

实验用狨猴微卫星引物筛选及遗传多样性分析

滕永康[#], 刘先菊[#], 张旭, 向志光, 阮研硕, 肖冲, 刘云波^{*}

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京 100021)

【摘要】 目的 筛选、优化狨猴微卫星 DNA 引物,用以对中国医学科学院医学实验动物研究所引进的实验用狨猴种群进行遗传学分析及评估。**方法** 用筛选的 20 对狨猴微卫星引物,对随机抽取的 30 只狨猴血液样本进行基因组 DNA 提取及 PCR 扩增,扩增产物经电泳鉴定后进行 STR 扫描检测,用 Popgene1.32 软件对 STR 扫描结果进行数据处理和分析。**结果** 20 对微卫星引物均呈现出遗传多样性,共检测 147 个等位基因,观察等位基因数 5~10 个,平均 7.35 个;有效等位基因数 2.2500~6.3830 个,平均 4.0402 个;观察杂合度 0.000~0.4667,平均 0.1533;期望杂合度 0.1424~0.4350,平均 0.2506;香隆指数 1.2242~2.0324,平均 1.5949;多态信息含量 0.5366~0.8254,平均 0.7053。**结论** 本文筛选的 20 对狨猴微卫星引物具有高度遗传多样性,均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。

【关键词】 实验用狨猴;微卫星 DNA;遗传多样性

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 06-0015-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.06.004

Microsatellite marker design and genetic analysis for the common marmoset

TENG Yongkang[#], LIU Xianju[#], ZHANG Xu, XIANG Zhiguang, RUAN Yanshuo, XIAO Chong, LIU Yunbo^{*}

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To screen and optimize the microsatellite DNA primers of the laboratory common marmoset, analyze and evaluate the population genetic quality for the marmosets (*Callithrix jacchus*) introduced into the Institute of Medical Laboratory Animal science, Chinese Academy of Medical Sciences. **Methods** A total of 30 marmosets were randomly chosen, and their genome DNA from blood was extracted using phenol/chloroform method. The microsatellite DNA was amplified using standard polymerase chain reaction (PCR). The amplification products were tested by STR scanning after 2% agarose gel and 8% PAGE electrophoresis. The data processing and genetic analysis were completed using the Popgene1.32 software. **Results** A total of 20 pairs of microsatellite loci showed genetic polymorphism, and 147 alleles were detected. The number of allele was 5 to 10, average 7.35. The effective allele was 2.2500 to 6.3830, average 4.0402. The observed heterozygosity was 0.000 to 0.4667, average 0.1533. The expected heterozygosity was 0.1424 to 0.4350, average 0.2506. The Shannon diversity index was 1.2242 to 2.0324, average 1.5949. The polymorphic information content was 0.5366 to 0.8254, average 0.7053. **Conclusions** The 20 pairs of marmoset microsatellite primers are genetically highly diverse and are in a Hardy-Weinberg equilibrium.

