

微卫星标记在长牡蛎三倍体鉴定中的应用

姜 群, 李 琪*, 于 红, 孔令锋

(中国海洋大学水产学院,海水养殖教育部重点实验室,山东 青岛 266003)

摘要:为开发一种简单有效的倍性检测方法对长牡蛎三倍体诱导结果进行准确评估,本实验采用细胞松弛素 B 抑制第二极体释放诱导产生长牡蛎三倍体,选用 7 个微卫星位点扩增基因组 DNA,通过亲子代基因分型进行倍性检测,检测结果采用流式细胞仪加以验证,以评估微卫星标记倍性检测的准确性。另外,本研究探讨了准确鉴定倍性所需的微卫星标记数量与微卫星—着丝粒重组率(y)之间的关系,以期为其他物种采用分子标记进行倍性检测提供理论依据。结果显示,细胞松弛素 B 诱导产生的 115 个长牡蛎子代经 7 个微卫星位点鉴定得到 40 个三倍体,与流式细胞仪检测结果一致,准确率达到 100%,7 个微卫星位点的 $(1-y)$ 的乘积为 0.005。随机挑选 6 个位点,也可鉴定出所有三倍体, $(1-y)$ 的乘积为 0.005~0.042。研究表明,本研究中开发的微卫星标记可以简单高效地鉴定长牡蛎三倍体,微卫星位点的 $(1-y)$ 的乘积小于 0.005,倍性检测的准确率达 100%,采用微卫星标记进行倍性检测对于加速长牡蛎三倍体育种进程具有十分重要的意义。

关键词:长牡蛎;微卫星;倍性检测;微卫星—着丝粒重组率

中图分类号:Q 785; S 968.3

文献标志码:A

长牡蛎(*Crassostrea gigas*)又称太平洋牡蛎,属软体动物门(Mollusca)、双壳纲(Bivalvia)、牡蛎目(Osteroidea)、巨蛎属(*Crassostrea*),是一种广温、广盐性的内湾贝类。因其具有生长快、个体大、产量高、生产周期短等优点而成为一种重要的经济贝类,目前已成为养殖范围最广、养殖产量最大的海产贝类。与二倍体相比,三倍体长牡蛎具有育性差、生长快等特点,现已在中日韩及欧美国家实现规模化养殖^[1-3]。

无论是人工诱导多倍体的研究实验,还是多倍体规模化养殖生产,都需要一种简单有效的多倍体鉴定方法,从而对诱导结果的有效性进行准确评估。目前,倍性检测的方法很多,如流式细胞仪检测法^[4]、染色体分析法^[5]、荧光显微分析法、同工酶电泳方法^[6]等。流式细胞仪检测被认为是最简单有效的方法^[7],但该方法需要一定数量的细胞样品,以致发育早期的个体很难鉴定,并且该仪器价格昂贵,鉴定成本高,难以推广应用,因

此开发一种简便高效的多倍体筛选技术对于加速长牡蛎三倍体育种进程具有十分重要的意义。

微卫星(microsatellite)具有共显性遗传、多态性高、重复性好、实验操作简单等优点,是遗传学研究的重要分子标记。近年来,随着第二代测序技术的推广,长牡蛎中已开发得到 500 多个微卫星标记^[8-13],其中 56 个位点定位于着丝粒图谱中^[3]。长牡蛎常通过抑制第二极体的排放即阻止第二次减数分裂过程中姐妹染色单体的分离,诱导产生三倍体。理论上此方法产生的三倍体只含有母本一个等位基因,然而,如果微卫星标记与着丝粒之间距离较远,四分体时期非姐妹染色单体之间可能发生交叉互换而导致基因重组,倘若微卫星标记在母本中为杂合位点,三倍体子代可能遗传得到母本的两个等位基因,因此通过子代是否含有母本的两个等位基因即可快速高效地进行倍性鉴定。

本研究开发了一组用于长牡蛎三倍体检测的微卫星位点,通过与流式细胞仪检测结果比对确

收稿日期:2014-06-07 修回日期:2014-10-10

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2012AA10A405-6);国家自然科学基金(31372524);山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(BS2012HZ020)

通信作者:李 琪,E-mail:qili66@ouc.edu.cn

定微卫星方法的检测精度,并探讨准确鉴定倍性所需的微卫星个数与微卫星一着丝粒重组率之间的关系,以期为其他物种采用分子标记进行倍性检测提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 亲贝获取、受精、三倍体诱导及样品采集

