

豚鼠基因组 26 个多态性微卫星标记的筛选

刘迪文¹, 杨伟伟², 吴宝金²

(1. 浙江大学实验动物中心, 杭州 310058; 2. 杭州师范大学实验动物科学实验室, 杭州 310036)

【摘要】 目的 筛选豚鼠基因组的多态性微卫星标记, 为豚鼠遗传质量控制及基因定位等工作奠定基础。方法 采用磁珠富集法和豚鼠基因组数据库筛选法获取微卫星位点序列, 通过分析和初步筛选, 挑选部分候选位点, 根据其序列设计引物, 对 5 种不同来源的豚鼠基因组 DNA 标本进行 PCR 扩增, 以期获得多态性分子标记。结果 本实验采用磁珠富集法共获得微卫星序列 304 个, 设计引物 125 对, 最终获得多态性位点 1 个, 暂未发现多态性的特异性位点 17 个; 用数据库筛选法共获得微卫星序列 292 个, 设计并合成相应引物 178 对, 最终发现多态性位点 25 个, 暂未发现多态性的特异性位点 28 个。结论 本实验获得 26 个多态性微卫星标记, 45 个潜在的候选标记, 为微卫星标记在豚鼠遗传质量监测及突变基因定位等工作的应用奠定了基础。

【关键词】 豚鼠; 微卫星; 多态性标记; 筛选

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 03-0078-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.03.016

26 polymorphic microsatellite markers screened from the genome of guinea pigs

LIU Di-wen¹, YANG Wei-wei², WU Bao-jin²

(1. Laboratory Animal Center, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

2. Laboratory of Experimental Animal Science, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036)

【Abstract】 Objective To screen microsatellite DNA markers from genome of guinea pigs for further genetic quality control and gene-mapping of this species. **Methods** Microsatellite sequences were obtained by magnetic bead enrichment and genome database screening, and candidate loci were chosen to design primers. Thereafter, genomic DNA of 5 different guinea pig strains were employed to select polymorphic microsatellite DNA markers based on PCR amplification results. **Results** A total of 304 microsatellite sequences were analyzed by magnetic bead enrichment and 125 primers were designed. One polymorphic microsatellite DNA marker and 17 specific sites (no polymorphic was found) were determined. By gene-mapping, 292 microsatellite sequences were obtained and 178 primers were analyzed, totally 25 polymorphic microsatellite DNA markers and 28 specific sites (without polymorphisms) were discovered. **Conclusions** We obtained 26 polymorphic microsatellite DNA markers and 45 potential markers in guinea pigs, and these may lay a foundation for application of microsatellite DNA markers in genetic quality control and gene-mapping of guinea pigs.

【Key words】 Guinea pig; Microsatellite; Polymorphism markers; Screening

豚鼠 (*Cavia porcellus*) 又名荷兰猪或荷兰鼠。1780 年 Lavisier 首次用豚鼠作热源实验, 此后开始实验动物化并遍布世界。因其特殊的解剖学及生物学

特征, 豚鼠广泛应用于生物医学研究中的各个领域。目前, 国内豚鼠主要为封闭群 Hartley 品系, 由于引进年代较长, 饲养规模及繁殖过程中未能实现完全

【基金项目】 卫生部科学研究基金 (编号: 98-2-323); 浙江省公益性技术应用研究计划项目 (编号: 2012C37084)。

【作者简介】 杨伟伟 (1983 年 -), 女, 兽医师。E-mail: 116606412@qq.com

【通讯作者】 刘迪文 (1958 年 -), 男, 研究员。E-mail: liudiwen2004@163.com, 为此篇文章做出同等贡献, 为共同第一作者。

的随机交配,封闭群豚鼠的近交现象比较严重^[1]。为了保持豚鼠的基因杂合度及遗传稳定性,对豚鼠遗传质量实行监测成为重要的课题,而开发一套基因组分子标记是检测的前提^[2-3]。此外,在豚鼠饲养过程中,研究人员发现并分离出多个豚鼠突变株,如刘迪文等^[4-5]筛选培育 Zmu-1;DHP 豚鼠,具有特殊的生物学性状,对口蹄疫病毒的易感性达 100%,更适于制作该病的感染模型^[6]。但是 Zmu-1;DHP 豚鼠特殊性状的分子机制尚不清楚,要解答这一问题,定位鉴定相关突变基因十分必要,但豚鼠基因组遗传标记的缺乏使得相关工作无法深入。

