

皱纹盘鲍微卫星多重 PCR 体系构建及其 在家系鉴定中的应用

聂鸿涛^{1,2}, 李 琪^{2*}, 孔令锋²

(1. 大连海洋大学水产与生命学院, 辽宁省贝类良种繁育工程技术研究中心, 辽宁 大连 116023;

2. 中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要: 为提高微卫星分型效率, 从以往报道的皱纹盘鲍微卫星中筛选出易扩增、特异性好的微卫星位点进行组合扩增, 并通过优化退火温度、反应体系、引物浓度等条件, 开发了 4 组多重 PCR 扩增体系。运用 CERVUS 3.0 软件对 12 个皱纹盘鲍全同胞家系的 372 个子代进行家系鉴定, 验证了这 4 组多重 PCR 在家系鉴定中的效率。结果发现, 仅用 1 组微卫星多重 PCR 模拟和实际家系鉴定的成功率分别为 86% 和 90%, 两组则达到 100%。结果表明, 微卫星多重 PCR 技术能准确地把任意子代鉴定至其所属家系, 可以进行大批量家系材料分析, 具有较好的应用价值。

关键词: 皱纹盘鲍; 微卫星标记; 多重 PCR; 家系鉴定

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai* Ino) 隶属于软体动物门 (Mollusca), 腹足纲 (Gastropoda), 原始腹足目 (Archaeogastropods), 鲍科 (Haliotidae), 鲍属 (*Haliotis*), 主要分布在我国辽宁、山东沿海及日本北部沿海。皱纹盘鲍具有很高的经济价值, 是我国重要的海水养殖贝类之一。为改良皱纹盘鲍的遗传特性, 并根据市场需求开发新的养殖品系, 国内外学者已开展了很多皱纹盘鲍遗传育种的相关研究^[1-4]。近年来, 皱纹盘鲍的遗传改良技术取得了一定的成绩, 如多倍体诱导^[5], 雌核发育^[6], 选择育种^[7-8], 杂交育种^[9-11]以及种间杂交^[12-15]等。

微卫星标记具有高多态性, 数量多且广泛分布于基因组, 共显性遗传, 符合孟德尔定律, 易于 PCR 扩增以及结果重复性好等优点, 是遗传学与育种研究的理想分子标记。微卫星标记在水产动物遗传育种中得到了广泛应用, 如养殖群体的家系分析和遗传多样性评估、遗传图谱构建等^[16-19]。多重 PCR (multiplex PCR) 是指

在一次 PCR 反应中同时进行多个位点的扩增, 从而一次性分析多个位点。多重 PCR 技术在微卫星分析中不仅可以节省大量的时间和成本^[20-21], 而且在位点分型过程中能够降低由于对大量样品的重复处理带来的人为误差^[22]。因此, 微卫星多重 PCR 体系的开发为大规模家系分析、亲子鉴定、群体遗传和基因作图等研究提供了有力的工具。目前, 一些水产动物的多重 PCR 扩增体系已经得到开发与应用, 如美洲牡蛎 (*Crassostrea virginica*)^[23]、中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)^[24]、太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*)^[25] 的家系分析, 以及斑节对虾 (*Penaeus monodon*)^[26] 的遗传多样性评估等。然而, 目前还未见皱纹盘鲍微卫星多重 PCR 的报道。为了研究多重 PCR 在皱纹盘鲍家系鉴定中的有效性, 本实验开发了 4 组微卫星多重 PCR 扩增体系, 并应用于皱纹盘鲍的家系鉴定分析, 以期对皱纹盘鲍的分子遗传学研究提供有用工具。

收稿日期:2012-04-17 修回日期:2012-11-08

资助项目:国家自然科学基金项目(31072207); 国家海洋局公益性行业科研专项(200905020, 2012418023)

通信作者:李 琪, E-mail: qili66@ouc.edu.cn

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料与DNA提取

实验于2008年4—6月在山东省荣成永顺育苗实验基地进行。所用皱纹盘鲍亲贝为荣成永顺育苗场提供。挑选性腺成熟好的亲贝进行人工催产。采用阴干1.5 h,紫外线照射升温海水2~4℃的方法诱导亲贝分别产卵、排精,通过人工授精建立了12个皱纹盘鲍单对交配家系。受精后72 h,用筛绢过滤收集每个家系的面盘幼虫,用淡水浸泡清洗筛绢以防止污染,收集到的面盘幼虫分别转移到1.5 mL灭菌离心管中,用100%的酒精固定,并置换酒精2~3次。用2 mL注射器分别吸取雌雄亲鲍的血液1 mL,5 000 r/min离心5 min,倒去上清,加入600 μL裂解液保存,用于亲本DNA提取。亲本DNA提取方法参照Li等^[27]用酚/氯仿法提取,幼虫DNA提取方法参照Li等^[17]用Chelex树脂提取。

1.2 皱纹盘鲍微卫星标记筛选

根据微卫星序列重复单位,位点的多态性,以及扩增效果等从已开发的皱纹盘鲍微卫星中筛选24个位点^[27-30]。微卫星引物由上海生工生物工程有限公司合成。通过单个微卫星位点的PCR扩增,筛选各个微卫星位点的最佳PCR扩增条件。以扩增效率,条带是否清晰,是否有多态性为原则,挑选出最好的12个微卫星标记用于多重PCR的开发。每个微卫星位点的最适退火温度范围采用10个个体检测。PCR反应体系10 μL:包括0.2 mmol/L dNTP,1×PCR buffer,1 μmol/L的正反引物,0.25 U *Taq* DNA聚合酶(大连宝生物公司),1.5 mmol/L MgCl₂和30 ng模板DNA。微卫星多重PCR反应条件为94℃预变性3 min;94℃变性1 min,退火温度1 min,72℃延伸1 min,进行35个循环;最后72℃延伸5 min。PCR反应于GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems公司)上进行。为了提高幼虫的PCR扩增产物的量,PCR程序使用40个循环^[31],反应条件为94℃预变性3 min;94℃变性1 min,退火温度30 s,72℃延伸30 s,进行7个循环;然后再进行33个循环,94℃变性30 s,退火温度30 s,72℃延伸30 s,最后72℃延伸5 min。扩增产物的于6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,银染显色。等位基因大小用10 bp DNA Ladder

