

冯丹丹,陈沫,杜小燕,等. 利用基因组数据对长爪沙鼠微卫星位点的筛选与优化 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(7): 1-7,16.

Feng DD, Chen M, Du XY, et al. Screening and optimization of microsatellite loci in Mongolian gerbils using genomic data [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(7): 1-7,16.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 07. 001

利用基因组数据对长爪沙鼠微卫星位点的 筛选与优化

冯丹丹¹,陈沫²,杜小燕¹,陈振文^{1*}

(1.首都医科大学基础医学院,北京 100069; 2.中国医学科学院药物研究所,北京 100050)

【摘要】 目的 利用基因组数据筛选更多有效的长爪沙鼠微卫星位点用于近交系和封闭群遗传质量分析,丰富长爪沙鼠遗传数据。**方法** 通过对长爪沙鼠全基因组测序结果分析,选出符合微卫星标准的重复序列 357 个,根据每个位点的侧翼序列设计并合成相应引物。提取长爪沙鼠基因组 DNA 进行 PCR 扩增,经引物序列和 PCR 条件优化以及凝胶电泳实验分析,对成功扩增的位点通过不同近交系和封闭群长爪沙鼠进行验证和优化,筛选出适于遗传质量分析的位点。**结果** 在 357 个微卫星位点引物中,135 个位点引物成功扩增 PCR 产物。分析结果显示,其中 10 个位点可以将长爪沙鼠脑缺血和糖尿病模型近交系区分开。在 12 只封闭群长爪沙鼠中,23 个位点呈现出多态性。**结论** 成功筛选出了 135 个长爪沙鼠微卫星位点,部分位点可用于近交系和封闭群长爪沙鼠遗传质量分析。

【关键词】 长爪沙鼠;微卫星 DNA;遗传质量分析

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 07-0001-07

Screening and optimization of microsatellite loci in Mongolian gerbils using genomic data

FENG Dandan¹, CHEN Mo², DU Xiaoyan¹, CHEN Zhenwen^{1*}

(1. School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China.
2. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050)

【Abstract】 Objective To screen for, and identify more-effective microsatellite loci for genetic quality analysis and enrichment of the genetic data in Mongolian gerbils using genomics. **Methods** Altogether, 357 repetitive sequences in accordance with the microsatellite criteria were selected from whole-genome sequencing data of Mongolian gerbils. The corresponding primers were designed and synthesized based on the flanking sequences of each locus. The genomic DNA of the Mongolian gerbils was extracted and polymerase chain reaction (PCR)-amplified with their corresponding primers. After optimizing the primer sequences, the PCR condition, and the gel electrophoresis experiments, the most efficient loci for successful amplification were verified and optimized in various inbred lines and an outbred group of Mongolian gerbils. The loci were also screened to identify those suitable for genetic quality analysis. **Results** Among the 357 microsatellite sequences, 135 loci primers were successfully amplified with the PCR product. Ten of them could be used to distinguish two inbred strains of Mongolian gerbils, including the cerebral ischemia model and the diabetes model. Also, 12 gerbils from

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31772545)。

[作者简介] 冯丹丹(1992—),女,硕士研究生,专业:遗传学。E-mail: 18810668776@163.com

[通信作者] 陈振文(1959—),男,博士,教授,研究方向:实验动物资源开发及遗传发育研究。E-mail: czwen@ccmu.edu.cn

the outbred group had 23 loci that exhibited polymorphism. **Conclusions** In all, 135 microsatellite loci of gerbils are successfully screened, some of which can be used for genetic quality analysis in both inbred and outbred groups of Mongolian gerbils.

[Keywords] Mongolian gerbils; microsatellite DNA; genetic quality analysis

长爪沙鼠是源自我国的实验动物资源,因其独特的解剖结构以及对微生物易感性等原因,已广泛地应用于脑神经、微生物、营养、代谢及肿瘤等诸多领域研究,被誉为“多功能”实验动物。但有关长爪沙鼠的遗传学研究相对较少,尤其是遗传标记物的开发和应用远滞后于对其生物学特性和实验应用研究。目前国内仅有 Neumann 等^[1]通过用克隆方法找到的 9 个长爪沙鼠微卫星位点并对野生长爪沙鼠和人工饲养群体进行了多态性分析。赵太云,谭元卿等^[2-3]利用种间扩增转移法,在 536 对小鼠微卫星引物中筛选出了长爪沙鼠微卫星位点 130 个。依据这些微卫星位点,浙江省和北京市分别用 28 个微卫星位点建立了《长爪沙鼠遗传质量控制》地方标准^[4-5],中国实验动物学会也据此发布了实验动物行业标准^[6]。这有效解决了长爪沙鼠遗传质量无据可依的状态,也为长爪沙鼠从实验用动物提升为实验动物奠定了基础。但在实际应用中发现标准中遗传质量检测所用的微卫星位点存在一定不足,表现为个别位点多态性不够高、个别位点扩增效果不够好、缺乏近交系遗传检测方法和位点等,因此有必要进一步寻找更多和更有效的长爪沙鼠微卫星位点。我们前期工作中对长爪沙鼠全基因组进行了测序分析,结果发现长爪沙鼠基因组中存在大量重复序列,但是这些微卫星能否成功扩增和是否适于遗传检测尚不确定。本研究中我们根据微卫星序列特征的标准选取了重复序列 357 个^[7],并根据这些序列的侧翼序列设计并合成相应的引物进行 PCR 扩增,最终成功筛选出 135 个能有效扩增的微卫星位点,通过近交系和封闭群长爪沙鼠基因组对位点进行测试,优化出适用于长爪沙鼠近交系区分和封闭群遗传分析的微卫星位点。这些微卫星位点的获取进一步丰富了长爪沙鼠的遗传信息,为建立长爪沙鼠遗传数据库积累了数据^[8],同时为制定长爪沙鼠近交系遗传质量标准 and 进一步完善和修改目前标准提供了依据,为下一步建立长爪沙鼠遗传质量国家标准奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选取普通级长爪沙鼠脑缺血和糖尿病模型近

