

三个远交系豚鼠微卫星遗传结构分析

刘迪文, 谭海明, 陈雁虹, 卫 振

(浙江大学实验动物中心, 杭州 310058)

【摘要】 目的 评估我校培育的三个远交系豚鼠种群的微卫星遗传结构, 筛选不同种群间呈现差异等位基因的微卫星位点, 为今后豚鼠遗传育种及应用提供资料。**方法** 使用45对引物通过PCR及电泳技术, 对我校三个豚鼠种群的微卫星DNA进行扩增分析, 计算各位点等位基因多态性等参数, 并筛选出种群间等位基因呈差异变化的微卫星位点。**结果** 所有微卫星位点在豚鼠种群中呈多态性变化, 各位点等位基因数2~7不等, 平均位点基因数2.29, 平均有效基因数1.74; 平均期望杂合度为0.39, 平均观测杂合度为0.21, 多态信息含量的可信范围为0.0739~0.6443, 平均PIC为0.32, 68.9%的位点呈中度多态性; 总Hardy-Weinberg平衡P值平均为0.1734, 各种群均为 $P > 0.05$, 但对每个位点的基因平衡状态来讲, 共有20个位点极显著偏离Hardy-Weinberg平衡, 种群平均偏离指数D为-0.407; 平均分化指数Fst为0.136, 平均基因流Nm为5.835, 还阐明了种群间的Nei遗传距离及遗传相似度。**结论** 三个豚鼠种群遗传呈中度多态性变化, 种群间平均遗传差异无显著性, 遗传相似度较高。群体遗传偏离Hardy-Weinberg平衡较突出, 出现严重的近交现象, 群体处于中等遗传变异水平, 但较高的基因流动阻止了遗传分化发生。分析这些问题的原因, 主要是本群体繁殖数量偏小, 种子选择范围不广泛等, 今后在培育过程中要引起重视。本课题还筛选到与不同种群或毛色豚鼠相关的微卫星位点12个, 种群特征性微卫星位点7个, 可能用于性状基因定位。

【关键词】 豚鼠; 远交系; 微卫星标记; 遗传多态性; 种群差异位点

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 11-0081-08

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.11.014

Analysis of microsatellite genetic structures of three outbred strains of guinea pig

LIU Diwen, TAN Haiming, CHEN Yanhong, WEI Zhen

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

【Abstract】 Objective To assess the genetical structures of three outbred strains of guinea pig and screen the microsatellite loci related to different groups of guinea pigs. **Methods** Using 45 primers, DNA of three groups of guinea pigs was analyzed by PCR and electrophoresis for genetic markers. Then, the polymorphism of these markers was calculated. In addition, the microsatellite locus related to different hair colors was screened in the three groups of guinea pig. **Results** All microsatellites loci showed polymorphism. The average number of allelic genes was 2.29 per locus and the average value of effective genes was 1.74 per locus. The average expected heterozygosity in total was 0.39. The average observed heterozygosity was 0.21. The average PIC was 0.32, and 68.9% of the loci showed moderate polymorphism. The average P-value of HW was 0.1734, but the inheritance in 20 loci of the total locus diverged extremely significantly from the HW balance. The average deviation index D was -0.407. The differentiation index Fst was 0.136. The gene flow Nm was 5.835. Nie genetic similarity of the three groups was low. **Conclusions** The genetic structures of the three guinea pig

groups show a moderate polymorphism. The genetic differences between the groups are not significant. Inheritance of groups diverged from the HW balance and inbreeding within the groups of guinea pigs is obvious. The main reason for these problems is that the number of guinea pigs used for reproduction is low and there are limitations to the approaches of choosing guinea pig seeds. In addition, 12 polymorphic microsatellite loci related to different groups of hair color of guinea pigs and seven specific loci are identified.

[Keywords] guinea pig; outbred strain; microsatellite marker; genetic polymorphism; diversity locus

豚鼠由于其特有的生物学性状,成为药理学、毒理学、免疫学、眼耳科疾病研究及疫苗研发等领域常用的实验动物,目前我国用于实验的豚鼠主要是英国种花色豚鼠及哈脱莱 DHP 远交系白色豚鼠^[1]。本课题组用上述两种豚鼠为亲本,培育出白色 Zmu-1: DHP 及黑色 Zmu-2: DHP 远交系豚鼠^[2-3],其特征是融合了英国种豚鼠遗传杂合性和 DHP 豚鼠遗传稳定性的特点。由于育种过程中采取了近交及选择措施,则同一位点的等位基因进行分离,重组到不同品系中,也可能某些性状与毛色基因连锁的缘故,因此,Zmu-1: DHP、Zmu-2: DHP 品系及英国种三种不同毛色的豚鼠,遗传及承载了不同的遗传特性^[4-6],成为研究某些正常生物学或疾病发生机理较理想的动物模型资源。

