

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00989

## 东方田鼠微卫星标记的富集筛选与初步应用

倪丽菊<sup>1,2</sup>, 陶凌云<sup>1,2</sup>, 柏熊<sup>3</sup>, 胡建华<sup>1,2</sup>, 高诚<sup>1,2</sup>, 谢建云<sup>1,2</sup>

1. 上海实验动物研究中心, 上海 201203;
2. 上海市实验动物质量监督检验站, 上海 201203;
3. 上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 上海 201203

**摘要:** 根据生物素与链霉亲和素的亲和原理, 利用磁珠富集法筛选东方田鼠(*Microtus fortis*)微卫星分子标记。

链霉亲和素磁珠捕获生物素标记的微卫星探针, 然后与连有接头的单链限制性酶切片段复性结合, 获得含有微卫星的单链片段, PCR 扩增形成双链, 连接 T 载体并转化感受态细胞, 得到东方田鼠微卫星富集文库。随机挑选 70 个阳性克隆, 经测序分析, 获得微卫星序列 92 个。设计合成 27 对微卫星引物并成功筛选出 21 对可用引物, 取其中 10 对引物, 荧光标记后对 3 个人工驯养及野生东方田鼠种群进行遗传多样性分析。结果显示, 文章所构建的东方田鼠微卫星文库的阳性克隆率较高, 初步筛选的 10 个微卫星标记均为具有高度多态性的微卫星标记。在 3 个东方田鼠种群中, 野生湖南种群的观测等位基因数( $N_a$ )、有效等位基因数( $N_e$ )、观测杂合度( $H_o$ )、期望杂合度( $H_e$ )和多态信息含量( $PIC$ )均最高, 人工驯养的湖南种群次之, 人工驯养的宁夏种群最低。

**关键词:** 东方田鼠; 磁珠富集; 微卫星标记; 遗传多样性

## Enrichment and screening of the microsatellite markers in *Microtus fortis* and its preliminary application in genetic diversity research

NI Li-Ju<sup>1,2</sup>, TAO Ling-Yun<sup>1,2</sup>, BAI Xiong<sup>3</sup>, HU Jian-Hua<sup>1,2</sup>, GAO Cheng<sup>1,2</sup>, XIE Jian-Yun<sup>1,2</sup>

1. Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai 201203, China;
2. Shanghai Quality Monitoring Center for Laboratory Animal, Shanghai 201203, China;
3. Shanghai SIPPR-BK LAB Animal Ltd, Shanghai 201203, China

**Abstract:** This study was to isolate microsatellite markers from *Microtus fortis* genome by magnetic beads enrichments. Through hybridization of biotin-labeled microsatellite oligonucleotide probes, which were captured by streptavidin-coated magnetic with the adaptor-ligated enzyme-digested genome fragments, single-stranded DNA fragments containing microsatellites were obtained. After PCR amplification, these fragments were then cloned into T vectors and were transformed into competent cells subsequently. Ninety-two microsatellite sequences were randomly isolated from 70 positive clones. Twenty-one out of 27 pairs of designed microsatellite primers were screened out from the microsatellite sequences, and 10 out of the 21 microsatellite loci were used to investigate the genetic diversity of three populations of *M. fortis*, Hunan (wild), Hunan (domesticated), and Ningxia (domesticated). All the 10 microsatellite loci used to analyze the genetic diversity ex-

收稿日期: 2010-12-22; 修回日期: 2011-06-03

基金项目: 上海市科委基金项目(编号: 071409001, 09140900101)资助

作者简介: 倪丽菊, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 实验动物遗传学。Tel: 021-50793648; E-mail: niliju@yahoo.com.cn

通讯作者: 谢建云, 研究员, 研究方向: 实验动物遗传学。E-mail: xiejianyun@hotmail.com

网络出版时间: 2011-7-27 15:48:07

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20110727.1548.003.html>

hibited a good level of polymorphism. The values of observed number of alleles ( $N_a$ ), effective number of alleles ( $N_e$ ), observed heterozygosity ( $H_o$ ), expected heterozygosity ( $H_e$ ) and polymorphic information content ( $PIC$ ) were all the highest in the Hunan (wild) population, lower in the Hunan (domesticated) population, and the lowest in the Ningxia (domesticated) population.