交系 F20 代动物各 6 只^[9-10],性别、年龄、体重不限,自行培育;普通级封闭群长爪沙鼠 12 只,性别、年龄、体重不限,由首都医科大学实验动物部提供。本实验通过首都医科大学实验动物和动物实验伦理委员会批准(No.: AEEI-2017-032),在实验过程中按照实验动物使用的 3R 原则给予动物人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

试剂:Taq 聚合酶、dNTP、10× PCR buffer 和 50 bp DNA marker(大连宝生物工程有限公司);低熔点琼脂糖(西班牙 Biowest Agarose 公司)。仪器:PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);PAC-30 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);凝胶图像仪(美国 Bio-Rad 公司);漩涡混合器(北京科尔德科贸有限公司)等。

1.3 实验方法

1.3.1 长爪沙鼠基因组 DNA 的提取

将 0.1 g 肝组织切成片并置于 2 mL 组织消化缓冲液中,然后加入 20 mg/mL 蛋白酶 K 10 μ L,充分混匀后在 55℃ 下消化 12 h。然后用苯酚:氯仿(比例=1:1)萃取消化混合物,用乙醇沉淀 DNA 并溶解在 TE 缓冲液中。用 Nanodrop 2000 C 微量分光光度计检测所得 DNA 质量,用 TE 溶液将已知浓度的 DNA 原液稀释为 50 ng/ μ L, -20℃ 保存备用,将 DNA 原液保存于 -80℃。

1.3.2 微卫星位点的选择与引物合成

选择位于长爪沙鼠基因组序列中符合微卫星标准的重复序列 357 个^[4],根据每个微卫星位点的侧翼特异序列应用 Primer 5 软件进行引物的设计,每个位点 2~4 条引物,所有引物均由北京天一辉远有限公司合成。通过 PCR 实验对以上位点的 PCR 反应条件进行优化,确定能成功扩增的引物、最佳退火温度和 Mg^{2+} 离子浓度。

1.3.3 PCR 扩增

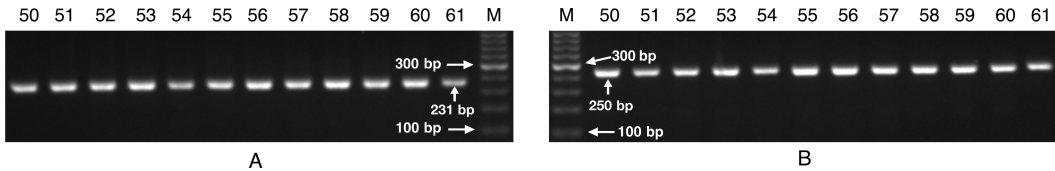
PCR 反应体系的建立:总反应体系 20 μ L,其中:10× buffer 2 μ L,上下游引物(100 μ mol/ μ L)各 0.1 μ L, dNTP Mg^{2+} plus(100 μ mol/L) 1.2 μ L, Taq 酶(5 U/ μ L) 0.2 μ L, 基因组 DNA(50~100 ng/ μ L) 1 μ L, 双蒸水(ddH₂O) 15.4 μ L。

PCR 扩增条件:95℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30

s,退火温度 30 s,72℃延伸 30 s,35 个循环,接 72℃继续延伸 7 min。PCR 产物于 4℃保存。

1.3.4 PCR 产物凝胶电泳

称取琼脂糖 2 g,加入到 100 mL 0.5×TBE 中,用微波炉加热约 5~10 min,自然冷却至 50℃左右,加入 EB 混匀,使 EB 终浓度为 0.5 μg/mL,灌入插好梳子的凝胶槽中,约 30 min 后拔出梳子。将凝胶放入电泳槽中。吸取 5 μL 样品加 1 μL 6×loading buffer 混匀,加入凝胶孔中。在凝胶样品中央或两侧加入 3~5 μL 的 50 bp DNA marker。电泳条件为 120 V,35 min,将电泳后的琼脂糖凝胶放入凝胶成像系统采集图像并分析结果。



注:A;ccmu152 位点;B;ccmu183 位点。M;50 bp marker;图示数字为 PCR 反应时所用退火温度(℃)。
图 1 典型的微卫星位点退火温度梯度优化电泳结果(ccmu152 和 ccmu183 两个位点)
Note. A, Locus ccmu152. B, Locus ccmu183. M, 50 bp marker. Numbers represent annealing temperatures (°C).