一龄长牡蛎亲贝采自山东威海。亲贝于室内培育促熟后,采用解剖法获取精子和卵子,对获取的精卵进行离体促熟和洗卵,人工授精。受精卵分为两组,一组为二倍体对照组,不进行任何处理;另一组为处理组,采用 0.5 mg/L 的细胞松弛素 B 在第一极体出现 50% 时处理 15 min,抑制第二极体的释放,诱导产生三倍体。受精卵经海水冲洗后孵化,孵化及幼虫培育同正常牡蛎育苗程序。受精后 140 d 随机选取 115 个处理组子代和 20 个对照组子代作为实验样品,解剖取闭壳肌于 100% 酒精中保存。

1.2 DNA 提取、PCR 扩增及基因型分析

采用苯酚-氯仿-异戊醇法^[14]从亲本及子代的闭壳肌中提取基因组 DNA,采用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 样品的质量, NANODROP 2000 (Thermo)测定 DNA 的浓度后稀释成 100 ng/ μ L 的模板工作液待用。以亲本 DNA 为模版,筛选 Hubert 等^[3]构建的着丝粒图谱上的 56 个微卫星位

点,PCR 反应 10 μ L 体系如下: 1 \times buffer, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTP, 上下游引物各 1 μ mol/L, 0.25 U 的 *Taq* DNA 聚合酶 (TaKaRa) 以及 100 ng (1 μ L) 的 DNA 模版。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 3 min; 然后 94 $^{\circ}$ C 45 s, 退火温度 45 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 循环 35 次; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。扩增产物经 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 筛选出能特异性扩增、母本杂合并且与父本不存在相同等位基因的位点。筛选出的位点以亲本和对照组的 20 个子代作为模板, 验证微卫星是否能准确判断二倍体个体, 之后以亲本和处理组子代作为模板扩增, 子代中存在母本两个等位基因的个体判定为三倍体。

1.3 流式细胞仪倍性鉴定

取少量处理组子代的闭壳肌, 用 IKA 高速分散机 ULTRA-TURRAX 将组织打碎, 经 300 目筛绢过滤后制成细胞悬浮液, 加入 2 mg/L 的 DAPI (Sigma) 荧光染色, 利用 PartecPA II 流式细胞仪 (FCM) 进行倍性分析。

2 结果

2.1 微卫星位点筛选及二倍体验证

56 个微卫星位点中筛选得到 7 个符合要求的位点, 即能清晰特异性扩增、在母本中杂合并且与父本不存在相同等位基因的位点, 这 7 个微卫星位点的多态性、重组率等相关信息如表 1 所示。在 20

表 1 本研究所用微卫星位点特征
Tab. 1 Characteristics for microsatellite loci used in this study

序号 no.	位点 locus	引物序列 (5'-3') primer sequence (5' to 3')	退火温度/ $^{\circ}$ C annealing temperature	重组率 (y) recombination frequency	检出率 P
A	ucdCg-126	TGGATTGATCACCCCTTACA CCTGGATTCTGTGCGAGATT	55	0.764	0.641
B	ucdCg-149	TGATTAACGTGGGTGATTGAG TTTCTGACTGTCCGTCTGTGA	60	0.265	0.615
C	ucdCg-165	TTTTTACCAGCACTCGCTGT TCCGAATTCACAAGTGTGTGT	57	0.432	0.538
D	ucdCg-195	CCAACAACAGGGCACCTACT GGTCCAGTTGGCATCCTCTA	58	0.491	0.538
E	ucdCg-196	CCTTTCATTTGGAGGTTACATTG ATCTTGCCATTTGCTTTTGG	58	0.229	0.333
F	ucdCg-197	AGCAGACCCACTGGAGGTAA GTCGCTTCACCCAGGAAAT	55	0	0.308
G	ucdCg-200	AAAGTTGCTTTGCTGTCGTC CGCTAACGTGCTTCATTCAA	58	0.88	0.769

注: y. 微卫星一着丝粒重组率; P. 每个微卫星位点的三倍体检出率 ($P = \text{该微卫星位点检测出的三倍体个数} / \text{三倍体总数}$), 重组率数据来源于 Hubert 等^[3]构建的着丝粒图谱, 对于重组率在着丝粒图谱的多个家系中计算的位点, 重组率取多个家系的平均值

