



中国地鼠线粒体基因组与微卫星遗传标记的研究

宋国华, 陈朝阳, 刘田福, 庞文彪, 高继萍, 张锐虎, 刘茂林, 樊林花

(山西医科大学实验动物中心, 实验动物与人类疾病动物模型山西省重点实验室, 太原 030001)

【摘要】 中国地鼠在生物医学研究中占有重要的地位, 但中国地鼠的分子遗传标记研究尚少。本研究运用生物信息学和比较基因组学等方法分析了中国地鼠的线粒体基因组的碱基组成、基因组结构、基因进化等特征, 为中国地鼠应用于人类疾病动物模型提供基因组数据。建立了中国地鼠近交系遗传质量控制体系, 为中国地鼠种质资源科学评估、合理开发利用奠定了基础。

【关键词】 中国地鼠; 线粒体基因组; 分子进化; 微卫星; 遗传检测

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 05-0004-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.05.002

Study of mitochondrial genomes and molecular genetic marker of microsatellite in chinese hamster

SONG Guo-hua, CHEN Zhao-yang, LIU Tian-fu, PANG Wen-biao,

Gao Ji-ping, ZHANG Rui-hu, LIU Mao-lin, FAN Lin-hua

(Shanxi Medical University, Laboratory Animal Center, Shanxi Key Laboratory of Experimental Animal Science and Human Disease Animal Model, Taiyuan 030001, China)

【Abstract】 Chinese hamster is an important laboratory animal in medical and biological researches, but the molecular genetic markers research was rarely reported. In our study the base composition, gene structure, genetic evolution and other characteristics of mitochondrial genome of Chinese hamster were analyzed using the methods of bioinformatics and comparative genomics, genetic quality detection system of Chinese hamster were also established. These results would supply genome data for animal models of human diseases, and lay the foundation for scientific evaluation and reasonable utilization.

【Key words】 Chinese hamster; Mitochondrial genome; Phylogenetic relationship; microsatellite; Genetic monitoring

1 研究背景

中国地鼠作为源于我国的特色实验动物资源, 在生命科学研究中占有重要地位。它的染色体大、数量少($2n = 22$), 易于辨认, 是研究染色体畸变的良好材料, 也可进行辐射遗传、细胞遗传等研究; 它有一对易于翻出的颊囊, 是微循环研究和肿瘤移植的理想部位; 通过近亲交配而具有的遗传性糖尿病

倾向, 更是理想的实验动物模型^[1]。上世纪八十年代初, 山西医科大学薄家璐教授等从北京郊区捕捉野生地鼠, 在国内首次培育出中国地鼠近交群体^[2]。

在生命科学研究中使用的实验动物不但应有严格的微生物控制, 还应有明确、稳定的遗传背景数据供研究者参考使用。在啮齿类实验动物中, 有关小鼠的各种生物学性状和基因组学研究非常

【基金项目】 山西省实验动物专项资金(2005k01, 2009k02)。

【通讯作者】 宋国华(1973-), 女, 教授, 研究方向: 实验动物遗传标记与疾病动物模型。E-mail: ghsongg@hotmail.com

深入和广泛,但中国地鼠的遗传性状、基因组等基础资料报道很少。过去关于中国地鼠的研究主要集中在染色体核型、RAPD 遗传标记、繁育等方面,其线粒体基因组、分子进化、微卫星遗传标记尚属空白^[3],这些工作的缺失,严重制约了近交系中国地鼠在生物医学领域的应用。提供可供参考使用的中国地鼠的基因组数据,建立可靠的遗传质量检测方法,显得非常迫切和必要。

线粒体基因组是核外遗传系统,具有小型性、多态性和自主性等特点。目前研究表明许多疾病与线粒体基因组的蛋白编码基因变异有关,已深入研究到生物的发育、衰老、肿瘤、代谢、疾病、遗传以及进化等领域^[4,5]。中国地鼠在医学领域有许多重要事件和它有密切关系,因此开展其线粒体基因组结构和功能的研究,对于深入了解中国地鼠发育过程中核内基因与核外基因遗传信息的相互作用、基因表达与调控的分子机理及其与母性遗传性状相关的遗传研究具有重要意义^[4,6]。对中国地鼠和其近缘种的线粒体 DNA 比较研究,将为中国地鼠的起源、种系演化以及特定遗传结构的形成原因提供重要证据,与哺乳类动物线粒体 DNA 的系统分析还将对哺乳类动物的系统演化提供一定证据^[7-9]。