**Keywords:** *Microtus fortis*; enrichment by magnetic beads; microsatellite; genetic diversity

东方田鼠(*Microtus fortis*)又称长江田鼠、沼泽田鼠,主要栖息于河、湖沿岸的沼泽、草甸和农田中,广泛分布于我国近 20 个省市自治区<sup>[1]</sup>,是我国血吸虫病流行区洞庭湖地区的重要鼠害。由于其具有特殊的先天抗血吸虫病特性,上海实验动物研究中心于 1998 年开始捕获野生东方田鼠进行人工驯养并逐步实验动物化,现已培育成两个封闭种群用于科学研究。微卫星(Microsatellite)又称短串联重复序列(Short tandem repeat, STR),在真核生物的基因组中广泛分布,平均间隔约 10~50 kb<sup>[2]</sup>,具有多态信息含量高、呈共显性遗传、易于 PCR 检测等优点。目前,一些常用实验动物都有清晰的遗传背景,并进行过相关的微卫星研究,而有关东方田鼠微卫星的研究极少,仅见苏志杰等<sup>[3]</sup>报道的用数据库搜索法寻找东方田鼠微卫星引物。本研究采用磁珠富集法首次成功构建了东方田鼠微卫星富集文库,并用初步筛选的 10 个微卫星标记比较分析野生与人工驯养东方田鼠种群的遗传多样性,以了解经过 10 多年人工驯养的东方田鼠种群,其群体遗传结构是否发生改变,同时也可验证此东方田鼠微卫星富集文库的质量。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物来源

野生湖南种群东方田鼠 20 只,从湖南洞庭湖地区捕获,剪取尾巴-70℃保存。人工驯养的湖南种群东方田鼠 31 只与宁夏种群东方田鼠 30 只由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,为室内封闭繁殖第 20~21 代,随机选取。

### 1.2 引物与探针

实验所用的接头为平端接头,其中 OligoA 序列为 5'-CTCTTGCTTGAATTCGACTA-3', OligoB 序

列为 5'-p-TAGTCCGAATTCAAGCAAGAGCACA-3'; 4 种生物素标记的微卫星寡核苷酸探针分别为 Biotin-ATAGAATAT(CA)<sub>12</sub>、Biotin-ATAGAATAT(CCG)<sub>8</sub>、Biotin-ATAGAATAT(AGAT)<sub>6</sub>、Biotin-ATAGAATAT(TTTG)<sub>6</sub>; 上述接头序列和探针与东方田鼠的微卫星引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成标记。

### 1.3 微卫星富集文库的构建<sup>[4]</sup>

#### 1.3.1 基因组 DNA 的提取、酶切及接头连接

用 DNeasy<sup>®</sup> Blood & Tissue Kit 提取东方田鼠尾巴基因组 DNA, -20℃保存备用。

基因组 DNA 经 *Hae* 与 *Afa* 酶切后,回收 300~1 000 bp 的 DNA 片段,纯化备用。将 OligoA 与 OligoB 等摩尔混合, 98℃变性 1 min, 68℃复性 2 min, 冷却至室温形成具有平末端的双链接头。在 100 μL 的连接反应体系中,加入 3 μg 酶切回收片段, 250 pmol 接头, 5 μL T4 DNA 连接酶及 10 μL T4 DNA Ligase Buffer, 16℃连接过夜。连接产物经酚-氯仿纯化后溶于无菌双蒸水中。

#### 1.3.2 磁珠富集与片段克隆

吸取 900 ng 磁珠至 1.5 mL 离心管中,于磁力架上轻轻吸去上清液。用 200 μL 洗液 I(0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-Cl, 1 mmol/L EDTA)洗涤磁珠两次,再将其悬浮于 100 μL 洗液 I 中。加入 50 μmol/L 生物素标记的微卫星探针(CA)<sub>12</sub> 9 μL、(CCG)<sub>8</sub> 5 μL、(AGAT)<sub>6</sub> 5 μL、(TTTG)<sub>6</sub> 5 μL,混匀,室温静置 1 h。用洗液 I 和 5×SSC 洗涤磁珠各两次,每次 5 min。将 1.3.1 的连接产物于 98℃变性 10 min,立即置冰上冷却。用变性产物与 20×SSC 重悬磁珠(终浓度为 6×SSC), 65℃杂交过夜。去上清后依次用洗液 II(2×SSC, 0.1% SDS)、洗液 III(1×SSC)、洗液 IV(0.15 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-Cl, 1 mmol/L EDTA)洗

