

7个地理种群小鼠 *TLR9* 基因的遗传多样性分析冷冰霜¹, 于立强², 黄玲^{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]分析我国7个地理种群小鼠 *TLR9* 基因的遗传多样性。[方法]利用PCR技术扩增并测序7个地理种群100个小鼠样品的 *TLR9* 基因。使用MEGA 7.0、DnaSP等软件对基因序列进行分析,计算遗传距离、遗传多样性,并构建系统发育树。[结果]获得的 *TLR9* 基因片段长度为1 030 bp,位于参与对病原体相关分子模式识别的LRR结构域的编码区,A、T、C、G的平均含量分别为22.9%、22.2%、32.8%和22.0%,各地理种群间碱基含量没有明显差异。通过计算各地理种群间遗传距离及核苷酸多样性发现,这7个地理种群小鼠 *TLR9* 基因序列较为保守,并无明显遗传分化。以褐家鼠(NM_198131)作为外群构建系统发育树,其结果与遗传多样性分析相一致。[结论]7个地理种群小鼠 *TLR9* 基因遗传多样性较低,具有极高的保守性。

关键词 小鼠; *TLR9* 基因; 遗传多样性

中图分类号 Q953 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)10-0089-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.10.026



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Genetic Diversity Analysis of *TLR9* Gene in 7 Geographical Populations of *Mus musculus*LENG Bing-shuang¹, YU Li-qiang², HUANG Ling¹ (1. College of Life Sciences, Ludong University, Yantai, Shandong 264025; 2. Yantai No.3 Middle School, Yantai, Shandong 264000)

Abstract [Objective] To analyze the genetic diversity of *TLR9* gene in *Mus musculus* from 7 geographical populations of China. [Method] PCR technology was used to amplify and sequence *TLR9* gene of 100 mice samples in 7 geographical populations. Using MEGA 7.0, DnaSP and other software, the sequences of *TLR9* gene were analyzed, the genetic distance and genetic diversity were calculated, and the phylogenetic tree was constructed. [Result] The length of *TLR9* gene fragment was 1 030 bp. *TLR9* gene was located in the encoding region of LRR domain, which was involved in the identification of pathogen-related molecular patterns. The average content of bases A, T, C, G were 22.9%, 22.2%, 32.8% and 22.0% respectively. There was no significant difference in base composition among different geographical populations. Through calculating the genetic distance and nucleotide diversity among the geographical populations, it was found that *TLR9* gene in *M. musculus* in 7 geographical populations was conservative, and there was no obvious genetic differentiation. The phylogenetic tree was constructed with *Rattus norvegicus* (NM_198131) as the outgroup, the results were consistent with the genetic diversity analysis. [Conclusion] The genetic diversity of *TLR9* gene in *M. musculus* of 7 geographical populations was low, with high conservation.

Key words *Mus musculus*; *TLR9* gene; Genetic diversity

小鼠(*Mus musculus*)是全球性分布的小型啮齿类动物,其适应性强、行动敏捷,活动范围广泛,主要栖息在与人类生产和生活密切相关的生境区域(室内生境、室周生境及农业耕作区等),是最常见的家栖鼠种之一^[1]。小鼠与人类伴生,关系密切,作为易感宿主,其体内存在多种寄生虫,可以携带多种病原体,并传播多种人兽共患病,目前已发现的有20多种,如莱姆病、肾综合征出血热、恙虫病、鼠疫和地方性斑疹伤寒等^[2]。小鼠早在6 000万年前便和人类共有同一祖先,与人类在基因组水平上的同源性高达93%。同时,其生理生化指标及其调控机制也与人类相同或相似,进一步为其作为人类疾病研究模型提供了强有力的证据^[3-4]。因此,小鼠被广泛应用于生物学和医学研究领域,是具有重要应用价值和意义的模式动物之一。

早在17世纪就有人用野生小鼠做试验,人们从野生小鼠中选择培育实验品系小鼠,迄今为止已培育出1 000多种品系。科学家们研究发现,在野生小鼠中平均每100~200 bp就包含1个单核苷酸多态性(SNPs)^[5-6]。研究发现,实验品系小鼠基因组的遗传多样性比野生小鼠低,在实验品系小鼠染色体上发现的SNPs只占野生小鼠中的25%左右^[7]。这些