(Invitrogen, USA)为参照标准对电泳条带进行判读。

1.3 微卫星标记优化组合

根据每个微卫星位点的PCR扩增结果,确认每个位点的等位基因大小范围最佳PCR退火温度以及是否存在非特异性条带。对筛选出的具有清晰扩增产物,特异性好的位点进行两两位点的组合扩增,挑选引物序列间互不干扰、扩增片段长度不重叠、退火温度接近且在上下5℃范围内浮动的位点进行多重PCR组合的筛选。先通过两两位点组合找出可以特异清晰扩增的组合,然后再进行3个位点的多重PCR体系的开发。通过优化退火温度、反应体系、引物浓度等条件摸索出最佳扩增条件,使扩增效率达到基本一致。

1.4 数据统计分析

采用 χ^2 检验检测在子代中有分离的位点是否符合孟德尔遗传定律(1:1,1:2:1和1:1:1:1)(自由度 $n-1$, n 为表型分类数),显著性水平设为 $P>0.01$ 。混合12个全同胞单对交配家系372个子代的基因型数据,以检验多重PCR在家系鉴定中的效率。微卫星位点的等位基因数(N_a),多态信息含量(PIC),单个位点的平均非排除能力通过软件Cervus 3.0计算^[32]。CERVUS 3.0进行模拟鉴定与实际家系鉴定的具体参数设置为亲本数量是24,模拟子代数是10 000,100%的亲本检测率,1%的分型误差率,100%的位点检测率,95%的置信水平。

2 结果

2.1 微卫星多重PCR在家系鉴定中的应用

本研究从选取的24个微卫星标记中筛选出12个扩增较好的微卫星标记用于多重PCR的开发。通过对12个微卫星标记进行不同组合扩增,确定了最佳多重PCR组合,并对不同引物的浓度和退火温度进行了优化。退火温度使用梯度PCR进行优化,温度梯度范围52~62℃,根据扩增效果确定了最佳退火温度。引物浓度根据每个位点的扩增效果进行适当调整,当引物浓度分别为0.33 μmol/L时,扩增效果较好。每组多重PCR的退火温度和引物浓度见表1。

本实验开发了4组微卫星多重PCR扩增体系,每组含有3个微卫星位点,每个微卫星位点的

多态性和非排除能力见表 1。位点的等位基因数 (N_a) 范围从 8 (Afa098) 到 22 (Afa084), 平均值为 14。多态信息含量 (PIC) 为 0.603 ~ 0.915, 位点平均多态信息含量为 0.820, 反映了这 4 组多重 PCR 在家系鉴定中具有较高的排除能力。4 组多

重 PCR 的观测杂合度范围为 0.448 ~ 0.844, 平均观测杂合度为 0.700, 期望杂合度范围为 0.629 ~ 0.921, 平均期望杂合度为 0.837。无效等位基因频率为 1.9% ~ 31.2% (表 1)。

表 1 皱纹盘鲍 4 组微卫星多重 PCR 的特性

Tab. 1 Characteristics of the four multiplex PCR in the Pacific abalone *H. discus hannai*

多重 PCR 组 multiplex panel	位点 locus	录号 GenBank accession no.	退火 温度/ ℃ T_a	片段 大小/bp size	引物浓度/ ($\mu\text{mol/L}$) concentration in multiplex PCR	N_a	H_o	H_e	PIC	无效等 位基因 频率 null allele frequency	NE- 1P ^a	NE- 2P ^b	NE- PP ^c
multiplex set 1	Afa098	AB239637	60	224 ~ 242	0.33	8	0.470	0.629	0.603	0.166	0.757	0.570	0.359
	Awb042	AB177925		176 ~ 216	0.33	12	0.836	0.863	0.847	0.019	0.433	0.274	0.111
	Awb033	AB177918		144 ~ 186	0.33	13	0.803	0.831	0.812	0.020	0.494	0.325	0.146
multiplex set 2	Afa193	AB239712	57	192 ~ 284	0.33	20	0.844	0.916	0.909	0.040	0.286	0.167	0.043
	Awb076	AB177934		160 ~ 220	0.33	16	0.725	0.882	0.870	0.103	0.380	0.234	0.082
	Awb026	AB177915		130 ~ 172	0.33	9	0.673	0.752	0.714	0.050	0.637	0.460	0.269
multiplex set 3	Afa084	AB239633	59	220 ~ 290	0.33	22	0.836	0.921	0.915	0.048	0.276	0.160	0.042
	Afa029	AB239612		202 ~ 226	0.33	11	0.448	0.839	0.821	0.312	0.479	0.312	0.136
	Awb022	AB177914		190 ~ 208	0.33	9	0.517	0.757	0.724	0.187	0.626	0.446	0.252
multiplex set 4	Afa038	AB239615	59	204 ~ 300	0.33	15	0.757	0.896	0.886	0.087	0.348	0.210	0.069
	Afa186	AB239676		138 ~ 230	0.33	17	0.807	0.845	0.836	0.028	0.438	0.278	0.098
	Eab1140	AB272747		122 ~ 160	0.33	17	0.683	0.910	0.902	0.146	0.311	0.184	0.054

注: a. 单亲本的平均非排除率; b. 已知单亲本基因型的平均非排除率; c. 两亲本的平均非排除率。

Notes: a. Average non-exclusion probability for one candidate parent. b. Average non-exclusion probability for one candidate parent given the genotype of a known parent of the opposite sex. c. Average non-exclusion probability for a candidate parent pair.