常用的实验动物遗传检测方法有形态学方法、免疫学方法、生物化学标记方法等,随着分子生物学的迅速发展,分子遗传标记技术在实验动物的遗传检测中得以广泛应用,其中包括限制性酶切片段多态性标记(RFLPs)、随机扩增多态性 DNA 标记(RAPD)、扩增片段长度多态性标记(AFLP)、微卫星 DNA 标记(Microsatellite DNA)、单核苷酸多态性标记(SNPs)等^[10]。微卫星 DNA 标记多态性丰富,均匀分布于哺乳动物基因组,检测技术成熟,稳定性好,重复性高,可比性强,已成为目前动物遗传多样性评估和遗传监测研究的首选标记^[11-13]。

因此本课题以中国地鼠为研究材料,对其线粒体全基因组序列进行研究,从分子水平确定其在啮齿类动物中的进化地位。同时建立中国地鼠微卫星遗传检测体系,为种质资源保护、群体变异和遗传连锁图谱构建等提供研究手段。

2 研究目的

中国地鼠作为实验动物,其遗传背景和遗传概貌需要清楚明确,目前还没有进行系统化和规范化研究。本研究参照近缘物种的线粒体基因组,设计

特异引物,应用降落 PCR 技术和生物信息学方法获得中国地鼠线粒体全基因组序列,分析其 37 个基因的结构和特征;从分子水平对啮齿类动物的分类及亲缘关系进行研究,对使用中国地鼠开辟新的动物疾病模型途径和研究多种疾病发病机制具有重要价值。针对遗传质量检测技术,采用构建文库的方法获得中国地鼠微卫星位点并开发微卫星引物,并对 SYB1 近交群体进行检测,建立中国地鼠近交系遗传质量控制体系,为中国地鼠这一独特的实验动物种质资源科学评估、妥善保存和合理开发利用提供了新型的遗传标记。

3 创新点

本项目系统研究了中国地鼠线粒体全基因组和微卫星遗传标记,首次测定中国地鼠线粒体全基因组序列,建立了一套中国地鼠线粒体基因组及相应序列的测定方法,比较分析了中国地鼠与金黄地鼠、大鼠、小鼠、田鼠的线粒体的基因组结构,阐明其基因组成、基因排列和基因结构特点,发现与金黄地鼠的序列同源性较高,结构相似。利用 GenBank 中的线粒体序列,分析其序列差异,构建分子系统关系,探讨中国地鼠、金黄地鼠、田鼠、小鼠、大鼠的进化关系。成功构建了中国地鼠基因组微卫星富集文库,筛选出一套多态性较高的微卫星标记;并对 SYB1 近交系中国地鼠进行检测,为中国地鼠遗传图谱构建、遗传监测研究奠定了基础。

4 讨论

本研究应用生物信息学技术对线粒体基因组的 13 个蛋白编码基因、2 个 rRNA 基因、22 个 tRNA 基因和 1 个 D-loop 区进行基因定位,分析 37 个基因结构和特征;利用 GenBank 所得到的线粒体序列,分析中国地鼠、金黄地鼠、田鼠、小鼠、大鼠的序列差异,构建分子系统关系,从比较医学角度为中国地鼠在生物医学应用研究提供理论依据。本研究建立的微卫星遗传检测方法与形态学检测法、生化标记检测法、免疫学技术检测法等传统的遗传检测方法相比,检测结果更准确、更可靠。尤其针对近交系动物进行检测,如果用一定数量的微卫星引物进行扩增,基因型均表现相同,说明基因位点纯合,达到近交系的要求;如果基因型表现不同,说明在繁育过程中可能发生了遗传变异或遗传污染^[14,15]。

(下转第 15 页)