微卫星作为第二代分子标记,以其较高的多态性及简便的操作,能够满足一般实验室对遗传研究的要求,而得到较为广泛的应用^[7-10]。对于基因组序列完全未知的物种,磁珠富集法筛选微卫星标记的报道很多,是目前微卫星标记开发广泛采用的方法。与此同时,已有不少物种的基因组序列登录在 GenBank 等数据库中,采用生物信息学手段为获取并筛选分子标记提供了可能。鉴于以上原因,本实验先后采用磁珠富集法和数据库筛选法对豚鼠基因组微卫星位点进行筛选及多态性探索,从而为微卫星标记在豚鼠遗传质量控制及突变基因定位等方面的应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

普通级豚鼠,雌性,6~8 周龄,①DHP 系,花色伴腿部黑色;②Zmu-1;DHP 远交系,纯白色;③Zmu-1;DHP 近交系,纯白色;④DHP 系,全黑色;由浙江大学实验动物中心提供【SCXK(浙)2012-0052】;⑤卷毛豚鼠购于浙江武义县;共计 5 种,2-3 只/种。实验在浙江大学实验动物中心进行【SYXK(浙)2012-0178】,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.1.2 主要试剂与仪器

链霉亲和素磁珠#S1420S(NEB,英国);pGEM-T vector 载体(Promega,美国);限制性内切酶 Bsp143I 及 MboI(Fermentas,美国)。磁性分离架(S1506S,美国);生化培养箱(SHP-250,中国);凝胶成像系统(Tanon2500,中国);PCR 仪(Bio-Rad T100,美国)等。

1.2 方法

1.2.1 磁珠富集法获取微卫星序列

采用酚氯仿法提取豚鼠基因组 DNA,经 Bsp143I 和 MboI 酶切,回收小 DNA 片段,与 Linker-1(P-5'-GATCGCAGAATTTCGCACGAGTACTAC-3')和 Linker-2(5'-GTAGTACTCGTGC GAATTCTGC-3')连接,PCR 扩增,回收产物与生物素标记的 (AC)₁₆A 和 (AG)₁₆A 探针进行杂交,再将杂交液和预先平衡的磁珠轻轻混合均匀,25℃ 孵育 30 min,依次清洗,最后取 50 μL 0.1 × TE,95℃ 变性 10 min,放到磁力架上,上清即为捕获微卫星序列,PCR 扩增回收,与 pGEM-T 载体连接转化,筛选阳性克隆,进行 PCR 检测及 DNA 测序鉴定。

1.2.2 数据库筛选法

数据库筛选的微卫星序列来自 Genome Browser Home(<http://genome.ucsc.edu/>)网站。操作步骤如下:1)豚鼠基因组序列的查找:点击“Genomes”,选择物种“Mammal”,“Guinea pig”;2)微卫星核苷酸重复单元的查找:点击“Tools”选择“Table Browse”,设置参数,查找并保存序列及位置信息;3)微卫星核苷酸重复单元两侧序列的查找:返回到 Sequence Retrieval Region Options,在两侧各设置 200 bp 序列,获得含有两侧序列的微卫星序列并保存。

1.2.3 引物设计

根据微卫星两侧高度保守的序列,设计特异性引物。本实验选用两碱基重复 7 次及以上,三碱基重复 4 次以上的序列,设计引物,选择扩增长度在 100~300 bp 的序列。送上海生物工程有限公司合成。

1.2.4 初步及多态性检测

首先进行常规 PCR 初步筛选,其次选择性地梯度 PCR 扩增,通过优化 Mg²⁺ 浓度(1~4 mol/L)、退火温度(45~65℃)等条件,建立最佳 PCR 反应体系。以五种豚鼠基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳银染显色,筛选多态性微卫星。

