

豚鼠个体及品系间多态性微卫星位点筛选

卫 振, 洪胜辉, 刘迪文*

(浙江大学实验动物中心, 杭州 310058)

【摘要】 目的 筛选豚鼠多态性微卫星标记, 为鉴定豚鼠遗传结构及基因定位提供基础信息。**方法** 从国外网站筛查得豚鼠基因组 DNA 资料, 选择 AC/GT 为核心的微卫星序列, 根据其旁侧序列用软件设计 400 对引物。经过二轮 PCR 及电泳等实验, 以电泳条带作为遗传标记, 通过豚鼠微卫星结构的评价筛选出多态性引物。**结果** 第一步用 5 个品系豚鼠的 10 份 DNA 样本进行 PCR, 从 400 对引物中筛选出约 110 对具有多态性的豚鼠引物, 其产物电泳条带数为 1~3 条。第二步用 5 个品系豚鼠的 60 份 DNA 样本进行 PCR, 从上述 110 对引物中筛选出 51 对电泳条带分辨率高的多态性引物, 其中 10 余对引物在品系间呈标记一致或多数一致的差异。**结论** 筛选出的 51 对引物在个体及品系间呈多态性, 未见其他报道, 可用于常规检测研究, 部分可能用于豚鼠性状基因定位。

【关键词】 豚鼠; 微卫星标记; 多态性; 遗传结构

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 11-0032-06

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2017. 11. 007

Screening of microsatellite loci with polymorphism among individuals and strains of guinea pigs

WEI Zhen, HONG Sheng-hui, LIU Di-wen*

(Laboratory Animal Center, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

【Abstract】 Objective To screen the polymorphism microsatellite markers of guinea pigs, and provide basic information for identification of genetic structure and gene mapping in guinea pigs. **Methods** The genomic DNA of guinea pigs was found out on foreign websites, and microsatellite sequences characterized by AC/GT were selected. A total of 400 pairs of primers were designed using software according to their flanking sequences. After two rounds of PCR and electrophoresis, with the electrophoresis bands serving as genetic markers, the polymorphic primers were screened by the evaluation of microsatellite structure of guinea pigs. **Results** At the first step, 10 DNA samples from 5 strains of guinea pigs were taken for PCR, and 110 pairs of polymorphic microsatellite markers with 1 - 3 electrophoretic bands were screened from the designed 400 pairs of primers. At the second step, 60 DNA samples from 5 strains of guinea pigs were assayed by PCR and 51 pairs of polymorphic primers with high resolution electrophoresis bands were screened from the above 110 pairs of primers. Among these screened 51 primers, more than 10 pairs of primers showed accordant or mostly accordant differences among strains. **Conclusions** The 51 pairs of primers are polymorphic among individuals and strains, and have not been found in other reports so far. They can be used for conventional genetic detection and related studies, and some of them can be used for gene mapping of the traits in guinea pigs.

【Key words】 Guinea pigs; Microsatellite markers; Polymorphism; Genetic structure

[基金项目] 浙江省公益技术应用研究(实验动物)计划项目(编号:2017C37144); 卫生部科学研究基金(编号:98-2-323)。

[作者简介] 卫振(1982-), 男, 研究方向: 实验动物模型资源开发。E-mail: mudi001@126.com

[通讯作者] 刘迪文(1958-), 男, 研究方向: 实验动物育种与遗传学。E-mail: liudiwen2004@163.com

微卫星是基因组内含子的一种特殊 DNA 结构,由 2~6 个核苷酸序列片段首尾重复连接而成,动物品系或个体间因该片段重复次数不同,常致使微卫星总序列长度引起差异,表现出同一位点呈现多态性,因此微卫星成为研究实验动物遗传结构有用的工具。Burgos-Paz 等^[1]利用 6 对引物研究了哥伦比亚豚鼠的遗传多样性及群体结构。动物品系间呈一致性差异的微卫星标记是研究基因遗传规律、定位新基因,进而揭示动物优势性状分子机理的分子标记,例如邵义祥等^[2]利用 39 对小鼠品系间一致差异的微卫星标记,将导致角膜基质变性小鼠的突变基因定位至 13 号染色体。

