

文章编号: 1000-0615(2008)03-0353-09

富集文库—菌落原位杂交法筛选栉孔扇贝的微卫星标记

战爱斌, 胡景杰, 胡晓丽, 王明玲, 彭薇, 李艳, 李纪勤, 包振民

(中国海洋大学海洋生命学院海洋生物遗传与种质工程实验室, 山东 青岛 266003)

摘要:应用微卫星富集文库—菌落原位杂交法, 筛选得到了 40 个栉孔扇贝的微卫星标记。用固定了 (AG)₁₅ 和 (AC)₁₅ 探针的尼龙膜 (Hybond N⁺) 捕捉含有微卫星 DNA 的片段, 经洗脱、PCR 扩增和 TA 克隆, 构建栉孔扇贝的微卫星富集文库。利用 ECL 试剂盒 (Amersham 公司) 标记的 (AG)₁₅ 和 (AC)₁₅ 探针进行菌落原位杂交筛选微卫星富集文库, 阳性克隆经测序获得微卫星 DNA。富集文库中 1200 个重组克隆经过菌落原位杂交后, 532 个 (44.3%) 为阳性克隆。任意挑选 100 个克隆测序, 结果显示所有的克隆都至少含有一个微卫星位点。利用软件设计了 65 对特异性 PCR 引物, 40 对能扩增出清晰的带谱; 利用 48 个栉孔扇贝个体评价微卫星位点, 分析表明 37 个位点具有多态性。不同的位点获得的等位基因数目为 2~14 个不等, 37 个多态性位点共获得 258 个等位基因, 平均每个位点获得 7.0 个等位基因。观测杂合度 (*H_o*)、期望杂合度 (*H_e*) 及多态性信息含量值 (*PIC*) 的范围分别为 0.1000~1.0000、0.1197~0.9831 和 0.1172~0.9782。结果表明, 富集文库—菌落原位杂交法适合大规模筛选目标物种的微卫星标记。

关键词: 栉孔扇贝; 富集文库; 菌落原位杂交; 微卫星标记; 多态性

中图分类号: S 917 **文献标识码:** A

栉孔扇贝 (*Chlamys farreri* Jones et Preston, 1904) 分布于我国北方近海, 在日本、韩国和俄罗斯等一些地区的沿海亦有分布。栉孔扇贝是我国传统的经济养殖贝类, 近年来在种苗繁育及养成过程中出现的问题表明, 培育具有抗逆和生长快速等优良经济性状的新品种是栉孔扇贝养殖业健康与可持续性发展的有效途径之一。由于栉孔扇贝生长周期较长, 常规选育方法培育新品种需要长期观测并分析优良性状的分离, 耗费大量的人力和物力。而近年来飞速发展的分子标记辅助选育 (molecular marker-assisted selection, MAS) 为良种的快速培育提供了支撑; 同时, MAS 在农业和畜牧业上的成功案例也为在水产养殖动物中实现优良性状的定向筛选和新品种的快速培育提供了实践经验。

微卫星 (microsatellites), 又称简单序列重复 (simple sequence repeats, SSRs), 是以 1~6 个核苷酸为基本单位组成的串联重复序列^[1]。与其他分子标记相比, 微卫星标记具有多态性高、稳定性好、特异性强、共显性遗传等优点^[1], 因而广泛地应用于连锁图谱构建^[2-6]、QTL (quantitative trait locus) 定位^[6-7] 及杂种优势的遗传学解析^[8-9] 等。李红蕾等^[10] 和 Zhan 等^[11] 分别利用 EST 文库筛查和菌落原位杂交筛选开发了 17 个栉孔扇贝的多态性微卫星标记。为全面了解栉孔扇贝的基因组特点和深入开展遗传标记辅助育种工作, 有必要筛选一批多态性好的微卫星标记。本文描述了一种效率高且操作简单的微卫星标记的筛选方法——微卫星富集文库—菌落原位杂交法; 利用此种方法开发了