Figure 1 Typical electrophoretic map of annealing temperature gradient optimization for loci ccmu152 and ccmu183

表 1 135 个微卫星位点的名称、引物序列、目的片段大小、核苷酸类型和重复次数及 PCR 反应条件
Table 1 Sequencing and polymerase chain reaction (PCR) conditions of 135 microsatellite loci

位点 Loci	引物序列(上游)(5'→3') Primer sequences (upstream)	引物序列(下游)(5'→3') Primer sequences (downstream)	目的片段 大小(bp) Target sequence size	核苷酸类型和 重复次数 Nucleotide type and number of repetitions	退火 温度(℃) Annealing temperature	Mg ²⁺ 浓度 (mmol/L) Mg ²⁺ concentration
ccmu131	TGCTAGATGCTGGTTTGTCTGAT	AGTACAGCCTCCCCATTGGAT	250	(TG)23	60	1.5
ccmu132	GGCGCTTAACCTACTCAGTCC	AAACCACAGATCACGTCAGTCC	300	(AG)28	60	1.5
ccmu133	CCTGAGCTTGTCCGTGAATCC	CTAGTAGGATGCTTTCCTCTTGT	219	(AAT)16	60	1.5
ccmu134	CGGTACAACGTGTACAAAGCG	GAGCCGGGGCTTTACACTAT	263	(AAT)16	60	1.5
ccmu135	CTCTGAGCTTCAAGGAGCC	CAGCCAGTTCTCCACCTCTG	119	(AAT)16	60	1.5
ccmu136	CACAGCTTAAAGTGTAGGGGCA	TAAAAGTTGAGGGCCGAGTG	285	(AG)28	60	1.5
ccmu137	TGCTGCTTGTCTTCCACCTT	CTGACCTCCACACTCATGCC	139	(TG)18	60	1.5
ccmu138	GTCTGGGAGGATGGAGAGGT	TGTCGTTCCCGTTGTTCTGT	250	(TG)18	60	1.5
ccmu139	GGTGCCCTGGAGTGAGCATC	CCGCAGCTGGCGAGTTATC	281	(TG)18	60	1.5
ccmu140	TGCTCTGTATCGCTTTGGTTGAA	CTTAGCATACAAAGCCCAGCCT	223	(TG)18	60	1.5
ccmu141	CAGAAACTCAAGTTCTCAGGTTTA	TGGTCACCACCATCTCTATGC	284	(TG)18	60	1.5
ccmu142	GCTTTTAGTGTACAGGCTGTGG	GCAGTGATAGACCTTGCTCCA	207	(TG)18	60	1.5
ccmu143	GCAGACGCCAGTCGCTAAAA	AAACACAAGTGTTCTTGAGGAGAAA	230	(AC)19	60	1.5
ccmu144	ACTATCCCATGAAATAGAGTCTTGA	GTTTCAGCATTCACCACAG	307	(AC)19	60	1.5
ccmu145	ACTTCAAGATTCTCTGCCAGGT	ACCAGATGCCCCAGTCTGTA	224	(AC)19	60	1.5
ccmu146	TTTTAGCGTGGCCATTCTAC	CCACTGGGAGACAGTGAGATTTC	279	(AGG)13	60	1.5
ccmu147	CCTGGATAAGGGAGGCAATCT	CTGAAAACCTGAGTGAGCGTC	230	(TAA)12	60	1.5
ccmu148	GACTCATGCAACCAACAACACA	GCACACCTTTTGATTCTGTTTC	208	(TAA)13	60	1.5
ccmu149	TAGGGTCTGAGGTAAAGTGCC	GGACAAAAAGACTAGAACTGGGTC	218	(AAT)16	60	1.5
ccmu150	TGTGGACTGAGTGCGTGAT	CTCTTCGAGGATAGGCAGTTT	291	(CT)28	60	1.5
ccmu151	CAATAAACGGCAATGCCTCA	AGAGTGATAATGCAGGTGCCC	172	(TG)18	60	1.5

(续表 1)

