



滇西亚种树鼩微卫星分子标记的筛选

张媛, 李晓飞, 李振宇, 仝品芬, 陈玲霞, 尹博文, 代解杰

(中国医学科学院/北京协和医学院 医学生物学研究所树鼩种质资源中心, 昆明 650118)

【摘要】 目的 筛选出适用于滇西亚种树鼩种群遗传质量控制的特异性微卫星分子标记。方法 首先从树鼩全基因组序列中筛选出约 700 个微卫星位点, 择优选出约 100 个位点设计引物, 去除有不良因素的, 最后保留 33 对和文献报道的 13 对引物对滇西亚种树鼩 DNA 进行 PCR 扩增, 根据琼脂糖电泳和聚丙烯酰胺电泳结果筛选保留, 进行 STR 扫描再次筛选适于树鼩遗传检测的微卫星位点组合。**结果** 筛选出树鼩微卫星位点 22 个, STR 基因扫描有明显 Stutter 峰。比较备选位点和最终筛选出的位点, 普通树鼩位点中选取 5 个, 2 个可用, 与滇西亚种的重合率是 40%; 印度小树鼩位点中选取 5 个, 2 个可用, 重合率是 40%; 中缅树鼩的位点中选取 3 个, 2 个可用, 重合率约 70%。**结论** 筛选出的 22 个微卫星位点适用于滇西亚种树鼩的遗传检测, 为树鼩种群的遗传质量监测提供科学依据。

【关键词】 滇西亚种树鼩; 微卫星分子标记; STR 扫描

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 06-0036-06

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.006.008

Isolation and characterization of microsatellite markers in *Tupaia belangeri chinensis*

ZHANG Yuan, LI Xiao-fei, LI Zhen-yu, TONG Pin-fen, CHEN Ling-xia, YIN Bo-wen, DAI Jie-jie
(Center of Tree Shrews Germplasm Resources, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Kunming 650118, China)

【Abstract】 Objective To screen out specific microsatellite markers for use in *Tupaia belangeri chinensis* genetic testing. **Methods** Firstly to screen about 700 microsatellite loci from whole genome. Secondly to choose about 100 better loci without defect factors. Lastly 46 primers were designed by 33 tree shrew's microsatellite loci obtained from whole genome and other references. Agarose gel electrophoresis and polyacrylamide gel electrophoresis were used for PCR products, and better loci based on electrophoresis results were chosen. Then STR scan was used to select the microsatellite loci combination for genetic testing. **Results** Twenty-two microsatellite loci were selected with a significant Stutter peak on STR scanning. Comparing the alternative loci and ultimately selected loci, there were two loci available in the five alternative loci of *T. glis*. The coincidence rate between *T. glis* and *T. b. chinensis* was 40%. There were two loci available in the five alternative loci of *T. minor*, and the coincidence rate between *T. minor* and *T. b. chinensis* was 40%. There were two loci available in the three alternative loci of *T. belangeri*, and the coincidence rate between *T. belangeri* and *T. b. chinensis* was about 70%. **Conclusions** The 22 microsatellite loci screened in this study are well applied for genetic

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2014BAI01B01); 云南省科技创新平台建设(2013DA002)。

[作者简介] 张媛(1988-), 女, 硕士, 研究方向: 实验动物遗传质量控制。E-mail: zyuan5788@163.com。

[通讯作者] 代解杰, 男, 研究员, 课题负责人, E-mail: dj@imbcams.com.cn。

testing of *Tupaia belangeri chinensis*, therefore, provide a scientific basis for the genetic quality monitoring of tree shrews.

【Key words】 *Tupaia belangeri chinensis*; Microsatellite maker; STR loci gene scan; Genetic quality monitoring

树鼩, 攀鼩目动物^[1]。线粒体 DNA 分析结果倾向于树鼩与兔形目动物亲缘关系最近^[2-5], 基因序列数据分析结果和系统发育关系显示树鼩与灵长类的亲缘关系最近^[6,7]。可见树鼩与人类的亲缘关系要高于广泛应用于生物、医药物研究的非灵长动物。20 世纪 80 年代以来树鼩被广泛应用于人类病毒感染的动物模型研究, 多种人类病毒都可以感染树鼩^[8-10]。世界卫生组织 (WHO) 曾建议用树鼩代替大型灵长类动物进行科学实验^[11]。树鼩作为新兴实验动物资源具有很大的潜在价值。

