

文章编号: 1674-5566(2011)02-0167-06

变态前牙鲆 cDNA 文库中 I 型微卫星的多态性分析

邢巨斌, 谢彩霞, 张逸飞, 鲍宝龙

(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: 牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 不仅是研究鱼类变态的模式生物, 也是我国的重要水产养殖对象。从变态前牙鲆 cDNA 文库中的 42 个单一序列表达标签 (ESTs) 中筛选到 46 个微卫星分子标记, 从中选择 21 个微卫星并在一个养殖牙鲆群体共 30 个样本中测试, 结果表明其中有 20 个微卫星标记具有多态性, 其等位基因数为 2 到 6 个, 观察杂合度从 0.06 到 1.00, 期望杂合度从 0.059 7 到 0.825 2 变化不等, 平均多态信息含量是 0.457 5, 可用于牙鲆连锁图的构建和分子标记辅助选育。其中, 有 3 个微卫星位点的三核苷酸重复序列在基因编码区内, 可能和基因功能有关。

研究亮点: I 型微卫星标记开发的研究并不多, 利用 ESTs 鉴定 I 型微卫星标记是非常有效的手段。本研究对一个牙鲆养殖群体 20 个位点的调查表明, I 型微卫星标记有较高的多态性, 可有效用作连锁图谱构建和辅助选育, *ADIPOQ*, *DZ1P1* 和 *NR4A2* 读码框内的微卫星标记, 应与基因的功能相关。

关键词: 牙鲆; I 型微卫星; 表达序列标签; cDNA 文库
中图分类号: S 917
文献标识码: A

牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 是中国非常重要的海水养殖鱼类, 也是研究鱼类变态发育的重要模型生物^[1-5]。微卫星 DNA (microsatellite DNA) 为简单重复序列, 重复单位由 1~6 个核苷酸对组成, 重复次数从几次到几十次不等。微卫星随机均匀分布在基因组中, 并具有高度多态性、遵循孟德尔遗传规律、共显性遗传等特点, 已在水产动物种质资源研究^[6]、种群遗传多样性研究^[7-9]、遗传连锁图谱构建^[10-11]、分子标记选育^[12]等方面得到了广泛应用。已有一些微卫星标记^[13-17]并应用到牙鲆种群遗传多样性研究的报道^[18-24], 但目前已开发的牙鲆微卫星标记仅有 211 个, 远达不到构建高密度遗传连锁图谱所需的数量^[25-26]。

在表达序列标签 (Expressed Sequence Tags, ESTs) 中寻找微卫星序列, 是开发 I 型分子标记的有效手段^[27], I 型分子标记在 cDNA 内, 能影响基因的功能。因此基于 ESTs 的分子标记与基因

的功能有很大的相关性, 这些标记与预测的表型能够进行关联^[28], 同时能够为各种鱼类基因组之间的共线性分析提供信息^[29]。目前已有 19 个牙鲆 I 型的微卫星标记^[30]。本研究从变态前牙鲆的 cDNA 文库中筛选出了 21 个微卫星标记, 并在一个养殖群体中通过测试表明具有多态性, 为分子标记辅助选育和研究牙鲆变态中的基因功能鉴定提供一定的基础。

1 材料与方法

1.1 用生物信息学方法发掘变态前牙鲆 cDNA 文库中的微卫星

在前期研究中, 我们构建了变态前牙鲆 (*P. olivaceus*) 的 cDNA 文库, 共得到了 2136 个 ESTs。通过分析, 筛选出包含微卫星标记的 ESTs, 并根据重复单位和重复次数对微卫星标记进行分类。微卫星序列通过在线软件 Microsat finder (<http://www.eusebius.mysteria.cz/microsatfinder/index.php>)

收稿日期: 2010-05-22 修回日期: 2010-12-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30771668); 教育部重点项目 (06ZZ65); 上海市教委重点学科建设项目 (S30701 和 J50701)