【Key words】 marmoset; microsatellite DNA; genetic diversity

[基金项目] 国家重点研发计划(2017YFA0105201);北京市科技计划(Z161100000216154)。

[作者简介] 滕永康(1991—),男,硕士研究生,研究方向:动物学。E-mail: tyk12345@126.com。

刘先菊(1965—),女,副主任技师,研究方向:实验动物遗传质量控制。E-mail: liuxianju1965@163.com。[#]共同第一作者

[通信作者] 刘云波(1962—),男,教授,研究方向:实验动物学。E-mail: yunbolu@126.com

普通绵耳狨猴 (*Callithrix jacchus*) 是一种小型的非人灵长类实验动物,原产于南美巴西的热带雨林,因具有体型较小(成年狨猴体长 165 ~ 199 mm, 体重 337 ~ 413 g^[1])、便于捕捉和固定、饲养成本较低、繁殖效率较高等特点,已广泛用于神经科学、行为学、传染病学、生殖医学、药物开发及药物安全评价等研究领域^[2-3]。自上世纪 80 年代引入我国以来,在病毒学^[4-5]、免疫学^[6-7]、基因工程^[8-9]等研究领域应用较多。清晰的遗传背景是狨猴实验结果的可靠性、准确性、可重复性、以及科学引种、繁殖和生产的基本保障,而尽快建立狨猴的遗传质量监测体系更是十分必要和亟待开展的工作。随着实验动物科学领域的快速发展,微卫星标记检测技术已广泛应用于我国多种实验动物遗传背景监测和种群遗传结构分析,如近交系小鼠及大鼠^[10]、封闭群小鼠^[11]及大鼠^[12]、长爪沙鼠^[13]、小型猪^[14]等常用实验动物群体已建立了稳定的微卫星标记检测方法,包括非人灵长类动物,如恒河猴^[15]及食蟹猴^[16],均有相关微卫星标记的遗传学结构分析报道。而狨猴作为新型的实验动物,国外研究者 Raveendran 等^[17]、Kato 等^[18]相继开发了狨猴微卫星 DNA 标记引物,并对狨猴微卫星位点多态性进行分析报道,国内至今尚无报道。鉴于狨猴在生物医学研究领域诸多学科的重要性,以及狨猴目前仍作为“实验用狨猴”,尚无国家、行业或地方标准的推出。本文通过筛选验证得到 20 对多态性较好的微卫星位点,并就中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物北方资源中心引进的实验用狨猴群体遗传结构进行测定分析,为狨猴科学繁育及遗传质量控制提供数据支持。

1 材料和方法

1.1 实验动物

成年狨猴 30 只,年龄 2 ~ 4 岁,体重 330 ~ 420 g。由中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物北方资源中心 [SCXK(京)2014 - 0011] [SYXK(京)2017 - 0027] 提供。温度 24℃ ~ 29℃,湿度 > 40%,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。

1.2 主要试剂及仪器

Easy Pure Blood Genomic DNA Kit (code #EE121 - 01, 全式金); 2 × EasyTaq PCR Super Mix (AS111 - 02, 全式金); 100 bp DNA Ladder (code 3422A,

TaKaRa); 抗凝剂为乙二胺四乙酸二钾 (EDTA-K₂); PCR 仪 (Mycycler™ Thermal Cycler 型, Bio-Rad); 电泳仪 (200/2.0 Power Supply 型, Bio-Rad); 凝胶成像系统 (Tanon-1600 型, 天能); 遗传分析仪 (3730XL DNA analyzer, ABI)。

1.3 实验方法

1.3.1 样本采集和基因组 DNA 提取

狨猴后肢静脉采血, EDTA-K₂ 抗凝, 采血量 of 每只 0.5 mL。用 Easy Pure Blood Genomic DNA kit 纯化基因组 DNA。

1.3.2 引物筛选及 PCR 扩增

通过查阅相关文献,筛选多态性较好的 41 个狨猴微卫星标记,经 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unists>) 报道及 PCR 优化后得到了 20 个狨猴微卫星标记和 20 对引物,这些标记基因基本覆盖了狨猴 20 条染色体上的遗传概貌,具有丰富的多态性,微卫星标记信息详见表 1。PCR 扩增总体系 20 μL,其中 2 × EasyTaq PCR Super Mix 8 μL,模板 DNA 量 1 μL,上下游引物各 0.2 μL (浓度: 50 μmol/L), ddH₂O 10.6 μL。PCR 扩增条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 退火温度 55℃ ~ 60℃ 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 40 个循环; 72℃ 继续延伸 8 min, 扩增产物 4℃ 保存。

1.3.3 PCR 产物鉴定及电泳结果

用 2% 琼脂糖凝胶 (agrose) 电泳, 点样量每孔 5 μL, 以 150 V 恒压 30 min 进行 PCR 产物鉴定; 再用 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 电泳, 以 80 V 恒压 1.5 h 进行等位基因的分离, 上样量 5 μL, 用 EB 缓冲液进行染色, Tanon-1600 凝胶成像系统进行成像。

1.3.4 STR 扫描

一次扫描 3 个微卫星位点, 每 3 个位点的反向引物分别用 ROX、FAM、HEX 三种荧光标记物进行标记, 标记后的引物再进行 PCR 扩增, 其扩增产物按 1:3:5 体积比混合后取 1 μL 进行毛细管电泳检测和遗传分析仪 3730xl DNA analyzer (ABI) 扫描分析, 通过 Genemarker V2.2.0 软件统计等位基因片段大小, 并对扫描峰图进行数据处理。