在 12 个皱纹盘鲍单对交配家系中, 4 组微卫星多重 PCR 的鉴定结果如图 1 所示。利用 Cervus 3.0 软件进行家系模拟和实际鉴定结果显示, 只使用 1 组多态信息含量最高的 multiplex set 4, 其鉴定成功率分别为 86% 和 90%。当再增加任意一个多重 PCR 组合时, 则可以将子代 100% 鉴定到亲本。

2.2 微卫星多重 PCR 的遗传分离模式

12 个微卫星位点的平均多态信息含量为 0.82。得到的 144 个基因型分离比中 (12 位点 \times 12 家系), 有 10 个基因型为 AA \times AA 的亲本全部纯合类型 (表 2)。对 144 组微卫星分离模式的分析发现, 在考虑到无效等位基因存在的情况下, 仍有 8 个 (5.6%) 基因型分离比偏离孟德尔分离定律 ($P < 0.01$)。通过分析多重 PCR 位点在 12 个家系内的 Mendelian 分离模式, 发现在 576 个微卫星等位基因 (12 个位点 \times 24 个亲本 \times 2) 中无效等位基因频率为 10.6%。

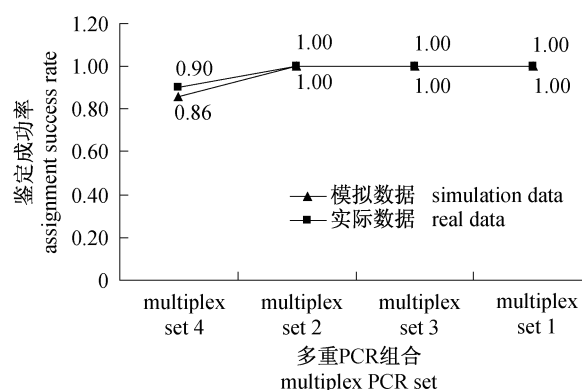


图 1 多重 PCR 在皱纹盘鲍家系中模拟和实际的累积鉴定成功率

根据 PIC 由高到低添加多重 PCR 组合 (置信水平为 95%)。

Fig. 1 Cumulative assignment success rates of simulated and real data in *H. discus hannai*

The multiplex PCRs were added from the most to the least mean PIC value (95% confidence interval).

表 2 多重 PCR 在 12 个皱纹盘鲍家系中的微卫星基因型分离比
 Tab. 2 Segregation analysis of microsatellite alleles in 12 families of Pacific abalone *H. discus hannai*

