

## 日本蟳微卫星富集文库的建立与多态性标记的筛选

宋春妮<sup>1,2</sup>, 李健<sup>1\*</sup>, 刘萍<sup>1</sup>, 陈萍<sup>1</sup>, 高保全<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 大连海洋大学生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023)

**摘要:** 采用磁珠富集法筛选日本蟳微卫星分子标记。日本蟳基因组 DNA 经 *Sau3* A I 酶切后, 收集 400~1 200 bp 大小的片段并纯化, 利用生物素标记的寡核苷酸探针 (AC)<sub>15</sub> 从中筛选出含有微卫星序列的 DNA 片段, 连接到 pMD18-T 载体中, 构建富集微卫星序列的基因组文库, 经 PCR 检测筛选出阳性克隆进行测序。从随机挑选的 970 个菌落中筛选出 369 个阳性克隆进行测序, 结果 86.99% (321 个) 含有微卫星序列, 其中完美型占 80.54%, 非完美型占 15.95%, 混合型占 4.28%。除使用的探针 AC 重复外, 还得到 GA、CT 等重复序列。共设计出 102 对微卫星引物, 其中 65 对能扩增出清晰条带, 27 对具有多态性。同时筛选出的微卫星标记可为今后研究日本蟳的分子遗传育种提供有效的遗传标记。

**关键词:** 日本蟳; 微卫星; 磁珠富集法

**中图分类号:** Q 785; S 917

**文献标识码:** A

日本蟳 (*Charybdis japonica*) 属梭子蟹科、梭子蟹亚科、蟳属, 俗称赤甲红、石鲟仔、海红和石蟹等, 是一种大型海产食用蟹类。它属于沿岸定居性种类, 广泛分布于我国四海及日本、朝鲜、东南亚等沿海岛礁区及浅海水域, 肉质细嫩, 味道鲜美, 很受消费者青睐。为了保护野生日本蟳种质资源并满足市场日益扩大的需求量, 目前已经开展了日本蟳的苗种生产和规模化养殖等工作, 有关其生物学和养殖技术的研究报道较多<sup>[1-4]</sup>, 而分子标记方面尚未见报道。

微卫星目前已广泛应用于遗传连锁图谱的制备、种质鉴定、种群多样性分析等方面<sup>[5-7]</sup>。本研究采用磁珠富集法筛选日本蟳的微卫星分子标记, 为日本蟳的分子遗传育种方面研究奠定了基础, 同时也为遗传连锁图谱的构建, 数量性状位点 (QTL) 定位和功能基因克隆等提供基础资料。

### 1 材料与方法

#### 1.1 样品来源

样品为莱州湾野生日本蟳 32 个个体, 取其大

螯放入 -80 °C 保存。

#### 1.2 DNA 提取

取 0.1 克大螯肌肉剪碎放入 475 μL TE 缓冲液中, 加入 25 μL 10% SDS 混匀 10 min; 加入 10 mg/mL 的 RNA 酶 2 μL, 37 °C 水浴 0.5~1 h; 加入 8 μL 20 mg/mL 的蛋白酶 K, 55 °C 水浴 3 h; 加入 500 μL 饱和酚抽提一次; 再加入饱和酚和氯仿各 250 μL 抽提一次; 加入氯仿 500 μL 抽提一次; 加入 20 μL 5 mol/L NaCl, 900 μL 无水乙醇, 放入 -20 °C 40 min。在 4 °C, 12 000 r/min 下离心 10 min, 取沉淀, 然后用 70% 的乙醇洗涤, 自然晾干后加入 100 μL 的 TE 溶解, 4 °C 保存。

#### 1.3 基因组 DNA 酶切和胶回收

基因组 DNA 酶切, 反应体系 50 μL 中包括 2 μL 限制性内切酶 *Sau3* I, 5 μL 10 × Buffer, 100 μg 的 DNA, ddH<sub>2</sub>O 补足 50 μL。37 °C 水浴 3 h, 80 °C 变性 30 min。将酶切产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳后, 用胶 DNA 回收试剂盒 (TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 DV805A TaKaRa) 回收 400~1 200 bp DNA 片段。

收稿日期: 2010-10-11 修回日期: 2010-11-11

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划 (2006AA10A406); 青岛市科技计划项目 (07-2-3-5-jch)

通讯作者: 李健, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

#### 1.4 接头的制备和连接

用单链的寡核苷酸制备接头,每种单链寡核苷酸的浓度均为 10  $\mu\text{mol/L}$ 。本实验采用 Brown 接头:等比例混合两组寡聚核苷酸链 OligoA (5'-GGCCAGAGACCCCAAGCTTCG-3') 和 OligoB (5' (PO<sub>4</sub>)-GATCCGAAGCTTGGGGTCTCTGG-CC-3'), 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 min, 然后缓慢冷却至室温, 最终形成双链接头。建立 20  $\mu\text{L}$  的反应体系(接头 10  $\mu\text{mol/L}$ , 1.5  $\mu\text{L}$ ; T<sub>4</sub> DNA 连接酶 1  $\mu\text{L}$ , 10  $\times$  Buffer 2  $\mu\text{L}$ , 纯化的酶切片段 10  $\mu\text{L}$ , 无菌水补足体积至 20  $\mu\text{L}$ )。16  $^{\circ}\text{C}$  连接过夜。