位点 Loci	引物序列(上游)(5'→3') Primer sequences (upstream)	引物序列(下游)(5'→3') Primer sequences (downstream)	目的片段 大小(bp) Target sequence size	核苷酸类型和 重复次数 Nucleotide type and number of repetitions	退火 温度(℃) Annealing temperature	Mg ²⁺ 浓度 (mmol/L) Mg ²⁺ concentration
ccmu152	ACTGGGCATTGCAGGAACTT	ACAGTGGTGAGCCAAACACA	231	(TG)18	60	1.5
ccmu153	GATGTCATGTATGTGTACCAGTTT	GGTCATTTGCAGTGCCTTTCTAC	222	(TG)18	60	1.5
ccmu154	AATATCCTGAGTCCTCTCACTCTC	GCCCTGGACCATACACATATT	214	(AC)19	60	1.5
ccmu155	AGCAGGCCAAAGCACTCC	AAGAAGCCCATAGTGCTGGC	269	(AGG)13	60	1.5
ccmu156	ATGGCTAATGCCCTGCTGGT	CCTGTGGTAGTTGGGCAGTAA	190	(TAA)11	60	1.5
ccmu157	TCCAAGGCGTCACCAAGTTC	CCCGTCTTACTTCTGTGGGT	213	(AT)18	60	1.5
ccmu158	CTGTTCAAGCCTCCATGCTC	GCTGAGACCAATTTCTGCGATG	197	(AC)15	60	1.5
ccmu159	TCCAGTTGTGTGGAAGGAAGT	GTAGGCCTTGGTGTAGGACT	208	(CA)20	60	1.5
ccmu160	TCTAATGCTAAGGCCTGCT	ACACCCTAAGGAAGGGGAGC	250	(CAA)10	60	1.5
ccmu161	ACGTACACCTTGTCTAAGGC	CGGAAATGGGGACTTAGGGG	234	(AC)13	60	1.5
ccmu162	TCACCAGTGGAGTTTGTTCATC	TGCCTTGAACACCGATAGAGA	299	(AC)13	60	1.5
ccmu163	TACGATCTCAGTGATGTGCTGC	ACTGTTTGGCACAAATGCTGG	207	(ATT)13	60	1.5
ccmu164	AGTCTTTGGCCTTTGTAGAGCTT	TCAGGGAAGTGAAACATCAGCA	136	(AC)13	60	1.5
ccmu165	ACTCTGGCTTCTGCCCTTGAC	ACTTCCCTTGGCTTAGGTGGC	258	(AC)13	60	1.5
ccmu166	CTGTTGGTAACATAGCAGGGC	CCCCAACTTGACGATGACCA	219	(AC)13	60	1.5
ccmu167	CCAGATATACTTGCTTTGTGAGGT	GTTTTCATCTTTGTCTGAAC TTGG	186	(AC)13	60	1.5
ccmu168	TCCGTGTCATTGCTGTGTGAT	TCATCTCCAACCTGTAGCACC	261	(AC)13	60	1.5
ccmu169	TTGGCTTGTCTTTCAGGGATTGA	AAAGTTGGTCTCCCTTCGGT	259	(AC)13	60	1.5
ccmu170	CAGACCACTGGATTGCAGGT	TCCCGAAATGAACATATCTACCCT	232	(ATT)13	60	1.5
ccmu171	TGCCATGTAAACATGAGAACTAAG	AGTGATCTCCAGGGATTTTTGT	200	(AC)13	60	1.5
ccmu172	TCATCCATCTGAATCTTGGTCACA	GGCACTTCTTGGCACATAGC	205	(AC)13	60	1.5
ccmu173	GCCAGGACTACATAAGGCCAC	CCCCATAGACATGCCACAAG	214	(AC)13	60	1.5
ccmu174	CGCATAGGACAAGAGCAGGAA	ATTTCACGCCACAGTCACC	243	(AC)13	60	1.5
ccmu175	AGGGGGAGGGAGGGAGA	AGCAAGCACTCCTTTAGATTACA	198	(AC)13	60	1.5