家系 family	多重 PCR multiplex	位点 locus	母本 female	父本 male	子代基因型 genotypes of progeny	期望比 expected ratio	观测比 observed ratio	χ^2	<i>P</i>
f1	multiplex set 1	Afa098	238/238	224/238	238/224;238/238	1:1	12:18	1.200	0.273
		Awb042	202/null	198/null	198/null;198/202;202/null;null/null	1:1:1:1	7:10:8:6	1.129	0.770
		Awb033	160/160	154/160	154/160;160/160	1:1	16:12	0.571	0.450
	multiplex set 2	Afa193	202/208	206/212	202/206;202/212;206/208;208/212	1:1:1:1	8:13:3:3	10.185	0.017
		Awb076	162/170	162/170	162/162;162/170;162/170;170/170	1:1:1:1	9:6:2:3	6.000	0.112
		Awb026	130/134	130/134	130/130;130/134;134/134	1:2:1	3:10:3	1.000	0.607
	multiplex set 3	Afa084	240/248	238/250	238/240;240/250;238/248;248/250	1:1:1:1	4:9:8:5	2.615	0.455
		Afa029	208/208	208/208	208/208	1	28	-	-
		Awb022	200/200	198/200	198/200;200/200	1:1	11:17	1.286	0.257
	multiplex set 4	Afa038	204/220	220/224	204/220;204/224;220/220;220/224	1:1:1:1	6:7:3:12	6.000	0.112
		Afa186	170/null	172/null	170/172;170/null;172/null;null/null	1:1:1:1	1:9:6:12	9.429	0.024
		Eab1140	148/152	148/148	148/148;148/152	1:1	14:13	0.037	0.847
f2	multiplex set 1	Afa098	240/240	240/242	240/240;240/242	1:1	13:10	0.391	0.532
		Awb042	202/null	200/null	200/202;202/null;200/null;null/null	1:1:1:1	8:6:6:11	2.161	0.540
		Awb033	154/164	158/null	154/158;154/null;158/164;164/null	1:1:1:1	7:2:14:2	15.480	0.001*
	multiplex set 2	Afa193	220/220	220/222	220/220;220/222	1:1	12:6	2.000	0.157
		Awb076	194/198	196/198	194/196;194/198;196/198;198/198	1:1:1:1	6:3:4:4	1.118	0.773
		Awb026	160/160	168/172	160/168;160/172	1:1	13:4	4.765	0.029
	multiplex set 3	Afa084	258/290	248/260	248/258;258/260;248/290;260/290	1:1:1:1	6:4:5:4	0.579	0.901
		Afa029	210/210	210/210	210/210	1	22	-	-
		Awb022	198/200	200/200	198/200;200/200	1:1	11:5	2.250	0.134
	multiplex set 4	Afa038	220/220	210/224	210/220;220/224	1:1	11:8	0.474	0.491
		Afa186	176/null	192/null	176/192;176/null;192/null;null/null	1:1:1:1	2:8:6:10	5.385	0.146
		Eab1140	150/160	138/150	138/150;150/150;138/160;150/160	1:1:1:1	8:3:3:5	3.526	0.317
f3	multiplex set 1	Afa098	224/240	238/240	224/238;224/240;238/240;240/240	1:1:1:1	8:4:9:5	2.615	0.455
		Awb042	202/206	186/null	186/202;186/206;202/null;206/null	1:1:1:1	11:7:2:7	6.037	0.110
		Awb033	154/160	154/null	(154/154+154/null);154/160;160/null	2:1:1	3:18:7	25.929	0.000*
	multiplex set 2	Afa193	226/null	202/212	202/226;212/226;202/null;212/null	1:1:1:1	7:3:6:8	2.333	0.506
		Awb076	178/196	196/196	178/196;196/196	1:1	12:12	0.000	1.000
		Awb026	160/170	170/null	160/170;160/null;170/170;170/null	1:1:1:1	10:8:2:3	7.783	0.051
	multiplex set 3	Afa084	240/250	250/256	240/250;240/256;250/250;250/256	1:1:1:1	5:3:9:5	3.455	0.327
		Afa029	210/210	210/210	210/210	1	24	-	-
		Awb022	200/200	198/200	198/200;200/200	1:1	9:14	1.087	0.297
	multiplex set 4	Afa038	216/224	210/224	210/216;216/224;210/224;224/224	1:1:1:1	3:5:7:12	6.630	0.085
		Afa186	170/null	160/null	160/170;170/null;160/null;null/null	1:1:1:1	5:8:10:8	1.645	0.649
		Eab1140	136/138	134/136	134/136;136/136;134/138;136/138	1:1:1:1	6:2:5:10	5.696	0.127
f4	multiplex set 1	Afa098	null/null	238/238	238/null	1	30	-	-
		Awb042	202/null	186/202	186/202;(202/202+202/null);186/null	1:2:1	11:5:10	9.923	0.007*
		Awb033	156/160	160/160	156/160;160/160	1:1	24:6	10.800	0.001*
	multiplex set 2	Afa193	null/null	274/null	274/null;null/null	1:1	20:11	2.613	0.106
		Awb076	196/204	196/196	196/196;196/204	1:1	11:17	1.286	0.257
		Awb026	158/168	168/168	158/168;168/168	1:1	20:9	4.172	0.041
	multiplex set 3	Afa084	250/270	262/null	250/262;250/null;262/270;270/null	1:1:1:1	8:12:6:3	5.897	0.117
		Afa029	224/null	210/210	210/224;210/null	1:1	17:14	0.290	0.590
		Awb022	198/200	198/200	198/198;198/200;200/200	1:2:1	6:14:6	0.154	0.926
	multiplex set 4	Afa038	208/208	206/212	206/208;208/212	1:1	10:10	0.000	1.000
		Afa186	178/null	170/null	170/178;178/null;170/null;null/null	1:1:1:1	9:6:4:12	4.742	0.192
		Eab1140	140/null	154/null	140/154;140/null;154/null;null/null	1:1:1:1	6:5:8:12	3.710	0.295

