



微卫星标记在布氏田鼠封闭群遗传结构研究中的应用

张 曼,施海霞,宋铭晶

(中国医学科学院医学实验动物研究所北京协和医学院比较医学中心
卫生部人类疾病比较医学重点实验室,北京 100021)

【摘要】 目的 使用微卫星标记分析连续三代布氏田鼠封闭群遗传结构的稳定性。**方法** 使用高盐沉淀法从鼠尾中提取布氏田鼠基因组 DNA,将筛选出 7 对微卫星引物并用荧光标记(Fam),然后对布氏田鼠封闭群连续三代的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,测序仪检测 PCR 产物,整理原始数据并对布氏田鼠基因组 DNA 进行微卫星分析。**结果** 由平均有效杂合度和多态信息含量的分析得出该布氏田鼠种群传代过程中保持着较高而且稳定的杂合度。**结论** 该实验结果说明本实验室布氏田鼠封闭群的遗传结构比较稳定。

【关键词】 布氏田鼠;封闭群;遗传结构;微卫星 DNA 标记

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 07-0034-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.007.008

Applications of microsatellite marker technology in the genetic structure research for closed colony of Brandt's voles

ZHANG Man, SHI Hai-xia, SONG Ming-jing

(Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health,
Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences & Comparative Medicine Centre,
Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective Analysis of the genetic structure stability of Brandt's vole (*lasiodomys brandtii*) in closed colony using microsatellite marker technology. **Methods** Genomic DNA was extracted from tail tip using high-concentration-salt precipitation methods. Marked with fluorescent tags(Fam), 7 microsatellite primers were filtered out by PCR, and the DNA structure of three consecutive generations of Brandt's vole was analyzed by microsatellite marker. **Results** By the analysis of the average heterozygosity and polymorphism information content, Brandt's vole populations maintained a closed group of qualified genetic structure. **Conclusions** The present results show that the closed group of Brandt's vole species in our laboratory maintain a stable genetic structure.

【Key words】 Brandt's vole; Closed colony; Genetic structure; Microsatellite DNA marker

2007 年从中国农业大学引入了已在室内随机交配 3 年的布氏田鼠 (*Brandt's vole*, *lasiodomys brandtii*) 普通级实验室种群,在本实验室连续繁殖 3 年,并对该种群进行了系统药物净化和同胞选择筛

选。2011 ~ 2013 年经清洁级实验动物微生物和寄生虫学检测达到了清洁级的标准^[1],到目前已建立了连续繁殖 8 代的清洁级布氏田鼠远交系(封闭群),同时 2013 年我们尝试使用剖腹产净化和 SPF

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31301890);北京市自然科学基金资助项目(7122110)。

[作者简介] 张曼(1989-),女,硕士生,研究方向实验动物学。E-mail: zh_man89@foxmail.com。

[通讯作者] 宋铭晶,博士,副研究员。E-mail: songmj@cnilas.org

级 ICR 雌鼠代乳得到净化的布氏田鼠仔鼠,剖腹产子代通过了 SPF 级的检测,说明本实验室有繁育和净化得到 SPF 级布氏田鼠的能力^[2]。

封闭群遗传结构的稳定是该封闭群维持遗传背景清晰和优质的必要条件,因此我们利用微卫星标记(simple sequence repeats, SSR)技术检测布氏田鼠封闭群连续三代(F6 ~ F8)的遗传结构的稳定性,分析布氏田鼠封闭群遗传结构的变化,进而推测在传代中种群大小的变化,对等位基因多样性的影响。最终,我们旨在通过 SSR 检测和合理繁育配对建立经济高效的布氏田鼠封闭群的传代体系。

