

我国不同地区小鼠 Y 染色体 Zfy1 基因遗传差异分析

陈梦璇¹, 于立强², 靖美东^{1*}

(1. 鲁东大学生命科学学院, 山东烟台 264025; 2. 山东省烟台第三中学, 山东烟台 264000)

摘要 [目的]对我国5个地区小鼠 Zfy1 基因进行遗传差异分析。[方法]通过对5个地区79个雄性小鼠样品进行DNA提取,PCR扩增后进行序列测定和分析。使用MEGA6.0和DNAsp等软件对获得序列进行分析,计算遗传距离,构建系统发育树。[结果]5个地区 Zfy1 基因碱基组成基本一致,碱基的平均含量为A 25.1%、T 39.6%、G 20.8%、C 14.4%,呈现出明显的AT偏向。79个样品共定义为13个单倍型,各单倍型间遗传距离小,无明显差异。以大鼠(GATN01000010)为外群,小鼠(NM_009570)为参照构建系统发育树,13个单倍型均处在同一分支上,无明显分化现象。[结论]我国南北方各区间小鼠 Zfy1 基因无明显分化现象,基因差异性较小,具有极高的保守性。

关键词 小鼠;Y染色体;Zfy1基因;遗传差异

中图分类号 Q75 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)08-0090-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2019.08.023



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Genetic Difference Analysis of Zfy1 Gene on Y Chromosome of Mice in Different Regions of China

CHEN Meng-xuan¹, YU Li-qiang², JING Mei-dong¹ (1. School of Life Sciences, Ludong University, Yantai, Shandong 264025; 2. Yantai No. 3 Middle School, Yantai, Shandong 264000)

Abstract [Objective] To analyze the genetic difference of Zfy1 gene in 5 regions of China. [Method] DNA was extracted from 79 male mouse samples in 5 regions, and the sequence was determined and analyzed after PCR amplification. MEGA6.0, DNAsp and other software were used to analyze the sequences, and the genetic distance was calculated and the phylogenetic tree was constructed. [Result] The base pair composition was consistent among 5 regions. The average contents of the bases were 25.1% A, 39.6% T, 20.8% G, and 14.4% C, showing a significant AT bias. A total of 79 samples were defined as 13 haplotypes, and there was no significant difference in genetic distance of each haplotype. The phylogenetic tree was constructed with rat GATN01000010 as the outgroup and mouse (NM_009570) as reference. 13 haplotypes were clustered into the same branch, without obvious differentiation. [Conclusion] There was no obvious differentiation of Zfy1 gene in mice from north to south in China, and the genetic difference was small, Zfy1 gene had high conservation.

Key words Mice; Y chromosome; Zfy1 gene; Genetic difference

小鼠(*Mus musculus*)隶属啮齿目(Rodentia)鼠科(Muridae)小家鼠属(*Mus*)^[1],体型较小,一般情况下其体长为70~75 mm,体重7~20 g,尾长略短于身长或与体长相当,背部通常呈灰棕色或灰褐色,腹部毛色为白色。小鼠是一种重要的模式生物,在医学和生物等领域均被广泛利用^[2-6]。目前关于小鼠的起源及分布主要有2种模型。一种为离心模型(centrifugal model)^[7],研究者通过蛋白质电泳线粒体DNA分析,印度及其附近地区的小鼠与欧洲和亚洲边缘种群相比有更高水平的遗传多态性。因此,提出小鼠起源于印度北部,然后分别向西、向北和向东幅射扩张形成*M. m. domesticus*、*M. m. musculus*和*M. m. castaneus*3个亚种^[7]。另一模型是在20世纪90年代末提出的,被称为顺序模型(sequential model)或线性模型(linear model)^[4],认为原始的小鼠是domesticus-like这一亚种,起源于亚洲西部及中部这一区域。domesticus-like种群最初生活在亚洲的底格里斯河和幼发拉底河流域附近,随着人类活动的迁徙,逐渐向南迁移到达阿拉伯半岛南部地区,然后向东、向北进入亚洲印度次大陆,形成了castaneus-musculus种;最后castaneus-musculus种在亚洲大陆内部进行了分化,形成现今的3个亚种^[8-9]。我国小鼠主要有2个亚种:一是北方亚种(*M. m. musculus*),二是南方亚种(*M. m. castaneus*)。

