

文章编号: 1674 - 5566(2011)03 - 0328 - 08

鲢三、四核苷酸重复微卫星标记的筛选及其特征分析

谭照君¹, 张天奇¹, 鲁翠云^{2,3}, 李超², 孙效文²

(1. 大连海洋大学 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023; 2. 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070; 3. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 通过磁珠富集法筛选鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)的三、四核苷酸重复微卫星分子标记。提取鲢血液大片段基因组 DNA, 用限制性内切酶 *Sau3AI* 进行酶切, 蔗糖密度梯度离心收集 400 ~ 900 bp 长度的片段, 构建鲢全基因组 PCR 文库, 用生物素标记的微卫星探针(TGA)₈、(CAG)₈ 以及 (AGAT)₆ 进行筛选, 磁珠富集含有微卫星序列的 DNA 片段, 获得含有微卫星的单链序列; 将这些序列通过 PCR 扩增, 连接 pMD 18-T 载体, 转入感受态大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α , 获得微卫星文库; 再用 γ -³²P 标记的放射性同位素探针进行二次杂交筛选, 获得 1 758 个阳性克隆, 选择测序 348 个克隆序列中, 共含有 280 个微卫星座位, 其中完美型 167 个 (59.64%), 非完美型 28 个 (10%), 混合型 85 个 (30.36%)。Primer 3.0 软件设计 60 对引物, 并用珠江水系的野生鲢群体对引物进行多态性位点检测。统计软件分析显示其中 22 对具有较高的筛选效率和多态性, 可作为鲢种质评价等遗传分析的工具。

研究亮点: 首次利用多碱基(三、四核苷酸重复)探针筛选出微卫星分子标记结合同位素探针进行两次筛选, 是开发鲢微卫星分子标记过程中新的尝试与探索。在与其他利用二碱基核苷酸重复探针开发的鲢微卫星分子标记的对比中发现, 四核苷酸重复的微卫星比二、三核苷酸重复微卫星具有更高的筛选效率和多态性。

关键词: 鲢; 微卫星; 三核苷酸和四核苷酸重复序列

中图分类号: S 917

文献标志码: A

鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 又叫鲢鱼, 属于鲤科鲢亚科, 广泛分布于我国黑龙江、长江、珠江等水系^[1], 为我国主要的淡水养殖鱼类之一。然而由于人类生产活动对自然水域造成了一定程度的破坏, 使野生鲢的产卵场和索饵场发生了变化, 经过世代繁衍的累积作用使其种群遗传多样性发生了改变。因此有必要从分子生物学角度研究其种群间及种群内的遗传结构特征, 以便了解鲢的种质资源情况, 进而为优良品种的选育、人工养殖生产和种质保护提供理论指导和技术支持。

微卫星 (microsatellite) 的突变率高 (一般在 $10^{-6} \sim 10^{-3}$ 之间), 足以产生高度多态性的位点, 提供具高分辨率的遗传信息, 因此适用于进行个体识别、遗传结构、亲缘关系等方面的研究^[2-3]。

目前最主要的克隆微卫星序列的方法有 3 种: (1) 二代测序仪进行全基因组测序, 可以得到大量微卫星, 但费用高一些, 适合规模开发用于高密度图谱制备等需要大量微卫星标记的研究; (2) 小片段基因组 DNA 随机克隆技术; (3) 生物素-磁珠富集技术^[4]。生物素-磁珠富集方法出现后, 因其阳性克隆率高的特点使多数非模式生物尤其是水产养殖生物的微卫星标记得以大量开发出来^[5], 此后微卫星标记这一共显性标记很快用于种质鉴定和育种研究之中, 孙效文等用此技术已克隆了鲤 (*Cyprinus carpio*)、鳊 (*Aristichthys nobilis*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 等 35 个物种的微卫星^[6-10]。本研究通过生物素标记的微卫星探针获得了大量鲢的三、四碱基微卫星克隆, 并用同位素标记的探针进行二

收稿日期: 2010-11-01 修回日期: 2010-12-16

基金项目: 国家 973 重大基础研究发展计划 (2004CB117405)

作者简介: 谭照君 (1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: tanzhaojun1986@163.com

通讯作者: 孙效文, E-mail: sunxw2002@163.com

次筛选,成功获得含有微卫星序列的阳性克隆片段,以期对鲢遗传多样性、群体的遗传结构分析、遗传图谱的建立、种质资源的保护和微卫星 DNA 指纹库的建立等研究提供更多的分析工具。

1 材料与方法

1.1 实验材料

克隆用样本采自黑龙江水产研究所松浦试验基地,取一尾鲢血样 5 滴加 500 μL 裂解液(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛋白酶 K,0.5% 十二烷基肌氨酸钠,0.5 mol/L EDTA,pH 8.0)混匀,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用;检测用样本采自珠江流域西江江段野生鲢 30 尾,剪取样本鳍条用乙醇固定,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2 实验方法