SSR 标记是被广泛应用并为学者认可的检测不同动物种群遗传多态性的有效工具^[3],蔡磊等^[4]检测采集于广东深圳大鹏湾浅水区的诸氏鳊虾虎鱼的平均多态信息指数(polymorphism information content, PIC)为 0.447;安徽大学笼养的野外种群猕猴的平均 PIC 值为 0.730^[5]。而实验室内的实验动物种群也利用 PIC 值作为其遗传多态性的重要检测指标之一,李芳芳^[6]等研究的两个豚鼠封闭群(1994 年引自日本,封闭至今;2004 年引自 Charles River)的平均 PIC 值为 0.552;班建荣等^[7]检测引自兰州公司实验动物室并连续封闭 6 年的 SPF 级 KM 小鼠封闭群 PIC 值为 0.368 ~ 0.830;申幸娇等人检测来自北京三个单位的封闭群兔(SPF 级日本大耳白兔,SPF 级新西兰白兔,SPF 级青紫蓝兔)平均 PIC 值为 0.410、0.549、0.470^[8]。但还未见有学者尝试运用 SSR 标记检测连续传代的封闭群的遗传稳定性,从而探索将野生种群在实验室内以最优的繁育规模繁育,以实现该动物的实验动物化,因此本实验为田鼠类动物封闭群的建立和实验动物化研究提供借鉴。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

清洁级的布氏田鼠饲养在独立送排风净化动物笼(individually ventilated cage, IVC)中,饲养室温度 22℃ ~ 25℃,湿度 50% ~ 70%,光照条件 14L:10D,自由摄食和饮水。动物饮水、垫料和笼具均经高压灭菌处理,饲料经 CO⁶⁰照射消毒达到 SPF 级动物饲料标准。饲料生产许可证编号【SCXK(京)

(2012、2013、2014)-0008】。动物实验批准号,ILAS-PG-2014-011。

1.1.2 试剂与仪器

1.1.2.1 试剂

蛋白酶 K(SIGMA 公司)

Taq DNA 聚合酶、10 × PCR buffer (Mg²⁺), dNTP、DNA Marker(20 bp)(TaKaRa)

胶回收试剂盒(BIOMIGA 公司)

KAPA Taq HotStart 扩增试剂(KAPA 公司)

1.1.2.2 仪器

7100 型全自动生化测定仪(日本日立公司产品),酶标仪(Thermo),ROX - 500 分子量内标(北京阅微基因技术有限公司),BC - subMIDI 电泳仪(北京六一仪器厂),JY300C 电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司),NAS - 99 分光光度计(ACTGene 公司),BioSens SC 810B 凝胶成像仪(上海山富科学仪器有限公司),GeneAmp 9600 PCR 仪(ABI 公司),3730XL DNA analyzer(ABI 公司)

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 的提取

布氏田鼠基因组 DNA 来自连续三代的清洁级布氏田鼠幼仔(F6 代 50 只,F7 代 36 只,F8 代 40 只,雌雄各半),采用高盐沉淀法提取,具体步骤如下:取布氏田鼠尾部组织置于 1.5 mL 离心管中,加入 500 μL 鼠尾裂解液(Tris · HCL 10 mmol/L, Na₂EDTA 0.1 mol/L, pH8.0 配制)和 10 μL 蛋白酶 K(20 mg/mL),55℃ 消化过夜,待鼠尾组织完全溶解仅有少许尾骨残骸后,加入 300 μL 6 mol/L 饱和 NaCl 混匀,冰上静置 15 min,12000 r/min 离心 15 min 后取上清,加入与上清等体积的异丙醇沉淀 DNA,70% 乙醇清洗两次,然后倒掉乙醇自然风干,200 μL TE 溶解沉淀,分光光度计检测 DNA 浓度,调整样品浓度至 10 ng/μL。

1.2.2 引物的筛选

随机选取 1 只布氏田鼠基因组 DNA 用 10 条微卫星 DNA 引物^[9]进行 PCR 扩增,用胶回收试剂盒回收目的片段后溶至 30 μL 无菌水中,取 20 μL 做基因组测序服务。根据测序结果筛选出与核心序列一致的 7 条引物,用带有荧光标记(Fam)的上游引物对布氏田鼠的基因组 DNA 进行微卫星分析。7 个布氏田鼠微卫星位点及其特征描述见表 1。

表 1 7 个布氏田鼠微卫星位点及其特征描述

Tab. 1 The primer and characteristics of 7 microsatellites loci for Brandt's voles

