

随机扩增杂交微卫星方法在大仓鼠种群遗传多态性研究中的应用

谢佳燕^{①②} 张知彬^{①*}

(^①中国科学院动物研究所 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室 北京 100080 ;

^②武汉工业学院 生物与制药工程系 武汉 430023)

摘要 :随机扩增杂交微卫星(Random amplified hybridization microsatellites ,RAHM)是一种复合 RAPD 扩增和寡核苷酸扫描的方法。该方法能够从 RAPD 产物凝胶上获得更多的信息,具有分析方法快速、高敏感性,能检测到高水平的多态性等优点。RAHM 方法通过对 RAPD 扩增的 DNA 片段进行微卫星杂交来替代限制性内切酶对基因组 DNA 的消化,有助于揭示微卫星基因组克隆,进行微卫星引物的筛选。本文采用随机扩增杂交微卫星方法来检测小型哺乳动物大仓鼠(*Tscherskia triton*)种群的遗传多态性,结果表明 RAHM 方法能够检测到大仓鼠种群中较高的多态性以及种群间的差异,这些条带模式可能代表真核基因组中另一种多态性标记的来源,可用于检测小型哺乳动物种群的遗传多态性。

关键词 :随机扩增杂交微卫星 ;RAPD ;大仓鼠 ;多态性 ;微卫星

中图分类号 :Q953 文献标识码 :A 文章编号 :0250-3263(2006)04-22-05

Application of Random Amplified Hybridization Microsatellite Markers in Polymorphic Analysis of the Greater Long-tailed Hamster Populations

XIE Jia-Yan^{①②} ZHANG Zhi-Bin^①

(^① State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents ,

Institute of Zoology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 ;

^② Wuhan Polytechnic University , Wuhan 430023 ,China)

Abstract : Random amplified hybridisation microsatellites (RAHM), a new system which combines RAPD amplification and oligonucleotide screening , can provide more information from analysis on RAPD gels , and it has several advantages including rapid analysis and high sensitivity for detecting high-level variability. RAHM is useful for revealing microsatellite genomic clones and selecting the microsatellite primers by substituting restrictions enzyme digestion of genomic DNA with microsatellite hybridization. Our study based on RAHM analysis revealed that this new technique could discern high level of polymorphism within and among populations of the Greater Long-tailed Hamster (*Tscherskia triton*). The result suggests that such banding patterns might represent an additional source of polymorphic markers in eukaryotes and could be used for detecting the genetic diversity of the small mammals populations.

Key words : Random amplified hybridisation microsatellites ; RAPD ; The Greater Long-tailed Hamster ; Polymorphism ; Microsatellite

基金项目 国家自然科学基金重点项目(No. 30370232 , 39730090) , 中国科学院重要创新方向资助项目(No. KSCX2-SW-103 , KSCX2-1-03) ;

* 通讯作者 , E-mail : zhangzb@ioz.ac.cn ;

第一作者介绍 谢佳燕,女,博士,主要从事分子生态学方面的研究, E-mail : xjyaphid@yahoo.com

收稿日期 2005-10-26, 修回日期 2006-03-26

近年来,在 DNA 水平上揭示多态性的多种分子标记已成为种群遗传分析、种属进化和生态学研究的一种新的手段^[1-3]。其中,随机扩增多态性 DNA (Random amplified polymorphic DNAs, RAPD) 是一种显性 DNA 分子标记。RAPD 以单一随机寡核苷酸作为引物,不同的基因组 DNA 为模板,通过 PCR 扩增,凝胶电泳分离扩增片段检测多态性^[4]。RAPD 可适用于 DNA 序列未知或信息较少物种的研究,已广泛用于种群遗传多样性^[3]、亲缘关系^[5]等方面的研究。微卫星 (Microsatellite) 是近年发展起来的一种新型 DNA 分子标记,是以少数几个核苷酸为单位多次串联重复的 DNA 序列,具有数量大、分布广、多态信息含量高、检测快速方便等优点^[6]。目前微卫星标记已用于多种物种的研究^[3,7],成为分子生态学的研究热点之一。

随机扩增杂交微卫星 (Random amplified hybridization microsatellites, RAHM) 是一种复合 RAPD 技术和寡核苷酸扫描的方法^[8],利用微卫星探针针对 RAPD 扩增片段进行 Southern 杂交来检测物种的遗传多态性。该方法能够从 RAPD 凝胶上获得更多的信息,检测到高水平的多态性。RAHM 标记已用于一些物种多态性及真核生物微卫星 DNA 检测分离的研究^[9-14],但在小型哺乳动物种群水平上的应用不多。本文采用随机扩增杂交微卫星方法,以检测大仓鼠 (*Tscherskia triton*) 种群的遗传多态性为例,探讨该技术在小型哺乳动物种群遗传多态性研究上应用的可行性。