作者简介: 邢巨斌 (1984-), 男, 硕士研究生, 专业方向为发育生物学研究。E-mail: jubinxing@gmail.com

通讯作者: 鲍宝龙, E-mail: blbao@shou.edu.cn

进行查找,微卫星序列确定标准如下:2核苷酸,至少8次重复;3核苷酸,至少6次重复;4或5核苷酸,至少5次重复;6核苷酸,至少4次重复。

1.2 ESTs 上微卫星标记的多态性分析

根据重复序列两侧侧翼序列的长短,得到21个可进行引物设计和多态性检测的微卫星序列。用软件 FastPCR^[31] 设计特异性引物,提取30尾牙鲈(购自中国水产科学研究所北戴河苗种增殖中心)的DNA并对这些微卫星标记进行多态性检测。用基因组DNA快速抽提试剂盒(博大泰克,北京)提取牙鲈基因组DNA前,先以100 mg/L的3-氨基苯甲酸乙酯甲基磺酸盐(MS222)麻醉仔鱼,并去除头部和肠道以避免外源DNA的污染。微卫星序列扩增反应体系为10 μ L,其中2 \times GoTag[®] Green Master Mix(Promega公司)5 μ L,上下引物各500 pmol,模板DNA 50 ng,用无菌水补足反应体系。PCR反应条件如下:预变性95 $^{\circ}$ C, 5 min;95 $^{\circ}$ C 45 s,引物特异性退火45 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,共30个循环;最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min。各对引物的特异性退火温度如表1所示。用8%非变性聚丙烯酰胺胶和银染法进行微卫星多态性的检测,确定PCR产物片段大小并记录等位基因数。用Popgene软件^[32]分析观察杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e)等种群遗传学数据,并用卡方检测法的P值检验Hardy-Weinberg平衡(HWE)。

2 结果与讨论

通过在线软件Microsat finder在42个单一EST序列中共找到46个微卫星序列(表2)。这42个ESTs已提交到GenBank中(接受号:GT229367-GT229408)。在这46个微卫星序列中,有30个是二核苷酸重复,15个是三核苷酸重复和1个是四核苷酸重复。经过Blast比对,发现42个EST序列中,有19个具有同源基因。值得注意的是,其中有6个同源基因的重复序列都在阅读框中,分别编码以下蛋白:C1q-like adipose specific protein(ADIPOQ),Iguana/Dzip1(DZIP1),Nur77 downstream protein 2 variant 1(NR4A2),hypothetical protein LOC360478, pituitary tumor-transforming gene 1 protein-interacting protein precursor(PTTG1IP)和toxin-1(TSST1)。由于此6个同源基因的重复序列都是三核苷酸重复,因此不管重复多少次,都不会改变阅读框的编码顺

序。

在包含微卫星的42个ESTs序列中,21个具有足够长的侧翼序列可用来设计合适的引物,并进行了多态性检测。文库中的21个基因位点都得到了有效扩增,经过在同一种群中的30尾牙鲈基因组DNA中的测试,发现其中20个位点具有多态性。每个位点的等位基因数从2到6变化不等,观察杂合度从0.06到1,期望杂合度从0.06到0.83不等(表2)。多个测试结果用Bonferroni法进行校正^[33]。在20个多态性位点中发现有16个明显偏离HWE(PO-1,PO-2,PO-3,PO-4,PO-5,PO-6,PO-8,PO-9,PO-10,PO-12,PO-14,PO-15,PO-16,PO-18,PO-19和PO-21),可能是由于测试用的样本都是同一个种群中的近亲缘故,剩下4个位点符合HWE($P=0.05$)。

在本研究中,计算了每个微卫星位点的多态信息含量(Polymorphism Information Content)。20个微卫星位点的平均多态信息含量是0.4775。其中9个微卫星位点(PO-4,PO-5,PO-6,PO-8,PO-13,PO-14,PO-15,PO-17,PO-21)的多态信息含量值在0.51与0.79之间,表明在这个牙鲈种群中这9个微卫星位点具有高度多态性,其中11个微卫星位点(PO-1,PO-2,PO-3,PO-7,PO-9,PO-10,PO-11,PO-12,PO-16,PO-18,PO-19)的多态信息含量值在0.29与0.38之间,具有中度多态性。尽管样本来自同一个养殖厂的同一个种群,这些微卫星位点仍有相对较高的多态性,因此,它们可应用于遗传连锁图谱的构建和分子标记辅助选育,并且为克隆变态前牙鲈中的功能基因提供帮助。