1.4 统计学方法

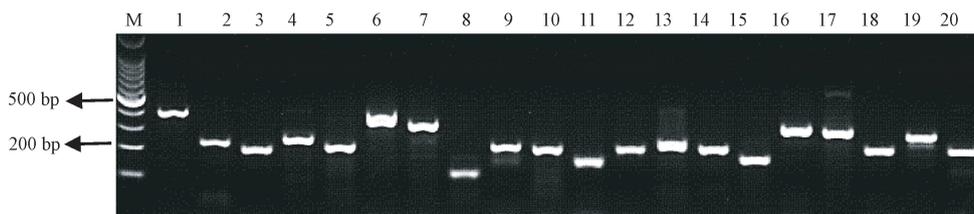
群体内遗传结构分析常采用杂合度和多态信息含量进行分析和评估, 将所有样本的微卫星基因型输入 Popgene1.32 软件, 计算不同个体在各个微卫星位点上的观察等位基因数 (observed number of

alleles, N_a)、有效等位基因数 (effective numbers of alleles, N_e)、表观杂合度 (observed heterozygosity, H_o)、期望杂合度 (expected heterozygosity, H_e)、香隆信息指数 (Shannon's information index, I) 及反映哈迪-温伯格平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE) 的 P -val; 再用 PIC-CALC 软件 (Version-0.6) 对每个位点进行多态信息含量 (polymorphism information content, PIC) 计算。

2 结果

2.1 PCR 扩增产物电泳结果

图 1 所示, 采用 No. 3 样本基因组 DNA 扩增的 20 对狨猴微卫星产物。2% 琼脂糖凝胶电泳结果显示, 经 PCR 反复优化, 扩增产物丰度较高、特异性较好, 初步可以观察到不同微卫星标记扩增片段大小

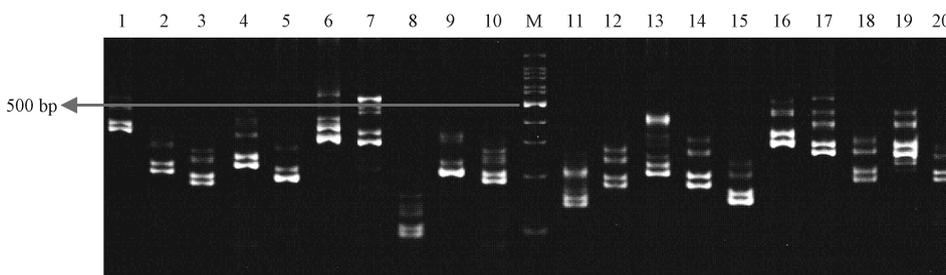


注: (M) DL1000 bp marker。

图 1 20 个狨猴微卫星标记对 No. 3 样本 DNA 的 PCR 扩增结果

Note. (M) DL1000 bp marker.

Fig. 1 The PCR amplification results of 20 marmoset microsatellite markers of the sample No. 3



注: (M) DL1000 bp marker。

图 2 20 个微卫星 DNA 等位基因片段大小的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离结果

Note. (M) DL1000 bp marker.

Fig. 2 The allele size and number results of 20 microsatellite DNA separated by the non-denatured 6% PAGE

2.3 种群遗传多态性分析

2.3.1 多态性分析

30 只狨猴在 20 个微卫星位点共检测 147 个观察等位基因, 平均每个位点有 5~10 个, 其中 CAJA17、Ham65、Ham61 均有 10 个等位基因, CAJA1 位点有 9 个等位基因, 表现出较高的多态性, 20 个座位的平均等位基因数为 7.35 个, 有效等位基因数在 2.250~6.383 个之间, 平均等位基因数 4.040 个。(见表 1)

的不同; 进一步用 6% 非变形的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 检测出各个微卫星不同等位基因的片段大小 (图 2)。

2.2 STR 扫描结果

筛选的 20 个狨猴微卫星标记通过 PCR 扩增, 凝胶电泳鉴定丰度较高, 初步用非变性聚丙烯酰胺电泳进行分离, 显示出各标记位点不同片段大小的等位基因; 进一步 STR 扫描后, 30 个样本在 20 个微卫星标记均检测到扫描波峰, 不同样本在各位点标明有效等位基因大小及数量 (图 3)。STR 扫描可以精确到等位基因片段大小 1 bp 的差异, 图 3 是样本 1、5、7、12 在微卫星位点 Ham26 的扫描波峰, 图 3A 只检测到 1 个等位基因波峰, 表示样本为纯合子; 图 3B~D 各检测到 2 个等位基因波峰, 表明所检样本均为杂合子。

