

张晴,张曦文,何松,等. 实验用大林姬鼠种群微卫星标记开发及遗传特性分析 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(4): 468-476.

ZHANG Q, ZHANG X W, HE S, et al. Development of microsatellite markers and analysis of genetic characteristics of laboratory Apodemus peninsulae population [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(4): 468-476.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.04.007

# 实验用大林姬鼠种群微卫星标记开发 及遗传特性分析

张晴,张曦文,何松,袁宝,陈健,任文陟,权福实,胡进平\*,丁瑜\*

(吉林大学动物科学学院,长春 130062)

**【摘要】** 目的 开发大林姬鼠多态性微卫星标记,丰富大林姬鼠遗传数据,为大林姬鼠遗传质量控制及基因定位等工作奠定基础。方法 基于大林姬鼠基因组序列筛选微卫星位点,挖掘微卫星引物,通过多重 PCR 技术分析群体的遗传多样性。结果 成功开发出 30 个微卫星标记,利用 60 份大林姬鼠基因组 DNA 对 30 个微卫星位点进行评价,共检测出 152 个等位基因,平均每个位点有 5.067 个等位基因;平均观察杂合度为 0.592;平均香农指数为 1.265;平均多态信息含量为 0.598。结论 基于本研究所开发的微卫星位点具有较好的多态性,能有效分析大林姬鼠群体的遗传多样性,适合为建立大林姬鼠遗传质量标准 and 遗传质量检测方法奠定基础。

**【关键词】** 大林姬鼠;微卫星位点;遗传多样性;封闭群

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 04-0468-09

## Development of microsatellite markers and analysis of genetic characteristics of laboratory Apodemus peninsulae population

ZHANG Qing, ZHANG Xiwen, HE Song, YUAN Bao, CHEN Jian, REN Wenzhi,  
QUAN Fushi, HU Jinping\*, DING Yu\*

(College of Animal Science, Jilin University, Changchun 130062, China)

Corresponding author: DING Yu. E-mail: dingyu03@163.com; HU Jinping. E-mail: hujp@jlu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** Polymorphic microsatellite markers developed for Apodemus peninsulae can enrich its genetic data and lay a foundation for genetic quality control and gene mapping. **Methods** Microsatellite loci were screened based on the genome sequence of Apodemus peninsulae, and microsatellite primers were identified. The genetic diversity of the population was analyzed by multiplex PCR. **Results** Thirty microsatellite markers were successfully developed and evaluated using 60 samples of Apodemus peninsulae. A total of 152 alleles were detected, with an average of 5.067 alleles per locus. The average observed heterozygosity was 0.592. The average Shannon index was 1.265. The average polymorphism information content was 0.598. **Conclusions** Based on the microsatellite loci developed in this study, the genetic diversity of Apodemus peninsulae can be effectively analyzed, laying a foundation for establishing genetic quality standards and detection method.

**【基金项目】** 国家重点研发计划(2022YFF0710503),吉林省科技发展计划项目(20230505037ZP)。

Funded by the National Key Research and Development Program of China (2022YFF0710503), Jilin Provincial Science and Technology Development Plan Project(20230505037ZP).

**【作者简介】** 张晴,女,在读硕士研究生,研究方向:动物学。Email:zqdyx25876@163.com

**【通信作者】** 丁瑜,女,副教授,博士,研究方向:模式动物。Email:dingyu03@163.com;

胡进平,男,高级实验师,硕士,研究方向:实验动物质量监测。Email:hujp@jlu.edu.cn。

\* 共同通信作者

**[Keywords]** Apodemus peninsulae; microsatellite loci; genetic diversity; closed colony

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

微卫星是一种广泛存在于基因组中且重复单位由 1 ~ 6 个核苷酸组成的重复序列,也被称为简单重复序列(simple sequence repeats, SSR)或短串联重复序列(short tandem repeats, STR),具有高度的多态性、保守性、共显性和重复性等特点<sup>[1]</sup>。微卫星在实验动物品系鉴定中具有非常重要的价值,广泛应用于各类实验动物遗传质量检测研究中,被视为一种重要且成熟的遗传学检测工具<sup>[2-3]</sup>。

大林姬鼠(学名: *Apodemus peninsulae*, 拉丁名: *Apodemus speciosus*)属啮齿目、鼠科、姬鼠属,多以阔叶树的种子和果实为食,为林区常见鼠类之一<sup>[4-5]</sup>。在将姬鼠属物种进行分类时,大林姬鼠被划分为 *Apodemus* 组,其中黑线姬鼠和大林姬鼠的分类地位最近<sup>[6]</sup>。现有的报道中较多关注的是大林姬鼠种群的生物学特性及生理生化指标的研究。徐春雨等<sup>[7]</sup>对大林姬鼠和黑线姬鼠的体长、耳长、足长、尾长、胴体重、体重、内脏重等进行了测量和比对分析。周思宇等<sup>[8]</sup>通过微生物测序技术对雌、雄性大林姬鼠的肠道菌群进行初步测定。贾修歧<sup>[9]</sup>对大林姬鼠血清蛋白、组织蛋白及同工酶进行了研究。辛笛<sup>[10]</sup>检测了低氧环境下大林姬鼠生活节律以及血液生理生化指标的变化。然而有关大林姬鼠遗传背景知识知之甚少, KOH 等<sup>[11]</sup>比较了大林姬鼠两个亚种线粒体 DNA 细胞色素 b 基因控制区的序列多样性,由于线粒体 DNA 的母性遗传以及两个相邻亚种之间存在种内杂交,使用细胞色素 b 的数据并不能对大林姬鼠的两个亚种完全区分,还需要结合形态学和核 DNA 特征的进一步分析。目前国内外尚未建立大林姬鼠的标准化种群,大林姬鼠的实验动物化研究已被列为国家相关研究项目。

