

Charakterisierung von Ratten-Inzuchtlinien mit Hilfe der Mikrosatellitenanalyse

Autor(en): **Dolf, G. / Colomb, B. / Schläpfer, J.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires**

Band (Jahr): **138 (1996)**

Heft 3

PDF erstellt am: **19.05.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-590534>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Charakterisierung von Ratten-Inzuchtlinien mit Hilfe der Mikrosatellitenanalyse

G. Dolf¹, B. Colomb¹, J. Schläpfer¹, J. Leuenberger², U. Märki²

Zusammenfassung

Die Ratten-Inzuchtstämme LEW, SHR und WKY wurden mit Hilfe der Mikrosatellitenanalyse charakterisiert. Dazu wurden sieben, im Handel erhältliche, Primerpaare verwendet. Drei Mikrosatelliten wurden individuell und je zwei als Duplex mit der PCR-Methode amplifiziert. Die resultierenden Produkte wurden in einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und auf einem UV-Leuchtpult fotografiert. Die dabei aufgezeigten Bandenmuster lassen die Homogenität innerhalb der Inzuchtlinien und auch die Unterschiede zwischen den Inzuchtlinien deutlich erkennen.

Schlüsselwörter: Ratten-Inzuchtstämme – Mikrosatelliten – Charakterisierung

Genetic monitoring of inbred rat strains by microsatellite analysis

Microsatellite analysis was applied to identify the inbred rat strains LEW, SHR and WKY. Of a set of seven commercially available primer pairs three pairs were used individually and two times two in duplex polymerase chain reactions (PCR). The products were analyzed in ethidium bromide stained agarose gels. The resulting banding patterns clearly demonstrated the homogeneity within strains and the differences between strains.

Key words: genetic monitoring – inbred rat strains – microsatellites

Einleitung

In der Tierzucht ist die korrekte Identifizierung der Individuen eine grundlegende Voraussetzung um ein Zuchtziel zu erreichen. Die Mikrosatellitenanalyse eignet sich als Methode sowohl für die Abstammungskontrolle in ausgezüchteten Populationen, als auch für die Charakterisierung von ingezüchteten Populationen. Damit kann man nicht nur ingezüchtete Populationen voneinander unterscheiden, sondern auch die Homogenität innerhalb einer Population prüfen.

Zur Beantwortung vieler Fragestellungen in der biomedizinischen Forschung sind Untersuchungen an genetisch standardisierten Inzuchtlinien unerlässlich. Die aus solchen Untersuchungen resultierenden Daten müssen reproduzierbar und international vergleichbar sein. Um dies zu gewährleisten, werden zahlreiche Methoden – wie zum Beispiel der Nachweis immunologischer und biochemischer Marker, Hauttransplantationen oder das DNA Fingerprinting eingesetzt –, die es erlauben die Stabilität des genetischen Hintergrundes von Inzuchtlinien über Generationen zu verfolgen. Zu dieser Palette von Methoden ist nun noch die Mikrosatellitenanalyse hinzugekommen, die mit Erfolg, zum Beispiel auch bei der Ratte (Hirayama et al., 1994), angewendet wird.

Mikrosatelliten sind kurze, 2 bis 4 Basenpaare lange, repetitive DNA-Sequenzen, welche meistens hochpoly-

morph und im Erbgut der Säugetiere weit verbreitet sind (Tautz, 1989; Fries et al., 1990; Love et al., 1990; Moore et al., 1991; Stallings et al., 1991). Individuelle Mikrosatelliten sind durch ihre spezifischen flankierenden Sequenzen charakterisiert, was sie dem PCR-Verfahren zugänglich macht (Saiki et al., 1988). Die vorliegenden Untersuchungen dienten dazu, ein schnelles, zuverlässiges und kostengünstiges Vorgehen auszuarbeiten, um Ratten-Inzuchtstämme zu charakterisieren.