远交系动物遗传质量常需要借助于遗传标记,通过计算群体遗传结构的数量遗传指标来评估。微卫星是一种稳定可靠的第二代 DNA 分子遗传标记,其序列长度的变化引起群体或个体遗传标记出现差异,表现为同一微卫星位点上,远交系动物基因呈现遗传多态性,而近交系动物则呈现一致性。优良品质的远交系动物应具备基因多态性及遗传稳定性,利用多个微卫星标记可以评价动物遗传质量,另外,筛选出与性状连锁的微卫星位点能够通过遗传定位分析,辅助定位目的性状基因。相对大小鼠,将微卫星技术用于豚鼠遗传结构分析的文章较少,目前仅见朱亮^[7]、李芳芳^[8]、刘迪文^[9]及 Burgos-Paz^[10]等人报道。本文拟用 45 对多态性引物,分析本中心三个远交系豚鼠种群遗传结构的多态性,并从中筛选出与豚鼠特征性状连锁的微卫星位点,为评估豚鼠遗传质量,豚鼠品质资源维持及应用选择提供相关的遗传背景依据,同时为豚鼠优势性状基因定位及其机理研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

英国种花色豚鼠,于 70 年代引自浙江农村,引进后长期封闭远交繁殖;Zmu-1: DHP 白色豚鼠,

2000 年由英国种与 HDP 远交系白色豚鼠(1987 年引自中检所)通过杂交-近交-远交方式育成的远交系;Zmu-2: DHP 黑色豚鼠,Zmu-1: DHP 豚鼠培育同时分离出的另一远交系。三个种群豚鼠年龄约为 30 日龄,体重约 350 g,均为普通级,性别不论,使用数量分别为 15 只、20 只及 15 只[SCXK(浙)2012 - 0052]。豚鼠采用屏障设施开放饲养[SYXK(浙)2012 - 0178],0.9 m × 0.6 m × 0.25 m 塑料笼盒加铺灭菌木片及稻草作为垫料,饲喂颗粒饲料及自来水,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

DNA 提取试剂盒(Takara)、PCR 试剂盒(Promega)、聚丙烯酰胺(Sigma)、硝酸银(国产);冷冻离心机(Eppendorf)、Nanodrop-one(Thermo)、PCR 仪(ABI)、电泳仪(Bio-Rad)、凝胶成像仪(Bio-Rad),等等。

1.3 实验方法

1.3.1 DNA 模板提取

取三个种群豚鼠,每只心脏取血 1 mL,肝素抗凝。用试剂盒提取豚鼠 DNA,定量,ddH₂O 浓度调整至 30 ng/μL。

1.3.2 模板 PCR 扩增

选取文献^[11]介绍的其中 45 对引物,由 Invitrogen 公司合成。PCR 配方成分:10 × PCR Buffer(Mg²⁺)2 μL,dNTP(2.5 mmol/L)1 μL,rTaq(5 U/μL,Takara)0.2 μL,Primer F(10 mmol/L)0.5 μL,Primer R(10 mmol/L)0.5 μL,Template DNA(约 50 ng)1 μL,ddH₂O 补足至 20 μL。PCR 反应条件:95℃ 预变性 5 min;然后进入 45 个循环,每循环包括 95℃ 变性 30 s,退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,各引物退火温度见文献^[11];最后 72℃ 延伸 5 min,4℃ 维持扩增产物。

1.3.3 PCR 产物电泳及条带分析

将 PCR 产物用 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳条件:电压 120 V,电泳时间 2 ~ 3 h,0.1% AgNO₃ 溶液染色,对电泳凝胶照像。按照小鼠电泳条带标

记法,标记豚鼠微卫星 PCR 产物电泳条带,从快到慢条带分别标记为 a、b、c、d 等。

1.4 统计学方法

根据每对引物对三个豚鼠种群扩增产物电泳条带的不同位置确定基因型,利用 POPGENE 3.2 软件统计三个群体在 45 个微卫星位点上的平均等位基因数 (Number of alleles)、平均有效等位基因数 (Number of effective alleles)、平均观测杂合度 (Observed heterozygosity)、平均期望杂合度 (Expected heterozygosity)、平均多态信息含量 (Polymorphism information content) 和平均 Hardy-Weinberg 平衡指数 (Hardy-Weinberg Equilibrium index)。同时,采用 Nei 方法计算群体间的遗传距离和遗传分化指数 F_{st} 。使用 MEGA 3.0 软件,采取 UPGMA 方法根据三个群体的遗传距离进行聚类。

2 结果

2.1 微卫星位点 PCR 产物电泳条带

45 对引物中两对引物扩增的 PCR 产物电泳图谱见图 1。可见三个豚鼠种群的微卫星位点 DNA 条带清晰、分辨率较高,在种群及个体间呈现遗传多态性,说明这些位点可作为豚鼠遗传结构分析及遗传质量检测的标记。