目前本团队正在深入研究其生物学特性,在饲养过程中发现大林姬鼠的部分生理生化指标高于大鼠和小鼠。此外,大林姬鼠的行为学特征比较明显,基于大林姬鼠的生理生化指标和行为学特征,可以更好地开发出代谢性疾病和神经系统疾病的动物模型,并深入探索相关疾病的机制和治疗方法。

本研究基于大林姬鼠的基因组序列,筛选出大林姬鼠基因组微卫星位点,并在此研究的基础上,分析来自吉林大学大林姬鼠群体的遗传结构,为今后该种群的遗传质量控制和监测提供依据,推动其作为实验动物的应用研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

选取清洁级封闭群大林姬鼠雌、雄各 30 只,10 周龄以上,体重不限,剪取尾尖组织 1 cm 进行冻存,用于后续 DNA 提取,群体引自大连医科大学【SCXK(辽)2018-0003】。动物群体饲养于吉林大学实验动物中心【SYXK(吉)2021-0006】,共 130 只,其中雄性 55 只、雌性 75 只。自引入以来,严格控制体内外微生物、寄生虫和病毒,对其进行饲养净化。依据封闭群的培育方式,已经进行了 5 代的选育,培育出共计 300 只大林姬鼠,其中包括 80 只繁殖核心群体。本实验经过吉林大学实验动物福利伦理委员会批准(SY202310009),在实验过程中按照实验动物使用的 3R 原则给予动物人道关怀。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

低电渗琼脂糖(绿新(厦门)海洋生物科技有限公司);DNA Marker(D2000 Plus)(GeneStar);组织裂解液(大连美仑生物技术有限公司);DNA 提取试剂盒(Tiangen 公司)。PCR 仪(Eppendorf);电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司);凝胶成像仪;自动研磨仪(净信 tissue lyser-192L)等。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 大林姬鼠基因组 DNA 的提取

使用 TIANGEN 试剂盒(DP304)对大林姬鼠 0.2 ~ 0.5 cm 的尾尖组织样本进行 DNA 提取,采用 Nanodrop 和琼脂糖凝胶电泳检测提取的 DNA 浓度和质量,DNA 提取后-20 °C 保存备用。

#### 1.2.2 大林姬鼠 SSR 标记开发及引物的筛选

基因组序列来源于美国国家生物技术信息中心(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),使用 MISA 软件基于大林姬鼠全基因组序列挖掘微卫星位点,筛选标准为重复基元长度 2 ~ 6 bp,去除 2、5、6 碱基重复单元,根据位点信息使用 Primer 5.0 软件设计引物,引物设计原则如下:引物长度 18 ~ 27 bp, Tm 设置为 50 ~ 65 °C, GC 含量为 50% ~ 60%,产物长度 100 ~ 500 bp。

#### 1.2.3 PCR 扩增及 SSR 检测

从 177 779 条待选引物中随机选取 288 对 SSR 引物,使用 60 份大林姬鼠基因组 DNA 对 288 对引

物进行筛选,筛选程序为:①第一轮 15 个样本筛选 192 对引物:从群体中共选取 15 个筛选样本,扩增 192 对引物 PCR 反应结束后,扩增产物经荧光毛细管电泳检测。使用 GeneMarker V2.2.0 软件对结果进行分析,得到 20 对引物。②15 个样本复筛 20 对引物:15 个样本对上一步筛出的 20 对引物进行复筛,PCR 反应结束后,扩增产物经荧光毛细管电泳检测。使用 GeneMarker V2.2.0 软件对结果进行分析,得到 20 对多态性引物。③第二批 8 个样本筛选 96 对引物:8 个筛选样本扩增第二批 96 对引物,PCR 反应结束后,扩增产物经荧光毛细管电泳检测。使用 GeneMarker V2.2.0 软件对结果进行分析,得到 10 对引物。④15 个样本复筛 10 对引物:15 个样本对上一步筛出的 10 对引物进行复筛,PCR 反应结束后,扩增产物经荧光毛细管电泳检测。使用 GeneMarker V2.2.0 软件对结果进行分析,得到 10 对多态性引物。⑤60 个样本检测 30 对引物:30 对多态性引物检测 60 个群体样本,PCR 反应结束后,扩增产物经荧光毛细管电泳检测。使用 GeneMarker V 2.2.0 软件对结果进行分析,获得每个样品的等位基因数、峰图和基因型。

PCR 扩增程序如下:10  $\mu$ L PCR 反应体系:2  $\times$  Taq PCR Master Mix 5  $\mu$ L, DNA 1  $\mu$ L, 上下游引物各 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 3  $\mu$ L。PCR 扩增条件:95  $^{\circ}$ C 5 min, 95  $^{\circ}$ C 30 s, 退火温度 52 ~ 62  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 10 个循环,每个循环下降 1  $^{\circ}$ C; 72  $^{\circ}$ C, 20 min。

## 1.2.4 大林姬鼠遗传多样性分析

PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测特异性后进行微卫星基因型分型,微卫星基因型分型均由武汉天一辉远生物技术有限公司进行毛细管荧光电泳检测(ABI 3730XL 自动测序仪),根据微卫星基因型分型结果,在 GenAlEx version 6.501 等软件中,分析观察等位基因数(number of alleles, Na)、有效等位基因数(effective number of allele, Ne)、香农指数(Shannon's information index, I)、多态信息含量(polymorphism information content, PIC)、观察杂合度(observed heterozygosity, Ho)、期望杂合度(expected heterozygosity, He)。使用 GenAlEx 6.5 (Excel 宏)进行主坐标分析(principal co-ordinates analysis, PcoA)、分子方差分析(analysis of molecular variance, AMOVA)以检测遗传变异来源。

## 2 结果

### 2.1 微卫星位点扩增结果

根据大林姬鼠基因组序列分析设计微卫星引物,从 177 779 条待选引物中随机选取 288 对引物用于实验。经 5 轮筛选后,选择条带清晰、多态性好的引物进行后续实验,最终得到 30 对引物(表 1)。对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示 30 对引物均有良好的特异性及扩增效率(图 1)。进一步的微卫星基因型分型结果显示 30 个位点均符合微卫星标准,在大林姬鼠中具有良好的多态性(图 2)。

