

大鼠及小鼠微卫星引物在社鼠中的跨种扩增

孙 波 鲍毅新* 张龙龙 赵庆洋 许 婧

(浙江师范大学生态研究所 金华 321004)

摘要: 利用微卫星引物在同一属、科、目不同种之间具有通用性的特点,通过 PCR 扩增、聚丙烯酰胺电泳和银染技术对社鼠(*Niviventer confucianus*)近缘物种大鼠(*Rattus norvegicus*)、小鼠(*Mus musculus*)中已知的 70 个微卫星位点引物进行跨种扩增,筛选适合社鼠相关研究的多态微卫星引物。结果发现,40 个位点引物出现扩增条带,21 个位点引物能够稳定扩增,其中 15 个位点杂合,13 个位点具有多态性;PCR 扩增的 Mg^{2+} 浓度主要集中在 1.5 及 2.0 mmol/L,退火温度在 50~60℃ 之间不等。虽然部分扩增产物有影子带的存在,但并不影响等位基因的判读。总体来看,利用大、小鼠的微卫星引物扩增社鼠的微卫星位点是可行的。

关键词: 社鼠; 微卫星; 聚丙烯酰胺电泳

中图分类号: Q341 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2009)06-145-06

Cross-species Amplification of Rat and Mouse Microsatellite DNA Loci in the *Niviventer confucianus*

SUN Bo BAO Yi Xin* ZHANG Long-Long ZHAO Qing-Yang XU Jing

(Institute of Ecology, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China)

Abstract: Taking consideration of the fact that microsatellite primers can be amplified among different species in the same genus, family and order, we used 70 Rat (*Rattus norvegicus*) and Mouse (*Mus musculus*) microsatellite primers to amplify their counterparts in a close species the Chinese White Bellied Rat (*Niviventer confucianus*) through PCR amplification, polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining technique. A total of 40 loci could be amplified in agarose gel electrophoresis, but after polyacrylamide gel electrophoresis, only 21 loci could be stably amplified, among which 15 loci showed hybridism and 13 loci showed polymorphism. Mg^{2+} concentration in PCR amplification was at 1.5 and 2.0 mmol/L, and the annealing temperature ranged from 50℃ to 60℃. The existence of stutter bands in partial amplified products did not affect the selection of purpose bands. Overall, it is feasible to amplify the Chinese white bellied microsatellite primers by using their rat and mouse counterparts.

Key words: *Niviventer confucianus*; Microsatellite; Polyacrylamide gel electrophoresis

微卫星标记(microsatellite marker)是近几年流行起来的分子标记技术,是进行分子遗传学方面研究的一种有效手段。由于其具有多态性高、杂合子比例高、信息含量大以及在同一属、科、目不同种之间具有保守性等优点,已被广泛应用于动植物遗传图谱构建^[1~3]、目标基因的标定^[4,5]、遗传多样性监测^[6]等研究领域。

社鼠(*Niviventer confucianus*)隶属于啮齿目

(Rodentia)鼠科(Muridae)白腹鼠属,是丘陵山林区常见的鼠类。因其取食林木和果树的嫩叶、果实及毗邻的农作物,已成为林区的主要害

基金项目 浙江省自然科学基金项目(No. Y507080);

* 通讯作者, E-mail: sky90@zjnu.cn;

第一作者介绍 孙波,男,硕士研究生;研究方向:动物生态学; E-mail: sunbo84@gmail.com。

收稿日期: 2009-04-10, 修回日期: 2009-09-16

鼠之一;它也携带多种病原体,在流行病学中占有一定的地位,从而引起了人们的日益关注^[7,8]。近年来在其分类地位^[9]、生理生态学^[10,11]、内脏器官形态^[12,13]、行为学^[14,15]以及繁殖生态学^[16]等领域已经开展了广泛的研究。开展社鼠遗传学方面的研究有利于揭示该动物的生物学特性,进而了解其生物学本质。由于社鼠与大鼠(*Rattus norvegicus*)、小鼠(*Mus musculus*)均隶属于啮齿目鼠科,存在一定的亲缘关系,因此,本文根据微卫星引物在同一属、科、目不同种之间具有通用性的特点,利用大、小鼠中已知的 70 个微卫星位点引物扩增社鼠样本 DNA,开展社鼠微卫星位点研究,寻找社鼠多态性微卫星位点。这对于了解社鼠的群体遗传概貌和基因资源多样性具有重要意义,也为构建社鼠种群的遗传数据库奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 实验所用社鼠样本来自 2008 年 5 月在浙江千岛湖岛屿开展小型兽类种群数量调查时捕获的个体,雄鼠 125 只,雌鼠 89 只,总计 214 只。社鼠经解剖后,肌肉组织暂时存放于含 95% 乙醇小口塑料瓶中固定保存,带回实验室后-70℃冰箱长期保存。解剖过程中,器械严格消毒和分开,防止样品间的交叉污染。