序列号位点 Site number	重复单元 Microsatellite Motif	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	退火温度(°C) Annealing (°C)	目的片段长度(bp) Fragmen tlength (bp)
BVM01 DQ886925	(GTT) ₅ TA(T) ₅ GT(GTTT) ₃	GAATGGAGCTATGTAGACA GAGCTAACATTCCAGGAC	48	162
BVM03 DQ886927	(GA) ₂₁	ACAGCAGGCACTGGTTCA ATCTACTGTTGAGCTTCATTCC	57	165
BVM06 DQ886930	(AC) ₁₂	CACCCACACACTGAGACAAC GTGGATGCTGGACCAGAAC	67	200
BVM02 DQ886926	(CA) ₉ GA(CA) ₈	GATCACCTTTCCCTCAC CTTAGACTACCTCTCCTGG	55	145
BVM05 DQ886929	(TG) ₁₀ TA(TG) ₃	GGAGTGGGCTGACTATAGAAG CCAACAGTCTCCACCTTATC	65	180
BVM09 DQ886932	(AG) ₅ GT(AG) ₂₀	CAGCTTAACTTAATGGGATGA CTGGGAGCAACCAAATATC	60	176
BVM13 DQ886934	(AG) ₃ ATAGAC(AG) ₃ AC(AG) ₅	CATCCAAATGTTTTAGAGTGTG GGGATTAAGGTGTGTGC	61	136

1.2.3 PCR 反应条件及电泳

利用 7 对微卫星引物对布氏田鼠基因组 DNA 进行 PCR 扩增,反应条件如下:10 × Buffer (Mg²⁺), 1.5 μL; 2.5 mmol/L dNTP, 1.2 μL; 上游和下游引物 (5 μmol/L), 1 μL; DNA Taq 聚合酶 (5 U/μL), 0.1 μL; 模板 DNA, 1 μL; 3d H₂O 补齐至 15 μL。PCR 反应程序为预变性 95°C, 5 min, 1 个循环; 然后进行 35 个循环, 包括变性 95°C, 30 s; 退火 (各引物最适退火温度), 30 s, 延伸 72°C, 30 s; 最后延伸 72°C, 7 min; 之后进入 4°C 保存。PCR 产物用 3% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 3730 XL 测序仪检测

在 96 孔板中每孔加入分子量内标和甲酰胺混合液 (0.5:8.5) 9 μL, PCR 产物 1 μL, 轻轻混匀后进行上机检测, 95°C 变性 3 min。

1.2.5 数据统计和分析

将检测得到的原始数据文件导入到分析软件 3730XL DNA analyzer 中进行分析, 运用 Genepop4.2 软件进行整理数据, 计算观测杂合度 (observed number of heterozygotes, H_o) = 观测杂合个体数/总种群个体数, H_e = 期望杂合个体数/总种群个体数, $PIC = 1 - \sum_{i=1}^k P_i^2 - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2P_i P_j = 2 \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k P_i P_j (1 - P_i P_j)$ 来计算, 其中 k 表示等位基因数目, P_i 和 P_j 分别是表示第 i 和 j 个等位基因的频率。

2 结果

2.1 微卫星引物扩增及多态性

选取 7 个微卫星座位检测三代布氏田鼠封闭群

的遗传多态性, 发现 DQ886927 座位有 12 个等位基因, DQ886932 座位有 11 个等位基因, DQ886926 座位有 10 个等位基因, DQ886925 座位有 9 个等位基因, 具有丰富的多态性, DQ886929 和 DQ886930 座位各有 7 个等位基因, DQ886934 座位最少, 为 4 个等位基因。7 个微卫星座位的平均等位基因数为 8.57 个。

2.2 杂合度和多态信息含量

三代布氏田鼠种群 7 个基因座位的观测等位基因数 (observed number of alleles)、H_o、H_e 和 PIC 值见表 2。由表 2 中可以计算出, F6 代布氏田鼠种群 7 个不同座位的平均期望杂合度为 0.606, F7 代布氏田鼠种群 7 个不同座位的平均期望杂合度为 0.512, F8 代布氏田鼠种群 7 个不同座位的平均期望杂合度为 0.507。

