

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.00475

荧光-构象敏感凝胶电泳技术筛查上海市郊区野生小鼠线粒体编码区 SNP 位点

范忠鹏¹, 朱旺升¹, 张超¹, 周宇荀¹, 李凯¹, 梁银明¹, 邢正宏², 陈国强², 柏熊², 肖君华^{1,2}

1. 东华大学生物科学与技术研究所, 上海 201620;

2. 上海市实验动物研究所-复旦大学-东华大学模式动物生物多样性联合实验室, 上海 201200

摘要: 利用通用引物荧光 PCR 方案, 应用荧光-构象敏感凝胶电泳(fluorescence-based conformation sensitive gel electrophoresis, F-CSGE)和 DNA 直接测序分型技术, 对上海地区 64 只野生小鼠线粒体 DNA(mtDNA)编码区进行序列分析, 在上海市郊区野生小鼠群体中初步检测 mtDNA 编码区 SNP, 以发现合适的遗传位标用于野生小鼠遗传多态性分析。结果发现: F-CSGE 所有存在 SNP 突变的峰图中同源双链和异源双链峰电泳泳动距离差异均较为明显, 在检测未知 SNP 中无假阳性出现, 检测效率高。F-CSGE 检出野生小鼠 mtDNA 编码区 SNP 24 个, 其中新发现 SNP 为 16 个。结果表明, F-CSGE 可用于 mtDNA 编码区 SNP 检测, 新发现的 SNP 可作为遗传位标用以研究整个上海地区野生小鼠的遗传结构和遗传多态性。

关键词: 线粒体 DNA; 单核苷酸多态性; 荧光-构象敏感凝胶电泳; 野生小鼠

SNP discovery by F-CSGE in the coding region of mitochondrial DNA in wild house mice from Shanghai suburb

FAN Zhong-Peng¹, ZHU Wang-Sheng¹, ZHANG Chao¹, ZHOU Yu-Xun¹, LI Kai¹, LIANG Yin-Ming¹, XING Zheng-Hong², CHEN Guo-Qiang², BAI Xiong², XIAO Jun-Hua^{1,2}

1. Institute of Biology Science & Technology, Donghua University, Shanghai 201620, China;

2. Institute of Experimental Animals-Fudan University-Donghua University United Laboratory of Bio-Diversity of Model Animals, Shanghai 201200, China

Abstract: This study was performed to discover SNPs for genetic polymorphism analysis of mitochondrial DNA from wild house mice. Universal primer fluorescent PCR, fluorescence-based conformation sensitive gel electrophoresis (F-CSGE) and DNA sequencing were conducted to analyze the coding region of mitochondrial DNA. Different types of unknown mutations were recorded by variable F-CSGE patterns without false positive. Twenty-four SNPs, sixteen of which were first discovered in the coding region of mitochondrial DNA, were found in 64 wild house mice from 4 districts in Shanghai. Therefore, F-CSGE was proved to be powerful technique for SNP discovery in the coding region mitochondrial DNA. The novel SNPs can be used as molecular markers to analyze population structure and genetic polymorphisms of the wild house mice in Shanghai.

Keywords: mtDNA; SNP; F-CSGE; wild house mice

收稿日期: 2007-10-27; 修回日期: 2008-01-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30771191)资助[Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30771191)]

作者简介: 范忠鹏(1979-), 男, 山东德州人, 硕士研究生, 专业方向: 医学分子遗传学。Tel: 021-67792650; E-mail: pawfl@163.com

朱旺升(1980-), 男, 湖北黄冈人, 硕士研究生, 专业方向: 医学分子遗传学。Tel: 021-67792650; E-mail: zhuws.hzau@gmail.com

范忠鹏、朱旺升对本文作出同等的贡献, 并列第一作者。

通讯作者: 肖君华(1968-), 男, 江苏无锡人, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 医学分子遗传学。Tel: 021-67792652; E-mail: xiaojunhua@dhu.edu.cn

野生小家鼠(*Mus Musculus*)相对于实验室近交系小鼠(laboratory inbred strains of mice), 具有更加丰富的遗传多态性和独特的遗传结构, 在复杂疾病易感性研究上可作为后者的有力补充。20 世纪 90 年代国外研究者就开始关注利用天然野生小鼠群体研究病原体易感性的分子遗传机制并且取得一定的成果^[1,2]。我国地理气候环境的多样性孕育了丰富的野生小家鼠遗传资源, 但对其研究和利用尚处于起步阶段, 大量基础工作尚未完成, 其群体遗传结构未知, 在进行遗传学研究之前需要进行多态性分析, 并确定遗传位标用于后续研究。