ccmu176	GTAGGAGTCACTCAGTGGAAGAG	AACTTCCCAAGTAGGAGACAGG	192	(AC)13	60	1.5
ccmu177	AGCCAGAGCTGGATACTTAAAGAC	AGACGAGGCTGGATAGACGTA	198	(AC)13	60	1.5
ccmu178	ATGTCTGTGTAAGCAGGCAATG	TGCGTATGTAGACCATTTTTCC	159	(AC)13	60	1.5
ccmu179	TTTCATGGGGACACAACCTGG	ACTAAGGATTGGACCTCTGGC	200	(AC)13	60	1.5
ccmu180	TGGCTCCAGCAGTTGATGA	GACAAGAAAAACAACATGCTCCTTA	200	(AC)13	60	1.5
ccmu181	AAATGAGCGGCACGCATGAGA	CAGGCTGCAAATGAGCAGAAG	160	(CA)15	60	1.5
ccmu182	AGCTTGAAAGAACCAACACAGT	TCTTCCCAGTTTTTCTACCAACT	217	(CA)16	60	1.5
ccmu183	GGGTAAAGCATCACCTGCCA	AGCAGATGGCATCAGGTGTG	250	(CA)17	60	1.5
ccmu184	TGGGCAAGTCAGTTGAAGCA	CATGGTGCAGATTCCCTCTGT	219	(CA)17	60	1.5
ccmu185	TGGGTGAATCCCAATTTTCT	TCTTCATAGAAATTAACAGCTGCAT	243	(CA)17	60	1.5
ccmu186	TCCCTTGGACTTTATGGGCAG	CGCCCTCTCTAGCCCTAACTT	241	(CA)19	60	1.5
ccmu187	AAAGCCCTGTTTGGGCTACCT	ATCCGGTGCTCCCTCACAGTA	232	(CAC)10	60	1.5
ccmu188	CATCCCCACCAATAGGAGCC	GGCCGTGTTCACTACAATCCCA	184	(CAT)11	60	1.5
ccmu189	GCAAGTAAAGGCTTGCAGT	TGCCCTTAAGCATGGAAGGA	247	(CAT)12	60	1.5
ccmu190	ACGAGTTCTCCCTAGCACA	ACTGTCTCCTTGACAAAGCC	247	(CAT)13	60	1.5
ccmu191	ACTCCCATGCTCCTTTTGCC	AAAGCCCTTAAGAAGCTGGGTT	172	(CTT)11	60	1.5
ccmu192	CTGTTTCAGAGGAAAGGCAGA	GCATCCAGATGGTGCTCTTT	217	(AC)15	60	1.5
ccmu193	CCCTCTCTAGACTGTGCAA	TGCTCCAGCCCATCAATTAGG	186	(AC)15	60	1.5
ccmu194	GCATTGGGGAAGGGCAATAG	CACACCCAAGTGTTCAGGCT	238	(AC)15	60	1.5
ccmu195	CACACCACACAGCCTAACCA	TCAGCCTGTGGGAACATTGAA	240	(AC)15	60	1.5
ccmu196	TCTACTCCTTCTTTCCCTCC	TTGCGCTTGTCTCTGTGAGAAT	155	(AC)15	60	1.5
ccmu197	CGGCCTCAGTCACAACACAT	CCTTGTCTTTGTGGTTGATCCAT	174	(AC)15	60	1.5
ccmu198	GCTTGTAACCTTGGAAAGCTGG	TGTTTCGTATGCTCACTTGCC	150	(AC)15	60	1.5
ccmu199	ACTCCTTTTCACTCTCTTTGGAT	GTAGGGGGAGCTCATTTTGGA	196	(AC)15	60	1.5
ccmu200	AAACCAAACCAAAACACACTCCT	TCTCCACCCAGGTCCTACAA	169	(AC)15	60	1.5
ccmu201	CAGTTACATCTGTGGGCAAA	ACCGCTAGAGGGCAGAGAAA	240	(AG)13	60	1.5
ccmu202	TGATTTGCATGCATACTTCCCT	CAACACTCCTGTCTGTCTGT	259	(AG)13	60	1.5