表 1 引物信息

Table 1 Information of primer

位点 Locus	重复单元 Repetitive unit	上游引物(5'→3') Forward primer(5'→3')	下游引物(3'→5') Reverse primer(3'→5')	产物长度/bp Product length/bp
AP001	(TAT)17	TGGTGGAGGCAGTACCAAAG	AAACTGGAGGCAGGAATGGG	247
AP018	(TTCC)14	ACAAGCCTGAAGGTACCCAC	GGCAAGTGTCTCTCACCTC	192
AP049	(TCAA)6	AGGCAGGAAGGAGGATGGAT	TCCCAAGGAGAAGGCTTTGC	213
AP057	(AAC)12	GTGAGTTCCAGGCTAGCTGG	GCACTTTCCTCCTCAGCT	246
AP059	(AAC)5	AGCGACAGCCTACAGAATGG	TGCTGGCCCATTCATTGACT	134
AP061	(AAT)14	CGGAAACTGAGCACTGCAAC	GCGTGAATTATGCTCCGCTC	238
AP068	(AAAC)5	TTCCAGGCCAGTCGGGTATA	CCAGAGGAGATCACCTGGGT	200
AP072	(GAT)23	GAGGATGCTCGGTACAGAG	CTTGGGCCCTAGAGTGGTTG	222
AP074	(TAGA)14	TGTCTCAGCCTTGCATGTGT	GGTGGCCCATAGGTTTGGAA	242
AP080	(AGGA)11	CACCGACCGGAAGTACACAA	TTCTATTCTCGCCTGCCTG	194
AP099	(AGAC)5	CAAGCAGGACAGTTFGTGGC	CAAGTAAGTGTGGCAGGGA	265
AP102	(GCAG)13	GCTCACAGTTCCCAAGGGTT	GCCATTCCGGGTAGCTCTTT	178
AP126	(TTCC)6	GAGCGGCTATGAGGAGCAAT	CAGATGTCAACCTGGGCTGT	192
AP129	(CATA)5	CCCAGCCACATGACTTCCAT	TGGGTGGATGGGTAGATGGA	206
AP139	(CAAT)10	ACCCTGGCACAAGGAAACAA	GCAAGGGAGCCGTCATATCA	213
AP147	(TATG)11	CCCAGTTTGTGCAGTGTFTGG	AATGTAGCACTTGTACAGCT	221
AP148	(TGT)11	ACTGAAAGGCTTCCCAGCTC	ACTGGCAAGGTTTCTAGGCA	200
AP156	(CCA)6	AGCCAAAGTGTCTTGGAGGA	GAAGCCTTGTGTTAGGCAT	212

续表 1

位点 Locus	重复单元 Repetitive unit	上游引物(5'→3') Forward primer(5'→3')	下游引物(3'→5') Reverse primer(3'→5')	产物长度/bp Product length/bp
AP175	(TCCCT)8	GCACACTCCTGGAGGTCAAA	ATCCACACCCATGCTCCTTG	257
AP181	(TTCT)8	GTAGGTCAGCCAGTCTCACA	GCTTCTGGCAGGTCTGAATA	273
AP196	(TTG)9	AGGGAGGAGACTGAATGGCT	AGCTCACTGGTTCCAATGCA	237
AP198	(CAAC)8	CTCGTCTGCAGACTTCCTG	GGATTGAACCCAGGGCCTAC	258
AP206	(CTC)7	ATTTCAAGGCCATGGACCAG	GGAGGAGAAGGAGGAGGAGG	120
AP217	(ATAG)16	CTCAGCTCAAGGCACAGGAA	AACTCAGTTCCACAGGGTG	272
AP223	(ATGT)6	GCAAGTCTTGACCTGAGCTT	GGCACTCCAACACTCCTGTT	204
AP232	(TGTA)9	TTCCCTGTGCACCATCCTTC	CCTGAGGTTGTCCACTGACC	171
AP252	(TCTG)7	GGGATCCTCTGCCTTCTTG	CCCTGCAACACTGACTGAGA	193
AP254	(TCTG)17	TGGGCAAGTTCAGACTAGC	ACCAGTGGTTGCACCTCAAA	271
AP278	(TTTG)6	GTGGGAGTCACCTGAGATGC	GGCTTGCAGCTTATGTTGGC	277
AP287	(CATC)12	TCCACCCAACCTCTCCATCCA	GACCATCCTGGGTGCAAGAA	272

