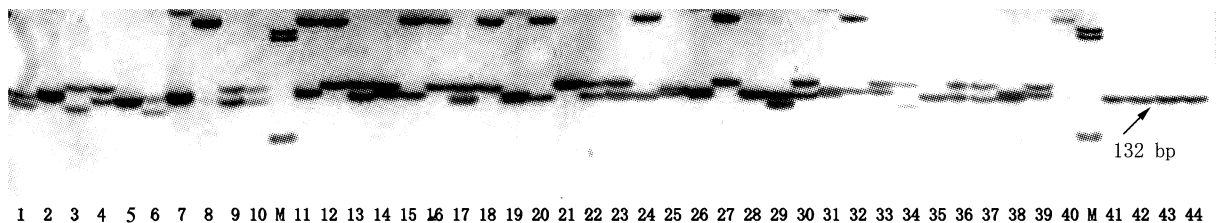


图 2 Msb025 座位的检测结果

Fig.2 Locus Msb025 amplified in RR-B and wild swordtail fish

1~10 为广州群体;11~30 为佛山群体;31~40 为南海群体;41~44 为部分 RR-B 系个体;M 为 v-gene 100 bp ladder DNA marker

1-10. wild swordtail fish in Guangzhou;11-30. wild swordtail fish in Foshan;31-40. wild swordtail fish in Nanhai;41-44. RR-B;M is 100 bp ladder DNA marker in v-gene

2.4 非选育群体的遗传多样性分析

对广州、佛山、南海 3 个地区的非选育群体的 7 个座位进行遗传多样性分析,运用 Pop-gene 计算各遗传参数。7 个座位共获得 25 个等位基因,不同的引物获得的等位基因数为 3~5 个不等。多态信息含量最高的座位 Msd003 为 0.694 3,多态信息含量最低的座位 Msa014 为 0.295 4,其余各座位 P 值也都在 0.5 以上。期望杂合度最高的座位 Msd003 为 0.725 8,期望杂合度最低的座位 Msa014 为 0.344 1。期望杂合度平均值为 0.617 7,表现了较好的遗传多样性。各座位多态信息含量,观测杂合度,期望杂合度见表 3。

表 3 非选育群体的遗传多样性

Tab.3 Genetic diversity of wild swordtail fish

| 座位 locus | 观测杂合度 H_o | 期望杂合度 H_e | 多态信息含量 PIC value |
|-------------|----------------|----------------|-----------------------|
| Msa012 | 0.5750 | 0.6135 | 0.5965 |
| Msa014 | 0.3750 | 0.3441 | 0.2954 |
| Msa033 | 0.5500 | 0.6650 | 0.6815 |
| Msb025 | 0.6750 | 0.7006 | 0.6864 |
| Msc036 | 0.5125 | 0.5592 | 0.5268 |
| Msd003 | 0.6875 | 0.7258 | 0.6943 |
| Msd051 | 0.6375 | 0.7157 | 0.6922 |

3 讨论

在现有的遗传监测方法中,外部形态学标记、细胞遗传学标记、免疫遗传学标记和生物化学标记是对性状或者遗传物质载体进行的研究,这些标记易受外界环境因素影响,缺乏遗传稳定性,有些方法,如染色体分带技术和免疫遗传学标记操作比较复杂,给近交系实验动物遗传监测造成诸多不便^[14-16]。利用微卫星 DNA 进行遗传监测,是以遗传物质 DNA 为监测对象,结果较传统方法更稳定和准确,已渐渐成为近交系动物遗传监测的主要方法。微卫星 DNA 具有高度的多态性,而且有丰富的可供个体识别的微卫星基因座^[17-18],近交系实验动物中微卫星的长度变化的发生率很低,而在不同近交系之间微卫星长度会有差异^[19],本实验最后筛到的 7 个座位,在 RR-B 系剑尾鱼均为单态,非选育群体呈现多态,可作为 RR-B 系剑尾鱼的特异性识别标志。根据这 7 个座位对 RR-B 系剑尾鱼的检测结果,推算出 RR-B 系剑尾鱼的遗传纯度达 100%,这与李霞等^[20]在 2002 年用 RAPD 方法、李凯彬等^[21]用同工酶方法鉴定出结果基本一致,近交程度已经达到很高

的水平。在这 7 个座位,RR-B 系剑尾鱼的特异基因型在非选育群体分布频率很低,在 1.25%~13.75%之间,这些座位可以用来鉴定 RR-B 系剑尾鱼。用一般排除法,单座位鉴定 RR-B 系剑尾鱼排除概率最高的是座位 Msa014,为 98.75%,最低的是座位 Msd003,为 86.25%。以两个排除概率最低的座位 Msb025 为 87.5%,Msd003 为 86.25%联合使用为例,联合使用排除概率可达到 98.45%,鉴定准确性比原单座位检测提高了 11%。为了能在以后检测工作中更好地应用这 7 个微卫星座位,我们还对 RR-B 系剑尾鱼 7 个座位的 PCR 产物进行了测序。

