

Charakterystyka genetyczna szczurów szczepów wsobnych utrzymywanych w polskich ośrodkach hodowlanych*)

MARTA GAJEWSKA*, ELŻBIETA WIRTH-DZIĘCIOŁOWSKA*.**, DOROTA ŁUKASIEWICZ**,
JOANNA LECHOWSKA-PISKOROWSKA*, MAREK WOSZCZYŃSKI*, MONIKA MIKULSKA**

*Zakład Genetyki i Hodowli Zwierząt Laboratoryjnych Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie,
ul. W. K. Roentgena 5, 02-781 Warszawa

**Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt Wydziału Nauk o Zwierzętach SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Gajewska M., Wirth-Dzięciołowska E., Łukasiewicz D.,
Lechowska-Piskorowska J., Woszczyński M., Mikulska M.

Molecular characteristics of rat inbred strains bred in Poland

Summary

Laboratory rats are widely used in a variety of biomedical investigations. Therefore, it is of great importance to know the genetic characteristics of these animals. Regular genetic control is indispensable for maintaining the homozygosity and authenticity of inbred laboratory animals. Identification of specific animal inbred strains or comparing substrains maintained in different laboratories is possible by establishing specific genetic profiles for these animals.

The aim of this publication is developing a microsatellite panel for characteristics of inbred rat strains bred in Poland. Using 144 microsatellite markers for genetic monitoring of 16 rat strains from seven laboratories in Poland, the homozygosity and authenticity of these animals was confirmed.

Keywords: inbred rats, microsatellite markers

Szczur laboratoryjny jest jednym z podstawowych modeli zwierzęcych wykorzystywanych w badaniach biomedycznych wielu chorób uwarunkowanych genetycznie, szczególnie schorzeń o złożonej etiologii, takich jak: nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, otyłość, schorzenia nowotworowe i stany zapalne. Stanowi także model w badaniach zaburzeń neurologicznych i emocjonalnych.

Zmienność genetyczna występująca w stadach niekrewniaczych i wpływ czynników środowiskowych w powstawaniu i rozwoju wymienionych schorzeń stwarza istotne problemy przy analizie podłoża genetycznego chorób uwarunkowanych wieloczynnikowo. W celu ograniczenia zmienności używa się do badań szczepów wsobnych o genetycznie utrwalonych skłonnościach do określonych schorzeń lub przejawiających konkretne anomalie anatomiczno-fizjologiczne. Zwierzęta pochodzące z poszczególnych szczepów wsobnych różnią się między sobą szeregiem *loci*, które w badaniach mogą być wykorzystywane jako markery genetyczne. Markerami takimi są sekwencje mikrosatelitarne. Te wysoko polimorficzne, niekodujące frag-

menty DNA składające się z tandemowych powtórzeń kilkunukleotydowych motywów są rozproszone w całym genomie. U szczura wykryto do tej pory ponad 6000 *loci* mikrosatelitarnych, spośród których zmapowano ponad 4000.

Celem badań było opracowanie panelu mikrosatelitarnego dla szczepów wsobnych szczurów utrzymywanych w Zwierzętarni Centrum Onkologii, jak również w kilku innych krajowych ośrodkach utrzymujących szczepy wsobne szczurów laboratoryjnych. Panel ten będzie miał dwojakie zastosowanie: umożliwi prowadzenie monitoringu genetycznego osobników hodowlanych oraz dostarczy eksperymentatorom precyzyjnych informacji dotyczących charakterystyki genetycznej utrzymywanych przez nich szczurów i ułatwi prowadzenie badań mających na celu wykrycie sprzężeń z analizowanymi cechami. Utworzenie takiego panelu ułatwi prowadzenie kolejnych eksperymentów związanych np. z poszukiwaniem *loci* QTL, poprzez minimalizację stosowania w takich badaniach markerów niepolimorficznych dla wybranej pary szczepów wsobnych. Tego typu problemy obserwowane są w bardzo wielu eksperymentach i wiążą się zarówno z wydłużeniem czasu badań, jak i ze zwiększeniem wydatków na nie ponoszonych.

*) Badania zrealizowano w ramach projektu badawczego nr 3PO5A 01223 finansowanego przez KBN.