Material und Methoden

Tiere, Probenentnahme und DNA-Extraktion

Neben den drei Ratten-Inzuchtstämmen LEW (CH-Ibm), SHR (CH-Ibm) und WKY (CH-Ibm) wurde noch der ausgezüchtete Stamm WIST (CH-Ibm) in die Untersuchung miteinbezogen. Jeder Stamm wurde durch 5 zufällig ausgewählte Tiere repräsentiert. Zur Blutentnahme wurden die Tiere mit CO₂ euthanasiert, da sie neben der Mikrosatellitenanalyse noch für weitere Untersuchungen verwendet wurden. Für die Mikrosatellitenanalyse wurden Blutproben von 0.1 ml aus dem Herzen mit Einweg-Spritzen entnommen, welche EDTA enthielten (1 ml, Becton Dickinson, Einwegnadeln 22 G 1/4). Die DNA wurde extrahiert, indem pro Tier 50 µl Vollblut in einem Eppen-

dorf-Röhrchen zuerst zweimal in 1 ml 10 mM EDTA, 10 mM NaCl, pH 8.0, mit 5 M NaOH eingestellt, gewaschen wurden. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden 200 µl 5% Chelex (w/v in H₂O, Chelex® 100 Resin, BIO-RAD 143-2832) je Probe zugegeben (Walsh et al., 1991). Die Proben wurden gut geschüttelt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Anschliessend wurden die Proben für 60 Minuten in einem Heizblock auf 100 °C erhitzt. Nach weiteren 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Proben noch einmal durchmischt und zentrifugiert. Der Überstand wurde für die PCR-Analyse verwendet.

Primers

Total wurden 20 Mikrosatelliten, welche 14 autosomale Chromosomen repräsentieren, analysiert. Dazu wurden alle Primerpaare (Rat MapPairs™) von der Firma Research Genetics, Huntsville, AL, USA, gekauft.

PCR

Die PCR-Gemische enthielten 2.5 µl 10 × Puffer (Boehringer Mannheim), 5 µl dNTP's (jedes Nukleotid in einer Konzentration von 0.25 bzw. 0.125 nmol/µl, Boehringer Mannheim), 5 µl der/des oberen Primer(s) (jeder in einer Konzentration von 1 pmol/µl), 5 µl der/des unteren Primer(s) (jeder in einer Konzentration von 1 pmol/µl), 2.5 µl Taq-Polymerase (0.7 U, Boehringer Mannheim) und 5 µl des Überstandes mit der DNA. Die Reaktion wurde auf einem Perkin Elmer 480 Thermocycler durchgeführt. Dazu wurde ein Touch-Down-Programm (Don et al., 1991) verwendet, welches von 63 °C auf 55 °C bzw. von 61 °C auf 53 °C heruntergeht. Bei diesen Touch-down-Programmen wurden nach einer Denaturierung während 3 Minuten bei 94 °C, ausgehend von der Anfangstemperatur, je zwei Zyklen pro Temperaturstufe in Schritten von 1 °C bis zur Endtemperatur durchgeführt. Bei der Endtemperatur wurden noch 14 Zyklen angefügt, was insgesamt 30 Zyklen ergab. Pro Zyklus dauerte die Denaturierung jeweils 30 Sekunden bei 94 °C, das Binden der Primer an die Vorlage 30 Sekunden und die Synthese der DNA 40 Sekunden bei 72 °C. Zum Schluss wurden die Ansätze noch für 5 Minuten bei 72 °C belassen. Bei einem Touch-Down-Programm wird in der Anfangsphase zwar nicht sehr effizient, dafür aber sehr spezifisch amplifiziert, sodass bei der anschliessenden effizienten Amplifikation bei der Endtemperatur die spezifische Vorlage im Überschuss vorliegt.

Elektrophorese

Je 15 µl der PCR-Produkte wurden auf einen Agarose-Gel (20 cm × 20 cm, 120 ml 2.5% MetaPhor™, FMC BioProducts in 1 × TBE mit 3 µl 10 mg/ml H₂O Ethidiumbromid) aufgetragen und in 2.3 l 1 × TBE-Puffer mit 50 µl

Ethidiumbromid für 3 bis 4 Stunden bei 2.5 V/cm laufen gelassen. Anschliessend wurden die Gele auf einem UV-Leuchtpult fotografiert.

Resultate

Von den 20 getesteten Mikrosatelliten waren 7 informativ für die Inzuchtstämme und amplifizierten gut unter den gegebenen PCR-Bedingungen. Der Duplex 2 MIT-R248 / 10 MIT-PPP amplifizierte am besten mit einem Touch-Down-Programm von 63 °C nach 53 °C. Die übrigen 5 Mikrosatelliten, 1 MTIPA, 6 MIT-R721, 7 MIT-PTBZRA und der Duplex 11 MIT-R561 / 13 MIT-R982, wurden in einem Touch-Down-Programm von 63 °C nach 55 °C (Abb. 1a-e) amplifiziert. Wie erwartet waren alle Tiere innerhalb eines Inzuchtstammes homozygot für das jeweilige Allel der 7 Mikrosatelliten. Die Tiere des Auszuchtstammes WIST zeigten verschiedene Allele und waren entweder homozygot oder heterozygot für die verschiedenen Mikrosatelliten mit Ausnahme des Duplexes 2 MIT-R248 / 10 MIT-PPP, bei dem alle Tiere für die selben Allele homozygot waren.