mtDNA 因母系单倍型遗传方式和相对核基因组突变率高、进化速度快的特点成为研究物种间、物种内部群体多样性, 建立系统发生关系, 物种起源和遗传分化的重要对象^[3]已广泛用于研究小家鼠种群结构和进化关系^[4]。目前对 mtDNA 的分析主要集中于 mtDNA 控制区的高变区(hypervariable regions I/II, HVS-I/II), 但该区域识别能力有限^[5]并且存在回复突变, 于编码区寻求更多的 SNP 位点可提高 mtDNA 对群体的鉴别能力。mtDNA 突变亦可导致多种疾病的发生^[6], 新发现的编码区 SNP 可作为潜在的致病位点。

mtDNA 编码区突变率较非编码区低, 直接测序寻找 SNP 的成本较高。目前, 筛选 SNP 和未知突变的主要方法有: 截短蛋白检测(protein truncation test, PTT)^[7], 单链构象多态性检测(single-strand conformation polymorphism analysis, SSCP)^[8], 变性梯度凝胶电泳(denaturing gel gradient electrophoresis, DGGE)^[9], 构象敏感凝胶电泳(conformation sensitive gel electrophoresis, CSGE)^[10], 变性高效液相色谱技术(dHPLC)^[11]等。在这些方法中, CSGE 步骤简单、快速、高通量、成本低、可检测较长片段(250~500 bp)^[12], 是一种强有力的 SNP 和基因突变的检测手段^[13]。

本研究利用通用荧光 PCR 方案, 应用 F-CSGE 和 DNA 测序分型技术, 于上海市崇明区(崇明岛)、青浦区、金山区、嘉定区随机捕获的野生小家鼠中检测 mtDNA 编码区 SNP 位点。对野生小家鼠 mtDNA 编码区 SNP 的筛查和遗传多态性分析, 可为开展野生小家鼠系统的种群结构和进化关系研究提供遗传位标, 为进一步开展野生小家鼠遗传资源调查及遗传结构分析奠定基础。

1 材料和方法

1.1 动物来源

本实验 64 只野生小家鼠分别随机捕获于上海市 4 个郊区: 崇明区 22 只(CM, 分别编号 CM1-CM22)、青浦区 14 只(QP, 分别编号 QP1-QP14)、金山区 13 只(JS, 分别编号 JS1-JS13)、嘉定区 15 只(JD, 分别编号 JD1-JD15)。

1.2 鼠尾 DNA 抽提

剪取 1 cm 左右鼠尾, 利用动物基因组 DNA 小量快速抽取试剂盒(Genomic DNA Rapid Isolation Kit, for animal tissue)(北京博大泰克生物基因技术有限公司)抽提全基因组 DNA, 分别采用分光光度法和琼脂糖凝胶电泳检测其质量。

1.3 mtDNA PCR 扩增

利用通用引物荧光方案对 mtDNA 进行 PCR 扩增^[14], 如图 1 所示。共设计引物 11 对, 其中 1 对通用荧光引物(universal primer), 10 对特异性附加通用荧光序列的非荧光引物(specific primers), 通用引物标记 HEX 荧光, 由上海生工生物工程技术有限公司合成。见表 1。

PCR 反应采用 5 μ L Qiagen 体系: 10 \times buffer 0.5 μ L (含 Mg^{2+} 15 mmol/L); 5 \times Q-Solution 1 μ L; Q- Mg^{2+} 0.3 μ L (25 mmol/L); dNTP 0.5 μ L (2 mmol/L); Qiagen HotStar Taq Enzyme 0.05 μ L (5 unit/ μ L); 特异性引物: 0.2 μ L (1 pmol/ μ L); 通用引物 0.1 μ L (10 pmol/ μ L); DNA 模版: 0.5 μ L (50~100 ng/ μ L); ddH₂O 补足 5 μ L。

