

文章编号: 1000- 0615(2005)04- 0482- 05

磁珠富集法分离草鱼微卫星分子标记

孙效文¹, 鲁翠云^{1,2}, 梁利群¹

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070;
2. 大连水产学院生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023)

摘要: 磁珠富集法是一种快速、高效的分离微卫星分子标记的方法。本研究通过该方法分离草鱼的微卫星分子标记。将草鱼(*Ctenopharyngodon idella*) 基因组 DNA 经 *Sau3AI* 酶切, 回收纯化 400~ 900 bp 片段, 连上接头, 构建“基因组 PCR 文库”。用生物素标记的简单重复序列(CA)₁₅ 作探针与其杂交, 杂交复合物结合到包被有链霉亲和素的磁珠上, 经一系列的洗涤过程, 去除磁珠表面不含有微卫星的片段。将吸附在磁珠上的片段洗脱, PCR 扩增放大, 再进行克隆和测序, 根据微卫星两端的保守序列设计引物, 即可得到微卫星分子标记。本研究又通过同位素标记的探针(CA)₁₅ 进行二次杂交筛选, 获得阳性克隆 132 个, 所得到的阳性克隆经测序, 86.36% 含有微卫星序列, 共获得 130 个微卫星 DNA 序列。用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计引物 83 对。

关键词: 磁珠富集; 草鱼; 微卫星分子标记

中图分类号: S917 文献标识码: A

Isolation of microsatellite with enrichment by magnetic beads in grass carp, *Ctenopharyngodon idella*

SUN Xiaowen¹, LU Cuirun^{1,2}, LIANG Lirun¹

(1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Science, Harbin 150070, China;
2. Life Science and Technology Institute, Dalian Fisheries College, Dalian 116023, China)

Abstract Enrichment by magnetic beads is a simple and efficient method for rapid isolation of microsatellite DNA. In this experiment, we isolated microsatellite DNA from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) genome with this method. Grass carp genomic DNA was extracted and digested with restriction enzyme *Sau3AI*. Fragments of 400– 900 bp were isolated and purified and then ligated with short linkers (20 bp). They were used to create a “whole genome PCR library”. This genomic DNA was hybridized with a biotin labeled microsatellite probe (CA)₁₅. The hybrid mixture was incubated with magnetic beads coated with streptavidin. After washing to remove the non-SRS fragments, the eluted single stranded DNA contains the selected microsatellite DNA. The selected DNAs are then amplified using primers designed complementary to the linkers, cloned into the pGEM-T vector and sequenced. In this experiment, we performed the second screening with a radiolabeled (CA)₁₅ probe and obtained 132 positive clones. From these positive clones, we isolated 130 microsatellite sequences. This allowed us to design 83 pairs of primers with the software Primer Premier 5.0.

Key words: enrichment by magnetic beads; *Ctenopharyngodon idella*; microsatellite

微卫星(microsatellite) DNA 指以少数几个核苷酸(1~ 6个)为单位多次串联重复的简单序列, 又称短串联重复序列(short tandem repeat, STR)、简单序列重复(simple sequence repeat, SSR) 或简

单序列长度多态性(simple sequence length polymorphism, SSLP), 是新近发展起来的一种新的分子标记。由于微卫星具有高度的多态性^[1]和共显性, 在真核生物基因组中随机分布, 因此, 在

收稿日期: 2004 06 22

资助项目: 国家重大基础研究资助项目(2004CB117405)

作者简介: 孙效文(1955-), 男, 黑龙江哈尔滨人, 博士生导师, 研究员, 主要从事水产动物遗传育种研究。Tel: 0451- 84842646, E

mail: xws1999@hotmail.com

种群遗传结构分析、种群遗传多样性鉴定^[2]、遗传图谱的构建^[3]及生产性状位点的连锁分析与QTL分析中得到了广泛的应用。

微卫星分子标记的发展主要受限于微卫星及其旁侧特异引物区的分离。微卫星的分离主要有两种途径:一种是用经典的分子生物学方法构建富含微卫星位点的基因组文库^[4,5],通过杂交筛选出含有微卫星序列的阳性克隆,但是筛选过程较复杂,筛选效率低,需要大量的人力和资金的投入;另一种是从已知的核酸序列中进行检索,但是可检索的资源相对有限。用生物素包被的磁珠富集法分离微卫星分子标记是一种简单高效的方法^[6,7],已经应用于一些植物和动物微卫星分子标记的分离^[8-10],但在水产动物方面的应用还未见报道。