2 结果

2.1 磁珠富集法筛选微卫星标记

2.1.1 微卫星序列的获得及类型统计

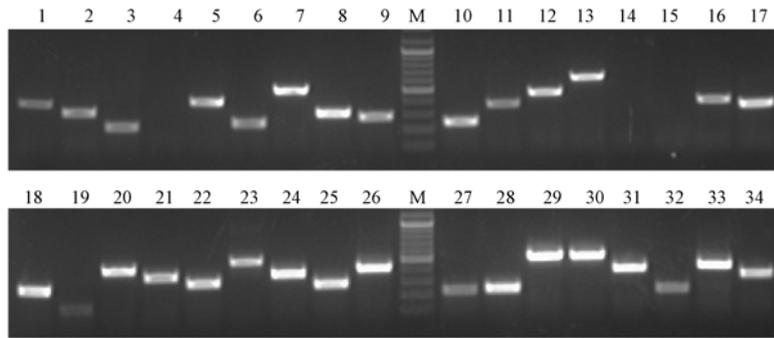
磁珠富集捕获 300~1000 bp 目的片段,连接转化,筛选阳性克隆,经菌液 PCR 初步检测(部分结果如图 1),挑选阳性克隆 312 个,DNA 测序,304 个含

有微卫星序列,阳性率为 97.5%。经 SSHunter 软件统计分析,304 个序列均为二核苷酸重复,类型较为单一。AC/CA 占 62.4%;GT/CA 占 20.8%;TC/AG 占 16.8%。

2.1.2 引物合成及多态性筛选

使用 DNASTar 软件针对 304 个微卫星序列,设计引物 125 条(41.12%);初步检测,特异性引物 22

条;多态性检测,多态性位点 1 个,暂未发现多态性的位点 17 个(结果见图 2),其余 4 个均出现杂带,无法进行多态性判断。微卫星位点信息引物编号 HZ-001;引物序列:CGTGATATGGCCTGGTCGTGATGAAAAAGATGGGCTGGTT;微卫星类型:(AC)17(AC)21;退火温度:59℃;产物长度:208 bp;有多态性。

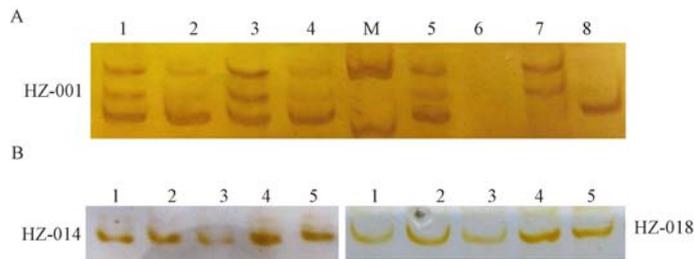


注:M:Marker,第4,14,15泳道为假阳性,其他的均为阳性。

图1 菌落 PCR 鉴定结果

Note:M: Marker; Lane 4, 14, 15 are false positive, the others are positive.

Fig.1 Results of colony PCR amplification



注:A:HZ-001 在不同来源样本 DNA 中扩增出不同的条带,为多态性微卫星标记;B:HZ-014 和 HZ-018 在现有的不同来源样本中扩增出同一条带,未发现多态性的微卫星标记。

图2 磁珠富集法筛选微卫星位点 PAGE 电泳结果

Note: A: The polymorphic bands (HZ-001) are in different DNA samples. B: The same band (HZ-014 and HZ-018) is no polymorphic microsatellite marker in different DNA samples.

Fig.2 PAGE electrophoresis results of microsatellite loci screened using a magnetic bead enrichment protocol

2.2 数据库筛选微卫星标记

2.2.1 基因组数据检索及类型统计

利用豚鼠基因组数据库进行部分筛选,获得微卫星序列 292 个,以二核苷酸重复单元为主(共计 216 条)占 73.97%,其中 TC/AG 为主(149 条),占二核苷酸重复单元的 68.98%;三核苷酸重复单元(共计 30 条)占 10.27%,其中以 TCT 较多(7 条),占三核苷酸重复单元的 23.33%;四核苷酸重复单元(共计 39 条)占 13.36%,其中以 TCTT 较多(10 条),占四核苷酸重复单元的 25.64%;此外,五核苷

