

文章编号: 1674-5566(2012)06-0951-04

西太公鱼微卫星的筛选与分析

龚小玲, 吴颖, 任圣杰, 刘其根

(上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

摘要: 利用磁珠富集法从西太公鱼 (*Hypomesus nipponensis*) 基因组中筛选到 14 对多态性微卫星引物, 并对来自黑龙江镜泊湖的西太公鱼 24 个样本进行检测: 扩增的等位基因数在 3 ~ 25 个之间, 平均为 8.4 个; 观察杂合度 (H_o) 和期望杂合度 (H_e) 分别为 0.266 7 ~ 1.000 0 和 0.282 5 ~ 0.932 2; 多态信息含量 (PIC) 为 0.239 2 ~ 0.910 6; 位点 HN-075 和位点 HN-250 显著偏离哈迪-温伯格平衡 ($P < 0.05$), 这些多态性微卫星位点可用于公鱼属鱼类种群遗传结构及其相关研究。

研究亮点: 本研究首次对在中国大陆广泛移植的西太公鱼多态性微卫星位点进行筛选, 这也是公鱼属鱼类首次公开报道、可以共享的微卫星数据, 它们可用于公鱼遗传学相关的研究。

关键词: 西太公鱼; 微卫星; 种群; 移植
中图分类号: S 917
文献标志码: A

西太公鱼 (*Hypomesus nipponensi*) 隶属于胡瓜鱼目 (Osmeriforms), 胡瓜鱼科 (Osmeridae), 公鱼属 (*Hypomesus*)^[1], 分布于太平洋西部的淡水、半咸水和沿海区域^[2]。西太公鱼是否是中国本土物种存在争议, 史为良等^[3]认为在 1942 年从朝鲜引入中国的, 而 fishbase 数据库中提供的信息则认为西太公鱼是否原产中国并不确定 (<http://www.fishbase.org/search.php>)。目前, 西太公鱼是中国常见种, 主要分布在东北地区, 为银白色的小型个体, 肉嫩油多而味美, 多为一年生, 亲体产卵后大多死亡。因其适温广 (0 ~ 28℃), 繁殖力、适应性强, 后来在中国被广泛移植到全国各地, 也长期被误认为是池沼公鱼 (*Hypomesus olidus*)^[4]。西太公鱼在中国大面积的移植, 但它的种群遗传结构和移植路径等研究极少, 筛选的多态性微卫星位点可用于这些研究。

1 材料与方法

1.1 样本

本实验所用西太公鱼样本来自黑龙江镜泊

湖, 鲜活个体鳍条用 95% 乙醇, 4℃ 保存。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取

基因组 DNA 提取采用饱和氯化钠法^[5], 提取 DNA 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后 -20℃ 存储备用。

1.2.2 微卫星的筛选

微卫星的筛选方法参照 GONG 等^[6], 主要过程: (1) 基因组 DNA 以 *Sau3AI* 切酶, 回收 250 bp ~ 1 000 bp 酶切片段; (2) 酶切片段加接头 AB (Micr-A : 5'GATCGTGCACGGTACCGAATTCT 3', Micr-B : 5'GTCAAGAATTCGGTACCGTCGAC 3'); (3) 以加接头 AB 的 DNA 为模板, 接头 B 为引物进行扩增; (4) 扩增产物纯化后解链, 与 5'生物素标记 (CA) 15 探针杂交; (5) 杂交富集的微卫星 DNA 转化感受态细胞 DH5 α , 建立微卫星 DNA 文库; (6) 将菌落 PCR 检测到有插入片段的阳性克隆交由上海美吉生物公司测序。

1.2.3 引物设计

测序结果用 SSRHunter 软件对去载体后的微

收稿日期: 2012-05-31 修回日期: 2012-10-08

基金项目: 上海市科技攻关项目 (10dz1200804); 上海市自然科学基金 (09ZR1421700); 上海市教育委员会创新项目 (09YZ279); 上海市重点学科建设项目 (S30701)

作者简介: 龚小玲 (1972—), 女, 博士, 副教授, 研究方向为鱼类系统发育。E-mail: xlgong@shou.edu.cn

通讯作者: 刘其根, E-mail: qgliu@shou.edu.cn

卫星序列进行分析,用在线软件 Web Primer (<http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer>)进行引物设计,并挑选部分引物交上海生工技术有限公司合成。