草鱼微卫星DNA的分离在国内还未见报道,林凯东等^[11]利用微卫星引物的通用性,首次将鲤的微卫星引物用于草鱼基因组分析。本研究尝试用磁珠富集的方法筛选草鱼的微卫星分子标记,以期为这一方法在水产动物方面的应用做一些探索,同时,分离出一些草鱼的微卫星分子标记,为草鱼养殖品系的优化、遗传多样性的检测及遗传图谱构建等打下基础。

1 材料和方法

1.1 构建草鱼“基因组PCR文库”

草鱼基因组DNA片段的提取和酶切 草鱼取自黑龙江水产研究所江北试验基地。采新鲜血液提取基因组DNA,用限制性内切酶 *Sau3AI* 进行部分酶切,1%琼脂糖凝胶电泳检测,切下400~900 bp大小的片段,用试剂盒(QIAquick Gel Extraction Kit (50), QIAGEN公司产品)进行回收备用。

接头的制备及连接 用单链的寡核苷酸合成双链接头,每种寡核苷酸的浓度均为 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。本实验所用接头:寡核苷酸链A:5'-GATCGTCGACGGTACCGAATTCT;寡核苷酸链B:5'-GTCAAGAATTCGGTACCGTCGAC。等比例的混合两组寡核苷酸链A、B,缓慢降温(95℃变性10 min,然后用4 h冷却到10℃),退火以形成带有限制性酶切位点(*Sau3AI*, *SalI*, *EcoRI*)的双链接头。最终形成的接头为:

3' CAGCTGCCATGGCTTAAGAAGACTG B
Sau3AI—*SalI*—*EcoRI*

将接头连接到已分离纯化的基因组片段上,并用旋离柱(centrifugal concentrators, PALL FILTRON公司产品)离心去除多余的接头,并最终浓缩到15 μL左右,1%琼脂糖凝胶电泳检测,看接头是否去除干净,由于多余的寡核苷酸接头会影响后面的PCR扩增,所以一定要把多余的接头去除干净。

获得草鱼“基因组PCR文库” 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℃预变性3 min,94℃1 min,58℃1 min,72℃1 min,30个循环,最后72℃延伸10 min。反应完毕后,过旋离柱以去除多余的引物和没有参加反应的dNTP,并浓缩到15 μL左右。电泳检测。

1.2 筛选富集草鱼微卫星文库

用生物素标记的微卫星探针筛选草鱼“基因组PCR文库” 杂交液的配制: $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 生物素标记的(CA)₁₅探针、 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物(为寡核苷酸链B)、 $6\times\text{SSC}$ 、0.1% SDS。68℃预热杂交液,将双链DNA片段95℃变性5 min快速加入,68℃杂交1 h。杂交过程中平衡磁珠。

磁珠的平衡 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)1~2 min,轻轻吸出盐溶液。用200 μL B & W洗液($10 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-Cl, $1 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, $2 \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 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,直到磁珠外观变得顺滑易洗脱。加入200 μL洗液I,室温放置直到杂交完毕。

磁珠富集微卫星序列、构建草鱼微卫星文库 磁珠上包被有链霉亲和素(streptavidin),可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℃温育20 min,并轻轻摇动,使生物素和链霉亲和素结合。温育结束后,将离心管放置到磁力架上,去除溶液。依次用洗液I($6\times\text{SSC}$, 0.1% SDS)、洗液II($3\times\text{SSC}$, 0.1% SDS)、洗液III($6\times\text{SSC}$)洗涤磁珠,去除不含有微卫星的序列。洗涤方法:洗液I在室温洗2次,每次静置10 min;洗

液II在68℃洗2次,每次静置15min;洗液III在室温快速洗2次,即可基本将不含微卫星的序列去除干净。然后,用200μL 0.1×TE在室温快速洗2次,加入50μL 0.1×TE,95℃变性10min,释放出含有微卫星序列的单链DNA。用所获得的单链DNA作为模板,以寡核苷酸链B作为引物进行PCR扩增,扩增方法同第一次PCR。将PCR产物同T-载体(pGEM-T vector,购于Promega公司)连接,同时T载体自身连接作为对照。用CaCl₂制备的感受态大肠杆菌DH5α(参照文献[12])进行转化,得到草鱼微卫星文库。