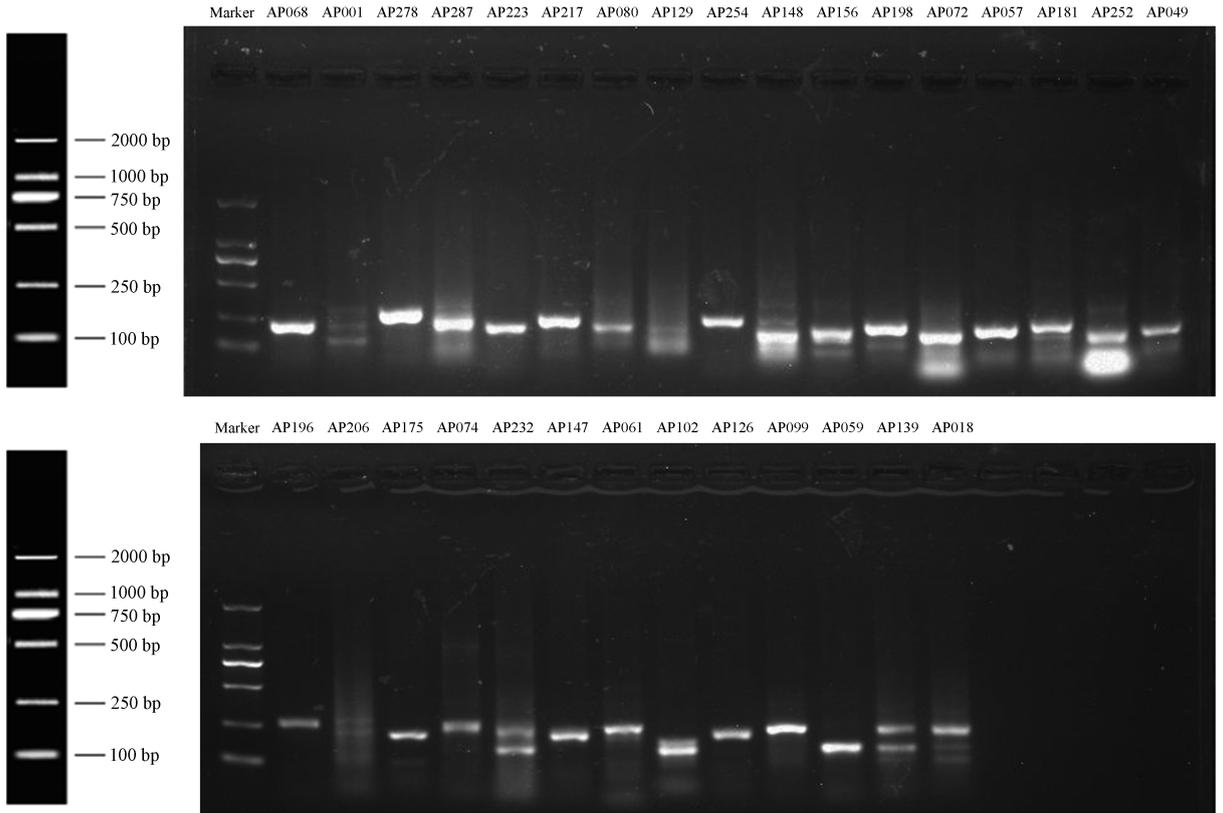


图 1 引物验证结果  
Figure 1 Primer validation results

2.2 大林姬鼠遗传多样性分析

30 对引物在 60 个样本中共检测出 152 个等位基因,有效等位基因总数为 97.983,数值变化范围为 1.571 ~ 6.139,平均每个位点有效等位基因数目为 3.266(表 2)。香农指数的数值范围为 0.672 ~ 1.965,平均值 1.265。观察杂合度的数值范围为 0.350 ~ 0.917,平均值 0.592。期望杂合度的数值范围为 0.364 ~ 0.837,平均值 0.646,表明该种群

具有良好的多态性<sup>[12]</sup>。多态信息含量是等位基因数目和频率的变化函数,能反映群体基因位点的变异程度<sup>[13]</sup>。本实验中大林姬鼠群体的多态性信息含量数值范围为 0.335 ~ 0.810,平均值为 0.598(表 2),属高度多态。

2.3 大林姬鼠群体遗传结构分析

利用 30 个分子标记对 60 个样本的群体结构进行评估。主坐标分析结果显示 60 份大林姬鼠样本

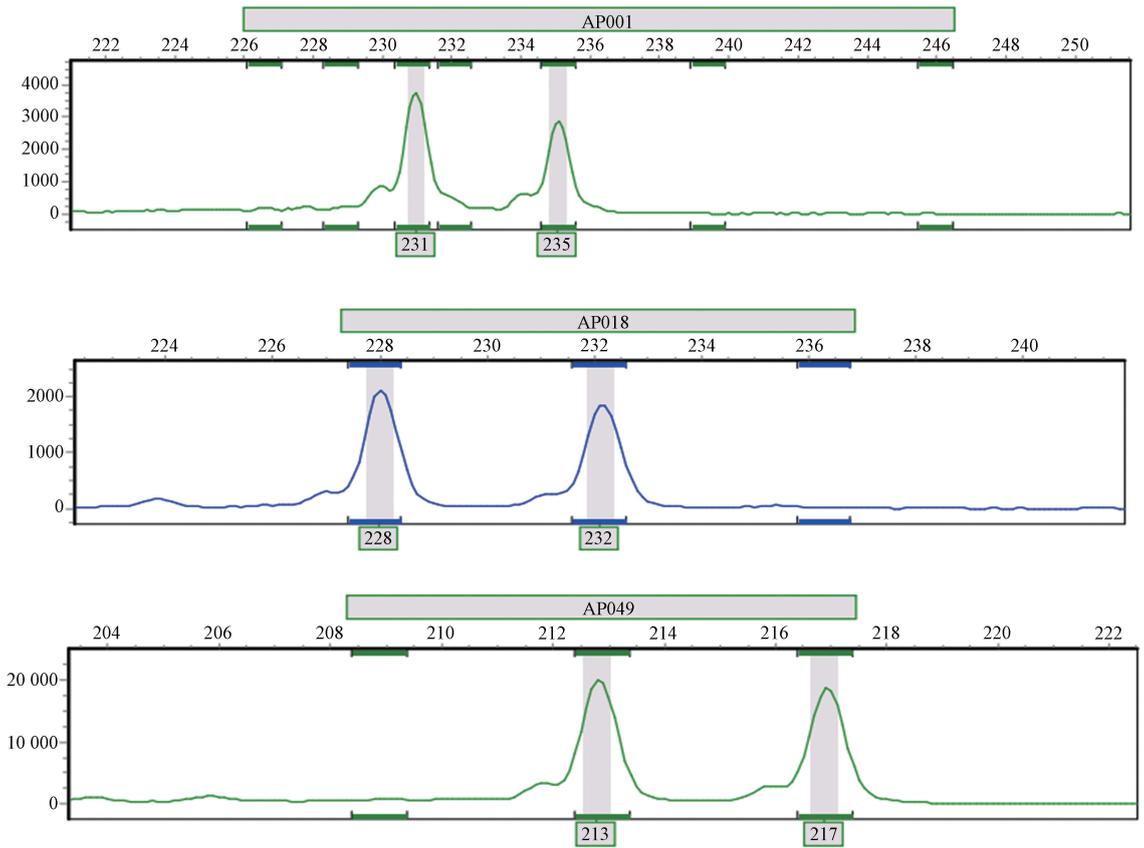


图 2 部分微卫星位点的峰图信息

Figure 2 Peak plot information of some microsatellite loci

能够较好地 被区分并聚类(图 3)。使用 STRUCTURE 2.3.4 分析群体遗传组分,根据似然值最大原则,判断最佳 K 值等于 2(图 4),可以将 60 个样本划分为 2 个亚群。遗传分化系数( $F_{st}$ )结果见表 2。两个亚群 30 个位点的遗传分化系数范围

