

文章编号: 1000-0615(2006)02-0192-05

仿刺参的微卫星标记

战爱斌^{1,2}, 包振民¹, 陆维¹, 汪小龙¹, 胡景杰¹

(1. 中国海洋大学生命科学与技术学部海洋生物遗传与种质工程实验室, 山东 青岛 266003;

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: 为了评价种质资源及基础生物学研究的需要, 本文开发了仿刺参的微卫星标记。NCBI 数据库中共有 20 个含有仿刺参微卫星的序列, 从中选取 8 个设计引物, 发现 6 个微卫星位点多态性。不同的引物获得的等位基因数为 3~9 个不等, 6 个位点共获得了 31 个等位基因, 每个位点平均获得 5.2 个等位基因。6 个位点的平均观测杂合度 (H_o) 为 0.3611, 平均期望杂合度 (H_e) 为 0.6402。位点 AJMS004 提供的多态性信息含量值较低, 为 0.4862; 其他 5 个位点均在 0.5 以上。另外, 还尝试了红海参 (*Parastichopus californicus*) 微卫星标记在仿刺参的通用性。实验结果表明, 在较高的退火温度下, 5 对引物均能扩增仿刺参的基因组 DNA 并具多态性。5 个位点共获得了 22 个等位基因, 每个位点平均获得 4.4 个等位基因。5 个位点的平均观测杂合度 (H_o) 为 0.1733, 平均期望杂合度 (H_e) 为 0.4201。其中位点 Psc 2 的多态性信息含量值最高, 为 0.8500。

关键词: 仿刺参; 微卫星标记; 多态性; 通用性

中图分类号: S917 **文献标识码:** A

Microsatellite markers of *Apostichopus japonicus*

ZHAN Ai-bin^{1,2}, BAO Zhen-min¹, LU Wei¹, WANG Xiao-long¹, HU Jing-jie¹

(1. Laboratory of Marine Genetics and Breeding, Division of Life Science and Biotechnology,
Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

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

Abstract: Sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) is regarded as a tonic food and traditional medicine in China. In order to aid in investigation of the population structure and marker assisted breeding, 11 microsatellite markers were developed and evaluated with sixty individuals caught from the offing in Shandong Province, China. In the NCBI database, 20 sequences of *Apostichopus japonicus* were found to contain microsatellites when data mining was performed. Eight microsatellite-containing sequences were chosen for designing the PCR primers. The results showed that six primer pairs successfully amplified scorable PCR products and revealed polymorphism with 5.2 alleles per locus. The locus AJMS007 had the greatest number of alleles (9), while the locus AJMS004 had the lowest number of alleles (3). The average H_o and H_e values of six loci were 0.3611 and 0.6402, respectively. PIC value was 0.4862 for locus AJMS004, and more than 0.5 for the other five loci. Five microsatellite markers developed and characterized in *Parastichopus californicus* were used to assess for transferability analysis in *Apostichopus japonicus*. The results showed that all the five primer pairs could amplify clear and scorable PCR products with expected size in *Apostichopus japonicus*. A total of 22 alleles were obtained for the five loci, with 4.4 alleles per locus. The locus Psc 2 had the greatest number of alleles (9) and the locus Psc 3 had the lowest number of alleles (2). The average H_o and H_e values of the five transferred loci were 0.1733 and 0.4201, respectively. And Psc 2 showed the highest PIC value of 0.8500.

收稿日期: 2005-07-20

资助项目: 国家自然科学基金(30571417); 中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室开放课题(200426)资助

作者简介: 战爱斌(1980-), 男, 山东莱州人, 博士研究生, 主要从事海洋生物分子遗传学与遗传育种学研究。Tel: 0532-82032059, E-mail: zhanaiabin@hotmail.com

通讯作者: 胡景杰, E-mail: hujingjie@ouc.edu.cn

Key words: *Apostichopus japonicus*; microsatellite markers; polymorphism; transferability