1.2.1 构建鲢“基因组 PCR 文库”

基因组 DNA 的提取、纯化以及酶切参照《分子克隆试验指南》。从鲢血样中提取基因组 DNA^[11],经透析后用限制性内切酶 *Sau3AI* (10 U/ μL)对基因组 DNA 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴温浴 5 h,用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。剩余产物经蔗糖密度梯度(10%、20%、30%、40%)于室温真空离心 22 h(22 000 r/min),收集 400 ~ 900 bp 片段,纯化后于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

用单链的寡核苷酸做接头,每种寡核苷酸的浓度均为 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。所用接头:寡核苷酸链 A (5'-GATCGTCGACGGTACCGAATTCT-3'),寡核苷酸链 B (5'-GTCAAGAATTCGGTCGGTACCGTCGAC-3')。等比例混合两组寡核苷酸 A、B,使其每组的终浓度为 25 $\mu\text{mol}/\text{L}$, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min,然后 4 h 缓慢冷却到 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$,最终形成双链接头:

5'-GATCGTCGACGGTACCGAATTCT A 链
3'-CAGCTGCCATGGCTTAAGAACTC B 链

建立 20 μL 连接体系:其中酶切片段 5 μL ,接头 8 μL , T_4 连接酶 2 μL ,10 \times Buffer 2 μL ,ddH₂O 3 μL ,于 $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ 循环水浴中过夜连接。其产物用 PCR 产物纯化试剂盒除去多余接头,以防影响到后面 PCR 过程,于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测产物。

获得鲢“基因组 PCR 文库”如下。用连有接头的 DNA 片段作为模板,寡核苷酸链 B 作为引物,进行 PCR 扩增(PE9700 型 PCR 仪),创建基因组 PCR 文库。程序为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$

变性 1 min, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min,2 个循环; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, $59\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min,2 个循环; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min,16 个循环;最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。反应完毕后,用 PCR 产物纯化试剂盒去除多余的引物和 dNTP,并浓缩到 15 μL 左右。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 筛选富集鲢微卫星文库

用生物素标记的微卫星探针筛选鲢“基因组 PCR 文库”的方法如下。杂交液的配制:10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 生物素标记的探针、50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 引物(寡核苷酸链 B)、 $6\times\text{SSC}$ 和 0.1% SDS,于杂交炉内预热杂交液,将 15 μL DNA 模板 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min 快速加入预热的杂交液,相应温度下杂交 1 h。其中探针(TGA)₈ 和 (AGAT)₆ 的杂交温度为 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$;探针(CAG)₈ 的杂交温度为 $64\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。在此杂交过程中,进行磁珠平衡过程。

磁珠的平衡过程为将磁珠(Dynal A. S 产品)轻轻摇匀,吸出 100 μL 到 500 μL 的硅化离心管中,放在磁力架上(MPC)静置 1 ~ 2 min,轻轻吸出盐溶液。用 200 μL B&W 洗液(10 mmol/L Tris-Cl,1 mmol/L EDTA,2 mol/L NaCl)洗涤 2 次,再用 200 μL 洗液 I($6\times\text{SSC}$,0.1% SDS)反复洗涤平衡大概 6 ~ 8 次,直至磁珠外观变得顺滑易洗脱为止。沿磁珠附着的一侧缓缓加入 150 μL 洗液 I,充分混匀,室温放置待杂交完毕。整个过程动作要轻,吸取液体过程切不可吹出大量气泡,以免造成磁珠的损失。

磁珠富集法筛选微卫星标记的原理是利用磁珠上包被的链霉亲和素(streptavidin)与探针上的生物素结合,从而通过磁力将探针连同所需的微卫星序列一同分离出来。将杂交完毕的杂交液加入已平衡好的磁珠中, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育 20 min,并缓缓转动,使生物素和链霉亲和素结合。温育结束后,将硅化离心管放置到磁力架上,除去溶液。依次用洗液 I 室温下洗涤 2 次,每次静置 10 min;用洗液 II($3\times\text{SSC}$,0.1% SDS)在该探针所对应的温度下洗涤 2 次,每次静置 15 min;用洗液 III($6\times\text{SSC}$)室温下快速洗涤磁珠;0.1 \times TE 室温下迅速洗涤 2 次,待磁珠全部吸附在磁力架一侧即可,不需长时间静置,这样基本可以除去不含有微卫星的序列。加入 30 μL 0.1 \times TE 于 PCR 仪上 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min,使含有微卫星序列的单链