2.2 豚鼠微卫星位点基因型频率及数量统计

根据引物扩增产物作为电泳标记,统计豚鼠等位基因型频率、等位基因数及有效等位基因数,见表 1。从表中可见,三个豚鼠种群的大部分微卫星位点呈多态性变化,所有位点电泳条带在 2~7 条之间,其中 1 个位点有 7 个等位基因,1 个位点有 4 个等位基因,6 个位点有 3 个等位基因,37 个位点有 2 个等位基因。45 个微卫星位点共有等位基因 103

个,平均等位基因数 N_a 为 2.29,平均有效等位基因数 N_e 为 1.74。

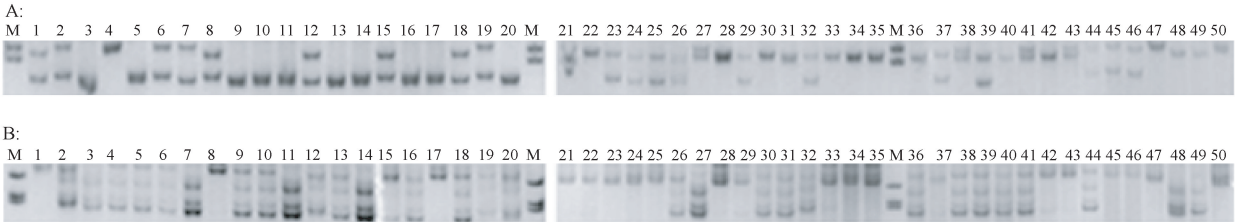
2.3 三个豚鼠种群遗传多样性分析

计算得到的观测杂合度、期望杂合度及 PIC 见表 2。从中可见,三个种群的总平均期望杂合度 H_e 为 0.394,总平均观测杂合度 H_o 为 0.212。另外,三个豚鼠种群之间的期望杂合度及观测杂合度差异无显著性 ($P > 0.05$)。所有位点的多态信息含量 PIC 的可信度范围为 0.0739 ~ 0.6443,平均为 0.319,其中可信度 > 0.5 的高度多态性位点有 2 个,占 4.44%, $0.5 \sim 0.25$ 的中度多态性位点有 31 个,占 68.89%, < 0.25 的低度多态性位点有 12 个,占 26.67%。

2.4 豚鼠种群的哈代-温伯格遗传平衡分析、豚鼠群体间遗传分化

Hardy-Weinberg (HW) 平衡卡方显著性分析、群体间遗传分化分析结果见表 3。从表中可见,三个豚鼠种群总的 HW 平衡 P 值为 0.1734,三个种群各自的平均 P 值均 > 0.05 ,群体偏离遗传平衡程度不显著。但对每个位点的基因平衡状态进行分析,三个种群共至少有 20 个位点极显著偏离 HW 平衡,其中种群 1 有 16 个,种群 2 有 13 个,种群 3 有 14 个。平均偏离指数 D 为 -0.407,表明群体存在 HW 遗传平衡偏离,同时又存在杂合子缺失现象。

三个种群的平均分化指数 F_{st} 为 0.136,提示由遗传分化引起种群差异的因素是 13.6%,86.4% 的差异是种群内遗传不同引起,种群间属于中度分化;种群近交程度 F_{is} 为 0.318,且大多数位点呈正值,说明这些种群内部的近交现象较严重;基因流 N_m 平均为 5.835,表明育种过程中种群间存在基因交流,也说明基因交流是形成不同种群的主要原因,而遗传分化引起的因素较小。



注:A;L74 引物;B;D86 引物。M:250 bp 分子标记;泳道 1 ~ 20;Zmu-1: DHP 远交系;泳道 21 ~ 35;英国种;36 ~ 50;Zmu-2: DHP 远交系。

图 1 三个品系豚鼠微卫星 PCR 产物的电泳图谱

Note. A: L74 Primer. B: D86 Primer. M: 250 bp Marker; Lane 1 ~ 20; Zmu-1: DHP outbred strain; Lane 21 ~ 35; England species; Lane 36 ~ 50; Zmu-2: DHP outbred strain.

Figure 1 Electrophoretogram of PCR analysis of microsatellites in the three guinea pig groups

表 1 三个豚鼠种群微卫星位点的基因型频率、等位基因数、有效等位基因数
Table 1 Genotypic frequencies, number of alleles, and number of effective alleles of the microsatellite loci of the three guinea pig groups