仿刺参(*Apostichopus japonicus*)是食用海参中最为名贵的一种,自然分布于我国北方、日本、朝鲜半岛及俄罗斯的远东地区^[1]。由于经济价值高,近几年来仿刺参的人工养殖及放流增殖发展迅猛,据山东海洋与渔业厅统计,2004年山东养殖面积达 $2.6 \times 10^4 \text{ hm}^2$,产值70亿元,占水产养殖总产值的1/3^[2]。为了尽快掌握群体结构及其种质资源状况,从而制定和实施更科学合理的渔业管理政策,促进养殖业的健康发展,有必要对仿刺参的遗传背景进行深入的研究。

近年来飞速发展的分子标记技术为研究个体的遗传特性、种群遗传结构、不同种群遗传多样性和亲缘关系,进而评价种质资源提供了有力的工具。微卫星DNA(microsatellite DNA)也称简单串联重复序列(simple sequence repeats, SSRs),由于多态性高、稳定性高、特异性高、共显性遗传、检测快捷,广泛地用于遗传连锁图的构建、基因的定位与克隆、遗传多样性研究、亲权分析、品种鉴定、农作物及动物育种、进化研究等领域^[3],因而已经发展成为当前主流的分子标记之一。

近几年来,国外一些学者通过线粒体DNA、RAPD和同工酶分析,研究了海参的遗传多样性、种群结构及种群间的基因流^[4-8],并指出异地亲本培育的幼体在放流时,应充分考虑对当地种群遗传结构的影响。研究还表明,同工酶标记数量有限,多态性较低,不适宜用作精细的遗传学分析^[9-11]。为了研究仿刺参种群(群体)遗传多样性及保护种质资源,开发微卫星标记就显得更为迫切。本文参照GenBank上仿刺参的相关序列设计了8对微卫星引物,对仿刺参微卫星位点的多态性进行研究;另外,还尝试了红海参(*Parastichopus californicus*)微卫星标记在仿刺参中的通用性,以期为评价种质资源及基础生物学研究提供了有力的工具。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用仿刺参活体样本于2004年9月捕自山东近海,共60只,活体解剖,取其体壁和肌肉组织分装到样品袋中,液氮冷冻,保存于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中备用。

1.2 基因组DNA的提取

剪碎约200 mg的体壁或者肌肉组织,加入500 μL CTAB裂解液($0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-Cl, pH 8.0, $1.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 2% CTAB, 使用前加入1.5% β -巯基乙醇),于 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中消化至澄清,等体积的饱和酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提,二倍体积预冷的无水乙醇沉淀,双蒸水溶解,饱和酚抽提两次后,溶于双蒸水,紫外分光光度计定量, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

1.3 位点来源、PCR反应及电泳

利用自行设计的软件Repeat Reporter(版本1.5)从NCBI注册的仿刺参序列中筛选含有微卫星的序列,用软件Primer Premier 5.0(Premier Biosoft International)设计了8对引物。另外,还选取了Nelson等^[12]分离的5个红海参微卫星位点进行分析。PCR反应总体积为20 μL ,内含20 ng的模板DNA, $0.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的引物, $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的dNTPs, $1.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Mg^{2+} , $1 \times$ PCR反应缓冲液,1 U的Taq DNA聚合酶(Promega)。反应在PTC-100 PCR(MJ Research)扩增仪上进行。PCR反应为35个循环,每个循环包括: $94\text{ }^\circ\text{C}$ 变性1 min,退火30 s, $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸45 s;首次循环前预变性5 min;最后一次循环结束后 $72\text{ }^\circ\text{C}$ 再延伸5 min。PCR扩增产物经8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,电压为 $5 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$,每张胶上包括两个分子量标准(pUC19/HaeIII)。电泳完后用溴化乙锭(浓度为 $0.15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)染色,紫外观察成像并对电泳谱带进行分析。

1.4 数据分析

对每个微卫星位点的等位基因的数目进行统计,计算每个等位基因的频率和下列参数:参照Botstein等^[13]的方法计算多态性信息含量(polymorphism information content, PIC)