#### 1.5 连接产物预扩增

用连有接头的 DNA 片段作为模板,寡核苷酸链 OligoA 作为引物,进行 PCR 扩增,创建基因组 PCR 文库。反应体系为(50  $\mu\text{L}$ ):连接产物 12  $\mu\text{L}$ , 10 mmol/L 引物 2  $\mu\text{L}$ , 2.5 mmol/L dNTP 3.2  $\mu\text{L}$ , 10  $\times$  PCR Buffer(含 Mg<sup>2+</sup>) 4  $\mu\text{L}$ , TaKaRa *Taq*(5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.25  $\mu\text{L}$ , 加 ddH<sub>2</sub>O 至 50  $\mu\text{L}$ 。反应程序为 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 45 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  退火 45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 45 s, 25 个循环; 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  再延伸 5 min。反应完毕后用普通 DNA 产物纯化试剂盒(TIANGEN)纯化预扩增产物。

#### 1.6 磁珠富集 SSR

预扩增产物与生物素探针杂交 设计合成生物素探针(AC)<sub>15</sub>, 根据引物分子量计算后加入适量超纯水配制成 10 mmol/L 的使用液。将纯化的预扩增产物和生物素标记的(AC)<sub>15</sub> 探针进行杂交, 杂交总体积为 50  $\mu\text{L}$ : 15  $\mu\text{L}$  20  $\times$  SSC, 0.5  $\mu\text{L}$  10% SDS, 5  $\mu\text{L}$  探针(AC)<sub>15</sub>, 5  $\mu\text{L}$  引物 OligoA, PCR 预扩增产物 13  $\mu\text{L}$ , 无菌水补足体积至 50  $\mu\text{L}$ 。杂交条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  下变性 5 min, 然后在 80  $^{\circ}\text{C}$  下杂交 50 min, 杂交反应在 PCR 仪中进行。杂交产物冷却至室温后加入 300  $\mu\text{L}$  的 TEN<sub>100</sub> (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl, pH 7.5) 溶液。杂交过程中平衡磁珠。

磁珠预处理 取 1 管新鲜有活性的磁珠 (Promega corporation, Madison, WI, USA), 充分摇匀后吸取 1 ~ 2 mg 包有链亲和霉素的磁珠到 1.5 mL 离心管中, 用 300  $\mu\text{L}$  TEN<sub>100</sub> 在室温下洗涤 3 次, 每次洗涤后用磁架固定磁珠, 洗完后用 50  $\mu\text{L}$  TEN<sub>100</sub> 重悬。

磁珠杂交 将加有 300  $\mu\text{L}$  TEN<sub>100</sub> 的杂交混合液加入到经过预处理的磁珠中, 在室温下放

置 30 min, 期间需要不停轻轻搅动和吹打, 避免磁珠沉淀。

非特异 DNA 片段的洗脱 磁珠吸附完毕后, 用磁力架固定磁珠, 移去杂交混合液。首先进行 3 次非严谨性洗脱: 使用 400  $\mu\text{L}$  缓冲液 TEN<sub>100</sub> (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mol/L NaCl, pH 7.5) 于室温下洗涤 PCR 产物-生物素探针-磁珠复合物 3 次, 每次 5 min, 不时搅动和吹打。然后再进行 3 次严谨性洗脱: 使用 400  $\mu\text{L}$  0.2  $\times$  SSC + 0.1% SDS 于室温下洗涤 PCR 产物-生物素探针-磁珠复合物 3 次, 每次 5 min, 不时搅动和吹打。每次洗涤后都用磁力架固定磁珠, 用移液枪将上清液吸走丢弃。最后再用 1  $\times$  SSC 洗脱两次, 除去 SDS。

目的 DNA 片段的洗脱 加入 50  $\mu\text{L}$  TE (pH 8.0), 吸打均匀, 用磁力架固定磁珠后, 迅速吸出上清液, 标记为“1”, 然后再加入 70  $\mu\text{L}$  TE (pH 8.0) 95  $^{\circ}\text{C}$  水浴 5 min。其间不时吹打均匀。用磁力架固定磁珠后, 迅速吸出上清液, 标记为“2”。

目的 DNA 片段扩增与纯化 将目的 DNA 片段进行 PCR 扩增, 扩增体系为: 目的 DNA 片段 5  $\mu\text{L}$ , 10 mmol/L 引物 1  $\mu\text{L}$ , 2.5 mmol/L dNTP 1.6  $\mu\text{L}$ , 10  $\times$  PCR Buffer(含 Mg<sup>2+</sup>) 2  $\mu\text{L}$ , TaKaRa *Taq*(5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.2  $\mu\text{L}$ , 加 ddH<sub>2</sub>O 至 20  $\mu\text{L}$ 。反应程序与预扩增程序一样, PCR 扩增产物经普通 DNA 纯化试剂盒(TIANGEN)纯化后冻存于 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。