1.2.4 引物检测

取3尾西太公鱼 DNA 样本,梯度 PCR 确定各引物最适退火温度,PCR 体系为 0.5 μ L DNA、0.5 μ L 引物(10 μ mol/L)、5 μ L 2 \times PCR Mix,去离子水补足 10 μ L。PCR 反应程序为:94 $^{\circ}$ C 5 min、94 $^{\circ}$ C 30 s、53 ~ 63 $^{\circ}$ C(根据引物的退火温度进行调整)30 s、72 $^{\circ}$ C 30 s、35 个循环、72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min、4 $^{\circ}$ C 保存,扩增产物用 8% 的聚丙烯酰胺胶进行电泳检测。对检测有条带的引物,以西太公鱼 24 个个体进行多态性分析。

1.3 数据处理

用 POPGENE 3.2^[7] 软件计算出观察杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e),然后参照 BOTSTEIN^[8]的方法计算每个位点的多态信息含量(polymorphism information content, PIC),群体的哈迪-温伯格平衡用 GENEPOP 1.2^[9]进行检验。

2 结果

2.1 重组子及杂交

本实验共获得 1 391 个转化子,取其中的 390 个经菌落 PCR 检测,其中 144 个成功插入公鱼基因组片段,测序获得的序列经 SSRHunter 软件筛选,有 132 个克隆含有微卫星序列,占全部测序序列的 91.7%。

2.2 阳性克隆测序及重复序列的分布特征

在 132 个含有西太公鱼微卫星的序列中,有 65 条差异序列。同一序列中可能同时含有不同重复单元、不同重复次数的多种重复,重复单元连续重复次数大于 9 个的有 94 个,单元重复最多为 62 次。根据 WEBER^[10]提出的标准进行分类,完美型序列 16 个,非完美型序列 34 个,混合型序列 15 个,分别占 24.6%、52.3%、23.1%。由于本实验使用的探针是 CA 探针,因此出现的微卫星序列大多为(CA)_n序列,以及与 AC 互补的(TG)_n序列。同时也检测少量以(CAGA)⋯(AG)、(CA)⋯(TC)为重复单元的序列(图 1)。

2.3 引物筛选及评估

共设计合成引物 30 对,以 3 个体进行初步扫描,并得到最适 PCR 条件。其中 25 对引物能扩

增出清晰的 DNA 条带,以 24 个体进行扫描后,发现其中 11 个扩增出无差异条带,14 对扩增出多态性条带,引物序列及信息见表 1。

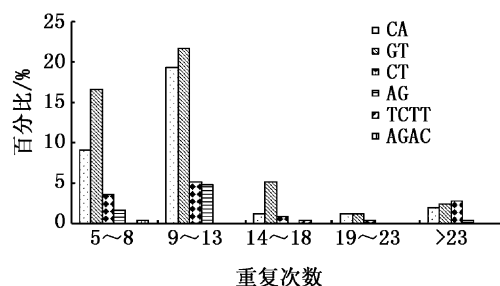


图 1 西太公鱼微卫星大小分布
Fig. 1 Microsatellite size distribution of *Hypomesus nipponensis*

各位点等位基因数从 3 到 25 个不等,平均为 8.36 个。该群体的观察杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e)分别为 0.266 7 ~ 1.000 0 和 0.282 5 ~ 0.932 2,多态信息含量(PIC)是 0.239 2 ~ 0.910 6,其中 10 个位点的 PIC 大于 0.5,位点 HN-075 和位点 HN-250 显著偏离哈迪-温伯格平衡($P < 0.05$,表 2)。

3 讨论

开发微卫星分子标记有两种方法,一是传统小片段克隆,另一个方法就是本实验中使用的磁珠富集法,前者保真率高,但操作比较繁杂,后者较为简单高效^[11-12]。本研究以动物中常见的微卫星重复(CA)₁₅为探针,使用磁珠富集法,144 个有插入片段的克隆中 132 个含有微卫星序列,阳性克隆率达 91.7%,与其它水生动物微卫星筛选相比,阳性克隆率较高^[13-15]。微卫星序列中(CA)和(GT)重复比例最高占 79.8%,同时还出现(CT)_n和(AG)_n重复。非完美型比例较高(52.3%),完美型(24.6%)和混合型(23.1%)比例接近,由于非完美型多为点突变类型,这些突变可作为进一步研究种群系统进化的证据^[16],也为研究西太公鱼移植后种群遗传结构变化提供了参考。

