

文章编号: 1004-7271(2007)01-0011-05

凡纳滨对虾微卫星 DNA 的筛选及其特性的研究

贾智英^{1,2}, 全迎春^{1,2}, 梁利群¹, 孙效文¹

(1. 黑龙江水产研究所农业部北方鱼类生物工程育种重点开放实验室, 黑龙江 哈尔滨 150070;

2. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090)

摘要:采用小片段克隆法构建凡纳滨对虾的部分基因文库,用放射性同位素 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 标记的 $(\text{CA})_{15}$ 、 $(\text{AT})_{12}$ 、 $(\text{AG})_{12}$ 、 $(\text{AAT})_8$ 、 $(\text{AAG})_8$ 做探针筛选阳性克隆。共获得微卫星序列 152 个,其中二核苷酸为核心的微卫星序列: $(\text{AG})_n > (\text{AC})_n > (\text{AT})_n$,三核苷酸为核心的微卫星序列: $(\text{AAT})_n > (\text{CAT})_n > (\text{AAG})_n$ 。应用引物设计软件 primer3.0 设计引物 105 对。选择合成 10 对理论上易出现影子带的引物,筛选后用 31 个凡纳滨对虾个体对这些引物进行了评估,结果 10 对引物中有 8 对引物能扩增出谱带,其中 1 对扩增产物出现影子带,1 对扩增产物为单态,有 6 对扩增产物出现多态。

关键词:凡纳滨对虾; 微卫星 DNA; 重复序列; 克隆

中图分类号: S 917 文献标识码: A

The isolation and characterization of microsatellite markers from *Litopenaeus vannamei*

JIA Zhi-ying^{1,2}, QUAN Ying-chun^{1,2}, LIANG Li-qun¹, SUN Xiao-wen¹

(1. Heilongjiang River Fishery Research Institute Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;

2. College of Aqua-life Sciences and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: The partial genome library of *Litopenaeus vannamei* was constructed by method of small fragments DNA cloning and the positive clones were screened with the probes $(\text{CA})_{15}$, $(\text{AT})_{12}$, $(\text{AG})_{12}$, $(\text{AAT})_8$ and $(\text{AAG})_8$ labeled with $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP. 152 sequences containing microsatellites were obtained. The dinucleotide repeats were $(\text{AG})_n > (\text{AC})_n > (\text{AT})_n$ and the trinucleotide repeats were $(\text{AAT})_n > (\text{CAT})_n > (\text{AAG})_n$ respectively. 105 sets of primers were designed with the software primer 3.0. 10 primers that the stutter bands easily occur in theory were synthesized and 31 samples were tested with them. Eight loci can give bands and six had a degree of polymorphisms, one was monomorphic and one had stutter bands.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; microsatellite DNA; repeat sequences; clone

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*), 俗称南美白对虾, 原分布于南美太平洋沿岸的水域^[1], 1988 年引入我国, 因其生长迅速、抗病力强、肉味鲜美和出肉率高而成为目前国内外广泛养殖的优良品种之一, 在我国虾蟹养殖业中占有重要的地位, 养殖范围较广^[2]。微卫星分子标记 (microsatellite marker) 是由 1~6 bp 串联重复序列构成, 它具有分布广、含量大、多态性丰富及保守性等特点, 至今已被广泛地应用

收稿日期: 2006-03-16

基金项目: 国家自然科学基金 (30271010)

作者简介: 贾智英 (1976-), 女, 山东蓬莱人, 博士研究生, 主要从事水产动物遗传育种研究。E-mail: xiaojiade_41@163.com

通讯作者: 孙效文, E-mail: sunxw2002@163.com, Tel: 0451-84842646

于遗传图谱的构建、基因定位及遗传多样性分析等方面^[3-5]。目前,斑节对虾(*Penaeus monodon*)和中国对虾(*Penaeus orientalis*)已筛选出较多的微卫星序列^[6-8],但对虾间基因组的差异性大、通用性较差,据报道^[9]对虾属间差异为25%,亚属间基因组差异为9.4%。凡纳滨对虾微卫星筛选工作虽然已经展开^[1,10],但对其各类微卫星及微卫星分布特征方面还知之甚少。本研究在开发一批微卫星序列的同时,对其在基因组中分布特征进行分析,以期深化对凡纳滨对虾基因组的认识,为开发微卫星标记、开展深入的遗传标记辅助育种工作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