#### 1.7 连接 T-载体和克隆

连接反应采用 TaKaRa 的 T 载体试剂盒, 建立 10  $\mu\text{L}$  连接反应体系: 连接酶缓冲液 5  $\mu\text{L}$ , pMD18-T 载体 1  $\mu\text{L}$ , 插入 DNA 片段 2  $\mu\text{L}$ , 加无菌去离子水补足 10  $\mu\text{L}$ , 同时 T 载体自身连接作为对照。16  $^{\circ}\text{C}$  连接 6 h。取 5  $\mu\text{L}$  连接产物加入到 50  $\mu\text{L}$  CaCl<sub>2</sub> 制备的感受态细胞 Top10 中进行转化, 至 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中长出菌落, 得到微卫星基因组文库。挑选单个菌落到盛有 800  $\mu\text{L}$  含有 Amp(100 g/L) 的 LB 液体培养基中, 200 r/min, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 7 h 后, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存作为 PCR 筛选的模板。

以菌落 PCR 检测阳性克隆<sup>[8]</sup>, 20  $\mu\text{L}$  反应体系: 1  $\mu\text{L}$  菌液, 10 mmol/L 引物 1  $\mu\text{L}$ , 2.5 mmol/L dNTP 1.6  $\mu\text{L}$ , 10  $\times$  PCR Buffer(含 Mg<sup>2+</sup>) 2  $\mu\text{L}$ , TaKaRa *Taq*(5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.2  $\mu\text{L}$ , 加 ddH<sub>2</sub>O 至 50  $\mu\text{L}$ 。反应程序与预扩增程序一样。取 2.5  $\mu\text{L}$  产

物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,选取 200 ~ 500 bp 片段进行测序,测序由北京六合华大基因科技股份有限公司完成。

### 1.8 引物设计、筛选与多态性分析

**序列分析** TRF (tandem repeat finder, version 3.21)<sup>[9]</sup> 从得到的序列中查找出含有重复单元的微卫星序列;序列在 chromas 软件上进行峰图分析,去掉载体和接头序列后,在软件 SSRhunter 上查找微卫星位点<sup>[10]</sup>,记录下序列的重复模式 (motif) 和重复次数。具有微卫星重复的序列通过 DNAMAN (version 6.0) 软件进行冗余序列的查找。

**引物设计** 根据微卫星序列两端足够长的侧翼序列用 Primer 5.0 软件设计引物,引物长度为 20 bp 左右,(G+C)% 为 40% ~ 60%, $T_m$  值为 55 ~ 60 °C,产物长度为 50 ~ 400 bp,委托北京六合华大基因科技股份有限公司合成。

**引物筛选** 对设计好的引物进行梯度退火温度筛选,筛选出最佳退火温度。20  $\mu$ L PCR 扩增体系:模板 DNA 3  $\mu$ L,10 mmol/L 引物各 1  $\mu$ L,2.5 mmol/L dNTP 1.6  $\mu$ L,10  $\times$  PCR Buffer (含  $Mg^{2+}$ ) 2  $\mu$ L,TaKaRa Taq (5 U/ $\mu$ L) 0.2  $\mu$ L,加 ddH<sub>2</sub>O 至 20  $\mu$ L。反应程序为 95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 45 s,退火 45 s,72 °C 延伸 45 s,30 个循环;最后 72 °C 再延伸 10 min。以 6 个基因组 DNA 为模板,PCR 筛选其特异性与多态性,并用日本蠅 (32 只莱州湾野生个体) 群体进行验证,扩增产物用 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,硝酸银染色,拍照保存。

**多态性分析** 利用 Genpop 4.0 软件进行数据处理,计算出等位基因数、观测杂合度 ( $H_o$ ) 与期望杂合度 ( $H_e$ ),并进行多态性信息含量 (PIC) 的计算。

多态性信息含量<sup>[11]</sup>:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^m P_i^2 - \sum_{i=1}^{m-1} \sum_{j=i+1}^m P_i^2 P_j^2$$

式中, $P_i$ 、 $P_j$  分别为群体中第  $i$  个和第  $j$  个等位基因频率, $m$  为等位基因数。

## 2 结果与分析

### 2.1 克隆及测序结果

从 (AC)<sub>15</sub> 基因组中随机挑选 970 个克隆,检测阳性克隆率,结果有 369 个克隆为阳性克隆,其重组率为 38.06%。测序 369 个克隆成功获得