续表 2

家系 family	多重 PCR multiplex	位点 locus	母本 female	父本 male	子代基因型 genotypes of progeny	期望比 expected ratio	观测比 observed ratio	χ^2	P
f5	multiplex set 1	Afa098	238/238	238/238	238/238	1	31	-	-
		Awb042	186/186	186/200	186/186;186/200	1:1	15:16	0.032	0.857
		Awb033	160/160	158/160	158/160;160/160	1:1	16:15	0.032	0.857
	multiplex set 2	Afa193	284/null	258/null	258/284;284/null;258/null;null/null	1:1:1:1	12:6:8:5	3.710	0.295
		Awb076	198/220	198/204	198/198;198/204;198/220;204/220	1:1:1:1	9:3:8:7	3.074	0.380
		Awb026	168/168	168/168	168/168	1	31	-	-
	multiplex set 3	Afa084	236/240	236/240	236/236;236/240;240/240	1:2:1	9:8:14	8.871	0.012
		Afa029	220/224	220/224	220/220;220/224;224/224	1:2:1	8:12:6	0.462	0.794
		Awb022	198/198	198/200	198/198;198/200	1:1	15:16	0.032	0.857
	multiplex set 4	Afa038	206/230	218/226	206/218;206/226;218/230;226/230	1:1:1:1	5:10:7:9	1.903	0.593
		Afa186	166/172	null/null	166/null;172/null	1:1	17:14	0.290	0.590
		Eab1140	146/154	146/154	146/146;146/154;154/154	1:2:1	7:10:14	7.065	0.029
f6	multiplex set 1	Afa098	238/238	238/238	238/238	1	29	-	-
		Awb042	178/186	186/186	178/186;186/186	1:1	17:12	0.862	0.353
		Awb033	158/160	160/164	158/160;158/164;160/160;160/164	1:1:1:1	9:5:7:8	1.207	0.751
	multiplex set 2	Afa193	202/null	192/null	192/202;202/null;192/null;null/null	1:1:1:1	8:13:8:2	7.839	0.049
		Awb076	170/180	180/180	170/180;180/180	1:1	22:7	7.759	0.005*
		Awb026	152/null	160/null	152/160;152/null;160/null;null/null	1:1:1:1	13:6:5:7	5.000	0.172
	multiplex set 3	Afa084	234/null	270/null	234/270;234/null;270/null;null/null	1:1:1:1	3:18:8:2	20.742	0.000*
		Afa029	208/null	222/null	208/222;208/null;222/null;null/null	1:1:1:1	12:6:4:9	4.742	0.192
		Awb022	200/202	200/202	200/200;200/202;202/202	1:2:1	11:11:7	2.793	0.247
	multiplex set 4	Afa038	206/212	212/220	206/212;206/220;212/212;212/220	1:1:1:1	8:10:5:6	2.034	0.565
		Afa186	180/184	176/180	176/180;180/180;176/184;180/184	1:1:1:1	2:6:11:10	7.000	0.072
		Eab1140	148/154	148/148	148/148;148/154	1:1	11:18	1.690	0.194
f7	multiplex set 1	Afa098	230/232	230/230	230/230;230/232	1:1	14:14	0.000	1.000
		Awb042	198/null	196/null	196/198;198/null;196/null;null/null	1:1:1:1	4:10:8:6	2.857	0.414
		Awb033	150/154	154/158	150/154;150/158;154/154;154/158	1:1:1:1	8:7:2:11	6.000	0.112
	multiplex set 2	Afa193	234/null	234/270	(234/234 + 234/null);234/270;270/null	2:1:1	11:13:5	6.103	0.047
		Awb076	194/194	194/212	194/194;194/212	1:1	16:15	0.032	0.857
		Awb026	160/168	160/168	160/160;160/168;168/168	1:2:1	5:21:5	3.903	0.142
	multiplex set 3	Afa084	236/null	240/246	236/240;236/246;240/null;246/null	1:1:1:1	9:5:8:9	1.387	0.709
		Afa029	220/224	216/220	216/220;220/220;216/224;220/224	1:1:1:1	8:5:2:11	6.923	0.074
		Awb022	200/206	200/206	200/200;200/206;206/206	1:2:1	10:15:6	1.065	0.587
	multiplex set 4	Afa038	212/220	216/220	212/216;212/220;216/220;220/220	1:1:1:1	9:4:7:8	2.000	0.572
		Afa186	142/null	162/168	162/142;142/168;162/null;168/null	1:1:1:1	5:9:5:7	1.692	0.639
		Eab1140	128/132	132/134	128/132;128/134;132/132;132/134	1:1:1:1	13:0:7:7	12.556	0.006*
f8	multiplex set 1	Afa098	238/238	224/238	224/238;238/238	1:1	12:18	1.200	0.273
		Awb042	206/206	208/208	206/208	1	30	-	-
		Awb033	154/158	166/176	154/166;154/176;158/166;158/176	1:1:1:1	8:4:10:8	2.533	0.469
	multiplex set 2	Afa193	206/226	208/null	206/208;206/null;208/226;226/null	1:1:1:1	5:11:5:10	3.968	0.265
		Awb076	194/194	188/194	188/194;194/194	1:1	20:10	3.333	0.068
		Awb026	172/172	160/172	160/172;172/172	1:1	20:10	3.333	0.068
	multiplex set 3	Afa084	246/246	246/280	246/246;246/280	1:1	16:15	0.032	0.857
		Afa029	212/212	212/212	212/212	1	31	-	-
		Awb022	202/204	204/204	202/204;204/204	1:1	14:17	0.290	0.590
	multiplex set 4	Afa038	222/224	206/230	206/222;222/230;206/224;224/230	1:1:1:1	4:7:11:9	3.452	0.327
		Afa186	178/188	160/168	160/178;168/178;160/188;168/188	1:1:1:1	7:4:8:12	4.226	0.238
		Eab1140	124/124	122/122	122/124	1	29	-	-