哺乳动物的性别由性染色体决定,在以往的研究中发现性染色体是由1对长度相同的染色体进化而来的^[10]。在进化过程中Y染色体逐渐退化,且Y染色体上丢失的基因数量约为X染色体上的2倍^[11]。Y染色体由长臂和短臂组成,长臂上逐渐形成的雄性特异区(MSY)是非重组区域,不会与X染色体发生重组,但可发生自身重组,因此Y染色体有高度进化、执行雄性特异功能的特点^[12-15]。

ZFY基因是位于Y染色体上的一个特异性基因,其作用是与X染色体上的ZFX基因构成1对等位基因,用以编码锌指蛋白^[16],ZFY基因有更高的突变率、遗传变异程度较高等特点^[17-18]。20世纪80年代末,Affara等^[19]通过对ZFY基因的序列分析及精确定位,提出人类Y染色体上的锌指蛋白基因定位即小鼠Y染色体上的Zfy1和Zfy2基因,通过比对发现Zfy1基因与人类有较高的同源性。小鼠ZFY基因位于Y染色体短臂,包含11个外显子和1个随机重复区域“锌指”结构,“锌指”结构由2个组氨酸和2个半胱氨酸构成^[20-21]。在减数分裂时期,Zfy1基因在减数分裂性染色体粗线期失活,并在减数分裂性染色体失活时期起主导作用^[21]。笔者对我国5个地区共79只雄性小鼠Zfy1基因进行序列分析与比较,以GenBank中褐家鼠(*Rattus norvegicus*, GATN01000010)为外群,*M. m. musculus*(NM_009570)为参照进行单倍型定义及系统发育树构建,以期为我国小鼠亚种分布及进化提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集与保存 在全国多个地区使用捕鼠夹或鼠笼

基金项目 国家自然科学基金项目(31371252)。

作者简介 陈梦璇(1993—),女,山东淄博人,硕士研究生,研究方向:分子生态学。*通信作者,副教授,博士,硕士生导师,从事分子生态与进化研究。

收稿日期 2019-02-11

进行样品采集。捕获后的小鼠样品根据 Corbet 等^[22]的物种描述进行鉴定。野外采样后,选取小鼠适量肌肉组织或剪切适量尾部保存于无水乙醇中,带回实验室后在低温条件(-80℃)下保存。采集样品覆盖全国各地,共 79 个小鼠样品,每个地区样品均在 5 个以上。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取。将采集的样品组织剪取适量置于 1.5 mL 离心管中,充分剪碎研磨,后续使用 Promega 试剂盒进行总 DNA 的提取。使用 2.0%的琼脂糖凝胶电泳进行 DNA 检测,并将提取的 DNA 置于冰箱中冷冻保存,备用。

1.2.2 PCR 扩增。设计引物由上海生工生物工程有限公司完成,并根据实际情况,调整退火温度。在该试验中通过梯度 PCR 确定扩增 Zfy1 基因的最适退火温度为 57℃,退火时间 30 s。PCR 反应体系(50 μL)如下:0.5 μL 模板 DNA,引物各 1 μL,25 μL Premix Taq,22.5 μL 双蒸水。PCR 反应程序如下:94℃预变性 3 min;94℃变性 30 s,56℃退火 30 s,72℃延伸 90 s,共 35 个循环;72℃延伸 10 min;温度降至室温,10℃下保存。