1 材料与方法

1.1 样品来源 于 2002 年 6~10 月采自北京市密云县和河北省固安县,使用木板夹于农田内捕获大仓鼠,取肌肉样于 95% 的乙醇中固定、保存。两地区随机取 10 个样品为例进行实验和分析。采用标准的酚/氯仿法提取基因组 DNA^[15]。常规试剂均为分析纯。

1.2 RAHM 方法 RAPD 扩增:筛选重复性好,多态性高的 RAPD 引物进行大仓鼠个体的 PCR 扩增,筛选的 10 个引物为 OPA04, OPA09,

OPE03, OPE14, OPE16, OPT18, OPY04, OPZ07, OPZ10 和 OPZ13。以 (CA)₅ 作为探针,对 RAPD 扩增产物进行杂交筛选。RAPD 反应条件参考 Williams 等^[16]的方法,并略加改动。反应体系 (25 μ l) 中含有 10 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 50 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl₂, dNTP 100 μ mol/L, 随机引物 2 μ l, 基因组 DNA 约 25 ng, *Taq* 酶 1.25 U (*TaKaRa*TM)。在 PTC-100 热循环扩增仪 (M. J. Research) 上进行 PCR 扩增。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 随后进行 40 个循环。每个循环由 94 $^{\circ}$ C 30 s, 36 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min 组成。最后一个循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后,凝胶成像系统拍照。

杂交: RAHM 杂交反应条件参考 Cifarelli 等^[8]的方法。1.5% 的琼脂糖凝胶分离 PCR 扩增产物后,转移到尼龙膜上 (Biodyne[®] B Membrane), 进行 Southern 印迹;对尼龙膜进行寡核苷酸探针杂交和冲洗,以 (CA)₅ 作为探针 (DIG-标记, Boehringer Mannheim 的 3' 末端标记试剂盒) 检测 CA/GT 重复的微卫星。Southern 杂交、DIG 免疫检测和显色使用 DIG 检测试剂盒 I (Boehringer Mannheim), 杂交流程依据试剂盒说明进行。显色完全后,用 TE (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 缓冲液冲洗 5 min, 尼龙膜晾干后照像保存。

1.3 数据分析 采用 POPGENE 1.31 软件^[17] 进行遗传多态性分析, 计算不同种群的遗传多态性指数。记录图谱中清晰的条带, 任意两个个体间的遗传距离 (D) 为: $D = 1 - F$, F 为相似性系数。相似性系数依据 Nei 等^[18] 的公式进行计算: $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, 其中 N_{xy} 为个体 x 和个体 y 所共有的片段数, N_x 和 N_y 分别为个体 x 和 y 所拥有的片段数。

2 结果

2.1 RAPD 和 RAHM 杂交结果 采用 RAPD 方法对大仓鼠种群进行扩增, 每个引物可扩增出 10~14 条条带, 片段长度在 250~2 000 bp 之

间(图 1)。所有大仓鼠个体产生的多态性条带占条带总数的 68.1%。样本中主要的谱带分布型相似,并且两个地区个体的扩增图谱中均无种群特有条带。同一种群内个体间的条带模式相似,同时,不同种群间的个体也可扩增出相

似的条带分布型。对所有大仓鼠个体进行多态性分析时发现, Nei's 基因多样度和 Shannon 多态性信息指数分别为 0.204 和 0.312;对不同地区的个体进行分析时表明(表 1),固安地区种群的多态性值高于密云种群。