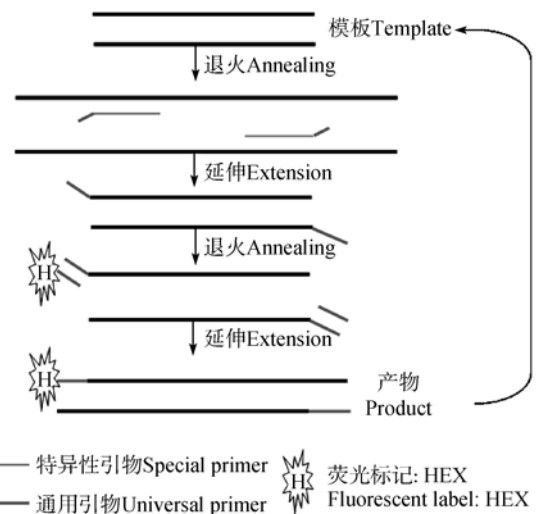


图 1 通用方案 PCR 图解

Fig. 1 Illustration of universal PCR method

表 1 引物序列
Table 1 Sequence of primers

引物编号 No.	引物序列 Primer sequence (5 3)	PCR 产物长度 Length of PCR products (bp)
Universal-U*	HEX-CGCAAACCTGTACGC	
Universal-L*	CCCTCTGAGTGATGC	
L16234-U	CGCAAACCTGTACGCTCATGTTCCGTGAACCAAAA	398
H311-L	CCCTCTGAGTGATGCTGGCACGAAATTTACCAACC	
L227-U	CGCAAACCTGTACGCCACGGGACTCAGCAGTGATA	322
H518-L	CCCTCTGAGTGATGCTGGCTAAGCATAGTGGGGTA	
L470-U	CGCAAACCTGTACGCCGACAGCTAAGACCCAAACTG	268
H707-L	CCCTCTGAGTGATGCTTTAGGGTTTGCTGAAGATGG	
L644-U	CGCAAACCTGTACGCCCGCTCTACCTCACCATCTC	505
H1119-L	CCCTCTGAGTGATGCGTGTAGGGCTAGGGCTAGGA	
L1061-U	CGCAAACCTGTACGCCCCAGAAGATTTTCATGACCAA	322
H1352-L	CCCTCTGAGTGATGCAGGTAGCTCGTTTGGTTTCG	
L1268-U	CGCAAACCTGTACGCTTGTACCTTTTGATAATGAACTAACT	425
H1662-L	CCCTCTGAGTGATGCAATTGAAATTTTATGTTGAGCTTGA	
L1607-U	CGCAAACCTGTACGCGCCTAAAAGCAGCCACCAAT	498
H2074-L	CCCTCTGAGTGATGCGCCGTTTCATGCTAGTCCCTA	
L7032-U	CGCAAACCTGTACGCTTGGTCTACAAGACGCCACAT	434
H7435-L	CCCTCTGAGTGATGCTCGGTTATCAACTTCTAGCAG	
L2013-U	CGCAAACCTGTACGCATCCTGACCGTGCAAAGGTA	388
H2370-L	CCCTCTGAGTGATGCGGGTAAGTTGGTCCGTTGATC	
L7440-U	CGCAAACCTGTACGCTTCTGCCAATAGAACTTCCAATC	462
H7871-L	CCCTCTGAGTGATGCCAGTGGAATGTTTGATGATGAG	
L2369-U	CGCAAACCTGTACGCCCTAGGGATAACAGCGCAATC	472
H2810-L	CCCTCTGAGTGATGCTAGGAAGGCTATGGCGATTAG	
L7832-U	CGCAAACCTGTACGCTTATTTCAACTAAAAGTCTCATCACAA	415
H8216-L	CCCTCTGAGTGATGCTGGGTAGTAGGTGTAAATGTATGTGG	
L2852-U	CGCAAACCTGTACGCGCCCTAACATTGTTGGTCCATAC	469
H3290-L	CCCTCTGAGTGATGCGGGTCAGGCTGGCAGAAGTAATC	
L8113-U	CGCAAACCTGTACGCCCAAAGGACGAACATGAA	426
H8508-L	CCCTCTGAGTGATGCAATAAATGTAATGGTAGCTGTTGGT	

U: 上游引物; L: 下游引物。
U: Upper primer; L: Lower primer.

扩增使用 ABI 9600 型 PCR 扩增仪反应, 程序: 95℃ 15 min (Qiagen HotStar Taq 酶获得活性), 94℃ 变性 30 s, 50~60℃复性 90 s, 72℃延伸 90 s, 30 个循环。

1.4 构建异源双链(Heteroduplexing)

异源双链构建过程如图 2 所示^[13]。以 CM6 作为对照样本, 其余样本 PCR 产物分别与 CM6 PCR 产物混合后, 利用 6 步梯度逐次降温法于 9600(ABI)PCR 扩增仪构建异源双链: 98℃ 5 min;

98℃→90℃ 5 min; 90℃→80℃ 5 min; 80℃→75℃ 10 min; 75℃→60℃ 10 min; 60℃→40℃ 20 min; 40℃→25℃ 20 min。反应完成后半小时内电泳上样。

1.5 F-CSGE

CSGE 温和变性胶配制参照文献[10], 取 0.5 μL PCR 产物、0.5 μL ROX、0.5 μL 葡聚糖蓝(50 mg/mL)、0.5 μL 新鲜的去离子甲酰胺混样, 毛细管吸取 1.2~1.5 μL 于 ABI 377 自动测序仪上样。377 自动测序仪电泳环境设置: 2 kV, 30℃, 电泳 4 h 后停止。利用 Genemapper 软件进行电泳结果分析。