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

式中: P_i 、 P_j 分别为群体中第*i*和第*j*个等位基因频率, n 为等位基因数。

多态位点杂合度(观测值) $H_o:H_o$ 为杂合子观察数与样本含量之比。

多态位点杂合度(期望值) $H_e:H_e = 1 -$

$\sum P_i^2$, P_i 为该位点上第*i*个等位基因的频率。

2 结果

2.1 NCBI 数据库得到的仿刺参微卫星标记

NCBI 数据库中共有 20 个含有仿刺参微卫星的序列, 从中选取 8 个设计引物, 通过温度梯度 PCR 优化退火温度, 发现 6 对引物能扩出与期望 PCR 产物大小相等或相近的片段, 微卫星序列在 GenBank 中的注册号以及引物序列见表 1。应用 6 对引物对 60 个个体进行了 PCR 扩增, 每一个实验个体在各微卫星位点上都产生了较为清晰的、能够准确判断的扩增条带。随机抽取部分样本进行 2~3 次的重复实验表明, 微卫星的扩增结果稳定、重复性高。微卫星引物扩增的代表性聚丙烯

酰胺凝胶电泳图谱见图 1。读取全部基因型, 6 个位点获得了 31 个等位基因, 每个微卫星位点的等位基因数及所扩增的等位基因片段大小变化范围见表 2; 不同的引物获得的等位基因数为 3~9 个不等, 平均每对引物获得 5.2 个等位基因。其中位点 AJMS007 获得 9 个等位基因, 等位基因数最多; AJMS001 次之, 为 6 个等位基因; AJMS002 获得 5 个等位基因; AJMS005 和 AJMS006 各获得 4 个等位基因; AJMS004 只获得了 3 个等位基因。AJMS004 位点提供的信息含量较低, 为 0.4862; 其他 5 个位点的 *PIC* 值均在 0.5 以上。6 对引物的多态性信息含量、观测杂合度和期望杂合度见表 2。

表 1 仿刺参和红海参微卫星标记

Tab. 1 Microsatellite loci in *Apostichopus japonicus* and *Parastichopus californicus*

位点 locus	GenBank 索引号 accession no.	中心重复序列 core sequence	引物序列(5' → 3') primer sequences (5' → 3')	退火温度(°C) annealing temp.
AJMS001 ⁺	AB106646	(CA) ₁₄	F: AACATCGACTTCTCATCCAGG R: ATGATACAAGAGTTGGGCGAGG	62
AJMS003 ⁺	AB106638	(GT) ₁₄	F: TGCAACGTTGATGTCTAGAGC R: GAGACCTAGGCACTATAATTCC	62
AJMS004 ⁺	AB106637	(CA) ₁₃ ... (AT) ₈	F: TTTGGTCAGCTTGCGGCTTTG R: ATTGCATCGAAGGAGGCGATC	60
AJMS005 ⁺	AB106630	(CA) ₁₃	F: AATTGGAAGTTCCCTGACCCG R: GTAAAAATTGCCTCAGCGAGGG	62
AJMS006 ⁺	AB106639	(TG) ₆ ...G ₁₅ (GT) ₅	F: CCCTCATTATGGA TCTGCCATG R: TTCTCTCCCTACCTCAA CTACCC	55
AJMS007 ⁺	AB106633	(CA) ₇ CG (CA) ₆	F: TTTCCATTGCTCCTGCAAAAC R: CCGGCCACAAAACTCTCCTATAAG	50
Psc 1 [*]	AF455029	(GACA) ₄ (GATA) ₃ (GACA) ₄ ... (GACA) ₄	F: CACACGAAAAACAACACTAGAACACAT R: TCGTTTGTGCCCATTGTGA	50
Psc 2 [*]	AF455030	(ACGG) ₂ ... (ACGG) ₄	F: TCTAGGCTAGCCAAACCAAA R: GATCAAAAATTGCATCCACCA	50
Psc 3 [*]	AF455031	(C) ₁₄ (AC) ₇	F: AAATCTCCCA CCGAAA AGTGA R: TTCGCAAACTATTGTGGTG	55
Psc 4 [*]	AF455032	(TTA) ₆	F: TAGAGGATCGTAAGGTTACA CAGG R: TTCGTGTTGCTGATGAAAAAGT	58
Psc 5 [*]	AF455033	(ATTTAGCTC)A (ATTTAGCTC) ₃	F: ACCGCCCTA CATCTCTC R: AGACTGGCATTAA AATTAGACAAA C	58