DNA 与磁珠脱离。用获得的单链 DNA 为模板,寡核苷酸链 B 作为引物进行第二次 PCR 扩增,扩增条件与第一次 PCR 相同,目的是获得大量的含有微卫星序列的双链 DNA。反应完毕后,用 PCR 产物纯化试剂盒去除多余的引物和 dNTP,并浓缩到 15 μL 左右。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

建立 10 μL 连接反应体系:2 \times 连接缓冲液 5 μL (内含连接酶),pMD 18-T 载体 1 μL (购自大连宝生物公司),DNA 双链片段 2 μL ,加无菌去离子水补足 10 μL ,16 $^{\circ}\text{C}$ 连接 4 h。用 CaCl_2 制备的感受态大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 进行转化^[12],获得微卫星基因组文库。

1.2.3 同位素探针进行二次筛选

含重组子的菌落转移至硝酸纤维素膜上,并用 γ -³²P 标记的放射性同位素探针进行二次杂交,之后压 X 光片,-70 $^{\circ}\text{C}$ 放射自显影 5~10 d (可视信号强弱增减放射自显影的时间)。具体操作参照《分子克隆试验指南》^[11]。挑出阳性克隆菌落,送至北京诺塞基因组研究中心有限公司测序。

1.3 序列分析与引物筛选

返回序列去掉人工合成的接头和载体序列后根据其两端保守的侧翼序列,利用 Primer 3.0 软件设计引物,由上海生物工程技术服务有限公司合成。以 30 尾采自珠江流域野生鲢的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增产物在 8% 聚丙烯酰胺凝胶上分析。

1.4 数据分析

用 Gelpro 32 软件分析电泳图片获得所有条带的片段大小,用 PopGen 32 软件统计微卫星座位的等位基因频率 (allele frequency, P) 和等位基因数 (observed number of alleles, A),有效等位基因数 (effective number of alleles, A_e) 和期望杂合度 (expected heterozygosity, H_e)。多态信息含量 (polymorphism information content, C_{PI}) 由 BOTSTEIN 等公式^[13]计算:

$$X = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2 \quad (1)$$

式中: X 为多态信息含量的值; n 为某一位点上等位基因数; P_i 、 P_j 分别为第 i 和第 j 个等位基因在群体中的频率, $j = i + 1$ 。

2 结果与分析

2.1 筛选结果

将重组载体转化入感受态大肠杆菌 DH5 α ,获得富集微卫星的基因组文库,共约 6 000 个克隆。随机挑取基因组文库约 3 000 个克隆,经同位素杂交进行二次筛选,得到 1 758 个阳性克隆,阳性克隆率为 58.6%;挑出其中的 373 个克隆进行测序,其中除 25 个克隆信号较弱外,其余 348 个克隆含有 280 个微卫星座位,微卫星含量达 80.5%;其中目的重复单元除 TGA/ACT、CAG/GTC 和 ATAG/TATC 外,还观察到 $(\text{TC})_n$ 、 $(\text{TG})_n$ 、 $(\text{CTG})_n$ 、 $(\text{TGC})_n$ 、 $(\text{GATA})_n$ 和 $(\text{ATCT})_n$ 等重复序列。图 1 为同位素二次杂交放射自显影的部分图像。

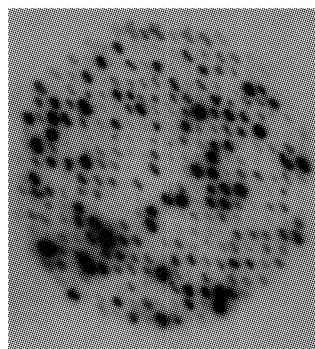


图 1 同位素二次杂交放射自显影图像
Fig. 1 Images of isotope second hybridization autoradiography

2.2 测序结果

根据 WEBER^[14] 提出的测序标准按完美型 (perfect)、非完美型 (imperfect)、混合型 (compound) 3 种类型对所获得的微卫星序列进行分类(表 1)。280 个微卫星序列中完美型 167 个(59.64%),非完美型 28 个(10%),混合型 85 个(30.36%)。微卫星重复次数大都在 5~25 次(96.18%),还有一小部分重复次数在 25 次以上(3.82%)。

2.3 3 种生物素探针的杂交效率

探针的杂交效率是指符合探针类型的微卫星占该探针富集的微卫星序列的比率。本研究所用的 3 种生物素探针 $(\text{TGA})_8$ 、 $(\text{CAG})_8$ 以及

(AGAT)₆ 的杂交效率分别为:38.71%、21.90% 和 36.61%。测序结果显示,所统计出的微卫星序列中,核心序列分别为二、三、四碱基的序列个数以及所占比例如表 2 所示。

表 1 鲢微卫星的不同类型重复序列所占比例

Tab. 1 Percentage of various repeat sequence types of microsatellite in silver carp