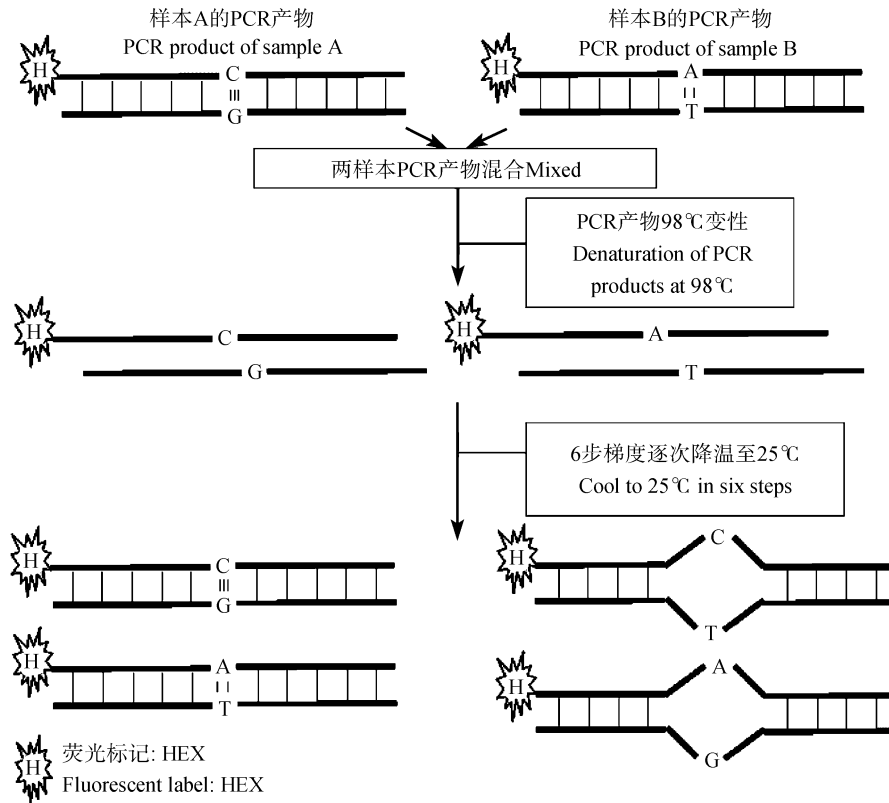


图2 异源双链形成过程

Fig. 2 Heteroduplex formation

1.6 DNA 测序

F-CSGE 检测为阳性的样本重新单重 PCR(不加通用荧光引物), PCR 产物利用 2%的琼脂糖凝胶电泳检测, PCR 产物经纯化后由上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.7 数据分析

运用 POPGENE32 统计软件对各 SNP 位点进行遗传多态性分析, 根据各 SNP 位点的等位基因频率和观测到的等位基因数(N_a), 计算有效等位基因数 N_e , 基因多样性 h 和 Shannon 表型多样性指数 I 。

2 结果与分析

2.1 F-CSGE 的 SNP 分型效果检验

本实验选取实验室常用近交系小鼠 C57BL/6(B6)和 C3H/HeJ(C3)各一雄性样本, 对其 X 染色体 2 个已知 SNP: rs29053133(A/G)、rs29051408(C/T)采用本方法检测纯合子和杂合子状态。结果如图 3 显示, 同源双链和异源双链谱带分离明显, 证明构象敏感凝胶电泳的高效性和准确性。

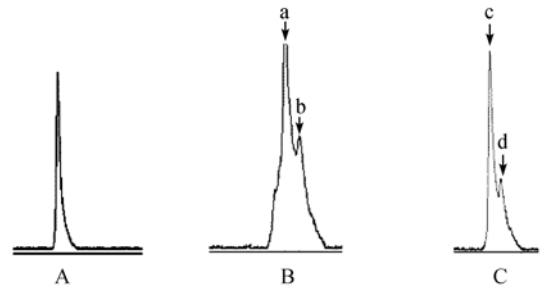


图3 F-CSGE 图谱截图

A: 2 管 B6 同一样本 PCR 产物混合后纯合子电泳峰图, 显示同源双链为一单峰; B, C: B6 和 C3 各一雄性样本 PCR 产物混合后杂合子电泳峰图, 显示为双峰, a、c 峰为同源双链峰, b、d 峰为异源双链峰。其中, B 图 SNP: A>G; C 图 SNP: C>T。

Fig.3 Screenshots of F-CSGE electropherograms of homoduplex and heteroduplex

A: Homoduplex formed in the mixture of identical PCR products amplified from male B6 templates; B: Heteroduplex formed in the mixture of different PCR amplicons of the same allelic sites of male B6 and male C3, A>G; C: C>T polymorphism detected by F-CSGE.