续表 2

家系 family	多重 PCR multiplex	位点 locus	母本 female	父本 male	子代基因型 genotypes of progeny	期望比 expected ratio	观测比 observed ratio	χ^2	<i>P</i>
f9	multiplex set 1	Afa098	238/238	238/240	238/238;238/240	1:1	15:16	0.032	0.857
		Awb042	200/202	186/186	186/200;186/202	1:1	18:13	0.806	0.369
		Awb033	154/158	160/160	154/160;158/160	1:1	17:11	1.286	0.257
	multiplex set 2	Afa193	226/226	230/230	226/230	1	21	-	-
		Awb076	188/196	190/196	188/190;188/196;190/196;196/196	1:1:1:1	9:8:11:0	10.000	0.019
		Awb026	160/168	160/160	160/160;160/168	1:1	17:11	1.286	0.257
	multiplex set 3	Afa084	260/264	274/null	260/274;260/null;264/274;264/null	1:1:1:1	7:8:8:7	0.133	0.988
		Afa029	208/208	208/222	208/208;208/222	1:1	12:18	1.200	0.273
		Awb022	198/200	200/200	198/200;200/200	1:1	17:13	0.533	0.465
	multiplex set 4	Afa038	222/226	218/218	218/222;218/226	1:1	16:14	0.133	0.715
		Afa186	168/null	166/null	166/168;168/null;166/null>null/null	1:1:1:1	9:9:5:8	1.387	0.709
		Eab1140	158/null	null/null	158/null>null/null	1:1	11:20	2.613	0.106
f10	multiplex set 1	Afa098	238/238	224/238	224/238;238/238	1:1	17:14	0.290	0.590
		Awb042	202/206	208/208	202/208;206/208	1:1	17:14	0.290	0.590
		Awb033	184/null	170/null	170/184;184/null;170/null>null/null	1:1:1:1	10:7:7:7	0.871	0.832
	multiplex set 2	Afa193	206/218	192/202	192/206;202/206;192/218;202/218	1:1:1:1	10:6:7:8	1.129	0.770
		Awb076	null/null	180/180	180/null	1	31	-	-
		Awb026	160/160	160/168	160/160;160/168	1:1	11:20	2.613	0.106
	multiplex set 3	Afa084	250/null	260/270	250/260;250/270;260/null;270/null	1:1:1:1	9:6:4:9	2.571	0.463
		Afa029	218/null	208/224	208/218;218/224;208/null;224/null	1:1:1:1	6:8:9:8	0.613	0.893
		Awb022	192/202	202/202	192/202;202/202	1:1	17:14	0.290	0.590
	multiplex set 4	Afa038	290/300	290/300	290/290;290/300;300/300	1:2:1	4:9:9	3.000	0.223
		Afa186	184/228	196/228	184/196;184/228;196/228;228/228	1:1:1:1	17:1:1:12	25.129	0.000*
		Eab1140	138/148	134/154	134/138;138/154;134/148;148/154	1:1:1:1	9:4:8:8	2.034	0.565
f11	multiplex set 1	Afa098	238/238	238/238	238/238	1	22	-	-
		Awb042	178/200	194/194	178/194;194/200	1:1	6:9	0.600	0.439
		Awb033	144/158	158/158	144/158;158/158	1:1	8:9	0.059	0.808
	multiplex set 2	Afa193	208/238	208/222	208/208;208/222;208/238;222/238	1:1:1:1	5:4:4:4	0.176	0.981
		Awb076	194/198	180/194	180/194;194/194;180/198;194/198	1:1:1:1	2:6:3:4	2.333	0.506
		Awb026	168/168	160/172	160/168;168/172	1:1	10:5	1.667	0.197
	multiplex set 3	Afa084	236/266	254/266	236/254;236/266;254/266;266/266	1:1:1:1	2:7:4:6	3.105	0.376
		Afa029	208/210	208/210	208/208;208/210;210/210	1:2:1	7:11:2	2.700	0.259
		Awb022	null/null	190/190	190/null	1	20	-	-
	multiplex set 4	Afa038	212/212	212/212	212/212	1	22	-	-
		Afa186	142/166	166/172	142/166;142/172;166/166;166/172	1:1:1:1	4:5:6:1	3.500	0.321
		Eab1140	140/140	132/132	132/140	1	24	-	-
f12	multiplex set 1	Afa098	236/236	230/240	230/236;236/240	1:1	17:14	0.290	0.590
		Awb042	216/216	200/null	200/216;216/null	1:1	17:14	0.290	0.590
		Awb033	170/null	168/null	168/170;170/null;168/null>null/null	1:1:1:1	6:11:8:6	2.161	0.540
	multiplex set 2	Afa193	230/274	230/230	230/230;230/274	1:1	7:17	4.167	0.041
		Awb076	194/200	194/204	194/194;194/204;194/200;200/204	1:1:1:1	7:13:3:8	6.548	0.088
		Awb026	172/172	160/168	160/172;168/172	1:1	15:15	0.000	1.000
	multiplex set 3	Afa084	226/240	226/230	226/226;226/230;226/240;230/240	1:1:1:1	7:6:7:6	0.154	0.985
		Afa029	208/208	208/208	208/208	1	30	-	-
		Awb022	196/198	198/198	196/198;198/198	1:1	14:16	0.133	0.715
	multiplex set 4	Afa038	220/226	220/null	(220/220 + 220/null);220/226;226/null	2:1:1	18:7:5	1.467	0.480
		Afa186	180/188	184/null	180/184;180/null;184/188;188/null	1:1:1:1	3:9:7:11	4.667	0.198
		Eab1140	138/146	138/146	138/138;138/146;146/146	1:2:1	9:12:5	1.385	0.500

注: * 偏分离的基因型分离比 ($P < 0.01$)。Notes: Bolded *P*-values indicate genotypic ratios that do not conform to Mendelian segregation ($P < 0.01$).

3 讨论

微卫星中的无效等位基因是指不能被 PCR 扩增的等位基因,可能由引物结合部位的点突变、插入或缺失引起。软体动物中微卫星标记扩增时出现扩增失败的无效等位基因,是海洋贝类中普遍存在的现象。例如,McGoldrick 等^[33]报道了在太平洋牡蛎中,发现 37.2% 的微卫星位点基因型出现偏分离。Marshall 等^[34]提出无效等位基因的出现可能会对家系鉴定结果有一定影响。因此,在实际家系鉴定中应尽量避免使用无效等位基因频率过高的微卫星位点。在本实验中,通过分析位点在家系内的孟德尔分离模式,得到的 576 个等位基因中,有 61 个(10.6%)无效等位基因,无效等位基因的比例与之前 Li 等^[35]在皱纹盘鲍的 56 个亲本等位基因中,发现有 6 个(10.7%)含有无效等位基因的结果基本一致。

在许多海洋贝类中,经常会出现偏分离的微卫星等位基因,这似乎是海洋贝类中一个普遍存在的现象。偏分离可能是由以下几个因素引起,包括隐性致死基因、取样或基因型判读错误等^[36]。在皱纹盘鲍中,Li 等^[35]报道了生长两年的成鲍微卫星偏分离比例为 10.7%,而 Nie 等^[37]在用皱纹盘鲍幼虫进行着丝粒作图的研究中没有发现偏分离的位点。本实验中,在考虑到无效等位基因存在的情况下,仅发现 8 个(5.6%)基因型分离比偏离孟德尔分离定律。可见,为了减少或排除偏分离位点的影响,利用海洋贝类的幼虫进行家系分析是一种有效可行的方法。