类别	类型			重复次数			重复序列			
	完美型	非完美型	复合型	5~10	10~25	>25	TGA/ACT	CAG/GTC	AGAT/TCTA	其他
序列数目	167	28	85	195	67	18	12	33	41	194
百分比	59.64%	10%	30.36%	69.64%	23.93%	6.43%	4.29%	11.78%	14.64%	69.29%

注:微卫星数目为 280 个。

表 2 3 种生物素探针的杂交效率

Tab. 2 Hybridization efficiency of probes

	复合探针的序列	二碱基	三碱基	四碱基	杂交效率
Bio-(TGA) ₈	38.71%	6.45%	54.84%	-	38.71%
Bio-(CAG) ₆	21.90%	2.19%	75.91%	-	21.90%
Bio-(AGAT) ₈	36.61%	4.46%	4.46%	54.56%	36.61%

2.4 引物设计与扩增结果

采用 Primer 3.0 软件进行在线引物设计,选择性设计出 60 对引物。采用常规 PCR 方法,利用一个采自珠江流域的野生鲢群体对合成引物

进行筛选。结果有 52 对引物可以扩增出清晰的片段,其中有 22 对具有良好的多态性(表 3),其片段长度均在 118~253 bp 之间。图 2 为筛选出的多态性标记在鲢群体中的扩增结果。

表 3 鲢多态性微卫星位点的遗传参数

Tab. 3 Characteristics of polymorphic microsatellite loci from *Hypophthalmichthys molitrix*

位点	引物序列	片段大小 /bp	核心序列	退火温度 /℃	等位基因数	期望杂合度 H_e	多态信息含量	GenBank 登陆号
HLJBL164	F: cgcaccaaggacaaacctaa R: cctgcagaagctacgagacc	170~187	(CAG) ₆	61 60	4	0.215 8	0.200 6	HQ116418
HLJBL165	F: ttagaggaacactggatgacc R: tgctgttctacagagtttgg	151~163	(TGC) ₆	58 58	5	0.742 9	0.684 1	HQ116419
HLJBL166	F: ctccaccggatgtgtatg R: ctgtggctccttgagtc	151~156	(GCA) ₅	60 60	3	0.158 8	0.150 0	HQ116420
HLJBL167	F: ccaccggatagagaaactcg R: ttatggcgccctacacag	176~183	(GTC) ₆	60 60	3	0.526 6	0.451 3	HQ116421
HLJBL168	F: ggccgaaatgtgactgact R: atttatggccgtgtctcaa	179~189	(CTG) ₆	60 60	4	0.734 5	0.671 5	HQ116422
HLJBL169	F: cgacgatcagaggagatcc R: ggcccagaagcattctctt	159~177	(TCA) ₁₁	60 61	6	0.688 1	0.644 2	HQ116423
HLJBL170	F: tgggtcagccttaaatgaa R: gaggaggccacctaagac	146~160	(CTG) ₈	60 60	5	0.694 4	0.627 5	HQ116424
HLJBL172	F: gttcacggcaacacagtct R: gtaccgtcgacgatcggag	119~126	(CAG) ₈	59 61	2	0.065 5	0.062 3	HQ116425
HLJBL173	F: tcttgagtggtttggcatga R: cattcgtcgacagtttgc	161~185	(TGC) ₆	60 61	3	0.503 4	0.439 8	HQ116426
HLJBL174	F: gtcgacgatcctgagtcceat R: ggaatgagatgtggcctaa	208~253	(GATA) ₁₀	60 60	7	0.829 4	0.791 1	HQ116427
HLJBL176	F: atccgaccttaacgctaca R: tegtcttctctctgtcc	138~184	(ATCT) ₆ N(ATCC) ₇	60 59	8	0.797 2	0.755 8	HQ116428