1.3 原位杂交,用同位素探针进行二次筛选

通过原位杂交对草鱼微卫星文库进行二次筛选。杂交膜的制备参照文献[12]。用同位素标记的(CA)₁₅进行杂交,压X光片,-70℃放射自显影7d(可视信号强弱增减放射自显影的时间)。挑取阳性克隆进行测序分析。测序由北京诺赛基因组研究中心有限公司完成。

2 结果及分析

本次实验共获得微卫星基因组文库2000个克隆,T载体自连的比例为35.22%,所以,所得到的重组克隆约为1300个。通过杂交进行2次筛选,得到阳性克隆132个(10.15%),测序得到114个(86.36%)克隆含有微卫星序列。

114个阳性克隆中含有微卫星座位130个,其中以CA/GT为单位的重复序列占110个(84.62%)。重复次数在20次以上的微卫星50个(38.46%),10~20次之间的59个(45.38%),所得微卫星序列较长。

根据Weber^[13]提出的测序标准将所获得的130个微卫星序列进行归类(表1)。其中,perfect的微卫星占大多数,此结果与鲤^[14]等淡水鱼类的微卫星情况大体相符。

表1 草鱼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 grass carp

微卫星数目 microsatellite number		130			
微卫星类型 repeat sequence type	perfect	imperfect	compound perfect	imperfect compound	
	90	23	15	2	
	69.23%	17.69%	11.54%	1.54%	

在130个微卫星序列中,除了一些微卫星序列因本身结构或两端太短不能设计引物外,其余微卫星利用引物设计软件Primer Premier 5.0设计引物83对,并从中选取30对(表2)。这些引物通过优化PCR反应条件,在适当的退火温度,可以获得目的条带。

3 讨论

磁珠富集法是一种高效而简单快速的筛选微卫星的方法,整个过程可在1个星期完成,如果利用蓝白斑筛选克隆,从理论上讲,每一个白色菌斑都应当含有微卫星序列。但是,操作过程中一些因素会影响筛选微卫星效率,最主要的影响因素是磁珠的平衡及洗液和洗涤温度的严格控制。磁珠用前需要用盐溶液反复平衡,根据经验,一般新鲜磁珠较容易平衡,而在4℃存放时间较长的磁珠不易平衡,需要反复多次,直到磁珠顺滑;另一方面,洗液的配置及洗涤温度要严格控制,以达到清除不含微卫星序列片段的目的,同时,保护吸附的含有微卫星序列的片段不被洗脱,整个操作过程要轻,以达到最高的分离效率。本次实验初次筛选的效率为10.15%,高于常规方法筛选微卫星的效率,但是,远低于本方法所能够达到的效率,可能在二次杂交过程中有误差,致使一些微卫星序列单链没有暴露出来,被同位素探针很好的杂交。

微卫星核心序列突变率相对较高($10^{-5} \sim 10^{-3}$),造成微卫星核心序列重复次数的增加或减少,即微卫星长度的变化,这是微卫星多态性的基础^[2]。微卫星寡核苷酸的重复数在同一物种的不同基因型间差别很大,具有十分丰富的多态性^[15,16]。Weber^[13]认为,只有在双碱基重复序列重复次数大于12次时,微卫星标记才有可能表现出较高PIC(polymorphic information content)值,当 $n \geq 16$ 时,可提供的多态性信息含量(PIC)在0.5以上^[17],才可以进行相应的多态性分析。由于在富集的过程中,磁珠经过多个洗涤的过程,所以不可避免的将一些因重复数目较少而附着不牢固的微卫星序列清洗除去,致使所获得的微卫星序列较长,重复次数较多。Valdes等^[18]认为在人类中重复次数低于5的微卫星,几乎检测不出多态性。Smulders等^[19]认为重复次数多的微卫星既能在种间又能在种内产生多态性,但重复次数少的微