实验动物的遗传质量决定着实验的可重复性、稳定性, 所以遗传质量控制是实验用树鼩标准化的重要部分。目前国际上使用最多的实验用树鼩是滇西亚种, 被用于建立各种疾病模型, 但其遗传质量控制存在着问题, 实验用树鼩多来自于野生型, 由于尚未建立标准有效的遗传检测方法, 实验用树鼩的遗传背景不清晰, 遗传质量不能保证, 直接导致了实验结果的重复性和稳定性降低, 因此迫切需求遗传质量控制标准。黎家敏等曾建立树鼩 RAPD 遗传标记分析方法, 筛选出 20 条可以用于树鼩群体遗传分析的引物^[12]。但由于 RAPD 本身的技术局限, 其遗传多样性检出水平低、检测方法不够稳定, 该方法已逐渐被新技术取代。目前, 被广泛使用的遗传多样性检测技术包括了微卫星多态性分析等技术。但是, 已报道的树鼩微卫星位点很少, 6 个普通树鼩 (*T. glis*) 位点, 7 个印度小树鼩 (*T. minor*), 14 个中缅树鼩位点其中的 2 个位点不存在多态性^[13-15], 针对于滇西亚种的特异性位点很匮乏仅有 14 个, 且部分位点有非特异性扩增条带^[16]。必须寻找到更多的特异性微卫星分子标记, 丰富树鼩的遗传信息, 建立滇西亚种树鼩的遗传检测标准, 为实验用树鼩的种群建立、遗传质量控制提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

动物: 所用树鼩均来源于医学生物学研究所树鼩种质中心饲养的 P₀ 代滇西亚种树鼩 (生产许可证号: SCXK(滇) K2013-0001), 共抽取 30 只, 其中雌

性、雄性各占一半, 分别对 30 只树鼩尾静脉采血各 0.3 mL, 用血液基因组 DNA 提取试剂盒 (天根 DP318-02) 提取 DNA 样本, Nanodrop-1000 测定质量和浓度, 将 30 份样本 4℃ 保存备用。

1.2 方法

1.2.1 位点和引物的筛选: 从 NCBI 中下载树鼩全基因组序列片段, 使用 SSR Hunter 软件设定单元碱基个数最大值为 5, 单元重复次数最小值为 15 进行微卫星筛选, 选出了约 700 个位点, 从中择优选出重复次数大于 30 次、单元碱基 2~5 个的位点约 100 个, 然后使用 Primer 5.0 软件设计引物, 设计过程中将含有发卡结构、错配、引物二聚体等不良影响因素较多的位点剔除, 最后保留 33 对引物作为初筛备选位点, 编号 1~33。连同从文献中选取的另外 13 对非滇西亚种树鼩的引物共 46 对引物交由 TaKaRa 公司合成。

1.2.2 梯度 PCR 扩增和产物检测: 使用 TaKaRa 公司 PCR 试剂盒 (R011) 做温度梯度 PCR, PCR 反应总体系为 25 μL, 10 × PCR buffer 2.5 μL, dNTP 2 μL, 上游引物 (25 pmol/μL) 0.2 μL, 下游引物 (25 pmol/μL) 0.2 μL, Taq 酶 0.25 μL, DNA 模板 1 μL, 灭菌双蒸水 18.85 μL, PCR 反应条件: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 35 s, 退火 40 s (退火温度 50℃~56℃), 72℃ 延伸 40 s, 30 个循环, 72℃ 充分延伸 5 min。