研究表明,实验品系小鼠的遗传多样性水平远远低于野生小鼠,与实验品系小鼠相比生存在自然环境下的野生小鼠积累了丰富的历史重组事件^[8-9]。因此,探究野生小鼠的遗传多样性对于复杂性状的研究具有非常重要的意义。我国疆域辽阔,地形地貌复杂,气候环境多变,拥有丰富多样的物种资源,这极大地丰富了野生小鼠资源,为研究小鼠种群遗传进化提供了优越的条件。

外界环境中存在多种病原微生物,威胁着生物的生存。生物在长期的进化过程中逐步形成并不断完善免疫系统来抵抗病原微生物。免疫系统是宿主的防御系统,包括天然免疫(innate immunity)防线和适应性免疫(adaptive immunity)防线^[10-11]。研究发现,天然免疫的防御机制是机体通过病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMP)对病原体的保守结构进行识别^[11-12],然后在细胞内外发生一系列反应,最终启动免疫应答。

Toll样受体(toll-like receptor, TLRs)家族是天然免疫模式识别受体中重要的一员,同时也是连接天然免疫和适应性免疫的桥梁^[13]。当病原微生物突破机体的第一道免疫抵御防线时,TLRs可以识别它们并激活机体产生免疫应答^[14-15]。迄今为止,哺乳动物中已经鉴定出13个TLRs家族成员,命名为TLR1~TLR13,但在不同的物种中含有的TLRs成员不一样,小鼠体内含有12个家族成员,分别为TLR1~9和TLR11~13^[16-17]。TLR9在识别外源DNA的过程中起到非常重要的作用^[18-19],研究发现在*TLR9*基因缺陷的小鼠中核因

基金项目 国家自然科学基金项目(31371252)。**作者简介** 冷冰霜(1992—),女,山东日照人,硕士研究生,研究方向:分子生态学。*通信作者,教授,博士,硕士生导师,从事分子生态与进化研究。**收稿日期** 2019-03-15

子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)、c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 等信号分子都被破坏,不能对 DNA 中非甲基化的 CpG 寡聚核苷酸序列产生免疫应答^[15],这表明 TLR9 蛋白受体对于识别细菌的非甲基化 CpG DNA 是不可缺少的^[20-21],此外还可能识别各种非正常结构及成分的 DNA 序列^[22]。笔者对我国 7 个地理种群 100 个小鼠 *TLR9* 基因序列进行了分析,探究小鼠 *TLR9* 基因的遗传多样性,进而为揭示我国小鼠遗传多样性与病原微生物间的关系提供基础性信息。

1 材料与与方法

1.1 样品采集 样品采自我国 7 个地区,包括漠河(MH)、烟台(YT)、渭南(WN)、乌鲁木齐(WQ)、上海(SH)、昆明(KM)和贵阳(GY)。具体采样方法参考徐健等^[3]、王金鹏等^[4]的方法。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取。根据 Promega 试剂盒的方法提取基因组总 DNA,具体方法参考徐健等^[3]、王金鹏等^[4]的方法。将提取的产物用 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测,并置于 -20 °C 冰箱中保存备用。

1.2.2 PCR 扩增。利用 GenBank 数据库查找小鼠 *TLR9* 基因序列,根据引物设计原则,利用 Primer 5.0 软件设计 *TLR9* 基因引物。PCR 体系及程序参考王金鹏等^[4]的方法,退火温度为 58 °C。

1.2.3 PCR 扩增产物检测。取 5 μ L PCR 扩增产物,在 1.5% 琼脂糖凝胶(已加溴化乙锭-EB 染色)中进行电泳检测,将扩增效果好的 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.3 产物测序及序列分析 应用软件 Chromas 查看序列峰图文件,选取可用片段,使用 Seqman 软件进行序列剪切与拼接,通过 BLAST 检测序列同源性,查看与 GenBank 数据库中已有小鼠 *TLR9* 基因序列的相似度,利用 ClustalX 1.83 软件进行比对与校正。利用 MEGA 7.0 和 DnaSP 5.10 软件进行序列分析。