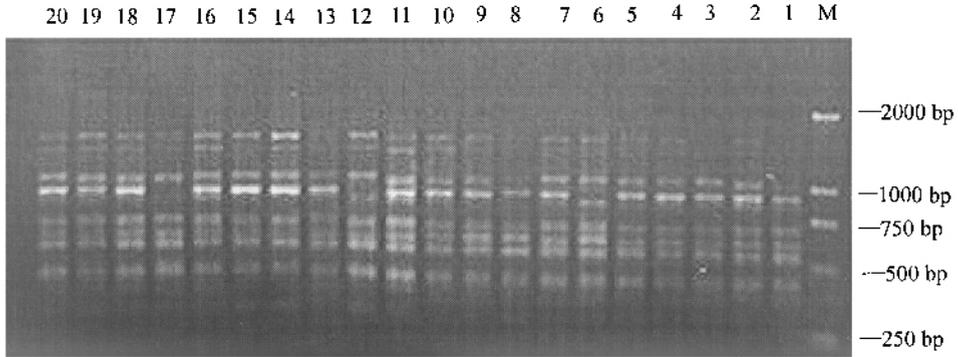


图 1 RAPD 引物 OPA04 扩增大仓鼠个体基因组 DNA 的电泳图谱

Fig. 1 RAPD pattern obtained using primer OPA04 on the Greater Long-tailed Hamster individuals

1 ~ 10. 固安种群个体 ;11 ~ 20. 密云种群个体。

Lanes 1 - 10 , specimens from Gu'an County ;Lanes 11 - 20 from Miyun County .

表 1 大仓鼠不同地区种群的遗传多态性(± SD)

Table 1 Genetic diversity of local populations of the Greater Long-tailed Hamster

种群 Population	Nei's 基因多样性 (H)		Shannon 信息指数 (I)	
	RAPD	RAHM	RAPD	RAHM
固安 Gu'an	0.187 ± 0.209	0.275 ± 0.230	0.278 ± 0.296	0.399 ± 0.319
密云 Miyun	0.175 ± 0.199	0.159 ± 0.220	0.263 ± 0.284	0.236 ± 0.313

RAHM 杂交结果与 RAPD 产物 EB 染色后的条带模式不同,结果见图 2。共检测出 4 ~ 7 条杂交条带,多态性条带占总条带数的 71%。所有样品的杂交结果中无种群特有单型性条带,个体间主要的杂交谱带分布型相似。所有

大仓鼠个体的 Nei's 基因多样度和 Shannon 多态性信息指数分别为 0.255 和 0.381;分析不同地区大仓鼠的多态性结果也表明,固安地区种群的多态性值高于密云种群(表 1),这与 RAPD 方法检测所得结果一致。

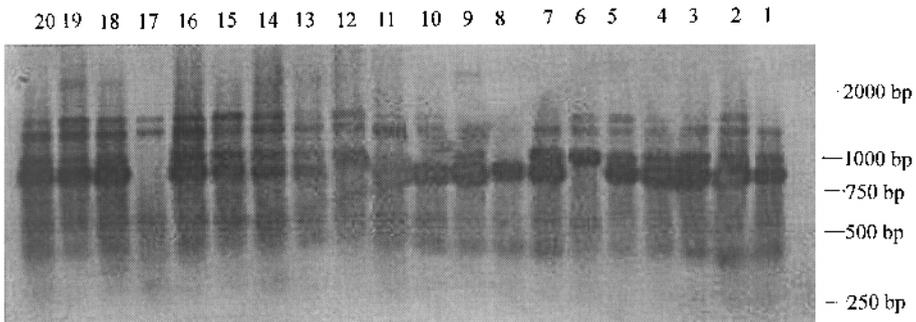


图 2 (CA)₅ 探针与 RAPD 扩增产物杂交后的 RAHM 图谱

Fig. 2 The corresponding Southern filter was hybridized with (CA)₅ probe

1 ~ 10. 固安种群个体 ;11 ~ 20. 密云种群个体。

Lanes 1 - 10 , specimens from Gu'an County ;Lanes 11 - 20 from Miyun County .

2.2 不同地区种群个体间的遗传关系 对大仓鼠个体间 RAPD 条带和 RAHM 杂交片段间的遗传距离进行分析,结果表明,采用 RAPD 方法进行分析时,固安地区不同个体间的遗传距离范围为 0.085 ~ 0.180 之间,而密云地区为 0.073 ~ 0.203,两地区内的平均遗传距离分别为 0.132 和 0.136,所有大仓鼠个体间的平均遗传距离为 0.161。在 RAHM 方法中,固安与密云地区不同大仓鼠个体间杂交片段的遗传距离为 0.000 ~ 0.500 和 0.000 ~ 0.273,两地区种群内的平均遗传距离分别为 0.150 和 0.081,所有大仓鼠个体间的平均遗传距离为 0.120。