序号 No.	位点 Locus	豚鼠种群 Guinea pig groups			等位基因数 Number of alleles	有效等位基因数 Number of effective alleles
		Zmu-1: DHP (n = 20)	英国种 England species (n = 15)	Zmu-2: DHP (n = 15)		
1	L70 *	11 aa,9 bb	3 aa,12 bb	15 bb	2	1. 6756
2	I53 **	4 aa,10 bb,6 cc	10 bb,5 cc	7 bb,8 cc	3	2. 2604
3	L148 *	1 aa,10 bb,9 ab	7 aa,3 bb,5 ab	5 aa,3 bb,7 ab	2	1. 9802
4	L74 *, **	10 aa,1 bb,7 ab,2 ac	9 bb,6 ab	10 bb,5 ab	3	2. 0129
5	I45	1 aa,16 bb,3 ab	2 aa,5 bb,8 ab	13 bb,2 ab	2	1. 4447
6	D77	2 bb,18 ab	2 aa,13 ab	4 aa,11 ab	2	1. 9873
7	L56	1 aa,16 bb,3 ab	3 aa,4 bb,8 ab	13 bb,2 ab	2	1. 4966
8	L57 **	3 aa,3 bb,14 cc	10 cc,2 dd,3 cd	1aa,5cc,2dd,7cd	4	1. 9810
9	L85 *	17 aa,3 bb	10 aa,5 bb	5 aa,10 bb	2	1. 8546
10	D93	1 aa,11 bb,8 ab	9 bb,6 ab	13 bb,2 ab	2	1. 4188
11	D86 *	16 aa,4 bb	5 aa,10 bb	8 aa,7 bb	2	1. 9501
12	D117	8 aa,10 bb,2 cc	5 aa,5 bb,5 cc	1 aa,10 bb,4 cc	3	2. 6539
13	D128	7 aa,13 bb	15 bb	15 bb	2	1. 3172
14	D149	16 aa,4 ab	15 aa	15 aa	2	1. 0832
15	D130	11 aa,1 bb,8 ab	10 aa,5 ab	9 aa,6 ab	2	1. 4966
16	L34	4 aa,9 bb,7 ab	1 aa,8 bb,6 ab	3 aa,3 bb,9 ab	2	1. 8911
17	L117	20 bb	12 bb,3 ab	2 aa,12 bb,1 ab	2	1. 1726
18	L130	19 bb,1 ab	10 bb,5 ab	2 aa,11 bb,2 ab	2	1. 2677
19	L160	17 aa,3 ab	11 aa,1 bb,3 ab	12 aa,1 bb,2 ab	2	1. 2677
20	L165	17 bb,3 ab	3 aa,6 bb,6 ab	3 aa,4 bb,8 ab	2	1. 7001
21	L166	19 aa,1 ab	11 aa,4 ab	11 aa,4 ab	2	1. 1959
22	L360	17 aa,3 bb	11 aa,4 bb	9 aa,6 bb	2	1. 6255
23	L388 *	17 aa,1 bb,2 cc	14 bb,1 cc	8 aa,6 bb,1 cc	3	2. 3105
24	D18	11 aa,9 bb	12 aa,3 bb	10 aa,5 bb	2	1. 8142
25	D41 **	8 aa,4 bb,8 bc	8 aa,3 bb,4 ab	10 aa,5 ab	2	1. 7476
26	D50	6 aa,14 bb	15 bb	15 bb	2	1. 2677
27	D107 *	13 bb,7 ab	4 aa,11 ab	9 aa,6 ab	2	2. 0000
28	D113 *	18 bb,2 ab	15 aa	15 aa	2	1. 8911
29	I25 **	1 aa,12 bb,7 ab	10 bb,5 dd	1 aa,5 bb,9 dd	3	2. 1617
30	L149	15 aa,5 ab	15 aa	15 aa	2	1. 1050
31	D76 **	11 aa,1 bb,1 cc, 1 dd,2 ee,4 af	6 aa,2 cc,1 dd, 4 ee,1 gg,1 af	6 aa,3 ff,4 gg, 2 af	7	3. 0506
32	D122 *	5 aa,15 bb	11 aa,4 bb	10 aa,5 bb	2	1. 9968
33	D140 *	15 aa,5 bb	1 aa,10 bb,4 ab	4 aa,10 bb,1 ab	2	1. 9802
34	I8	3 aa,4 bb,13 ab	6 aa,4 bb,5 ab	2 aa,2 bb,11 ab	2	1. 9992
35	L10 *	11 aa,2 bb,7 ab	2 aa,8 bb,5 ab	10 bb,5 ab	2	1. 9616
36	I26 **	1 aa,12 bb,7 ab	10 bb,5 cc	1 aa,5 bb,9 cc	3	2. 1617
37	J	1 aa,13 bb,6 ab	1 aa,9 bb,5 ab	4 aa,4 bb,7 ab	2	1. 7241
38	D3	20 bb	1 aa,7 bb,7 ab	1 aa,8 bb,6 ab	2	1. 3931
39	D49	8 aa,4 bb,8 ab	6 aa,6 bb,3 ab	9 aa,2 bb,4 ab	2	1. 9077
40	L17	1 aa,13 bb,6 ab	8 bb,7 ab	6 bb,9 ab	2	1. 5743
41	L63	1 aa,19 bb	3 aa,10 bb,2 ab	15 bb	2	1. 2195
42	L108	13 aa,1 bb,6 ab	13 aa,2 ab	14 aa,1 ab	2	1. 2435
43	L21 *	7 aa,3 bb,10 ab	3 aa,2 bb,10 ab	9 bb,6 ab	2	1. 9873
44	L1	2 aa,9 bb,9 ab	3 aa,7 bb,5 ab	12 bb,3 ab	2	1. 6507
45	L107	15 bb,5 ab	13 bb,2 ab	11 bb,4 ab	2	1. 2435
平均值 Average value					2. 29	1. 74

注: * 表示种群间有差异的微卫星位点; ** 表示有特殊等位基因的位点。
Note. * Differential locus between guinea pig groups; ** Specific locus.