注: + 仿刺参的微卫星标记; * 红海参的微卫星标记

Notes: + means the microsatellite markers in *Apostichopus japonicus*; * means the microsatellite markers in *Parastichopus californicus*

2.2 红海参微卫星标记在仿刺参中的通用性

Nelson 等^[12]分离了 5 个具多态性的红海参微卫星标记, 尝试其在仿刺参的通用性及其多态性。结果表明, 在较高的退火温度下(表 1), 5 对引物均能扩增仿刺参的基因组 DNA。对 60 个个体进行了 PCR 扩增(Psc 2 位点的图谱见图 1), 读

取全部基因型, 5 个基因位点获得了 22 个等位基因, 每个微卫星位点的等位基因数及所扩增的等位基因片段大小变化范围见表 2; 不同的引物获得的等位基因数为 2~9 个不等, 每个位点平均获得 4.4 个等位基因。Psc 2 获得 9 个等位基因, 等位基因数最多, Psc 5 次之, 为 5 个等位基

因; Psc 1 和 Psc 4 各获得 3 个等位基因; Psc 3 只获得了 2 个等位基因。Psc 2 位点的信息含量最高, 为 0.8500; 其他 4 个位点的 PIC 值均在 0.5 以下。5 对引物的多态性信息含量、观测杂合度和期望杂合度见表 2。

3 讨论

微卫星标记的筛选主要有以下 3 种方法: ①构建小插入片段的 DNA 文库或者微卫星富集文库, 通过杂交等手段筛选阳性克隆, 通过测序获得微卫星 DNA; ④从发表的 DNA 序列中查找含有微卫星的片段; ④通过近缘种已有的引物或者发表的序列寻找目的物种的微卫星标记。

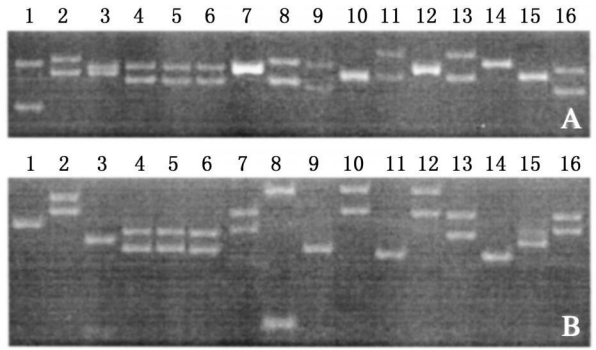


图 1 位点 AJMS007(A) 和 Psc 2(B) 在刺参 16 个个体中扩增得到的电泳图谱

Fig. 1 Locus AJMS007(A) and locus Psc 2(B) amplified in 16 *Apostichopus japonicus* individuals

表 2 仿刺参微卫星标记评价及在仿刺参中通用成功的红海参微卫星标记评价

Tab. 2 The evaluation of microsatellite markers of *Apostichopus japonicus* and the microsatellite markers derived from *Parastichopus californicus*

位点 locus	等位基因大小范围(bp) allele size range	等位基因数目 no. of alleles	多态性信息含量值 PIC value	观测到的杂合度 H_o	预期杂合度 H_e
AJMS001	129~ 153	6	0.7178	0.5500	0.7238
AJMS003	111~ 127	5	0.6185	0.4500	0.6237
AJMS004	169~ 187	3	0.4862	0.0667	0.4903
AJMS005	129~ 155	4	0.5838	0.3500	0.5987
AJMS006	194~ 200	4	0.5643	0.4500	0.5714
AJMS007	135~ 179	9	0.8125	0.7500	0.8333
Psc 1	78~ 86	3	0.1679	0.1167	0.1693
Psc 2	82~ 154	9	0.8500	0.7500	0.8718
Psc 3	86~ 100	2	0.4592	0.0587	0.4658
Psc 4	186~ 200	3	0.4067	0	0.4136
Psc 5	146~ 165	5	0.1779	0.1702	0.1798