是 0.007 ~ 0.227,平均值为 0.081。通过 STRUCTURE 2.3.4 对 60 个样本进行聚类(图 5)分子方差分析表明 12% 的遗传变异存在于群体,有 88% 的遗传变异存在于个体,个体的变异是大林姬鼠总变异的主要来源(表 3)。

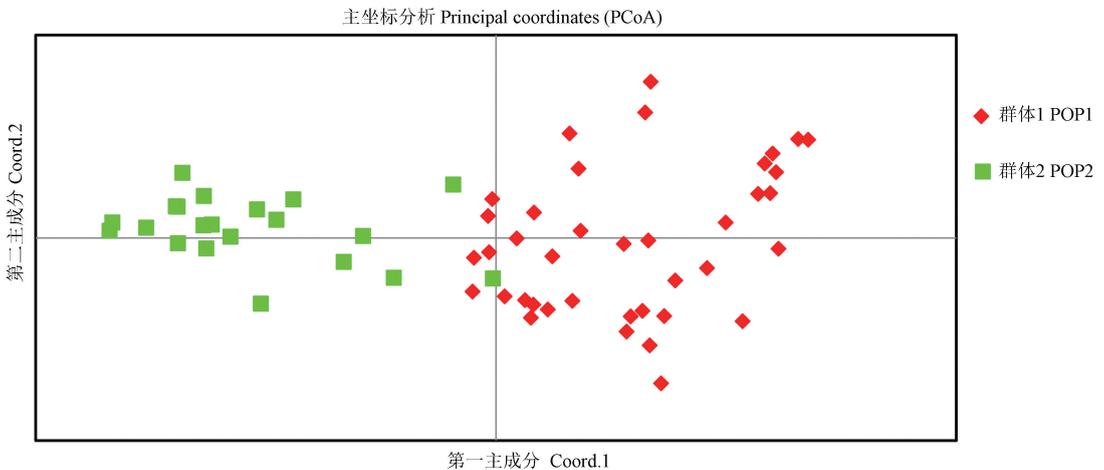


图 3 60 个样本的主坐标分析

Figure 3 Principal coordinate analysis of 60 samples

表 2 30 个微卫星位点在总群体上的遗传分布

Table 2 Genetic distribution of 30 microsatellite loci in the total population

位点 Locus	观察等位 基因数 Na	有效等位 基因数 Ne	香农 指数 I	观察杂 合度 Ho	期望杂 合度 He	多态性信 息指数 PIC	固定 指数 F	群体内近 交系数 Fis	整体近 交系数 Fit	遗传分 化系数 Fst	P
AP001	7.000	4.136	1.619	0.864	0.758	0.726	-0.140	-0.158	-0.140	0.016	0.490
AP018	3.000	2.165	0.838	0.550	0.538	0.431	-0.022	-0.196	-0.024	0.144	0.961
AP049	3.000	1.571	0.672	0.383	0.364	0.335	-0.054	-0.147	-0.020	0.111	0.731
AP057	3.000	2.002	0.798	0.533	0.501	0.410	-0.065	-0.129	-0.036	0.082	0.931
AP059	4.000	3.257	1.271	0.683	0.693	0.640	0.014	-0.068	-0.003	0.061	0.868
AP061	8.000	3.832	1.682	0.617	0.739	0.716	0.166	0.119	0.173	0.060	0.004
AP068	6.000	2.759	1.246	0.390	0.638	0.582	0.389	0.206	0.386	0.227	0.000
AP072	4.000	1.828	0.874	0.500	0.453	0.418	-0.104	-0.282	-0.178	0.081	0.592
AP074	9.000	6.061	1.956	0.729	0.835	0.816	0.127	0.080	0.164	0.092	0.001
AP080	5.000	4.079	1.484	0.746	0.755	0.713	0.012	-0.105	0.009	0.103	0.120
AP099	3.000	1.910	0.726	0.433	0.477	0.378	0.091	0.086	0.107	0.022	0.615
AP102	4.000	2.625	1.137	0.633	0.619	0.565	-0.023	-0.117	-0.008	0.098	0.865
AP126	5.000	4.038	1.450	0.500	0.752	0.709	0.335	0.213	0.295	0.104	0.000
AP129	6.000	3.162	1.275	0.655	0.684	0.623	0.042	0.044	0.063	0.021	0.000
AP139	6.000	3.367	1.374	0.661	0.703	0.659	0.060	0.037	0.075	0.040	0.037
AP147	5.000	4.190	1.510	0.610	0.761	0.722	0.199	0.114	0.209	0.108	0.000
AP148	3.000	1.649	0.708	0.400	0.394	0.357	-0.016	-0.199	-0.078	0.101	0.699
AP156	4.000	2.349	1.080	0.533	0.574	0.531	0.071	-0.033	0.071	0.100	0.055
AP175	4.000	3.478	1.319	0.667	0.712	0.664	0.064	-0.118	0.080	0.177	0.429
AP181	9.000	5.434	1.861	0.424	0.816	0.792	0.481	0.396	0.481	0.141	0.000
AP196	6.000	4.887	1.653	0.814	0.795	0.763	-0.023	-0.064	-0.029	0.032	0.133
AP198	4.000	1.711	0.831	0.417	0.416	0.391	-0.002	-0.065	0.009	0.069	0.429
AP206	9.000	6.139	1.965	0.917	0.837	0.818	-0.095	-0.144	-0.091	0.047	0.056
AP217	4.000	3.157	1.220	0.683	0.683	0.621	0.000	-0.039	0.015	0.051	0.736
AP223	3.000	2.133	0.815	0.350	0.531	0.421	0.341	0.309	0.342	0.048	0.005
AP232	5.000	2.371	1.177	0.600	0.578	0.546	-0.038	-0.096	-0.051	0.041	0.276
AP252	4.000	2.954	1.197	0.400	0.661	0.604	0.395	0.312	0.434	0.177	0.000
AP254	5.000	4.157	1.497	0.763	0.759	0.719	-0.004	-0.112	-0.059	0.047	0.020
AP278	4.000	2.536	1.105	0.650	0.606	0.548	-0.073	-0.162	-0.149	0.011	0.493
AP287	7.000	4.046	1.595	0.650	0.753	0.721	0.137	0.100	0.106	0.007	0.395
平均值 Mean	5.067	3.266	1.265	0.592	0.646	0.598	0.076	-0.007	0.072	0.081	-
标准差 St Dev	1.874	1.272	0.375	0.152	0.136	-	0.164	0.031	0.031	0.010	-