(续表 1)

位点 Loci	引物序列(上游)(5'→3') Primer sequences (upstream)	引物序列(下游)(5'→3') Primer sequences (downstream)	目的片段 大小(bp) Target sequence size	核苷酸类型和 重复次数 Nucleotide type and number of repetitions	退火 温度(℃) Annealing temperature	Mg ²⁺ 浓度 (mmol/L) Mg ²⁺ concentration
ccmu203	AGTGGCTGGAACAACCCAA	CCTCTCACTGAACCAACGTCA	318	(AG)13	60	1.5
ccmu204	ACTCCTACATTGAAGCCGCTCTC	GGTCACTATGGCCCCAGAAG	222	(AG)13	60	1.5
ccmu205	GGATTGTGTCTGCAGGTCAGT	ATGATGCACCAGCCATAGGTT	241	(AG)13	60	1.5
ccmu206	TGAGTGACTTGTAGTGACAGTACC	TGTGACTGGATGAGGCTTGC	224	(AG)13	60	1.5
ccmu207	TCAGGAAAACCAAAACAAATTGGAA	CTTTCCTTTCACCACCGGAT	302	(AG)13	60	1.5
ccmu208	GAGCTGTGTGAGGACCAGTT	TGTCTGACTGCTTTGACAACGTAT	172	(AC)5	60	1.5
ccmu209	CAGCCCCAAGCCAAAGGTTTT	TGCCAACTGGGTGGGATAAGA	200	(AC)5	60	1.5
ccmu210	GACAGGCTCTAGCAGCAGAAA	TACAGTCACAGGAGAGTGCT	186	(AG)13	60	1.5
ccmu211	CTTCTGATCATTCCCTGCGTG	TCTCTGGTGCTGCCTCTAA	152	(AC)13	60	1.5
ccmu212	CTGTTACCATTCACTTAACACCA	AGGCTGATGAAAGTTGCCCT	156	(AC)13	60	1.5
ccmu213	TACAGAACACAGATATTGGGCAC	ATACACCCACCTCAAATGCG	199	(AC)5	60	1.5
ccmu214	TCCCTATGCCTCTTCCCTAGTC	TAGTAAGAGGGGCAGGGGATG	170	(AC)5	60	1.5
ccmu215	GAGGGACCATAGGAAGCAGAAG	ACTCCACATGTCACCCCA	52	(AC)5	60	1.5
ccmu216	TTACAGGTACAGTCATGGGC	CAACAAGTGGTCTTTGTCAGAAA	63	(AC)5	60	1.5
ccmu217	TCTTGCTCTCTATCCCTCTCCA	TCCAGACTCAGAAAGGCAACC	126	(AC)5	60	1.5
ccmu218	AGTAGCCATTTCATGAGGACA	TTCCCTAGTGATCTATTGGGTTGG	137	(AC)5	60	1.5
ccmu219	TGACTCTTGTGAGCTATCCTCTG	TGCTACCTTCTGTCTCTCTCA	180	(AC)5	60	1.5
ccmu220	CACGCAGGTGCTTATCTCCA	CAGGGTGAACAGAACGAGGT	136	(AC)5	60	1.5
ccmu221	ACCCTCATTTTCATACCTGCC	ATTGGCCATTGGGCATAGCA	271	(CA)20	60	1.5
ccmu222	AAAACCTCCTCGGAAGGTGG	ACGAATTTGGGGCGCATAAG	289	(CA)20	60	1.5
ccmu223	ATGCCTGTGTGTATCAGGC	TCCAGGTTTTCACAGGTTTAC	208	(CA)20	60	1.5
ccmu224	TGCTGACCCCTACTCACAGT	GCCTTGGTTCTTAGAAAGCCC	246	(CA)20	60	1.5
ccmu225	TATGGTTCTTGACAGAGGGCG	TGCATGGAATTGATCCGCT	283	(CA)20	60	1.5
ccmu226	CCCGGGGTCTGTGTACAATC	AGCTGTCTCTTGACTGTGTT	240	(CA)20	60	1.5
ccmu227	ATGTTAACCACCACGGGTCC	CGTGTCAGTAGGAGGTTGT	249	(CA)20	60	1.5
ccmu228	TAAACAAGAGCTGGGTGCCCTC	CCCTCATGGGCAGAACGAA	300	(CA)20	60	1.5
ccmu229	TTGGCATGCACATGAACTGA	TTTTATCCTCCGTGCTCCCG	232	(CAC)12	60	1.5
ccmu230	ACATGTTTCCAATTGGGCTGC	ACTGCTTTCAGAATGGATTTTGT	239	(CA)20	60	1.5
ccmu231	GTCTGGGCTTGTCTAGGTGC	TCCCAGGACTGTGGCCTATT	242	(TC)22	60	1.5
ccmu232	TGACAACAGCCAGCACAGAG	CCAGATTGGTTCCAACAGCAG	259	(TC)22	60	1.5
ccmu233	AGTCACGCGGAGTAGAACT	GCTCTCCTGTGGAGACCTC	191	(TC)22	60	1.5
ccmu234	AATGGGGGCCATCTTCTCCA	CGCTGTCTTGTGTGTATCC	177	(TC)22	60	1.5
ccmu235	CCTGGTGTACTCCATTGTCTCT	GTGGGTGTCCAGTTGTCTT	243	(TC)22	60	1.5
ccmu236	GAAGAGGCTACAGATGGGG	AGCCTTGGTGTTCAGTTTCA	231	(TC)22	60	1.5
ccmu237	CTCCTGTGCAGGCACACTTA	GATCCCAGCACCACAGAAG	307	(TC)22	60	1.5
ccmu238	TGTGTACGCCATAAGTCCCC	AACTGGGGCACTGTCAACAT	279	(TC)22	60	1.5
ccmu239	ACACCATGGATAAAGACCCCTG	TAAACTTCTTTCAGCTTCCACT	114	(TC)22	60	1.5
ccmu240	TGTGGGATACTGGTGCACATG	CTGCTTTCAGTTGTGTGTGC	234	(TC)22	60	1.5
ccmu241	CTGTTAGCACGGGACTGACT	AGACATTATGGCTTGTCCCCA	226	(TC)22	60	1.5
ccmu242	GATGCCTGGTCCCCAATCTT	CTGTTGAGAAATGGCCACC	287	(TC)22	60	1.5
ccmu243	GCCTCGTTGGAGAAAGTGTG	AAGACACCATGACCACAGCAA	164	(TC)22	60	1.5
ccmu244	GGGCCAGCTGATGCTTAGAT	TTGGTGCTAACATTCTGGCA	144	(TC)22	60	1.5
ccmu245	CCACTGCCACTGTTTACCCA	GGTCTGTCTGTAGATCTGCCAAT	277	(TC)22	60	1.5
ccmu246	GGACTTGTGGCCTTGTAGGAG	GGTCATCGTGAGAGCATGG	272	(TC)22	60	1.5
ccmu247	AGGTATGGCTCTGTAGAGGA	GTGTCAGAGGGTTAGAGTCCAT	232	(TC)22	60	1.5
ccmu248	TACCTGGAGGGGCAGCTAAA	GATCATGCCATAAGGGGGAGG	343	(TC)22	60	1.5
ccmu249	GAGTTGGGAAACTCAGCGT	TCCCAAGTTTCTTTTCATCACTG	245	(TC)22	60	1.5
ccmu250	TCCCTAGACCTGCAAAACCAC	ACCCCCATCCCAAGATTCTTA	214	(TC)22	60	1.5
ccmu251	TTGTGTCTAATTCCCTCCTCCC	GTGCTTCTTACCGGGTACT	152	(CA)22	60	1.5
ccmu252	CCTAGACAGAAACAAGGGCCA	CCCCACAAAGCACTGATTAGC	224	(CA)22	60	1.5
ccmu253	ACTGGGGACCATGGTAAGTCT	ATTACCTTTGTGGAGTACTTGGT	277	(ATT)3	60	1.5

(续表 1)