Materiał i metody

Ośrodki prowadzące hodowlę szczurów szczepów wsobnych wybrano na podstawie zestawienia Zwierzęta laboratoryjne hodowane w ośrodkach naukowych w Polsce, dostępnego na stronie KBN www.mnii.gov.etyka/kke/lab.html. Listę ośrodków, które dostarczyły materiał do analiz zamieszczono w tab. 1.

Badaniami objęto 23 grupy zwierząt zgłoszone przez hodowców jako należące do szczepów wsobnych.

Z dostarczonych tkanek – fragmentów ogona lub płatów uszu pochodzących od 2-4 osobników z danego szczepu, izolowano DNA, stosując metodę fenolowo-chloroformową. Ocenę czystości i stężenia DNA przeprowadzano na spektrofotometrze i żelu agarozowym. Próbkę DNA pochodzącą od osobników jednego szczepu poolowano przed przystąpieniem do dalszych badań. Nie optymalizowano warunków PCR dla poszczególnych markerów. Ich przydatność do tworzenia profilu genetycznego weryfikowano na podstawie prawidłowego przebiegu reakcji PCR w podanych niżej warunkach. Ocena markerów na podstawie ich działania w określonych z góry warunkach pozwala na stosowanie jednego programu PCR, co znakomicie ułatwia prowadzenie badań i minimalizuje możliwość pomyłki (5).

Amplifikację przeprowadzano w 20 µl roztworu zawierającego 10 mM Tris-HCl (pH 8,5), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM każdego dNTPs, 0,05 µM każdego startera (Sigma-Genosys, London UK), 200 ng genomowego DNA i 0,3 U REDTaq DNA Polymerase (Sigma). Parametry reakcji PCR były następujące: wstępna denaturacja (hot start) 3 min. w 94°C, następnie 35 cykli: 60 sec. w 94°C; 60 sec. w 55°C; 60 sec. w 72°C; końcowe wydłużanie: 5 min. w 72°C. Elektroforeza prowadzona była na 4,5% agarozie wysokiej rozdzielczości MetaPhore 3 : 1 (FMC Bioproducts) z domieszką Agarose for Routine Use (Sigma), zawierającej bromek etydy, w buforze TBE, na aparacie firmy Kucharczyk TE. Długość fragmentów oceniano w odniesieniu do dwóch niezależnych markerów: LowLadder 20 bp (Sigma) i pUCMix (Fermentas) lub 50 bp GeneRuller (Fermentas) lub 100 bp GeneRuller (Fermentas). Długość alleli szacowano przy pomocy programu komputerowego GelExpert (Nucleotech, San Mateo CA, USA).

Przetestowano 152 markery mikrosatelitarne rozmieszczone na wszystkich chromosomach autosomalnych i chromosomie X. Zestaw użytych markerów mikrosatelitarnych zamieszczono w tab. 2. Markery wybierano na podstawie danych zamieszczonych w Rat Genome Database (RGD) <http://rgd.mcw.edu>. Pozycje markerów określono wg mapy sporządzonej na bazie krzyżówki szczepów SPRDN × BN. W przypadku, gdy dla danego markera nie było danych z tej krzyżówki, posłużono się wynikami krzyżówki FHH × ACI.

Wyniki i omówienie

Spośród testowanych 152 markerów mikrosatelitarnych wykorzystano 144 do opracowania profili mikrosatelitarnych. Osiem markerów zostało wyeliminowanych z powodu braku produktu amplifikacji (markery D1Rat2, D7Rat30 i D8Rat55) lub generowania dużej ilości niespecyficznych produktów (tzw. prążki – du-

Tab. 1. Ośrodki hodowlane, które wzięły udział w projekcie

Nazwa ośrodka	Siedziba	Skrót hodowlany	Lista zgłoszonych grup zwierząt
Akademia Medyczna	Warszawa	AM	3
Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej	Warszawa	Cmd	4
Instytut Biologii Doświadczalnej	Warszawa	Ibd	1
Instytut Medycyny Pracy	Łódź	Imp	5
Uniwersytet Jagielloński	Kraków	Krf	2
Szpital – Centrum Matki-Polki	Łódź	Lod	5
Centrum Onkologii	Warszawa	W	3

Tab. 2. Sekwencje starterów wykorzystanych do amplifikacji testowanych markerów mikrosatelitarnych. Dane wg Rat Genome Database (RGD), maj 2004