表 2 三个品系豚鼠的观测杂合度、期望杂合度及 PIC
Table 2 Observed heterozygosity, expected heterozygosity, and PIC of the three strains of guinea pig

序号 No.	位点 Locus	期望杂合度 Expected heterozygosity				观测杂合度 Observed heterozygosity				多态信息含量 Polymorphism information content
		种群 1 Group 1	种群 2 Group 2	种群 3 Group 3	总体 Totality	种群 1 Group 1	种群 2 Group 2	种群 3 Group 3	总体 Totality	
1	L70	0.5077	0.331	0	0.41	0	0	0	0	0.3219149
2	L53	0.6359	0.4598	0.5149	0.56	0	0	0	0	0.4678051
3	L148	0.409	0.508	0.508	0.50	0.45	0.2	0.4667	0.38	0.3724875
4	L74	0.4321	0.331	0.2874	0.51	0.45	0.4	0.3333	0.4	0.3951549
5	L45	0.2244	0.4966	0.1287	0.31	0.15	0.5333	0.1333	0.26	0.2604296
6	D77	0.5077	0.508	0.4805	0.50	0.9	0.8667	0.7333	0.84	0.3733949
7	L56	0.2244	0.5149	0.1287	0.34	0.15	0.5333	0.1333	0.26	0.2767544
8	L57	0.4769	0.3701	0.5586	0.50	0	0.2	0.4667	0.2	0.4552944
9	L85	0.2615	0.4598	0.4598	0.47	0	0	0	0	0.3546317
10	D93	0.3846	0.331	0.1287	0.30	0.4	0.4	0.1333	0.32	0.2516285
11	D86	0.3282	0.4598	0.5149	0.49	0	0	0	0	0.3685181
12	D117	0.5949	0.6897	0.4966	0.63	0	0	0	0	0.5522109 *
13	D128	0.4667	0	0	0.24	0	0	0	0	0.2118077 **
14	D149	0.1846	0	0	0.08	0.2	0	0	0.08	0.0738509 **
15	D130	0.3846	0.2874	0.331	0.34	0.4	0.3333	0.4	0.38	0.2767544
16	L34	0.4808	0.4046	0.5172	0.48	0.35	0.4	0.6	0.44	0.3601853
17	L117	0	0.1862	0.2874	0.15	0	0.2	0.0667	0.08	0.1363661 **
18	L130	0.05	0.2874	0.331	0.21	0.05	0.3333	0.1333	0.16	0.1888973 **
19	L160	0.1423	0.2874	0.2391	0.21	0.15	0.2	0.1333	0.16	0.1888973 **
20	L165	0.1423	0.4966	0.5149	0.42	0.15	0.4	0.5333	0.34	0.3270104
21	L166	0.05	0.2391	0.2391	0.17	0.05	0.2667	0.2667	0.18	0.1503848 **
22	L360	0.2615	0.4046	0.4966	0.39	0	0	0	0	0.3107645
23	L388	0.2718	0.1287	0.5701	0.57	0	0	0	0	0.4735421
24	D18	0.5077	0.331	0.4598	0.45	0	0	0	0	0.3480893
25	D41	0.4923	0.4598	0.2874	0.43	0.4	0.2667	0.3333	0.34	0.3362936
26	D50	0.4308	0	0	0.21	0	0	0	0	0.1888973 **
27	D107	0.2962	0.4805	0.331	0.51	0.35	0.7333	0.4	0.48	0.375
28	D113	0.0974	0	0	0.48	0.1	0	0	0.04	0.3601853
29	L25	0.3577	0.4598	0.5425	0.54	0.35	0	0	0.14	0.4681526
30	L149	0.2244	0	0	0.10	0.25	0	0	0.1	0.0904875 **
31	D76	0.5641	0.7379	0.6621	0.68	0.2	0.0667	0.1333	0.14	0.6442606 *
32	D122	0.3846	0.4046	0.4598	0.50	0	0	0	0	0.3745997
33	D140	0.3846	0.331	0.4345	0.50	0	0.2667	0.0667	0.1	0.3724875
34	L8	0.5115	0.508	0.5172	0.51	0.65	0.3333	0.7333	0.58	0.3749
35	L10	0.409	0.4345	0.2874	0.50	0.35	0.3333	0.3333	0.34	0.370052
36	L26	0.3577	0.4598	0.5425	0.54	0.35	0	0	0.14	0.4681526
37	J	0.3282	0.3701	0.5172	0.42	0.3	0.3333	0.4667	0.36	0.3318
38	D3	0	0.4345	0.4046	0.29	0	0.4667	0.4	0.26	0.2423816 **
39	D49	0.4923	0.5172	0.4046	0.48	0.4	0.2	0.2667	0.3	0.3626072
40	L17	0.3282	0.3701	0.4345	0.37	0.3	0.4667	0.6	0.44	0.2982605
41	L63	0.0974	0.4046	0	0.18	0	0.1333	0	0.04	0.1638 **
42	L108	0.3282	0.1287	0.0667	0.20	0.3	0.1333	0.0667	0.18	0.1766312 **
43	L21	0.4923	0.5149	0.331	0.50	0.5	0.6667	0.4	0.52	0.3733949
44	L1	0.45	0.4805	0.1862	0.40	0.45	0.3333	0.2	0.34	0.3165032
45	L107	0.2244	0.1287	0.2391	0.20	0.25	0.1333	0.2667	0.22	0.1766312 **
平均值 Average value		0.3374	0.3586	0.3298	0.394	0.208	0.225	0.204	0.212	0.319