在20个多态性位点中,有11个位点和其他物种具有同源性。在测试的牙鲈种群中,位点PO-3,PO-8和PO-9分别代表基因ADIPOQ,DZIP1和NR4A2,都具有多态性,且这些基因的编码区中都有三核苷酸重复序列。ADIPOQ专一地在脂肪组织中表达,其编码的脂联素在脂肪酸分解代谢中发挥作用^[34-35]。DZIP1编码是在Hedgehog信号通路中的一种新的重要物质,在动物发育中起着重要作用^[36],NR4A2编码核受体相关蛋白(NURR1),是类固醇-甲状腺激素-类维生素A家族中的一员^[37]。NURR1可能在由甲状腺激素调控的牙鲈变态发育中发挥作用。这3个重要基因的编码框中都包含有多态性的微卫星

序列说明多态性可能与该基因的功能有关,具体 机理有待进一步研究。

表 1 牙鲆 ESTs 序列中的微卫星分子标记特征

Tab. 1 Characterization of the EST-based microsatellite markers in *P. olivaceus*

基因座	接受号	基因	引物序列(5'-3')	核心重复 序列	等位基因数 (大小范围, bp)	T _a (°C)	H _o	H _e	P-value	多态信息 含量
PO-1	GT229367	ID2	F: ATGACAGATGACAGCCGGACTCTGC R: CGCGTCCGTGTGAGTGTATGAG	(AC) ₉	2 (110~123)	65	1	0.51	0	0.375
PO-2	GT229368	APOC1	F: TCACATCACCCCTCCTGACCA R: TCCAAACATAAAGACTCATCCAATCA	(TA) ₈	2 (201~217)	58	0.21	0.49	0.001	0.366 6
PO-3	GT229369	ADIPOQ	F: TACAGGTAATAATGTTGGTCACGTC R: TAGGAGTTTCTTGGATCCTCTTCAC	(CTG) ₆	2 (404~527)	58	1	0.51	0	0.375
PO-4	GT229370	unknown	F: GGAATGATAAGTGAATGCCCTTCT R: TTGATGATCAGTTGATTGACACAG	(GT) ₂₂	5 (160~201)	59	1	0.77	0	0.711 8
PO-5	GT229371	BOLA2	F: ACACCAGAACAGTGGAAAAACAGA R: GGACATTATAAACTGATGTGAGGGTGA	(AC) ₁₄	5 (90~147)	61	1	0.81	0	0.764
PO-6	GT229372	unknown	F: TGTCCGTCTGATCTGGTAAAACCTC R: CTCCAAGAAACAGGCCCGAAGAAG	(CA) ₁₁ , (TTC) ₇	3 (190~238)	63	1	0.63	0	0.550 7
PO-7	GT229373	MYO5A	F: TGAGAGACGCATCTTGTCCCTGAGC R: CACCGCTATGTCTTCTCTCTGCT	(CAG) ₇	2 (180~190)	65	0.52	0.39	0.054	0.309 3
PO-8	GT229374	DZIP1	F: AACCGTCAGCTGTTTGGAGTCGAT R: GGTGACGAAGACGGCAGTGACAAAAG	(TCC) ₆	3 (110~123)	66	0.94	0.65	0	0.566 7