2.3.2 杂合度和多态信息含量

20 个微卫星位点的观察杂合度、期望杂合度、香隆信息指数以及多态信息含量分析结果详见表 2。从表 2 中可以看出, 观察杂合度最大为 0.4667, 平均为 1.533; 期望杂合度在 0.1424~0.435 之间, 平均期望杂合度为 0.251; 香隆信息指数在 1.2242~2.0324 之间, 平均为 1.5949, PIC 在 0.5365~0.8253 之间, 平均 PIC 为 0.7053。

2.4 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验

用 Popgene1.32 软件计算实验用狨猴 20 个微卫星位点的 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验的

P 值, 结果 P 值均大于 0.05, 即 30 只狨猴在 20 个微卫星位点处于 Hardy-Weinberg 平衡, 详见表 2。

表 1 狨猴微卫星 DNA 标记信息

Tab.1 Information of the marmoset microsatellite DNA markers

序号 No.	位点 Loci		引物序列(5' - 3') Primer sequences	等位基因数 No. of alleles	等位基因范围 Allele range	退火温度(°C) Temperature
1	CAJA1	F	GAAGACGGGGCCGTAATA	9	386 ~ 402	60
		R	TGTGGTGGCTCATACCTGAA			
2	CAJA6	F	GAGCACCAAGATTGGCATT	6	235 ~ 243	60
		R	CCAATACACATCGGCTTTGA			
3	CAJA10	F	ACCCCTACATTGCCAAATTGC	6	198 ~ 208	60
		R	GCCTCTTCTGAGGGAAGTGA			
4	CAJA11	F	CGAAAAGTGTGCTCAACAGGA	5	254 ~ 262	60
		R	AAGGTGGGATTCTGAAAGCA			
5	CAJA14	F	AGCACATGAACCCAGGTT	6	378 ~ 390	60
		R	AGTGAAAACAGGCTGGGAGA			
6	CAJA17	F	GGGCACTCCAAGGTCAGTAA	6	216 ~ 232	60
		R	TTGCCCCCTGCTTATTGTAG			
7	CAJA18	F	ACTTGCAGGCCAGTGTCTT	10	382 ~ 400	60
		R	TGGACAGCTGAGGTTTCTT			
8	D10q ham51	F	CGGGAATTCAAAGGCGTTCT	8	315 ~ 329	63
		R	AGGAGGATTTCCGATTTGGG			
9	D11ham187	F	TGGAAGAACTTCTGCCAAACC	6	103 ~ 117	60
		R	GCTTGTTCAGGCAGACTGAC			
10	Ham157	F	CAGCCAACATGCTTCTCAGT	6	193 ~ 205	60
		R	GGTGGAAATAAATCAGGCTACCAG			
11	Ham60	F	TGCTCTAGAGGTTCCACTCTG	8	139 ~ 165	58
		R	GGCATGTTACCTAACCTCTCTG			
12	Ham65	F	TGAGAACGACTGCTCTAGGT	10	177 ~ 201	58
		R	TGGAAGTGGCTTCATTCCTG			
13	Ham181	F	CAATGAGATGTGTCCAAGTGAG	7	213 ~ 239	58
		R	CCAAAACCCAATATGCAGT			
14	Ham184	F	GGCCGAGCTCATCTTTCAC	7	150 ~ 172	63
		R	CCTCCCAGCATCTTCAAGAC			
15	Ham125	F	GTGGGTAAATGCTGCCATCT	8	187 ~ 201	59
		R	GTTTCAACTCTGCGTCTAGTC			
16	Ham101	F	AGACCAAGCATCTTCTGGAC	6	281 ~ 297	59
		R	CACCTTTAAACTGCTGTGGTTC			
17	Ham61	F	CAAAGATGCTTGGGGATGGA	10	263 ~ 287	61
		R	AAGATCTTGCAGGGCGTAAG			
18	Ham32	F	GCCCAAATCTGTTTGACAC	7	183 ~ 199	58
		R	CCACCTAGATCATCGAGAGTAG			
19	Ham100	F	GACCAACTCAAAGCTAGCA	8	244 ~ 262	58
		R	GGTAAACATGCTCTCGACCTT			
20	Ham26	F	GCAAATTCGTGAAGCATTCC	8	182 ~ 206	59
		R	AACAGTTGGATGAGTTCAG			