1.1.2 实验仪器 Eppendorf 5417R 高速冷冻离心机;Eppendorf 恒温混匀仪;Thermo DNA 干燥仪; BIO-RAD 电泳仪; BIO-RAD 梯度 PCR 仪; BIO-RAD 紫外凝胶成像系统; BIO-RAD 双向聚丙烯酰胺凝胶电泳仪。

1.1.3 试剂 *Ex Taq* 聚合酶、dNTP、DL2000 DNA marker 购自宝生物工程(大连)有限公司, pUC19 DNA/ MSPI Marker 及其他试剂购自上海生工生物工程技术服务有限公司。

1.2 方法

1.2.1 微卫星位点的选取 选取位于大、小鼠的不同染色体上,且等位基因数多、多态性含量丰富的微卫星位点。分别为小鼠 1~4 号染色体上的 6 个位点(引物基因座分别为 D1Mit13、

D2Mit30、D2Nds3、D3Mit15、D3Mit22、D4Mit17), 6~16 号染色体的 14 个位点(D6Mit4、D7Nds1、D8Mit4、D9Mit23、D10Mit3、D10Mit12、D11Mit2、D12Nds2、D13Mit3、D14Mit5、D15Mit5、D15Mit17、D16Mit4、D16Mit7);大鼠 1~14 染色体的 38 个位点(BSIS、KAL、PKC、TON、CPB、FGG、PKL、CAT、SCN2A、SVS2P、A2M、FABP1、ENO2、NPY、SPR、TRY1、GLUTB、PND、CKB、IGHE、ELA1、MYC、PERF、ACPH、APOC3、THY1、CRYG、ABP、GH、NGFR、CSPMO2、TKG、MDH2、PLNAH、LCA、AFP、CSNA、IGFBP), 16~19 染色体上的 12 个位点(MBPA、ACRM、PRL、RPL35P、ADRB2、GJA1、TILP、TTR、HP、UCP、TAT、TNF), 总计 70 个位点,全部参考相关文献^[17,18]。微卫星引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2.2 样本 DNA 的制备 取 95% 乙醇固定样品,用灭菌 ddH₂O 清洗样品表面 3 次,然后用滤纸吸干表面水分。取肌肉组织 150~200 mg,采用经典酚氯仿法抽提基因组 DNA^[19]。利用紫外分光光度计测定样品浓度和纯度,4℃保存。

1.2.3 PCR 扩增及检测 各个引物所需的 buffer 浓度以及退火温度不同,根据引物的需要,把 buffer 分为含 Mg²⁺ 1 mmol/L、1.5 mmol/L、2.0 mmol/L 3 个梯度。退火温度设为 8 个梯度,然后按以下体系和程序进行扩增。

PCR 反应体系为 25 μl: 10×buffer (分为含 Mg²⁺ 1 mmol/L、1.5 mmol/L 和含 2 mmol/L 3 种) 2.5 μl、dNTP 1.5 μl(2.5 μmol/L)、上游和下游引物各 0.4 μl(10 μmol/L)、样品 DNA 1 μl(40 ng)、*Taq* 酶 0.2 μl(5 U/μl),加水补足。

扩增程序为: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 退火温度 50~60℃(根据各引物 *T_m* 值,分别设为 8 个梯度,由 PCR 一次性设定完成) 35 s, 72℃延伸 40 s, 35 个循环; 72℃延伸 10 min。

用所选取的 70 对微卫星引物先分别对社鼠的混合 DNA 进行扩增(随机抽取 10 只社鼠样本的 DNA,相互混合制备社鼠基因组 DNA 池),扩增产物经过 1% 的琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,观察所有的微卫星引物对社鼠的混合 DNA 扩增结果。选取在琼脂糖凝胶电泳上有

清晰扩增条带的引物, 分别对 214 只社鼠的 DNA 进行扩增, 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 银染, 拍照, 观察。DNA 条带泳动距离一致的即表现为单态性, 若有差异即为多态性。通过 BandScan 5.0 软件对凝胶电泳图进行泳道校正、数据提取, 然后用凝胶分析软件 Gel-Pro 4.5 分析并统计目的条带长度及其他相关信息。