涤杂交产物。最后将含有微卫星序列的单链 DNA 片段洗脱在 70℃ 预热的无菌双蒸水中。经 PCR 扩增后连接 pMD<sup>®</sup>18-T 载体, 转化至 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 得到东方田鼠基因组微卫星富集文库。

#### 1.4 富集文库的筛选与测序分析

随机挑取白色菌落接种至含 Amp 的 LB 液体培养基中, 37℃ 振荡培养 12~14 h。以 OligoA 为引物对菌液进行 PCR 筛选, 筛选出的阳性菌液由上海 Invitrogen 公司测序。

#### 1.5 微卫星序列分析与引物设计

利用 DNAssist2.0 与 SSRHunter1.3 软件对候选克隆的测序结果进行分析和微卫星重复结构域的查找。利用 Primer Premier 5.0 软件对获得的微卫星序列设计引物。

#### 1.6 种群遗传多样性分析

##### 1.6.1 各种群微卫星标记的扩增与检测

将 10 对呈现多态性的微卫星引物经荧光标记后对 3 种群东方田鼠共计 81 个个体 DNA 进行 PCR 扩增。PCR 反应总体积为 15  $\mu$ L, 含 10 $\times$ PCR Buffer(Mg<sup>2+</sup>-) 1.5  $\mu$ L, DNA 模板 75 ng, 上、下游引物各 0.2  $\mu$ mol/L, MgCl<sub>2</sub> 适量, dNTP 200  $\mu$ mol/L, *Taq* DNA 聚合酶 0.75 U。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 复性 30 s(复性温度见表 1), 72℃ 延伸 30 s, 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。

PCR 扩增产物先用 2% 琼脂糖电泳抽样检测,

然后将同一模板、不同荧光标记、产物大小不同的两对引物的扩增产物经稀释、按比例混合后, 在 ABI377 自动测序仪上电泳分型, 用 Genemapper 软件对电泳结果进行分析。

##### 1.6.2 数据统计分析

利用 POPGENE 软件(Version1.32)计算各种群与各微卫星座位的观测等位基因数(Observed number of alleles, *Na*)、有效等位基因数(Effective number of alleles, *Ne*)、多态信息含量(Polymorphic information content, *PIC*)、期望杂合度(Expected heterozygosity, *He*)、观测杂合度(Observed heterozygosity, *Ho*)等并对各微卫星座位进行 Hardy-Weinberg 平衡检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因组酶切及磁珠富集

用 *Hae* 和 *Afa* 酶切东方田鼠基因组 DNA, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测显示酶切片段多集中于 1 000 bp 以下(图 1A), 可用于构建基因组微卫星富集文库。

基因组的酶切回收产物经链亲和素磁珠富集后得到含微卫星序列的单链 DNA 片段, 再以 OligoA 为引物进行 PCR 扩增得到双链目的片段。图 1B 显示, 磁珠富集的目的片段大小与酶切回收片段一致, 分布于 300~1 000 bp 内。

### 2.2 富集文库的筛选与测序分析

本研究采用磁珠富集法成功构建了东方田鼠的

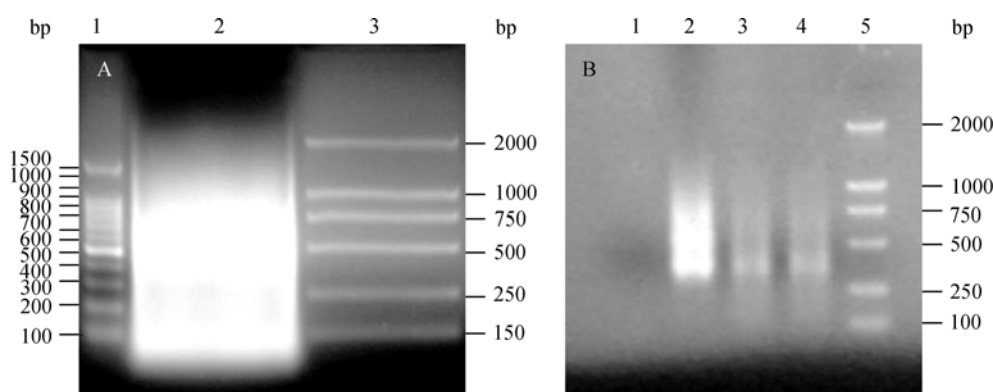


图 1 东方田鼠基因组 DNA 的酶切与磁珠富集结果

A: 基因组 DNA 的 *Hae* 与 *Afa* 双酶切结果。1: 100 bp DNA Ladder; 2: 酶切片段; 3: DL 2000 DNA Marker。