凡纳滨对虾购于大连市黑石礁市场;质粒 pGEM-3ZF(+)和 DH5 α 取自农业部北方鱼类生物工程育种重点开放实验室;各种限制性内切酶购自 Promega 公司;T₄ DNA 连接酶购于 MBI 公司;硝酸纤维素滤膜购自 Phamacia 公司;探针 (CA)₁₅、(AT)₁₂、(AG)₁₂、(AAT)₈、(AAG)₈ 和引物由上海生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 总基因组 DNA 的提取

按照梁利群等^[11]提取基因组 DNA 的方法,提取基因组 DNA。

1.2.2 文库的构建与阳性克隆的筛选

文库的构建与阳性克隆的筛选主要参考魏东旺^[12]的方法,并略加修改。限制性内切酶 Sau3A I 对基因组 DNA 进行部分消化后,用蔗糖密度梯度离心筛选片断大小为 250 ~ 1 000 bp DNA。杂交膜的制备按照分子克隆^[13]的方法进行。

1.2.3 序列测定及统计分析

将阳性克隆穿刺培养在 LB 培养基中,由上海生物工程公司进行测序。应用微卫星查找软件 Tandem Repeats Finder (Version 2.02) 进行重复序列的查找,然后应用 NCBI 上的 VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>) 软件去除载体序列,并将得到的微卫星序列按核心序列重复次数进行统计。

1.2.4 引物设计

用在线软件 Primer3.0 (http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html) 进行引物设计。

1.2.5 引物合成及其评估

在所设计的引物中,选择合成理论上易出现影子带(重复碱基数为 100 bp \pm) 的 10 对引物(见表 1),并用 31 个凡纳滨对虾个体、2% 琼脂糖凝胶电泳对所筛选的引物进行检测评估,所用统计指标为等位基因频率 (allele frequency, *P*)、观测杂合度 (observed heterozygosity, *Ho*)、期望杂合度 (expected heterozygosity, *He*) 和多态信息含量 (average polymorphism information content, *PIC*)。公式为:

$$\text{期望杂合度: } He = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

$$\text{多态信息含量: } PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i p_j^2$$

其中 *n* 为等位基因数目;*p_i* 和 *p_j* 分别为第 *i* 和第 *j* 个等位基因的频率。

2 结果

2.1 重组子及其杂交

本实验共得到 5 000 个转化子, *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切检测重组载体所占的比率为 90%, 所以重

组子数为 4 500。

表 1 10 对微卫星引物筛选结果及其特性
Tab. 1 The screen results and characterization of the primers

位点	引物序列	重复序列	重复类型	退火温度 (°C)	片段大小 (bp)
HLJN-001	GCACCTGAAGGACATGTGTG ACAACCAGCCTGTCTGTTT	(AG) ₉ GG(AG) ₇ GG(AG) ₄₇ C(GA) ₂ A(AG) ₅ (AAAGAA) ₂ (AG) ₂₇	非完美型	60.16 59.62	296
HLJN-002	GCATCAGTAGAACAAAAGCATCA GGCCAAAAGACAATTTTGGAT	(GA) ₄₂ ...(TA) ₄	混合型	59.42 60.18	250
HLJN-003	CCTTATAAAAATGCGGCCAAA TGTGCACATCTCGTTTGGAT	(CA) ₈ T(CA) ₄₁	非完美型	59.93 60.12	235
HLJN-004	GGGAGGCTAAAAGATGTTGA GGGTGAGGCGAGACAATTC	(AG) ₄₃ (CA)C(AG) ₇ AAA(AG) ₃ (AC) ₄ (AG) (AC)(AG) ₇ A(AG) ₃	混合型	59.13 60.62	225
HLJN-005	GGGGATCACCACCCATTATT AGAAGGAAAGGTTGGGAGA	(CA) ₅₅	完美型	60.64 60.04	203
HLJN-006	CGTGACACTCGTGCAGTTCT TCAGGCTGCGTATTTTGCATG	(CA) ₂₅ CT(CA) ₂₀	非完美型	60.10 59.83	222
HLJN-007	CGACGGAAAATCGAGTTGTTT CCAACAAAAGAACCTCCGTA	(GT) ₃ (TG) ₂₀ (AGTG) ₂ (TG) ₂₂ TTC(GT) ₆ G (GT) ₁₃ (TG) ₄	非完美型	61.39 59.96	249
HLJN-008	CGTAAGTCCTGCAAAAAGAAACT GCCGTTCAACTATATATCAGCA	(TA) ₁₂ (GA)(TAGA) ₄ A(AT)(AG) ₄₉ A(AG) ₁₀ (AT)(AG)A(AG) ₁₀ TG(GA)(AG) ₃ A(AT)(AG) ₆	混合型	57.77 57.03	299
HLJN-009	GCACAGTGCCAAATTTCTTG AGGCACAGAGGCTTCTCCTT	(CT) ₇ C(CT)(TC) ₅ TT(TC) ₆ (AC) ₆ (AT) (AC) ₁₂ (AT) ₃ GT(AT) ₄ (TA)A(AT) ₄	混合型	59.32 60.53	373
HLJN-010	GCGGAGGAAGGAGGATAAAG TTGGTTTCTGAATTTGCCGTATG	(GA) ₄ (N) ₅₇ (GA) ₃₇ (GAGACA) ₆	混合型	60.17 60.00	236