注: 位点 Psc 3 受试个体数目为 35; 位点 Psc 5 受试个体数目为 47

Notes: The values H_o of the loci Psc 3 and Psc 5 were estimated by 35 and 47 individuals, respectively

本文利用后两种方法筛选仿刺参的微卫星标记, 从 NCBI 数据库中得到了 20 个含有微卫星的序列, 选取侧翼序列的长度以及 GC 含量适宜的 8 条序列, 设计引物并检测, 得到 6 个具有多态性的仿刺参微卫星标记。虽然微卫星标记具有种类的特异性, 但随着研究的深入开展, 人们发现生物体的基因组之间存在一定程度的相似性, 尤其是亲缘关系较近的物种^[14]。因此, 利用已发表的文献资料及 DNA 序列, 从相近物种的微卫星位点筛选目标物种的微卫星位点, 不失为一条简捷而有效的途径。在很多研究已经证明微卫星标记可以跨属甚至跨科通用。在水生生物中, 鲤 (*Cyprinus*

carpio L.) 的 15 对微卫星引物可以扩增银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 的基因组 DNA^[15]; 张天时等^[16]证明斑节对虾的微卫星引物能在中国对虾、凡纳对虾和日本对虾中扩增出预期的 PCR 产物。本文研究发现近缘种红海参发表的 5 对微卫星引物, 均可扩增仿刺参的基因组 DNA, 并且具有多态性。微卫星标记通用性的实验表明, 仿刺参和红海参的遗传背景具有一定程度的相似性, 引物可应用于仿刺参和红海参分子标记的基因组比较作图。通用 SSR 引物在海参遗传分析中的应用, 将促进基因组比较作图研究的顺利开展, 可揭示物种的进化, 有利于在不同物种间互相利用

遗传信息。利用通用的微卫星标记进行比较基因组学研究,现正成为国际上研究的热点。

微卫星标记由于其高度的多态性,与其它的标记系统相比在检测种群异质性方面有明显优势,能更多的揭示群体的遗传变异水平,因而日益受到重视。微卫星位点的多态性水平可用多态信息含量值(PIC)衡量。一般情况下,多态信息含量值能反映出某个遗传标记所包含的或所能够提供的遗传信息容量,当 $PIC > 0.5$ 时,表明该遗传标记可提供丰富的遗传信息;当 $0.25 < PIC < 0.5$ 时,表明该遗传标记能够较为合理地提供遗传信息,而当 $PIC < 0.25$ 时,表明该遗传标记可提供的遗传信息较差^[17]。本文的结果表明,从仿刺参发表序列得到的6个多态性位点中,有5个位点的 PIC 值大于 0.5,可为群体遗传学分析提供有效的工具。红海参的5对微卫星引物中,位点 $P_{sc} 2$ 在仿刺参中有高的多态性,检测到的等位基因数目、等位基因大小分布以及多态性信息含量都高于红海参;位点 $P_{sc} 2$ 的 PIC 值大于 0.5,表明该位点可提供丰富的遗传信息,也作为群体遗传学分析的有效工具。

杂合度指微卫星座位为杂合子的比例,能较好地反映群体中等位基因的丰富程度和均匀程度。杂合度作为一个反映群体遗传变异的重要参数,其大小可以反映群体遗传变异的高低。杂合度高的生物群体具有更大的适应环境变化和自然选择的能力;具有更多优良的经济性状,如生长迅速、高抗病能力等^[18,19]。通过计算 $PIC > 0.5$ 的6个微卫星位点(5个仿刺参的位点和1个来自红海参的位点),发现观测杂合度(H_o)为 0.3500~0.7500,预期杂合度(H_e)为 0.5714~0.8718,表明仿刺参种群有较高的遗传多样性,这与 ISSR 标记分析的结果相吻合(未发表)。Uthicke 和 Purcell^[7]应用同工酶标记,发现海参(*Holothuria scabra*)种群间具有很显著的基因流,指出异地亲本培育的幼体在放流时,应充分考虑对当地种群遗传结构的影响。Uthicke 等^[8]研究发现,海参资源一旦破坏,难以恢复。为此,在目前仿刺参养殖产业刚刚发展,自然种群资源尚未被破坏之时,进行仿刺参种群(群体)资源及遗传学方面研究,有效地保护和利用天然种群的优良种质资源、保护产业的长远利益非常必要。