表 3 种群的分子方差分析(AMOVA)

Table 3 Molecular variance analysis of population(AMOVA)

变异来源 Source	自由度 df	总方差 SS	均方差 MS	估算差 异值 Est. Var.	变异百 分比/% Percentage of variation/%
群体间 Among pops	1	82.265	82.265	1.331	12
个体间 Among indiv	58	557.244	9.608	0.395	4
个体内 Within indiv	60	529.000	8.817	8.817	84
总计 Total	119	1168.508	-	10.543	100

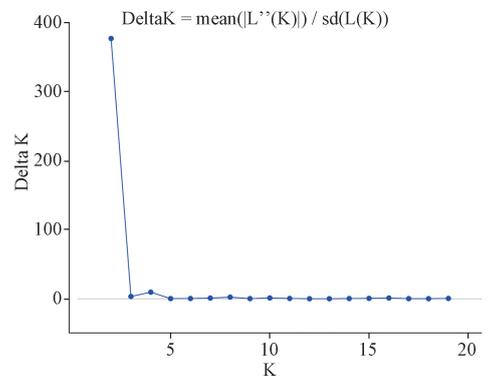


图 4 STRUCTURE 聚类 K 值分析

Figure 4 STRUCTURE clustering K value analysis

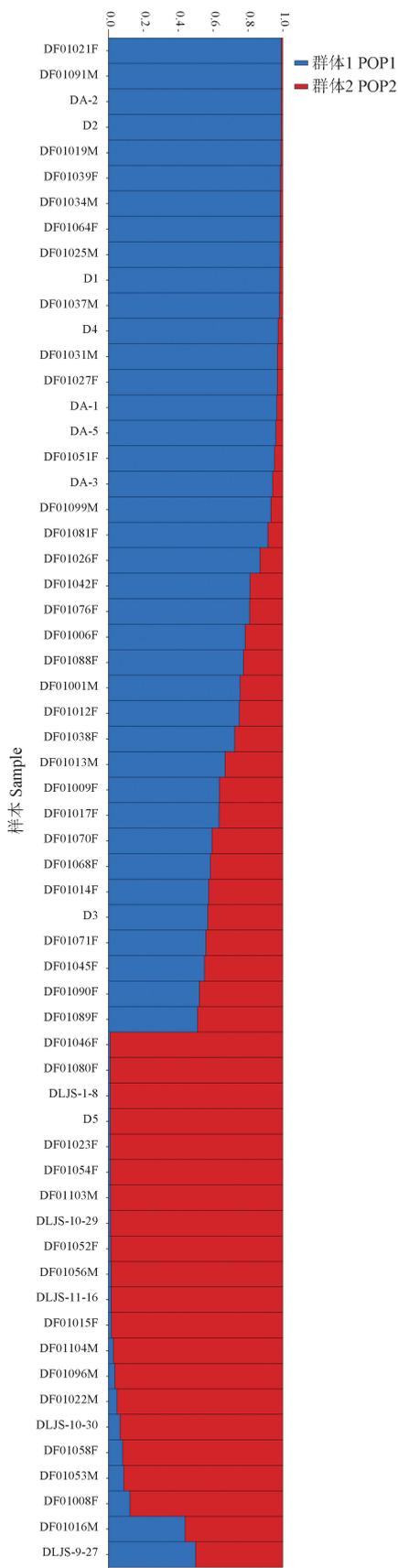


图 5 60 个样本的 STRUCTURE 聚类结果

Figure 5 STRUCTURE clustering results for 60 samples

### 3 讨论

实验动物是生命科学、医药和畜牧兽医等领域不可或缺的战略资源,啮齿类动物与其他种类动物相比是使用数量最多、应用范围最广、研究最深入的实验动物种类。作为一种特殊的实验材料,实验动物的标准化一直受到行业内的高度重视<sup>[14]</sup>,而遗传背景的标准化需要对各个品系进行遗传学质量检测。野生啮齿类动物的实验动物化是新型实验动物开发的方向之一,在实验动物种质资源的扩充及开发利用方面具有重要意义。其中,大林姬鼠作为一种小型啮齿类动物,如何为科学研究所用以及探究出新的实验动物品种,就需要对其基础生物学及分子生物学等相关指标进行研究。目前,对于大林姬鼠微卫星分子标记开发的遗传学研究尚不充足,缺乏对大林姬鼠群体遗传多样性和种群结构的分析。本研究利用大林姬鼠基因组序列开发并筛选出的多态性微卫星分子标记,能有效分析大林姬鼠群体的遗传多样性,为研究大林姬鼠种群遗传结构,建立大林姬鼠遗传质量标准奠定基础。