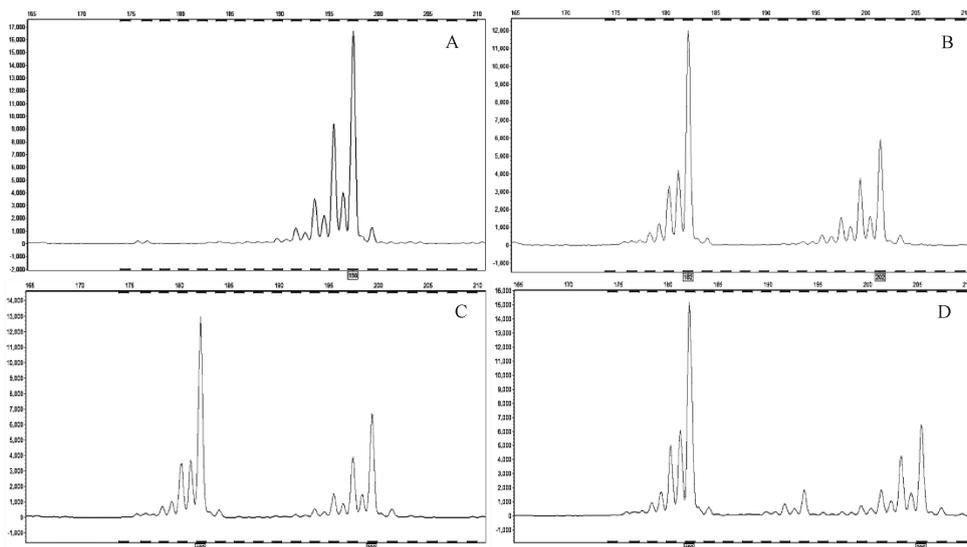


图 3 Ham26 对 4 个样本的 STR 扫描结果

Fig. 3 Results of Ham26 scanning of 4 samples from the marmosets

表 2 20 个微卫星位点对狨猴种群的检测结果

Tab. 2 The detected information of 20 microsatellite marker loci in the marmosets

序号 No.	位点 Loci	等位基因数 Na	有效等位基因数 Ne	观测杂合度 Ho	期望杂合度 He	香隆信息指数 I	多态信息含量 PIC	遗传平衡 P 值 Hardy-Weinberg
1	CAJA1	9	4.7493	0.0000	0.1972	1.7501	0.7614	>0.05
2	CAJA6	6	3.6290	0.0667	0.2633	1.4503	0.6826	>0.05
3	CAJA10	6	4.2553	0.0667	0.2220	1.5796	0.7296	>0.05
4	CAJA11	5	3.1414	0.0000	0.3068	1.3157	0.6287	>0.05
5	CAJA13	6	4.5455	0.1333	0.2068	1.5880	0.7447	>0.05
6	CAJA14	6	3.2609	0.2000	0.2949	1.3867	0.6498	>0.05
7	CAJA17	10	5.1724	0.2333	0.1797	1.9874	0.7907	>0.05
8	CAJA18	8	2.2500	0.3667	0.4350	1.2785	0.5366	>0.05
9	D10qham51	6	4.7619	0.1333	0.1966	1.6591	0.7589	>0.05
10	Ham157	6	4.1096	0.0667	0.2305	1.5230	0.7157	>0.05
11	Ham60	8	4.1475	0.2667	0.2282	1.6684	0.7286	>0.05
12	Ham65	10	3.3210	0.2000	0.2893	1.6787	0.6804	>0.05
13	Ham181	7	2.3018	0.4667	0.4249	1.2242	0.5387	>0.05
14	Ham184	7	4.6036	0.0667	0.2040	1.6538	0.7513	>0.05
15	Ham125	8	4.5685	0.1333	0.2056	1.7239	0.7519	>0.05
16	Ham101	6	3.5644	0.1333	0.2684	1.4560	0.6749	>0.05
17	Ham61	10	6.3830	0.0000	0.1424	2.0324	0.8254	>0.05
18	Ham32	7	3.6810	0.2000	0.2593	1.6062	0.7023	>0.05
19	Ham100	8	4.5685	0.1333	0.2056	1.7442	0.7537	>0.05
20	Ham26	8	3.7895	0.2000	0.2514	1.5919	0.7001	>0.05
	均值	7.35	4.0402	0.1533	0.2506	1.5949	0.7053	>0.05