豚鼠是药理学、免疫学、病毒学、眼耳科疾病等研究领域应用的实验动物,目前我国多数地区使用的是上世纪 30 年代从国外引进的英国种花色豚鼠,各地遗传差异较大,实验效果较差。近 10 年又引进 DHP 品系白色豚鼠,但应用数量少,缺乏有关生物学及特点资料。经过多年努力,本中心利用上述两种豚鼠于 2000 年培育出 Zmu-1: DHP 远交系白色豚鼠^[3],同时还分离出 Zmu-2: DHP 远交系黑色豚鼠。研究发现, Zmu-1: DHP 品系豚鼠具有多项优越性状^[4-6]。

众所周知,远交系基因呈高度杂合,性状基因定位难度较大,而近交系则基因纯合,个体遗传一致,成为定位新基因理想的材料。于是,本中心于 2002 至 2015 年将 Zmu-1: DHP 远交系豚鼠培育成 Zmu-1: DHP 近交系白色豚鼠(22 代)^[7]。2009 至 2015 年又将 Zmu-2: DHP 远交系培育成 Zmu-2: DHP 部分近交系黑色豚鼠(9 代)。

截止目前本中心已有 5 个品系的豚鼠,要鉴定这些种系的遗传结构,研究其遗传特性的分子机理,定位优越性状的基因,必须设计一种实验思路,而借助微卫星作为分子标记辅助进行上述研究不失为一种方便可靠的方法。因微卫星位点广泛分布于动物基因组,人们对其数量掌握得越多,就越能发挥其作用。本文拟从豚鼠基因组中克隆微卫星位点,并筛选出多态性的位点及品系间呈一致差异的位点,为豚鼠育种、分子遗传结构鉴定及优越性状基因定位等奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

英国种远交系花色豚鼠 15 只;Zmu-1: DHP 远交系白色豚鼠 20 只;Zmu-2: DHP 远交系黑色豚鼠

15 只;Zmu-1: DHP 近交系白色豚鼠 6 只(其中 1 亚系 1 只,2 亚系 5 只);Zmu-2: DHP 近交系黑色豚鼠 4 只。所有豚鼠性别不限,成年,体重 300~450 g,普通级[SCXK(浙)2012-0052],[SYXK(浙)2012-0178]。

1.2 主要仪器

PCR 仪(ABI 公司);电泳仪(Bio-Rad 公司);凝胶图像仪(Bio-Rad 公司);离心机(Eppendorf 公司);等。

1.3 实验方法

1.3.1 豚鼠基因组 DNA 提取

豚鼠行心脏采血每只 1 mL,肝素抗凝,按照说明书介绍用 Takara 试剂盒提取豚鼠基因组 DNA,最后溶解在 TE 缓冲液中。

1.3.2 微卫星引物设计

从加州大学圣克鲁兹学院 Genome Browser Home(<http://genome.ucsc.edu/>)网站的数据库内随机查找核心为 AC、GT 重复序列的豚鼠微卫星 DNA 序列,用 Primer 5.0 软件设计引物序列,委托 Invitrogen 公司合成引物。

1.3.3 小样本多态性微卫星位点引物筛选

随机从上述 5 个豚鼠品系中,共选取 10 份样本,通过 PCR 进行初次扩增,用凝胶电泳筛选出多态性较高、条带少及清晰度高的位点引物。豚鼠微卫星位点 PCR 扩增,产物电泳及电泳条带鉴定等方法见参考文献^[8]。

1.3.4 多样本个体及品系间多态性微卫星位点引物筛选

从 1.3.3 筛选出的多态性微卫星位点中,挑选差异程度高、条带距离较远的引物,对上述 5 个豚鼠品系的 60 份样本进行 PCR,筛选出多态性高,品系内基本一致、品系间呈差异的引物。