有效等位基因数,是反映群体遗传变异大小的指标之一,同时也反映等位基因间的相互影响,有效等位基因数值越接近等位基因数的绝对值,表明等位基因在群体中分布越均匀<sup>[15-16]</sup>。研究结果表明 30 个微卫星位点在 60 个样本中共检测出 152 个等位基因,观察等位基因数变化范围是 3 ~ 9,平均每个位点观察等位基因数为 5.067;有效等位基因总数为 97.983,数值变化范围为 1.571 ~ 6.139,平均每个位点有效等位基因数目为 3.266,有效等位基因数小于实际观察到的等位基因数,说明群体等位基因分布不均匀。遗传杂合度是评价群体遗传变异程度的重要参数之一,反映了群体在基因位点上的遗传变异情况,可以度量种群遗传多样性的高低<sup>[17]</sup>。观察杂合度和期望杂合度平均值分别为 0.592 和 0.646,平均期望杂合度高于平均观测杂合度,表示群体遗传一致度低,群体遗传多样性丰富。香农指数可用于估算种群内的遗传分化,指数越大遗传多样性越大,种群分化程度越高<sup>[18]</sup>。香农指数变化范围为 0.672 ~ 1.965,平均 1.265,说明种群内具有中等程度的遗传分化。平均多态信息含量为 0.598,且这些微卫星位点的多态信息含量大部分大于 0.5,表明本研究开发的 30 个微卫星位点具有高多态性<sup>[19]</sup>。

STRUCTURE 2.3.4 分析结果发现本研究观察的大林姬鼠可划分为 2 个亚群。遗传分化系数是衡量群体间的遗传分化程度的指标。实际研究中,遗传分化系数为 0 ~ 0.05 时,表示群体间遗传分化很小;遗传分化系数为 0.05 ~ 0.15 时,表示群体间存在中等程度的遗传分化;遗传分化系数为 0.05 ~ 0.15 时,表示群体间存在中等程度的遗传分化;遗传分化系数为 0.25 以上时,表示群体间有很大的遗传分化<sup>[20]</sup>。大林姬鼠 2 个亚群间的遗传分化系数为 0.081,说明 2 个群体间有着中等程度的遗传分化。分子方差分析是一种通过进化距离来度量并计算单倍型(或基因型)间遗传变异的方法<sup>[21]</sup>。其结果显示个体的变异是大林姬鼠总变异的主要来源。

根据本研究的结果显示,30 个微卫星位点中有 8 个位点偏离 Hardy-Weinberg 遗传平衡,这可能是由于群体在初始建立阶段群体规模较小所导致的。封闭群动物的遗传检测与近交系不同,对封闭群动物的遗传性状控制,主要针对以下方面:(1)保持其个体间较大的遗传性状差异;(2)所有基因的相对频率都是稳定的<sup>[22]</sup>。因此,为了准确评估遗传特征,需要检测更多的个体样本,并且使用更多的检测位点以及具有更丰富位点多态性的标记<sup>[23]</sup>。这就要求筛查鉴定的位点具稳定性及多态性好;有特异等位基因,且该等位基因频率高;遗传分化系数大于 0.05 等特性。本研究开发的 30 个微卫星分子标记,大部分都能满足以上要求。在今后的大林姬鼠种群的繁育工作中,需要采取更加细致的方法来进行控制和管理,每个世代使用本研究开发的 30 个微卫星分子标记对封闭群大林姬鼠进行质量监测,根据基因频率进行评价,基因频率保持稳定,则判为合格,从而确保动物遗传质量符合要求,以维持其良好的遗传质量。

综上所述,本研究基于大林姬鼠基因组序列成功开发出 30 个微卫星分子标记并在此基础上对吉林大学实验动物中心引进的大林姬鼠群体进行遗传多样性检验,各微卫星位点的观察等位基因数、有效等位基因数、观察杂合度、期望杂合度、香农指数等表明大林姬鼠群体的遗传多样性比较丰富,大林姬鼠 2 个亚群均符合封闭群动物的群体遗传特征。本研究结果可为封闭群大林姬鼠遗传检测方法和标准的建立提供基础资料,为推动大林姬鼠种质资源评价和遗传图谱构建等研究提供了高效分子标记和科学参考。