2 结 果

2.1 DNA 电泳结果 经紫外可见分光光度计检测, 从 95% 乙醇保存的社鼠肌肉组织提取的 DNA 260 nm/280 nm OD 值为 1.7~1.8, 所提取的 DNA 纯度较好。电泳结束后在点样孔附近都有单一的高分子量条带 (图 1)。

2.2 琼脂糖凝胶电泳 70 个微卫星位点中扩增产物可见 1~2 条清晰条带的位点, 或者有多条带但仅 1 条或 2 条是非常明显主带的位

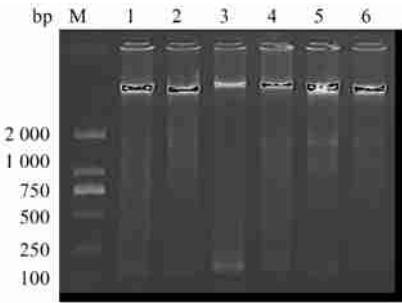


图 1 部分社鼠肌肉组织 DNA 电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from *Niventer confucianus* muscle

M: DL2000 DNA 分子量标准; 1~6 为动物编号。
M: DL2000 DNA marker; 1~6. Animal numbers.

点, 共有 40 个。对筛选到的 40 个微卫星位点进行 PCR 反应条件的再次优化, 最终确定重复性较好、稳定性高的微卫星位点 21 个(其中, 小鼠的 8 个, 大鼠的 13 个, 见表 1)。图 2 为 PKC 位点引物扩增结果。

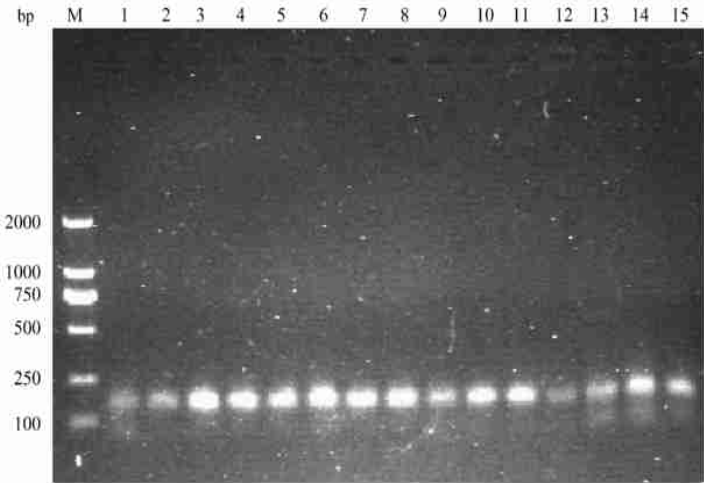


图 2 PKC 位点引物在社鼠基因组 DNA 中扩增图谱

Fig. 2 Profile of agarose gel electrophoresis for PCR product of primer PKC in *Niventer confucianus* genomic DNA

M: DL2000 DNA 分子量标准; 1~15 为动物编号。
M: DL2000 DNA marker; 1~15. Animal numbers.

2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳 选取稳定扩增的 21 个微卫星位点引物, 分别对 214 只社鼠基因组 DNA 一一扩增, 进行基因分型检测。发现 21 个位点中, 有 15 个杂合位点, 6 个单态性位点, 13 个位点具有多态性(小鼠 4 个, 大鼠 9 个)。在具有多态性的基因座中, 除位点 APOC3 外,

其他位点的等位基因数均大于 5, 表现出高多态性, 但同时也不可避免的有影子带(stutter bands)出现(图 3)。PCR 扩增的 Mg^{2+} 浓度主要为 1.5 及 2.0 mmol/L, 退火温度在 50~60℃ 之间不等, 具体结果见表 1。

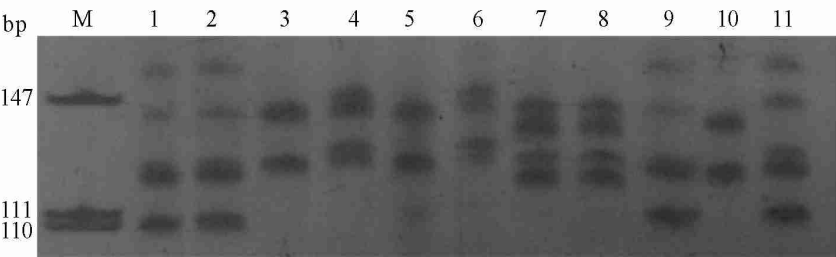


图3 微卫星位点 TNF 变性聚丙烯酰胺凝胶扩增结果

Fig. 3 Profile of denatured polyacrylamide gel electrophoresis for PCR product of primer TNF

M: pUC19 DNA/ MSPI 分子量标准; 1~ 11 为动物编号。
M: pUC19 DNA/ MSPI Marker; 1- 11 Animal numbers.

