

微卫星方法简介*

张艳 张树义

(中国科学院动物研究所 北京 100080)

关键词 微卫星 分子生态 应用

80年代以来,分子生物学技术与方法已成为进化生物学、保护遗传学、生态学等诸多领域非常重要和崭新的研究工具。而摆在人们面前可供选择的分子生物学方法又有许多种,如同工酶(allozymes)、限制性片断长度多态性(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)、多位点或单位点小卫星(Multi-locus or Single-locus Minisatellites)以及随机扩增多态DNA(Randomly Amplified Polymorphic DNA, RAPD)。其中每种方法都具有自己明显的不足之处,比如:同工酶标记物由于位点多态性低、变异低而不能很好地被用来估计群体内部个体之间的亲缘关系,这在研究濒危物种时显得尤为突出;小卫星探针由于其片断长而难以获得;RAPD方法稳定性和重复性较差。目前,随着人们对微卫星(Microsatellites)方法认识的不断深入,这一技术和手段越来越为研究者们所青睐。

微卫星(又名简单序列)是由串联重复序列组成,每单元长度在1~10bp之间,如(TG)_n或(AAT)_n^[1-3],广泛分布于真核基因组中^[4],因重复单元数目不同而呈现高度多态性^[5]。

1 微卫星的产生历程

生物学家在20世纪70年代就已经知道真核基因组中存在着短串联重复位点,但直至1982年Hamada等^[6]发现从酵母到脊椎动物中的多拷贝多聚(dT-dG)时,这些序列的数目之大和存在之广泛才显现出来。这一发现后来被Tautz和Renz^[7]所证实:他们用不同微卫星序列与不同有机体中的基因组DNA杂交,发

现存在着许多类型的简单序列。1985年,Jeffreys等^[8]发现了人基因组中有更长重复单元的超变串联重复序列,即小卫星DNA(Minisatellite)。与微卫星一样,小卫星的串联重复单位的数目也显示出可变性,因此二者被统称为可变数目串联重复位点(Variable Number of Tandem Repeats VNTRs)^[2]。但在用于探针方面,小卫星稍逊于微卫星。

2 微卫星方法的优点

微卫星之所以成为当前研究者最为喜爱的分子生物学方法之一,其原因有如下几点:

(1)微卫星位点可通过PCR扩增 小卫星受限缘于以下两点:第一、小卫星的等位基因一般比较大;第二、PCR在扩增大于10kbDNA序列时有一定局限性。一个高度多态序列的等位基因在小于500bp或在较小范围内波动是理想的,因为这些位点上的多态性可以用PCR及凝胶电泳分析,而微卫星序列就很好地符合了以上标准。也正因为微卫星位点可以通过PCR扩增,使得它比其余方法(除RAPD外)有更多的实际应用上的优势。首先,使样品量减少,行为学家可用来调查个体非常小的有机体交配关系;保护遗传学家可用非损伤取样法获得样品,这在濒危物种的研究方面尤显重要。微卫星位点已从唾液、精液、粪便^[9]、毛发^[10]和羽毛^[11]的毛细胞中扩增出来。其次,微卫星序列短,既

* 中国科学院“百人计划”项目资助;

第一作者简介:张艳,女,24岁,硕士

使降解的 DNA 也可能包含足够用来扩增的微卫星位点序列(在这方面,微卫星甚至优于 RAPD 和具有更长目的基因序列的可扩增 VN-TRs),这一特点使那些保存差的样品也可能成为有价值的研究材料。例如,研究者已从有 1850 年历史的埃及木乃伊中扩增出微卫星位点^[9]。这一特点也意味着工作者在野外收集材料及运输过程中的工作量大大降低。

(2)微卫星引物的通用性 微卫星的一个具有潜在价值的特征是从一个物种产生的引物可以应用于相关的分类群,而这一特征总体来说不为小卫星所具有。如在一种鲸基因库中确认的微卫星位点的 PCR 引物已经成功地应用于许多其它相关物种中^[12];一些人类的引物可应用于非人灵长类动物^[10]等等。如果证明许多微卫星引物具有广泛的分类范围,那么在基因组文库的发展和筛选上将会花费更少的时间和精力。