家系鉴定中所需要的位点数量,取决于标记的总体信息量(平均多态信息含量)、排除能力的高低以及亲本和子代的数量^[38]。同时,Norris 等^[38]还指出鉴定成功率不仅与微卫星的多态性和标记数量有关,而且也与所选择群体可能的配对亲本数有关。在实际应用过程中,出现的基因型错误,无效等位基因,偏分离以及随机等位基因与实际突变的关联等都会严重影响家系鉴定的效率^[39]。在本实验中,仅用 2 组微卫星多重 PCR 组合(multiplex set 4 和其余任意一组),就可达到 100% 的实际鉴定结果。可能与这 4 组微卫星多重 PCR 组合在 12 个家系中具有较高的多态信息含量,而且与亲本数量有限(12 个父本和 12 个母本)有关。因此,在大批量的家系材料分析中,可

能需要更多的多重 PCR 组合才能使鉴定率达到 100%。

综上所述,皱纹盘鲍微卫星多重 PCR 技术的开发以及在家系鉴定中的应用表明,这 4 组多重 PCR 可以作为有用的遗传工具用于家系重建、亲子鉴定、群体遗传分析以及种群资源管理等研究。

参考文献:

- [1] 中国农业部渔业局. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京:中国农业出版社,2011.
- [2] Kijima A, Li Q, Park C. Development of genetics and breeding in abalone culture [J]. Fisheries Science, 2002, 68 (Suppl.): 730 - 733.
- [3] 张国范. 海洋贝类遗传育种研究 20 年[J]. 厦门大学学报:自然科学版, 2006, 45 (2): 190 - 194.
- [4] 张国范, 刘晓. 关于贝类遗传改良几个问题的讨论 [J]. 水产学报, 2006, 30 (1): 130 - 137.
- [5] Zhang G F, Wang Z C, Chang Y Q, et al. Triploid induction in Pacific abalone *Haliotis discus hannai* Ino by 6-dimethylaminopurine and the performance of triploid juveniles [J]. Journal of Shellfish Research, 1998, 17 (3): 783 - 788.
- [6] Li Q, Osada M, Kashihara M, et al. Cytological studies on artificially induced gynogenesis in the Pacific abalone [J]. Fisheries Science, 2000, 66 (4): 701 - 707.
- [7] Zhang G F, Que H Y, Liu X, et al. Abalone mariculture in China [J]. Journal of Shellfish Research, 2004, 23 (4): 947 - 950.
- [8] Liu X, Deng Y W, Zhang G F. Growth of eight Pacific abalone families at three temperatures [J]. Acta Oceanologica Sinica, 2005, 24 (3): 148 - 153.
- [9] Zhang G F, Wang J H, Zhao H G, et al. The RAPD marker of self-bred and hybrid progeny between Chinese and Japanese populations of *Haliotis discus hannai* Ino [J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2002, 33 (5): 484 - 491.
- [10] Deng Y W, Liu X, Zhang G F. Fertilization, hatching, metamorphosis and growth of two Pacific abalone populations and their reciprocal crosses [J]. Aquaculture, 2007, 272 (S1): 319 - 320.
- [11] Deng Y W, Liu X, Wu F C, et al. Experimental evaluation of heterosis and heterobeltiosis between two populations of Pacific abalone *Haliotis discus hannai* Ino [J]. Acta Oceanologica Sinica, 2008, 27 (4): 112 - 119.
- [12] Hoshikawa H, Sakai Y, Kijima A. Growth

