

用于实验用猫群体遗传分析的微卫星位点筛选

贾松华, 王 洪, 魏 杰, 岳秉飞*

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

【摘要】 目的 筛选适用于猫遗传质量检测的微卫星位点。方法 从相关文献和 GenBank 中备选了 74 个微卫星位点, 摸索了最佳退火温度优化 PCR 反应条件, 以琼脂糖凝胶电泳以及 STR 扫描结果为依据, 选取条带清晰稳定、等位基因丰富、均匀分布于猫 18 对常染色体上的一组微卫星位点用于实验用猫遗传质量检测。结果 从 74 个备选的微卫星位点中筛选到 55 个具有多态性且稳定扩增的 STR 位点。并在猫的每条常染色体(除了 A1、B1 染色体)适当选择 1~2 个多态性较高的 STR 位点, 最终得到 31 个分布于 18 对常染色体且等位基因多的微卫星位点。结论 成功筛选到一组适用于猫群体遗传结构分析的微卫星位点。

【关键词】 猫; 微卫星; 位点筛选

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018)12-0055-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.12.010

Selection of microsatellite loci for genetic analysis of experimental cat populations

JIA Songhua, WANG Hong, WEI Jie, YUE Bingfei*

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

【Abstract】 **Objective** To screen a panel of suitable microsatellite loci to analyze the genetic structure of experimental cat populations. **Methods** Seventy-four candidate microsatellite loci on 18 pairs of autosomes in cats were chosen from GenBank and related literature. Then, the PCR conditions were optimized by exploring the optimal annealing temperature. Based on the results of agarose gel electrophoresis and STR scanning, a set of microsatellites with clear and stable bands, abundant alleles, and even distribution on the 18 pairs of autosomes in cats were selected. **Results** Fifty-five polymorphic and stably amplified STR loci were screened from 74 alternative microsatellite loci. Then, one to two higher polymorphic STR loci were selected in each autosome (other than A1 and B1 chromosomes) of the cat. Finally, 31 loci with multiple alleles and even distribution on the 18 pairs of autosomes in cats were screened from 74 candidate microsatellite loci. **Conclusions** A set of microsatellite loci suitable for genetic structure analysis of cat populations is successfully screened.

【Keywords】 cat; microsatellite; locus isolation

猫(cat; *Felis catus*) 隶属哺乳纲(Mammals)、食肉目(Carnivora)、猫科(Felidae)、猫属(Felis)。染色体数 $2n = 38$ 。目前, 猫在全世界的拥有量约 6 亿

只^[1], 为其在科研方面的应用提供了丰富的猫资源。据 OMA (ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN ANIMALS) 网站的统计分析, 截止 2018 年 6 月,

[基金项目] 北京市科技计划“实验用猫地方标准及相关检测技术标准研究”(D171100002717001)。

[作者简介] 贾松华(1992—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 分子遗传学。E-mail: 1870070105@qq.com

[通信作者] 岳秉飞(1960—), 男, 博士, 研究员。研究方向: 动物遗传学。E-mail: y6784@126.com

在猫中发现的与人类同源的遗传性疾病有 208 种。同时,猫使人类更深入地了解了一些急性感染性疾病的相关机理和生物学特性。历史上很多致癌基因的信号转导通路最初是在携带有白血病病毒的猫动物模型中发现的^[2];转基因鼠和猫是研究人类免疫缺陷病毒(HIV)时应用最多的两类非灵长类动物^[3-4];感染有冠状病毒(FeCoV)的猫对于研究 SARS 的临床症状是一个重要的切入点^[2]。此外,猫是研究神经生理学、药理学的热门动物。它是我国药典在检查药品的降压物质时指定的实验用动物^[5],也是研究脑神经以及眼科的绝佳材料^[6]。

鉴于猫丰富的科学实验价值,有必要对猫进行实验动物化培育。在猫的实验动物化进程中,初筛过的猫必须进行严格的微生物净化、遗传及饲养环境等因素的控制。目前,国外对猫群体的饲养繁育、质量控制、品系培育等经验丰富。例如,宾夕法尼亚大学在 1974 年构建了 RCAM (Referral Center for Animal Models of Human Genetic Disease) 系统,其保存的猫疾病模型在研究与人类同源的遗传性疾病中具有不可或缺的位置^[7]。NIH (National Institutes of Health) 自 1978 年在其动物中心建立了封闭群猫种群^[8]。苏黎世大学目前已培育有 SPF 级的实验用猫^[9]。与之相比,我国实验用猫资源紧缺,多数实验用猫购自市场,经隔离检疫、严格筛选后使用;目前为止,我国 90% 以上的教学科研实验用猫都是从商贩或“收购型饲养场”购买。其来源混杂,遗传背景模糊,所携带微生物不明等情况,对实验结果的准确性、科学性以及重现性都有直接影响^[10-12]。为了提高实验用猫的质量,使其更易于做科研和生产,我国的一些单位近年来也建立了实验用猫的群体。比如,华北制药厂定向培育成了虎斑猫的常染色体隐性突变品系—虎皮猫^[13];自 2003 年大连医科大学也开始了猫的封闭饲养繁育^[14]。