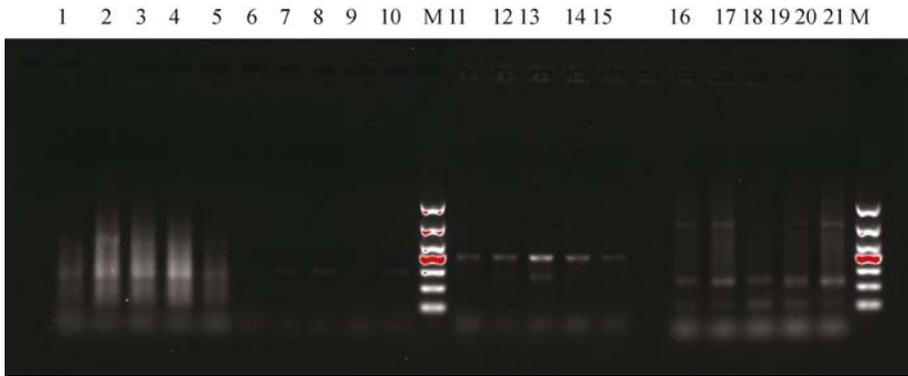
2 结果

2.1 电泳

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳 (图 1), 选取条带明亮清晰的再进行 12% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳后银染显色 (图 2), 剔除扩增后无产物、产物特异性差的位点, 保留条带清晰、特异性强的微卫星位点共 29 个, 同时通过引物在不同退火温度的产物电泳图的比较确定各引物的合适退火温度。

2.2 STR 扫描

STR 扫描结果: 有 22 个位点可见典型的 Stutter 峰, 如图 3 (图 3 为位点 TBC26 的 STR 扫描图)。将筛选保留的新位点编号 TBC15~TBC30。22 个位点的引物和退火温度等见表 1。

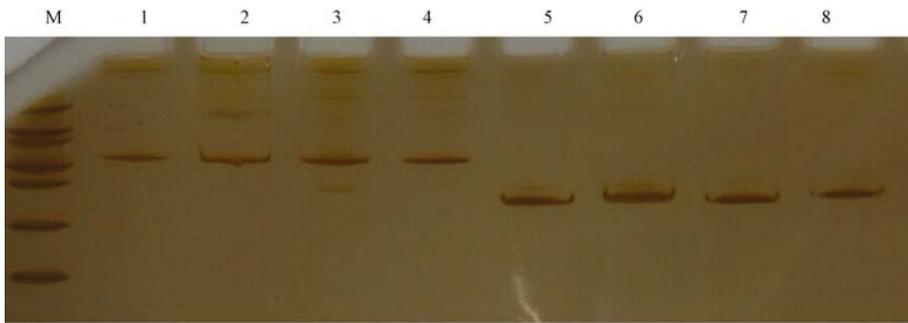


M; DL1000 marker; 1~5 为初筛备选位点 4,6~10 为 TBC17, 11~15 为 TBC18, 16~21 为初筛备选位点 7

图 1 引物初筛备选位点 4、5、TBC6、TBC7 在树鼩基因中扩增后产物的琼脂糖电泳

Note. M; DL1000 marker; 1-5; alternative loci 4, 6-10; TBC17; 11-15; TBC18; 16-21; Alternative locus 7

Fig. 1 The results of gel electrophoresis showing amplified products with the alternative loci 4, 5, TBC6, TBC7 of primers for microsatellites in the tree shrew



M; DL1000 marker; 1~4 为 TBC19, 5~8 为 TBC20

图 2 引物 TBC19、TBC20 在树鼩基因中扩增后聚丙烯酰胺电泳

Note. M; DL1000 marker; 1-4; TBC19; 5-8; TBC20

Fig. 2 The results of PAGE electrophoregram showing amplified products with the TBC19 and TBC20 of primers for microsatellites in the tree shrew

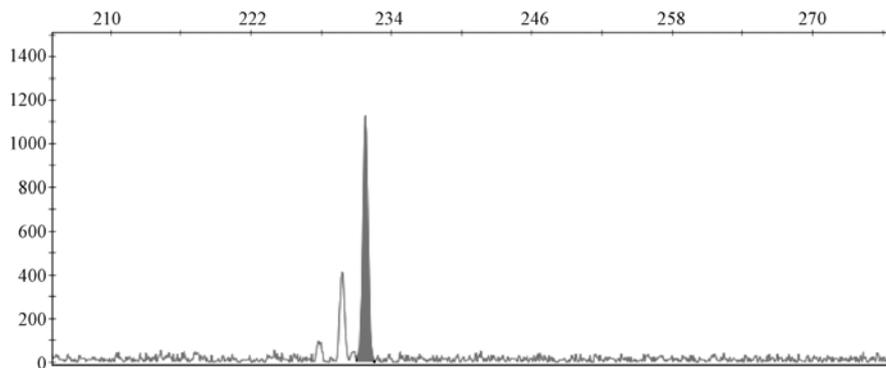


图 3 引物 TBC26 在树鼩基因中扩增后 STR 基因扫描图

Fig. 3 The results of STR Genescan showing amplified products with the primer TBC26 for microsatellites in the tree shrew