3 讨论

通过探针 (CA)₅ 对大仓鼠个体的 RAPD 产物进行杂交,显色后产生显著的可识别信号,这与前述的一些研究分析所得结果一致,表明这些条带模式可能代表了真核基因组中另一种多态性标记的来源^[9]。在本研究中,RAPD 产物经 EB 染色后产生的条带模式,与通过 (CA)₅ 探针和 RAPD 产物杂交后产生的指纹图谱模式不同,说明 RAPD 条带在凝胶中未被完全检测出。RAHM 杂交条带模式强烈的依赖于引物/探针的复合使用,因此,采用多对这样的组合有利于揭示种群的遗传多态性水平。这些结果也说明,PCR 扩增产物杂交后所产生的杂交信号并非存在于凝胶中未经扩增的基因组 DNA。这种条带模式的产生可能源于如下原因:任意一次 RAPD 反应均可产生不同丰度的多条产物,经凝胶电泳、染色后仅能分辨出丰度最多的扩增条带,但是大部分的小片段依然低于检测水平而未检出或形成背景。由于微卫星普遍存在于真核基因组中,这为通过杂交检测这些低丰度产物提供了可能。此外,通过某个微卫星重复单元杂交后得到的片段信号的强度,依赖于这些重复单元的长度及该片段的丰度^[9]。

RAHM 的杂交结果中,大仓鼠个体间的条带模式存在差异,并且遗传多态性分析表明固安种群多态性值高于密云种群个体,个体间存在明显的遗传异质性,这与 RAPD 分析的结果

一致,表明 RAHM 标记可以检测到种群内的差异和个体间的多态性。Richardson 等^[9]用寡核苷酸探针与一种植物 (*Dioscorea bulbifera*) 的 21 个品系进行杂交,结果也发现该标记方法能揭示相近基因型间条带模式的差异。Bildanova 等^[19]也认为该标记方法可识别小麦变种。此外,Ramser 等^[10]也发现 RAHM 方法能够区分物种间的亲缘关系。他们认为 RAHM 技术中可能包含了某种杂交控制,一些 RAHM 条带可能是比 RAPD 方法对物种亲缘关系更为可靠的描述。Amicucci 等^[12]也认为 RAHM 方法是一种可检测种群内多态性的新型标记。此外,杂交产生较低复杂性的条带模式,有利于检测到物种特异性的条带,如 Homg 等^[20]用 RAHM 标记筛选到雄性荷兰牛的特异条带。

以 (CA)₅ 作为探针,筛选 RAPD 扩增产物进行 RAHM 杂交。探针 (CA)₅ 在 RAPD 扩增产物中检测到的多态性条带占总条带数的 71%,说明这些条带中含有 (CA) 重复序列。将这些杂交条带纯化和克隆测序,将有助于揭示微卫星基因组克隆,筛选微卫星侧翼引物,而无需耗时扫描基因组文库。Cifarelli 等^[8]采用寡核苷酸探针对不同植物的 RAPD 产物进行杂交,筛选阳性条带,结果发现这些阳性微卫星条带与植物基因组文库扫描结果一致。之后,他们将寡核苷酸探针检测到的 RAPD 产物纯化、克隆测序,分析结果表明这些 RAPD 条带中确实含有该微卫星重复单元序列。Tanaka 等^[11]采用 RAPD 方法对一种山毛榉树 (*Fagus crenata*) 个体扩增后进行 RAHM 杂交,产生了 10.6% 的阳性片段率,并依据这些条带设计出 8 对可成功扩增微卫星的侧翼引物。因此,Tanaka 等^[11]认为 RAHM 方法比用常规构建基因文库筛选微卫星引物的方法具有更高的筛选效率。多个研究者也采用 RAHM 方法筛选了微卫星引物,用于种群遗传学和种质变种的研究^[13 21]。

总之,RAHM 方法能够从 RAPD 产物凝胶上获取更多的遗传信息,该技术复合了寡核苷酸指纹和 RAPD 的许多优点,如分析方法快速,敏感性高,检测到高水平的多态性和无需已知

DNA 序列的信息等。该方法可通过对 RAPD 扩增的 DNA 片段进行微卫星杂交,替代了限制性内切酶对基因组 DNA 的消化,有助于揭示微卫星基因组克隆;再者,使用非放射性探针,避免了放射性的危险。本研究通过 RAHM 标记,检测到大鼠种群中较高的遗传多态性和个体间的差异,表明 RAHM 标记可作为检测小型哺乳动物种群水平上遗传多态性的一种新型分子标记。