微卫星^[15] (microsatellite) 又称为短串联重复序列(short tandem repeat, STR) 或称简单重复序列(simple sequence repeats, SSR),是指以少数几个核苷酸(一般为 1~6 bp)为单位,经多次重复(重复 10~60 次左右)单位组成的简单多次串联重复序列,如(CA)_n, (TG)_n。由于微卫星具有分布广泛且均匀、多态性丰富、通用性及保守性等特点,使其迅速成为了第二代 DNA 遗传标记,在小型猪^[16],豚

鼠^[17],兔^[18]等多种实验动物的遗传质量检测中广泛应用。为了能够在猫的实验动物化进程中提供遗传控制的技术支持,本课题组通过检索国内外相关文献报道,备选了 74 个具有多态性的微卫星位点进行实验用猫的遗传质量检测。最终,本研究成功筛选出了 31 个富含多态点且均匀分布于 18 对常染色体上的微卫星位点。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本实验所用家猫、暹罗猫血液样本均由大连医科大学实验动物中心提供。经舒泰麻醉后,无菌采集前肢抗凝血,冷链运输至实验室,并于 4℃ 保存备用。家猫的样本量为 16 只,暹罗猫的样本量为 10 只。动物实验过程中遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

Bio-Rad PowerPar Basic 型电泳仪, NanoPhotometer 型 DNA 微量分析仪, ABI Veriti™ 96 型 PCR 扩增仪, GelLogic 212Pro 型凝胶成像分析系统。

DNA marker、Taq 酶、dNTP 和 10 × PCR buffer 均购自 Takara 公司。ExRed 核酸染料由庄盟生物提供。

1.3 实验方法

1.3.1 猫基因组 DNA 的制备:

参照《分子克隆指南》^[19]及 Loparev VN^[20]等所提出的方案,用 NaI 手提法提取血凝块基因组 DNA,具体步骤详见李芳芳等^[21]采用的血凝块手提法。

提取后的基因组 DNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定并用微量分光光度计测定其浓度和纯度。最后将 DNA 适量稀释成 50~100 ng/μL 作为 DNA 模板,于 4℃ 保存备用。

1.3.2 微卫星 DNA 位点的选择与引物的合成

本课题组根据 Lipinski 等^[22]推荐的 9 个位点,衣帅等^[23]人选出的用于华北制药厂虎皮猫遗传检测的 31 个微卫星位点,以及从 GeneBank 中筛选出的一些位点,共计 74 个微卫星作为本次实验的备选位点。引物委托上海生工有限公司合成。

1.3.3 PCR 及琼脂糖凝胶电泳

PCR 扩增选用 20 μL 的反应体系,其中:10 × PCR buffer(Mg²⁺ Plus) 2 μL, dNTP(各 2.5 mmol/L) 1 μL,上下游引物(100 μmol/L)各 1 μL, Taq 酶(5

U/ μL)0.2 μL ,模板(50 ~ 100 ng/ μL)1 μL ,灭菌水(ddH₂O)13.8 μL 。

PCR 反应程序:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,退火 30 s;72℃延伸 30 s;35 个循环;72℃延伸 7 min;用 2.5% 的琼脂糖、电压 120 V、30 min,ExRed (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 染色,电泳 PCR 产物,进而筛选出扩增效果好的产物进行 STR 扫描。

初选的退火温度是参考相关文献或引物合成公司推荐的退火温度,挑选扩增效果不好的引物进行退火温度的梯度优化。

1.3.4 STR 扫描

首先在 ABI3730XL DNA 测序仪上 (Applied Biosystems, Inc.) 将 PCR 产物进行毛细管电泳分型,并通过 GeneMapper4.0 (Applied Biosystems, Inc.) 软件判读每个位点各等位基因对应的扩增片段大小,随后,用自主编写的软件将每个位点等位基因的扩增片段从小到大排序为 01、02、03、04 等,之后将每个样本的基因型转为 0101、0203、0202、0103 等形式(无扩增条带的样本基因型记为 0000)。