Locus	Locus	Locus	Locus	Locus
D1Mgh7	D4Mgh14	D8Rat49	D12Rat68	D17Rat15
D1Mit34	D4Rat145	D8Rat11	D12Rat93	D17Rat65
D1Rat126	D4Rat17	D8Rat56	D13Rat5	D17Rat72
D1Rat19	D4Rat183	D8Rat62	D13Rat126	D17Rat76
D1Rat36	D4Rat206	D8Rat68	D13Rat152	D18Rat6
D1Rat208	D4Rat34	D8Mgh3	D13Rat30	D18Rat132
D1Rat27	D4Rat64	D9Rat11	D13Rat32	D18Rat57
D1Rat316	D5Rat190	D9Rat106	D13Rat8	D18Rat62
D1Rat42	D5Rat138	D9Rat129	D14Rat2	D18Rat67
D1Rat5	D5Rat187	D9Rat132	D14Mgh1	D19Rat15
D1Rat58	D5Rat2	D9Rat2	D14Rat21	D19Rat46
D1Rat71	D5Rat36	D9Rat60	D14Rat49	D19Rat58
D2Rat111	D5Rat9	D10Rat103	D14Rat65	D19Rat67
D2Rat116	D5Rat95	D10Rat104	D14Rat7	D19Rat82
D2Rat183	D5Rat98	D10Rat135	D14Rat78	D19Rat85
D2Rat199	D6Mit9	D10Rat145	D14Rat94	D19Rat9
D2Rat21	D6Rat119	D10Rat148	D15Rat102	D20Mit1
D2Rat224	D6Rat123	D10Rat41	D15Rat126	D20Rat3
D2Rat252	D6Rat148	D10Rat45	D15Rat16	D20Rat34
D2Rat256	D6Rat149	D10Rat70	D15Rat29	D20Rat41
D2Rat42	D6Rat23	D10Rat8	D15Rat3	D20Rat55
D2Rat6	D6Rat3	D11Mgh4	D15Rat42	DXRat16
D3Rat157	D7Mgh7	D11Rat21	D15Rat81	DXRat21
D3Rat166	D7Rat113	D11Rat43	D16Rat106	DXRat3
D3Rat181	D7Rat4	D11Rat67	D16Rat14	DXRat50
D3Rat210	D7Rat7	D11Rat91	D16Rat59	DXRat91
D3Rat227	D7Rat19	D12Rat14	D16Rat69	
D3Rat45	D8Mgh3	D12Rat14	D16Rat78	
D3Rat72	D8Rat3	D12Rat43	D17Mgh5	
D3Rat82	D8Rat43	D12Rat49	D17Rat122	

chy) (markery D3Rat77, D4Rat209, D12Rat6, D16Rat66, D18Rat3).

Tab. 3. Zestawienie szczepów wsobnych szczurów, których homozygotyczność została potwierdzona w badaniach*

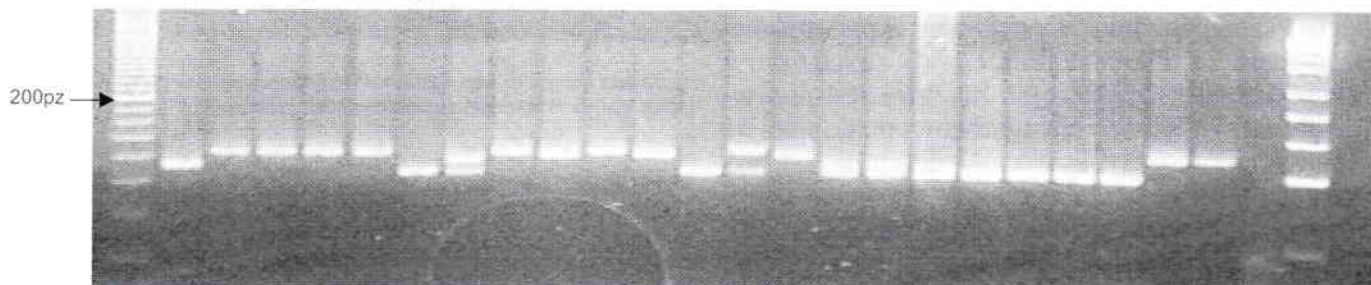
Szczep	Ośrodek hodowlany	Liczba loci heterozygotycznych	Oszacowany współczynnik wsobności
AUG/OlaHsdCmd	Cmd	0	1
BN/Cmd	W	0	1
BN/CrlCmd	Cmd	0	1
BN/RijHsdImp	Imp	0	1
CDF(F-344)CrlLod	Lod	0	1
COP/OlaHsdImp	Imp	0	1
HO/Krf	Krf	0	1
LE/CpbHsd	lbd	0	1
LEW/CrlCmd	Cmd	0	1
LEW/W	W	0	1
WAG/Krf	Krf	0	1
WAG/Cmd	Cmd	3	0,98
WAG/W	W	0	1
WKY/NhsdLod	AM W-wa	2	0,99
WKY/OlaHsdLod	Lod	0	1