B: 磁珠富集产物的 PCR 扩增结果。1: 阴性对照; 2: 磁珠富集产物的 PCR 扩增片段; 3、4: 基因组 DNA 的酶切回收片段; 5: DL2000 DNA Marker。

微卫星富集文库, 共获得 2 000 多个克隆。随机选取 70 个重组克隆, PCR 鉴定结果显示插入片段多在 300~700 bp 之间, 共有 68 个克隆被 PCR 筛选为可能含有微卫星序列的候选克隆。

对这些候选克隆进行测序分析发现, 共有 57 个克隆含有重复次数大于或等于 5 的微卫星重复序列, 阳性克隆率为 81.4%; 其中有 4 个克隆序列与其他克隆相同, 占阳性克隆数的 7%; 47 个克隆中的微卫星具有完整的侧翼序列, 在 GenBank 中未发现同源性一致的 DNA 序列, 说明本研究首次发现了 47 个含东方田鼠微卫星标记的 DNA 序列。将这 47 个东方田鼠 DNA 序列在 GenBank 上注册, 登陆号为

FJ425056 ~ FJ425090 和 FJ787515 ~ FJ787526。

在筛选出的 47 个东方田鼠微卫星克隆中有 92 个微卫星序列, 重复次数在 5~31 之间不等, 核心序列以 (AC/TG)<sub>n</sub> 二碱基重复为主, 另外还有 (TC)<sub>n</sub>、(AG)<sub>n</sub>、(AAAC)<sub>n</sub>、(GAC)<sub>n</sub>、(GCT)<sub>n</sub>、(GCC)<sub>n</sub>、(CAAGCC)<sub>n</sub>、(GAGGCG)<sub>n</sub>、(ATCC)<sub>n</sub> 等多种重复类型。

2.3 微卫星引物的筛选结果

根据得到的东方田鼠微卫星序列设计合成 27 对引物, 经常规 PCR<sup>[5]</sup>优化筛选, 有 21 对引物能稳定扩增出目的片段, 且条带清晰。引物序列和扩增条件见表 1。