3 讨论

目前常用的分子标记技术主要有 RFLP、RAPD、AFLP、SSR、SNP 和 EST 技术等。RFLP 标记为显性遗传, 但对 DNA 多态性的检出灵敏度不高; RAPD 技术为显性遗传, 不能识别杂合子位点; AFLP 技术对基因组纯度和反应条件要求较高^[10-11]; SNP 技术和 EST 技术多用于大规模的 DNA 序列检测^[12]。较之于上述 5 种分子标记技术, 微卫星 DNA 分布广泛, 为共显性标记, 具有较高的多态性和重复性, 对 DNA 的浓度要求不高, 可提供高分辨率的遗传信息, 适合于个体水平和种群水平上遗传结构的研究^[13]。

表 2 三代布氏田鼠种群 7 个基因座位的遗传特点
 Tab. 2 Genetic characteristics of 7 microsatellite locus in three generations of Brandt's voles

基因座位 Locus	种群 Populations	观测等位 基因数 Observed number of alleles	等位基因大小(bp) Alleles size(bp)	观测杂 合度 H_o	期望杂 合度 H_e	多态信息含量 PIC
BVM01 DQ886925	F6	7	162 ~ 174	0.520	0.640	0.603
	F7	4	163 ~ 174	0.694	0.667	0.612
	F8	5	163 ~ 174	0.625	0.650	0.601
BVM02 DQ886926	F6	6	139 ~ 146	0.380	0.640	0.601
	F7	5	139 ~ 147	0.556	0.500	0.459
	F8	6	139 ~ 151	0.375	0.475	0.460
BVM03 DQ886927	F6	10	151 ~ 194	0.460	0.680	0.663
	F7	6	151 ~ 179	0.778	0.667	0.629
	F8	9	151 ~ 183	0.600	0.750	0.716
BVM05 DQ886929	F6	5	175 ~ 186	0.560	0.460	0.380
	F7	3	173 ~ 181	0.306	0.278	0.249
	F8	3	175 ~ 181	0.425	0.325	0.290
BVM06 DQ886930	F6	5	192 ~ 210	0.300	0.600	0.548
	F7	4	192 ~ 211	0.306	0.361	0.341
	F8	4	192 ~ 209	0.275	0.275	0.265
BVM09 DQ886932	F6	9	170 ~ 210	0.680	0.680	0.669
	F7	5	170 ~ 203	0.583	0.750	0.706
	F8	6	171 ~ 203	0.525	0.675	0.639
BVM13 DQ886934	F6	4	125 ~ 134	0.440	0.540	0.430
	F7	2	126 ~ 134	0.361	0.361	0.296
	F8	2	126 ~ 134	0.325	0.400	0.326

目前国内没有国家标准或行业标准作为指导实验动物封闭群遗传多样性的建立和维持的规范。 H_e 和 PIC 值是评价种群遗传多态性量化的主要指标,一般 H_e 或 PIC 值越大,该基因座位杂合子的比例就越大,携带的遗传信息量就越大。本研究中,7 个微卫星座位各自在连续三代的布氏田鼠种群传代下的平均 PIC 和 H_e 值分别为 DQ886925:0.606 和 0.652;DQ886926:0.507 和 0.538;DQ886927:0.669 和 0.699;DQ886929:0.306 和 0.354;DQ886930:0.385 和 0.412;DQ886932:0.672 和 0.702;DQ886934:0.350 和 0.434,说明本实验室连续繁殖 6 代以上的布氏田鼠种群的平均 PIC 值在 0.306 ~ 0.672,平均 H_e 值在 0.354 ~ 0.702。同有关学者研究的种群的遗传多态性相比较,如:C Marchi 等^[14]2007 ~ 2008 年研究丹麦两个农业区域和一个自然区域的东方田鼠种群 (H_e :0.671 ~ 0.835)、Magdalena Mikowska^[15]2009 年取自小岛、大陆、重金属污染区共 10 个地域的堤岸田鼠种群 (H_e :0.578 ~ 0.869)、Claudia Melis 等^[16]2006 年在挪威北部的 14 个水鼠种群 (H_e :0.115 ~ 0.486) 等,本实验室的布氏田鼠封闭群在实验室繁育规模较小的情况下,也没有发生明显的遗传漂变。并且 genepop4.2 的