321 (86.99%) 个含有微卫星序列的克隆,用 PCR 法筛选日本蠅微卫星序列的部分阳性克隆的电泳图 (图 1)。

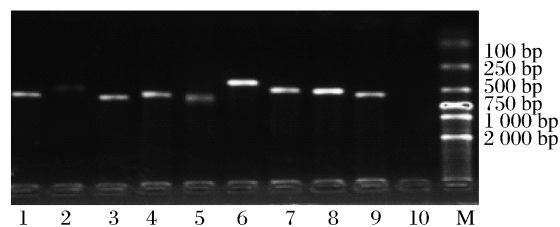


图 1 PCR 扩增检测阳性克隆

Fig. 1 PCR amplification for testing positive cloning

### 2.2 序列分析

321 个阳性克隆中共含有微卫星座位 392 个,其中重复次数小于 10 的序列有 107 个,占 27.30%;重复次数大于 10 小于 20 的 113 个,占 35.20%;重复次数大于 20 的有 101 个,占 31.46%;最高重复次数为 107 次。根据 WEBER<sup>[12]</sup> 提出的标准,将微卫星序列分为 3 类:完美型 (perfect)、非完美型 (imperfect) 和混合型 (compound)。完美型微卫星序列指由不中断的重复单位构成的;非完美型序列指 2 个或 2 个以上的同种重复序列被 3 个碱基以下的非重复序列所间隔;混合型指一种重复序列与其他种类的重复序列被 3 个以下的非重复序列所间隔。在这 259 个重复 5 次以上的 SSR 位点中,完美型微卫星序列 207 个 (80.54%),非完美型 41 个 (15.95%),混合型 11 个 (4.28%) (表 1)。其中完美型微卫星序列占绝大多数,此结果与中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*)<sup>[13]</sup> 等甲壳类动物的微卫星情况相符。在这些微卫星序列中,除了与使用的探针 AC 相同 (互补) 的以 AC/TG 为重复单位的微卫星位点重复外,还有 TC, GA, TCA, AGG, TTGT, GAGT, AGAGAA, GTGAG 等重复单元。

### 2.3 引物设计与筛选

在获得的 259 个重复 5 次以上的微卫星序列中,除了微卫星侧翼序列太短没有设计引物外,其余微卫星序列都用软件 Primer 5.0 设计引物,共设计 102 对引物。PCR 检测筛选出 65 对能扩增出特异性条带的引物,再用 32 个不同日本蠅基因组 DNA 检验其多态性,最终确定 27 对引物具有良好的多态性,可作为日本蠅的分子标记使用 (表 2)。部分扩增结果见图 2。

表 1 日本蟳微卫星各种类型的比列  
 Tab. 1 Percentages of various repeat sequence types of microsatellite in *C. japonica*

| 完美型<br>perfect repeats | 非完美型<br>imperfect repeats | 混合型<br>compound repeats | 重复 repeat numbers |        |        |
|------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------|--------|--------|
|                        |                           |                         | <10               | 10~20  | >20    |
| 207                    | 41                        | 11                      | 107               | 113    | 101    |
| 80.54%                 | 15.95%                    | 4.28%                   | 27.30%            | 35.20% | 31.46% |

表 2 日本蟳微卫星分子标记及其引物序列  
 Tab. 2 Microsatellite markers and their primers sequences from *C. japonica*