2 结果

2.1 豚鼠多态性位点初步筛选

通过网站搜索,共设计 400 个豚鼠微卫星位点的引物,用小样本筛选出约 110 对多态性引物,部分引物 PCR 产物电泳图谱见图 1。

从图中可见,被选豚鼠微卫星位点扩增条带清晰,多态性差异较大,条带间区分显著,条带数量 1~3 条,其 DNA 序列长度在 100~250 bp 之间。

2.2 多样本豚鼠多态性位点的筛选

从 110 对引物扩增的分子标记中,挑选出 51 对

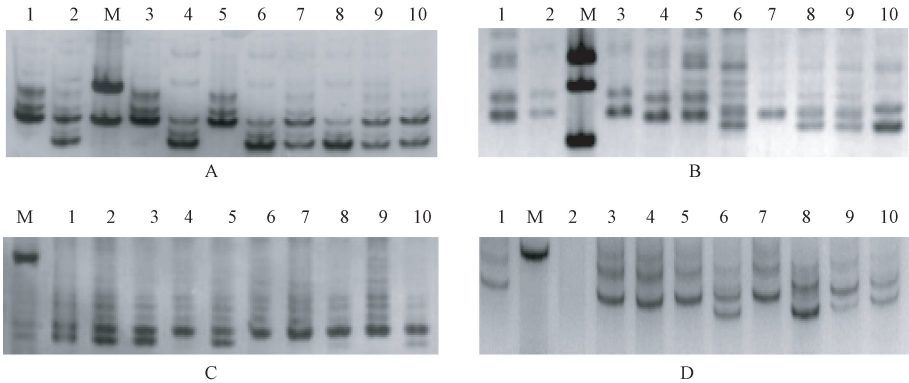
扩增质量较好的多态性微卫星引物(见表1)进行PCR,其中15对引物(标注*)扩增2个近交系及3个远交系,36对引物扩增3个远交系豚鼠DNA。部分引物扩增产物电泳图谱见图2。

从图中可见,同一近交系豚鼠内个体之间条带一致性较高,不同近交系之间的条带存在较大差异,而远交系个体及品系间条带均呈现高度多态

性,符合遗传规律,说明本文中多态性位点的筛选方法及选择出的位点是可靠的,这些引物扩增的位点作为分子标记,能用于豚鼠遗传基因纯度的检测。

2.3 品系间一致性差异位点的筛选

从51个位点中,挑选出豚鼠品系内基因标记基本一致,品系之间呈差异的位点,这些位点的基因型列于表2。



注:A:引物 L1 PCR 产物;B:引物 L107 PCR 产物;C:引物 L70 PCR 产物;D:引物 D122 PCR 产物。M:Marker;泳道 1~2:英国种;泳道 3~4:Zmu-2; DHP 远交系;泳道 5~6;Zmu-1; DHP 远交系;泳道 7~8;Zmu-2; DHP 近交系;泳道 9~10;Zmu-1; DHP 近交系。

图1 10个豚鼠DNA样本PCR产物电泳图

Note. A: PCR products of primer L1; B: PCR products of primer L107; C: PCR products of primer L70; D: PCR products of primer D122. M: Marker; Lane 1-2; English species; Lane 3-4; Zmu-2; DHP outbred strain; Lane 5-6; Zmu-1; DHP outbred strain; Lane 7-8; Zmu-2; DHP inbred strain; Lane 9-10; Zmu-1; DHP inbred strain.