1.4 统计学方法

每个样本的基因型转为 0101、0203、0202 等形式后输入在线软件 Genepop,对各位点进行 Hardy-

Weinberg 平衡分析并检测杂合子缺失情况。并用该软件的类型转换功能将每个样本的基因型转换为 PopGen1.32 软件所需格式。PopGen1.32 可计算观测等位基因数、有效等位基因数、观测杂合度、期望杂合度等指标。

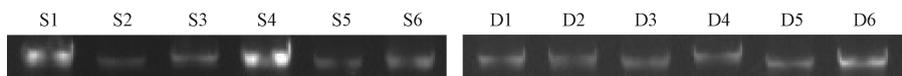
2 结果

2.1 基因组 DNA 琼脂糖检测结果

将 NaI 手提法提取的基因组 DNA 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,凝胶成像系统拍照后的电泳图显示,DNA 条带清晰、明亮、无明显拖尾现象(如图 1 所示),满足该实验要求。

2.2 PCR 反应中退火温度的优化结果

以初选的退火温度进行两个样本的 PCR 反应时,有 56 个位点得到了有效扩增,另有 18 个位点的凝胶电泳图存在条带模糊、有非特异性扩增或者没有目的条带扩增等现象,本研究针对这 18 个位点的退火温度进行了梯度优化。13 个位点优化后扩增出了理想条带;有 4 个位点的扩增效果变化不明显;另有 1 个位点经退火温度优化后仍没有扩增出目的条带。图 2 为 FCA1264、FCA996 两位点的退火温度优化电泳图。

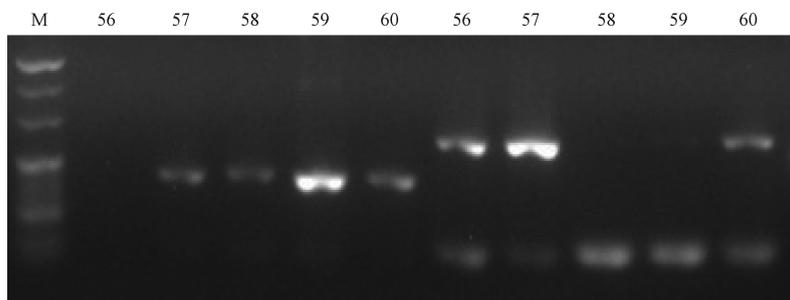


注:编号 S1 ~ S6 为暹罗猫 DNA;编号 D1 ~ D6 为家猫 DNA。

图 1 部分猫基因组 DNA 的 1% 琼脂糖凝胶电泳图

Note. S1-S6; Numbers of Siamese cat genomic DNA; D1-D6; Numbers of domestic cat genomic DNA.

Figure 1 1% Gel electrophoretogram of cat genomic DNA



注:M 为 marker,分子量从大到小依次为 500、400、300、200、100 bp。图示编号为 PCR 反应时所用退火温度(°C)。1 ~ 5 泳道所用引物为 FCA1264;6 ~ 10 泳道所用引物为 FCA996。

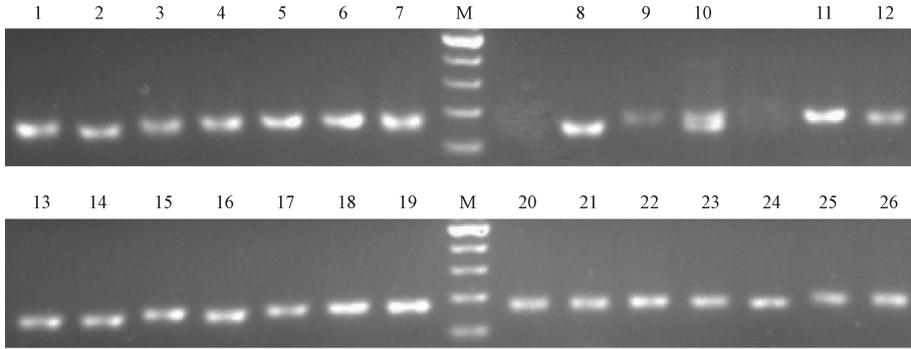
图 2 FCA1264、FCA996 位点的退火温度梯度优化电泳结果

Note. M is the marker (500, 400, 300, 200, and 100 bp). Numbers represent annealing temperatures (°C). The former five temperatures were used for the FAC1264 locus, and the later five temperatures were used for the FAC996 locus.