酸重复单元和六核苷酸重复单元分别为 2.06% (5 条)和 0.34% (1 条)。

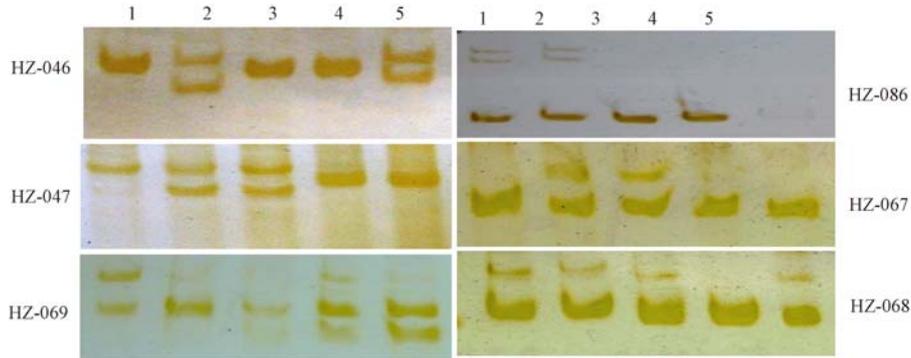
2.2.2 引物设计及多态性筛选

使用 DNASTar 软件针对 292 个序列,设计引物 178 条(60.96%);初步检测,特异性引物 90 条(50.56%);多态性检测,共获得多态性位点 25 个(27.78%)(如图 3),暂未发现多态性的特异性扩增位点 28 个(31.11%),其余 37 个均出现杂带,有待进一步优化。微卫星位点信息(见表 1)。

表 1 数据库筛选 25 个豚鼠微卫星位点相关信息

Tab. 1 Characteristics of 25 microsatellite loci screened from the genome database of guinea pig

引物编号 Primer numbers	引物序列 Primer sequence 5'-3'	微卫星类型 Microsatellite types	退火温度 Annealing temperature /°C	产物长度 Product length/bp	多态性 Polymorphism
HZ-030	CCATGTCCTCTTCTTGCCACTAC ATTGATCCATACCCATTTA	(CA) ₂₃	58	153	Yes
HZ-031	ACTCCAGGGCAGAAGCAACAT GGGTCACCGAGGCATAAC	(AG) ₂₅	59	290	Yes
HZ-032	TGTTTCAGCCCCAGACTC CTCAAGAAGACAAAAGGAAAGA	(CTTT) ₁₄ (TC) ₁₅ (TCTT) ₁₄	59	276	Yes
HZ-033	GATATTTGGATGATTACTTGTGTT CCAGTTGAGGATGACT	(TTC) ₂₂ ttt (TTC) ₂₄	59	297	Yes
HZ-045	TTTTTATTTTGAGATGGTGTGAGT AGGCTGCTAGTTCTATCTTTTG	(GA) ₄₅	59	238	Yes
HZ-046	CTGACCTCCTTCTCCTCTTC CTAAACAACCAATGGGCTACAG	(TTC) ₃₃	58	191	Yes
HZ-047	GAAGAAGAAGAAAAGAAGAAGAGG CGGCCAAGCAGAGGAAACCA	(AGA) ₁₇ aagaaga (AGG) ₁₃	59	203	Yes
HZ-048	AGATAGGGAGAAGATAGGGGAGAG CCTGATGCATGGTGGTTGGTAGAG	(AGAGAC) ₆	59	215	Yes
HZ-049	CTGTAGGTAGATGATGGCTGTC TCTTCCCTTTTGTATGCTGAT	(AG) ₂₃	58	235	Yes
HZ-050	GATGGGCCTTTGGTTGGATGG GGAGGAGAAGAAGAGGAAAAAGAA	(CTT) ₂₇	59	255	Yes
HZ-051	ACCTGGGATTTAGCTGAGTGT CTTCTTCTTCTTCTTTTGTTC	(GAA) ₂₄	56	182	Yes
HZ-052	TGAAGGGCACTAGAAGCAGAAAG GTCACCTCGGCACCATCAAT	(AG) ₇	59	230	Yes
HZ-065	AAGGTTTGTACATTCCATA AGCCTCTTCTGTGTCTGTC	(AG) ₂₂	60	230	Yes
HZ-066	CTCTTTCCTTCTTCTTCTTCTCC GTGGCCCTGACATCTCG	(CTTC) ₇ CTCC(CTTT) ₁₇	59	158	Yes
HZ-067	GCCCAGCAAAGCGTGAGG TTTGTGGGGAATTTAGAAGGAT	(AG) ₆	59	240	Yes
HZ-068	ACCACGGTTCCTCGGATGTT TCACCACGCAGACCTTAGAGT	(TC) ₂₈	60	241	Yes
HZ-069	TTTATTTGGCTCACGGTTTCA CTCTGGGACTGTATCTTGCTCT	(AG) ₂₀	59	197	Yes
HZ-072	CAAATAGCTCTGTGCAAACCTGGTA AAGAAAGAAAAGATGGAAGGAAGG	(TCTT) ₁₈	59	241	Yes
HZ-073	AAAAGAAGTTGAAAAGGAAAAGTA ACATTGGGTCATAGTCTGGAT	(TC) ₄₃	59	249	Yes
HZ-074	GCTGGCCTGGAATGATACC ACAGGAAGGAAGTGGGAAAAGGAG	(CTTT) ₁₆	59	235	Yes
HZ-075	GGCCCTCCCTTCACTTC TAAATCCTCAAACCATCAACTTCA	(AC) ₈ GCAT(AC) ₁₁ GCAT(AC) ₁₉	58	171	Yes
HZ-085	GTCTTCTGGTCTGTGTATCTTAG ATGCCATGAGTTCAATTTCCAGTT	(TTCT) ₅ (TTTC) ₁₄	59	196	Yes
HZ-086	TGTCCATTCTTGCTCTACTCAG TACTTGCCCTTTTCACTACAG	(TGTCTG) ₁₁	58	265	Yes
HZ-087	AGCGAGACAGAATAATAGGAAAAT AGGGGTGCCATGAAATCTC	(CTT) ₁₆	59	204	Yes
HZ-088	GTGGCTGAACCTAGAATGAGTGA GCAAGGCAGTGAATACAGC	(TC) ₂₉	59	244	Yes



