

文章编号: 1000- 0615(2005)03- 0323- 04

微卫星标记在坛紫菜丝状体品系 DNA 指纹构建中的应用

刘必谦¹, 曾庆国², 骆其君¹, 周湘池¹

(1. 宁波大学海洋生物工程重点实验室, 浙江 宁波 315211; 2. 宁波海洋与渔业研究院, 浙江 宁波 315012)

摘要: 用从条斑紫菜 EST 数据库中筛选合成的微卫星引物对 8 个坛紫菜丝状体品系进行微卫星 DNA 指纹扩增。5 个微卫星引物共扩增出 32 条带, 其中 3 对引物所扩增出的 5 个条带 (AU192094- 127、AU187410- 335、AU187410- 190、AU194267- 203 和 AU194267- 328) 被用来构建 8 个坛紫菜丝状体品系的 DNA 指纹。在这个图谱中, 每个丝状体品系都有唯一的指纹模式, 彼此很容易被区分开。所获得的 DNA 指纹图谱, 可用来进行孟德尔分离研究, 及为坛紫菜纯系鉴定提供分子基础。

关键词: DNA 指纹; 微卫星标记; 坛紫菜; 丝状体

中图分类号: Q943 文献标识码: A

Establishment of the DNA fingerprint of *Porphyra haitanensis* filament lines with microsatellite markers

LIU Bi-qian¹, ZENG Qing-guo², LUO Qi-jun¹, ZHOU Xiang-chi¹

(1. Provincial Key Lab of Marine Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. The Institute of Ocean and Fishery of Ningbo, Ningbo 315012, China)

Abstract: As a high polymorphic and codominant molecular marker, microsatellites, or simple sequence repeats (SSRs) have been used widely in genetic researches such as genetic maps construction and population polymorphism research. In *Porphyra*, no effort was devoted to the utilization of microsatellite marker. The biggest obstacle of microsatellite marker is the availability of interested microsatellite loci. One of the most convenient methods for obtaining microsatellite loci is to search the public database. In former work, online BLAST software was used to isolate all the di- nucleotide and tri- nucleotide microsatellite loci from the Genbank dbEST of *Porphyra yezoensis*. Total of 211 non-redundant microsatellite loci, amounted to 1.01% of the dbEST, were exploited from 20 979 EST sequences. Among these microsatellite sequences, 35 dinucleotide microsatellite repeats which core-unit repeats not less than 7 and 176 trinucleotide microsatellite which repeat numbers no less than 5 were isolated. Then some loci were selected out to design primers at the flanking regions according to the followed criteria: primer length within 20 ± 2 bp, GC content between 50% and 75%, melting temperature between 50°C and 65°C, expected product size between 100 and 300bp and without a secondary structure. 15 microsatellite primer pairs were synthesized and inter- species amplified on 8 filament lines of *Porphyra haitanensis*, the primer pairs which produced distinct amplified bands were selected out. In this research, total 32 bands were amplified by 5 microsatellite primer pairs in 8 filament lines of *P. haitanensis*. Among them, 5 bands (AU192094- 127, AU187410- 335, AU187410- 190, AU194267- 203, AU194267- 328 note: the former was the name of primer, latter was the molecular weight of selected bands) were chosen to construct the DNA fingerprinting of 8 filament lines. For the rest two primer pairs of AV435669 and AV432452, multiple band pattern and false positive (microsatellite repeats were absent from the amplification bands) problems might exist in the inter- species amplification, so the amplified bands of these two primer pairs were excluded from the fingerprint construction. In the constructed DNA fingerprint, each filament line has its unique fingerprint pattern and can be easily distinguished from each other. According to this fingerprint, researchers can trace the genetic background of descendant blades which germinated from 8 filament lines. Besides, the molecular fingerprint can overcome the disability of morphological identification, which was susceptible to the environment affection. In addition, the co- dominant of microsatellite marker made it possible to study the Mendel segregation so as to identify the

收稿日期: 2005-04-18

资助项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 49976030)

作者简介: 刘必谦 (1960-), 男, 湖南祁阳人, 博士, 副研究员, 主要从事海洋生物遗传及分子生物学研究。Tel: 086- 0574- 87600556;

E-mail: lbqhy@163.com

pure line filaments of *Porphyra haitanensis*. The fingerprint can also be used to confirm the stage of meiosis during the life history of *P. haitanensis*, for this purpose, the microsatellite primer should not have the problems of multiple bands and false positive problems, and the microsatellite locus of this primer is heterozygosis. In summary, this paper just built a molecular basis for the future genetic research of *Porphyra haitanensis*.