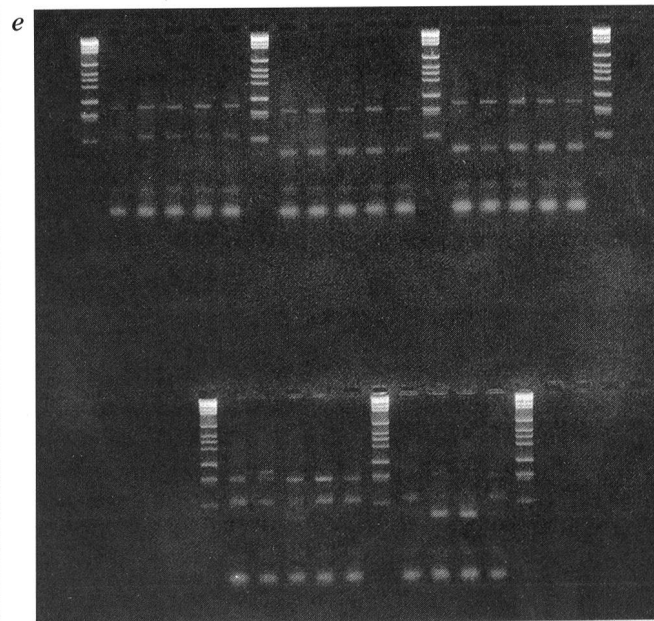
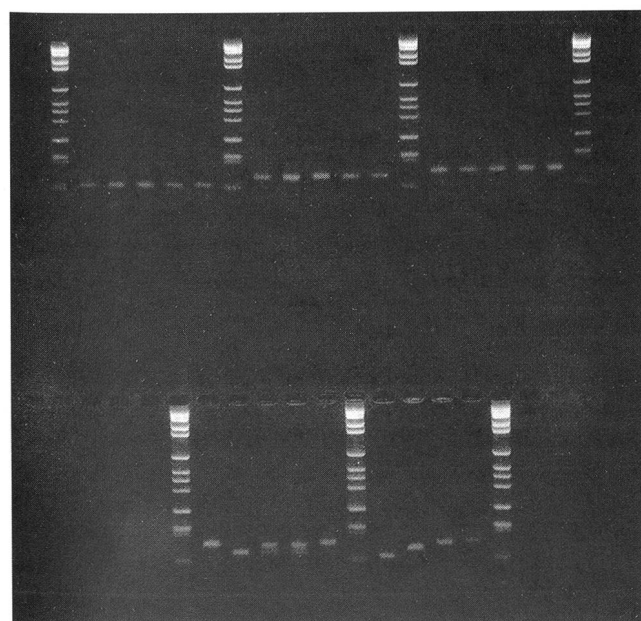
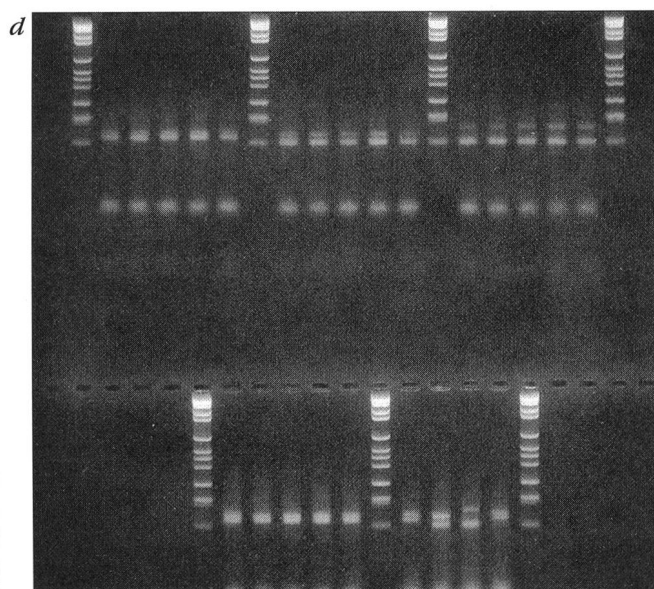
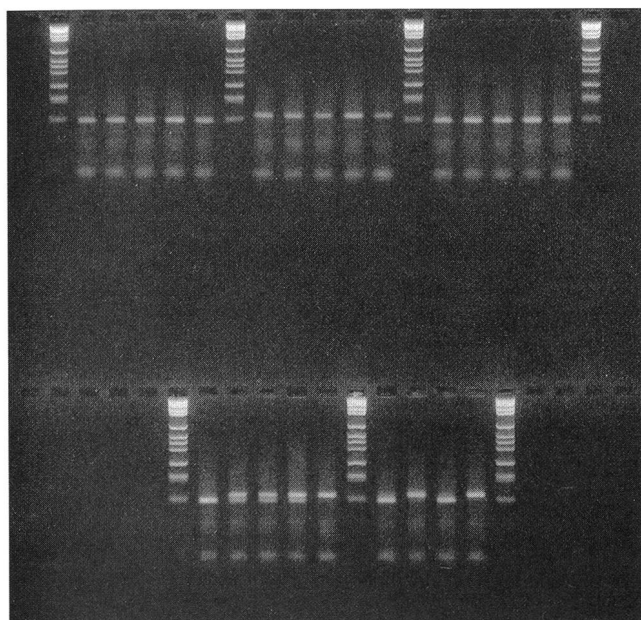
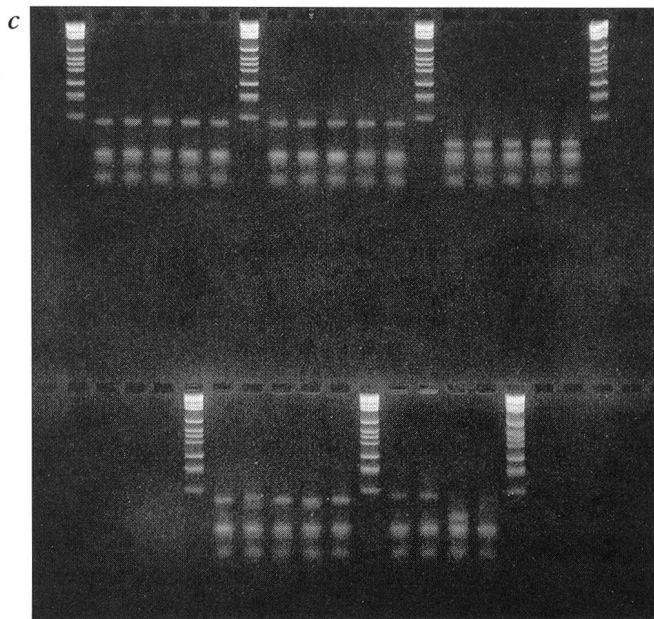
Diskussion