(3)高质量的信息 微卫星位点的多态性使其具有较高的信息量,但该信息量的质量又如何呢?一个遗传标记物所提供的信息质量无非是看它是否能前后一致、客观地产生可计数的产物,以及能否精确地反映出潜在遗传差异性和这些差异是否具有代表性。而第一个要求实际上表现为产生的条带是否能前后一致。在 RAPD 及 DNA fingerprinting (DFP) 中,会有许多强度不一的条带,不同的实验条件可能产生不同甚至错误的结果。而在微卫星 PCR 中则不存在这样的问题,因为微卫星 PCR (同 allozyme) 每个样品应该只产生一条带或两条同样深度的带,虽然在实际应用中要稍比这复杂些。

另外,更麻烦的是在什么时候认为两条带是完全相同的呢?这个问题在不同的胶间进行比较时显得尤为突出。微卫星虽然有更多的等位基因,但它在不同的胶间却易于进行比较,其原因:第一、在同一胶上的序列梯度能提供分辨率达一个碱基对的差异^[1-3];第二、微卫星等位基因一般通过一两个参照个体的条带朝上或朝下计数即可获得,这是因为 PCR 能允许多次

使用同一参照个体,且微卫星条带的差别通常是可预测的(成倍数关系)。当条带出现较稳定时,除非它能正确清楚地反映出潜在的基因,否则也不能说明问题。多位点方法的困难之一是来自不同位点但具有相同大小的等位基因可能产生混淆。如果等位基因不能确定出它所反映的位点,估计一些遗传参数则更为困难。也许共享条带对于亲缘鉴定仍具有一定的意义,但需要知道一定的亲缘背景。而微卫星却不存在这个问题,因为它可通过设计者精心设计不同长度的微卫星位点的引物而避免,这样 PCR 扩增出来的条带会互不重叠^[2-3]。

影响信息质量的另两点因素。微卫星具有很高的多态性但其突变率却低于 10^{-4} ,在二者之间有了一个很好的平衡。而 DFP 和 VNTRs 突变率很高(5×10^{-2}),在进行亲子鉴定时,有可能一个突变事件就会导致错误的父子关系的判断。此外,遗传标记物作为一种中性标记是最理想的。如果它具有高度选择性,则就不再具有广泛的标记作用,因为它只代表其自身。在这方面 DNA 标记物,尤其是非编码区的标记物,要优于蛋白质标记物如同工酶。虽然对微卫星的进化仍需进一步的研究,但单从微卫星如此庞大的数目上来看,一个典型的微卫星位点不可能经过太严格的进化上的精心筛选。

(4)微卫星是共显标记物 微卫星同大多数同工酶和 RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) 一样,是很好的共显标记物。多位点的指纹图谱和 RAPD 通常仅可被解释为显性标记,杂合子看起来就象一种纯合子。用显性标记来估计表现型参数更困难。

3 微卫星位点的获得及其应用

微卫星具有很多优点:高度多态性、能用 PCR 扩增、高质量的信息、取材简便易行。但在使用微卫星方法之前,如何获得所需要的微卫星位点?大致有三条途径:第一、寻找已存在的微卫星引物;第二、使用与所研究物种亲缘关系较近物种的引物;第三、用经典分子生物学方法克隆所需要的微卫星位点^[13]。一旦拥有微

卫星位点,便可自行选择作探针或作引物。

随着人们对微卫星位点认识的不断深入,用微卫星方法进行的研究也越来越多。下面简要概括微卫星应用的几个方面。

(1) 杂交(Hybridization) Roy 等^[14]用微卫星进行种间杂交,他用来自家养狗的 10 个多态系统来检查在灰狼和草原狼杂交地段的等位基因频率的干扰,以及已知无杂交情况发生地段二者等位基因的情况,结果显示杂交种群的灰狼和草原狼具有相同的等位基因频率。更重要的是基因流动无方向性,只是杂交灰狼的等位基因频率受到严重干扰。

(2) 种群研究 利用微卫星进行种群内和种群间两种研究。如 MacHugh 等^[15]用 2 个微卫星位点分析了 6 个不同品系的欧洲牛间的遗传差异,并计算了遗传距离,建立了树状图,显示的结果与已知各自品系牛的遗传历史一致。到目前为止,种群内遗传差异的研究工作做得较多。比如在研究一个发生过瓶颈现象的濒危物种——北方毛鼻袋熊时^[16],用 16 个微卫星位点检查它们之间的遗传差异性水平,结果发现其水平远远低于与其有紧密亲缘关系的远系繁殖种——南方毛鼻袋熊。这种微卫星多态性的降低表明此物种曾经历过持续 120 年仅有 10~20 只个体的瓶颈现象。另外在社会性昆虫的研究中,由于微卫星比同工酶有更大的多态性,在做父子排除时,用更少的微卫星位点就可解决,因此用微卫星方法进行这方面研究的报告也不断增多。