## 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] GROVER A, SHARMA P C. Development and use of molecular markers: past and present [J]. Crit Rev Biotechnol, 2016, 36 (2): 290-302.
- [ 2 ] 倪丽菊, 赵丽亚, 赵立虎, 等. 利用多重荧光 STR 技术分析上海地区 7 品系常用近交系小鼠核心群的遗传特性 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(1): 72-79.  
NI L J, ZHAO L Y, ZHAO L H, et al. Genetic characteristics of seven inbred mouse strains in core colonies from Shanghai analyzed using fluorescent multiplex STR [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2016, 24(1): 72-79.
- [ 3 ] 赵丽丽, 陆涛峰, 张晓萍, 等. 无特定病原体金定鸭微卫星 DNA 遗传多样性分析 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24 (3): 299-303.  
ZHAO L L, LU T F, ZHANG X P, et al. Analysis of the DNA genetic diversity in SPF Jinding duck population [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2016, 24(3): 299-303.
- [ 4 ] 纪春艳, 李强, 杨春文. 大林姬鼠昼夜活动节律的研究 [J]. 牡丹江师范学院学报(自然科学版), 2005, 4: 1-3.  
JI C Y, LI Q, YANG C W. A study on the daily activity rhythms of *Apodemus speciosus* Temminck [J]. J Mudangjiang Teach Coll, 2005, 4: 1-3.
- [ 5 ] 万祥旭, 黄笑然, 周宝丽, 等. 东北野生大林姬鼠感染小型缩小膜壳绦虫病观察报道 [J]. 天津农业科学, 2022, 28 (9): 30-33.  
WAN X X, HUANG X R, ZHOU B L, et al. Observation and report on infection of *Apodemus agrarius* with *Hymenolepis miniatura* in northeast China [J]. Tianjin Agric Sci, 2022, 28 (9): 30-33.
- [ 6 ] SUZUKI H, FILIPPUCCI M G, CHELOMINA G N, et al. A biogeographic view of *Apodemus* in Asia and Europe inferred from nuclear and mitochondrial gene sequences [J]. Biochem Genet, 2008, 46(5/6): 329-346.
- [ 7 ] 徐春雨, 王述艳, 于成文, 等. 大林姬鼠与黑线姬鼠生物学指标对比分析 [J]. 湖北农业科学, 2021, 60(2): 123-125.  
XU C Y, WANG S Y, YU C W, et al. Comparative analysis of biological index of *Apodemus peninsulae* and *Apodemus agrarius* [J]. Hubei Agric Sci, 2021, 60(2): 123-125.
- [ 8 ] 周思宇, 苏航, 杨文建, 等. 牡丹江三道关林场大林姬鼠肠道菌群与功能预测 [J]. 中国林副特产, 2022, 4: 19-21.  
ZHOU S Y, SU H, YANG W J, et al. Preliminary analysis of intestinal microflora and functional prediction of *apodemus mongolicus* in mudanjiang sandaoguan forest farm [J]. Forest By-Product Speciality Chin, 2022, 4: 19-21.
- [ 9 ] 贾修歧. 大林姬鼠和黑线姬鼠血清蛋白、组织蛋白及同工酶的比较研究 [D]. 牡丹江: 牡丹江师范学院; 2021.  
JIA X Q. Comparative study on serum protein, tissue protein and isozyme of *a. peninsulae* and *Apodemus agrarius* [D]. Mudanjiang: Mudanjiang Normal University; 2021.
- [ 10 ] 辛笛. 低氧环境对大林姬鼠生活节律及血液生理生化指标的影响 [D]. 牡丹江: 牡丹江师范学院; 2017.

- XIN D. Effects of hypoxic environment on the life rhythm and blood physiological and biochemical indexes of *Apodemus peninsulae* [D]. Mudanjiang: Mudanjiang Normal University; 2017.
- [11] KOH H, JANG K, WANG J X, et al. Sequence diversity of the mitochondrial DNA cytochrome b gene and control region in the two subspecies of the Korean field mouse (*Apodemus peninsulae*) [J]. Acta Theriol Sin, 2010, 30(3): 256-263.
- [12] LIU X, YU X, XU Y, et al. Development of an effective microsatellite marker system to determine the genetic structure of *Meriones meridianus* populations [J]. Exp Anim, 2020, 69(2): 224-232.
- [13] 熊建杰. 西北地区 4 个中国特有鹿种的微卫星遗传多样性研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学; 2010.
- XIONG J J. Microsatellite genetic diversity of four Chinese unique Deer species in northwest region [D]. Yangling: Northwest A & F University; 2010.
- [14] 左琴, 魏杰, 付瑞, 等. 应用微卫星技术对 KM 小鼠种子群体遗传质量进行比较分析 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6): 819-823.
- ZUO Q, WEI J, FU R, et al. Population genetic quality analysis of a closed KM mouse colony by microsatellites [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(6): 819-823.
- [15] 李晓锋, 马月辉, 熊琪, 等. 麻城黑山羊微卫星标记多态性分析 [J]. 湖北农业科学, 2013, 52(18): 4454-4457, 4468.
- LI X F, MA Y H, XIONG Q, et al. Genetic polymorphism of microsatellite markers in Macheng black goat [J]. Hubei Agric Sci, 2013, 52(18): 4454-4457, 4468.
- [16] 储明星, 王吉振, 王爱国, 等. 小尾寒羊五个微卫星基因座遗传多态性研究 [J]. 遗传学报, 2002, 29(6): 502-506.
- CHU M X, WANG J Z, WANG A G, et al. Genetic polymorphisms of five microsatellite loci in small tail Han sheep [J]. Acta Genet Sin, 2002, 29(6): 502-506.
- [17] 张振祥, 陈艳霞, 刁向玉, 等. 应用微卫星标记分析山丹军马场甘肃马鹿遗传多样性 [J]. 高原科学研究, 2022, 6(1): 63-75.
- ZHANG Z X, CHEN Y X, XI X Y, et al. Genetic diversity analysis of Gansu red Deer using microsatellite markers [J]. Plateau Sci Res, 2022, 6(1): 63-75.
- [18] 张民照. 用多态位点率和香农指数分析的飞蝗地理种群遗传多样性 [J]. 中国农学通报, 2008, 24(9): 376-381.
- ZHANG M Z. The genetic diversity of geographical populations of the migratory locust analyzed with the percent of polymorphic loci and shannon's index [J]. Chin Agric Sci Bull, 2008, 24(9): 376-381.
- [19] BOTSTEIN D, WHITE R L, 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.
- [20] WADE M J. Wright's View of Evolution: *Evolution and the Genetics of Populations*. Vol. 4, Variability within and among Natural Populations. Sewall Wright. University of Chicago Press, Chicago, 1978. x, 580 pp., illus. \$ 37.50 [J]. Science, 1980, 207(4427): 173-174.
- [21] EXCOFFIER L, SMOUSE P E, QUATTRO J M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data [J]. Genetics, 1992, 131(2): 479-491.
- [22] 胡维新, 杨榕, 许冰, 等. 洞庭湖日本血吸虫疫区东方田鼠生化与分子遗传学标记的初步研究 [J]. 中国实验动物学报, 2002, 10(4): 205-209.
- HU W X, YANG R, XU B, et al. Studies on biochemical and molecular genetic markers of *Microtus fortis* in dongtinghu lake region of China [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2002, 10(4): 205-209.
- [23] 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.
- SHANG H T, WEI H, YUE B F, et al. Microsatellite analysis in wistar and spague-darley outbred rats [J]. J Mol Cell Biol, 2008, 41(1): 28-34.

[收稿日期] 2023-10-24