Objaśnienie: * – pozostałych 8 grup badanych zwierząt nie uznano za szczepy wsobne ze względu na zbyt wysoki stopień heterozygotyczności

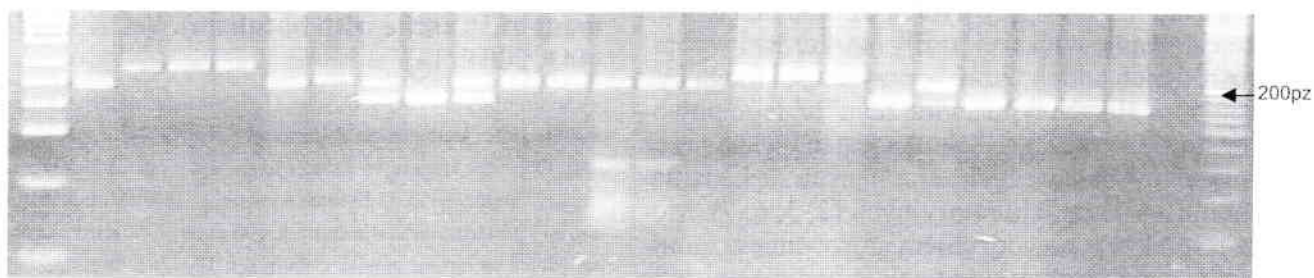
Z testowanych 23 grup zwierząt u 15 stwierdzono poziom homozygotyczności wyższy niż 98%, co pozwala na pozytywne zweryfikowanie ich jako szczepy wsobne. Pełną charakterystykę mikrosatelitarną tych szczepów zamieszczono na stronie internetowej www.coi.waw.pl/badania. Informacje o poziomie homozygotyczności szczurów spełniających kryteria szczepów wsobnych zawarto w tab. 3.

Poszukiwanie genów warunkujących badaną cechę metodą analizy sprzężeń z markerami mikrosatelitarnymi jest jedną z najczęściej stosowanych obecnie technik badawczych. Sukces w tego typu mapowaniu zależy przede wszystkim od posiadania bardzo precyzyjnych informacji na temat charakterystyki genetycznej testowanych zwierząt. Szczepy wsobne szczurów laboratoryjnych są znacznie mniej ujednoczone niż szczepy myszy laboratoryjnych. Hodowla wsobna myszy laboratoryjnych ma dużo dłuższe tradycje niż szczurów. Pierwsze szczepy myszy powstały na początku XX wieku (m.in. szczep DBA, CBA, BALB). Wyprowadzono je ze stada niekrewniaczego, a następnie udostępniono różnym ośrodkom naukowym już jako szczepy wsobne. W tej sytuacji zmienność między poszczególnymi hodowlami tego samego szczepu wynika głównie ze stopniowej akumulacji pojawiających się mutacji spontanicznych w podszczepach hodowanych w poszczególnych ośrodkach.

Marker D10Rat145



Marker D5Rat36



Marker D10Rat145

Ścieżki: 1 – marker wielkości LowLadder 20bp (Sigma); 26 – marker wielkości pUCMix (Fermentas); 2-25 – AUG/OlaHsdCmd; BN/Cmd; BN/CrlCmd; BN/RijHsdImp; CDF (F-344)/CrlLod; COP/OlaHsdImp; EPIL/Imp; HO/Krf; LE; LE/CpbHsd; LEW/CrlCmd; LEW/HanImp; LEW/HanLod; LEW/W; SHR/NhsdLod; SPRD/MolLod; SPRD/MolLod; WAG/Krf; WAG/RijHsdImp; WAG/Cmd; WAG/W; WKY/NhsdLod; WKY/OlaHsdLod; kontrola negatywna PCR