1.2.3 序列处理及分析。将 PCR 扩增产物送至上海生公进行纯化与测序。将测序结果使用 Chromas 软件确定使用片段。确定无误后,使用 Seqman 软件进行序列剪切与拼接。最后,将每条序列进行 BLAST 检测,确定为小鼠 DNA 序列。利用 MEGA 软件,将所有序列整合比对。利用 MEGA6.0、Dnasp 4.0 和 DAMBE 等软件进行后续序列分析。

2 结果与分析

2.1 各地区碱基含量 将得到的 79 个序列导入 MEGA 6.0 软件比对对齐后,剪切了 609 bp 的基因片段用于分析。对各地区间序列碱基组成分析结果见表 1。由表 1 可知,在各地区间碱基差异不明显;5 个地区的样品均表现出明显的 AT 碱基偏向,这一现象在以往的小鼠基因分析研究中也被发现,在哺乳动物中是普遍现象。

2.2 单倍型组成 将全部序列导入至 DAMBE 中进行单倍型定义及分析。79 个样品中共发现 10 个变异位点[variable

(polymorphic) sites, V],其中单态位点(singleton variable sites,S)3 个、简约性信息位点(parsimonyinformative sites,Pi)7 个,共定义了 13 个单倍型,分别为 H1 HN44;H2 XJ2243, XJ1374, XJ2245;H3 XJ2248;H4 XJ1358;H5 XJ1364, XJ1343, XJ1372, XJ1359, XJ1327;H6 SH40, XJ1320;H7 XJ1348, XJ1322, XJ1338, XJ2227, XJ1354, XJ1335, XJ1374, XJ1329, XJ1337, XJ1380, XJ1321, XJ1373, XJ1319, XJ1375, XJ1333, XJ1317, XJ1324, XJ1328, XJ1376, XJ1356;H8 MH58;H9 MH47;H10 MH62;H11 YM56;H11 HN29,HN24,HN40,SH15, SH2, SH6, SH30, SH33, SH26, SH4, MH56, MH50, MH51, MH43.2, YM39;H13 HN26, HN34, HN22, HN21, HN1, SH14, SH18, SH8, SH10, SH7, SH13, SH39, SH41, SH45, SH19, SH17, MH37, MH49, MH43, MH44, MH51, MH46, YM69, YM78, YM6, YM59。其中,共享单倍型有 3 个,分别为 H6、H11、H13,主频单倍型为 H13,由 26 个序列组成。

表 1 不同地区样品序列片段的碱基含量

Table 1 Base content of Zfy1 gene in different regions of China %

地区 Region	A	T	C	G	A+T
HN	25.1	39.6	14.5	20.8	64.7
SH	25.2	39.6	14.4	20.8	64.8
XJ	25.0	39.6	14.4	21.0	64.6
MH	25.2	39.5	14.5	20.8	64.7
YM	25.2	39.6	14.4	20.8	64.8
平均 Average	25.1	39.6	14.4	20.8	64.7

注:各序列长度均为 609 bp

Note:Each sequence was 609 bp in length

2.3 单倍型遗传距离 将 5 个地区共 79 个小鼠样品所定义的 13 个单倍型与 GenBank 中下载的小鼠 Zfy1 基因序列为参照,以褐家鼠序列为对比进行单倍型间遗传距离分析。由表 2 可知,各单倍型间的遗传距离较小(0.000~0.008),由此可知单倍型间小鼠 Zfy1 基因并没有明显的差异,遗传分化较少。将 5 个地区间的小鼠 Zfy1 基因序列进行遗传距离分析,结果见表 3。由表 3 可知,5 个地区小鼠 Zfy1 基因并无明显差异,南北方小鼠并没有出现明显的遗传分化现象。