- 2003, 15(4): 251–252.
- [13] 屠鹏飞. 中药质量标准现状及其发展趋势[A]. 海峡两岸中医药发展大会论文集[C], 2009 年.
- [14] QI WH, SHEN LZ, WANG SL, *et al.* Establishment of beagle dog model with implanted telemetry transmitter[J]. Chin Pharm Aff, 2009, 23(7): 650–652.
- [15] 戈峰, Ming Liu, 李琦. 基础胸外科[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2003: 539–550.
- [16] 谭学诗. 动物疾病诊疗[M]. 太原: 山西科学技术出版社, 2009: 277–281.
- [17] 邓小明, 朱科明. 常用实验动物麻醉[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2001: 76–83.
- [18] 牛义民, 张天宏. 外科动物手术学[M]. 贵阳: 贵州科学技术出版社, 2004: 59–61.
- [19] 江朝光. 实用实验动物外科技术[M]. 北京: 人民军医出版社, 2006: 227–229.
- [20] 王三龙, 张颖丽. 清醒 Beagle 犬安全药理心血管遥测系统验证研究[J]. 中国药理学杂志, 2010, 45(11): 828–831.
- [21] Qin XS, Jin KH, Ding BK, *et al.* Effects of extract of Ginkgo biloba with venlafaxine on brain injury in a rat model of depression[J]. Chin Med J, 2005, 118(5): 391–397.
- [22] Mechan AO, Moran PM, Elliott M, *et al.* A comparison between Dark Agouti and Sprague-Dawley rats in their behaviour on the elevated plus-maze, open-field apparatus and activity meters, and their response to diazepam[J]. Psychopharmacology, 2002, 159(2): 188–195.
- [23] Rygula R, Abumaria N, Flugge G, *et al.* Citalopram counteracts depressive-like symptoms evoked by chronic social stress in rats[J]. Behav Pharmacol, 2006, 17(1): 19–29.
- [24] Tchekalarova J, Kubova H, Mares P. Postnatal caffeine exposure: effects on motor skills and locomotor activity during ontogenesis[J]. Behav Brain Res, 2005, 160(1): 99–106.
- [25] Salmi P, Ahlinius S. Sedative effects of the dopamine D1 receptor agonist A 68930 on rat open-field behavior[J]. Neuroreport, 2000, 11(6): 1269–1272.
- [26] Lalonde R, Lewis TL, Trazielle CS. Transgenic mice expressing the β APP695 SWE mutation: effects on exploratory activity, anxiety, and motor coordination[J]. Brain Res, 2003, 977(1): 38–45.
- [27] Chen R, Xue J, Xie ML. Reduction of isoprenaline-induced myocardial TGF- β 1 expression and fibrosis in osthole-treated mice[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2011, 256(2): 168–173.

[收稿日期]2017-01-04

(上接第 5 页)

因此,应用微卫星标记方法更适用于近交系动物的遗传检测,可以进行纯合位点的判定,还能分析基因位点的变异情况。本研究获得的中国地鼠线粒体微卫星遗传质量控制体系不仅丰富和完善了我国实验动物质量标准体系,还为中国地鼠的繁育与开发利用等提供了技术支撑。

参考文献:

- [1] 刘田福. 中国地鼠山医群体近交系的培育[J]. 实验动物科学与管理, 2003, 20(增刊): 22–24.
- [2] 秦川. 医学实验动物学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008, 94.
- [3] 宋国华, 林强, 岳文斌, 等. 中国地鼠线粒体基因组序列分析与分子进化[J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(1): 70–74.
- [4] 宋国华, 陈朝阳, 庞文彪, 等. 五种啮齿类动物 mtDNA 蛋白编码基因序列变化的比较[J]. 中国实验动物学报, 2013, 21(2): 70–74.
- [5] 陈刚, 杜卫东, 曹慧敏. 线粒体 DNA 突变与相关人类疾病[J]. 遗传, 2007, 29(11): 1299–1308.
- [6] Koszul R, Malpertuy A, Frangeul L, *et al.* The complete mitochondrial genome sequence of the pathogenic yeast *Candida (Torulopsis) glabrata* [J]. FEBS Lett, 2003, 534(1–3): 39–48.
- [7] Nakao M, Yokoyama N, Sako Y, *et al.* The complete mitochondrial DNA sequence of the cestode *Echinococcus multilocularis* [J]. Mitochondrion, 2002, 1(6): 497–509.
- [8] Triant DA, Dewoody JA. Accelerated molecular evolution in *Microtus* (Rodentia) as assessed via complete mitochondrial genome sequences[J]. Genetica, 2006, 128(1–3): 95–108.
- [9] Cao Y, Adachi J, Janke A, *et al.* Phylogenetic relationships among eutherian orders estimated from inferred sequences of mitochondrial proteins: Instability of a tree based on a single gene[J]. J Mol Evol, 1994, 39(5): 519–517.
- [10] 李雷. 微卫星 DNA 在近交系小鼠遗传监测中的应用[D]. 郑州大学硕士论文, 2007: 8–9.
- [11] 李军林, 张思河, 魏泓. 用微卫星引物对近交系小鼠进行遗传监测[J]. 西北农业学报, 2001, 10(1): 1–3.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] Song GH, Geng JN, Jia RY, *et al.* Isolation and characterization of 16 novel microsatellite loci in two inbred strains of the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*) [J]. Genet Mol Res, 2011, 10(3): 2245–2256.
- [15] 陈振文. DNA 指纹图与微卫星 DNA 技术在近交系大、小鼠遗传监测中的应用研究[D]. 中国农业大学博士论文, 2004, 62–63.

[收稿日期]2016-10-29