3 讨论

实验动物是实验动物科学的重要组成,是生命科学的基础支撑、活的“精密仪器”,而实验动物的标准化和动物实验的规范化研究势必会成为实验动物科学的重要工作。在我国,狨猴至今仍被定义为“实验用动物”,即狨猴作为诸多学科研究用的非人灵长类实验动物,目前尚无国家、行业或地方标

准的推出。众所周知,健康可用于科学研究的实验动物,除了要求其携带的病原微生物、寄生虫进行实施质量控制和监测外,还要求实验动物具有清晰和明确的遗传背景。

狨猴是公认的、重要的非人灵长类实验动物模型,美国国家人类基因组研究机构已大力度投资验证了狨猴的基因组序列,这对狨猴的基因和基因型分析具有重要意义^[3]。微卫星标记存在于大多数

原核及真核生物基因组 DNA 序列,由 2~6 个核苷酸串联重复序列构成,物种间和物种个体间的差异及核心序列重复数量的不同,便产生微卫星 DNA 标记及微卫星 DNA 的多态性。由于微卫星 DNA 相对其它分子标记分布广、信息含量高、多态性丰富、特异性好、操作简单、且符合孟德尔的共显性遗传定律,近年来已广泛用于实验动物质量监测及动物群体遗传结构分析^[19-20]。本文通过查阅文献^[17-18]筛选优化了 20 个狨猴微卫星 DNA 标记,并对 30 只样本进行微卫星 DNA 扩增和扫描,初步对实验用狨猴群体进行了遗传多样性分析。等位基因频率作为评估遗传变异的前提和基础,是指某一等位基因特定基因座位在所有等位基因中所占的比例,在某一个位点上,如果它的等位基因频率最大值 < 0.95,通常定义为多态性位点,本文检测的所有等位基因频率最高为 0.65,表明筛选的 20 个微卫星位点的遗传多样性较好,有效等位基因数是反映群体遗传变异程度的一个重要指标,如果有效等位基因数与绝对等位基因数越接近,表明该等位基因在群体内均匀分布度就越好,文中涉及的 20 个微卫星位点,其中 D10ham51 的有效等位基因数和观察等位基因数较接近,为 1.2381;而 Ham65 位点的有效等位基因数与绝对等位基因数相差最大,为 6.679,表明该位点的等位基因的均匀分布度较差,有可能是繁育过程中人工选择因素所导致。

群体杂合度表示在被检测的位点上群体中的杂合子频率,它是反映群体杂合程度的度量单位,群体平均杂合度的高低反映了群体遗传的一致性程度,群体杂合度越高,表明该群体的遗传变异越大,群体遗传多态性越高良好的种群平均杂合度在 0.5~0.7。本文用 Popgene1.32 软件计算平均观测杂合度和平均期望杂合度基本接近,相差范围仅为 -0.05~0.3,表明狨猴群体遗传变异较小、遗传一致性较差。而 PIC 是用以描述微卫星基因座多态性大小的量度单位,Botstein 等^[21]认为当基因座位 PIC > 0.5 为高度多态位点,低度多态位点时, PIC < 0.25。本文的 20 个微卫星基因座位中, PIC 范围在 0.5365~0.8253,平均为 0.7053,所有的位点均大于 0.500,表明 20 个位点均表现为高度多态性,说明所筛选的微卫星基因座用于狨猴群体遗传多样分析较可靠,表明所监测的狨猴群体具有较丰富遗传多样性,选择潜力较大。此外,香隆指数是反映种群均匀性分布的一个重要指标,一般情况下其香

隆指数变化在 1.5~3 之间,本文的 20 个微卫星基因座位香隆指数平均值为 1.594,表明本地狨猴群体分布及群体交配较随机。

Hardy-Weinberg 平衡定律是指在一个群体无限大、个体间进行随机交配、没有突变、没有遗传漂变的情况下,群体内一个位点上的基因型频率和基因频率将世代保持不变,即处于遗传平衡状态。Hardy-Weinberg 检验 P 值 (HWE) > 0.05 时,表示该位点在群体中处于 Hardy-Weinberg 平衡;当 $0.01 < P < 0.05$ 时,表示显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡。本文 Hardy-Weinberg 检验平均 P 值为 0.817,最小 P 值为 0.0982,即微卫星位点检验 P 值均大于 0.05,表明在狨猴种群中筛选的 20 个微卫星位点处于 Hardy-Weinberg 遗传平衡状态。