筛选的 14 个多态性微卫星位点以黑龙江镜泊湖 24 个西太公鱼样本进行扩增,等位基因 3 ~ 25 个不等,平均 8.4 个;多态信息含量均值为 0.637 5,中度多态信息座位(PIC 在 0.25 ~ 0.50 之间)的有 4 个,其余均为高度多态信息座位

表 1 西太公鱼 14 对微卫星标记及其引物

Tab. 1 14 microsatellite markers and their primers in *H. nipponensis*

位点	引物序列(5'-3')	重复单元	退火温度/°C	片段大小/bp	重复类型
HN-001	F: GCACAAGCACATAACCAAGG R: TTCATCCGTCTGGACCTG	(AC) ₁₁	63	257 ~ 298	完美型
HN-003	F: CGTCAGAAACGTAATCCCAC R: ATCGCAGCCACTATTGACAG	(GT) ₇	63	176 ~ 184	完美型
HN-004	F: GAGAGGGTTGGCATGAAAG R: TGGCGGTGATTGACACTT	(CA) ₁₁	63	142 ~ 148	完美型
HN-014	F: GTCCGAAAGAACCCCTAAAG R: ATGCTACAGAAACAGCTGCC	(GT) ₁₀	63	187 ~ 197	完美型
HN-020	F: CAGCAGACTAAAGGGCACCAT R: AGCGGATTCACCTGGAACA	(TG) ₈ /(TG) ₁₂	58	254 ~ 280	非完美型
HN-026	F: TCGACAATCAATGCCGATTA R: AAAAAACAAACGCTGCCACTC	(TG) ₈	65	217 ~ 231	完美型
HN-028	F: TCACATCCTCCTTGGTCAC R: GGCTGATGATGTTCTGATGG	(CAGA) ₁₂ (AG) ₂₃	63	252 ~ 347	混合型
HN-043	F: ACGTGATACATAAGTTCTCGCA R: AAATGCTGTGACTCATGC	(CA) ₁₄	57	123 ~ 142	完美型
HN-051	F: TTCTTCTGTACTGGCCATC R: TATTCCGGAGGAGACAGACA	(GA) ₁₂	63	155 ~ 169	完美型
HN-055	F: TGATTATGCTGTGTGTGCTTG R: CTGGCTCTGACCTTGCATTA	(GT) ₁₄ /(TG) ₁₃	65	207 ~ 317	非完美型
HN-075	F: CGCCTGACTTGGTAAATCCT R: ATTCACGGCTGCAGTAGAG	(GT) ₂₅	57	171 ~ 243	完美型
HN-200	F: CACTGGCATCCTACAGGTACA R: TTGGGTCTCAGGAACATAGGT	(CA) ₂₀ /(TC) ₁₅	61	165 ~ 183	混合型
HN-250	F: ATGCTGGAGGAAGATTAGGG R: CAGCCAGCAGCCTCTTACACA	(GT) ₂₀	62	302 ~ 328	完美型
HN-257	F: CTGCCATACCTCAGACAACGG R: TAATGCTTTAGACGGTTTCCC	(AC) ₉	57	273 ~ 295	完美型

表 2 西太公鱼 14 个微卫星位点的引物序列、PCR 扩增条带和产物特征

Tab. 2 Primer sequences, PCR conditions and characteristics for 20 microsatellite loci in *H. nipponensis*

位点	退火温度 /°C	等位基因数 N	多态信息含量 PIC	观察杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	哈-温平衡检测值 PHWE -value	序列号
HN-001	63	9	0.596 4	0.666 7	0.656 5	0.404 9	FJ980447
HN-003	63	3	0.369 8	0.428 6	0.498 7	0.700 3	GU457020
HN-004	63	3	0.294 1	0.400 0	0.336 7	0.700 7	FJ980448
HN-014	63	6	0.407 3	0.466 7	0.466 1	0.731 6	FJ980449
HN-020	58	6	0.795 0	0.958 3	0.837 8	0.209 6	JX080678
HN-026	65	4	0.239 2	0.266 7	0.282 5	1.000 0	GU444120
HN-028	63	25	0.910 6	0.966 7	0.932 2	0.135 4	FJ980450
HN-043	57	10	0.689 9	0.700 0	0.731 6	0.878 0	FJ980451
HN-051	63	5	0.579 6	0.666 7	0.658 2	0.878 0	FJ980452
HN-055	65	16	0.859 9	0.933 3	0.886 4	0.219 4	GU444121
HN-075	57	13	0.885 7	0.966 7	0.910 2	0.000 4	FJ980454
HN-200	61	5	0.725 4	0.625 0	0.762 2	0.075 6	VJX080679
HN-250	62	6	0.795 9	1.000 0	0.821 2	0.011 7	JX080680
HN-257	57	6	0.775 9	0.750 0	0.803 0	0.605 0	JX080681
均值		8.4	0.637 5	0.699 7	0.684 5		