Notes: y. Microsatellite-centromere recombination frequency; P. Ability of triploid verification of each microsatellite ($P = \text{Number of triploids detected} / \text{number of triploids}$). Microsatellite-centromere recombination frequency (y) is obtained from Centromere mapping constructed by Hubert *et al.*^[3]. Some Microsatellite-centromere recombination frequencies are estimated in several families in [3], the average values of all families are used in this table

个对照组的二倍体个体中,7个微卫星均出现一条带(父本中存在无效等位基因)或两条带,没有其他干扰条带,确保了后期三倍体鉴定的准确性。

2.2 微卫星标记及流式细胞仪方法倍性检测结果分析

采用微卫星进行倍性检测时,存在母本两个等位基因的子代即判定为三倍体(图1),三倍体通常存在三条带,但如果父本中存在无效等位基因,三倍体则只出现两条带。采用7个筛选得到的微卫星位点分析115个处理组子代基因型,鉴定得出40个三倍体。每个微卫星标记鉴定三倍体的检出率与重组率之间表现出显著的线性相关($R^2 = 0.7532$, $P < 0.01$,图2)。

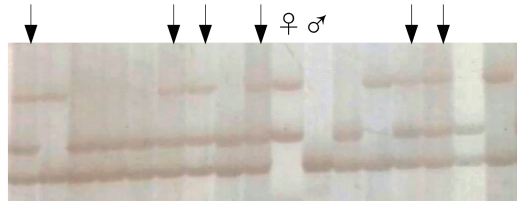


图1 ucdCg-195号微卫星三倍体检测结果

箭头所示为三倍体

Fig.1 Triploid validation using ucdCg-195 marker

Arrow indicates triploid

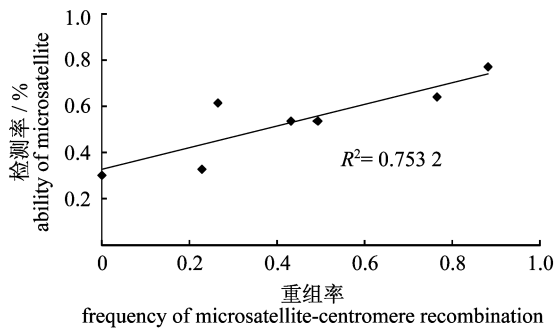


图2 微卫星—着丝粒重组率与标记三倍体检出率关系

Fig.2 Linear correlation between microsatellite-centromere recombination frequency and ability of microsatellite in triploid verification

采用流式细胞仪检测倍性,根据峰图所对应的横坐标中值可以获得细胞的相对DNA含量,以对照组(二倍体)的样品(图3-a)作为临时参照标准(1.00),处理组中的三倍体子代细胞核DNA含量相对值为1.54(图3-b)。115个处理组的样品中40个个体鉴定为三倍体,该结果与微卫星方法检测结果完全一致。

为检验微卫星方法能否用于幼虫倍性鉴定,

本实验将开发的7个微卫星位点以长牡蛎D型幼虫DNA为模版进行扩增和基因分型,结果显示,7个位点都可得到清楚扩增条带,证实了微卫星方法在幼虫倍性检测中的可行性,因幼虫鉴定结果不能采用流式细胞仪加以验证,本实验并未列出相关数据。