用 [γ -³²P] ATP 标记的探针杂交,得到阳性克隆 168 个,占 3.73%,其中每张膜上的信号为 3~17 个,平均 8.6 个。

2.2 阳性克隆测序及重复序列分布特征

在 168 个阳性杂交信号中,共测出 161 个序列,其中 51 个序列测序结果不理想,将其反向测序后,只有 10 个序列两次测序结果得到了拼接。在所测得的序列中,含有微卫星的序列一共 152 个,重复碱基数大于或等于 40 的微卫星序列占总数的 80.8%。统计所有的微卫星序列,其中含有 (AG)_n、(AC)_n、(AT)_n、(AAT)_n、(CAT)_n、(AAG)_n 的序列所占的比率分别为 45.9%、25.2%、16.0%、8.2%、3.7%、1.0%。以二核苷酸为重复单位的序列中,(AG)_n>(AC)_n>(AT)_n;在以三核苷酸为重复单位的序列中,(AAT)_n 最多,其次为 (CAT)_n、(AAG)_n,目的重复序列 (AAT)_n 的数目多于 (AAG)_n,但非目的重复序列 (CAT)_n 的数目比目的序列 (AAG)_n 多,大约是后者的 3.5 倍。从重复序列的次数上看,凡纳滨对虾的重复次数跨度很大,从 4~119 不等(图 1)。

2.3 引物设计

在 152 个所筛选的含有微卫星的序列中,共设计引物 105 对,可到农业部北方鱼类生物工程育种重点开放实验室网站 (www.fishbreeding.org) 查询。

2.4 引物筛选及评估

10 对引物中有 8 对引物能扩增出谱带,其中 1 对扩增产物出现影子带,1 对扩增产物为单态,6 对

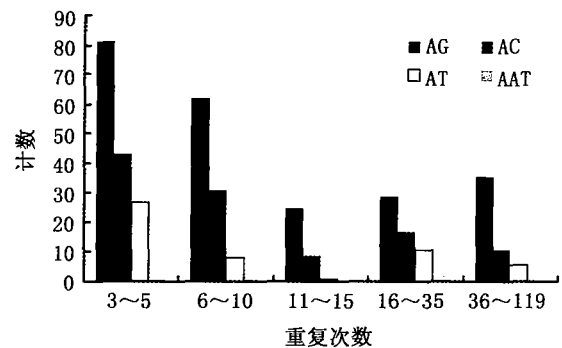


图 1 凡纳滨对虾微卫星大小分布
Fig. 1 Microsatellite size distribution of *Litopenaeus vannamei*

扩增产物出现多态(表2;图2)。除位点 HLJN05、HLJN06 外,其余 6 个位点的期望杂合度较高,均在 0.5 以上,平均为 0.723 2。位点 HLJN01、HLJN04、HLJN07、HLJN08、HLJN10 多态信息含量高,而 HLJN02 多态含量低,按 Bostein 等^[14]提出的衡量基因变异程度高低的多元信息含量指标,前 5 个位点属于高度多态基因座,后 1 个为低度多态性。总体上各位点的等位基因数较多,等位基因数差异较大,平均每个位点 12.142 9,基因型丰富。除位点 HLJN04 外,经卡方检验其余位点观测杂合度与期望杂合度差异均极显著($P < 0.01$)。这可能是由于多年来凡纳滨对虾人工选择、非随机交配等原因造成的。