2.2 F-CSGE 迁移状态与 DNA 异源双链构成的关系

结果显示, 所有存在 SNP 突变的峰图中同源双链和异源双链峰电泳泳动距离差异均较为明显。由 A>G 或 C>T 等单碱基突变导致的同源双链和异源双

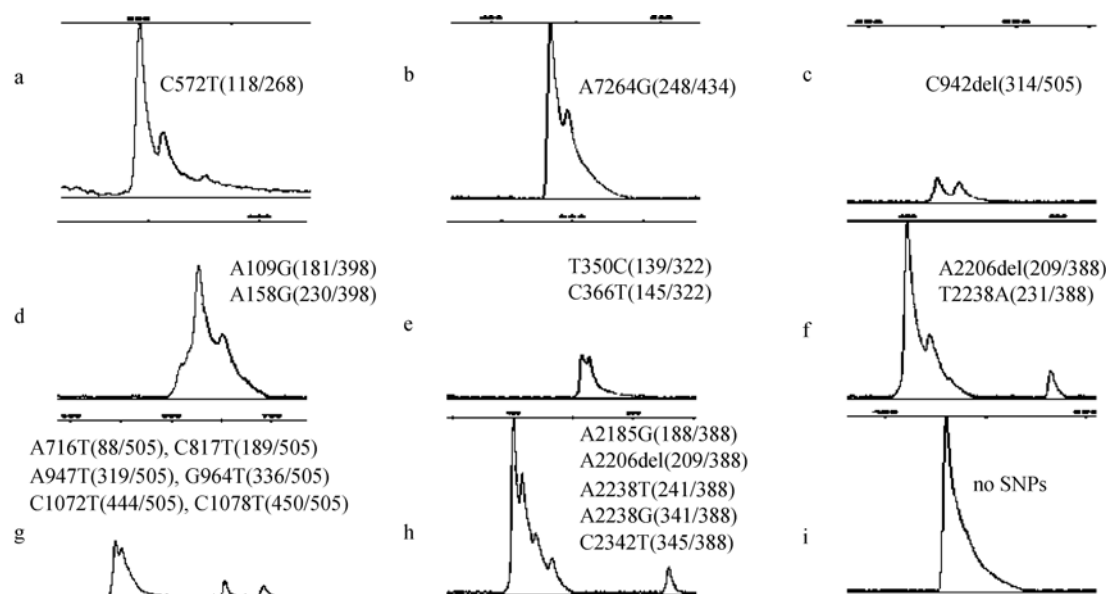


图 4 F-CSGE 迁移状态截图与对应测序检测出的突变位点

a, b, c: 检测区段(PCR 产物)中仅存在 1 个单碱基突变的电泳峰型图; d, e, f: 检测区段(PCR 产物)中存在 2 个单碱基突变的电泳峰型图; g, h: 检测区段(PCR 产物)中存在 5~6 个单碱基突变的电泳峰型图; i: 检测区段(PCR 产物)中无任何碱基突变的对照电泳峰型图。

C572T(118/268), (118/268)表示该突变位点处于 PCR 产物中的位置/PCR 产物长度, 单位 bp, 用以表明该碱基突变的位置信息。

Fig. 4 Screenshots of different F-CSGE electropherograms and mutations detected in mtDNA amplicons

a, b, c: Heteroduplexes splitting pattern of one single nucleotide substitution (SNS); d, e, f: Heteroduplexes splitting pattern of two SNSs; g, h: Heteroduplexes splitting pattern of multiple SNSs; i: Homoduplex patterns without nucleotide substitutions.

C572T(118/268), 118/268: SNS at the site 118 of a 268 bp fragment.

表 2 上海市野生小家鼠中检测出的 mtDNA 编码区 SNPs (样本数=64)

Table 2 SNPs of mtDNA coding region in wild house mice in Shanghai suburb ($n=64$)

SNP 基因座 SNP locus (bp)	基因型 Genotype	样本数 n	等位基因频率 Allele frequency	SNP 基因座 SNP locus (bp)	基因型 Genotype	样本数 n	等位基因频率 Allele frequency
109	A	40	0.6250	1078*	C	27	0.4219
	G	24	0.3750		T	37	0.5781
158*	A	49	0.7656	2185*	A	4	0.0625
	G	15	0.2344		G	60	0.9375
350*	T	27	0.4219	2206*	A	31	0.4844
	C	37	0.5781		T	33	0.5156
366*	C	48	0.7500	2238	T	60	0.9375
	T	16	0.2500		A	4	0.0625
543*	A	48	0.7500	2338*	C	12	0.1875
	G	16	0.2500		A	52	0.8125
572*	T	46	0.7188	2342*	T	58	0.9063
	C	18	0.2813		C	6	0.0938
716	A	19	0.2969	2525	C	30	0.4688
	T	45	0.7031		T	34	0.5313
817	C	16	0.2500	2615	T	44	0.6875
	T	48	0.7500		C	20	0.3125
947	T	36	0.5625	2656*	C	33	0.5156
	A	28	0.4325		T	31	0.4844
957*	T	49	0.7656	7264*	A	22	0.3438
	C	15	0.2344		G	42	0.6563
964*	G	22	0.3438	8088*	C	37	0.5781
	A	42	0.6563		T	27	0.4219
1072	T	18	0.2813	8163*	T	53	0.8281
	C	46	0.7188		C	11	0.1719

*: 新发现的 SNP, NCBI 网站数据库该点无 SNP 记录。

*: New SNPs which have no SNP records in NCBI database.