微卫星座位的多态性水平可用多态信息含量值(PIC)衡量。一般情况下,当 $PIC > 0.5$ 时基因座为高度多态基因座, $0.25 < PIC < 0.5$ 为中度多态基因座,当 $PIC < 0.25$ 时为低度多态基因座^[22]。用 7 个微卫星座位对非选育剑尾鱼群体进行分析,除 Msa014 座位为中度多态座位, PIC 值为 0.295 4,其余 PIC 值都大于 0.5,均为高度多态基因座,能够提供丰富的遗传信息,可作为遗传监测分析的有效工具。杂合度又称基因多样性,反映群体在多个基因座上的遗传变异,它是度量群体遗传变异的一个最适参数^[23]。本研究计算了非选育群体的基因观测杂合度、期望杂合度,7 个座位非选育群体期望杂合度范围在 0.344 1~0.725 8 之间,平均值为 0.617 7,说明其群体遗传多样性程度处于中等水平。本实验用筛选到的微卫星座位对 RR-B 系剑尾鱼进行遗传监测,初步建立了 RR-B 系剑尾鱼的分子遗传监测方法,也为实验动物剑尾鱼的遗传监测标准的建立提供了基础数据。

参考文献:

- [1] 黄志斌,吴淑勤,石存斌,等.剑尾鱼的若干生物学特性研究[J].中国水产科学,2000,7(3):107-109.
- [2] 潘厚军,吴淑勤,李凯彬,等.剑尾鱼在检测细菌毒力方面的应用[J].水产学报,2000,24(5):467-471.
- [3] Wu S, Huang Z, Yu R, et al. Approach for the application of *Xiphophorus helleri* as experiment animal [C]. Proceeding of the Fourth Asian Fisheries Forum, 1995:101-107.
- [4] 蔡武卫.实验动物的遗传质量控制及意义[J].海峡预防医学杂志,1997,3(3):68-70.
- [5] 叶朗惠.微卫星标记在畜禽遗传育种中的应用[J].

- 畜牧与饲料科学,2005,4(2):65-70.
- [6] 谢建云,邵伟娟,高 诚.近交系小鼠微卫星座位遗传检测方法的建立[J].上海交通大学学报,2002,20(2):100-108.
- [7] 李瑞生,陈振文,宋德光,等.PCR扩增近交系大鼠微卫星点 DNA 多态性的研究[J].遗传,2001,23(6):539-543.
- [8] 陈振文,欧阳兆和,董 罡,等.用微卫星标记技术对国内 BALB/c 小鼠遗传质量的分析[J].遗传,2004,26(6):845-848.
- [9] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼压阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南(第二版)[M]. 北京:科学出版社,1999.
- [10] Walter R B, Rains J D, Russel J E, *et al.* A microsatellite genetic linkage map for *Xiphophorus* [J]. Genetics,2004,168(1):363-372.
- [11] 霍金龙,曾 嵘,潘伟荣,等.微卫星 PCR 聚丙烯酰胺凝胶银染法影响因素的分析研究[J].云南农业大学学报,2005,20(1):67-71.
- [12] Jamieson A, Taylor S C. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion[J]. Animal Genetics,1997,28(6):397-400.
- [13] Botstein D, White R L, Skolnick M. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. Am J Anim Gen,1980,32:314-341.
- [14] 王凤山,徐 坚,支 宇,等.近交系小鼠遗传质量监测新方法的建立-染色体 Q-H 分带技术及其应用[J].中国实验动物学报,1993,1(1):42-48.
- [15] 杨维东,施新猷,马振国,等.白细胞介素-2 受体表达在近交系小鼠遗传监测中的应用[J].上海实验动物科学,1994,4(2):67-70.
- [16] 孙敬方,田小芸,潘震寰,等. NJS 系小鼠的多项遗传纯度监测与分析[J].中国兽医学报,1997,17(3):285-288.
- [17] Remmers E F, Goldmuntz E A, Zha H, *et al.* Linkage map of seven polymorphic markers on rat chromosome 18 [J]. Mamm Genome, 1993, 4(5):265-270.
- [18] Jacob H J, Brown D M, Bunker RK, *et al.* A genetic linkage map of the laboratory rat, *Rattus norvegicus* [J]. Nature Genetic, 1995,9(1):63-69.
- [19] Montagutelli X, Guenet J L. Genetic monitoring of inbred strains by analysis of microsatellite polymorphisms [C]. Fifth FELASA Symposium: welfare and science, 1993,183-186.
- [20] 李 霞,吴淑勤,白俊杰.剑尾鱼近交系遗传纯度的 RAPD 分析[J].中国实验动物学报,2003,(2):1-4.
- [21] 李凯彬,姜 兰,潘厚军,等.RR-B 系剑尾鱼 LDH 和 GDH 同工酶的分析[J].中国比较医学杂志,2004,13(3):46-50.
- [22] 战爱斌,包振民,陆 维,等.仿刺参的微卫星标记[J].水产学报,2006,30(2):192-196.
- [23] 梁利群,常玉梅,董崇智,等.微卫星 DNA 标记对乌苏里江哲罗鱼遗传多样性的分析[J].水产学报,2004,28(3):242-248.