综上所述,本文从大量的狨猴微卫星 DNA 座位筛选出分布在不同染色体上 20 个标记,并随机抽取 30 只人工饲养繁殖的实验用狨猴样本进行 PCR 扩增,扩增产物的电泳结果均显示清晰可见的目的条带及 DNA 多态性,表明采用的微卫星标记能够较好地反映狨猴种群个体间的遗传多样性。STR 扫描结果经软件分析显示,除等位基因均匀度分布度较差,群体杂合度的遗传变异较小、遗传一致性较差外,其 PIC 仍处于高度多态性范围,即具有较丰富遗传多样性,同时香隆指数的平均值进一步表明本地狨猴群体分布及群体繁殖具有随机性。此外,Hardy-Weinberg 检验 P 值也证实了狨猴种群得遗传平衡状态。这些结果均反映了狨猴种群遗传结构的现状,为狨猴科学繁育及遗传检测方法提供了基础资料。

参考文献:

- [1] 田岛嘉雄. 实验动物的生物学特性资料 [M]. 第一版. 实验动物中央研究所, 1989: 486-488.
- [2] Kishi N, Sato K, Sasaki E, et al. Common marmoset as a new model animal for neuroscience research and genome editing technology [J]. Dev Growth Differ, 2014, 56(1): 53-62.
- [3] Mansfield K. Marmoset models commonly used in biomedical research [J]. Comp Med, 2003, 53(4): 383-392.
- [4] 马波,胡彩珍,何丽芳,等. 精制甲型肝炎灭活疫苗 (YN5 株) 狨猴试验安全性和免疫原性 [J]. 中国生物制品学杂志, 2004, 17(1): 36-38.
- [5] 李婷婷,帅丽芳,陈姿喧,等. 丙型肝炎病毒结构蛋白的嵌合病毒狨猴感染模型 [J]. 中国输血杂志, 2010, 23(s1): 167.
- [6] 殷森. 普通棉耳绒猴 MHC-I 型基因多态性特征分析 [D]. 南方医科大学, 2013.

- [8] 寇珍珍. 胰岛素受体及其相关信号转导通路参与糖尿病性痛和炎性痛信息传递和调控的机理研究 [D]. 第四军医大学, 2014.
- [9] 张泽宾. PCK1 转录调控机制及功能性分子标记鉴定 [D]. 石河子大学, 2013.
- [10] 严晋华. 肿瘤坏死因子抑制磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶基因转录表达的机制探讨 [D]. 中山大学, 2007.
- [11] Perez-Villamil B, Schwartz PT, Vallejo M. The pancreatic homeodomain transcription factor IDX1/IPF1 is expressed in neural cells during brain development [J]. *Endocrinology*, 1999, 140(8): 3857-3860.
- [12] Bretherton-Watt D, Gore N, Boam DS. Insulin upstream factor 1 and a novel ubiquitous factor bind to the human islet amyloid polypeptide/amylin gene promoter [J]. *Biochem J*, 1996, 313 (Pt 2): 495-502.
- [13] Watada H, Kajimoto Y, Umayahara Y, et al. The human glucokinase gene beta-cell-type promoter: an essential role of insulin promoter factor 1/PDX-1 in its activation in HIT-T15 cells [J]. *Diabetes*, 1996, 45(11): 1478-1488.
- [14] Tsuji O, Miura K, Okada Y, et al. Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107 (28): 12704-12709.
- [15] 王涤非. 胰岛素受体底物-1 在 2 型糖尿病发生发展中的作用研究 [D]. 中国医科大学, 2005.
- [16] 于海兵. 瘦素信号通路及脂联素信号通路与 2 型糖尿病的关系研究 [D]. 南方医科大学, 2015.
- [17] 曾健, 林竞成, 黄坚航. 金线莲的应用与开发 [J]. *海峡药学*, 1996, 8(4): 82-83.
- [18] 马志杰, 胡宏友. 民间药材金线莲研究动态(综述) [J]. *亚热带植物科学*, 2002, 31(S1): 27-31.
- [19] 陈卓, 黄自强. 金线莲及其提取物降血糖实验研究 [J]. *福建医科大学学报*, 2000, 34(4): 350-353.
- [20] 梁锦锋, 朱勇, 张洪瑶, 等. 斑马鱼模型在药物研发早期肾脏毒性中的应用研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26 (9): 30-35.
- [21] Gnügge L, Meyer D, Driever W. Pancreas development in zebrafish [J]. *Methods Cell Biol*, 2004, 76(3): 531-551.
- [22] Key B, Devine CA. Zebrafish as an experimental model: strategies for developmental and molecular neurobiology studies [J]. *Methods Cell Sci*, 2003, 25(1-2): 1-6.
- [23] 徐振华, 赵慕钧, 李载平. 斑马鱼与人类疾病模型的研究 [J]. *生命的化学*, 2002, 22(4): 376-379.
- [24] Westerfield M. The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*) [M]. M. Westerfield, 2007.
- [25] 薛钰. 斑马鱼胚胎组织中心表达的 Bmp 信号在背腹分化中的作用 [D]. 清华大学, 2014.
- [26] Evans-Molina C, Garmey JC, Ketchum R, et al. Glucose regulation of insulin gene transcription and pre-mRNA processing in human islets [J]. *Diabetes*, 2007, 56(3): 827-835.