表 1 21 个微卫星引物在社鼠基因组 DNA 中的扩增结果

Table 1 PCR results of 21 microsatellites in the *Niviventer confucianus* genomic DNA

座位 Locus	杂合性/ 纯合性 Homozygosity and heterozygosity	等位 基因数 Number of alleles	退火温度 Recovering temperature ($^{\circ}\text{C}$)	扩增片段 长度(bp) Length of fragment s
ADRB2	杂合	7	58	84~ 126
APOC3	杂合	4	52	90~ 124
ACPH	纯合	1	54	81
CAT	杂合	13	56	143~ 197
D2Nds3	杂合	5	56	143~ 163
D1Mit365	纯合	1	53	64
D8Mit4	纯合	1	56	173
D9Mit23	杂合	13	54	219~ 303
D14Mit5	杂合	14	52	172~ 232
D11Mit2	杂合	2	56	54, 65
D11Mit128	杂合	2	53 7	76, 104
D15Mit5	杂合	10	52	125~ 179
GLUTB	杂合	12	52	128~ 178
IGFBBP	杂合	10	56 5	138~ 178
LCA	杂合	10	56	148~ 176
NPY	纯合	1	59	128
PKC	杂合	14	58	130~ 176
PKL	纯合	1	55	109
PLNAH	纯合	1	59	133
THY1	杂合	12	52	166~ 228
TNF	杂合	10	59 5	111~ 149

3 讨 论

由于微卫星标记具有种族特异性, 必须采用特异引物进行 PCR 检测, 因而存在引物开发

的问题^[20]。传统获取微卫星位点的方法通常需要建立、筛选基因组文库, 克隆测序以及扩增引物等一系列费时费力的实验室工作, 并且因扩增引物不同使实验结果产生较大的差异^[21]。采用什么样的方法开发分离微卫星引物, 做到节约费用、省时高效, 是现在多数学者普遍关心的问题。随着微卫星侧翼保守序列在哺乳动物基因组中的发现^[22], 微卫星引物在同一属、科、目不同种之间具有保守性的特点也被发现, 即同属、科、目的不同物种可以使用一种引物扩增微卫星。该方法一经提出, 便被广泛应用^[23~ 25]。Arevalo 等^[26]将山羊(*Capra hircas*)中发现的 10 个引物在牛科 8 个其他属的 11 种动物中扩增, 发现所有位点中都有多态性; Rico 等^[27]报道, 有 17 个微卫星位点能够在 4 亿年前就分离的鱼类之间转移扩增; 蔡清秀等^[28]也从已知的非洲象(*Loxodonta africana*) 31 个微卫星位点和 5 个亚洲象(*Elephas maximus*) 微卫星位点中筛选到 14 个能在勐养的亚洲象肌肉 DNA 中进行扩增的位点, 且经测序证实为微卫星序列。

本实验通过对社鼠近缘动物大、小鼠中已知的微卫星位点引物进行扩增发现, 大、小鼠微卫星引物可在社鼠基因组 DNA 中扩增出一定的有效图带。其中, 设计合成的 70 个大、小鼠微卫星位点引物的扩增产物在琼脂糖凝胶电泳时有 40 个位点出现扩增图带, 21 个位点能够稳定扩增; 将这些稳定扩增位点引物对所有的

社鼠个体分别扩增,进行聚丙烯酰胺电泳、基因分型后,最终筛选到 13 个高多态性的微卫星位点。这些在社鼠中高度多态性的微卫星位点分布于大、小鼠不同的染色体或连锁群中,虽然部分扩增产物中有影子带的存在,但并不影响等位基因的判读^[29]。Murray 等^[30]认为影子带的产生机理可能是扩增中 DNA 链在复制时滑动误配所致,加之聚丙烯酰胺凝胶分辨率较高,是不可避免的,可见扩增效果是相当成功的,所给的数据也具有一定的代表性。