位点 Loci	引物序列(上游)(5'→3') Primer sequences (upstream)	引物序列(下游)(5'→3') Primer sequences (downstream)	目的片段 大小(bp) Target sequence size	核苷酸类型和 重复次数 Nucleotide type and number of repetitions	退火 温度(℃) Annealing temperature	Mg ²⁺ 浓度 (mmol/L) Mg ²⁺ concentration
ccmu254	TCTGAGTGAACGTAAGTACACCT	AGTTTCTGCTCTCTGACATGGA	210	(ATT)3	60	1.5
ccmu255	ACCAACTATTCCCACTGAGACA	GCTTACCACAGACATTCCCCA	240	(ATT)3	60	1.5
ccmu261	TTTGGGCAGTTCACACGAT	GTCCCGCCTGTTTGAAGGTA	316	(GA)11	60	1.5
ccmu262	AGTGTGTCCGTGTCTTCCTTC	AGGAGAAATCCAATGCTGTGC	146	(GA)9	60	1.5
ccmu263	AGGCTACACCATACTGACC	TCTGAGTCTGGAGTCTGCTGT	249	(GA)18	60	1.5
ccmu264	AGGCTAGCTTCTGGATGCAC	GTAGGTCTCCAGATCAAGGGC	249	(GCT)10	60	1.5
ccmu265	TGGGTAGGATGGCAGGGATA	TATGACTCCTGGGCAGTTGTTT	161	(GCT)10	60	1.5
ccmu266	ACCACCACCTCCAAAGAACTG	ACAATGCCACCTCCCTGAAT	151	(AC)15	60	1.5
ccmu267	ACTTGAGATTCTTCAGCAGCAA	ATCTCAGTCAGTGACACTCAAA	200	(AC)15	60	1.5
ccmu268	TCCCAACTGCCGAGTCATAG	ACCCTGTGTGTTTCTCCAAAGT	225	(AC)15	60	1.5
ccmu269	GCTCCAACACAGGGCGATA	AGGGTCCCTGGTATCTGAGT	247	(AC)15	60	1.5
ccmu270	CCCATACATTCTCATTTGCAC	TGCCACTGAGGCTTCATTTCAT	221	(AC)15	60	1.5

2.2 适于长爪沙鼠近交系区分的微卫星位点优化

选取本课题组自行培育的长爪沙鼠脑缺血和糖尿病模型近交系 F20 代动物各 6 只,通过 135 个微卫星位点扩增结果分析,结果发现各位点在同一品系内均呈单态性,而有 10 个微卫星位点在 2 种模型品系间存在差异,包括 ccmu138、ccmu146、ccmu156、ccmu161、ccmu175、ccmu189、ccmu218、ccmu235、ccmu250 和 ccmu261。这些位点可将长爪沙鼠 2 种模型近交系品系区分开来,图 2 为 2 个位点对不同近交系的扩增结果。

2.3 微卫星位点多态性优化

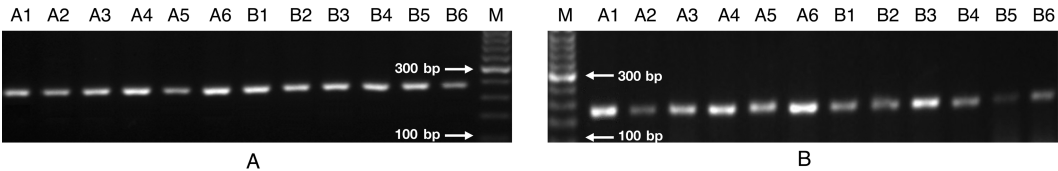
应用 135 个筛选出的长爪沙鼠微卫星位点引物对 12 只封闭群长爪沙鼠样本进行扩增,结果有 23 个微卫星位点出现多态性,包括 ccmu148、ccmu151、ccmu163、ccmu164、ccmu165、ccmu176、ccmu183、ccmu187、ccmu190、ccmu192、ccmu198、ccmu201、ccmu214、ccmu231、ccmu232、ccmu233、ccmu241、ccmu244、ccmu248、ccmu249、ccmu264、ccmu267 和 ccmu269 微卫星位点,图 3 显示 ccmu148 和

ccmu176 位点对 12 只封闭群动物的扩增结果,两个位点在封闭群多个样品中显示多态性。

3 讨论

微卫星 DNA 也称为简单重复的 DNA 片段,其重复单位一般为 1 ~ 6 bp,重复数为 10 ~ 20 次左右,在哺乳动物基因组中随机分布。由于其具有在基因组中分布广泛、多态性高、易于检测、共显性遗传等优点,成为第二代遗传标记物。微卫星在评价遗传多样性、构建遗传连锁图谱、绘制系统发生树、连锁分析、疾病诊断和亲子鉴定等方面显示出巨大优势,并在动植物的遗传研究中得到了广泛应用^[11-12],并成为一种重要的、成熟的遗传学检测工具广泛应用于各类实验动物遗传质量检测研究中^[13-14]。

微卫星 DNA 标记在大、小鼠遗传多态性的研究已经取得较好成果,但长爪沙鼠开发出的微卫星位点数量较少。除 Neumann 等^[1]通过用克隆方法找到的 9 个长爪沙鼠微卫星位点外,本实验室利用种

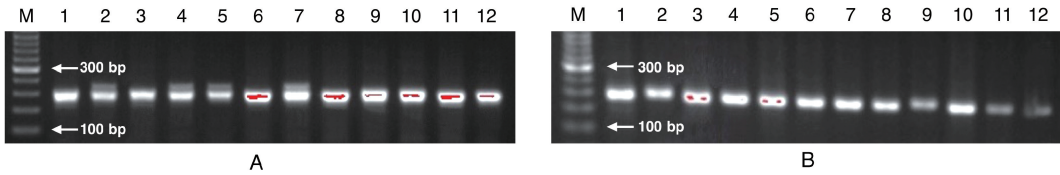


注:A;引物 ccmu138 的 PCR 产物;B;引物 ccmu218 的 PCR 产物。M;50 bp marker;A1 ~ A6;长爪沙鼠脑缺血模型;B1 ~ B6;长爪沙鼠糖尿病模型。

图 2 两个微卫星位点 ccmu138 和 ccmu218 的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Note. A, PCR product of ccmu138 primers. B, PCR product of ccmu218 primers. M, 50 bp marker. A1-A6, Cerebral ischemia Mongolian gerbils. B1-B6, Diabetic Mongolian gerbils.