Figure 2 Annealing temperature gradients of FCA1264 and FCA996 loci

2.3 微卫星位点的初步筛选结果

备选 74 对引物的 PCR 产物经 2.5% 琼脂糖凝胶电泳后,其中 41 对引物(占总数的 55.41%)可检测到个体间等位基因的多态性,有 15 对引物(占总数的 20.27%)的扩增产物为单态,8 对引物的扩增产物为非特异性条带,10 对引物尚得不到稳定扩增。图 3 为 FCA221 位点扩增产物的电泳图谱。

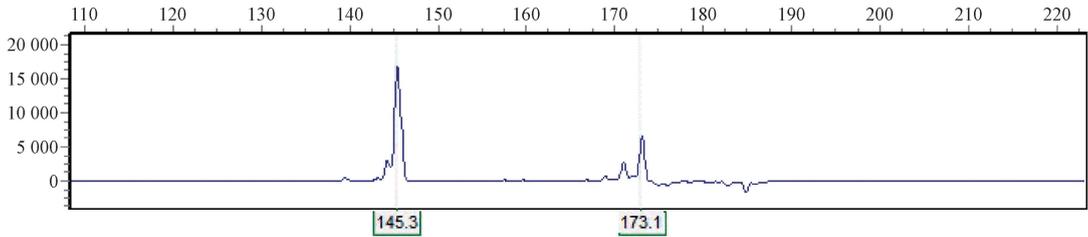


注: M 为 marker,分子量从大到小依次为 500、400、300、200、100 bp;序号 1~10 为暹罗猫,序号 11~26 为家猫。

图 3 FCA221 位点 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图谱

Note. 1-10; M represents the marker (500, 400, 300, 200, and 100 bp). 1-10; Numbers of Siamese cats; 11-26; Numbers of domestic cats.

Figure 3 Agarose gel electrophoresis of PCR products from the FCA221 locus

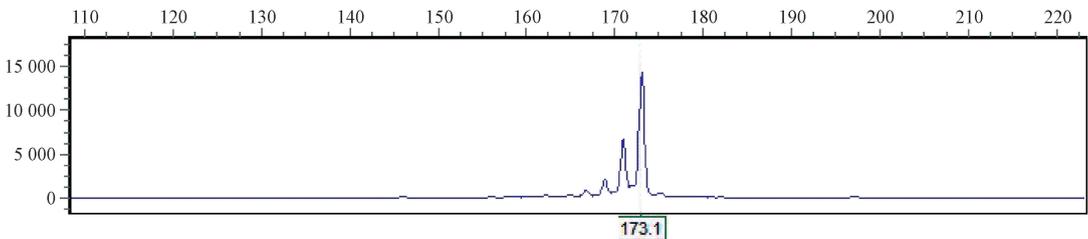


注:第 10 号猫的等位基因大小为 145 bp 和 173 bp,属于杂合子。

图 4 FCA221 位点在图 3 对应的 10 号猫 STR 扫描结果

Note. The alleles of cat 10 were 145 and 173 bp, which were heterozygous.

Figure 4 STR scanning at the FCA221 locus in cat 10



注:第 11 号猫的等位基因大小为 173 bp,属于纯合子。

图 5 FCA221 位点在图 3 对应的 11 号猫 STR 扫描结果

Note. The allele of cat 11 was 173 bp, which was homozygous.

Figure 5 STR scanning at the FCA221 locus in cat 11

2.4 STR 扫描结果

本实验通过毛细管凝胶电泳进行了基因分型,成功分型率为 97.3%。PCR 扩增产物进行 STR 扫描时,会出现两种情况的波形,判读方法如下:若样品为杂合子,则有两个独立的主峰(如图 4);只有一个主峰的样品为纯合子(如图 5)。可依照峰面积的大小判断主峰。图 4、图 5 的横坐标表示扩增产物的片段大小。图中所示峰值越高,表示该产物片段量越多。