| 微卫星标记<br>microsatellite<br>marker | GenBank 注册号<br>GenBank<br>accession number | 引物序列<br>primer sequence(5'-3')                   | 核心序列<br>core sequence | 产物(bp)<br>product size | 退火温度(℃)<br>annealing<br>temperature |
|-----------------------------------|--|--|-----------------------|------------------------|-------------------------------------|
| RBX-01A                           | HQ222591                                   | F:TTCCCATAGCCATACAG<br>R:GTCCGACTTTTCTTTCATTT    | (GT) <sub>35</sub>    | 339                    | 49                                  |
| RBX-04G                           | HQ222595                                   | F:ACTAAGCCTGACTGAAAC<br>R:TATACGTTGACTGACGAT     | (GT) <sub>29</sub>    | 435                    | 53                                  |
| RBX-05I                           | HQ222594                                   | F:CAATGAAGGAGGTAACA<br>R:AGACTCTGAAGACGGAAG      | (AG) <sub>10</sub>    | 118                    | 49                                  |
| RBX-06J                           | HQ222596                                   | F:TTAGGCGTTCTGTGGCT<br>R:CAGCAGGCCGTAGTGAAT      | (GT) <sub>32</sub>    | 268                    | 53                                  |
| RBX-01                            | HQ222562                                   | F:GGTCACGAATCCAGCAAG<br>R:GAAACCAGCACCATCCAC     | (AC) <sub>20</sub>    | 128                    | 54                                  |
| RBX-03                            | HQ222563                                   | F:ATCGTGGGTGGTGTATTT<br>R:AGCTTCGGATCAGTTTGT     | (GT) <sub>18</sub>    | 382                    | 47                                  |
| RBX-64                            | HQ222582                                   | F:CTGTCACGCCGTTCCCTC<br>R:TTCCTCCCCAGTCTTCCT     | (CA) <sub>31</sub>    | 213                    | 45                                  |
| RBX-58                            | HQ222580                                   | F:ATGAATGCTACTGTCCCTG<br>R:CCTTCGCTGTGGTTCTGT    | (CA) <sub>14</sub>    | 327                    | 45                                  |
| RBX-90                            | HQ222590                                   | F:GAGACTGGGTTTATTGGC<br>R:GTGGAGCATCATGGTTTATC   | (CA) <sub>15</sub>    | 158                    | 45                                  |
| RBX-46                            | HQ222575                                   | F:CAACTTGATTTACATCCCGTAC<br>R:CACTTGCATCCTCGCTTC | (TG) <sub>16</sub>    | 129                    | 45                                  |
| RBX-12                            | HQ222565                                   | F:CCCAGCATACCTTTAGTC<br>R:CACAAGTAGGCAAGTTCG     | (AC) <sub>22</sub>    | 433                    | 45                                  |
| RBX-89                            | HQ222589                                   | F:TCTTACCTGGCAGTCAC<br>R:CACCACCTCTTCAACACC      | (AC) <sub>21</sub>    | 348                    | 47                                  |
| RBX-51                            | HQ222576                                   | F:ACCCTGTTTGGAACTCTT<br>R:CTCACTCATTAGGCACCC     | (GT) <sub>30</sub>    | 298                    | 50                                  |
| RBX-38                            | HQ222574                                   | F:AGCCAGACGATACCCTAC<br>R:CACGCAACAGATATGACC     | (GT) <sub>22</sub>    | 416                    | 50                                  |
| RBX-69                            | HQ222583                                   | F:TGATTCAGTCGCCTCATA<br>R:TAACATCTCCTCGCTCCA     | (AC) <sub>37</sub>    | 365                    | 52                                  |
| RBX-56                            | HQ222578                                   | F:AATAATCCGTTTGTCCCTG<br>R:GTGAGCCTGTTGAAGTGT    | (GCGT) <sub>6</sub>   | 371                    | 52                                  |
| RBX-54                            | HQ222577                                   | F:AATGAGAAATGGCTTGTTAG<br>R:GAGGGATGGAGATTAGGG   | (CA) <sub>17</sub>    | 214                    | 52                                  |
| RBX-15                            | HQ222566                                   | F:GAAAGTTGGCAGTGGAGG<br>R:GGAATGCGTTAAATGAGG     | (GT) <sub>16</sub>    | 380                    | 52                                  |
| RBX-17                            | HQ222568                                   | F:GATCAGTTTGTCCAGGTAT<br>R:ATCGTGGGTGGTGTATTT    | (AC) <sub>18</sub>    | 375                    | 52                                  |
| RBX-79                            | HQ222586                                   | F:CGCAAGTAAGTTGGGTGA<br>R:ATGGAACGGATTGAGTGA     | (TG) <sub>20</sub>    | 255                    | 55                                  |

· 续表 2 ·

| 微卫星标记<br>microsatellite<br>marker | GenBank 注册号<br>GenBank<br>accession number | 引物序列<br>primer sequence(5'-3')                    | 核心序列<br>core sequence | 产物(bp)<br>product size | 退火温度(℃)<br>annealing<br>temperature |
|-----------------------------------|--|---|-----------------------|------------------------|-------------------------------------|
| RBX-85                            | HQ222587                                   | F:ACGGCTGGTTGGTCACAT<br>R:CCTCCCTAACTCACTTGCT     | (AC) <sub>26</sub>    | 214                    | 56                                  |
| RBX-09                            | HQ222564                                   | F:CGATGCTTCCAGGCTCTG<br>R:CGGCGGATTATCCCACT       | (GT) <sub>22</sub>    | 231                    | 55                                  |
| RBX-16                            | HQ222567                                   | F:TCGGAGCAGGCAGGTAGA<br>R:GTCCTGGGAGGGCGTAAT      | (GT) <sub>27</sub>    | 390                    | 56                                  |
| RBX-27                            | HQ222572                                   | F:ACTCACTGTTTTCATTGCTCCAT<br>R:CTACTCGCCTCGCATTCC | (CT) <sub>13</sub>    | 393                    | 58                                  |
| RBX-19                            | HQ222569                                   | F:GCGAGCTTTCCTGTCTCTG<br>R:CACTTCCCTTCTCTTCTGT    | (GT) <sub>22</sub>    | 271                    | 58                                  |
| RBX-22                            | HQ222570                                   | F:ATTTTGTCTGGCTGGCTGAT<br>R:GCTAACTCGCCGACCAC     | (GTCT) <sub>4</sub>   | 104                    | 59                                  |
| RBX-73                            | HQ222584                                   | F:CGAGTTGGCGAGTCTTAG<br>R:TTCCTCGTTTCAAGGTAGTC    | (TG) <sub>26</sub>    | 290                    | 45                                  |

注:F. 正向引物;R. 反向引物。

Note:F. Forward primer;R. Reverse primer.