PO-9	GT229375	NR4A2	F: CAGCGCTCTCACAGGAGCTTTCAGT R: TCAGGTCACTTTGATTGGTGGCACA	(GCA) ₉	2 (350~410)	66	1	0.51	0	0.375
PO-10	GT229376	PVALB	F: TCCAAAGGAACAACCTGAGCCAAAGACA R: CGTCCAGTACATTCATCCAGGACAGC	(CT) ₁₀	2 (160~180)	64	1	0.51	0	0.375
PO-11	GT229377	unknown	F: CAGCCTGCTCTGATTCAGTCCAACG R: GTAGCAACGGGAGGACCGCTGCAT	(CAT) ₈	2 (123~147)	65	0.49	0.38	0.077	0.299 8
PO-12	GT229378	unknown	F: CGGCAGATACATTCCTGAACCGGTTT R: CAGTTGGACGAAGAGGAGACGTCCTCA	(AC) ₁₉	2 (217~309)	64	1	0.51	0	0.375
PO-13	GT229379	unknown	F: TGAATCTCCTCGTGTGTTGCTGGTC R: CCAGTTGAATCATCAGAAAAGTCTG	(GTT) ₈	3 (201~217)	61	0.67	0.66	0.175	0.568 2
PO-14	GT229380	unknown	F: GATCCGGTGATAGTCTGCACACACG R: CTGGAGCTGCAGAGATGCTCTCAGAC	(CA) ₁₅ , (CA) ₉	3 (90~147)	64	0.94	0.67	0.005	0.589 3
PO-15	GT229381	unknown	F: TTATTTCGCCCTCGTGGCTCCTCAGT R: CTCCGTAGCCGACTTTGGGCTTCTT	(CCG) ₁₂	3 (90~110)	65	0.19	0.59	0	0.514 1
PO-16	GT229382	unknown	F: CAAGCATTCTTCCAGTCTGACTGGGAC R: CTTCCGCTCTCTGGGCTCTGCTC	(CTG) ₆	2 (160~180)	64	1	0.51	0	0.375
PO-17	GT229383	unknown	F: TTTGGAGCGCTGGCTCAGTG R: TGCTGAGACTGGAAGTGACACAGG	(TGC) ₁₆	6 (180~217)	63	1	0.83	0.061	0.786 3
PO-18	GT229384	CLIP2	F: CTCGGCTCTCTGCATCAGCATC R: CCATGTTGGCTGCGTGGTTTG	(CCT) ₉	2 (123~147)	64	0.33	0.39	0.404	0.309 3
PO-19	GT229385	EIF4EBP1	F: CGTGTGCTCAGTCCCTGCTTAAC R: GGGCTCCGAGTCTGTGTCTGATG	(TG) ₁₄	2 (180~201)	62	1	0.51	0	0.375
PO-20	GT229386	ATP2A3	F: TGCTGAAGCTCTCCCTCCAGTCATC R: GCGCTCAGCCTTATCTCTCCATCCT	(AG) ₁₃	1 (>622)	64	0	0	-	-
PO-21	GT229387	unknown	F: GGCTCTGCTCTGAAGTACTGTTG R: TCCCATGAGCATCACAGGCCATAAC	(CA) ₂₁ , (CA) ₁₀	3 (160~238)	62	0.82	0.67	0.001	0.589 5