表 1 东方田鼠的微卫星标记及其引物扩增条件

位点 编号	GenBank 登陆号	引物序列 (5'→3')	核心序列	产物大小 (bp)	复性温度 (°C)	Mg <sup>2+</sup> 浓度 (mmol/L)
MFA01	FJ425056	F: TGTGGTGTGCCCCCTATAGTC R: CAGCCAGGGTGACAAAGT	(GT) <sub>26</sub>	160	50	1.5
MFA03	FJ425058	F: AGAGGGAGGTGAAGCCAAC R: CTCGGAGTTCTACTGTGC	(TG) <sub>18</sub> (AG) <sub>31</sub>	192	48	1.5
MFA04	FJ425059	F: GGAAGGGTGACTGAGATG R: AGTGCAAGCAAGACTAGGAC	(AC) <sub>19</sub>	142	58	1.5
MFA07	FJ425061	F: ACACCCTGTCCTTCATCTG R: GACCCTGGCTACAATCTC	(AC) <sub>8</sub> AT(AC) <sub>10</sub>	230	58	1.5
MFA08	FJ425062	F: TCATCTCCGCAGTCTTTC R: CCCAATCTTGTTAGGGTAG	(TC) <sub>24</sub>	227	52	1.5
MFA20	FJ425069	F: CGACTTCAGCCTGCATAT R: AGGTACGGTCTCACTCTTC	(AC) <sub>23</sub>	185	52	1.0
MFA21	FJ425070	F: ACATGTGCACCAACATACATTC R: AGAGGGGCAAAGAAAGTT	(TC) <sub>7</sub> ...(CA) <sub>9</sub> (CGCA) <sub>7</sub>	196	54	1.5
MFA23	FJ425072	F: TTGGATGTGGGTCAAGAAG R: GCTGAGTTAGCCTATTAGTGG	(GT) <sub>29</sub> (GC) <sub>7</sub>	253	54	1.0
MFA28	FJ425077	F: AGAGAGTGGAGTCAGGTCAT R: CCTATATGGCAATCTTTCC	(TG) <sub>23</sub>	201	50	1.0
MFA29	FJ425078	F: AGGTGTTCCCGAGCTGTGAG R: GGTTGCATGGATGACCCTGC	(AC) <sub>18</sub> A(CACG) <sub>3</sub>	268	61	1.5
MFA38	FJ425084	F: CCAGCCAGGATTAGTTAGAG R: GCTATTCTCAAAGGACCACC	(AC) <sub>25</sub>	327	54	1.5
MFA39	FJ425085	F: TTAATCTCAGCACTTGGGAG R: TGTAGCAGTATTGATGGCTG	(AAAC) <sub>5</sub>	227	54	1.0
MFA45	FJ425076	F: GGCTGAGTTTCATCTGATGCC R: TGGTCATGGAGTCCCTTC	(CAC) <sub>6</sub> (CAA) <sub>5</sub>	159	48	1.5
MFA48	FJ425090	F: GCAAATAGTGAGGACCCG R: ATCTGCCTGCCTCCATTC	(GT) <sub>24</sub> A(TG) <sub>5</sub>	147	58	1.5
MFB06	FJ787515	F: CTCTGCTGAAATGCCAAAGC R: TAAAGTAGCCGAGGACCAGT	(GCC) <sub>4</sub> (GCT) <sub>5</sub>	320	58	1.5
MFB07	FJ787516	F: AGGCAGGTGGATCGCAGT R: TCCCGAGTTCAAGGACAGC	A <sub>11</sub> CCAA(AAAC) <sub>6</sub>	201	56	1.0
MFB17	FJ787517	F: TACAAGCACAAGAACCTGAGT R: CCTCTAACTCATTGATATCTGTC	(GAGGCG) <sub>9</sub>	135	53	2.0
MFB20	FJ787518	F: TTCCTCCCAGTTGCAGCAGAC R: CACATCAAGGGTCCCACGAGT	(TTTG) <sub>5</sub> (TTTTG) <sub>3</sub>	140	54	1.0
MFB41	FJ787522	F: GACCATAAAGTGAGATGCTACC R: AGTGCTGGGATTAACG	(AAAC) <sub>9</sub>	237	52	1.5
MFB44	FJ787525	F: CAAGCGGGGGGTATCTCAC R: GGCAGGAGGCTTAGCGGAC	C <sub>11</sub> GAG(GAC) <sub>6</sub>	201	58	2.0
MFB47	FJ787526	F: TCCTCGGACTTTCACATC R: CCCTATCCCTCCAGTTT	(GGC) <sub>3</sub> (GC) <sub>3</sub> G <sub>3</sub> (CA) <sub>23</sub>	149	49	1.5

注: F 表示正向引物; R 表示反向引物。

2.4 东方田鼠种群的遗传多样性

2.4.1 微卫星标记的遗传多态性

10 个微卫星标记在 3 个东方田鼠种群中共检测到 110 个等位基因, 平均等位基因数为 11。各微卫星座位的观测等位基因数( $N_a$ )在 7~16 之间, 有效等位基因数( $N_e$ )在 2.6010~7.9963 之间, 观测杂合度( $H_o$ )为 0.2593~0.7778, 期望杂合度( $H_e$ )为 0.6194~0.8804, 多态信息含量( $PIC$ )的范围为 0.5700~0.8630(表 2)。根据 Botstein<sup>[6]</sup>的分类方法, 我们应用的 10 个东方田鼠微卫星标记均为具有高度多态性的微卫星标记( $PIC>0.5$ ), 其中 MFA23 座位的观测等位基因数最多, MFA04 座位的有效等位基因数最多且多态信息含量与观测杂合度的值也最高。