Für die Charakterisierung der Inzuchtstämme Lew, SHR und WKY wurden von den geprüften 20 Mikrosatelliten schliesslich deren 7 verwendet. Mit der Kombination von jeweils zwei Mikrosatelliten wurde es möglich die Anzahl der notwendigen PCR zu verringern. Ideal wäre es, wenn alle 7 Mikrosatelliten gleichzeitig amplifiziert werden könnten. Da aber die Primers der verschiedenen Mikrosatelliten untereinander binden können, und damit die korrekte Amplifikation beeinträchtigen oder gar verhindern, wird das Zusammenstellen von Multiplexen um so schwieriger, je mehr Mikrosatelliten involviert sind. Im vorliegenden Fall war es nur möglich, zwei Duplexe zusammenzustellen.

Die Kombinationen 2 MIT-R248 / 10 MIT-PPP und 11 MIT-R561 / 13 MIT-R982 und der Mikrosatellit 6 MIT-R721 können alle drei Inzuchtstämme LEW, SHR und WKY voneinander unterscheiden. Dagegen unterscheidet der Mikrosatellit 1 MTIPA nur zwischen SHR und LEW bzw. WKY, aber nicht zwischen LEW und WKY, und der Mikrosatellit 7 MIT-PTBZRA zwischen WKY und LEW bzw. SHR, aber nicht zwischen LEW und SHR. Bei jedem dieser 7 Mikrosatelliten liegen die Allele, welche zwischen den Inzuchtstämmen unterscheiden, so weit auseinander, dass sie problemlos in einem Agarose-Gel auseinandergehalten werden können. Bei Verwendung dieser Mikrosatelliten kann deshalb auf eine aufwendige radioaktive oder nicht-radioaktive Markierung mit entsprechender Analyse verzichtet werden. Der ganze Ablauf, von der Blutentnahme bis zur Interpretation der Resultate, dauert nicht länger als zwei Tage. Die Mikrosatelliten, die für diese Untersuchung verwendet wurden, sind nicht gekoppelt und repräsentieren deshalb ihrer