参 考 文 献

- [1] Brooks S A , Terry R B , Bailey E . A PCR-RFLP for kit associated with tobiano spotting pattern in horses. *Animal Genetics* 2002 **33**(4): 301 ~ 303.
- [2] 汪永庆 张知彬 徐来祥. 中心区和边缘区大鼠种群的遗传多样性. *科学通报* 2001 **46**(19): 1 644 ~ 1 650.
- [3] Harley E H , Baumgarten I , Cunningham J , et al . Genetic variation and population structure in remnant populations of black rhinoceros , *Diceros bicornis* , in Africa. *Molecular Ecology* , 2005 , **14**(10): 2 981 ~ 2 990.
- [4] Williams J G K , Hanafey M K , Rafalski J A , et al . Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods Enzymol* , 1993 **218** : 705 ~ 740.
- [5] Yamazaki Y , Shimada N , Tago Y . Detection of hybrids between masu salmon *Oncorhynchus masou masou* and amago salmon *O. m. ishikawae* occurred in the Jinzu River using a random amplified polymorphic DNA technique. *Fisheries Science* , 2005 , **71**(2): 320 ~ 326.
- [6] Zane L , Bargelloni L , Patarnello T . Strategies for microsatellite isolation : a review. *Molecular Ecology* 2002 **11**(1): 1 ~ 16.
- [7] Goossens B , Chikhi L , Jalil M F , et al . Patterns of genetic diversity and migration in increasingly fragmented and declining orang-utan (*Pongo pygmaeus*) populations from Sabah , Malaysia. *Molecular Ecology* , 2005 , **14**(2): 441 ~ 456.
- [8] Cifarelli R A , Gallitelli M , Cellini F . Random amplified hybridization microsatellites (RAHM) : isolation of a new class of microsatellite-containing DNA clones. *Nucleic Acids Research* , 1995 **23**(18): 3 802 ~ 3 803.
- [9] Richardson T , Cato S , Ramser J , et al . Hybridization of microsatellites to RAPD : a new source of polymorphic markers. *Nucleic Acids Research* , 1995 **23**(18): 3 798 ~ 3 799.
- [10] Ramser J , Weising K , Lopez-Peralta C , et al . Molecular marker-based taxonomy and phylogeny of Guinea yam (*Dioscorea rotundata*-*D. cayenensis*). *Genome* , 1997 **40**(6): 903 ~ 915.
- [11] Tanaka K , Tsumura Y , Nakamura T . Development and polymorphism of microsatellite markers for *Fagus crenata* and the closely related species , *F. japonica* . *Theoretical and Applied Genetics* , 1999 **99**(1 - 2): 11 ~ 15.
- [12] Amicucci A , Guidi C , Potenza L , et al . Microsatellite primed-PCR to select molecular markers for Tuber species. *Biotechnology Letters* , 2002 , **24**(4): 263 ~ 267.
- [13] Yamamoto T , Kimura T , Sawamura Y , et al . Simple sequence repeats for genetic analysis in pear. *Euphytica* , 2002 , **124**(1): 129 ~ 137.
- [14] Jayasankar P , Dharmalingam K . Potential application of RAPD and RAHM markers in genome analysis of scombroid fishes. *Current Science* , 1997 **72**(6): 383 ~ 390.
- [15] 萨姆布鲁克 J E F 弗里奇 T 曼尼阿蒂斯著. 分子克隆实验指南(第二版). 北京 科学出版社, 1993.
- [16] Williams J G K , Kubeik A R , Livak K J , et al . DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* , 1990 , **18**(22): 6 531 ~ 6 535.
- [17] Yeh F C , Yang R C , Boyle T B J , et al . POPGENE. Molecular Biology and Biotechnology Centre , University of Alberta , Canada , 1997.
- [18] Nei M , Li Wen-Hsiung . Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Genetics* , 1979 **70**(10): 5 269 ~ 5 273.
- [19] Bildanova L L , Salina E A , Pershina L A . Investigation of the backcross progeny of barley-wheat hybrids by the RAPD and RAMPO methods. *Russian Journal of Genetics* , 2002 , **38**(3): 257 ~ 263.
- [20] Horng Y M , Huang M C . Male-specific band in random amplified microsatellite polyphism fingerprints of Holstein cattle. *Proceedings of Natural Sciences Council* , ROC (B) , 1999 **24**(1): 1 ~ 13.
- [21] Usmani S , Tan S G , Siraj S S , et al . Population structure of the Southeast Asian river catfish *Mystus nemurus* . *Animal Genetics* , 2003 , **34**(6): 462 ~ 464.