2.4.2 东方田鼠各种群内的遗传多样性

表 3 列出了东方田鼠各种群的观测等位基因数、有效等位基因数、观测杂合度、期望杂合度和多态信息含量等信息。比较 3 种群东方田鼠的上述各项遗传参数, 野生湖南种群均最高, 人工驯养的湖南种群次之, 人工驯养的宁夏种群最低。结果表明, 野生湖南种群东方田鼠的杂合子最多, 遗传信息含量最丰富; 人工驯养的宁夏种群东方田鼠的杂合子最少, 遗传信息含量亦最少。

2.4.3 基因型频率的 Hardy-Weinberg 检验

从表 4 可以看出, 根据  $\chi^2$  检验的结果, 在所检测的 10 个微卫星位点中, 人工驯养的宁夏种群东方田鼠有 7 个位点都处于遗传不平衡状态; 野生湖南种群东方田鼠除 MFB41 位点外, 其余 9 个位点均处于遗传平衡状态; 人工驯养的湖南种群东方田鼠有 4 个位点处于遗传不平衡状态。

3 讨论

用于微卫星研究的基因组文库一般有大插入片段文库、常规小插入片段文库和微卫星富集文库等。用微卫星富集文库筛选微卫星标记与其他基因组文库相比具有周期短、操作简便、效率高、可一次获得大量微卫星标记等优点, 特别适用于一些可利用序列信息较少的物种。

目前, 有关东方田鼠的基因组信息极少, 很难从已知序列中获得微卫星引物。有学者<sup>[3]</sup>试图从 RatMap、MGI、GenBank 等数据库中筛选出啮齿类动物中同源性较强的微卫星引物, 再经 PCR 扩增验证这些微卫星在东方田鼠的基因组中是否存在。然而, 在近 70 对候选微卫星引物中仅有 3 对有扩增产物, 而且该学者也未用测序等方法进行验证。可见, 这种寻找东方田鼠微卫星引物的方法不适用, 我们

表 2 东方田鼠各微卫星座位的基因组扫描信息

座位	样本量	等位基因 片段长度	观测等位 基因数	有效等位 基因数	观测杂 合度	期望杂合 度	多态信 息含量
MFA01	81	136~166	11	3.2257	0.6173	0.6943	0.6730
MFB06	81	305~332	7	2.6010	0.3457	0.6194	0.5700
MFA04	81	128~156	14	7.9963	0.7778	0.8804	0.8630
MFA08	81	227~259	12	5.0547	0.4691	0.8071	0.7770
MFA23	81	203~269	16	5.5019	0.6420	0.6724	0.7960
MFA45	81	153~180	7	2.8713	0.2593	0.7893	0.6150
MFA29	77	258~284	9	3.0127	0.5195	0.8233	0.6430
MFB47	81	123~159	13	4.6384	0.4321	0.6558	0.7550
MFB41	81	213~249	9	4.8243	0.5432	0.7930	0.7620
MFA48	81	123~149	12	4.7184	0.5802	0.7976	0.7620

表 3 东方田鼠各种群的基因组扫描信息

种群名称	观测等位基因数	有效等位基因数	观测杂合度	期望杂合度	多态信息含量
湖南(驯养)	5.8000	3.2849	0.6081	0.6608	0.6060
宁夏(驯养)	5.1000	1.9282	0.2478	0.4227	0.3870
湖南(野生)	8.2000	5.8970	0.7850	0.8228	0.7740

表 4 东方田鼠各微卫星座位的 $\chi^2$ 值

座位	湖南(驯养)	宁夏(驯养)	湖南(野生)
MFA01	71.4069**	0.8188	40.7750
MFB06	62.0899**	59.3454**	1.7004
MFA04	70.6928**	92.6596**	42.2762
MFA08	10.6477	94.5522**	58.6616
MFA23	10.8562	9.9919	70.5667
MFA45	0.1880	74.0675**	11.6240
MFA29	8.8253	5.6130	9.2648
MFB47	10.8454	98.7748**	50.4902
MFB41	94.7702**	48.0317**	56.5578**
MFA48	18.3382	59.2279**	31.5133