Abbildung 1: Charakterisation der Ratten-Inzuchtstämme LEW, SHR und WKY mit 7 Mikrosatelliten

a. 1 MTIPA, b. 6 MIT-R721, c. 7 MIT-PTBZRA, d. 2 MIT-248 / 10 MIT-PPP, e. 11 MIT-R561 / 13 MIT-R982. Auf jedem Gel (a bis e) wurden die Tiere in derselben Reihenfolge aufgetragen. In der oberen Reihe, von links nach rechts, finden sich je 5 Tiere der Stämme LEW, SHR und WKY und in der unteren Reihe von links die 5 Tiere des ausgezüchteten Stammes WIST, sowie von links nach rechts je ein Tier der Stämme LEW, SHR, WKY und WIST zum direkten Vergleich. Der DNA-Molekulargewichtsmarker ist ein Gemisch von pBR328 verdaut mit BglI und pBR328 verdaut mit HinfI.



Zahl entsprechend den grösstmöglichen Teil des Rattengenoms. Diese Abdeckung des Genoms kann jederzeit mit weiteren, kartierten Mikrosatelliten ausgebaut werden. Die Grenzen dieses vorliegenden Ansatzes liegen in der Auftrennung der Allele im Agarose-Gel. Damit können wohl Kontaminationen festgestellt werden, aber nicht Punktmutationen innerhalb eines Stammes. Um solche feststellen zu können, müssten die Mikrosatelliten in einem Polyakrylamid-Gel analysiert werden.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden über drei Jahre jährlich durchgeführt, wobei keine Änderungen in den Resultaten festgestellt werden konnten. Das einzige Problem, das bisher aufgetreten ist, betrifft die Qualität dieser im Handel erhältlichen Primerpaare. Es scheint, dass diese über einen Zeitraum von mehr als einem Jahr nicht stabil sind. Ein erster Vergleich mit Primerpaaren einer anderen Firma hat gezeigt, dass offenbar qualitative Unterschiede bestehen. Dieser Befund muss erst noch betätigt werden, bevor die Frage angegangen werden kann, worin dieser qualitative Unterschied bestehen könnte.

Literatur

- Don R.H., Cox P.T., Wainwright B.J., Baker K., Mattick J.S. (1991): „Touchdown“ PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *NAR* 19, 4008.
- Fries R., Eggen A., Stranzinger G. (1990): The bovine genome contains polymorphic microsatellites. *Genomics* 8, 403–406.
- Hirayama N., Kuramoto T., Kondo Y., Yamada J., Serikawa T. (1994): Genetic profiles of 12 inbred rat strains for 46 microsatellite loci selected as genetic monitoring markers. *Exp. Anim.* 43, 129–132.
- Love J.M., Knight A.M., McAleer M.A., Todd J.A. (1990): Towards construction of a high resolution map of the mouse genome using PCR-analysed microsatellites. *NAR* 18, 4123–4130.
- Moore S.S., Sargeant L.L., King T.J., Mattick J.S., Georges M., Hetzel D.J.S. (1991): The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics* 10, 654–660.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487–491.
- Stallings R.L., Ford A.F., Nelson D., Torney D.C., Hildebrand C.E., Moyzis R.K. (1991): Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics* 10, 807–815.
- Tautz D. (1989): Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *NAR* 17, 6463–6471.
- Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R. (1991): Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 10, 506–513.

Korrespondenzadresse: G. Dolf, Institut für Tierzucht, Universität Bern, Bremgartenstrasse 109a, CH-3012 Bern

DIANA.
Computersoftware für Gross- und Kleintierpraxen

■ **brunner & hess software ag**
PC-Lösungen aus Entwicklerhand
Schulhausstrasse 73 Tel. 01/286 20 30
CH-8002 Zürich Fax 01/286 20 31
DIANA-Direktnummer Tel. 01/286 20 40