利用大、小鼠微卫星引物对社鼠基因组 DNA 进行跨种扩增,两者跨种扩增成功的几率相差不大,其中从小鼠中筛选到多态性位点几率为 20%,而从大鼠中筛选到多态性位点几率为 18%。可见,科以内的亲缘关系对近缘物种通用微卫星引物的筛选影响不大;社鼠微卫星位点跨种扩增的同源率达到 30%,高于长爪沙鼠(*Meriones unguiculatus*)跨种扩增的同源率(13%)^[31],与亚洲象微卫星位点(29.03%)筛选结果相当^[28],明显低于鸟类 82.05%的跨种扩增同源率^[32],可见微卫星跨种扩增的成功率有不确定性。但是这种方法简单、方便,并且对实验室的技术设备要求也不高,多数实验室都能够完成,因此,仍不失为一种社鼠微卫星筛选的有效方法。

以上研究结果也说明,研究某一缺乏相应微卫星标记的物种时,利用微卫星侧翼序列的保守性开展微卫星标记种间扩增,不失为一种快速有效的方法,对于群体遗传学的研究也具有一定的指导意义。

参 考 文 献

- [1] Sun Z N, Liu P, Li J, *et al.* Construction of a genetic linkage map in *Fenneropenaeus chinensis* (Osbeck) using RAPD and SSR markers. *Hydrobiologia*, 2008, **596**: 133~ 141.
- [2] Gong L, Stift G, Kofler R, *et al.* Microsatellites for the genus *Cucurbita* and an SSR-based genetic linkage map of *Cucurbita pepo* L. *Theor Appl Genet*, 2008, **117**: 37~ 48.
- [3] Woodhead M, McCallum S, Smith K, *et al.* Identification, characterisation and mapping of simple sequence repeat (SSR) markers from raspberry root and bud ESTs. *Mol Breeding*, 2008, **22**: 555~ 563.
- [4] Borner A, Roder M S, Unger O, *et al.* The detection and molecular mapping of a major gene for non-specific adult plant disease resistance against stripe rust (*Puccinia striiformis*) in wheat. *Theor Appl Genet*, 2000, **100**: 1 217~ 1 224.
- [5] Fukino N, Ohara T, Antonio J, *et al.* Identification of QTLs for resistance to powdery mildew and SSR markers diagnostic for powdery mildew resistance genes in melon (*Cucumis melo* L.). *Theor Appl Genet*, 2008, **118**: 165~ 175.
- [6] Narasimhamoorthy B, Saha M C, Swaller T, *et al.* Genetic diversity in Switchgrass collections assessed by EST-SSR markers. *Bioenerg Res*, 2008, **1**(2): 136~ 146.
- [7] 鲍毅新. 社鼠的研究概要. 浙江师范大学学报, 1993, **16**(2): 50~ 54.
- [8] 柳燕, 吴松榆, 王俊等. 安徽省大别山区肾综合征出血热微小疫源地调查及分析. 安徽预防医学杂志, 2003, **9**(5): 272~ 276.
- [9] 邓先余, 冯庆, 王应祥. 西南地区社鼠的亚种分化兼二新亚种描述. 动物学研究, 2000, **21**(5): 375~ 382.
- [10] 鲍毅新, 杜卫国, 林治等. 环境温度对社鼠能量需求和食物同化的影响. 动物学报, 2001, **47**(5): 597~ 600.
- [11] 郑荣泉, 鲍毅新, 周慧娣等. 光周期对社鼠能量摄入的影响. 动物学报, 2003, **49**(4): 525~ 528.
- [12] 杜卫国, 鲍毅新. 社鼠和褐家鼠消化道长度和重量的季节变化. 动物学报, 2000, **46**(3): 271~ 277.
- [13] 张美文, 王勇, 李波等. 洞庭湖区社鼠消化道长度和质量的季节变化. 生态学杂志, 2007, **26**(1): 61~ 66.
- [14] 路纪琪, 张知彬. 围栏条件下社鼠的食物贮藏行为. 兽类学报, 2005, **25**(3): 248~ 253.
- [15] 姜仕仁, 丁平. 实验条件下社鼠个体相遇时的叫声特征. 动物学研究, 2006, **27**(1): 12~ 17.
- [16] 张美文, 黄璜, 王勇等. 洞庭湖区社鼠的繁殖生态. 生态学报, 2006, **26**(3): 884~ 894.
- [17] Senikawa T, Kuramoto T, Hilbert P, *et al.* Rat gene mapping using PCR-analyzed microsatellites. *Genetics*, 1992, **131**(3): 701~ 721.
- [18] Jacob H J, Brown D M, Bunker R K, *et al.* A genetic linkage map of the laboratory rat, *Rattus norvegicus*. *Nat Genet*, 1995, **9**(1): 63~ 69.
- [19] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T 编著(金冬雁, 黎孟枫译). 分子克隆实验指南(第 2 版). 北京: 科学出版社, 1999.
- [20] 李明芳, 郑学勤. 开发 SSR 引物方法之研究动态. 遗传, 2004, **26**(5): 769~ 776.
- [21] Ujino T, Kawahara T, Tsumura Y, *et al.* Development and polymorphism of simple sequence repeat DNA markers for *Shorea curtisi* and other Dipterocarpaceae species. *Heredity*,