表 2 小鼠 Zfy1 基因各单倍型间遗传距离

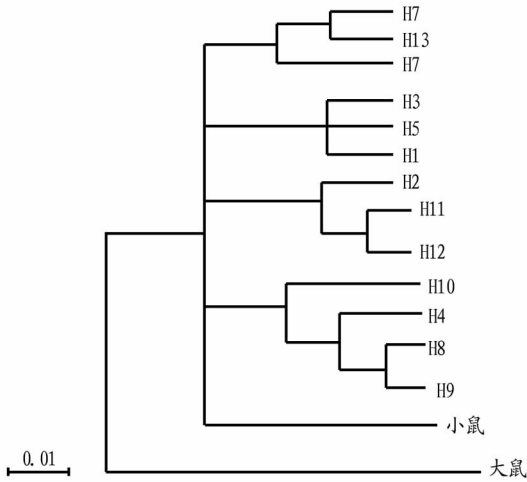
Table 2 The genetic distance of Zfy1 gene in mice among different haplotypes

单倍型 Haplotypes	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	小鼠 Mice	大鼠 Rat
H1	—														
H2	0.005	—													
H3	0.007	0.003	—												
H4	0.008	0.008	0.005	—											
H5	0.008	0.003	0	0.005	—										
H6	0.005	0.005	0.002	0.003	0.003	—									
H7	0.008	0.003	0	0.005	0	0.003	—								
H8	0.007	0.008	0.005	0	0.005	0.003	0.005	—							
H9	0.007	0.008	0.005	0	0.005	0.002	0.005	0	—						
H10	0.005	0.005	0.007	0.003	0.007	0.005	0.008	0.002	0.002	—					
H11	0.003	0.003	0.005	0.005	0.005	0.002	0.005	0.006	0.005	0.003	—				
H12	0.003	0.002	0.005	0.005	0.005	0.003	0.005	0.005	0.005	0.002	0	—			
H13	0.005	0.005	0.003	0.003	0.003	0	0.003	0.003	0.003	0.005	0.002	0.002	—		
小鼠 Mice	0.005	0.006	0.005	0.006	0.004	0.006	0.007	0.007	0.008	0.005	0.002	0.005	0.002	—	
大鼠 Rat	0.120	0.115	0.154	0.135	0.115	0.124	0.118	0.126	0.152	0.138	0.106	0.120	0.115	0.111	—

表3 小鼠 *Zfy1* 基因各地区间遗传距离Table 3 The genetic distance of *Zfy1* gene in mice among different regions

地区 Region	HN	SH	XJ	MH	YM
HN	—				
SH	0.002	—			
XJ	0.003	0.001	—		
MH	0.002	0.002	0.002	—	
YM	0.002	0.001	0.001	0.002	—

2.4 系统发育树分析 Y染色体上的基因由于其特殊的形态结构和其本身的退化机制等原因具有较强的保守性。该研究以褐家鼠为外群,以小鼠为参照构建系统发育树,结果如图1所示。由图1可知,13个单倍型均在同一分支上,并没有明显的分支现象。13个单倍型均与小鼠在同一分支上,表明13个单倍型间没有明显的分化现象。

图1 小鼠 *Zfy1* 基因系统发育树分析Fig.1 Phylogenetic tree analysis of *Zfy1* gene in mice

3 结论

长久以来,我国小鼠的亚种分布及迁徙路线问题一直是我国小鼠相关研究者的关注热点之一。笔者对我国南北方5个地区共79个小鼠样品进行DNA提取及后续序列扩增分析,发现扩增到的*Zfy1*基因序列片段在609 bp左右,79个样本共定义了13个单倍型。各单倍型之间碱基组成差异不大,通过计算各单倍型之间遗传距离与各地之间种群遗传距离可知,小鼠*Zfy1*基因序列较为保守,并无明显分化现象。以GenBank *M.m.musculus*的*Zfy1*片段为参照,以褐家鼠*Zfy1*基因序列为外群进行系统发育树构建。结果显示,13个单倍型均聚在同一分支上,说明由于Y染色体在进化过程中严格遵循父系遗传,进化过程极度保守,我国南北方小鼠Y染色