表 1 STR 分子标记引物序列
Tab. 1 Microsatellite markers and their primers

位点 Loci	引物序列 (5' - 3') Primer sequence	复性温度 Annealing temperature	重复单元 Repeat element	镁离子浓度 Mg ²⁺ (mM)
TBC15	F: TGGAAATAACAGCCACAA R: ACCTGCCCCAGTAATAAG	52℃	-	1.5
TBC16	F: CCATCCTGACTACTGCTTAC R: AGGGCTACTTTATAGGTTTC	51℃	-	1.5
TBC17	F: AGCAGATAATAACAAACA R: TAAACTGTAAAGGAAAGA	52℃	(AC) _n	1.5
TBC18	F: TTTTGGTATGGATCTCCT R: AGTCAAATCAACAGCCTTC	52℃	(TTAT) _n	1.5
TBC19	F: AGGGAACCAAATGAACAA R: GTCACCGAAGTCACAACC	53℃	(AC) _n	1.5
TBC 20	F: TTAAATTTGACCAGACAC R: TGGCAATATGACATAGAC	53℃	(GA) _n	1.5
TBC21	F: AGGAAAAGGGACTTACTG R: TTGGGAATCAAATGACTATA	52℃	(CA) _n	1.5
TBC 22	F: TGGCTTATCCTACTGGTC R: CTTGTAGTTGCTGCTTT	51℃	(AC) _n	1.5
TBC23	F: GCTTTGTCACTTTCTTCCTA R: TGGCTCGTGGCTATTTT	53℃	(GA) _n	1.5
TBC24	F: TGGAAATAACAGCCACAA R: ACCTGCCCCAGTAATAAG	53℃	(TTC) _n	1.5
TBC25	F: TGTCTCCCTGGTCATATT R: GTGCTCTTCTCAGCGTTT	54℃	(AAGG) _n	1.5
TBC26	F: CATCCCTGAATCCAAGCC R: CACCAGCAAGGTAAGTCC	53℃	(CA) _n	1.5
TBC27	F: GTTAAGGCACTGGACATT R: CTGAACCCACAAATAATCTA	55℃	(TC) _n	1.5
TBC28	F: TGGGCTGGAATACATAA R: GCTGTGAGACCCTGTTGG	54℃	(TG) _n	1.5
TBC29	F: CAAATCAAAATGAGCCAAAA R: TCGGGACTCAAACCTGTGG	53℃	-	1.5
TBC30	F: AGCCTGGGCTGGAATAC R: GCTGTGAGACCCTGTTGG	53℃	-	1.5
TB1	F: ATCAGAATCTGGTTTCAAAGGT R: GCACACCATGATGTAGCTGT	56℃	(AAGAAA) _n	1.5
TB6	F: AGACAGAATGCAAGAAATCAC R: ATGTGCAATGTAATAGTTCCAG	56℃	(AAAAC) _n	1.5
TG4	F: TGAAAACCTGGCAATTCATATGC R: CAATCCTTTTTCGTTAGTTTTGTG	52℃	(CA) _n	1.5
TG22	F: GTGAGTGCCTTGGCCCTGTA R: TCCTGAACCTGGTGGCTAAC	55℃	(CA) _n	1.5
JS188	F: ACACACACAAAACCTATTTTATCC R: TCTACACGAATGTGCCAAC	57℃	(CA) _n	1.5
SKTg22	F: GAGTGCCTTGGCCCTGTAAC R: TCCTGAACCTGGTGGCTAAC	57℃	(CA) _n	1.5

3 讨论

微卫星技术是近二十年来发展起来的一种新的分子标记,它是几个核苷酸(1~6个)为单位多次重复的简单序列,相对于限制性酶切片长度

多态性和随机扩增多态性等分子标记,微卫星分子标记具有数量多、在真核生物的基因组中分布广泛且均匀、多态信息含量高、共显性遗传、检测快速以及适合自动化分析等优点,适合于封闭群动物较多检测样本、较多检测位点的需求。微卫星标记应用