表 2 牙鲆中包含微卫星的 ESTs 序列

Tab. 2 Microsatellite-containing ESTs in *P. olivaceus*

克隆号	序列接受号	基因名	核心重复序列	微卫星位置
SFU-PO-DEV0278	GT229367	DNA-binding protein inhibitor (<i>ID2</i>)	(AC) ₉	3'-UTR
SFU-PO-DEV0051	GT229368	apolipoprotein C-I (<i>APOC1</i>)	(TA) ₈	3'-UTR
SFU-PO-DEV0086	GT229369	C1q-like adipose specific protein (<i>ADIPOQ</i>)	(CTG) ₆	coding region
SFU-PO-DEV0733	GT229370	unknown	(GT) ₂₂	unknown
SFU-PO-DEV0002	GT229371	BolA-like protein 2 (<i>BOLA2</i>)	(AC) ₁₄	3'-UTR
SFU-PO-DEV0524	GT229372	unknown	(CA) ₁₁ , (TTC) ₇	unknown
SFU-PO-DEV0364	GT229373	Myo5a protein (<i>MYO5A</i>)	(CAG) ₇	5'-UTR
SFU-PO-DEV0800	GT229374	Iguana/Dzip1 (<i>DZIP1</i>)	(TCG) ₆	coding region
SFU-PO-DEV0802	GT229375	putative Nur77 downstream protein 2 variant 1 (<i>NR4A2</i>)	(GCA) ₉	coding region
SFU-PO-DEV0808	GT229376	Parvalbumin (<i>PVALB</i>)	(CT) ₁₀	3'-UTR
SFU-PO-DEV0379	GT229377	unknown	(CAT) ₈	unknown
SFU-PO-DEV0391	GT229378	unknown	(AC) ₁₉	unknown
SFU-PO-DEV0399	GT229379	unknown	(GTT) ₈	unknown
SFU-PO-DEV0515	GT229380	unknown	(CA) ₁₅ , (CA) ₉ , (GAG) ₆	unknown
SFU-PO-DEV0604	GT229381	unknown	(CCG) ₁₂	unknown
SFU-PO-DEV0283	GT229382	hypothetical protein LOC360478	(CTG) ₆	coding region
SFU-PO-DEV0631	GT229383	unknown	(TGC) ₁₆	unknown
SFU-PO-DEV0166	GT229384	PREDICTED: similar to CAP-GLY domain containing linker protein 2 (<i>CLIP2</i>)	(CCT) ₉	5'-UTR
SFU-PO-DEV0198	GT229385	Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (<i>EIF4EBP1</i>)	(TG) ₁₄	5'-UTR
SFU-PO-DEV0948	GT229386	sarcoendoplasmic reticulum calcium ATPase (<i>ATP2A3</i>)	(AG) ₁₃	3'-UTR
SFU-PO-DEV0643	GT229387	unknown	(CA) ₂₁ , (CA) ₁₀	unknown
SFU-PO-DEV0216	GT229388	PREDICTED: novel FERM domain containing protein (<i>FRMD7</i>)	(CA) ₈	5'-UTR
SFU-PO-DEV0405	GT229389	diablo-like protein	(AT) ₁₀	5'-UTR
SFU-PO-DEV0533	GT229390	Unknown	(AT) ₈	unknown
SFU-PO-DEV0684	GT229391	Unknown	(AT) ₁₀	unknown
SFU-PO-DEV0736	GT229392	Unknown	(AG) ₈	unknown
SFU-PO-DEV0016	GT229393	Unknown	(GT) ₈	unknown
SFU-PO-DEV0402	GT229394	Unknown	(TG) ₉	unknown
SFU-PO-DEV0566	GT229395	Unknown	(GT) ₈	unknown
SFU-PO-DEV0680	GT229396	Nucleolar protein 12 (<i>NOL12</i>)	(GT) ₈	5'-UTR
SFU-PO-DEV0694	GT229397	Unknown	(GT) ₈	unknown
SFU-PO-DEV0520	GT229398	Unknown	(AC) ₉	unknown
SFU-PO-DEV0641	GT229399	Unknown	(AC) ₉	unknown
SFU-PO-DEV0655	GT229400	Unknown	(AC) ₉	unknown
SFU-PO-DEV0535	GT229401	Unknown	(TC) ₂₄	unknown
SFU-PO-DEV0511	GT229402	Unknown	(CT) ₉	unknown
SFU-PO-DEV0705	GT229403	PREDICTED: similar to tribbles homolog 1 (<i>TRIB1</i>)	(CT) ₈	3'-UTR
SFU-PO-DEV0755	GT229404	PREDICTED: hypothetical protein	(TC) ₁₉	3'-UTR
SFU-PO-DEV0508	GT229405	Unknown	(ACA) ₇	unknown
SFU-PO-DEV0665	GT229406	Pituitary tumor-transforming gene 1 protein-interacting protein precursor (<i>PTTG1IP</i>)	(GCA) ₆	coding region
SFU-PO-DEV0677	GT229407	toxin-1 (<i>TSS1</i>)	(CTG) ₇	coding region
SFU-PO-DEV0627	GT229408	Unknown	(AGAT) ₂₂	unknown

总之,在 42 个 ESTs 序列中,鉴定出 46 个微卫星序列。19 个 ESTs 具有同源基因,其中 6 个同源基因的开放读码框中含三核苷酸重复的微

卫星序列。调查其中 21 个可设计引物的微卫星序列在一养殖群体的多态性,发现 20 个位点有相对较高的多态性,表明这些微卫星标记可有效

用作遗传连锁图谱的构建和分子标记辅助选育。多态性位点 PO-3, PO-8 和 PO-9 分别位于基因 *ADIPOQ*, *DZIP1* 和 *NR4A2* 的读码框内,表明多态性可能与该基因的功能有关。