体*Zfy1*基因无明显遗传分化现象。

参考文献

- [1] 朱琼蕊,郭宪国,黄辉.小家鼠的研究现状[J].热带医学杂志,2014,14(3):392-396,401.
- [2] 李菁菁,张亚平.小家鼠的遗传与进化研究进展[J].动物学研究,2001,22(5):406-412.
- [3] PRAGER E M,SAGE R D,GYLLENSTEN U,et al.Mitochondrial DNA sequence diversity and the colonization of Scandinavia by house mice from East holstein[J].Biological journal of the linnean society,2008,50(2):85-122.
- [4] BOURSOT P,AUFFRAY J,BIRTON-DAVIDIAN J,et al.The evolution of house mice[J].Annual review of ecology & systematics,1993,24(1):119-152.
- [5] POCOCK M J O,HAUFFE H C,SEARLE J B.Dispersal in house mice[J]. Biological journal of the linnean society,2005,84(3):565-583.
- [6] CORTI M,CAPANNA E,ESTABROOK G F.Micro evolutionary sequences in house mouse chromosomal speciation[J].Systematic zoology,1986,35(2):163-175.
- [7] BOURSOT P,DIN W,ANAND R,et al.Origin and radiation of the house mouse;Mitochondrial DNA phylogeny[J].Journal of evolutionary biology,1996,9(4):391-415.
- [8] GERALDES A,BASSET P,GIBSON B,et al.Infering the history of speciation in house mice from autosomal,X-linked,Y-linked and mitochondrial genes[J].Molecular ecology,2008,17(24):5349-5363.
- [9] BOHLING J H,WAITTS L P.Assessing the prevalence of hybridization between sympatric *Canis* species surrounding the red wolf (*Canis rufus*) recovery area in North Carolina[J].Molecular ecology,2011,20(10):2142-2156.
- [10] 苏莹,鞠贵春,邵元臣,等.利用Y染色体进行鹿科动物的起源和进化分析[J].特产研究,2016,38(1):53-57.
- [11] 王金鹏,杨晓莹,于立强,等.3个群体小家鼠 *Sry* 基因序列分析[J].安徽农业科学,2017,45(11):114-116.
- [12] 沈红霞,尹坤.大理地区男性Y染色体多态性与临床效应关系探讨[J].大理大学学报,2016,1(8):65-66.
- [13] 朱运良,伍新尧.Y染色体MSY区域内DNA分子重组[J].国外医学(遗传学分册),2004,27(5):276-278.
- [14] 蒋虎.人类性染色体DNA回文序列分析[D].兰州:兰州大学,2011.
- [15] 徐健.中国小家鼠线粒体全基因组序列分析[D].烟台:鲁东大学,2014.
- [16] 张永生,席继锋,王香祖,等.*Zfy*基因与哺乳动物性别控制研究进展[J].畜牧与兽医,2016,48(12):105-108.
- [17] GERRARD D T,FILATOV D A.Positive and negative selection on mammalian Y chromosomes[J].Molecular biology and evolution,2005,22(6):1423-1432.
- [18] JEGALIAN K,PAGE D C.A proposed path by which genes common to mammalian X and Y chromosomes evolve to become X inactivated[J].Nature,1998,394(6695):776-780.
- [19] AFFARA N A,CHAMBERS D,O'BRIEN J,et al.Evidence for distinguishable transcripts of the putative testis determining gene (ZFY) and mapping of homologous cDNA sequences to chromosomes X,Y and 9[J].Nucleic acids research,1989,17(8):2987-2999.
- [20] MITCHELL M,SIMON D,AFFARA N,et al.Localization of murine X and autosomal sequences homologous to the human Y located testis-determining region[J].Genetics,1989,121(4):803-809.
- [21] DECARPENTRIE F,VERNET N,MAHADEVALAH S K,et al.Human and mouse ZFY genes produce a conserved testis-specific transcript encoding a zinc finger protein with a short acidic domain and modified transactivation potential[J].Human molecular genetics,2012,21(12):2631-2645.
- [22] CORBET G B,HILL J E.A world list of mammalian species[M].3rd ed. Oxford:Oxford University,1991.