续表 3

位点	引物序列	片段大小 /bp	核心序列	退火温度 /°C	等位基因数	期望杂合度 H_e	多态信息含量	GenBank 登陆号
HLJBL178	F: gatgggaaggcagacagaaa	170 ~ 181	(GATA) ₇	60	3	0.066 1	0.063 9	HQ116429
	R: gcttctcctgaggacgtta			60				
HLJBL180	F: cegtcgacgatcctcatta	123 ~ 168	(TCTA) ₅ N(TCTA) ₈	61	7	0.835 5	0.798 5	HQ116430
	R: tgaatagacgagcagtgata			N(TCCA) ₇				
HLJBL181	F: tcgacgatctctccctgitt	118 ~ 166	(TCTA) ₉	60	6	0.762 1	0.710 3	HQ116431
	Rr: cagctcgatcgatagacacac			59				
HLJBL184	F: ctgctatgctgcaccacact	213 ~ 235	(CTAT) ₅ N(TCTG) ₅	60	5	0.444 6	0.410 0	HQ116432
	R: ggcattggttctactctgta			60				
HLJBL202	F: ttactgcccagagactgct	139 ~ 154	(CTG) ₆ N(TGT) ₆	60	3	0.263 8	0.233 4	HQ116434
	R: acaagcagcagagagtttg			N(TGC) ₈				
HLJBL203	F: gcaatcgctcgatagacaga	131 ~ 146	(GCA) ₁₁	60	3	0.452 5	0.381 0	HQ116435
	R: gtgctctctgaggctgaa			59				
HLJBL211	F: cegtcgacgatcttaccattg	155 ~ 172	(TATC) ₉	59	3	0.633 3	0.551 6	HQ116436
	R: caaaccttgatgttgcttgag			60				
HLJBL216	F: tatgcaggtcagtggaacga	189 ~ 244	(TCTA) ₇	60	7	0.841 6	0.803 2	HQ116437
	R: aacgacgacagaacgacaga			60				
HLJBL217	F: ggggttacattcacttcaa	176 ~ 249	(GATA) ₁₀	60	7	0.863 8	0.830 7	HQ116438
	R: acgatctggccaacgatatg			61				
HLJBL219	F: gaacgagcagtgatagatgatt	155 ~ 194	(GATG) ₇ N(ATAG) ₈	60	7	0.795 5	0.755 0	HQ116439
	R: tacegtcgacgatcctcat			N(ATAG) ₅				
HLJBL220	F: tcaatcggccatctatcag	196 ~ 222	(TCTA) ₇ N(TCCA) ₆	61	6	0.831 6	0.791 6	HQ116440
	R: ttgctgccattccataaaga			59				

注: F 为正向引物; R 为反向引物。

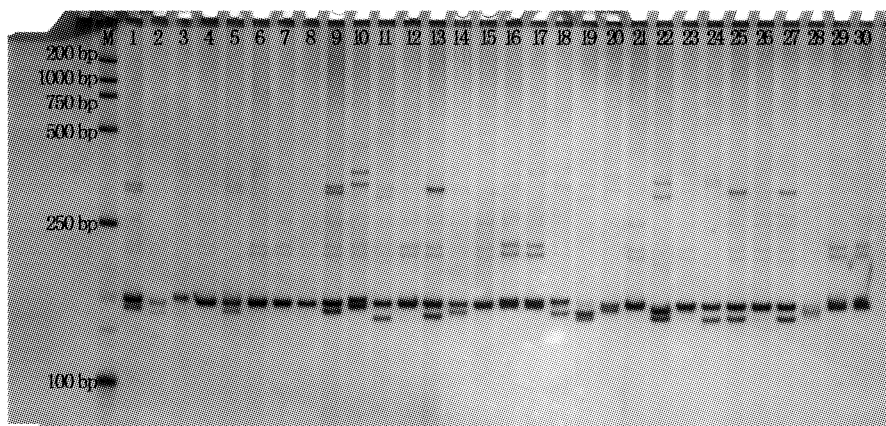


图 2 引物 HLJBL169 的扩增结果

Fig. 2 Amplification result of locus HLJBL169

M. DNA 分子量标准 DL2000; 1 - 30. 30 个鲢个体。

本研究所得到的 22 个微卫星标记,共检测出 107 个等位基因,每个位点的平均等位基因数为 4.696 个,数量最多的是 HLJBL176,共检测到 8 个等位基因。这些等位基因片段大小均在 118 ~ 253 bp 之间,其中最大片段出现在 HLJBL174 位点上,为 253 bp;最小片段出现在 HLJBL181 位点上,为 118 bp。用珠江水系的野生鲢群体对本研究得到的微卫星标记进行多态性位点检测,将所

得到的结果进行统计计算,发现 22 个微卫星标记在珠江群体中平均观察杂合度为 0.482 4,平均期望杂合度为 0.579 4,平均多态信息含量达到 0.536 7。其中核心序列为三、四核苷酸重复的微卫星各有 11 个,三核苷酸重复微卫星的平均等位基因数为 3.7 个,多态信息含量平均值为 0.4;四核苷酸重复微卫星的平均等位基因数为 6 个,多态信息含量平均值为 0.7。