注:HZ-046, HZ-047, HZ-069, HZ-086, HZ-067, HZ-068 在不同来源样本中扩增出不同的条带;可见明显的多态性。

图 3 数据库法筛选多态性微卫星标记 PAGE 电泳结果

Note: Different polymorphic bands (HZ-046, HZ-047, HZ-069, HZ-086, HZ-067, HZ-068) are in different DNA samples.

Fig. 3 PAGE electrophoresis results of polymorphic microsatellite loci screened from the genome database of guinea pig

3 讨论

3.1 磁珠法和数据库筛选法筛选微卫星标记的对比

微卫星标记的开发过程需要耗费相当的人力财力,选择合适的开发方法会起到事半功倍的效果。对于基因组序列完全未知的物种,磁珠富集法筛选微卫星标记的报道很多,是目前微卫星标记开发广泛采用的方法。朱亮^[11]采用磁珠富集法获得 98 个豚鼠微卫星序列,合成引物 35 对,多态性位点 17 个。本实验磁珠富集法获得微卫星序列 304 个,合成引物 125 条 (125/304, 41.12%),最终获得多态性位点 1 个,暂未发现多态性的位点 17 个。本文采用豚鼠基因组数据库筛选法进行部分搜索,其核苷酸重复单元类型较多,引物设计 (178/292, 60.96%) 及特异性引物筛选 (90/178, 50.56%) 的比例相对较高,多态性位点 25 个,未发现多态性的位点 28 个。总体来讲,磁珠富集法存在操作流程复杂,费用高,获得理想的微卫星序列相对较少等缺点。相比之下,数据库法具有极大的筛选利用空间。利用生物学软件从 GenBank、EMBL、DDBJ、Genome Browser Home 等数据库中检索微卫星序列无疑是一个经济、简便、快速有效的方法。

3.2 豚鼠基因组分子标记技术的研究现状

豚鼠作为常用实验动物,具有十分显著的特征,如血清补体含量最高、体内不能合成维生素 C,耳蜗大且听觉灵敏等,但其遗传学研究一直远远落后于其它物种,而其相关机制的研究受制于其遗传学的

发展。Genbank 数据库中豚鼠微卫星标记仅有 6 个^[12],国内除朱亮等^[11]成功获得豚鼠微卫星引物 17 对外,未见其他报道。目前,豚鼠基因组分子标记的数量尚不能满足对豚鼠遗传检测及突变基因定位的需要。本文筛选的 26 个多态性微卫星位点及 45 个候选标记是对相关工作的极好补充,候选标记在扩大样本来源及数量的基础上进行多态性检测,很可能成为多态性标记。研究者可以利用现有的豚鼠基因组序列信息进行分子标记的筛选 (包括微卫星及 SNP),待基因组序列组装后,可依据微卫星序列将其锚定到对应的染色体区域,故豚鼠分子标记的开发在基因组测序公布前后均应该得到重视,以促进豚鼠遗传学的发展。