参考文献:

- [1] 张春云,王印庚,荣小军. 国内外海参自然资源、养殖状况及存在问题[J]. 海洋水产研究, 2004, 25(3): 56-63.
- [2] 宋修武. 大力发展海参健康养殖培养海洋渔业经济发展新亮点[J]. 齐鲁渔业, 2005, 22(1): 1-2.
- [3] 何平. 真核生物中的微卫星及其应用[J]. 遗传, 1998, 20(4): 42-47.
- [4] Uthicke S, Benzie J A H, Ballment E. Genetic structure of fissiparous populations of *Holothuria (Halaleima) atra* on the Great Barrier Reef[J]. Mar Biol, 1998, 132: 141-151.
- [5] Uthicke S, Benzie J A H, Ballment E. Population genetics of the fissiparous holothurian *Stichopus chloronotus* (Aspidochirotrida) on the Great Barrier Reef, Australia[J]. Coral Reefs, 1999, 18: 123-132.
- [6] Uthicke S, Benzie J A H. Gene flow and population history in high dispersal marine invertebrates: mitochondrial DNA analysis of *Holothuria nobilis* (Echinodermata: Holothuroidea) populations from the Indo-Pacific[J]. Mol Ecol, 2003, 12: 2635-2648.
- [7] Uthicke S, Purcell S. Preservation of genetic diversity in restocking of the sea cucumber *Holothuria scabra* investigated by allozyme electrophoresis[J]. Can J Fisheries Aquat Sci, 2004, 61: 519-528.
- [8] Uthicke S, Welch D, Benzie J A H. Slow growth and lack of recovery in overfished holothurians on the great barrier reef: evidence from DNA fingerprints and repeated large-scale surveys[J]. Conserv Biol, 2004, 18: 1395-1404.
- [9] Kanno M, Kijima A. High genetic variability of isozymes in Japanese sea cucumber *Stichopus japonicus*[J]. Fish Genet Breed Sci, 2002, 31: 7-12.
- [10] 高悦勉,孙静波. 刺参种群同工酶的生化遗传分析[J]. 大连水产学院学报, 2004, 19: 30-34.
- [11] Kanno M, Kijima A. Genetic differentiation among three color variants of Japanese sea cucumber *Stichopus japonicus*[J]. Fish Sci, 2003, 69: 806-812.
- [12] Nelson J R, Cooper G, Garner T, et al. Polymorphic markers for the sea cucumber *Parastichopus californicus*[J]. Mol Ecol Notes, 2002, 2: 233-235.
- [13] Bostein D, White R L, Skolnick M. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. Am J Hum, 1980, 32: 314-331.
- [14] 周涵韬,郑文竹. 不同作物间共用 SSR 引物的初步研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2002, 1: 90-93.
- [15] Yue G H, Ho M Y, Orban L, et al. Microsatellites within genes and ESTs of common carp and their applicability in silver crucian carp[J]. Aquaculture, 2004, 234: 85-98.
- [16] 张天时,刘萍,孟宪红,等. 不同对虾种间共用微卫星 DNA 引物的研究[J]. 高技术通讯, 2003, 11: 80-85.
- [17] 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的分析[J]. 水产学报, 2004, 28(2): 241-244.
- [18] Xu Z, Primavera J P, Pena L D, et al. Genetic diversity of wild and cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites[J]. Aquaculture, 2001, 199: 13-40.
- [19] Beardmore J A, Mair G C, Lewis R I. Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture[J]. Aquaculture Res, 1997, 28: 829-839.