Fig.1 PCR products of 10 DNA samples of guinea pigs

表1 豚鼠多态性微卫星引物

Tab.1 Polymorphic microsatellite primers of guinea pigs

序号 No.	引物名称 Primer names	引物序列 Primer sequences	退火温度 Annealing temperature	序号 No.	引物名称 Primer names	引物序列 Primer sequences	退火温度 Annealing temperature
1	L32	aagggatgtgtgctactgtagg atctcgaaggatgttggagct	60	27	L166	ttccacttgggaatcaagca tacttccaagcagactccct	58
2	L45 *	gctgaaacttagctctcagactg agagagatgttggttgcttacc	58	28	L360	agctacgtgagtgatgtt caaccacacaggagcatgg	58
3	L53 *	tggcaaagttgcttcaatgga ccttgcatagaatactctgggca	60	29	L388	tgagaaggcagctgaactt atccatgctactaccaagagc	57
4	L56 *	gtctgtggtaatcaggacacc gaatgggtcctggagcatgtctc	59	30	D18	ctgccaaagttccacagtg gggtgtctactgcacaggaa	62
5	L57 *	gcactttctaacccgatgagg gctgtcatggagaaggcttgg	59	31	D31	tcgggatactgcaaaactcat taaaggggttctcaagtc	62
6	L70 *	tgtctaaacgtaggaaactgcac gatatggctcactgccaaagtc	60	32	D41	aaggggagaagcctgagta tggagttcagtgctccac	58
7	L74 *	tcaaggtcagcctgaacat acacagatgttctgagtcga	58	33	D50	caatgtctcagtttgggtt tgtgtggactttggccctc	62
8	L85 *	cagctttgaacaaggaggta gtgtgaagtttcttgcgatgg	58	34	D55	atgatggcgcactgcctgta gccattcttgaacatggtgc	62
9	L148 *	tcttgtcttcagcaggtg ccctgatgaagcacttagg	60	35	D105	gacagacatgcctagattcag cactccagtgacttggga	58
10	D149 *	ctagtcccccttgtatctgg gtcaactgaacctcagcac	60	36	D107	tgggcctttgtcttcatcccaaa cagtcceccacatttg	62
11	D77 *	ctgctcttgctgaagtgc tttgtaccctggcacaagg	62	37	D113	agctaaccagggcactttgc tgatcagaccctaaggccca	62

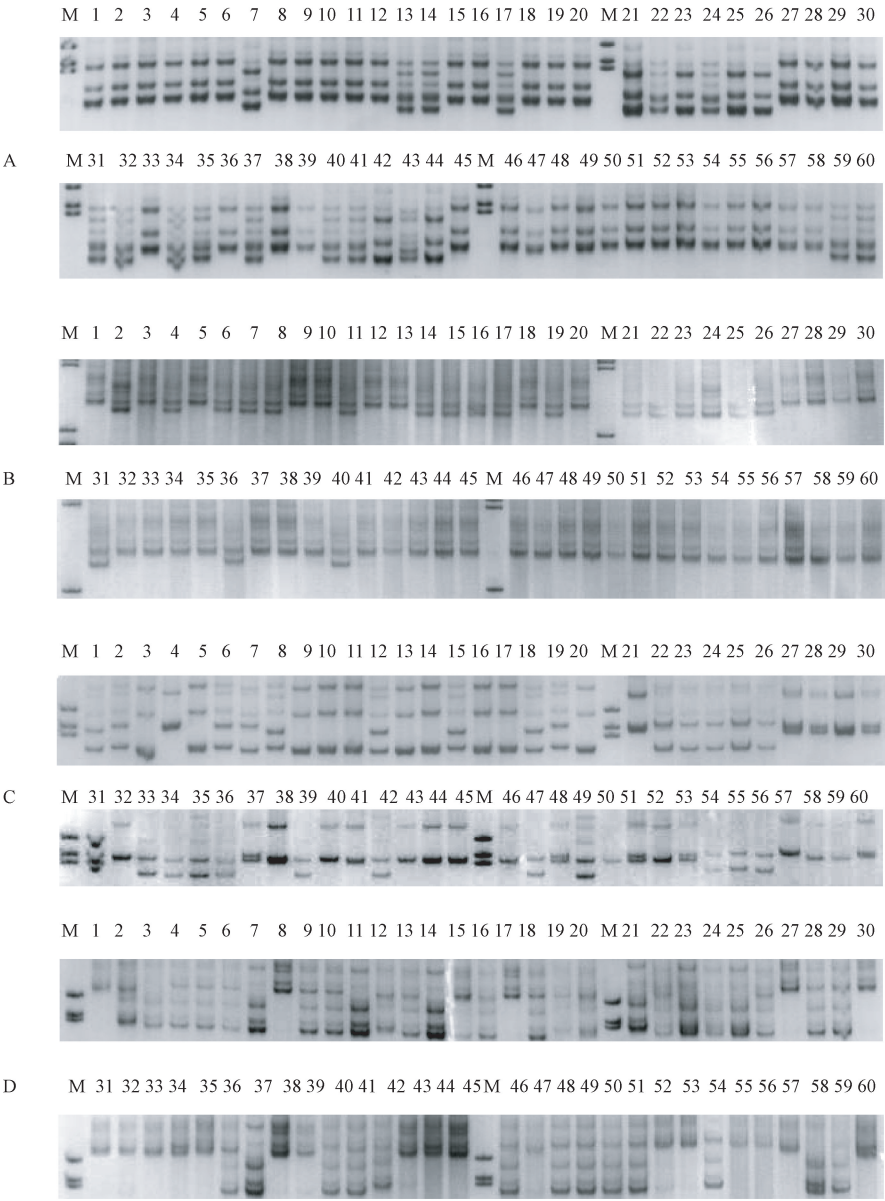
(续表)