2 结果与分析

2.1 目的基因提取及 PCR 扩增产物检测结果 将提取的 DNA 进行 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳,结果见图 1。从图 1 可见整齐清楚且明亮的条带,说明 DNA 提取效果较好。



注:M.DL Marker 1000;1~11 为提取的 DNA

Note:M.DL Marker 1000;1~11.Extracted DNA

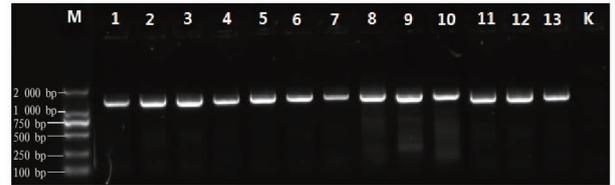
图 1 基因组总 DNA 提取结果

Fig.1 Results of total genomic DNA extraction

经 PCR 扩增后的扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,结果见图 2。从图 2 可以看出,检测到整齐明亮的条带,长度

为 1 000~2 000 bp,表明目的基因的扩增效果较好。

2.2 小鼠 *TLR9* 基因碱基含量分析 获得的 *TLR9* 基因片段长度为 1 030 bp,位于参与对病原体相关分子模式识别的 LRR 结构域的编码区。分析对各地理种群 *TLR9* 基因序列的碱基组成,结果见表 1。由表 1 可知,小鼠 *TLR9* 基因片段 A、T、C、G 的平均含量分别为 22.9%、22.2%、32.8%、22.0%,且 C+G 的碱基含量(54.8%)略高于 A+T 含量(45.1%),各地理种群间碱基含量没有明显差异。



注:M.DL Marker 2000;1-13. 部分 DNA 样品 PCR 产物;K. 空白对照

Note:M.DL Marker 2000; 1-13. PCR products of partial DNA samples; K. Blank control

图 2 小鼠 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig.2 Electropherogram of PCR amplification products of *M. musculus*

表 1 各地理种群小鼠 *TLR9* 基因片段的碱基含量

Table 1 Base content of *TLR9* gene in *M. musculus* of different geographical populations %

| 种群 Populations | A | T | C | G | A+T |
|----------------|------|------|------|------|------|
| GY | 22.8 | 22.2 | 32.8 | 22.1 | 45.0 |
| KM | 22.9 | 22.4 | 32.8 | 22.0 | 45.3 |
| MH | 22.9 | 22.2 | 32.8 | 22.0 | 45.1 |
| SH | 22.9 | 22.2 | 32.8 | 22.1 | 45.1 |
| WN | 22.9 | 22.1 | 32.9 | 22.1 | 45.0 |
| WQ | 23.0 | 22.2 | 32.8 | 22.0 | 45.2 |
| YT | 22.9 | 22.2 | 32.8 | 22.0 | 45.1 |
| 平均 Average | 22.9 | 22.2 | 32.8 | 22.1 | 45.1 |

注:各地区 *TLR9* 基因片段长度均为 1 030 bp

Note:The length of *TLR9* gene in length was 1 030 bp

2.3 各地理种群间遗传距离分析 基于小鼠 *TLR9* 基因序列,计算各地理种群间遗传距离,结果见表 2。由表 2 可知,各地理种群间的遗传距离为 0.000~0.012,各地理种群间除昆明(KM)小鼠外,其他地理种群间遗传距离均较小。这表明各地理种群间小鼠 *TLR9* 基因的遗传差异较小,该基因在进化过程中具有一定的保守性,这对于其功能的保守结构具有重要意义。前人研究^[3]发现,我国小鼠存在 2 条迁移路线,据此推测昆明地区小鼠起源于古印度,受地理环境及起源地的影响,使其与其他地理种群存在较小的遗传差异。

2.4 小鼠 *TLR9* 基因遗传多样性分析 使用 DnaSP 软件对各地理种群小鼠 *TLR9* 基因进行遗传多样性分析,结果见表 3。由表 3 可知,各地理种群小鼠 *TLR9* 基因片段包含变异点数 2~11 个,单倍型多样性指数为 0.154~0.905,核苷酸多样性范围为 0.000 98~0.003 42,昆明地区的单倍型多样性和核苷酸多样性均最高。这表明这 7 个地理种群小鼠 *TLR9* 基因遗传多样性较低,与遗传距离的结果相符,说明该基因进