Key words: DNA fingerprint; microsatellite marker; *Porphyra haitanensis*; filament

紫菜(*Porphyra*)在分类学上属于红藻门,是一种全球分布的经济养殖海藻。根据联合国粮农组织的数据,2000年全球紫菜产量达1010963 t^[1],产值达到20亿美元,其中中国和日本是两个产量最大的国家,2000年我国紫菜产量为48159 t^[2]。紫菜养殖已成为沿海一些地区农户经济收入的主要来源。

同陆地栽培农作物一样,紫菜栽培也存在着品系鉴定问题。到目前为止,形态学的一系列方法仍广泛应用于藻类种质鉴定中^[3]。但由于绝大多数形态学特征易受环境因素的影响,不能完全反映品系内在的遗传性质,且紫菜丝状体从形态学上难以区分不同的品系。这就需要运用DNA标记技术,通过分析不同品系的DNA指纹图谱来进行种质鉴定。许多分子标记已被用来进行DNA指纹研究,其中包括RFLP^[4]、RAPD^[5]、AFLP^[6]、ISSR^[7]、SSR^[8-10]以及23S rRNA^[11]等。在这些DNA指纹构建方法中,微卫星标记(microsatellite或simple sequence repeat, SSR)由于具有多态性高和可重复性好的特点,已被广泛应用于养殖品系的鉴定中。另外,微卫星标记的共显性在多倍体检验和孟德尔分离(Mendel segregation)研究中具有其他分子标记所不具有的优势。

目前已发表的藻类DNA指纹研究的文献,包括用RAPD标记构建海带配子体DNA指纹^[12]和对5种紫菜的15个丝状体系的RAPD标记DNA指纹构建^[13]等。在本研究中,用条斑紫菜(*P. yezoensis*)的微卫星引物来建立8种坛紫菜丝状体品系的指纹图谱,从而为坛紫菜(*P. haitanensis*)的种质鉴定建立分子基础,同时探讨微卫星标记在坛紫菜品系研究中的进一步应用。

1 材料与方法

1.1 丝状体系及DNA提取

实验用的8个坛紫菜丝状体品系取自宁波大学海洋生物工程重点实验室藻种室,它们的叶状体分别具有不同的优良性状,依次标记为PHF-

1、PHF-2、PHF-3、PHF-4、PHF-5、PHF-6、PHF-7、PHF-8。丝状体DNA提取仿CTAB方法^[14]。提取的DNA在0.8% agarose胶上电泳,Kodak凝胶成像系统拍照并测定DNA的分子量和浓度。

1.2 引物设计

从Genbank的条斑紫菜EST(Expressed sequence tag, EST)数据库中筛选出包含有微卫星重复的EST序列,选取一些序列用引物设计软件Primer Premier(version 5.0)进行引物设计。引物设计:长度为20±2 bp,GC含量为50%~75%,TM值为50~65℃,期望产物长度为100~300 bp,引物内不出现发夹等二级结构。共设计出引物15对,委托上海生工公司合成。

1.3 PCR扩增及电泳

除坛紫菜丝状体样本外,以条斑紫菜样本作为阳性对照,不加模板的作为阴性对照。PCR反应体积为25 μL,反应成份包括:10×PCR buffer 2.5 μL,25 mmol·L⁻¹ Mg²⁺ 2.0 μL,2.0 μmol·L⁻¹ dNTPs,1U TaqDNA聚合酶,微卫星正向引物和反向引物各40 pmol,模板DNA 5~10 ng。PCR反应在Perkin Elmer 2400扩增仪上进行,94℃变性5 min,接下来35个循环为94℃变性30 s;退火30 s,退火温度依引物而异;72℃延伸1 min。扩增产物4%琼脂糖凝胶电泳,EB染色。各重复一次PCR。

1.4 图像处理与DNA指纹构建

经Kodak electrophoresis documentation and analysis system 120数字成像系统记录实验结果,并进行图像处理及带型分析。以1(有泳带)和0(无泳带)记录每个样品的扩增模式,每条泳带的分子量由凝胶成像系统算出。选取扩增清晰的条带建立DNA指纹,构建方法参照文献[15]。