- characteristics of the hybrid between Pinto abalone, *Haliotis kamtschatkana* Jonas, and Ezo abalone, *H. discus hannai* Ino, under high and low temperature [J]. *Journal of Shellfish Research*, 1998, 17(3): 673 – 677.
- [13] Sun Z X, Chang L R, Song Z L. Effects of hybridization between *Haliotis discus hannai* and *Haliotis discus* [J]. *Fisheries Science*, 2005, 24(8): 1 – 3.
- [14] 郑升阳. 日本西氏鲍与皱纹盘鲍杂交试验初报 [J]. *福建农业学报*, 2006, 21(3): 296 – 298.
- [15] Luo X, Ke C H, You W W, *et al.* Molecular identification of interspecific hybrids between *Haliotis discus hannai* Ino and *Haliotis gigantea* Gmelin using amplified fragment-length polymorphism and microsatellite markers [J]. *Aquaculture Research*, 2010, 41(12): 1827 – 1834.
- [16] Wang Y H, Fu D K, Xia J J. The genetic diversity of the noble scallop (*Chlamys nobilis*, Reeve 1852) in China assessed using five microsatellite markers [J]. *Marine Genomics*, 2012, doi: 10. 1016/j. margin. 2012. 06. 003.
- [17] Li Q, Park C, Kijima A. Allelic transmission of microsatellites and application to kinship analysis in newly hatched Pacific abalone larvae [J]. *Fisheries Science*, 2003, 69(5): 883 – 889.
- [18] Li R H, Qi L, Yu R H. Parentage determination and effective population size estimation in mass spawning Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, based on microsatellite analysis [J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2009, 40(5): 667 – 677.
- [19] Zhan A, Hu J, Hu X, *et al.* Construction of microsatellite-based linkage maps and identification of size-related quantitative trait loci for Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) [J]. *Animal Genetics*, 2009, 40(6): 821 – 831.
- [20] Neff B D, Fu P, Gross M R. Microsatellite multiplex in fish [J]. *Transactions of the American Fisheries Society*, 2000, 129(2): 584 – 593.
- [21] Ezaz M T, Sayeed S, McAndrew B J, *et al.* Use of microsatellite loci and AFLP markers to verify gynogenesis and clonal lines in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* [J]. *Aquaculture Research*, 2004, 35(15): 1472 – 1481.
- [22] Porta J, Porta J M, Martinez-Rotriguez G, *et al.* Development of a microsatellite multiplex PCR for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and its application to broodstock management [J]. *Aquaculture*, 2006, 256(1 – 4): 159 – 166.
- [23] Wang Y, Wang X X, Wang A, *et al.* A 16-microsatellite multiplex assay for parentage assignment in the eastern oyster (*Crassostrea virginica* Gmelin) [J]. *Aquaculture*, 2010, 308 (Suppl. 1): 28 – 33.
- [24] 孔杰, 高焕, 于飞, 等. 微卫星三重 PCR 基因扫描技术在中国明对虾家系标识中的应用 [J]. *中国水产科学*, 2007, 14(1): 59 – 66.
- [25] Li R H, Li Q, Cornette F, *et al.* Development of four EST-SSR multiplex PCRs in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and their validation in parentage assignment [J]. *Aquaculture*, 2010, 310(1 – 2): 234 – 239.
- [26] Li Y T, Wongprasert K, Shekhar M, *et al.* Development of two microsatellite multiplex systems for black tiger shrimp *Penaeus monodon* and its application in genetic diversity study for two populations [J]. *Aquaculture*, 2007, 266(1 – 4): 279 – 288.
- [27] Li Q, Park C, Kijima A. Isolation and characterization of microsatellite loci in the Pacific abalone, *Haliotis discus hannai* [J]. *Journal of Shellfish Research*, 2002, 21(2): 811 – 815.
- [28] Sekino M, Kobayashi T, Hara M. Segregation and linkage analysis of 75 novel microsatellite markers in pair crosses of Japanese abalone (*Haliotis discus hannai*) using the 5'-tailed primer method [J]. *Marine Biotechnology*, 2006, 8(5): 453 – 466.
- [29] Sekino M, Saido T, Fujita T, *et al.* Microsatellite DNA markers of Ezo abalone (*Haliotis discus hannai*): a preliminary assessment of natural populations sampled from heavily stocked areas [J]. *Aquaculture*, 2005, 243(1 – 4): 33 – 47.
- [30] Sekino M, Hara M. Linkage maps for the Pacific abalone (genus *Haliotis*) based on microsatellite DNA markers [J]. *Genetics*, 2007, 175(2): 945 – 958.
- [31] Li Q, Nie H T, Kong L F. Microsatellite-centromere mapping in zhikong scallop (*Chlamys farreri*) through half-tetrad analysis in D-shaped larvae of gynogenetic diploid families [J]. *Aquaculture*, 2009, 293(1 – 2): 29 – 34.
- [32] Kalinowski S T, Taper M L, Marshall T C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment [J]. *Molecular Ecology*, 2007, 16(5): 1099 – 1106.
- [33] McGoldrick D, Hedgecock D, English L J, *et al.* The

- transmission of microsatellite alleles in Australian and North American stocks of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): selection and null alleles [J]. *Journal of Shellfish Research*, 2000, 19 (2): 779 – 788.
- [34] Marshall T C, Slate J, Kruuk L E B, *et al.* Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations [J]. *Molecular Ecology*, 1998, 7 (5): 639 – 655.
- [35] Li Q, Park C, Kobayashi T, *et al.* Inheritance of microsatellite DNA markers in the Pacific abalone *Haliotis discus hannai* [J]. *Marine Biotechnology*, 2003, 5(4): 331 – 338.
- [36] Launey S, Hedgecock D. High genetic load in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. *Genetics*, 2001, 159(1): 255 – 265.
- [37] Nie H, Li Q, Kong L. Centromere mapping in the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*) through half-tetrad analysis in gynogenetic diploid families [J]. *Animal Genetics*, 2012, 43(3): 290 – 297.
- [38] Norris A T, Bradley D G, Cunningham E P. Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers [J]. *Aquaculture*, 2000, 182 (1 – 2): 73 – 83.
- [39] Vandeputte M, Rossignol M N, Pincent C. From theory to practice: Empirical evaluation of the assignment power of marker sets for pedigree analysis in fish breeding [J]. *Aquaculture*, 2011, 314 (1 – 4): 80 – 86.

Development of four multiplex PCR panels of microsatellites and application to kinship analysis in the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*)

NIE Hongtao^{1,2}, LI Qi^{2*}, KONG Lingfeng²

(1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Engineering and Technology Research Center of Shellfish Breeding of Liaoning Province, Dalian 116023, China;

2. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: The Pacific abalone *Haliotis discus hannai* is a commercially important marine mollusk. To develop a rapid, economically efficient and robust approach for genetic studies in this species, twelve microsatellites were used to optimize four multiplex PCRs for the *H. discus hannai*, and the results obtained indicate the usefulness of the four multiplexed microsatellite systems in parentage assignment. We evaluated and validated these multiplex PCRs in 12 full-sib families. The average polymorphism information content (PIC) was 0.82. Inheritance analyses in the 144 tests showed that 4.9% microsatellite loci deviated from Mendelian ratios. The frequency of null alleles was estimated at 10.6% of all the alleles segregating based on a within-family analysis of Mendelian segregation patterns. Simulations and parentage analysis showed that with the most informative multiplex set 4, the assignment success could be 86% and 90% respectively, and 100% of the offspring were correctly allocated to their parents when two or more multiplex PCRs were used. Our results show that four multiplex PCR panels of microsatellites are possible and can be used for rapid and highly efficient parentage assignment in the Pacific abalone.

Key words: *Haliotis discus hannai*; microsatellites; multiplex PCR; parentage assignment

Corresponding author: LI Qi. E-mail: qili66@ouc.edu.cn