化相对保守。

表 2 各地理种群小鼠 *TLR9* 基因的遗传距离分析

Table 2 The genetic distance between different geological populations based on *TLR9* gene

| 种群 Populations | GY | KM | MH | SH | WN | WQ |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| GY | | | | | | |
| KM | 0.012 | | | | | |
| MH | 0.001 | 0.012 | | | | |
| SH | 0.000 | 0.012 | 0.001 | | | |
| WN | 0.000 | 0.012 | 0.001 | 0.000 | | |
| WQ | 0.001 | 0.012 | 0.001 | 0.001 | 0.000 | |
| YT | 0.000 | 0.012 | 0.001 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

表 3 各地理种群小鼠 *TLR9* 基因片段遗传多样性统计

Table 3 Genetic diversity statistics of *TLR9* gene in *M.musculus* of different geological populations

| 种群 Populations | <i>H</i> | <i>V</i> | <i>Hd</i> | $\pi // \times 10^{-2}$ | <i>K</i> |
|----------------|----------|----------|-------------|-------------------------|----------|
| GY | 4 | 4 | 0.778±0.091 | 0.140±0.020 | 1.444 |
| KM | 5 | 11 | 0.905±0.103 | 0.342±0.146 | 3.523 |
| MH | 3 | 2 | 0.607±0.164 | 0.108±0.034 | 1.107 |
| SH | 5 | 3 | 0.833±0.098 | 0.132±0.205 | 1.314 |
| WN | 2 | 3 | 0.154±0.126 | 0.130±0.025 | 1.307 |
| WQ | 4 | 2 | 0.743±0.090 | 0.098±0.019 | 1.209 |
| YT | 2 | 3 | 0.167±0.134 | 0.116±0.013 | 1.166 |

注:*H*.单倍型数;*V*.变异位点数;*Hd*.单倍型多样性(haplotype diversity); π .核苷酸多样性;*K*.平均核苷酸差异性(average number of nucleotide differences)

Note:*H*.Haplotype number;*V*.Number of variation sites;*Hd*.Haplotype diversity; π .Nucleotide diversity;*K*.Average number of nucleotide differences

2.5 系统发育树分析 系统发育树能反映物种进化关系,基于 *TLR9* 基因片段,以褐家鼠 *TLR9* 基因 (NM_198131) 为外群,构建 7 个地理种群小鼠的系统发育树,结果如图 3 所示。从图 3 可以看出,昆明地区小鼠单独为一支,最先分离出来,其他地理种群聚为一个分支,这表明除昆明地区小鼠外,其他 6 个地理种群小鼠没有明显的分化现象。系统发育树分析结果与此前研究结果相一致,而昆明地区相对于其他地区存在遗传差异,需要进一步分析其遗传结构。

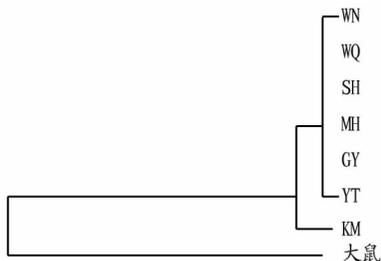


图 3 我国小鼠 *TLR9* 基因的系统发育树分析

Fig.3 Phylogenetic tree analysis of *TLR9* gene in *M.musculus* in China

3 讨论

近年来,随着对多种动物相关免疫基因进化模式的研究,科学家们开始重视对野生动物 *TLRs* 基因分子进化研究。病原微生物保守的分子结构需要高度保守的免疫基因才可以发挥其特异性识别作用。笔者分析了我国 7 个地理种群小鼠 *TLR9* 基因遗传多样性,发现获得的 *TLR9* 基因片段长度