3.3 关于豚鼠微卫星标记的多态性及群体特征

Burgos-Paz 等^[13]利用数据库中 6 个豚鼠微卫星标记,对哥伦比亚 7 个地区 3 个品系 (本土种,改良种和宠物种共计 384 只) 豚鼠的遗传多样性及群体结构进行研究,结果显示:等位基因丰度在 3.0 - 6.56,观察杂合度在 0.33 - 0.60,提示种群间的遗传分化很低。朱亮等^[1]利用自主筛选的 8 个微卫星标记对封闭群豚鼠 (1000 个样本中随机选择 72 个) 的遗传情况进行检测,等位基因丰度在 2.0 - 5.0,杂合度在 0.2222 - 0.5833,群体的遗传多态性处于中等水平,在繁殖过程中存在一定程度上的近交现象。以上结果提示封闭群豚鼠的遗传分化较低,群体结构单一,近交现象比较严重。

本文用 26 个微卫星标记检测现有 5 种来源的豚鼠群体,发现这些位点复等位基因数目远远低于

朱亮等结果,分析原因可能是我们 5 种豚鼠有三个远交系来自浙江大学,亲缘关系较近,一个近交系又是由浙江大学的远交系培育而成,产生突变的可能性不大,而外购豚鼠的数量较少,这些问题都可能导致豚鼠群体的近交系数上升,微卫星标记的多态性下降,以至于本研究结果中多态性位点的比例较低。作者 05 年曾用 DNA 指纹技术分析 Zmu-1;DHP 和 DHP 品系豚鼠,发现近交系数位于 0.7 左右,处于中高度近交水平^[14],与本文研究结果近似。关于国内豚鼠的遗传背景及检测标准有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 朱亮,蔡月琴,屠珏,等. 应用微卫星标记研究 Dunkin Hartley 豚鼠封闭群的遗传背景 [J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(1):51-55.
- [2] 李薇,江其辉,杜小燕,等. 封闭群长爪沙鼠遗传标准的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2011, 28(2):31-36.
- [3] 李瑞生,陈振文,李晓娟,等. 微卫星 DNA 标记在常用实验动物遗传检测中的分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(10):75-76.
- [4] 刘迪文. Zmu-1;DHP 豚鼠部分生物学特性研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(5):492-495.
- [5] 刘迪文. Zmu-1;DHP 豚鼠免疫学功能研究 [J]. 浙江农业学报, 2006, 18(4):246-249.
- [6] 刘迪文. 2 个品系豚鼠对口蹄疫疫苗的免疫反应 [J]. 中国兽医学报, 2008, 28(3):272-275.
- [7] 陈振文,赵太云,孙贺娟,等. 微卫星 DNA 与生化标记分析对长爪沙鼠群体遗传分析的比较 [J]. 中国实验动物学报, 2006, 14(4):276-279.
- [8] 吴宝金,茅慧华,曾咏梅,等. snthr^{-1Bao} 稀毛小鼠突变基因的精确定位及克隆鉴定 [J]. 动物学研究, 2009, 30(3):267-275.
- [9] 施美莲,徐平,殷筱舒,等. 腹侧黄斑小鼠的部分特征及其突变基因的染色体定位 [J]. 动物学研究, 2012, 33(3):290-297.
- [10] 闻旭阳,戴广海. hMLH1 基因启动子 CpG 岛甲基化,微卫星不稳定与胃癌 [J]. 中国医药导报, 2011, 8(7):9-11.
- [11] 朱亮,蔡月琴,屠珏,等. 磁珠富集法筛选实验豚鼠微卫星分子标记 [J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(6):29-34.
- [12] Asher M, Lippmann T, Epplen J, et al. Large males dominate: ecology, social organization, and mating system of wild cavies, the ancestors of the guinea pig [J]. Behav Ecol Sociobiol, 2008, 62:1509-1521.
- [13] Burgos-Paz W, Cerón-Muñoz M, Solarte-Portilla C. Genetic diversity and population structure of the Guinea pig (*Cavia porcellus*, Rodentia, Caviidae) in Colombia [J]. Genet Mol Biol. 2011, 34(4):711-718.
- [14] 刘迪文,母连志. 用 DNA 指纹技术研究 Zmu-1;DHP 豚鼠的群体遗传结构 [J]. 中国兽医学报, 2005, 25(6):661-663.

[收稿日期] 2014-01-06