Marker D5Rat36

Ścieżki: 1 – marker wielkości pUCMix (Fermentas); 26 – marker wielkości LowLadder 20bp (Sigma); 2-25 AUG/OlaHsdCmd; BN/Cmd; BN/CrlCmd; BN/RijHsdImp; CDF (F-344)/CrlLod; COP/OlaHsdImp; EPIL/Imp; HO/Krf; LE; LE/CpbHsd; LEW/CrlCmd; LEW/HanImp; LEW/HanLod; LEW/W; SHR/NhsdLod; SPRD/MolLod; SPRD/MolLod; WAG/Krf; WAG/RijHsdImp; WAG/Cmd; WAG/W; WKY/NhsdLod; WKY/OlaHsdLod; kontrola negatywna PCR

Szczury utrzymywane były do połowy XX wieku głównie jako stada o zróżnicowanym spokrewnieniu. Zwierzęta z tych właśnie stad były przekazywane do różnych ośrodków badawczych, w których dopiero rozpoczynano hodowlę szczepów wsobnych. Tak właśnie uzyskano np. szczury szczepów opisywanych jako LEW, które zostały niezależnie wyprowadzone w kilku ośrodkach hodowlanych ze stada Lewis. Istniejące między tymi szczepami różnice niekiedy są na tyle istotne, że mogą w znaczący sposób wpłynąć na wynik eksperymentu. Sytuacja taka jest wyraźnie widoczna w podszczepach szczepu LEW utrzymywanych w CMDiK i CO-I. Każdy z podszczepów został sprowadzony z innego zagranicznego ośrodka hodowlanego i charakteryzuje się odpowiednio wysokim (powyżej 98%) poziomem homozygotyczności. Podszczepy te jednak różnią się między sobą w ponad 20% loci mikrosatelitarnych, pomimo że zostały wyprowadzone z tego samego stada niekrewniaczego. Podobną sytuację obserwuje się wśród podszczepów szczepu WAG; testowane zwierzęta szczepu LE istotnie różnią się od danych RGD. Najmniejsze zróżnicowanie między podszczepami obserwowane jest wśród zwierząt BN. Ze względu na stwierdzone różnice między poszczególnymi podszczepami, nie powinno się stosować w jednym eksperymencie zwierząt pochodzących z różnych podszczepów.

Zwierzęta szczepów wsobnych są praktycznie całkowicie homozygotyczne. U wszystkich osobników danego szczepu powinien występować określony allel danego markera mikrosatelitarnego (w układzie homozygotycznym). Dzięki temu możliwe jest porównanie długości alleli na żelu agarozowym, dobierając je na zasadzie: dłuższy–krótszy. Ocena taka jest wystarczająca przy wyborze markerów do analiz genomów zwierząt pochodzących z krzyżówki dwóch dowolnych szczepów. Technika oceny polimorfizmu genetycznego na żelu agarozowym jest przy tym tania i szybka – wykonanie reakcji PCR i elektroforezy zajmuje ok. 4 godzin. Niewątpliwie jest ona mniej dokładna od analiz sekwencyjnych. Pozwala ona jednak na przetestowanie większej liczby markerów i wybranie spośród nich takich, które w przyszłości mogą być używane w analizach typu „wide scan”. Z tego powodu zastosowana przez nas technika jest używana przez wiele ośrodków badawczych zajmujących się badaniami genomu zwierząt laboratoryjnych (2, 3, 6, 7). Metoda ta jest także z powodzeniem stosowana w monitorowaniu genetycznym zwierząt, zapewniając dużą precyzję oceny przy minimalnych kosztach (1, 4).

Znajomość długości alleli charakteryzujących szczepy wsobne użyte do kojarzenia pozwala na podjęcie próby łączenia markerów w pary i przeprowadzania reakcji multiplex w eksperymentach, w których niezbędne jest genotypowanie dużej liczby osobników w poszczególnych loci mikrosatelitarnych. Opracowana w wyniku niniejszych badań charakterystyka genetyczna zwierząt szczepowych zapewnia kontrolę pra-

widłości prowadzenia hodowli. Może być także szeroko wykorzystana w mapowaniu genetycznym i poszukiwaniu genów odpowiedzialnych za poziom cech ilościowych (QTL). Znajomość długości alleli charakteryzujących poszczególne szczepy wsobne umożliwia zastosowanie techniki multiplex-PCR, co zdecydowanie obniża koszty prowadzonych badań i skracza czas ich trwania.