(PIC > 0.5)^[8],表明筛选的位点多态性较高,适用于西太公鱼及其近缘种相关的遗传学研究,观察杂合度有的稍高于期望杂合度,有的低于期望

杂合度,观察杂合度与期望杂合度均值接近,这表明,尽管镜泊湖中的西太公鱼是移植引种的^[17],但并不存在明显的杂合缺失,这可能由于

移植群体比较大,近亲繁殖概率不高的缘故。但同时也观察到,14 个多态位点中有 2 个偏离哈-温平衡,另有 11 个位点,在 24 个个体中没有多态性,这暗示镜泊湖中的西太公鱼近亲繁殖是存在的,如何合理开发利用西太公鱼是应该引起重视的。

参考文献:

- [1] 解玉浩. 我国的公鱼[J]. 大自然,1992(4):40.
- [2] MCALLISTER D E. A revision of the smelt family, Osmeridae [M]. Ottawa: Dept. of Northern Affairs and National Resources, 1963:1-53.
- [3] 史为良,毋全富,龔全胜. 我国池沼公鱼 (*Hypomesus olidus*) 和西太公鱼 (*H. nipponensis*) 的来源和比较[J]. 水利渔业,1987(2):5-9,42.
- [4] 曹晓霞,董仕,杨正玲,等. 关于移植公鱼的种类问题[J]. 河北渔业,2009(6):10-12.
- [5] 林长坤,姜莉,张励,等. 一种实用的基因组 DNA 提取方法及其应用[J]. 中国医科大学学报,1998(4):440-442.
- [6] GONG X L, REN S J, CHEN S Q, et al. Highly polymorphic microsatellite loci from the giant mottled eel (*Anguilla marmorata*) [J]. Molecular Ecology Resources, 2009, 9(6):1544-1547.
- [7] YEH F C, YANG R, BOYLE T. Microsoft Windows-based free ware for population genetic analysis[M]. Release 1.31. Edmonton: University of Alberta,1999.
- [8] 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.
- [9] RAYMOND M, ROUSSET F. GENEPOP (version 1.2). population genetics software for exact tests and ecumenicism[J]. J Hered,1995,86:248-249.
- [10] WEBER J L, WONG C. Mutation of human short tandem repeats[J]. Hum Mol Genet,1993,2:1123.
- [11] BROWN J, HARDWICK L J, WRIGHT A F. A Simple method method for rapid isolation of microsatellites from yeast artificial chromosomes [J]. Molecular and Cellular Probes 1995,9(1):53-57.
- [12] KANDPAL R P, KANDAPAL G, WEISSMAN S M. Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping clones, and hybridization selection for region-specific markers [J]. P Natl Acad Sci USA, 1994, 91(1):88-92.
- [13] 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.
- [14] 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,2009,4(4):366-370.
- [15] 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.
- [16] ZHU Y, QUELLER D C, STRASSMANN J E. A phylogenetic perspective on sequence evolution in microsatellite loci [J]. Molecular Ecology,2000,50(4):324-338.
- [17] 王彦文,唐荣庆,董杰武. 镜泊湖移植放养池沼公鱼效果分析[J]. 黑龙江水产,1994,58(4):24-26.

Isolation and characterization microsatellite markers from *Hypomesus nipponensis*

GONG Xiao-ling, WU Ying, REN Sheng-jie, LIU Qi-gen

(The key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Fourteen polymorphic microsatellite loci were isolated from the Japanese smelt (*Hypomesus nipponensis*). These microsatellite markers were tested in a sample of 24 individuals. The number of alleles ranged from 3 to 25, with an average of 8.4 alleles per locus. The observed and expected heterozygosity of these loci varied from 0.266 7 to 1.000 0 and 0.282 5 to 0.932 2, respectively. Locus HN-075 and HN-250 deviated significantly from Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.05$). No genotypic disequilibrium among loci was found ($P < 0.05$). These microsatellite markers could be useful in studying population structure of the Japanese smelt, or introduction routes of this fish to China.

Key words: *Hypomesus nipponensis*; microsatellite; population; transplant