- 1998, **81**: 422~ 428.
- [22] Moore S S, Sergeant L L, King T J, *et al.* The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics*, 1991, **10**: 654~ 660.
- [23] Hancock J M. Simple sequences and the expanding genome. *Bioessays*, 1996, **18**: 421~ 425.
- [24] De Gortari M J, Freking B A, Cuthbertson R P, *et al.* A second generation linkage map of the sheep genome. *Mamm Genome*, 1998, **9**(3): 204~ 209.
- [25] 包文斌, 陈国宏, 束婧婷等. 孔雀微卫星引物筛选及其遗传多样性分析. *遗传*, 2006, **28**(10): 1 242~ 1 246.
- [26] Arevalo E, Holder D A, Derr J N, *et al.* Caprine microsatellite dinucleotide repeat polymorphisms at the SR-CRSP 1, SR-CRSP 2, SR-CRSP 3, SR-CRSP 4 and SR-CRSP 5 loci. *Anim Genet*, 1994, **25**(3): 202~ 205.
- [27] Rico C, Rico I, Hewitt G. 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1996, **263**: 549~ 557.
- [28] 蔡清秀, 林柳, 潘文婧等. 勐养保护区亚洲象微卫星位点筛选及种群遗传多样性分析. *兽类学报*, 2008, **28**(2): 126~ 134.
- [29] 刘丽, 刘楚吾, 郭昱嵩等. 青石斑鱼微卫星 DNA 标记的筛选及群体遗传多样性分析. *中国水产科学*, 2008, **15**(1): 22~ 29.
- [30] Murray V, Chutima M, England P R. The determinations of the sequences present in the shadow bands of a dinucleotide repeat PCR. *Molecular Biology*, 1993, **21**(10): 2 395~ 2 398.
- [31] 赵太云, 路静, 王钜等. 大、小鼠微卫星引物对长爪沙鼠的扩增. *中国比较医学杂志*, 2006, **16**(2): 114~ 117.
- [32] Primer C R, Moller A P, Ellegren H. A wide range survey of cross species microsatellite amplification in birds. *Mol Ecol*, 1996, **5**: 365~ 378.

著名生物学家、教育家贝时璋院士逝世

中国共产党党员、著名生物学家和教育家、中国科学院最年长的院士、中国科学院生物物理研究所名誉所长、中国生物物理学学会名誉理事长、中国动物学会创始人之一、中国动物学会第十届理事会理事长贝时璋院士, 2009 年 10 月 29 日在北京辞世, 享年 107 岁。

贝时璋院士是国际知名的生物学家, 创立了“细胞重建学说”; 也是我国生物物理学的奠基人, 创建了中国科学院生物物理研究所。他高瞻远瞩、勇于开拓创新, 努力推动新型边缘学科的发展、交叉、渗透和融合。

中国动物学会于 1934 年 8 月在江西庐山成立时, 贝时璋先生作为 17 名代表中的一员参加了会议。贝时璋院士曾任中国动物学会第四、六、七届理事会理事, 第十届理事会理事长, 曾于 1953 年任《动物学报》编委会主任。他作为科技战线上的领导者和组织者, 为我国生物学的发展、中国动物学会的创建和发展倾注了大量心血, 做出了卓越贡献。贝时璋院士德高望众, 是众多生物学科科技工作者的恩师和楷模, 他将毕生精力献给了生命科学研究事业, 并以渊博的学识和严谨的治学态度培养了大批人才, 桃李满天下, 堪称一代宗师。

贝时璋院士品德高尚、淡泊名利、严以律己、宽以待人、谦虚谨慎, 他的优良品德永远是我们学习的榜样。

贝时璋院士的逝世, 是我国科技界的一大损失, 使我们失去了一位德高望重的老前辈、一位良师益友, 我们将永远怀念他。