链峰电泳泳动距离(图 4, a 和 b)差异小于由缺失突变引起的异源双链与同源双链峰泳动距离(图 4c)。检测区段(PCR 产物)存在 2 个单碱基改变的电泳峰型(图 4, d 和 e)与仅存在 1 个单碱基突变的电泳峰型(图 4, a 和 b)相比, 峰型差别不明显, 而存在 5~6 个单碱基突变的电泳峰型(图 4, g 和 h)呈现较复杂的多峰状态, 同源双链和异源双链累计出现 4~5 个峰, 但多 SNP 位点导致的峰型图状态并无一致性。在检测未知 SNP 中, 异源双链无假阳性出现。

2.3 mtDNA 编码区 SNPs

F-CSGE 检测为阳性的样本, 经上海生工生物工程技术有限公司 DNA 测序确认 mtDNA 编码区 SNP 为 24 个, 对照 NCBI 小鼠现有 SNP 数据库

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 确定新发现 SNP 为 16 个(表 2)。

2.4 野生小家鼠 mtDNA SNPs 遗传多态性分析

利用 F-CSGE 和 DNA 测序分型技术检测获得的 mtDNA SNPs 位点, 通过 POPGENE32 统计分析软件, 得到描述各遗传多样性的重要指标: 有效等位基因数 N_e , 基因多样性 h 和 Shannon 表型多样性指数 I 等(表 3)。从表 3 各位点遗传参数指标可以看出, 各位点平均基因多样性 $h=0.3927$, 最低 0.1172; Shannon 表型多样性指数 I 均值为 0.5744, 最低 0.2338; 表明本实验检测出的 mtDNA SNPs 位点遗传多态性较高, 可选作为遗传位标。

表 3 野生小家鼠 SNPs 遗传多态性统计结果

Table 3 Summary of genetic variation statistics for all mtDNA SNPs

SNP 基因座 SNP locus (bp)	样本数 n	等位基因数 N_a	有效等位基因数 N_e	基因多样性 h	Shannon 表型多样性指数 I
109	64	2	1.8824	0.4688	0.6616
158	64	2	1.6000	0.3750	0.5623
350	64	2	1.9692	0.4922	0.6853
366	64	2	1.6000	0.3750	0.5623
543	64	2	1.6000	0.3750	0.5623
572	64	2	1.6787	0.4043	0.5941
716	64	2	1.7534	0.4297	0.6211
817	64	2	1.6000	0.3750	0.5623
947	64	2	1.9692	0.4922	0.6853
957	64	2	1.6787	0.4043	0.5941
964	64	2	1.8221	0.4512	0.6435
1072	64	2	1.6787	0.4043	0.5941
1078	64	2	1.9692	0.4922	0.6853
2185	64	2	1.1327	0.1172	0.2338
2206	64	2	2.0000	0.5000	0.6931
2238	64	2	1.1327	0.1172	0.2338
2338	64	2	1.4382	0.3047	0.4826
2342	64	2	1.2047	0.1699	0.3111
2525	64	2	1.9922	0.4980	0.6912
2615	64	2	1.7534	0.4297	0.6211
2656	64	2	2.0000	0.5000	0.6931
7264	64	2	1.8221	0.4512	0.6435
8088	64	2	1.9692	0.4922	0.6853
8163	64	2	1.4382	0.3047	0.4826
Mean	64	2	1.6952	0.3927	0.5744
St. Dev		0	0.2711	0.1157	0.1371

3 讨论

3.1 F-CSGE 与 mtDNA SNP 筛选

目前常用的筛选未知 SNP 方法中, CSGE 技术相对于 PTT 和 dHPLC 较为简单和低成本。而在单碱基突变检测中, 与 SSCP 检测碱基替换较弱的敏感性(仅单链构象差异)相比, CSGE 具有明显的高敏感性, 原因在于该方法建立的基础为单碱基错配^[15]。这也是 CSGE 技术用于 SNP 筛查的优势。目前 F-CSGE 技术主要用于筛查较大的多外显子基因的单碱基突变^[16], 例如 BRCA1、BRCA2。mtDNA 编码区与这类基因编码区较为相似: 序列较长, 突变率较低, 存在多个 SNP 位点。但是尚未有文献表明该技术在 mtDNA 未知 SNP 筛查中的应用。本实验的结果证实, F-CSGE 技术非常适用于 mtDNA 未知 SNP 的筛查。