序号 No.	引物名称 Primer names	引物序列 Primer sequences	退火温度 Annealing temperature	序号 No.	引物名称 Primer names	引物序列 Primer sequences	退火温度 Annealing temperature
12	D86 *	gctgtgaaagcttctgggtgg acatgtgaggttagccctgc	62	38	D3	caagactcatgctcagccca ctagactctggcccttcag	62
13	D93 *	ttgccctttgttcagcaa getccaggtttgtactgc	62	39	D49	agttccaaggtagccccagc tctgtgtgggaagtccctc	62
14	D117 *	gtagcatggcttcacagag tgtaatccagcagttggca	58	40	D58	tcattctggctgcaaggcag tatgtcacccggtccctaagc	58
15	D128 *	tgaaaatgtccagggaagcct ttgcaagcacacagtecta	62	41	D76	cagggcattttggtgtggcct actgtgaatctgagggcagc	58
16	D130 *	aagccagatcccacactcac agatctgctgtccagtgac	60	42	D122	agtcatggtctaaagcgagaa tttgtgccctctactaggt	58
17	L17	tcattggccaccatagcaggga cttgggtccccagctaatagcagg	60	43	D140	acacattctgagacacca cactcaaatgggagtcatcat	62
18	L34	gatgcaggacattgaaccag gtacagagtgagagcccctgc	59	44	J	aagctccctctccctctctc tagaggcatgcaccaccata	60
19	L63	tggtgtgcaattccagcctg actgagccacaaatctctgt	58	45	L1	gggttgtaaaaaggcatgtggct aagctggcttccctgtgagg	60
20	L107	tctaaccagggggcactgtg ttctgtctgagtcagggtgg	58	46	L8	ctcattctggctgacacctc gacacgactgatggaacagagc	60
21	L108	tgtgtlaaaaccttggccat aggaggattgcagatcagta	59	47	L10	tggtgtgtacattcttcaggac tagcgtggtagcttggaagg	60
22	L117	gtctctgaagaccctgtg ttcagcacactccactggga	58	48	L12	gattgtgagttcaatccctggt ctcttgcttaacattgagggt	60
23	L130	ctgcgtctctcagcgtacc gaagcctccatctcacgt	61	49	L21	attggttctcttaccacaagagc ccagtttgaactgcataggga	58
24	L160	aatagccagggcacccaagac aggggaacacttggcctccat	57	50	L26	gctgagctaaatccccagca gccctgactaagcaactgtctc	58
25	L165	ttatgaccagcacactgtg tttaagggtatggttcacctc	59	51	L149	ctggatagggaaccacca tcagcatcttgacctctcc	61
26	L25	ctaaagattcgttcacagcca gcaaccagaggttgcatcc	59				

注：* 表示用于扩增 2 个近交系及 3 个远交系的 15 对引物。
Note. * indicates the 15 pairs of primers used for PCR of the two inbred strains and three outbred strains.