2 结果与讨论

用设计出的15对微卫星引物对坛紫菜8个丝状体品系进行引物种间转移扩增,其中5对(表1)引物可以得到理想的扩增产物,共得到32条带。每个引物的扩增条带数目从4到10条不等,平均每个引物扩增出6.4条片段。实验过程中每

个引物对都重复两次, 以保证扩增条带的可靠性。

表 1 微卫星引物信息

Tab. 1 The information of applied microsatellite primers

Genbank 编号重复形式 accession no. repeat motif	序 列 sequence	退火温度(°C) annealing temperature	期望长度(bp) expected length	阳性对照条带长度(bp) positive control bands
[AV435669 (AG) 28]	TCTTG TTCCT TGACG ACTGG GATGG TGGCA GTGGC AGATG	57.9	253	477/ 181
[AV432452 (ACA) 25]	CCAAC GATGG GTTTC TTCAA ACTTC ATGCC CCTGC CGATG	57.0	300	597/ 145
[AU194267 (TGG) 5]	GCCCA CGCAA GTGTT TACCC GGAAA GTATG TTGTC GGTGC GG	56.5	186	203
[AU187410 (ACG) 5]	AGCCC GTTGG CGAAA TCC TACTG GGTG CTGTG CTCTG TT	61.0	177	177
[AU192094 (AGC) 8]	CGTCG CTTCC GTCGC TGTCT TAGTT GGTGT TGTGC GTTGA	57.0	197	212

注: 引物序列上排为正向引物序列 5' - 3', 下排为反向引物序列 3' - 5' (从左到右); 阳性对照为条斑紫菜引物扩增条带大小

Notes: sequences message: upper is direct primer sequence (5' - 3'), lower is reverse primer sequence (3' - 5') (from left to right); positive control is the amplification bands of *Porphyra yezoensis*

5 个可重复的微卫星条带被用来进行 8 个坛紫菜丝状体品系的指纹分析。这 5 个条带由引物 AU192094、AU187410 和 AU194267 扩增所得(分别为图 1 的 1、2 和 3), 它们是: AU192094- 127、AU187410- 335、AU187410- 190、AU194267- 203、AU194267- 328。依据上述结果构建了 DNA 指纹模式(图 2)。在这个模式中, 每个位点是根据所用的引物和扩增片段大小所确定的。实验中的坛紫菜 8 个丝状体品系各自具有自己特有的指纹, 所以这 3 个引物对可以用于区分本研究的 8 个坛紫菜丝状体品系。对于引物 AV435669 和 AV432452, 阳性对照和坛紫菜丝状体扩增条带的分子量都远高于引物设计的期望长度(图 3), 所以没有选用它们构建 DNA 指纹。

在植物遗传研究种中, 微卫星标记最初被用于谷类物种品系鉴定。近年随着越来越多物种的微卫星引物被开发, 微卫星标记应用扩大到包括番茄^[8]、苹果^[16]、天竺葵^[17]和山杨^[18]等多物种中。在这些研究中, 微卫星标记表现出较高的多态性: Dayanandan 用四个微卫星引物对就可区分白杨的 34 个品系, 只有两个品系没有被区分开^[18]; Becher 用 3 个引物就可很好区分 44 个天竺葵品系^[17]。

在本实验中, 微卫星引物 AU187410 和 AU194267 所扩增出的 4 个条带构建的指纹, 还不能区分 8 个坛紫菜丝状体品系。同上述文献相比, 位点多态性相对较低, 这可能与所用的微卫星引物的来源有关。