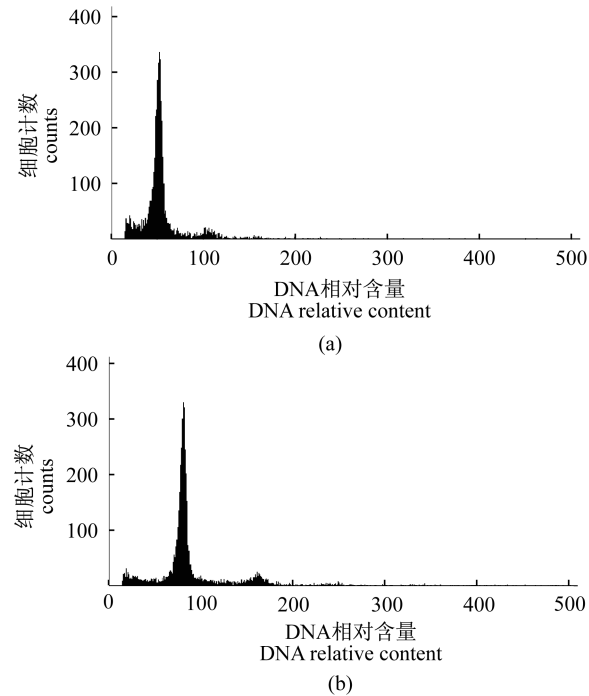


图3 流式细胞仪倍性检测结果

(a)长牡蛎二倍体;(b)长牡蛎三倍体

Fig.3 Ploidy analysis using flow cytometry

(a) diploid oyster;(b) triploid oyster

2.3 倍性检测所需微卫星数目分析

本实验发现7个微卫星位点可以100%鉴定出处理组中的三倍体牡蛎。为探索倍性检测所需要的微卫星位点数量,实验将所有位点随机组合,筛选出能准确鉴定三倍体的组合,其中最优的组合(不同组合中能准确鉴定三倍体所需要的最少位点组合)有5个:A+D+G,B+D+G,A+C+F+G,A+B+C+D和A+B+C+F。从以上组合中可以发现,7位点中去除任何一个位点,即随机挑选6个位点就可以将所有三倍体全部鉴定出;如果随机挑选5个位点,可以形成21个组合,其中7个组合(AG,CG,BG,AD,AB,CD或DF两个位点同时缺失的组合)不能鉴定出所有三倍体,即有2/3的可能性将所有三倍体鉴定出;当微卫星—着丝粒重组率较大时,倍性检测所需要的微卫星位点数减少,如A+D+G和B+D+G组合,只需要3个微卫

星位点就可以检测出所有三倍体。

3 讨论

3.1 长牡蛎倍性检测方法比较

目前有很多方法用于牡蛎三倍体的检测,例如流式细胞仪^[15],染色体分析法^[16]以及细胞核大小分析^[17],这些方法各有长处,却都存在缺点。流式细胞仪和染色体分析法是贝类倍性检测中最常用的方法,尤其是流式细胞仪检测法具有快速和准确率高等优点,但是该方法检测时需要一定数量的细胞样品,对于牡蛎幼虫期的个体很难鉴定,并且该方法所需仪器价格昂贵,使用成本高;染色体分析法虽然不需要昂贵的仪器,却容易在制片时引起染色体的缺失,并且鉴定过程耗时较长,操作复杂,无法及时获得鉴定结果;细胞核大小分析方法则因不同倍性之间存在重叠的现象而影响检测结果的准确性。

与之前的多种检测方法相比,微卫星方法检测三倍体操作简单、准确性高,不受发育时期的限制。随着第二代测序技术的推广,已知序列资源不断增加,越来越多的物种开发得到大量的微卫星标记,这为该技术的推广奠定了基础。采用微卫星方法鉴定三倍体已经应用于部分水产动物,如鲍(*Haliotis midae*)^[18],大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[19]以及鲫(*Carassius auratus*)^[20]等,经流式细胞仪验证,鉴定结果的准确性可达到100%。

3.2 倍性检测中微卫星位点个数与微卫星一着丝粒重组率关系分析

微卫星鉴定三倍体的效率主要取决于四分体时期非姐妹染色单体间交叉互换的频率,即微卫星一着丝粒重组率。为保证鉴定结果的准确性需选择足够的微卫星位点数目,在研究倍性检测所需微卫星数目之前,本实验做了一个假设:微卫星一着丝粒重组率(y)指示了微卫星倍性检测的能力,确定99%的鉴定准确性,所需微卫星位点的 $(1-y)$ 的乘积应小于0.01。为验证该假设,对实验结果进行分析,本实验所采用的7个微卫星位点的 $(1-y)$ 的乘积为0.005,流式细胞仪验证其准确率为100%;随机去除任意一个微卫星位点,即采用6个位点进行倍性检测, $(1-y)$ 的乘积为0.005~0.042,三倍体检出率仍为100%,由此可以推断, $(1-y)$ 的乘积小于0.005,可鉴定出所有三倍体;随机挑选5个位点检测时,有7个组合不能鉴定出