图 2 微卫星 RBX-90 在 32 个日本蠹个体中的扩增图谱

Fig. 2 Amplified allele of microsatellite RBX-90 in 32 individuals of *C. japonica*

#### 2.4 微卫星位点的多态性分析

对具有良好多态性的 27 对引物扩增的数据进行多态性分析,其等位基因数、观测杂合度( $H_o$ )等的统计分析结果如表 3。在 27 个微卫星位点上共获得了 177 个等位基因,平均每个位点扩增得到 6.6 个等位基因,不同引物获得的等位基因数差别比较大的,从 2~12 个不等,其中 RBX-01A、RBX-19、RBX-27 三个位点分别获得了 11、11、12 个等位基因,而 RBX-64、RBX-46、RBX-54 都只有 2 个等位基因。多态信息含量在 0.277 0~0.874 8,根据 BOTSEIN 等<sup>[14]</sup>的分类方法,有 22 个位点的 PIC 值高于 0.5,显示出高度多态性;只有 5 个位点的 PIC 值介于 0.25~0.5,显示出中度多态性,说明所筛选的引物大部分具有高度多态性,同时 PIC 值的高低也反映在  $H_o$  和  $H_e$  上。

### 3 讨论

微卫星 DNA 标记是基于 PCR 技术的第二代

DNA 分子标记,由于其具有多态性丰富、重复性好、共显性标记、易操作等优点,且存在于绝大多数真核生物基因组中<sup>[15]</sup>,因此,近年来发展和应用广泛。作为一种特异引物标记,SSR 标记是必须在物种 DNA 序列已知的情况下才能设计引物进行 PCR 扩增,故 SSR 引物的开发是一个非常关键的问题。

微卫星序列广泛且随机分布于真核生物基因组中,特别是两碱基重复类型(AC)<sub>n</sub> 含量十分丰富,如在鱼类基因组中,以(AC)<sub>n</sub>、(AG)<sub>n</sub> 分布最为广泛<sup>[16]</sup>;中国对虾(*Penaeus chinensis*)中 CT/GA 的含量非常丰富<sup>[17]</sup>。因此本研究所用生物素探针为(AC)<sub>15</sub>,结果绝大部分微卫星序列与探针序列相符,只是重复长度有所差别,这说明 AC/GT 在日本蠹基因组中分布广泛且含量丰富。在日本蠹基因组中除了观察到两碱基重复类型,还有部分的三碱基、四碱基、五碱基重复类型,实验结果表明重复次数大于 10 小于 20 的占 35.20%,

表 3 日本蟳 27 个微卫星座位的多态性评价

Tab. 3 Polymorphism evaluation at 27 microsatellite loci in *C. japonica*

| 微卫星标记<br>microsatellite marker | 等位基因数<br>number of alleles | 等位基因大小(bp)<br>allele size range | 观测杂合度<br>$H_o$ | 期望杂合度<br>$H_e$ | 多态信息含量<br>PIC |
|--------------------------------|----------------------------|---------------------------------|----------------|----------------|---------------|
| RBX-01A                        | 11                         | 322~380                         | 0.687 5        | 0.780 1        | 0.874 8       |
| RBX-04G                        | 9                          | 390~450                         | 0.562 5        | 0.813 6        | 0.850 2       |
| RBX-05I                        | 9                          | 88~121                          | 0.187 5        | 0.645 6        | 0.841 0       |
| RBX-06J                        | 7                          | 230~280                         | 0.812 5        | 0.695 8        | 0.804 8       |
| RBX-01                         | 9                          | 108~140                         | 0.562 5        | 0.716 9        | 0.863 2       |
| RBX-03                         | 6                          | 325~390                         | 0.750 0        | 0.742 6        | 0.770 7       |
| RBX-64                         | 2                          | 210~215                         | 0.500 0        | 0.382 1        | 0.395 0       |
| RBX-58                         | 9                          | 290~345                         | 0.281 3        | 0.664 2        | 0.798 8       |
| RBX-90                         | 5                          | 160~182                         | 0.625 0        | 0.521 2        | 0.580 9       |
| RBX-46                         | 2                          | 120~128                         | 0.468 8        | 0.412 6        | 0.386 0       |
| RBX-12                         | 6                          | 408~447                         | 0.375 0        | 0.460 8        | 0.514 7       |
| RBX-89                         | 6                          | 360~380                         | 0.687 5        | 0.648 6        | 0.742 9       |
| RBX-51                         | 7                          | 297~328                         | 0.250 0        | 0.615 6        | 0.705 1       |
| RBX-38                         | 3                          | 394~415                         | 0.312 5        | 0.260 8        | 0.306 5       |
| RBX-69                         | 3                          | 95~110                          | 0.468 8        | 0.481 8        | 0.498 6       |
| RBX-56                         | 5                          | 364~407                         | 0.437 5        | 0.652 8        | 0.716 2       |
| RBX-54                         | 2                          | 220~225                         | 0.281 3        | 0.285 5        | 0.277 0       |
| RBX-15                         | 5                          | 358~395                         | 0.500 0        | 0.555 2        | 0.708 9       |
| RBX-17                         | 5                          | 325~383                         | 0.812 5        | 0.725 6        | 0.751 6       |
| RBX-79                         | 8                          | 250~300                         | 0.750 0        | 0.645 6        | 0.748 1       |
| RBX-85                         | 5                          | 205~218                         | 0.406 3        | 0.543 8        | 0.732 1       |
| RBX-09                         | 9                          | 210~260                         | 0.468 8        | 0.732 5        | 0.792 3       |
| RBX-16                         | 8                          | 300~350                         | 0.500 0        | 0.673 9        | 0.751 3       |
| RBX-27                         | 12                         | 348~410                         | 0.437 5        | 0.631 3        | 0.857 1       |
| RBX-19                         | 11                         | 225~292                         | 0.625 0        | 0.690 7        | 0.864 4       |
| RBX-22                         | 9                          | 78~115                          | 0.468 8        | 0.707 0        | 0.817 8       |
| RBX-73                         | 4                          | 275~310                         | 0.468 8        | 0.381 7        | 0.459 0       |