表 2 10 对微卫星基因座的遗传信息

Tab. 2 The genetic information of ten pairs of primers

位点	退火温度(℃)	片断大小(bp)	等位基因数	观测杂合度	期望杂合度	多态信息含量
HLJN-001	60	237~426	19	0.240 0	0.803 2	0.794 8
HLJN-002	60	250~279	7	0.034 5	0.527 6	0.243 2
HLJN-004	58	250~360	13	0.520 0	0.664 2	0.608 7
HLJN-005	61	-	Stutter bands	-	-	-
HLJN-006	60	250	1	0.000 0	0.000 0	0.000 0
HLJN-007	50	212~355	18	0.794 1	0.929 1	0.924 6
HLJN-008	60	324~445	9	0.047 6	0.663 3	0.607 6
HLJN-010	60	237~469	18	0.260 9	0.731 5	0.720 8

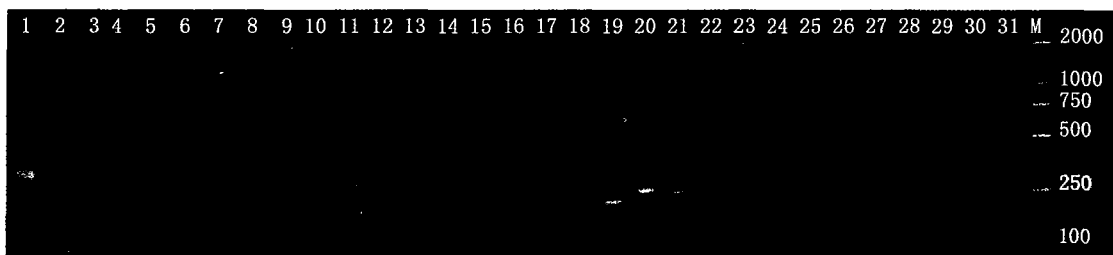


图 2 凡纳滨对虾 HLJN07 基因位点的电泳图

Fig. 2 Analysis of PCR products for the HLJN07 locus in *Litopenaeus vannamei*

3 讨论

微卫星序列的筛选主要有两种方法,一是小片段克隆法,二是富集的方法。富集的方法目前应用较多,该方法相对简单、快速,工作量小,获取的微卫星数目较多,但富集方法要经过两次 PCR 扩增,保真性较低,引物筛出率较差,不适合微卫星序列较长的生物微卫星 DNA 的筛选^[15],而小片段克隆法不存在这些不足。对虾的微卫星序列一般较长^[16],因此本次实验中微卫星 DNA 的筛选采用了小片段克隆法。

不同核心重复单元在基因组中的丰度是不同的,微卫星分子标记的筛选就是以丰度为基础的,因而在筛选微卫星分子标记之前,清楚丰度十分重要。研究表明,动物中微卫星 DNA 一般以 CA/GT 重复为主,植物中多以 AT/TA 或 GA/CT 重复为主。目前,已通过部分基因组测序的方法分别获得了斑节对虾、中国对虾多种重复单元的含量^[7,17]。中国对虾两碱基重复类型中,AT 重复数目最多,其次是 AC 和 AG;三碱基重复类型中以 AAT 重复拷贝类别最多,其次是 AAG 和 ATC。斑节对虾两碱基重复类型中,CT 重复数目最多,其次是 GT、AT、CG。本实验所筛选凡纳滨对虾两碱基重复类型中,AG 最多,其次为 AC 和 AT;三碱基重复中,以 AAT 最多,其次为 CAT 和 AAG。这一结果与中国对虾和斑节对虾均不相同,这也印证了“对虾基因组间差异较大^[9]”的结论。

据 Hamada 等^[18]报道,人的基因组 DNA 中大于或等于 40 bp 的微卫星序列占微卫星序列总数的 12%,鼠中占 43%,本实验得出在凡纳滨对虾中占 80.8%,是人类中的 6.7 倍,小鼠的 1.9 倍。在对日

本对虾的研究中表明对虾基因组中以二核苷酸为中心的重复单元的重复次数较多,但扩增产物电泳时影子带现象严重,很难能筛选出较好的微卫星分子标记^[17]。在人类中^[19]证明用三或四碱基为重复单元的微卫星分子标记多态性高、等位基因差异明显和影子带现象少,因而一些学者倾向于用三或四碱基核苷酸做探针进行筛选。但对虾中以三或四碱基核苷酸为重复单元的丰度还未见报道,为此,一些学者在筛选对虾微卫星序列时不惜花费大量的费用对构建的文库进行直接测序^[7,11]。本实验借助其它对虾所筛选的结果设计了探针,并得出了凡纳滨对虾中几种三碱基重复单元的丰度,从而深化了对凡纳滨对虾基因组微卫星序列的认识,并为开发其微卫星标记提供了技术支撑。