[收稿日期]2017-10-19

(上接第 20 页)

- [7] 徐玉霞. 普通棉耳猕猴 MHC-I 限制性等位基因抗原分子特征分析 [D]. 南方医科大学, 2015.
- [8] 石亮, 张晨, 向志光, 等. 腺相关病毒介导的猕猴 P53 基因沉默 [J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26(4): 53-57.
- [9] 邓怡晨, 张晨, 向志光, 等. 猕猴 B2m 基因沉默位点在细胞水平的验证 [J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(5): 37-41.
- [10] 王越甲, 杨炜峰, 车路平, 等. 利用优选的微卫星标记建立常用大小鼠品系的遗传监测体系 [J]. *实验动物科学*, 2014, 31 (3): 5-9, 14.
- [11] 商海涛, 魏泓, 岳秉飞, 等. 应用微卫星标记对三个昆明小鼠封闭群的遗传学研究 [J]. *实验动物科学*, 2009, 26(2): 1-6.
- [12] 商海涛, 魏泓, 岳秉飞, 等. 应用微卫星 DNA 标记对 Wistar 和 SD 大鼠封闭群的遗传学研究 [J]. *分子细胞生物学报*, 2008, 41(1): 28-34.
- [13] 丁贤明, 钱宝珍, Junichiro M, 等. 长爪沙鼠的遗传多样性分析 [J]. *遗传*, 2008, 30(7): 877-884.
- [14] 魏杰, 王吉星, 王洪, 等. 房山封闭群小型猪微卫星位点的测定 [J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23(11): 7-12.
- [15] 禹文海, 和占龙, 鲁绍雄, 等. 基于微卫星 DNA 标记的恒河猴遗传多样性研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23(3): 21-25.
- [16] 李瑞生, 李晓娟, 高蓉, 等. 食蟹猴微卫星 DNA 标记遗传监测及多态性分析 [J]. *中国比较医学杂志*, 2011, 21(8): 27-30.
- [17] Raveendran M, Tardif S, Ross CN, et al. Polymorphic microsatellite loci for the common marmoset (*Callithrix jacchus*) designed using a cost- and time-efficient method [J]. *Am J Primatol*, 2008, 70(9): 906-910.
- [18] Katoh H, Takabayashi S, Itoh T. Development of microsatellite DNA markers and their chromosome assignment in the common marmoset [J]. *Am J Primatol*, 2009, 71(11): 912-918.
- [19] 左宝芬, 杜小燕, 霍学云, 等. 五个 C57BL/6J 小鼠生产群的微卫星检测及遗传学质量分析 [J]. *实验动物与比较医学*, 2012, 32(1): 51-55.
- [20] 王洪, 杜小燕, 徐平, 等. 上海 KM 小鼠种子群体遗传状况分析 [J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(12): 27-32.
- [21] Botstein D, White RL, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *Am J Hum Genet*, 1980, 32(3): 314-331.

[收稿日期]2017-12-08