重复次数大于 20 的占 31.46%,说明日本蟳基因组中存在不少较长的微卫星片断。由于本实验采用的探针类型仅为(CA)<sub>15</sub>这一种探针,而且经测序的克隆数也较少,因此对日本蟳微卫星的分布特征和规律的认识有一定局限性,要想对日本蟳微卫星的分布特征和规律有一个全面充分的认识,需要同时采用更多类型的探针,并且需要挑取大量的克隆进行测序。

本实验筛选的阳性克隆率为 38.06%,优于同类其他实验。魏东旺等<sup>[18]</sup>使用常规方法筛选微卫星序列其效率仅为 2.25%,鲁翠云等<sup>[19]</sup>的筛选效率为 1.25%,李琪等<sup>[20]</sup>在皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)的研究中报道为 13.1%。这说明富集法制备微卫星的效率可以通过改进实验方法

来提高。高质量基因组 DNA 的获得、接头连接效率和连接产物的纯化效果都影响到后面扩增和载体连接等步骤。但最关键的一步还是磁珠富集效率和特异性,它直接影响微卫星序列获得的效率。磁珠富集法的最大障碍是不含 SSR 的 DNA 也被吸附到磁珠表面或与 SSR 探针非特异结合,杂交的温度、DNA 及探针的纯度也是影响杂交特异性的重要因素。

我们对菌落 PCR 筛选出的 369 个阳性克隆进行测序,成功获得 321(86.99%)个含有微卫星序列的克隆。这种方法通过一次 PCR 扩增即可从大量转化子中筛选出含微卫星的阳性克隆,操作简单快捷,成本较低,准确性高,同时避免了同位素污染环境,危害人体等缺点<sup>[21]</sup>,非常适合大

量微卫星序列的筛选。但是 PCR 法过于灵敏,经常会出现非特异性扩增条带,要减少非特异性条带的产生可通过改善 PCR 的条件或通过设立阴性克隆的对照来筛选。有研究者认为,微卫星富集法虽然使阳性克隆率提高,但获得有用序列的概率并不高<sup>[22]</sup>。经常是由于插入片段过短、侧翼序列太短或二级结构过多,不足以设计高质量的引物。从本次实验来看,该结论成立。本实验共获得 259 个重复 5 次以上的微卫星序列,只可设计出 102 对引物。

多态信息含量(PIC)能反映出某个标记所包含或所提供的遗传信息容量,当  $PIC > 0.5$  时,表明该标记可提供丰富的遗传信息;当  $0.25 < PIC < 0.5$  时,表明该标记可提供较为合理的遗传信息;当  $PIC < 0.25$  时,表明该标记可提供的遗传信息较差<sup>[23]</sup>。本研究中的 27 个微卫星位点 PIC 均大于 0.25,且大部分为高度多态性位点,因此这些位点可为日本鳎遗传学分析提供有效的依据。杂合度的高低反映了群体在多个基因上的遗传变异及群体遗传多样性丰富度。由表 3 可知, $PIC > 0.5$  的 22 对引物的  $H_o$  为 0.187 5~0.812 5,  $H_e$  为 0.260 8~0.813 6;  $0.25 < PIC < 0.5$  的 5 对引物的  $H_o$  为 0.312 5~0.500 0,  $H_e$  为 0.260 8~0.481 8,表明日本鳎具有较高的遗传多样性。结果分析发现有 7 个位点的  $H_o$  和  $H_e$  存在较大差异,可能是由这 7 个位点的无效等位基因引起的。微卫星在进行 PCR 扩增时偶尔会出现无效等位基因(null allele)的现象,即无特异性的扩增产物,这可能是微卫星引物的结合部位的点突变、插入或缺失阻碍微卫星的扩增<sup>[24]</sup>导致的。

本实验构建了部分日本鳎基因组文库,对设计合成的 102 对引物进行筛选,最终获得了特异性强,多态性良好的 27 对微卫星分子标记,为揭示日本鳎的种群多样性以及遗传连锁图谱的构建、QTL 定位及对其进行更深入地研究提供了基础资料。