现在一致的观点认为重复序列较长(100 bp ±),PCR 扩增时易发生 Taq 酶滑动现象,电泳时易出现影子带,从而干扰谱带的计数,引发计数错误。但本次实验结果表明,凡纳滨对虾中对于重复序列较长的微卫星标记来说,影子带的现象并不严重(如图 2 所示)。这可能与重复序列的类型有关。非完美型的重复序列被其它的几个碱基隔开,这大大减少了 Taq 酶的滑动。因而利用微卫星分子标记进行对虾各种遗传分析时,应尽量选择核心重复序列为非完美型的,从而避免影子带的出现。此外,本实验所设计合成的引物杂合度和多态信息含量均较高(HLJN06 除外)。所以对虾中微卫星序列虽然较长,但如果能对其重复序列进行仔细筛选,仍是较好的分子标记。

参考文献:

- [1] Meehan D, Xu Z, Zuniga G, et al. High frequency and large number of polymorphic microsatellites in cultured shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* [Crustacea: Decapoda] [J]. Marine Biotechnology, 2003, 5(4):311-30.
- [2] 彭自然,臧维玲,高杨,等. 氨和亚硝酸盐对凡纳滨对虾幼虾的毒性影响[J]. 上海水产大学学报, 2004, 13(3):274-278.
- [3] Bentzen P, Taggart C T, Ruzzante D E, et al. Microsatellite polymorphism and the population structure of Atlantic cod (*Gadus morhua*) in the Northwest Atlantic [J]. Can J Fish Aquat Sci, 1996, 53:2706-2721.
- [4] Lee W J, Kocher T D. Microsatellite DNA markers for genetic mapping in *Oreochromis niloticus* [J]. Fish Biol, 1996, 49: 169-171.
- [5] Postlethwait J H, Yan Y L, Gates M A, et al. Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map [J]. Nature Genetics, 1998, 18: 345-349.
- [6] Pongsomboon S, Whan V, Moore S S, et al. Characterization of Tri- and Tetranucleotide Microsatellites in the Black Tiger Prawn, *Penaeus monodon* [J]. Science Asia, 2000, 26:1-8.
- [7] Xu Z, Dhar A K, Wyrzykowski J, et al. Identification of abundant and informative microsatellites from shrimp (*Penaeus monodon*) genome [J]. Anim Genet, 1999, 30(2):150-156.
- [8] 徐鹏,周岭华,相建海. 中国对虾微卫星 DNA 的筛选 [J]. 海洋与湖沼, 2001, 32(3):255-259.
- [9] Berzie J A H. Genetic improvement of prawns [C] // Proceedings of the Sixth World Congress on the Application of Genetics to Livestock Production Armidale, NSW Australia University-of-New-England, 1998:103-110.
- [10] Garica D K, Alcivar Warren A. Identification and organization of microsatellite in *Penaeus vannamei* shrimp [C] // Proceedings of 25th International Conference on Animal Genetic. Tours, France, 1996.
- [11] 梁利群,孙孝文,王鹏,等. 利用鳍条提取样品总 DNA 初探 [J]. 生物技术, 1994, 4(1):45-46.
- [12] 魏东旺. 鲤鱼微卫星分子标记的筛选及其在遗传连锁图谱上的定位 [D]. 上海:上海水产大学, 2001. 20-35.
- [13] 萨姆布鲁克,拉塞尔著. 分子克隆实验指南(第三版) [M]. 黄培棠,王嘉玺,朱厚础译. 北京:科学出版社, 2002.
- [14] Bostein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. Animal Journal and Human Genetic, 1980, 32(3):314-331.
- [15] Yin S, Vanson Liu, Dai C F, et al. Cloning and Characterization of Microsatellite Loci in a Gorgonian Coral, *Junceella juncea* (Anthozoa; Octocorallia; Ellisellidae) and Its Application in Clonal Genotyping [J]. Marine biotechnology, 2005, 7:26-32.
- [16] Moore S S, Whan V, Davis G P, et al. The development and application of genetic markers for the kuruma prawn *Penaeus japonicus* [J]. Aquaculture, 1999, 173(1):19-32.
- [17] 高焕,刘萍,孟宪红,等. 中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 基因组微卫星特征分析 [J]. 海洋与湖沼, 2004, 35(5): 424-431.
- [18] Hamada H, Petrino M G, Kakunaga T. A novel repeated element with Z-DNA forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes [J]. National Academy of Sciences, 1982, 79(12):6465-6469.
- [19] Edwards A, Civitello A, Hammond H A, et al. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats [J]. Animal Journal and Human Genetic, 1991, 49:746-56.