通过对 mtDNA 扩增引物的巧妙设计可有效地避免假阴性。F-CSGE 的敏感性与碱基错配的不同碱基对、PCR 产物中碱基错配发生的位置以及 PCR 产物长度有关^[17]。F-CSGE 检测 PCR 产物的长度的最适范围为 250~500 bp, 一般认为, PCR 产物中位于两端 50 bp 内的 SNP 不易检出, 我们于设计引物时在相邻两对引物间采取重叠 35 bp 左右的策略解决这一困难, 即相邻的下一对引物的上游引物起始端设计在距上一 PCR 片段末端上游 35 bp 左右, 加上通用引物上下游各 15 bp, 累计 50 bp 左右。本实验检出的大部分 SNP 位点在 PCR 产物中的位置居中, 随机抽检了 10 个同纯合子峰型一致的样本的 PCR 产物直接测序, 没有发现新的 SNP, 最大程度地避免了漏检 SNP 的可能性。

本研究发现 mtDNA 644~1119 和 2013~2370 两区段均集中出现 5~6 个 SNP 位点, 峰图中出现 4~5 峰的形态(图 4, g 和 h), 而其他单点碱基替换或缺失均为 2 峰(同源双链峰和异源双链峰)。先前有报道认为 4 峰状态为 2 碱基缺失突变引起, 缺失突变导致的 PCR 产物长度突变和构象突变共同影响了同源双链和异源双链的电泳速率^[13], 本实验发现多 SNP 位点同样导致了 4 峰状态, 认为可能的多点错配导致的构象突变也是造成多峰状态的复杂性的因素。

与其他突变检测技术一样, F-CSGE 无法辨别两个位置相近的序列突变。检测区段(PCR 产物)中存在 2 个单碱基突变的峰型图与仅存在 1 个单碱基突变的峰型图相比, 虽然同源双链和异源双链组成的

两峰形态略有不同, 但异源双链峰与同源双链峰之间的距离并没有明显的差异, 无法从峰图状态中获得 SNP 数量上的信息, 而这些信息可以通过进一步测序获得。

另外, 通过设计不同的 PCR 产物长度和利用荧光平台使用不同的荧光标记, 可显著提高 CSGE 技术的检出单碱基突变的敏感性和通量水平。利用通用引物荧光方案 PCR 扩增, 则降低了合成引物荧光标记的次数进而节省了实验成本。

3.2 mtDNA SNP 与野生小家鼠资源

物种进化研究和群体多态性分析首先要了解其种群分布和进化分枝。为检验野生小家鼠群体的区域分化和多态性分布, 我们需要了解其不同群体的详细历史, 对不同区域野生小家鼠群体及群体间的基因流动进行确认。

探究野生小家鼠种群间的相互关系关键依赖于遗传位标。虽然有人质疑 mtDNA 用作分子标记的可靠性^[18], mtDNA 的多态性因其母系单倍型遗传方式和相对核基因组突变率高、进化速度快的特点仍为目前应用较广泛的遗传位标。本实验于 mtDNA 编码区 5 kb 的区段内筛查出 SNP 位点 24 个, 644~1119 和 2013~2370 区段均出现 5~6 个 SNP 位点, 显示即使进化压力较大的 mtDNA 编码区突变率仍然较高, 进一步表明 mtDNA 进化速度较快以及其丰富的遗传多态性。

本实验于 mtDNA 编码区 5 kb 的区段内新检测出 SNP 16 个, 结果显示野生小家鼠相对于实验室近交系小鼠具有更加丰富的遗传多态性。同时表明野生小家鼠编码区 SNP 比较常见, 而在实验室近交系小鼠中编码区 SNP 则是较少见的, 这种差异在遗传学研究中可用于分析来自不同亲本的等位基因的转录水平等, 具有重要的病理价值。

总之, 本研究利用通用荧光引物 PCR 方案, 应用 F-CSGE 和 DNA 测序分型技术, 能快速筛选出 mtDNA SNP 作为遗传位标。利用筛选出的 mtDNA 编码区 SNP 初步分析和确定野生小家鼠的遗传多态性, 是进一步利用这一宝贵遗传资源的重要基础。随着我国丰富的野生小家鼠遗传资源的挖掘以及境内野生小家鼠资源的种系发生史、遗传变异以及亲缘关系、亚种和种群结构研究和分析, 我们将获得我国境内野生小家鼠资源全面系统的了解和认识, 可为我国利用野生小家鼠模型开展人类疾病研究开辟新的研究领域。

参考文献(References):