注:种群 1;Zmu-1: DHP 豚鼠;种群 2;英国种豚鼠;种群 3;Zmu-2: DHP 豚鼠。* 高度多态性位点; ** 低度多态性位点;不标注:中度多态性位点。
Note. Group 1; Zmu-1: DHP; Group 2: England species; Group 3; Zmu-2: DHP. * High polymorphic locus; ** Low polymorphic locus; No mark indicates a moderate polymorphic locus.

表 3 豚鼠群体哈代-温伯格遗传平衡、Fis、Fst、基因流
Table 3 Hardy-Weinberg genetic balance, Fis, and gene flow of the guinea pig groups

序号 No.	位点 Locus	P(Chi-square test)				偏离指数 D			
		种群 1 Group 1	种群 2 Group 2	种群 3 Group 3	总体 Totality	Deviation index D	Fis	Fst	基因流 Gene flow
1	L70	0.000004	0.000028	单态位点 Monomorphic locus	0	-1	1	0.2756	0.6573
2	L53	0	0.000052	0.000061	0	-1	1	0.0496	4.7932
3	L148	0.640703	0.014933	0.743701	0.086411	-0.24	0.1914	0.0759	3.0438
4	L74	0.87303	0.383057	0.494525	0.143218	-0.2131	-0.1612	0.2976	0.5900
5	L45	0.101262	0.765797	0.84739	0.236039	-0.1637	0.0079	0.1334	1.6235
6	D77	0.000389	0.004602	0.033837	0.000001	0.6740	-0.7235	0.0232	10.5282
7	L56	0.101262	0.886114	0.84739	0.105521	-0.2243	0.0289	0.1817	1.1257
8	L57	0	0.057524	0.000002	0	-0.6002	0.5108	0.0784	2.9389
9	L85	0.000001	0.000052	0.000052	0	-1	1	0.1935	1.0420
10	D93	0.851716	0.383057	0.84739	0.595912	0.0731	-0.1390	0.0420	5.7023
11	D86	0.000002	0.000052	0.000061	0	-1	1	0.1480	1.4392
12	D117	0	0	0	0	-1	1	0.0783	2.9432
13	D128	0.000004	单态位点 Monomorphic locus	单态位点 Monomorphic locus	0	-1	1	0.2642	0.6964
14	D149	0.670556	单态位点 Monomorphic locus	单态位点 Monomorphic locus	0	0.0309	-0.1111	0.0690	3.3750
15	D130	0.851716	0.494525	0.383057	0.334057	0.1337	-0.1650	0.0072	34.5592
16	L34	0.210373	0.962892	0.521245	0.588965	-0.0756	0.0073	0.0386	6.2337
17	L117	单态位点 Monomorphic locus	0.729406	0.001042	0.000509	-0.4620	0.4175	0.0579	4.0658
18	L130	1	0.494525	0.012401	0.06602	-0.2499	0.2009	0.0507	4.6800
19	L160	0.769866	0.194306	0.051315	0.06602	-0.24989	0.2537	0.0131	18.8024
20	L165	0.769866	0.434258	0.886114	0.190136	-0.1827	0.0297	0.1359	1.5892
21	L166	1	0.611179	0.611179	0.511612	0.0876	-0.1416	0.0297	8.1635
22	L360	0.000001	0.000042	0.000058	0	-1	1	0.0527	4.4978
23	L388	0	0	0	0	-1	1	0.4487	0.3071
24	D18	0.000004	0.000028	0.000052	0	-1	1	0.0473	5.0303
25	D41	0.388549	0.089218	0.494525	0.126496	-0.2131	0.1682	0.0459	5.2019
26	D50	0.000004	单态位点 Monomorphic locus	0.383057	0	-1	1	0.2222	0.8750
27	D107	0.384683	0.033837	0	0.723125	-0.0497	-0.3822	0.2808	0.6404
28	D113	0.869417	单态位点 Monomorphic locus	单态位点 Monomorphic locus	0	-0.9160	-0.0526	0.9268	0.0197
29	L25	0.919495	0.000052	0	0	-0.7421	0.7344	0.1922	1.0510
30	L149	0.572012	单态位点 Monomorphic locus	单态位点 Monomorphic locus	0.740438	0.0417	-0.1429	0.0870	2.6250
31	D76	0	0	0.000033	0	-0.7938	0.7898	0.0704	3.3027
32	D122	0.000003	0.000042	0.000052	0	-1	1	0.1848	1.1027
33	D140	0.000003	0.415572	0.000576	0	-0.8	0.7010	0.2354	0.8119
34	L8	0.214193	0.167438	0.093966	0.28765	0.1490	-0.1522	0.0060	41.4704
35	L10	0.502282	0.343777	0.494525	0.025151	-0.3134	0.0728	0.2367	0.8061
36	L26	0.919495	0.000052	0	0	-0.7421	0.7344	0.1922	1.0510
37	J	0.684108	0.681321	0.695071	0.277521	-0.1513	0.0660	0.0841	2.7226
38	D3	单态位点 Monomorphic locus	0.763238	0.962892	0.523504	-0.0880	-0.0685	0.1176	1.8750
39	D49	0.388549	0.01394	0.162797	0.007209	-0.3758	0.3679	0.0384	6.2534
40	L17	0.684108	0.28104	0.121335	0.162416	0.1940	-0.2449	0.0094	26.4643
41	L63	0	0.006052	单态位点 Monomorphic locus	0	-0.7800	0.7257	0.1419	1.5121
42	L108	0.684108	0.84739	1	0.506906	-0.0900	0.0175	0.0576	4.0893
43	L21	0.942718	0.237369	0.383057	0.795764	0.0363	-0.2072	0.1240	1.7661
44	L1	1	0.216971	0.729406	0.293935	-0.1462	0.0922	0.0706	3.2898
45	L107	0.572012	0.84739	0.611179	0.406777	0.1122	-0.1318	0.0091	27.2039
平均值 Average value		0.408523	0.284028	0.318291	0.173362	-0.4073	0.3177	0.1361	5.8347