Hardy-Weinberg test 分析得出三代布氏田鼠种群均达到平衡状态,因此可以判定该群体在传代过程中保持着合格封闭群的遗传结构。

总之,本研究表明该布氏田鼠封闭群在连续传代过程中保持着稳定的遗传结构和高度的遗传多态性,该结论为我们建立最优化的传代体系提供了重要的理论支撑。鉴于目前国内还没有对封闭群的遗传多样性有指导性的要求,本研究在 25 对繁育笼的情况下,保持了该封闭群的遗传多态的稳定性,为田鼠类野生动物的引种和繁育提供了借鉴。

参考文献:

- [1] 梁虹,潘思丹,施海霞,等. 布氏田鼠封闭群建立及繁殖特性研究[J]. 中国卫生检验杂志,2009,19(12):2767-2769.
- [2] 潘思丹,张曼,施海霞,等. 布氏田鼠剖腹产净化技术的建立[J]. 中国卫生检验杂志,2014,24(3):352-354.
- [3] Deng Wang, Yongwang Guo, Dazhao Shi. Genetic structure of Brandt's vole (*Lasiopodomys brandtii*) populations in Inner Mongolia, China based on microsatellite analysis [J]. Conservation Genetics. 2011,12(3):659-667.
- [4] 蔡磊,陈小曲,郑伟强,等. 诸氏蝾螈虎鱼多态性微卫星标记的开发及评价[J]. 中国实验动物学报,2015(1):57-62.
- [5] 徐玉蕊. 安徽野生猕猴实验动物化及其种质特异性研究[D]. 安徽大学,2013.

- [6] 李芳芳,魏杰,王洪,等. 应用微卫星标记对两个豚鼠封闭群的遗传学研究[J]. 中国比较医学杂志,2014,24(12):33-46.
- [7] 班建荣,胡芹宝,张新创. 两个封闭群 SPF 级昆明小鼠遗传背景调查[J]. 微生物学免疫学进展,2013,41(5):6-9.
- [8] 申幸娇,岳秉飞. 应用微卫星 DNA 标记对三个封闭群兔遗传分析[J]. 中国比较医学杂志,2013(9):12-18.
- [9] Wang Deng, Shi Dazhao. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from Brandt's voles (*Lasiopodomys brandtii*) [J]. *Molecular Ecology Notes*,2007,7(4):671-673.
- [10] Greg W. DOUHAN, Lucie VINCENOT, Herve GRYTA, *et al.* Population genetics of ectomycorrhizal fungi: from current knowledge to emerging directions [J]. *FUNGAL BIOLOGY*, 2011, 115: 569-597.
- [11] Milee Agarwal, Neeta Shrivastava, Harish Padh. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences [J]. *Plant Cell Reports*,2008,27:617-631.
- [12] 唐立群,肖层林,王伟平. SNP 分子标记的研究及其应用进展 [J]. *中国农学通报*,2012,28(12):154-158.
- [13] Alisoltani A, Fallahi H, Shiran B, *et al.* RNA ~ Seq SSRs and small RNA ~ Seq SSRs: New approaches in cancer biomarker discovery [J]. *Gene*,2015,560(1):34-43.
- [14] C Marchi, LW Andersen, C Damgaard. Gene flow and population structure of a common agricultural wild species (*Microtus agrestis*) under different land management regimes [J]. *Heredity*,2013,111:486-494.
- [15] Magdalena Mikowska, Aneta Gaura, Edyta Sadowska, *et al.* Genetic Variation in Bank Vole Populations in Natural and Metal ~ Contaminated Areas [J]. *Archives of Environmental Contamination Toxicology*,2014, 67:535-546.
- [16] Claudia Melis, Asa Alexandra Borg, Henrik Jensen, *et al.* Genetic variability and structure of the water vole *Arvicola amphibius* across four metapopulations in northern Norway [J]. *Ecology and Evolution*,2013,3(4):770-778.

[修回日期]2015-05-28)