- [1] Ideraabdullah FY, de la Casa-Esperón E, Bell TA, Detwiler DA, Magnuson T, Sapienza C, de Villena FP. Genetic and haplotype diversity among wild-derived mouse inbred strains. *Genome Res*, 2004, 14(10A): 1880–1887. [\[DOI\]](#)
- [2] Jean-Louis G, François B. Wild mice: an ever-increasing contribution to a popular mammalian model. *Trends in Genetics*, 2003, 19(1): 24–31. [\[DOI\]](#)
- [3] GAO Shu-Hui, LIU Qing-Bo, GUI Hong-Sheng, QIAO Ke, LI Sheng-Bin. Study on SNP polymorphism of mitochondrial DNA D-loop region from Nu ethnic population in Yunnan of China. *Chin J Med Genet*, 2007, 24(3): 354–357. 高树辉, 刘清波, 桂宏胜, 乔可, 李生斌. 中国云南怒族群体线粒体 DNA D 环区 SNP 遗传多态性研究. *中华医学遗传学杂志*, 2007, 24(3): 354–357.
- [4] Terashima M, Furusawa S, Hanzawa N, Tsuchiya K, Suyanto A, Moriwaki K, Yonekawa H, Suzuki H. Phylogeographic origin of Hokkaido house mice (*Mus musculus*) as indicated by genetic markers with maternal, paternal and biparental inheritance. *Heredity*, 2006, 96(2): 128–38. [\[DOI\]](#)
- [5] Allen M, Andréasson H. Mitochondrial D-loop and coding sequence analysis using pyrosequencing. *Methods Mol Biol*, 2005, 297: 179–196.
- [6] Dimauro S, Davidzon G. Mitochondrial DNA and disease. *Ann Med*, 2005, 37(3): 222–232. [\[DOI\]](#)
- [7] Roest PA, Roberts RG, Sugino S, van Ommen GJ, den Dunnen JT. Protein truncation test (PTT) for rapid detection of translation-terminating mutations. *Hum Mol Genet*, 1993, 2(10): 1719–1721. [\[DOI\]](#)
- [8] Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(8): 2766–2770. [\[DOI\]](#)
- [9] Fischer SG, Lerman LS. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, 80(6): 1579–1583. [\[DOI\]](#)
- [10] Ganguly A. An update on conformation sensitive gel electrophoresis. *Hum Mutat*, 2002, 19(4): 334–342. [\[DOI\]](#)
- [11] Underhill PA, Jin L, Lin AA, Mehdi SQ, Jenkins T, Vollrath D, Davis RW, Cavalli-Sforza LL, Oefner PJ. Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography. *Genome Res*, 1997, 7(10): 996–1005.
- [12] Leung YF, Tam PO, Tong WC, Baum L, Choy KW, Lam DS, Pang CP. High-throughput conformation-sensitive gel electrophoresis for discovery of SNPs. *Biotechniques*, 2001, 30(2): 334–335, 338–340.
- [13] Velasco E, Infante M, Durán M, Pérez-Cabornero L, Sanz DJ, Esteban-Cardenosa E, Miner C. Heteroduplex analysis by capillary array electrophoresis for rapid mutation detection in large multiexon genes. *Nat Protoc*, 2007, 2(1): 237–246. [\[DOI\]](#)
- [14] Missiaggia A, Grattapaglia D. Plant microsatellite genotyping with 4-color fluorescent detection using multiple-tailed primers. *Genet Mol Res*, 2006, 5(1): 72–78.
- [15] Markoff A, Sormbroen H, Bogdanova N, Preisler-Adams S, Ganey V, Dworniczak B, Horst J. Comparison of conformation-sensitive gel electrophoresis and single-strand conformation polymorphism analysis for detection of mutations in the BRCA1 gene using optimized conformation analysis protocols. *Eur J Hum Genet*, 1998, 6(2): 145–150. [\[DOI\]](#)
- [16] Ganguly T, Dhulipala R, Godmilow L, Ganguly A. High throughput fluorescence-based conformation-sensitive gel electrophoresis (F-CSGE) identifies six unique BRCA2 mutations and an overall low incidence of BRCA2 mutations in high-risk BRCA1-negative breast cancer families. *Hum Genet*, 1998, 102(5): 549–556. [\[DOI\]](#)
- [17] Ganguly A. An update on conformation sensitive gel electrophoresis. *Hum Mutat*, 2002, 19(4): 334–342. [\[DOI\]](#)
- [18] NIU Yi-Dong, LI Ming, WEI Fu-Wen, FENG Zuo-Jian. Reliability of mtDNA as molecular marker and its perspective. *Hereditas(Beijing)*, 2001, 23 (6): 593–598. 牛屹东, 李明, 魏辅文, 冯祚建. 线粒体 DNA 用作分子标记的可靠性和研究前景. *遗传*, 2001, 23 (6): 593–598.

新书推荐

代谢组学手册

John Lindon 著, 科学出版社 2008 年 3 月出版, 书号: 978-7-03-020777-7, 定价: 128.00 元。

本书从以下 3 个方面对国际代谢组学研究进行描述: 1. 代谢组学分析技术及原理; 2. 代谢组学中的数据和处理; 3. 代谢组学的应用实例。

邮购地址: 北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学销售中心 邮编: 100717

联系人: 周文宇 联系电话: 010-64031535(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目