#### 参考文献:

- [1] 俞存根,宋海棠,姚光展. 东海日本鳎的数量分布和生物学特性[J]. 上海水产大学学报,2005,14(1):40-45.
- [2] 王兴强,阎斌伦,曹梅. 日本鳎生物学及其养殖研究进展[J]. 河北渔业,2005,1:16-18.
- [3] 鄂春宇,许方学. 日本鳎人工育苗技术初探[J]. 河北渔业,2006,4:38-39.
- [4] 许星鸿,徐家涛,阎斌伦,等. 日本鳎人工育苗技术[J]. 中国水产,2009,2:48-49.
- [5] DIB C, FAURE S, FIZAMES C, *et al.* A comprehensive genetic map of the human genome based on 5 624 microsatellites[J]. *Nature*,1996,380(6570):152-154.
- [6] 胡雪松,李池陶,马波,等. 3 个德国镜鲤养殖群体遗传变异的微卫星分析[J]. 水产学报,2007,31(5):575-582.
- [7] 宋红梅,白俊杰,叶星,等. 罗非鱼微卫星 DNA 指纹图谱的构建[J]. 水产学报,2009,33(3):357-363.
- [8] SKINNER D D, DENOYA C D. Simple DNA polymerase chain reaction method to locate and define orientation of specific sequences in cloned bacterial genomic fragments[J]. *Microbios*,1993,75:125-129.
- [9] BENSON G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences[J]. *Nucleic Acid Research*,1999,27(2):573-580.
- [10] 李强,万建民. SSRHunter,一个本地化的 SSR 位点搜索软件的开发[J]. 遗传,2005,27(5):808-810.
- [11] BRENNER S, ELGAR G, SANDFORD R, *et al.* Characterization of the pufferfish(Fugu) genome as a compact model vertebrate genome[J]. *Nature*,1993,336:256-259.
- [12] WEBER J L. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub>-(dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms[J]. *Genomics*,1990,7:524-530.
- [13] 毛瑞鑫,鲁翠云,刘福军,等. 中华绒螯蟹部分基因组文库构建和微卫星位点的筛选[J]. 上海海洋大学学报,2009,18(2):130-135.
- [14] BOTSEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. *American Journal of Human Genetics*,1980,32:314-331.
- [15] TAUTZ D, RENZ M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes[J]. *Nucleic Acids Research*,1984,12(10):4127-4138.
- [16] 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.
- [17] 高焕,刘萍,孟宪红,等. 中国对虾基因组微卫星特征分析[J]. 海洋与湖沼,2004,35(5):424-431.

- [18] 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.
- [19] 鲁翠云,孙效文,梁利群,等. 鳙鱼微卫星分子标记的筛选[J]. 中国水产科学,2005,12(2):192-196.
- [20] 李琪. 皱纹盘鲍微卫星研究进展[J]. 中国海洋大学学报,2004,34(3):365-370.
- [21] 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.
- [22] 李明芳,郑学勤. 开发SSR引物方法之研究动态[J]. 遗传,2004,26(5):769-776.
- [23] 梁利群,常玉梅,董崇智,等. 微卫星DNA标记对乌苏里江哲罗鱼遗传多样性分析[J]. 水产学报,2004,28(2):241-244.
- [24] EDE A M, CRAWFORD A M. Mutations in the sequence flanking the microsatellite at the KAP8 locus prevent the amplification of some alleles[J]. Anim Genet,1995,26:43-44.

## Microsatellite-enriched library construction and polymorphic microsatellite marker isolation in *Charybdis japonica*

SONG Chun-ni<sup>1,2</sup>, LI Jian<sup>1\*</sup>, LIU Ping<sup>1</sup>, CHEN Ping<sup>1</sup>, GAO Bao-quan<sup>1</sup>

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. College of Aqua-life Science and Technology, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

**Abstract:** The method of magnetic bead hybridization enrichment was used to screen the microsatellite molecular markers of *Charybdis japonica*. Genomic DNA of *Charybdis japonica* was extracted and digested with restriction enzyme *Sau3A I*. The fragments of 400 – 1 200 bp were recycled and purified. DNA fragments which containing microsatellite sequence were screened with (AC)<sub>15</sub> oligonucleotide probe and connected to pMD18-T vector. Genomic library contained the microsatellite sequence was constructed. Positive clones were isolated with PCR method and sequencing. After sequence analysis on 369 positive clones randomly picked from 970 colonies, 321 (86.99%) of the colonies were found to contain microsatellite sequences. Among the 321 microsatellites, 80.54% were perfect, 15.95% were imperfect and 4.28% turned out to be compound. From the primers designed for the 102 microsatellite loci, 65 could amplify expected PCR products and 27 were found to be polymorphic. The results of this work may contribute to future studies of *Charybdis japonica* molecular genetic breeding.

**Key words:** *Charybdis japonica*; microsatellite; magnetic bead hybridization enrichment

**Corresponding author:** LI Jian. E-mail: lijian@ysfri.ac.cn