注: \*\* $P < 0.01$ , 差异极显著。

还须从东方田鼠自身的基因组文库中来筛选微卫星分子标记。

本研究利用链霉亲和素磁珠构建的东方田鼠微卫星富集文库, 阳性克隆率达 81.4%, 与 Cheng 等<sup>[7]</sup>和王登等<sup>[8]</sup>构建的常规小插入片段文库相比, 微卫星富集文库的克隆效率提高了数十至数百倍, 与 Kandpal 等<sup>[9]</sup>、Edwards 等<sup>[10]</sup>和 Fischer 等<sup>[11]</sup>构建的微卫星富集文库的克隆效率相当。根据 Weber<sup>[12]</sup>提出的分类标准, 按照微卫星核心序列排列方式的不同, 将微卫星序列分为完美型(perfect)、非完美型(imperfect)和复合型(compound)3 类。在 92 个东方田鼠微卫星序列中, 完美型 51 个, 占 55.4%; 非完美型 19 个, 占 20.7%, 复合型 22 个, 占 23.9%。结果表明, 完美型微卫星序列为东方田鼠微卫星序列的优势类型, 这一特征与人<sup>[12]</sup>和其他动植物<sup>[13-15]</sup>的研究结果相一致。

研究结果显示, 我们分析的 10 个东方田鼠微卫星标记的等位基因数、杂合度、多态信息含量的值均较高, 均为具有高度多态性的微卫星标记, 可用于东方田鼠的遗传多样性分析。利用这 10 个微卫星标记对野生和人工驯养的东方田鼠种群分析发现, 野生湖南种群东方田鼠的等位基因数最多, 多态信息含量也最丰富, 遗传变异程度最高。人工驯养的湖南种群东方田鼠由于在长期的封闭繁殖中没有外来血缘的加入, 其微卫星的杂合度和多态信息含量略有下降, 遗传多样性水平降低。而人工驯养的宁夏种群东方田鼠的较多等位基因已丢失, 很多位点已趋于纯合。研究结果提示我们, 今后在这两个人工

驯养的东方田鼠种群的繁育工作中, 可以考虑给湖南种群适当导入外血以丰富其遗传信息含量; 而宁夏种群则可以培育成近交系动物利用。

在一个无限大的随机交配群体内, 如果没有选择、突变、迁移和遗传漂变等情况的发生, 等位基因频率和基因型频率应随世代的增加而保持不变, 这是 Hardy-Weinberg 平衡定律的核心内容。野生湖南种群东方田鼠除个别微卫星位点外, 其余基本处于遗传平衡状态, 表明野生湖南种群东方田鼠在自然状态下仍维持着良好的遗传结构。人工驯养的宁夏种群东方田鼠在封闭繁殖的十多年间曾经由于种种原因, 种群缩小至 50 只以下, 导致很多微卫星位点的杂合度降低, 部分基因丢失, 从而使该种群在大多数微卫星位点都打破了 Hardy-Weinberg 遗传平衡。人工驯养的湖南种群东方田鼠经过十多年的封闭繁殖其近交程度也有一定提高, 导致少数几个位点也不符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡。当然, 由于样本量还不足够大, 也不排除是随机抽样误差的可能性, 这需要在今后扩大样本量的基础上进行验证。

综上所述, 我们所建立的东方田鼠微卫星富集文库的质量是较高的, 可用于大规模测序筛选微卫星标记, 为东方田鼠的群体遗传结构分析、遗传连锁图谱构建及分子进化研究等提供大量的分子标记, 从而为东方田鼠的种群控制与开发利用提供分子遗传学依据。

#### 参考文献(References):

- [1] 郑智民, 姜志宽, 陈安国. 啮齿动物学. 上海: 上海交通大学出版社, 2008: 172-174.
- [2] Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Human Genet*, 1989, 44(3): 388-396.
- [3] 苏志杰, 俞远京, 周智君, 马亚东, 唐运安. 用数据库搜索法寻找东方田鼠微卫星引物. *中国现代医学杂志*, 2008, 18(9): 1212-1214.
- [4] Bloor PA, Barker FS, Watts PC, Noyes HA, Kemp SJ. Microsatellite-enriched library construction. <http://www.genomics.liv.ac.uk/animal/Protocol1.html>.
- [5] 谢建云, 邵伟娟, 胡建华, 高诚. 微卫星技术对近交系小鼠遗传质量的分析. *中国比较医学杂志*, 2007, 17(9): 511-515.
- [6] Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction

- fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*, 1980, 32(3): 314–331.
- [7] Cheng HH, Levin I, Vallejo RL, Khatib H, Dodgson JB, Crittenden LB, Hillel J. Development of a genetic map of the chicken with markers of high utility. *Poult Sci*, 1995, 74(11): 1855–1874.
- [8] 王登, 施大钊. PCR 方法筛选布氏田鼠小片断插入微卫星文库. *草地学报*, 2007, 15(3): 278–282.
- [9] Kandpal RP, Kandpal G, Weissman SM. Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping clones, and hybridization selection for region-specific markers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(1): 88–92.
- [10] Edwards KJ, Barker JH, Daly A, Jones C, Karp A. Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. *Biotechniques*, 1996, 20(5): 758–760.
- [11] Fischer D, Bachmann K. Microsatellite enrichment in organisms with larger genomes (*Allium cepa* L.). *Biotechniques*, 1998, 24(5): 796–800, 802.
- [12] Weber JL. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub>•(dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. *Genomics*, 1990, 7(4): 524–530.
- [13] 李齐发, 赵兴波, 罗晓林, 姚平, 李宁, 田志华, 吴常信, 谢庄. 牦牛基因组微卫星富集文库的构建与分析. *遗传学报*, 2004, 31(5): 489–494.
- [14] 佟广香, 闫学春, 匡友谊, 梁利群, 孙效文, 王爱民, 王嫣. 马氏珠母贝微卫星快速分离及遗传多样性分析. *海洋学报*, 2007, 29(4): 170–176.
- [15] 邓玉营. 黄花柳微卫星富集文库构建及标记筛选[学位论文]. 南京: 南京林业大学, 2005.

## • 综合信息 •

### 欢迎订阅 2012 年《基因组学与应用生物学》

《基因组学与应用生物学》是由广西大学主管和主办, 公开发行的双月刊科学期刊。广西大学聘请中国农业大学李宁院士任主编, 北京大学教授朱玉贤博士和海南省热带农业资源研究所所长方宣钧博士任执行主编, 国内众多的著名学者出任编委。

《基因组学与应用生物学》主要刊登现代生物技术的前沿学科和基础学科如基因组学、分子细胞遗传学、生化与分子生物学、应用生物学等相关的原始研究成果。刊登植物、动物及微生物领域的生物在组织、器官、细胞、染色体、蛋白质、基因、酶、发酵工程等不同水平上的现代生物技术等基础与应用基础研究的成果。本刊按国际标准编排, 题目摘要、图表、引用文献等均实行中英文对照, 同行评审发表模式。

《基因组学与应用生物学》, 前身是原《广西农业大学学报》, 创刊于 1982 年。广西农业大学合并入广西大学以后更名为《广西农业生物科学》。《广西农业生物科学》已入编《中文核心期刊要目总览》2008 年版(即第五版)之综合性农业科学类的核心期刊, 是中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊, 也是中国科技核心期刊即中国科技论文统计源期刊。2001 年入选国家新闻出版总署“中国期刊方阵”, 先后被国际知名检索系统——英国国际农业与生物科学研究中心(CABI)、美国《化学文摘》(CA)、美国《剑桥科学文摘: 自然科学》(CSA: NS)、英国《动物学记录》(ZR)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)等收录。

承载着《广西农业生物科学》的历史与荣誉, 《基因组学与应用生物学》将在新的高度开拓奋进, 为现代生命科学和应用生物学的研究与发展提供学术交流的平台, 使之成为中国科学家走向世界的桥梁。

《基因组学与应用生物学》《Genomics and Applied Biology》, ISSN1674-568X, CN45-1369/Q, 双月刊, 双月 28 日出版, 国内定价: ¥40.00/期, ¥240.00/年; 国际定价: \$40.00/期, \$240.00/年。

#### 邮局汇款

地址: 广西南宁市大学东路 100 号广西大学西校园榕江路《基因组学与应用生物学》编辑部

收款单位: 《基因组学与应用生物学》编辑部

邮编: 530004 联系电话: 0771-3239102, 0771-3232621 传真: 0771-3232621

投稿邮箱: gab@hibio.org; gab@sophiapublisher.com

网址: www.genoapplbiol.org; www.gab.chinese.sophiapublisher.com