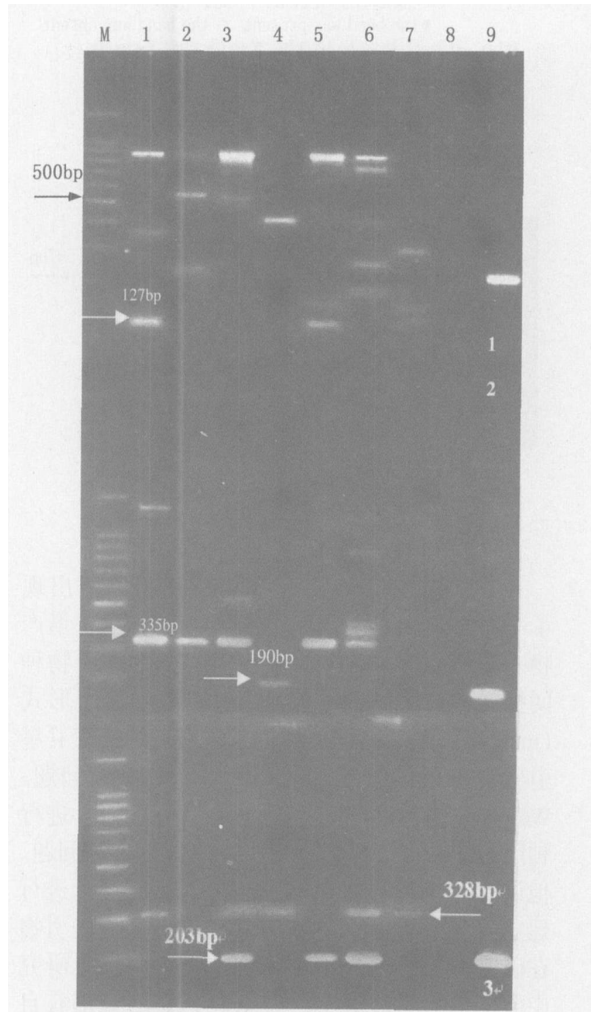


图 1 引物 AU192094(1)、AU187410(2) 和引物 AU194267(3) 扩增结果

Fig. 1 The amplification results of primer AU192094 (1), AU187410 (2), AU194267 (3) 箭头所示为所选用的条带。各泳道从左到右为: mark, 丝状体系 1 到 8, 9 为条斑紫菜的阳性对照
Arrows indicate the selected bands. From left to right is: mark, 1 to 8 were filament lines, 9 was the positive control of *P. yezoensis*

实验所用微卫星引物来自 Genbank 中条斑紫菜 EST 数据库, EST 是从 cDNA 文库随机挑选的克隆进行测序所获得 cDNA 的 5 或 3 端序列。同基因组序列信息来源的微卫星相比, EST 微卫星位点在种间(甚至在属间)具更高的保守性, 表现为扩增产物的多态性信息含量(PIC)低。因此, 从基因组 DNA 序列中筛选出的微卫星, 其信息量要比来自 EST 的丰富。但在物种基因组序列信息缺乏的情况下, EST 也不失为一个好的微卫星信息源。

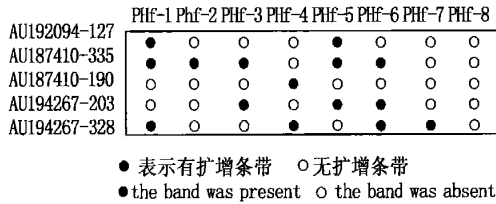


图 2 8 个坛紫菜丝状体品系的微卫星 DNA 指纹

Fig. 2 Microsatellite DNA fingerprint of 8 filament lines of *P. haitanensis*

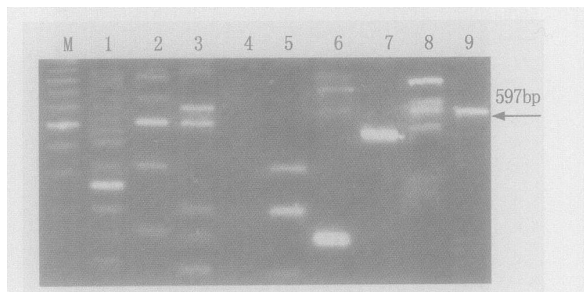


图 3 AV 432452 扩增结果(有高分子量带出现)

Fig. 3 The amplification of primer AV432452 (high molecular bands appeared)

引物 AV435669 和 AV432452 在扩增中出现了一些高分子量的条带, 可能的原因是: 1) 扩增产物中出现了 cDNA 中不含有的内含子, 2) 引物种间扩增出现的假阳性(false positive) 或多带形式(multiple bands pattern)。Fisher^[19] 研究了微卫星引物扩增可能出现的多带问题和假阳性问题。Westman 在用拟南芥的微卫星引物在芸苔上进行种间引物转移扩增时, 分析了多带和假阳性问题。他认为, 出现上述问题的微卫星引物不适于进行建立微卫星突变模式上的遗传研究, 但这些引物在确定了相关的性质后可以应用到育种等研究中^[20]。在本实验 8 个坛紫菜丝状体品系都有自己独特指纹的情况下, 所以不再选用这两个引物。