参考文献:

- [1] 杨桂梅,鲍宝龙,任大明. 3-磷酸甘油醛脱氢酶,β-肌动蛋白和 18S rRNA 作为相对定量的内标在牙鲆发育阶段的稳定性比较[J]. 上海水产大学学报,2005,14(1):84-88.
- [2] 龚小玲,鲍宝龙,杨桂梅,等. 牙鲆变态早期 cDNA 文库的构建和 parvalbumin 基因的克隆[J]. 水产学报,2005,29(4):467-472.
- [3] 鲍宝龙,杨桂梅,施志仪,等. 抑制差减杂交法克隆牙鲆变态早期差异表达的基因[J]. 水产学报,2006,30(2):204-210.
- [4] 鲍宝龙,杨桂梅,任大明. 牙鲆变态过程中的细胞凋亡[J]. 动物学报,2006,52(2):355-361.
- [5] 谢彩霞,邢巨斌,鲍宝龙. 牙鲆 epigen 基因的克隆以及在变态过程中的表达[J]. 上海海洋大学学报,2010,19(5):577-582.
- [6] 杜长斌,孙孝文,楼允东,等. 微卫星在水产动物种质资源研究方面的应用[J]. 水产学杂志,2000,13(1):68-73.
- [7] 刘志毅,相建海. 微卫星 DNA 分子标记在海洋动物遗传分析中的应用[J]. 海洋科学,2001,25(6):11-13.
- [8] GONG X L, LI S F, CAI W Q, *et al.* Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers from Australia short-finned eel (*Anguilla australis* Richardson) [J]. Molecular Ecology Resources, 2008, 8(4):777-779.
- [9] LIU Y G, BAO B L, LIU L X, *et al.* Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from RAPD product in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) and a test of cross-species amplification [J]. Molecular Ecology Notes, 2008, 8(1):202-204.
- [10] 杜长斌,楼允东,沈俊宝,等. 微卫星分子标记技术在鱼类遗传连锁图谱构建中的应用[J]. 上海水产大学学报,2000,9(3):254-258.
- [11] 鲍宝龙,李家乐. 主要水产养殖动物 QTL 定位的研究现状[J]. 上海水产大学学报,2005,14(4):444-450.
- [12] 宓国强,赵金良,贾永义,等. 鳊(♀)×斑鳊(♂)杂种 F₁ 的形态特征与微卫星分析[J]. 上海海洋大学学报,2010,19(2):145-150.
- [13] SEKINO M, HARA M. Isolation and characterization of microsatellite DNA loci in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Molecular Ecology, 2000, 9(12):2200-2202.
- [14] COIMBRA M, HASEGAWA O, KOBAYASHI K, *et al.* Twenty microsatellite markers from the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Fisheries Science, 2001, 67(2):358-360.
- [15] KIM W, KIM K, LEE J, *et al.* Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Molecular Ecology Notes, 2003, 3(4):491-493.
- [16] 常玉梅,孙效文,李绍武,等. 牙鲆 CA/GT 微卫星标记的筛选[J]. 动物学研究,2005,26(6):652-656.
- [17] 陈微,张全启,于海洋,等. 牙鲆微卫星标记的筛选及群体多态性分析[J]. 中国水产科学,2005,12(6):682-687.
- [18] SEKINO M, HARA M. Application of microsatellite markers to population genetics studies of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Marine Biotechnology, 2001, 3:572-589.
- [19] SEKINO M, HARA M. Inheritance characteristics of microsatellite DNA loci in experimental families of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Marine Biotechnology, 2001(3):310-315.
- [20] SEKINO M, HARA M, TANIGUCHI N. Loss of microsatellite and mitochondrial DNA variation in hatchery strains of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Aquaculture, 2002, 213:101-122.
- [21] 王伟,尤锋,高天翔,等. 山东近海牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 自然和养殖群体 10 个微卫星基因座位的遗传多态性分析[J]. 海洋与湖泊,2004,35(6):530-537.
- [22] LIU Y, CHEN S, LI B. Assessing the genetic structure of three Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) stocks by microsatellite markers [J]. Aquaculture, 2005, 243:103-111.
- [23] 刘海金,朱晓琛,孙效文,等. 牙鲆 5 个养殖群体的遗传多样性分析[J]. 中国水产科学,2008,15(1):30-37.
- [24] 邵长伟,廖小林,田永胜,等. 牙鲆 3 个养殖群体遗传结构的微卫星分析[J]. 渔业科学进展,2009,30(1):41-46.
- [25] COIMBRA M, KOBAYASHI K, KORETSUGU S, *et al.* A genetic linkage map of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. Aquaculture, 2003, 220:203-218.
- [26] KANG J, KIM W, LEE W. Genetic linkage map of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. International Journal of Biological Sciences, 2008, 4(3):143-149.
- [27] KARSI A, CAO D, LI P, *et al.* Transcriptome analysis of channel catfish (*Ictalurus punctatus*): initial analysis of gene expression and microsatellite-containing cDNAs in the skin [J]. Gene, 2002, 285:157-168.
- [28] EUJAYL I, SORRELLS M, BAUM M, *et al.* Isolation of EST-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2002, 104:399-407.
- [29] SHIMIZU N, SASAKI T, ASAKAWA S, *et al.* Comparative genomics of medaka and fugu [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part D: Genomics and Proteomics, 2006, 1(1):6-12.
- [30] JI X, CHEN S, MA H, *et al.* Isolation and characterization of 19 EST-linked polymorphic microsatellite loci for olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Aquaculture Research, 2009, 40(8):980-983.
- [31] KALENDAR R, LEE D, SCHULMAN A. FastPCR software for PCR primer and probe design and repeat search [J]. Genes,