表 2 草鱼微卫星分子标记及其引物
Tab. 2 Microsatellite markers and their primers in grass carp

微卫星标记 microsatellite marker	引物序列 5' - 3' primer sequence	大小(bp) size	重复序列 repeat sequence	最适退火温度(°C) optimum annealing temperature
GM01	F GCGACAGGCCATCA AAC R GCCCTAACCCAACAATA A	211	(CT) ₂₄ (GT) ₁₀	51.9
GM02	F TTTCTGTGATGGGTAGGTT R GCGGATTAAGTTGGGTAA	293	(GT) ₁₀	50.9
GM03	F TGTATGTTTGTAGTAACCCAC R TTGGTTCTGCTTCTATTTC	171	(CA) ₅₃	50.5
GM04	F TTAGCACCGTCTA ACACCC R A AATTCCCAGCCTTCCAG	244	(CA) ₁₉	51.4
GM05	F ACTATGGCAACCTCACCG R GCA CAG ATG CG TAAGG AGA	313	(GT) ₉	55.1
GM06	F CGCA T TACTGTG GTTGG A R A GGGTA AGCAGGATTTGG	375	(GT) ₂₉	52.7
GM07	F ACAGAACCAGGGA AACAAA R TGAGCCAGTAGCGAGT AAG	115	(CA) ₁₇	49.5
GM08	F AAGAAA TAGCGTAGGACAA C R TACCAATCGCA CCAAG AC	240	(CA) ₂₀	49.6
GM09	F TTTCCGTT CAGGACTCTAA R TAGCACCGCTA AACACCC	235	(GT) ₁₉	49.4
GM10	F CA CAG CG GTT CAGCATA T R GCGGATTAAGTTGGGTAA	280	(GT) ₃₃ (GTCT) ₅	51.2
GM11	F GAATG GCTGCCACTGCT R GCCTCTTCTGCTATTACGC	350	(GT) ₁₅	53.3
GM12	F GGTGGTG GGCAGTTGTG R AGGCGATTAAGTTGGGTAA	274	(GT) ₁₂	53.1
GM13	F CCAG ACGGATG AGGACAC R AGGCGATTAAGTTGGGTAA	294	(CA) ₁₄	53.4
GM14	F GTCACGGCTTATTGCG R A AGGCGATTAAGTTGGGT	247	(CA) ₁₈	53.0
GM15	F CAAGTGG GAAAGATAAGA CA R GCGGATTAAGTTGGGTAA	337	(CA) ₂₂ TA(CA) ₉ A A(CA) ₁₄ CG(CA) ₄	52.5
GM16	F GGCACAATA GGGAAGAA R GCGGATTAAGTTGGGTAA	245	(GT) ₅ GC(GT) ₁₉	52.0
GM17	F TACGCCAACAA CAGA CGC R A CCGCAG AGTGA GGAATGA	262	(GT) ₇ TT(GT) ₅	53.5
GM18	F GCGTTTCTCA TTCATTTGT R GTGGGTTTACTGA ATAAG GTTG	294	(CA) ₆₃	52.7
GM19	F ACCG CCAAGTATGGTG AC R GCCTCTTCTGCTATTACGC	365	(CA) ₆₉	53.9
GM20	F TACCGCAATCA GACCATAAT R GATTCACTTACTCACCCCTCGT	125	(CA) ₂₁	50.5
GM21	F GCACCCCTTACTTCTACTCG R GACCTCGTTTCCAAGACC	286	(GT) ₃₆	51.9
GM22	F CATGATTA CGGCAGCTATT R GGGGCAACTGTCTCTAC	354	(GT) ₆ CT(GT) ₃	52.9
GM23	F TTACGCCAGCTATTTA GG R TGGATTCACTTACTCA CCC	312	(CA) ₂₀	51.8
GM24	F ATTACGCCAGCTATTTAGG R ATGTTACCGCAGGTGTTT	297	(GT) ₉ GA(GT) ₄ GA(GT) ₁₁	52.7
GM25	F GATTTCCTTCCG CACCA R CCCAGCACAGGGAGATTG	297	(GT) ₁₈	54.3
GM26	F AAGGAAAGAGGGAGG GTC R CAGTAGCTGTAA AGAGTG GGT	270	(CA) ₁₇	52.7
GM27	F AACAAATCAGGCTTTACGGT R A AGGCGATTAAGTTGGGT	348	(GT) ₁₃	53.9
GM28	F ACCA ACGGCA TCACAACC R ACGCCA CAAGTCATAACAGCAA	313	(GT) ₂₈	53.7
GM29	F ATCAGAGGTTCCGCCCA CA R GTCCATTTCGCCATTCA GG	331	(CA) ₁₃ CT CT(CA) ₅	56.1
GM30	F GCCA CATTCCACAGGTT R TCATCCGCTCCACTTCT	249	(GT) ₁₀	51.6

注: F: 正向引物; R: 反向引物

Notes: F: forward primer; R: reverse primer

卫星, 仅能在种间产生多态性。Xu 等^[20] 曾对斑节对虾进行微卫星引物设计, 最后结果表明, 凡是核心序列重复次数较少的微卫星标记, 其结果或是单态性的, 或等位基因数目非常少, PIC 值也偏低。因此, 研究所选用的微卫星序列其核心序列重复次数应当在一个非常高的水平上, 避免由于微卫星核心序列过短, 造成微卫星标记筛选中多态性引物比例过低而造成浪费。本实验所获得的微卫星序列重复数在 10 次以上的占总数的 83.85%, 这对于筛选多态性信息含量高的分子标记是有利的。