2.5 遗传相似度及遗传距离

三个种群间的 Nei 遗传距离及遗传相似度见表 4,图 2 是三个种群的聚类图。从表图可见 Zmu-1: DHP 的遗传结构与英国种较近,与 Zmu-2: DHP 较远,英国种与 Zmu-2: DHP 两者最近。

3 讨论

实验动物的遗传类型决定了动物的用途及实验效果。从遗传学角度来说,近交系动物基因位点上所具有的基因单一,质量检测评定比较简单,而远交系动物遗传呈多样性,不同个体的同一位点上存在多种基因,使得其遗传质量评定变得比较复杂。远交系动物的遗传质量一般通过位点各等位基因的发生频率来评价,质量较好的远交系动物其基因位点杂合性较高,但群体同一位点多次测定的基因频率基本能够保持稳定。微卫星 DNA 通常是插入性状基因,与性状基因连锁的基因片段,可作为性状基因的遗传标记,通过检测微卫星的遗传信息,一般就能获知某些性状基因的遗传信息,或阐明个体及群体的遗传构成。本文探讨了我校三个远交系豚鼠种群的数量遗传特性,从表 1、2 可见,各微卫星位点平均基因数、总杂合度及多态信息量等指标判断,这些种群的遗传多态性较低,处于中等偏下水平。查其原因可能与种群数量较小、初期曾采用近亲繁殖及选种呈局限性等因素有关。朱亮等曾报道,他们的豚鼠群体处于中度遗传多态性水平。事实上,实验动物远交系动物不同于其他动

物,群体较小,长期封闭繁殖,容易形成近亲繁殖。但本结果中多数微卫星位点的 PIC 较高,这些位点可用于远交系豚鼠遗传检测。

通过比较远交系动物种群间遗传结构,及鉴定其多态性变化是由群体内个体变异,还是群体间遗传分化引起的差异,对判断种群是同种还是异种很有必要。我校三个豚鼠种群中,Zmu-1: DHP(白色)及 Zmu-2: DHP(黑色)种群都源自英国种豚鼠(花色),从表 3 中 Fst、Fis、基因流值及表 4 遗传距离可见,三个种群的遗传相似度较高,并且纯合子个体较多,缺少杂合子个体,虽然种群间遗传处于中等分化水平,但通过基因交流阻止了遗传分化的影响,说明三个群体豚鼠属于一个种属下的不同亚群。相对来讲,英国种与 Zmu-2: DHP 遗传距离最近,与 Zmu-1: DHP 较近,而 Zmu-1: DHP 及 Zmu-2: DHP 相对较远。这种情况似乎与毛色相似度有关,说明花色和黑色都是有色豚鼠,遗传结构较近;白色与有色豚鼠属于完全不同的毛色,其群体间遗传结构则较远。从表 3 三个种群的具体位点看,少数位点极显著偏离遗传平衡,多数位点遗传偏离平衡不显著,但结合偏离指数看,整个种群仍处于不平衡水平。Klötting 等^[12]曾指出,实验动物封闭群 Hardy-Weinberg 平衡偏离是常见的问题。因此,为了提高本远交系豚鼠种群的遗传质量,今后必须扩大每个种群的个体数量,原先每个种群为 30 盒,现起码要扩充至 50 盒以上;要尽量遍布所有笼盒内选择豚鼠种子,每个笼盒只选择单一性别的个体留