3 讨论

磁珠富集技术在水产动物的研究中已经日趋成熟^[15-16],在此基础上,本研究利用多碱基(三、四核苷酸重复)探针筛选出微卫星分子标记结合同位素探针进行两次筛选,是开发鲢微卫星分子标记过程中新的尝试与探索。这种技术方法相对于传统的克隆方法以及质粒检测具备灵敏度高,周期短,目的性强,阳性克隆率及效率高,一次可获得大量的微卫星序列等优点,同时可以较好地避免克隆库中的假阳性克隆,从理论上讲,文库中每一个白色菌落都应含有微卫星序列^[17]。然而,本研究中通过同位素探针二次筛选所得到的阳性克隆率仅为 58.6%,远低于使用该方法理论上可得到的阳性克隆率。笔者分析其原因可能是在进行同位素二次杂交过程中所使用的放射性元素放置时间较长,放射自显影的信号较弱,使一些原本应为阳性克隆的菌落阴影在 X 光片上未被显示出来。在所得到的全部含有微卫星的 280 个序列中完美型 167 个(59.64%),这个结果与牙鲢(*Paralichthys olivaceus*)^[10]以及黑斑狗鱼(*Esox reichertii Dybowski*)^[18]基本相似。与此同时本研究中微卫星重复次数大都在 5~25 次(96.18%),从而进一步验证了 ELLEGREN^[19]研究所提出的结论,即在真核生物中微卫星的核心序列重复次数大多小于 30 次。

本实验室的姬长虹等^[20]曾利用 34 个微卫星引物对长江、珠江、黑龙江三大水系野生鲢进行遗传多样性分析,这里仅就珠江群体与本研究的结果进行对比。文章显示每个位点检测到的等位基因数为 2~9 个,平均为 4.666 7 个,在珠江群体中共检测到 113 个等位基因;平均观察杂合度为 0.443 3;平均期望杂合度为 0.546 4;平均多态性信息含量为 0.489 0。本研究与姬长虹等的研究所用的珠江样本为同一群体,因此不同引物检测出的等位基因数以及观察和期望杂合度没有明显差异,且观察杂合度均小于期望杂合度,说明群体中存在杂合子确实现象。平均多态性信息含量是衡量等位基因片段多态性的理想指标^[13]。在某一群体中,当平均多态性信息含量大于 0.5 时,该座位为高度多态性座位;当平均多态性信息含量大于 0.25 而小于 0.5 时,该座位为中度多态性座位;当平均多态性信息含量小于 0.25 时,该

座位为低度多态性座位^[13]。本研究的平均多态性信息含量(0.536 7)大于姬长虹等的研究结果(0.489 0),说明本研究中所开发的微卫星具有更高的多态性。

由于二核苷酸微卫星序列丰富,故对水产动物的研究多以二核苷酸重复的微卫星探针为主,三核苷酸重复序列由于含量比二核苷酸微卫星序列大约低 10 倍,而四核苷酸微卫星就更为少见^[21],所以较少作为探针进行筛选。但在一些文献中曾经指出三核苷酸具有其自身的优势,通过对 PCR 反应结果分析发现,由于三核苷酸扩增稳定,较少出现“结巴带”,故基因分型效果较二核苷酸微卫星要好^[22-23]。研究也发现:在人类及其它一些物种中三核苷酸和四核苷酸重复序列比二核苷酸重复序列遗传稳定性更高且扩增更忠实^[24-25]。基于以上理论,将本研究的结果与姬长虹等^[20]的研究结果相比较后得出结论:四核苷酸重复的微卫星比二、三核苷酸重复微卫星具有更高的筛选效率和遗传稳定性。这个结果与鲁翠云等^[26]在鲤鱼基因组中筛选的三、四核苷酸重复微卫星标记的结果基本相似,因此可以有力地说明在鱼类研究中,微卫星标记核苷酸重复碱基数越高,表示该标记的扩增稳定性越高,筛选效率也越高,更加适合作为种群分析的工具标记。

在本次获得的 22 个标记中 HLJBL165、HLJBL168、HLJBL169 等 13 个标记的平均多态性信息含量值均大于 0.5,表示这些标记可作为鉴定鲢种质资源,建立家系图谱以及 QTL 定位等研究的候选标记。现今微卫星标记已经广泛运用到经济水产养殖品种的研究中。除了鲤鱼、牙鲢、大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)^[27]等鱼类,在许多节肢动物和贝类中,微卫星技术也日趋成熟^[28-32]。对于我国特有品种的鲢,我国学者对其种质资源进行过研究并积累了一些资料,李思发和吕国庆^[33]对线粒体 DNA(mt DNA)的 ND5/6、Cytb 基因和 D-Loop 区片段进行了 RFLP 分析,对长江中下游水系的鲢原种群进行了评价;吴力钊和王祖熊^[34]用 7 个标记分析长江中游鲢天然种群 11 种同工酶的遗传变异性,结果表明鲢天然种群的多态座位比例与人工繁殖种群相似,并指出鲢人工繁殖种群遗传变异性的降低在很大程度上取决于人工繁育过程中的某些不合理