- Genomes and Genomics, 2009, 3.
- [32] YEH F, YANG R, BOYLE T. POPGENE (version 1.31): Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis [M]. University of Alberta and Centre for International Forestry Research, 1998.
- [33] RICE W. Analyzing tables of statistical tests [J]. *Evolution*, 1989, 43(1): 223 – 225.
- [34] UKKOLA O, SANTANIEMI M. Adiponectin: A link between excess adiposity and associated comorbidities [J]. *Journal of Molecular Medicine*, 2002, 80: 696 – 702.
- [35] DIEZ J, IGLESIAS P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease [J]. *European Journal of Endocrinology*, 2003, 148(3): 293 – 300.
- [36] SEKIMIZU K, NISHIOKA N, SASAKI H, *et al.* The zebrafish iguana locus encodes Dzip1, a novel zinc-finger protein required for proper regulation of Hedgehog signaling [J]. *Development*, 2004, 131: 2521 – 2532.
- [37] OKABE T, TAKAYANAGI R, IMASAKI K, *et al.* cDNA cloning of a NGFI-B/nur77-related transcription factor from an apoptotic human T cell line [J]. *The Journal of Immunology*, 1995, 154(8): 3871 – 3879.

Characterization of polymorphic type I microsatellite from cDNA library in premetamorphosing *Paralichthys olivaceus*

XING Ju-bin, XIE Cai-xia, ZHANG Yi-fei, BAO Bao-long

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

Abstract: Oliver flounder, *Paralichthys olivaceus*, is not only a model animal for fish metamorphosis, but also an important cultured species in China. In this study, 42 unique expressed series tags (ESTs) containing 46 microsatellites were found from the cDNA library of premetamorphosing flounder. Twenty-one microsatellite loci were tested in 30 individuals in the breeding population of *P. olivaceus* and 20 among them had polymorphism. The number of detected alleles varied from two to six, while the number of observed heterozygosity varied from 0.06 to 1.00, and the expected heterozygosity ranged from 0.059 7 to 0.825 2. The average of polymorphism information content (PIC) is 0.4575. The results indicate that these microsatellite loci will be useful for linkage map construction and marker-assisted-selection program of *P. olivaceus*. Three microsatellite loci with trinucleotide repeats buried in the coding region of genes were found to have polymorphism, which might be related to the gene function.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; type I microsatellite; Expressed Series Tags (ESTs); cDNA library