2.5 最终筛选的微卫星位点结果

经两种方法逐步筛选备选的 74 对引物时,共得到 55 个富含多态性的微卫星位点。在猫的每条常染色体(除了 A1、B1 染色体)上适当选择 1~2 个多态性较高的 STR 位点,并最终选取了 31 对扩增效果较好、多态性较高的微卫星引物,作为实验用猫遗传质量检测的一套引物。表 1 为筛选的 31 个微卫星位点对应的编号、染色体位置、等位基因范围、退火温度等相关信息。终选的 31 个引物在猫群体中的扩增条带范围为 124~385 bp,所用退火温度范围为 55℃~60℃,共检测出 261 个等位基因,各位点的等位基因数 5~20 个不等,平均等位基因数为 8.42。

3 讨论

众多实验结果^[24-27]表明,本课题组所选用的

STR 标记多态性高,呈共显性,等位基因的变化幅度小,易实现 PCR 扩增和凝胶电泳。在收集样本时,可选用非损伤方式获得,提取的 DNA 纯度要求不高。因此,微卫星具有很强的实用性,属于遗传质量检测的优选标记。微卫星标记的获得方式有四种:1)通过检索 DNA 序列数据库获得 STR;2)借助与所研究物种亲缘关系较近的物种寻求 STR;3)从构建的基因组文库中筛选含 STR 的阳性克隆;4)利用 RAPD 标记获取 STR。本次实验选用第一种方式获得微卫星标记。该方法简单易行且快速经济,但所得微卫星信息有限不如基因组文库,无法反映整个猫的基因组状况。

备选的 STR 在 PCR 扩增时有些位点存在等位基因无法扩增,非特异性扩增等现象。需要对扩增产物进行检测,从而剔除无法扩增以及非特异性扩

表 1 31 个猫微卫星位点的相关信息

Table 1 Characteristics of 31 microsatellite loci in the cats

序号 No.	所在染色体 Chromosom	退火温度(℃) Annealing temperature	等位基因数 Number of alleles	等位基因范围(bp) Allele range
NIFDC1	A2	57	5	167-180
NIFDC2	A3	57	8	170-195
NIFDC3	B1	57	7	162-174
NIFDC4	B2	57	10	160-194
NIFDC5	B2	57	9	186-206
NIFDC6	B3	57	8	181-198
NIFDC7	B4	58	12	207-250
NIFDC8	D1	60	7	128-150
NIFDC9	D1	59	9	156-187
NIFDC10	D3	57	8	145-173
NIFDC11	E1	57	8	181-207
NIFDC12	E3	58	7	195-217
NIFDC13	E3	57	8	372-385
NIFDC14	F1	56	8	154-169
NIFDC15	F2	58	8	276-300
NIFDC16	B1	58	8	171-214
NIFDC17	D4	55	7	216-230
NIFDC18	A1	58	8	219-243
NIFDC19	A1	58	10	199-236
NIFDC20	E2	58	20	214-331
NIFDC21	A1	55	9	157-184
NIFDC22	B4	58	9	124-156
NIFDC23	A1	59	6	211-230
NIFDC24	D2	58	6	145-167
NIFDC25	B1	58	7	220-237
NIFDC26	D4	56	11	125-167
NIFDC27	B3	59	5	244-259
NIFDC28	C1	60	11	240-279
NIFDC29	E2	58	9	185-224
NIFDC30	A2	58	7	172-201
NIFDC31	C2	58	6	151-167

增的位点,最终选出相对理想的高多态性 STR 位点。目前,国内外对筛选微卫星并没有统一的标准可寻,一般通过衡量等位基因数目取舍备选的微卫星位点^[28-29]。Barker^[30]在全球家畜品种间遗传距离测定草案中提供的建议具有一定的参考价值。在检测群体遗传质量时,Barker 认为:1)所用的每个微卫星位点至少有 4 个等位基因;2)为了兼顾检测结果的准确性和经济性,所筛选的微卫星位点数不少于 26 个;3)位点之间不连锁,所选的位点尽量均匀分布每条染色体上。