因素,要在生产过程中加以避免或者限制;张四明等^[35-36]分别用 RFLP 和 RAPD 技术对长江水系鲢和草鱼的遗传多样性进行比较,发现长江鲢的遗传多样性普遍比草鱼要丰富。然而,利用微卫星作为工具的报道不多,只有少数关于鲢 2 碱基微卫星克隆的研究^[18,37],而 3 碱基及以上的微卫星克隆的相关研究还未见报道。因此本次研究克隆筛选出的鲢微卫星序列进一步丰富了鲢的微卫星资源;此外本研究提供的 22 对三、四核苷酸重复微卫星标记具有较高的筛选效率和遗传稳定性,可以作为较好的分析工具,通过遗传多样性分析、种质资源鉴定和家系图谱的建立等方法,运用到鲢分子辅助育种、野生种群的保护管理和养殖种的种质评价,以及相关种群的遗传特性等研究中,从而实现对鲢的种质资源科学管理以及应用,并对进一步开发鲢分子标记、构建遗传连锁图谱、品种选育及评估等方面具有重大意义。

参考文献:

- [1] 李思发,吴力钊,王强,等. 长江珠江黑龙江鲢鳙草鱼种质资源研究[M]. 上海:上海科学技术出版社,1990.
- [2] LAGERCRANTZ U, ELLEGREN H, ANDERSSON L. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates[J]. *Nucleic Acids Research*, 1993,21(5): 1111-1115.
- [3] 盛岩,郑蔚红,裴克全,等. 微卫星标记在种群生物学研究中的应用[J]. *植物生态学报*,2002,26(s): 119-126.
- [4] 孙效文,贾智英,魏东旺,等. 磁珠富集法与小片段克隆法筛选鲤微卫星的比较研究[J]. *中国水产科学*,2005,12(2): 126-132.
- [5] 孙效文,张晓锋,赵莹莹,等. 水产生物微卫星标记技术研究进展及其应用[J]. *中国水产科学*,2008,15(4): 689-703.
- [6] 魏东旺,楼允东,孙效文,等. 鲤鱼微卫星分子标记的筛选[J]. *动物学研究*,2001,22(3): 238-241.
- [7] 鲁翠云,孙效文,梁利群. 鳙鱼微卫星分子标记的筛选[J]. *中国水产科学*,2005,12(2):192-196.
- [8] 孙效文,鲁翠云,梁利群. 磁珠富集法分离草鱼微卫星分子标记[J]. *水产学报*,2005,29(4): 482-486.
- [9] 顾颖,郭忠宝,谷晶晶,等. 大菱鲆微卫星标记的分离及其多态性位点检测[J]. *大连水产学院学报*,2009,24(4): 365-370.
- [10] 王蕾,刘继红,张立冬,等. 牙鲆基因组(CAG)_n 微卫星 DNA 特征分析[J]. *中国水产科学*,2009,16(6): 807-815.
- [11] 萨姆布鲁克 J, 拉萨列 D W. 分子克隆试验指南[M]. 3 版. 黄培堂,译. 北京:科学出版社,2002.
- [12] KANDPAL R P, KANDPAL G, WEISSMAN S M. Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping clones, and hybridization selection for region specific markers[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(1): 88-92.
- [13] BOTSTEIN D, WHITE R I, SKOLNICH M. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314-331.
- [14] WEBER J L. Informativeness of human (dT-dA)_n, (dGdT)_n polymorphisms[J]. *Genomics*, 1990(7): 524-530.
- [15] 马海涛,鲁翠云,于冬梅,等. 草鱼基因组中微卫星分子标记的制备及筛选[J]. *上海水产大学学报*,2007,16(4): 389-393.
- [16] 毛瑞鑫,鲁翠云,刘福军,等. 中华绒螯蟹部分基因组文库构建和微卫星位点的筛选[J]. *上海海洋大学学报*,2009,18(2): 129-135.
- [17] JIA Z, SUN X, LIANG L, et al. Isolation and characterization of microsatellite markers from Fangzheng silver crucian carp (*Carassius auratus* (Bloch)) and cross-amplification in the closely related species crucian carp (*C. auratus auratus* (Linnaeus)) [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2006, 6: 1141-1143.
- [18] WANG H Z, YIN Q Q, FENG Z G, et al. Construction Fractional Genomic Libraries and Screening Microsatellites DNA of *Esox reichertii* Dybowski [J]. *Zoological Research*, 2008,29(3): 245-252.
- [19] ELLEGREN H. Microsatellite evolution: a battle between replication slippage and point mutation [J]. *Trends in Genetics*, 2002, 18(2): 70.
- [20] 姬长虹,毛瑞鑫,朱新平,等. 长江、珠江、黑龙江水系野生鲢遗传多样性的微卫星分析[J]. *水产学报*,2009,33(3): 364-371.
- [21] MA Z Q, RODER M, SORRELLS M E. Frequencies and sequence characteristics of di-, tri-, and tetra-nucleotide microsatellites in wheat [J]. *Genome*, 1996, 39(1): 123-130.
- [22] DIWAN N, CREGAN P B. Automated sizing of fluorescent-labelled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean[J]. *Theory of Applied Genetics*, 1997, 95(5): 723-733.
- [23] HEARNE C M, GHOSH S, TODD J A. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits [J]. *Trends in Genetics*, 1992, 8(8): 288-294.
- [24] KIJAS J M H, THOMAS M R, FOWLER J C S, et al. Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of *Citrus*[J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 94(5): 701-706.
- [25] GASTIER J M, PULIDO J C, SUNDEN S, et al. Survey of trinucleotide repeats in the human genome: assessment of their utility as genetic markers [J]. *Human Molecular Genetics*, 1995, 4(10): 1829-1836.
- [26] 鲁翠云,毛瑞鑫,李鸥,等. 鲤鱼三、四核苷酸重复微卫星