(3) 亲缘关系和繁殖成功度(Relatedness and Reproductive Success) 用微卫星来估计自然状态下种群的亲缘关系和繁殖成功度已有报告。Morin 等^[17]用人类微卫星位点来检查自由生活状态下的黑猩猩种群的亲缘关系、社会结构和父子关系,使其得以验证种群内关于亲缘关系的假说。另外 Morin 等^[18]还分析了同群个体间的父子关系。

总之,微卫星在未来保护遗传学中扮演着非常重要的角色,在自然状态和笼养状态种群遗传差异性评估的应用上受到较少限制。尤其

是微卫星可用非损伤性取样法获得大量多态性标记,给濒危物种的研究带来了极大的方便。虽然有人认为微卫星不适于种及种以上水平的研究,但 Goldstein 等^[19]研究表明,对于即使在几百万年之前已分化的物种,如果遗传距离是建立在重复数目上,微卫星仍可能是一个合适的分子生物学方法。当然在使用分子方法的时候,仍需要“量体裁衣”,即考虑用不同分子方法解决不同问题的有效性、可靠性和适用性。

参 考 文 献

- 1 Litt, M., J. A. Luty. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of dinucleotide repeats within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 1989, 44:397~401
- 2 Tautz, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid. Res.*, 17:6463~6471
- 3 Weber, J. L., P. E. Mary. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed, using polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.*, 1989, 44:388~396
- 4 Gyapay, G., J. Morissette, A. Vignal, C. Dib, C. Fizames, P. Millasseau, S. Mare, G. Bernardi, M. Lathrop, J. Weissenbach. The 1993~1994 Genethon human linkage map *Nature Genetics*, 1994, 7:246~339
- 5 Amos, B., C. Schlotterer, D. Tautz. Social Structure of pilot whales revealed by analytical DNA profiling. *Science*, 1993, 260:670~672
- 6 Hamada, H., M. Pirino, T. Kakunaga. A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, 1982, 79:646~6469
- 6 Hamada, H., M. Pirino, T. Kakunaga. A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, 1982, 79:646~6469
- 7 Tautz, D., M. Renz. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryote genomes. *Nucleic Acids. Res.*, 1984, 17:6463~6471
- 8 Jeffreys, A. J., V. Wilson, L. Thein. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature*, 314:67
- 9 Hoss, M., M. Kohn, S. Paabo, F. Knauer, W. Schroder *Nature*, 1992, 359:199
- 10 Martin, R., A. Duxson, E. Wickings. Paternity in Primate. *Genetic Tests and Theories.*, Karger, swiss:1992

- 11 Ellegren, H. Bacterial choice DNA typing of museum birds. *Nature*, 1991, **354**:113
- 12 Schlotterer, C., W. Amos, D. Tautz. Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. *Nature*, 1991, **354**:63~65
- 13 Rassmann, K., C. Schlotterer, D. Tautz. Isolation of simple sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *Electrophoresis*, 1991, **12**: 113 ~ 118
- 14 Rog, M. S., E. Geffen, D. Smith, O. Ostrander, R. K. Wayne. Patterns of differentiation and hybridization in North American wolflike canids, revealed by analysis of microsatellite loci. *Mol. Biol. Evol.*, 1994, **11**:553~570
- 15 MacHugh, D. E., R. T. Loftus, D. G. Bradley, P. M. Sharp, P. Cunningham. Microsatellite DNA variation within and among European Cattle breeds. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 1994, **256**:25~31
- 16 Taylor, A. C., W. B. Sherwin, R. K. Wayne. Genetic variation of simple sequence loci in a bottlenecked species: The decline of the northern hairy-nosed wombat (*Lasiorhinus krefftii*). *Mol. Ecol.*, 1994, **3**:277~290
- 17 Morin, P. A., J. J. Moore, R. Chakraborty, L. Jin, J. Goodall, D. S. Woodruff. Kin selection, social structure, gene flow and the evolution of chimpanzees. *Science*, 1994, **265**:1193~1201
- 18 Morin, P. A., J. Wallis, J. J. Moore, D. S. Woodruff. Paternity exclusion in a community of wild chimpanzees using hypervariable simple sequence repeats. *Mol. Eco.*, 1994, **13**: 469~478
- 19 Goldstein, D. B., A. R. Linares, L. L. Cavalli-Sforza, M. W. Feldman. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics*, 1995, **139**:463~471