所有三倍体,这7个组合中5个位点的 $(1-y)$ 乘积为0.010~0.176,反面证明了实验的假设。综合以上分析,采用分子方法检测倍性时,所选微卫星的 $(1-y)$ 的乘积小于0.005可以确保约100%的准确性,若受到实验条件的限制,也可将条件放宽至 $(1-y)$ 的乘积小于0.01。

本研究中微卫星的选择并未考虑微卫星一着丝粒重组率的大小,所用位点的重组率为0~0.880,平均重组率值为0.437,在该情况下,采用6个位点可以准确鉴定出所有三倍体牡蛎。当微卫星位点距离着丝粒较远,即微卫星一着丝粒重组率较大时,位点个数可少于6个。由于一些物种所开发的微卫星并未定位于着丝粒图谱中,因此在采用微卫星方法鉴定三倍体时,所需位点数不能由 y 值计算得出,这种情况下为保证鉴定准确性,建议选取6个以上微卫星位点。在父母本信息未知的群体研究中,子代三倍体的鉴定应该以出现3个等位基因为标志,考虑到母本中可能存在纯合位点的现象,选用的微卫星位点数应适量增加。

3.3 无效等位基因

无效等位基因是指不被PCR扩增的等位基因,通常是由引物结合部位的点突变、插入或缺失引起^[21],广泛存在于众多物种中。Li等^[22]对皱纹盘鲍微卫星遗传特性的研究表明,等位基因中无效等位基因的比例为10.7%;Hubert等^[23]也曾报道长牡蛎中51%的微卫星位点在三个家系中至少存在一个无效等位基因。无效等位基因的存在将减弱微卫星标记倍性检测的能力,这种影响在父母本信息已知的家系分析中可忽略不计,通过筛选母本杂合的位点即可排除母本中存在无效等位基因的可能性,倍性检测时出现母本杂合位点的子代即可判定为三倍体,该检测方法无需考虑父本信息,即使父本中存在无效等位基因也不会影响检测结果,这拓展了微卫星标记的选择范围。在父母本信息未知的群体分析中,子代需出现三个等位基因才能判定为三倍体,此时无效等位基因会影响检测效率,该条件下应选择无效等位基因频率较小的标记,并适当增加检测所用标记数量,以保证检测的准确性。

参考文献:

- [1] Nell J A. Farming triploid oysters[J]. *Aquaculture*, 2002,210(1):69-88.