于实验动物的遗传检测已被证明具有独特优势和良好前景^[17,18]。我们筛选的 22 个位点可以为建立树鼩封闭群提供依据,可以对封闭群繁殖四代以上的树鼩种群,使用微卫星标记扩增检测,计算每世代的有效等位基因数(N_e)、观察杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、遗传分化指数(F_{ST})等,评估种群各个世代的遗传关系,当各世代之间的上述遗传信息两两比较均差异无显著性($P > 0.05$),种群合格,或是检验种群是否达到哈迪—温伯格平衡,若达到即为合格封闭群,若未达到则说明仍有基因频率的变化,不能达到封闭群的要求。

STR 基因扫描技术比琼脂糖凝胶电泳、聚丙烯酰胺电泳技术结果更加准确客观,可以检测到微小片段差异,相对于以电泳技术确定等位基因数,STR 基因扫描可以得到更准确的等位基因数。

树鼩相关遗传研究较少,没有建立有效的遗传检测方法极大的限制了它的应用。微卫星标记具有种属差异性,必须采用特异的引物进行 PCR 检测,因而存在特异位点引物筛选的问题。找到更多的微卫星分子标记是建立遗传质量检测标准的需要,据所查阅到的文献显示,目前有关于树鼩的微卫星分子标记仅有约 40 个,其中部分并不属于滇西亚种树鼩,如:普通树鼩(*T. glis*)6 个位点,印度小树鼩(*T. minor*)7 个位点等^[13-16]。表 1 中的 22 个位点,TBC15 ~ TBC30 是从树鼩全基因组序列中筛选出的全新滇西亚种特异位点,另外的 6 个位点则筛选于文献报道的其他品种树鼩位点。微卫星位点初级筛选时我们选取了其他品种树鼩(包括普通树鼩、印度小树鼩、中缅树鼩等)13 个位点对滇西亚种树鼩进行扩增,我们的研究表明:普通树鼩选取的 5 个位点,有 2 个位点有清晰条带,3 个位点扩增效果差,与滇西亚种的重合率是 40%;印度小树鼩选取的 5 个位点,有 2 个位点有清晰条带,3 个位点扩增效果差,与滇西亚种的重合率是 40%;中缅树鼩选取的 3 个位点,2 个位点有清晰条带,1 个位点扩增效果差,与滇西亚种的重合率约 70%,由此推测不同种树鼩之间存在着基因差异,微卫星位点并不完全通用,位点重合率的高低也较符合几种树鼩间地域隔离的特点,较远的重合率低,较近的重合率高,证明了扩增结果的准确性。实验中所筛选出的 22 个新位点在电泳后均出现清晰、特异性强的条带,如图 1 中的 TBC17 和 TBC18 等,而条带模糊拖带的初筛备选位点 4、7 等位点则被认为特异性

差而剔除,STR 基因扫描更精准确定了所选位点是特异的 STR 位点。相对于以前筛出的 14 个滇西亚种 STR 位点会出现拖带、非特异扩增的缺点,本次所筛选的 22 个位点更适合用于滇西亚种树鼩的遗传质量检测,筛选出的新位点同样可以应用于遗传图谱构建、遗传多样性评估、QTL 定位等更深一步的遗传研究。

参考文献:

- [1] 郑永唐,姚永刚,徐林. 树鼩基础生物学与疾病模型 [M]. 昆明:云南科技出版社. 2014: 4.
- [2] Arnason U, Gullberg A, Janke A. The mitochondrial DNA molecule of the *aardvark*, *Orycteropus afer*, and the position of the Tubulidentata in the eutherian tree [J]. Proc Biol Sci, 1999, 266(1417): 339-345.
- [3] Schmitz J, Ohme M, Zischler H. The complete mitochondrial genome of *Tupaia belangeri* and the phylogenetic affiliation of Scandentia to other eutherian orders [J]. Mol Phyl Evol, 2000, 17(9): 1334-1343.
- [4] Xu L, chen SY, Nie WH, et al. Evaluating the phylogenetic position of Chinese tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) based on complete mitochondrial genome: implication for using tree shrew as an alternative experimental animal to primate in biomedical research [J]. J Genet Genomics, 2012, 39(3): 131-137.
- [5] Adkins RM, Honeycutt RL. Molecular phylogeny of the superorder Archonta [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(22): 10317-10321.
- [6] Lindblad-Toh K, Garber M, Zuk O, et al. A high-resolution map of human evolutionary constraint using 29 mammals [J]. Nature, 2011, 478(7370): 476-482.
- [7] Fan Y, Huang ZY, Cao CC, et al. Genome of the Chinese tree shrew [J]. Nat Commun, 2013, 4:1426.
- [8] Amako Y, Tsukiyama-Kohara K, Katsume A, et al. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri* [J]. J Virol, 2010, 84(1): 303-311.
- [9] Zhang L, Ben KL. In vitro infection of tree shrew immunocytes with human immunodeficiency virus type 1 [J]. Zool Res, 2001, 22: 33-40.
- [10] Yang EB, Cao J, Su JJ, et al. The tree shrews: useful animal models for the viral hepatitis and hepatocellular carcinoma [J]. Hepatogastroenterology, 2005, 52(62): 613-616.
- [11] 杨芳,何保丽,何永蜀,等. 树鼩生化与微卫星标记的初步研究 [J]. 昆明医学院学报, 2010, 5: 8-11.
- [12] 黎家敏,李海燕,李婧潇,等. 应用 RAPD 标记技术对树鼩遗传多样性的分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(2): 34-40.
- [13] Srikwan S, Hufford K, Lori Eggert L, et al. Variable microsatellite markers for genotyping tree shrews, *Tupaia*, and their potential use in genetic studies of fragmented populations

- [J]. ScienceAsia, 2002, 28: 93 - 97.
- [14] Munshi-south J, Wilkinson GS. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in Bornean tree shrews (*Tupaia spp.*) [J]. Molec Ecol Notes, 2006, 6(3): 698 - 699.
- [15] Liu XH, YAO YG. Characterization of 12 polymorphic microsatellite markers in the Chinese tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) [J]. Zool Res, 2013, 34(2): 62 - 68.
- [16] 李婧潇, 王新兴, 王文广, 等. 中緬树鼯微卫星分子标记的筛选 [J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(4): 312 - 315.
- [17] Basta PV, Whitmore SP, Basham KB, et al. Microsatellite analysis in FVB/ N mice [J]. Comp Med, 2004, 54(5): 524 - 527.
- [18] Katoh H, Yoshino S, Inui Y, et al. Microsatellite genotyping for genetic quality testing using sperm cells in the mouse [J]. Exp Animals, 2005, 54(4): 373 - 376.
- [修回日期] 2015-04-22

《中国比较医学杂志》约稿 欢迎踊跃投稿

《中国比较医学杂志》是中国实验动物学会和中国医学科学院医学实验动物研究所共同主办的全国性学术刊物(月刊),主要刊载实验动物与动物实验等生命科学各分支学科,比较医学成果和进展。本刊开设研究报告,综述与专论,研究快报,技术方法,经验交流,管理科学,国外研究进展,学术信息,简讯等。

1 文稿内容要具有创新性、科学性和实用性,论点明确,资料可靠,文字通顺精练,标点符号准确,用词规范,图表清晰。

2 来稿须附第一作者主管单位正式介绍信,作者单位应对稿件内容的真实性负责,声明无署名纠纷,无一稿两投或多投。

3 请登录(<http://zgswydw.alljournal.ac.cn/zgbyjxzz/ch/index.aspx>) 注册后按照提示投稿。作者也可通过登陆中国实验动物学会网站(www.calas.org.cn) 链接进入投稿系统。

4 两刊采用论文授权书形式替代单位介绍信,请在投稿系统网站下载中心下载后填写盖章,扫描件或照片件以附件形式随文章一同投稿上传。

本刊已入万方数据网络和中国学术期刊(光盘版)电子杂志、中文生物医学期刊文献数据库、中国实验动物信息网和中国实验动物学会网站等网络文献数据库,如不同意自己论文入网,请在来稿中声明。

地址:北京朝阳区潘家园南里 5 号《中国比较医学杂志》编辑部,邮编:100021

电话:010 - 67779337 传真:010 - 67781534 E-mail: b67761337@126.com