表 2 品系间差异的微卫星位点基因型
Tab.2 Genotypes of polymorphic microsatellite loci among strains

序号 No.	引物名称 Primer names	基因型 Genotypes					英国种 English species
		Zmu-1 ; DHP 远交系 Zmu-1 ; DHP outbred strain	Zmu-1 ; DHP 近交系 1 系 Zmu-1 ; DHP inbred strain , substrain 1	Zmu-1 ; DHP 近交系 2 系 Zmu-1 ; DHP inbred strain , substrain 2	Zmu-2 ; DHP 远交系 Zmu-2 ; DHP outbred strain	Zmu-2 ; DHP 近交系 Zmu-2 ; DHP inbred strain	
1	L45	1/20 a. 16/20b. 3/20ab	1/1 a	3/5 a. 2/5ab	13/15b. 2/15ab	4/4b	2/15 a. 5/15b. 8/15ab
2	L56	1/20 a. 16/20b. 3/20ab	1/1 a	5/5 a	13/15b. 2/15ab	4/4b	5/15 a. 3/15b. 7/15ab
3	L70	11/20 a. 9/20b	1/1 a	5/5 a	15/15b	4/4b	3/15 a. 12/15b
4	L74	10/20 a. 1/20b. 9/20ab	1/1b	5/5ab	10/15b. 5/15ab	4/4b	9/15b. 6/15ab
5	L85	17/20 a. 3/20b	1/1b	5/5 a	5/15 a. 10/15b	3/4 a. 1/4b	10/15 a. 5/15b
6	D117	14/20 a. 6/20b	1/1b	5/5 a	15/15 a	3/4 a. 1/4b	13/15 a. 2/15b
7	L148	1/20 a. 10/20b. 9/20ab	1/1 a	5/5b	5/15 a. 3/15b. 7/15ab	2/4b. 2/4ab	7/15 a. 5/15b. 3/15ab
8	D107	13/20b. 7/20ab			15/15ab		2/15 a. 12/15ab
9	D113	18/20b. 2/20ab			15/15 a		15/15 a
10	D122	5/20 a. 15/20b			11/15 a. 4/15b		12/15 a. 3/15b
11	D140	17/20 a. 3/20b			4/15 a. 11/15b		6/15 a. 9/15b
12	L26	1/20 a. 12/20b. 7/20ab			1/15 a. 6/15b. 9/15c		10/15b. 5/15c



注:A;引物 L45 PCR 产物;B;引物 L70 PCR 产物;C;引物 L74 PCR 产物;D;引物 D86 PCR 产物。M;Marker;泳道 1~20;Zmu-1; DHP 远交系;泳道 21;Zmu-1; DHP 近交 1 系;泳道 22~26;Zmu-1; DHP 近交 2 系;泳道 27~30;Zmu-2; DHP 近交系;泳道 31~45;英国种;泳道 46~60;Zmu-2; DHP 远交系。

图 2 60 个豚鼠 DNA 样本 PCR 产物电泳图

Note. A: PCR products of primer L45; B: PCR products of primer L70; C: PCR products of primer L74; D: PCR products of primer D86. M: Marker; Lane 1-20: Zmu-1; DHP outbred strain; Lane 21: Zmu-1; DHP inbred strain, substrain 1; Lane 22-26: Zmu-1; DHP inbred strain, substrain 2; Lane 27-30: Zmu-2; DHP inbred strain; Lane 31-45: English species; Lane 46-60: Zmu-2; DHP outbred strain.

Fig.2 PCR products of 60 DNA samples of guinea pigs

从表中可见,远交系品系间差异较为一致的位点有 L70、L74、D113、D122、D140、D107、L26;近交系品系间差异一致的位点有 L45、L56、L70 等;近交系支系间的差异位点有 L85、D117、L148 等。近交系同一基因座上两个等位基因标记与豚鼠毛色存在显著关系,表 2 中的分子标记或许对品系鉴定及新特征基因定位有一定意义。

3 讨论

微卫星 DNA 是动植物遗传鉴定及基因定位等很有价值的分子标记,目前已开发出大约两万个大小鼠微卫星标记,对利用大小鼠研究做出非常大的贡献,但豚鼠作为实验动物其开发的微卫星位点数量少至甚少,然而豚鼠却有许多大小鼠不具备的遗