微卫星分子标记在水产动物的分离和应用起步较晚, 远落后于陆生动植物, 大多还处于寻找合适的标记为遗传结构分析、图谱构建及进一步研究打基础的初级阶段, 在国内, 只有鲤^[4], 对虾^[21-23], 扇贝^[24] 等少数种类已分离出微卫星分子标记, 网上基因库可利用的资源也还非常有限, 远不能满足研究和应用的需要。分离微卫星所用的方法也主要是用微卫星探针筛选常规小片段基因组文库, 费时费力, 且阳性克隆率也非常低。本方法为水产动物微卫星的分离提供了广阔前景。

我国是一个渔业大国, 水产动物种类多, 数量多, 遗传特性复杂, 依靠微卫星引物的通用性进行遗传多样性分析、连锁图谱构建、QTL 定位基因、分子标记辅助育种等研究具有很大的局限性。可以预见, 磁珠富集法制备微卫星技术可以加速水产动物微卫星分子标记的筛选和应用进程。

参考文献:

[1] 何平. 真核生物中的微卫星及其应用[J]. 遗传, 1998, 20(4): 42-47.

[2] 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.

[3] 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.

[4] Karagyozov L. Construction of random small insert genomic libraries highly enriched for simple sequence repeats[J]. Nucleic Acid Res, 1993, 21: 3911-3912.

[5] Alish R S, Takagi M, Dong S, et al. Isolation and inheritance of microsatellite markers in the common carp *Cyprinus aurpio*[J]. Fisheries Science, 1999, 65(2): 235-239.

[6] Bronw J L, Hardwick J, Wright A F. A simple method for rapid isolation of microsatellites from yeast artificial chromosomes[J].

Molecular and Cellular Probes, 1995, 9: 53-58.

[7] 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]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 88-92.

[8] 高国庆, He G H, 李祥瑞. 磁珠富集法从 AFLP 片段中分离微卫星 DNA 标记[J]. 植物学报, 2003, 45(11): 1266-1269.

[9] He G H, Meng R H, Newman M, et al. Microsatellites as DNA markers in cultivated peanut[J]. (*Arachis hypogaea* L.), 2003, 97: 143-149.

[10] Ostrander E A, Jong P M, Rine J, et al. Construction of small insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences[J]. Proc Natl Acad Sci USA. 1992, 89: 3419-3423.

[11] 林凯东, 罗琛. 鲤的微卫星引物对草鱼基因组分析适用性的初步研究[J]. 激光生物学报, 2003, 12(2): 121-127.

[12] 金冬雁, 等(译). 分子克隆实验指南(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 1992.

[13] Weber J L. Informativeness of human (dC-dA)n(dG-dT)n polymorphisms[J]. Genomics, 1990, 7: 524-530.

[14] 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.

[15] Goldstein A R, Pollock D D. Launching microsatellites: a review of mutational processes and methods of phylogenetic inference[J]. Hered, 1997, 88: 335-342.

[16] Ferguson A. Molecular genetics in fisheries: current and future perspective[J]. Rev Fish Biol Fish, 1994, 4: 379-383.

[17] Orit G, Pearse D E, Avise J. Phylogenetic assessment of length variation at a microsatellite locus[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 10745-10749.

[18] Valdes A M, Slatkin M, Freimer N B. Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited[J]. Genetics, 1993, 133: 737-749.

[19] Smulders M J M, Bredemeijer G, Rus kortekaas W, et al. Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species[J]. Theor Appl Genet, 1997, 97: 264-272.

[20] Xu Z, Dhar A K, Wyrzykowski J, et al. Identification of abundant and information microsatellites from shrimp genome[J]. Animal Genetics, 1999, 30: 1-7.

[21] 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.

[22] 徐鹏, 周岭华, 相建海. 用 PCR 法快速筛选中国对虾含微卫星的重组阳性克隆[J]. 水产学报, 2001, 25(2): 127-130.

[23] 徐鹏, 周岭华, 田丽萍, 等. 从中国对虾 ESTs 中筛选微卫星标记的研究[J]. 水产学报, 2003, 27(3): 213-218.

[24] 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, 12: 72-75.