Piśmiennictwo

1. Benavides F., Glasscock E., Gohlan L. G., Stern M. C., Weiss D. A., Conti C. J.: PCR-based microsatellite analysis for differentiation and genetic monitoring of nine inbred SENCAR mouse strains. *Lab. Anim.* 2001, 35, 157-162.
2. Cheverud J. M., Vaughn T. T., Pletcher L. S., Peripato A. C., Adams E. S., Ericson C. F., King-Ellison K. J.: Genetic architecture of adiposity in the cross of LG/J and SM/J inbred mice. *Mamm. Genome* 2001, 12, 3-12.
3. Danciger M., Matthes M. T., Yasamura D., Akhmedov N. B., Rickabaugh T., Gentleman S., Redmond T. M., La Vail M. M., Farber D. B.: A QTL on distal Chromosome 3 that influences the severity of light-induced damage on mouse photoreceptors. *Mamm. Genome* 2000, 11, 422-427.
4. Hirayama N., Kuramoto T., Kondo Y., Yamada J., Serikawa T.: Genetic profiles of 12 inbred rat strains for 46 microsatellite loci selected as genetic monitoring markers. *Exp. Anim.* 1994, 43, 129-132.
5. Iakoubova O. A., Olsson C. L., Dains K. M., Choi J., Kalcheva I., Bentley L. G., Cunanan M., Hillman D., Loulee J., Machrus M., West D. B.: Microsatellite marker panels for use in high-throughput genotyping of mouse crosses. *Physiol. Genomics* 2000, 3, 145-148.
6. Koide T. K., Moriwaki K., Uchida A., Mita T., Sagai H., Yonekawa H., Katoh N., Miyashita K., Tsuchiya T., Nielsen J., Shiroishi T.: A new inbred strain JF1 established from Japanese fancy mouse carrying the classic piebald allele. *Mamm. Genome* 1998, 9, 15-19.
7. Masuyama T., Ishibiki J., Awata T., Noda M., Kanazawa Y., Sugarawa M., Komeda K.: An improved genetic linkage map of rat chromosome 20. *Comp. Med.* 2000, 50, 369-373.

Adres autora: dr hab. Elżbieta Wirth-Dzięciółowska, ul. W. K. Roentgena 5, 02-781 Warszawa; e-mail: ewd20@poczta.onet.pl

BRAUN U., FEIGE K., SCHWEIZER G., POSPISCHIL A.: Objawy kliniczne i leczenie 30 krów chorych na botulizm. (Clinical findings and treatment of 30 cattle with botulism). *Vet. Rec.* 156, 438-441, 2005 (14)

Spośród 30 krów pochodzących z 11 gospodarstw, w których zdiagnozowano zatrucie jadem kielbasianym 13 zwierząt przeżyło, a pozostałe skierowano na ubój. Objawem klinicznym występującym u wszystkich zwierząt była utrata napięcia mięśni języka. U 20 sztuk wystąpił też ślinotok i trudności w polykaniu, u 15 porażenie małżowin usznych, u 21 zwierząt uległ osłabieniu lub zaniknął odruch na ukucnie powłok ciała igła, u 12 wystąpiły zaburzenia postawy ciała, zaś 8 zwierząt leżało. U zwierząt skierowanych do uboju stwierdzono zmianę zachowania, spadek kondycji, utratę łaknienia, spadek napięcia skóry i wewnętrznej temperatury, przyspieszenie akcji serca, niskie pH krwi. Jedenaście zwierząt poddano ubojowi zaraz po zdiagnozowaniu choroby, 6 w okresie 1-5 dni po podjęciu leczenia na skutek szybkiej utraty kondycji. Trzynaście zwierząt wyleczono, stosując przez okres od 3 do 23 dni dożylnie infuzje 10-20 l glukozy w roztworze fizjologicznym soli kuchennej i podawanie świeżej treści zwaça. Korygowano też niedobór elektrolitów i stosowano antytoksynę przeciwko *Clostridium botulinum* typ C i D.