传特性可以被人类利用^[8]。其次微卫星标记众多,用微卫星检定豚鼠品系遗传质量快速可靠,微卫星标记还可以辅助育种工作,因此开发大量豚鼠微卫星标记具现实意义。笔者曾从网站上随机搜索并设计 178 对豚鼠微卫星引物,筛选出 25 个多态性位点及 28 个潜在多态性位点,占 29.8%^[8]。随着该网站豚鼠基因组数据不断扩充,本文又从该网站搜索到 400 个位点,剔除不能设计引物、扩增效果不佳及非多态性的位点,筛选到约 110 个多态性位点,占 27.55%。经扩大样本量进一步筛选出 51 个扩增质量较高的多态性位点,从中随机挑选 15 对引物检测了近交系及远交系豚鼠的遗传结构,结果显示远交系位点条带多态性高,个别杂无规律;近交系条带数少,位置集中,亮度高,且品系间呈一致性差异,检测结果比较理想^[7]。由此说明本文开发的位点是有效可靠的,适合于豚鼠日常遗传质量检测。同时证明多态性微卫星位点开发难度较大,特别是筛选远交系间呈一致差异的位点难度则更大。

动物微卫星位点引物的获取至少有 3 种方法,一是直接从网上下载同种动物的基因组微卫星资料,设计引物;二是从该动物基因组中克隆微卫星序列,设计引物;三是用邻近动物已有的引物。第一种方法简单易行,筛选效率高,但需要已公布的物种基因组;第二种方法费用较大,有假阳性克隆出现;第三种方法常出现偶然性,筛选效率较低。因此在已有基因组资料的情况下,第一种是值得推荐的方法。本文从加州大学圣克鲁兹学院网站的数据库,搜索到豚鼠基因组随机片段序列的资料,在这些序列中找出微卫星结构,然后用软件设计豚鼠微卫星引物,结果用 51 对多态性微卫星引物,筛选到 12 个品系间基本呈一致差异的位点,笔者认为本办法筛选效果比较好,很少出现引物 PCR 扩增不出条带的情况。

多态性微卫星标记用于动物遗传质量检测及群体遗传基因分析的原理众所周知。微卫星基因座上两个等位基因作为遗传标记,如果在两个品系间呈一致性差异,那么该基因座就可以定位性状基因。其原理是通过不同品系动物杂交和回交,如能

发现某微卫星位点上一个等位基因与某品系的一种性状连锁,而另一等位基因与另一品系的相对性状连锁,通过连锁分析该微卫星与性状的连锁性,计算出该连锁率 LOD 值,那么只要 LOD 大于一定值,并确定该微卫星位点位于第几条染色体,就能将该性状基因定位到相应染色体上。本文发现, L70、D113、D122、D140 等微卫星位点的 2 个等位基因分别与 2 个远交系的不同毛色相对应, L74、L56、L70 等位点的等位基因与 2 个近交系的不同毛色相对应,通过两个品系的测交试验及连锁分析,有可能找到与毛色连锁的微卫星位点,如毛色性状又与某个性状连锁,则最后能将该性状基因定位至特定染色体。因此,筛选品系间呈一致性差异的微卫星是前提因素,在基因定位中有重要的作用。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 邵义祥, 吴宝金, 薛整风, 等. 遗传性角膜基质变性小鼠及其突变基因的定位 [J]. 南京师范大学(自然科学版), 2006, 29(2): 99–102.
- [3] 郭汉身, 刘迪文, 付军, 等. DHP 白化豚鼠杂交后的生长与繁殖性能 [J]. 上海实验动物科学, 1994, 14(1): 34–36.
- [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, 郭汉身. 两个品系豚鼠对化学介质诱导产生气道反应的差异性研究 [J]. 中国实验动物学报, 2002, 10(2): 91–95.
- [6] 卫振, 张森, 蒋丽琴, 等. 两品系豚鼠屈光状态和眼球径的发展和比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 24(1): 92–96.
- [7] 刘迪文, 谢敏, 陈雁虹, 等. Zmu-1: DHP 近交系豚鼠的培育及其分子遗传结构初步鉴定 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(1): 90–96.
- [8] 刘迪文, 杨伟伟, 吴宝金. 豚鼠基因组 26 个多态性微卫星标记的筛选 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(3): 78–83.

[收稿日期]2017-03-17