坛紫菜生活史中存在着二倍体的丝状体和单倍体的叶状体两个阶段, 通过比较亲代二倍体丝状体和子代单倍体叶状体的指纹异同, 可以判断基因位点的孟德尔分离。在紫菜纯系培育中, 公认的方法是用单倍体叶状体组织块培育出二倍体

的丝状体, 后者再作为纯系保种。但由于紫菜叶片是嵌合的, 这种丝状体纯系要经过多代选育。可以结合微卫星标记检验技术, 对紫菜纯系进行鉴定。

参考文献:

- [1] FAO. Yearbook of fisheries statistics: summary table. FAO, Rome, 2000.
- [2] 农业部渔业局统计资料[EB/OL]. 2000. <http://www.cnfm.gov.cn/tongji/result.asp>.
- [3] 费修隼. 红藻类细胞工程育种和育苗[M]. 山东: 山东科学技术出版社, 1998. 50-90.
- [4] Viti C, Giovannetti L, Granchi L, et al. Species attribution and strain typing of *Oenococcus oeni* (formerly *Lel conostoc oenos*) with restriction endonuclease fingerprints [J]. Res Microbial, 1996, 147: 651-660.
- [5] Stoeck T, Schmidt H J. Fast and accurate identification of European species of the *Paramecium aurelia* complex by RAPD-fingerprints [J]. Microb Ecol, 1998, 35: 311-317.
- [6] Barcaccia G, Albertini E, Tavoletti E, et al. AFLP fingerprinting in *Medicago* spp: Its development and application in linkagemapping [J]. Plant Breeding, 1999, 118: 335-340.
- [7] 宣继萍, 章镇, 房经费, 等. 苹果品种 ISSR 指纹图谱构建[J]. 果树学报, 2002, 19(6): 421-423.
- [8] Bredemeijer G M M, Arens P, Wouters D, et al. The use of semi-automated fluorescent microsatellite analysis for tomato cultivar identification [J]. Theor Appl Genet, 1998, 97: 584-590.
- [9] Hansson B, Bensch S, Hasselquist D, et al. Increase of genetic variation over time in a recently founded population of great reed warblers (*Acrocephalus arundinaceus*) revealed by microsatellites and DNA fingerprinting [J]. Molecular Ecology, 2000, 9: 1529-1538.
- [10] 于永红, 李云海, 马荣荣, 等. 用微卫星 DNA 标记建立宁 2A 的指纹图谱[J]. 中国水稻科学, 2001, 15(3): 215-217.
- [11] Momol E A, Burr T J, Reid C L, et al. Genetic diversity of *Agrobacterium vitis* as determined by DNA fingerprint of the 5'-end of the 23s rRNA gene and Random Amplified Polymorphic DNA [J]. Journal of Applied Microbiology, 1998, 85: 685-692.
- [12] Xiu L W, Yang Y X, Cong Y Z, et al. DNA fingerprinting of selected *Laminaria* (Phaeophyta) gametophytes by RAPD markers [J]. Aquaculture, 2004, 238: 143-153.
- [13] Wang B, Jia J H, Shi J F, et al. Identification of *Porphyra* lines using computerize DNA fingerprinting [J]. Acta Oceanologica Sinica, 2001, 20(3): 401-407.
- [14] 王勇, 裴鲁青, 骆其君, 等. 紫菜丝状体 DNA 的提取[J]. 海洋学报, 2002, 24(2): 146-148.
- [15] 马轩, 杜雄明, 孙君灵. 18 个彩色棉系的 SSR 指纹分析[J]. 植物遗传资源学报, 2003, 4(4): 305-310.
- [16] Gianfranceschi L, Seglias N, Tarchini R, et al. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple [J]. Theor Appl Genet, 1998, 96: 1069-1076.
- [17] Becher S A, Steinmetz K, Weising K, et al. Microsatellites for cultivar identification in *Pelargonium* [J]. Theor Appl Genet, 2000, 101: 643-651.
- [18] Dayanandan S, Rajora O P, Bawa K S. Isolation and characterization of microsatellites in trembling aspen (*Populus tremuloides*) [J]. Theor Appl Genet, 1998, 96: 950-956.
- [19] Fisher P J. Characteristics of single- and multi-copy microsatellites from *Pinus radiata* [J]. Theor Appl Genet, 1998, 96: 969-979.
- [20] Westman A L, Kresovich S. The potential for cross-taxa simple sequence repeat (SSR) amplification between *Arabidopsis thaliana* L. and crop brassicas [J]. Theor Appl Genet, 1998, 96: 272-281.