表 4 三个品系豚鼠种群间的 Nei 遗传距离及遗传相似性系数
Table 4 Nei genetic distance and genetic similarity coefficient of the three guinea pig strains

种群 Groups	Zmu-1: DHP	英国种 England species	Zmu-2: DHP
Zmu-1: DHP	***	0.8463	0.8306
英国种 England species	0.1668	***	0.9403
Zmu-2: DHP	0.1857	0.0616	***

注:星号以下为遗传距离,星号以上为遗传相似性系数。
Note. Under the asterisk: genetic distance; Above the asterisk: genetic similarity coefficient.

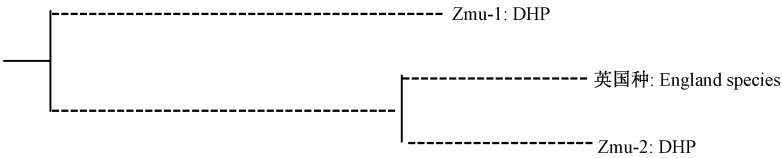


图 2 基于遗传距离的三个种群的 UPGMA 聚类图
Figure 2 UPGMA cluster graph of genetic distance

种,避免同胞兄妹繁殖;如有必要可引入其他远交系豚鼠,与现有豚鼠杂交后再采取远交封闭 4 代以上育种,以渗入其他基因,丰富种群的遗传多样性。

除了评价群体遗传结构外,某些微卫星位点还可作为性状基因的风向标,用于性状基因定位。课题组曾发现不同种群豚鼠在多个性状方面呈显著差异性^[4,6],例如白色豚鼠多为近视及对某些病毒敏感,而有色尤其是黑色豚鼠多为远视,并对某些病毒呈现抗性,说明这些性状差异与豚鼠品系遗传间存在相关性。微卫星是性状基因内含子中的重复序列,多态性微卫星位点的不同等位基因,常与某些相对性状或基因,如近视及远视性状及基因分别连锁。如果已知该微卫星的染色体位置,通过进一步种群间连锁分析,就可以定位性状基因,已有多篇文献报道了微卫星基因定位的研究结果^[13-14]。

因此,筛选到符合基因定位要求,即与相对性状连锁的多态性微卫星标记是关键。本文根据表 1 的豚鼠微卫星位点基因型频率,筛选出 12 个呈种群差异的位点(带*标记),可能作为基因定位的分子标记。另外,还筛选出 7 个白色豚鼠或有色豚鼠种群的特征性微卫星标记(带**标记),例如 L26 位点上两个有色豚鼠携带 c 基因,而白色豚鼠则缺少 c 基因,有可能作为特征性状基因的指示标记。

总之,本文报道了我校三个远交系豚鼠种群的遗传多态性,评估了这些豚鼠种群的遗传质量,同时报道了与不同种群或毛色性状相关的多态性微卫星位点,为今后豚鼠育种及遗传鉴定,优势性状基因定位及其遗传机理研究等提供基础资料。

参考文献:

- [1] 钟品仁. 哺乳类实验动物 [M]. 北京:人民卫生出版社, 1983; 251 - 265.
- [2] 郭汉身, 刘迪文, 傅军, 等. DHP 白化豚鼠杂交后的生长与

繁育性能 [J]. 上海实验动物科学, 1994, 14(1): 34 - 36.

- [3] 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.
- [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, 2005, 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]. 中国实验动物学报, 2016, 24(1): 92 - 96.
- [7] 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): 50 - 55.
- [8] 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研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(12): 33 - 38.
- [9] 刘迪文, 谢敏, 陈雁虹, 等. Zmu-1: DHP 近交系豚鼠的培育及其分支遗传结构初步鉴定 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(1): 90 - 96.
- [10] 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.
- [11] 卫振, 洪胜辉, 刘迪文. 豚鼠个体及品系间多态性微卫星位点筛选 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(11): 32 - 37.
- [12] Klötting I, Nitschke C, van den Brandt J. Impact of genetic profiles on experimental studies: outbred versus wild rats [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2003, 189(1): 68 - 71.
- [13] 吴宝金, 茅慧华, 邵义祥, 等. ENU 诱导获得 4 种白班小鼠及对突变基因的染色体定位 [J]. 科学通报, 2003, 48(22): 2301 - 2307.
- [14] 吴宝金, 茅慧华, 曾永梅, 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.

[收稿日期] 2018-06-18