为 1 030 bp,位于参与对病原体相关分子模式识别的 LRR 结构域的编码区,A、T、C、G 的平均含量分别为 22.9%、22.2%、32.8%和 22.0%,各地理种群间碱基含量没有明显差异。通过计算各地理种群间遗传距离及核苷酸多样性,发现这 7 个地理种群小鼠 *TLR9* 基因序列较为保守,并无明显分化现象,以褐家鼠 (NM_198131) 作为外群构建系统发育树,其结果与遗传多样性分析相一致。小鼠是生物学和生物医学领域最常用的模式动物之一,从分子水平上探究我国小鼠群体 *TLR9* 基因的遗传多样性,能为揭示小鼠和病原微生物间的关系提供基础性信息。但目前的研究数据较少,需要继续补充全国范围的小鼠 *TLR9* 基因序列,进一步探究我国小鼠 *TLR9* 基因的遗传多样性。

参考文献

- [1] 梁银明,周宇荀,李凯,等.野生小家鼠遗传多样性与复杂性状研究[J].国际遗传学杂志,2009,32(4):312-315,320.
- [2] 朱琼蕊,郭宪国,黄辉,等.小家鼠的研究现状[J].热带医学杂志,2014,14(3):392-396.
- [3] 徐健,靖美东,黄玲.中国小家鼠细胞色素 *b* 基因序列分析[J].安徽农业科学,2014,42(4):989-991.
- [4] 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.
- [5] WANG X S, KORSTANJE R, HIGGINS D, et al. Haplotype analysis in multiple crosses to identify a QTL gene[J]. Genome research, 2004, 14(9): 1767-1772.
- [6] YOSHIKI A, MORIWAKI K. Mouse phenome research: Implications of genetic background[J]. JILAR Journal, 2006, 47(2): 94-102.
- [7] SALCEDO T, GERALDES A, NACHMAN M W. Nucleotide variation in wild and inbred mice[J]. Genetics, 2007, 177(4): 2277-2291.
- [8] 梁银明.中国野生小家鼠遗传多样性研究[D].上海:东华大学,2009.
- [9] HARDOUIN E A, CHAPUIS J L, STEVENS M I, et al. House mouse colonization patterns on the sub-Antarctic Kerguelen Archipelago suggest singular primary invasions and resilience against re-invasion[J]. BMC Evol Biol, 2010, 10(1): 1-15.
- [10] GOENKA A, KOLLMANN T R. Development of immunity in early life[J]. Journal of infection, 2015, 71(S1): 112-120.
- [11] BRUBAKER S W, BONHAM K S, ZANONI I, et al. Innate immune pattern recognition: A cell biological perspective[J]. Annual review of immunology, 2015, 33(1): 257-290.
- [12] THAISS C A, LEVY M, ITAV S, et al. Integration of innate immune signaling[J]. Trends in immunology, 2016, 37(2): 84-101.
- [13] WERLING D, JUNCI T W. TOLL-like receptors linking innate and adaptive immuneresponse [J]. Veterinary immunology & immunopathology, 2003, 91(1): 1-12.
- [14] BOEHME K W, TERESA C. Innate sensing of viruses by toll-like receptors[J]. Journal of virology, 2004, 78(15): 7867-7873.
- [15] WLASIUK G, NACHMAN M W. Adaptation and constraint at toll-like receptors in primates[J]. Molecular biology & evolution, 2010, 27(9): 2172-2186.
- [16] MEDZHITOV R. Toll-like receptors and innate immunity[J]. Nature reviews immunology, 2001, 1(2): 135-145.
- [17] KUMAR H, KAWAI T, AKIRA S. Toll-like receptors and innate immunity [J]. Biochemical & biophysical research communications, 2009, 388(4): 621-625.
- [18] KUMAGAI Y, TAKEUCHI O, AKIRA S. TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2008, 60(7): 795-804.
- [19] 盛美霞,任涛. TLR9 信号通路的功能与调控研究进展[J]. 国际呼吸杂志, 2012, 32(22): 1747-1750.
- [20] AKIRA S, UEMATSU S, TAKEUCHI O. Pathogen recognition and innate immunity[J]. Cell, 2006, 124(4): 783-801.
- [21] REBL A, GOLDAMMER T, SEYFERT H M. Toll-like receptor signaling in bony fish[J]. Veterinary immunology & immunopathology, 2010, 134(3/4): 139-150.
- [22] ISHII K J, AKIRA S. Innate immune recognition of, and regulation by, DNA[J]. Trends in immunology, 2006, 27(11): 525-532.