- 座位的筛选及特征分析[J]. 农业生物技术学报,2009,17(6): 979-987.
- [27] 郝君,孙效文,梁利群,等. 大黄鱼微卫星标记的富集与筛选[J]. 中国水产科学,2006,13(5): 263-766.
- [28] 赵莹莹,朱晓琛,孙效文,等. 磁珠富集法筛选虾夷扇贝微卫星序列[J]. 中国水产科学,2006,13(5): 749-755.
- [29] 李红蕾,宋林生,王玲玲,等. 栉孔扇贝 EST 中微卫星标记的筛选[J]. 高技术通讯,2003,13(12): 72-75.
- [30] 徐鹏,周岭华,相建海,等. 中国对虾微卫星 DNA 的筛选[J]. 海洋与湖沼,2001,32(3): 255-259.
- [31] 李琪,木岛明博. 长牡蛎微卫星克隆快速分离及特征分析[J]. 海洋与湖沼,2004,35(4): 364-370.
- [32] 贾智英,全迎春,梁利群,等. 凡纳滨对虾微卫星 DNA 的筛选及其特性的研究[J]. 上海水产大学学报,2007,16(1): 11-15.
- [33] 李思发,吕国庆. 长江中下游鲢鳙草青四大家鱼线粒体 DNA 多样性分析[J]. 动物学报,1998,44(1): 82-93.
- [34] 吴力钊,王祖熊. 长江中游白鲢天然种群的生化遗传结构及变异[J]. 水生生物学报,1997,21(2): 157-162.
- [35] 张四明,邓怀,汪登强,等. 长江水系鲢和草鱼遗传结构及变异性的 RAPD 研究[J]. 水生生物学报,2001,25(4): 324-330.
- [36] 张四明,汪登强,邓怀,等. 长江中游水系鲢和草鱼群体 mtDNA 遗传变异的研究[J]. 水生生物学报,2002,26(2): 142-147.
- [37] 鲁翠云,孙效文,曹洁,等. 磁珠富集法筛选白鲢的微卫星分子标记[J]. 农业生物技术学报,2005,13(6): 772-776.

Development and characteristics of tri- and tetra-nucleotide microsatellites for silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)

TAN Zhao-jun¹, ZHANG Tian-qi¹, LU Cui-yun^{2,3}, LI Chao², SUN Xiao-wen²

(1. College of Life Science and Technology, Dalian Ocean University, Dalian 116023, Liaoning, China;

2. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, Heilongjiang, China;

3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: It was a study to isolate the tri- and tetra-nucleotide repeat microsatellite from silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) with magnetic beads enriched method. Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) genomic DNA was extracted from blood and digested with restriction Sau 3A I. The segments of 400-900 bp were collected by centrifugation of sucrose density gradient and then a whole genome PCR library was created. The genomic DNA was hybridized with biotin-labeled microsatellite probes (TGA)₈, (CAG)₈, (AGAT)₈, and the single-stranded DNA containing the selected microsatellite DNA was obtained. Those selected DNAs were amplified with PCR, cloned into pMD 18-T vector, transformed into the competent *Escherichia coli* DH5 α , and the microsatellite library was finally obtained. The second screen was performed with radiolabeled probes. 1758 positive clones were obtained and 348 microsatellite clones contained 248 microsatellite sequences. There were 167 (59.64%) perfect motifs, 28 (10%) imperfect motifs, 85 (30.36%) compound motifs. 60 pairs of primers were designed with the software Primer 3.0 and detected with the wild population of silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) from the Pearl River. The results showed that 22 pairs of primers could be used to amplify special fragments and a genetic tool to evaluate germplasm resources of silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*).

Key words: *Hypophthalmichthys molitrix*; microsatellite; tri- and tetra-nucleotide microsatellites