- [2] Guo X. Oyster breeding and the use of biotechnology [J]. Bulletin of the Aquaculture Association of Canada, 2004, 104 (2) : 26 - 33.
- [3] Hubert S, Cognard E, Hedgecock D. Centromere mapping in triploid families of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) [J]. Aquaculture, 2009, 288 (3) : 172 - 183.
- [4] Zheng C J, Wu X F, Liu D H, *et al.* Triplot analysis of *psendociaena crocea* by flow cytometry [J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2006, 28 (2) : 253 - 256. [郑春静, 吴雄飞, 刘东海, 等. 用流式细胞仪检测大黄鱼三倍体 [J]. 细胞生物学杂志, 2006, 28 (2) : 253 - 256.]
- [5] Thorgaard G H. Chromosome set manipulation and sex control in fish [J]. Fish Physiology, 1983, 9 (Part B) : 405 - 434.
- [6] Liu S, Hashimoto K, Sezaki K, *et al.* Simplified techniques for determination of polyploidy in *Ginbuna Carassius auratus langsdorfi* [J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1978, 44 (6) : 601 - 606.
- [7] Allen Jr S K. Flow cytometry: assaying experimental polyploid fish and shellfish [J]. Aquaculture, 1983, 33 (1) : 317 - 328.
- [8] McGoldrick D J, 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.
- [9] Li G, Hubert S, Bucklin K, *et al.* Characterization of 79 microsatellite DNA markers in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. Molecular Ecology Notes, 2003, 3 (2) : 228 - 232.
- [10] Yu H, Li Q. Exploiting EST databases for the development and characterization of EST-SSRs in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) [J]. Journal of Heredity, 2008, 99 (2) : 208 - 214.
- [11] Qi H, Wu Q, Li L, *et al.* Development and characterization of microsatellite markers for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. Conservation Genetics Resources, 2009, 1 (1) : 451 - 453.
- [12] Yu Z, Wang Y, Fu D. Development of Fifty-one novel EST-SSR loci in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* by data mining from the public EST database [J]. Conservation Genetics Resources, 2010, 2 (1) : 13 - 18.
- [13] Bai J, Li Q, Cong R, *et al.* Development and characterization of 68 expressed sequence tag derived simple sequence repeat markers in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* [J]. Journal of The World Aquaculture Society, 2011, 42 (3) : 444 - 455.
- [14] Li Q, Yu H, Yu R. Genetic variability assessed by microsatellites in cultured populations of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in China [J]. Aquaculture, 2006, 259 (1) : 95 - 102.
- [15] Guo X, Allen S K. Reproductive potential and genetics of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg) [J]. The Biological Bulletin, 1994, 187 (3) : 309 - 318.
- [16] Nell J, Hand R, Goard L, *et al.* Studies on triploid oysters in Australia; Evaluation of cytochalasin B and 6-dimethylaminopurine for triploidy induction in Sydney rock oysters *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley) [J]. Aquaculture Research, 1996, 27 (9) : 689 - 698.
- [17] Gardner C, Maguire G B, Kent G N. Studies on triploid oysters in Australia. VII. Assessment of two methods for determining triploidy in oysters; adductor muscle diameter and nuclear size [J]. Journal of Shellfish Research, 1996, 15 (3) : 609 - 615.
- [18] Slabbert R, Prins N, Brink D. A microsatellite panel for triploid verification in the abalone *Haliotis midae* [J]. African Journal of Marine Science, 2010, 32 (2) : 259 - 264.
- [19] Hernández-Urcera J, Vera M, Magadán S, *et al.* Development and validation of a molecular tool for assessing triploidy in turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. Aquaculture, 2012, 330 : 179 - 184.
- [20] Bai Z, Liu F, Li J, *et al.* Identification of triploid individuals and clonal lines in *Carassius auratus* complex using microsatellites [J]. International journal of biological sciences, 2011, 7 (3) : 279 - 285.
- [21] Callen D F, Thompson A D, Shen Y, *et al.* Incidence and origin of " null " alleles in the (AC)_n microsatellite markers [J]. American Journal of Human Genetics, 1993, 52 (5) : 922 - 927.
- [22] 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.
- [23] Hubert S, Hedgecock D. Linkage maps of microsatellite DNA markers for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. Genetics, 2004, 168 (1) : 351 - 362.

A microsatellite panel for triploid verification in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)

JIANG Qun, LI Qi*, YU Hong, KONG Lingfeng

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

Abstract: In the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), triploidy induction is the most common genetic method to enhance production yield through phenotypic improvement. Production of triploids necessarily requires a proper method to verify the ploidy level after induction. Various methods have been developed such as flow cytometry, chromosome counting by karyotype analysis, counting of nucleoli, particle size analysis and so on. However, each method has some drawbacks considering size of sample, accuracy, complexity in conduction and cost. This study aims to identify a microsatellite panel for triploid validation in the Pacific oyster and further explore the number of microsatellites required to successfully verify ploidy status. Triploid oysters are usually induced by suppressing the extrusion of the second polar body. If the distance between a microsatellite and centromere is great, homologous chromosomes might cross over at prophase I of most meiosis allowing the triploid progenies having both of the two maternal alleles. This study screened the 56 microsatellites located in the centromere mapping and obtained seven successfully amplified loci at which the female parent is heterozygous and does not share any allele with the male parent. Using these seven microsatellites, 40 triploid oysters were verified from the 115 individuals treated by cytochalasin B (CB, 0.5 mg/L) for 15 min starting from the time when about 50% of the eggs released the first polar body. Ploidy status was then verified by flow cytometry and the correspondence was 100%. The ability of a microsatellite in identifying triploids relies on its frequency of microsatellite-centromere recombination (y). To further explore the number of microsatellites required to successfully identify all the triploids, different combinations of microsatellites were analyzed. The results indicate approximate 100% accuracy when product of $(1 - y)$ of all microsatellites is no more than 0.005. This study shows that microsatellite markers can serve as an accurate, fast, cost-effective and technically simple method for triploid verification in the Pacific oyster. The protocol described in this work will help in the application of triploids verification using molecular markers in other species.

Key words: *Crassostrea gigas*; microsatellite; triploids verification; microsatellite-centromere recombination

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