Figure 2 Agarose gel electrophoresis of PCR products for loci ccmu138 and ccmu218



注:A:ccmu148 引物的 PCR 产物;B:ccmu176 引物的 PCR 产物。M:50 bp marker;1 ~ 12:封闭群长爪沙鼠。

图 3 两个微卫星位点 ccmu148 和 ccmu176 的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Note. A, PCR product of ccmu148 primers. B, PCR product of ccmu176 primers. M, 50 bp marker. 1-12, outbred group of Mongolian gerbils.

Figure 3 Agarose gel electrophoresis of PCR products for the loci ccmu148 and ccmu176

间扩增转移法,在 536 对小鼠微卫星引物中筛选出了长爪沙鼠微卫星位点 130 个,并已登录到 GenBank 中^[2-3]。我们利用国内外筛选的 139 个微卫星位点通过封闭群长爪沙鼠进行多态性分析,优化出了 28 个具有多态性的位点,以此为依据建立了封闭群长爪沙鼠遗传质量检测方法,并被浙江省和北京市长爪沙鼠遗传质量控制地方标准和中国实验动物行业标准所采纳^[4-6]。在建立长爪沙鼠遗传检测方法时,由于可供选择的位点数量少,为了能真实地反映群体遗传概貌,不得采用更多的位点组合,使一些仅有 2 个等位基因的位点也纳入了其中。这大大增加了工作量,也使得检测周期延长和耗费过多。同时,以往尚未见有对近交系长爪沙鼠遗传检测方法的研究报道,因此有必要筛选更多的长爪沙鼠微卫星位点为下一步补充和完善目前的长爪沙鼠遗传检测方法,并建立近交系长爪沙鼠遗传检测方法提供候选位点。

本研究中我们通过分析长爪沙鼠全基因组的测序结果,选择符合微卫星标准的位点 357 个,并根据微卫星位点的侧翼序列合成相应的引物,能够针对性地筛选适用于长爪沙鼠的微卫星位点,优于实验室前期利用种间扩增转移的方法。我们首先用长爪沙鼠混合基因组对位点进行 PCR 扩增,在 357 个微卫星位点中成功扩增出 135 个条带清晰且无杂带的微卫星位点,包括 112 个二核苷酸位点和 23 个三核苷酸位点。其余 222 个微卫星位点没有扩增出理想条带,扩增失败的原因可能为以下方面:所设计的引物特异性不佳,形成引物二聚体从而产生非特异性扩增条带;模板 DNA 的质量也能影响个别位点的扩增,尤其是对相对较长的微卫星片段的影响更加明显。本实验室前期研究发现长爪沙鼠近交系是脑缺血研究良好的模型动物,也是理想的 II 型糖尿病模型,两种模型的建立不但丰富了实验动物资源,也为研究人类疾病的机制与药物开发提供良

好的模型材料。所以本研究利用筛选出的 135 个微卫星位点分析已知的长爪沙鼠脑缺血和糖尿病模型近交系动物进行验证,结果多数位点为单态性,尤其在同一品系内均为一致的电泳图带。而 2 个品系间有 10 个微卫星位点存在差异,能区分长爪沙鼠脑缺血和糖尿病模型近交系群体,对于模型动物的推广应用具有重要的意义。由于这 2 个近交系均来源于 20 代前的共同父母,是在 F7 代时分离培育成 2 个品系,因此遗传背景很大程度上是一致的,以往的遗传检测方法很难将其区分,说明这 10 个位点可用于近交系的遗传监测。遗传多样性是生物多样性的核心和重要组成部分,对遗传多样性的研究有利于了解物种或种群的进化历史和分类地位,为资源的保存与利用提供理论依据。封闭群动物群体中存在遗传多样性,选择用于群体遗传分析的微卫星位点更加注重其多态性,即等位基因数量越多,其所蕴含的信息量越大,遗传分析的结果更加真实可靠。为了建立有效的长爪沙鼠群体遗传检测方法,开展长爪沙鼠群体遗传多样性分析,本研究随机选取了长爪沙鼠封闭群动物 12 只,应用筛选出的 135 个微卫星位点进行扩增,结果有 23 个多态性位点,一共发现了 63 个等位基因,其中等位基因数最多的达 6 个。这为补充和完善封闭群长爪沙鼠遗传质量检测方法提供了新的可供选择的微卫星位点。

参考文献:

- [1] Neumann K, Maak S, Stuenkel IW, et al. Low microsatellite variation in laboratory gerbils [J]. J Hered, 2001, 92(1): 71-74.
- [2] 赵太云,路静,王钊,等. 大、小鼠微卫星引物对长爪沙鼠的扩增 [J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(2): 114-117.
- [3] 谭元卿,李薇,杜小燕,等. 种间转移扩增法筛选长爪沙鼠微卫星位点 [J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(2): 1-5.
- [4] DB33/T 2110. 3-2018. 实验动物 长爪沙鼠 第 3 部分:遗传质量控制 [S]. 2018.

(下转第 16 页)