本实验采用两种方法逐步筛选备选的 74 对引物。第一步选用 2.5% 的琼脂糖凝胶电泳初筛,根据琼脂糖凝胶电泳结果初步判定所选引物是否合适以及 PCR 扩增是否成功,即初步分析引物适用性。剔除无法扩增、非特异性扩增或者不能稳定扩增的位点。挑选了 56 个条带清晰,具有特异性扩增的位点以便进一步 STR 扫描。电泳时有些位点存在引物二聚体现象,但其片段小于 100 bp,易与特异条带区分。初筛所用琼脂糖凝胶电泳法分离效果不是很好,难以区分小于 10 bp 的片段,多数 STR 位点的等位基因变化幅度为 20~40 bp,琼脂糖凝胶最多仅能检出 3~4 个等位基因。理论上可通过增加琼脂糖凝胶的浓度提高分离效果,但浓度太高不易灌制凝胶,无法提高分辨率。但琼脂糖凝胶电泳省时省力经济,不失为初筛引物的有效方法。随后,将挑选的 56 个位点进行 STR 扫描。STR 扫描属于一种新型的基因分型技术,不仅能有效判读样品的纯合和杂合状况,还可以将相差 1 bp 的 DNA 片段区分开,准确测定等位基因的片段大小。该方法灵敏度高、操作简单、易实现高通量检测,但在检测前要求荧光标记引物,检测成本较高。本实验采用琼脂糖凝胶电泳初筛后再进行 STR 扫描可适当降低成本。本实验综合考虑扩增条带的特异性、清晰度、稳定性以及微卫星位点在个体间的多态性,共得到 55 个富含多态性的微卫星位点。为了兼顾遗传检测成本和准确性,本实验在猫的每条常染色体(除了 A1、B1 染色体)上适当选择 1~2 个多态性较高的 STR 位点。最终获得了 31 对扩增效果较好,多态性较高的微卫星引物,推荐为实验用猫遗传质量检测的一套首选引物。但筛选的位点是否完全适合用于实验用猫的群体遗传检测,尚需在实践中应用验证。此外,由于实验所用样本数量有限,还不能完全代表猫的多态性。在今后实践中,应增加

不同来源的猫品种样本量,发掘新的多态性位点,以确保准确描述实验用猫的遗传质量。

参考文献:

- [1] O'Brien SJ, Johnson W, Driscoll C, et al. State of cat genomics [J]. *Trends Genet*, 2008, 24(6): 268-279.
- [2] Menotti-Raymond M, O'Brien SJ. The Domestic Cat, *Felis catus*, as a model of hereditary and infectious disease [M]. Humana Press, 2008.
- [3] 夏祖昌,魏征,徐立然.非灵长类艾滋病动物模型的研究现状[J].*中国组织工程研究*,2008,12(42):8362-5.
- [4] O'Brien SJ, Menotti-Raymond M, Mmurphy WJ, et al. The feline genome project [J]. *Ann Rev Genet*, 2002, 36(1): 657-686.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:2010年版.二部[M].中国医药科技出版社,2010:附录103.
- [6] Narfström K, Deckman KH, Menottiraymond M. Cats: A gold mine for ophthalmology [J]. *Annu rev Anim Biosci*, 2013, 1(1): 157-177.
- [7] Gurda B L, Bradbury AM, Vite CH. Canine and feline models of human genetic diseases and their contributions to advancing clinical therapies [J]. *Yale J Biol Med*, 2017, 90(3): 417-431.
- [8] Yuhki N, O'Brien SJ. Molecular characterization and genetic mapping of class I and class II MHC genes of the domestic cat [J]. *Immunogenetics*, 1988, 27(6): 414-425.
- [9] Geret C, Riond B, Cattori V, et al. Housing and care of laboratory cats: from requirements to practice [J]. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 2011, 153(4): 157-164.
- [10] 钟品仁.哺乳类实验动物[M].人民卫生出版社,1987:305.
- [11] 方远书,何忠平,裘颖儿.实验用猫研究现状和发展趋势探讨[J].*山东畜牧兽医*,2017,38(10):
- [12] 刘明慧,袁宝,陈健,等.猫实验动物标准化的研究进展及探讨[J].*吉林畜牧兽医*,2015,36(2):29-30.
- [13] 李锦铭,刘继锋,何梅英,等.虎皮品种猫的育成[J].*实验动物科学*,1990,3(3):8-12.
- [14] 詹红微,王爱国,王福金,等.浅谈实验猫的一些饲养与管理体会[J].*实验动物与比较医学*,2012,32(6):541-3.
- [15] 宋国华.遗传标记在实验动物遗传质量控制中的应用[M].军事医学科学出版社,2011:77.
- [16] 王思珍,郭闯,郭猛,等.巴马小型猪和贵州小型猪封闭群的遗传结构分析[J].*中国兽医学报*,2017,37(7):1389-93.
- [17] 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):32-7.
- [18] 申幸娇,岳秉飞.应用微卫星标 DNA 记对三个封闭群兔遗传分析[J].*中国比较医学杂志*,2013,23(9):12-8.
- [19] J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔, 萨姆布鲁克, et al. 分子克隆实验指南(第三版) [M]. 科学出版社, 2002.