收稿日期: 2007-04-25

资助项目: 国家“十一五”支撑计划项目 (2006BAD09A09); 国家科技基础条件平台建设 (2005DKA30470); 农业科技成果转化资金项目 (2006GB23600451)

作者简介: 战爱斌 (1980-), 男, 山东莱州人, 博士研究生, 主要从事分子遗传学与遗传育种学研究。

通讯作者: 包振民, Tel: 0532-82031960

40个栉孔扇贝的微卫星标记,并估算了这些微卫星位点的主要遗传参数。

1 材料与方 法

1.1 实验材料及 DNA 的提取

实验所用栉孔扇贝样品于1999年3月采自山东省长岛县周围海域,共48只,取其闭壳肌液氮速冻后转入 -20°C 冰箱中保存。利用标准酚-氯仿法^[12]提取冷冻样品的DNA,溶于 $0.1\times\text{TE}$ (pH 8.0)缓冲液中,紫外分光光度计定量, -20°C 保存备用。

1.2 栉孔扇贝微卫星富集文库的构建

富集文库的构建主要参照 Karagyozov 等^[13]和 Edwards 等^[14]的方法,在DNA的酶切、微卫星DNA的捕捉、探针的标记和洗脱的严谨度等方面做了必要的调整与优化。

基因组DNA的酶切、400~1200 bp DNA片段回收及人工接头的连接 取5~10 μg 栉孔扇贝的总DNA,在500 μL 反应体系中用30 U的限制性内切酶 *RsaI* 处理3 h,利用1%低熔点琼脂糖电泳回收片段大小范围为400~1200 bp的酶切产物。建立20 μL 的连接反应体系,其中含有500 ng的回收片段,50 ng的人工接头(21-mer的寡核苷酸链:5'-CTCTTGCTTGAATTCGGACTA-3'和25-mer 5'-端磷酸化了的寡核苷酸链:5'-pTAGTCCGAATTCAAGCAAGAGCACACA-3'退火形成),2 U的 T_4 DNA连接酶和 $1\times T_4$ DNA连接酶缓冲液,在 16°C 下连接过夜(12~14 h)。带接头的DNA在 95°C 下变性5 min,然后迅速在碎冰中降温变性。

尼龙膜的制备及预杂交 取浓度为100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的寡核苷酸探针(GA)₁₅和(CA)₁₅各1 μL 点在直径约为5 mm的尼龙膜(Hybond N⁺, Amersham公司)上,空气中晾干后 80°C 烘烤2 h固定探针。

将含有寡核苷酸探针的尼龙膜放在杂交液[50%(V/V)的甲酰胺、7%(W/V)的SDS、 $5\times\text{SSC}$ 、50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸钠(pH 7.0)]中 37°C 预杂交3 d,取出尼龙膜在1%的SDS中处理10 min,去除未与膜结合的探针。

含有微卫星DNA片段的捕捉 将变性的DNA片段、尼龙膜和3 μg 人工接头的一条链(21-mer)加入到600 μL 的杂交液中, 37°C 杂交

24 h。洗膜采用如下严谨度:首先用 $2\times\text{SSC}$,1% SDS(W/V)洗脱液在 60°C 下洗脱2次,每次15 min;然后用 $2\times\text{SSC}$,1% SDS(W/V)洗脱液在 62°C 下水浴30 min;最后用500 μL 的 $0.5\times\text{SSC}$,1% SDS(W/V)洗脱液在 65°C 下水浴30 min洗脱捕捉得到的DNA片段;在500 μL 的洗脱液中加入50 μL 的 $7.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵、600 μL 的异丙醇和40 mg的贻贝糖原(mussel glycogen),于冰上放置10 min, 4°C 14 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min沉淀核酸。将沉淀的核酸溶于20 μL 的双蒸水中, -20°C 冰箱保存备用。

TA-克隆 建立20 μL 的PCR反应体系,其中含有2 μL 的捕捉产物,0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的21-mer引物,200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的dNTPs、1 U的 *Taq* 酶(TaKaRa)和 $1\times\text{PCR}$ 缓冲液。反应在PTC-100 PCR(MJ Research)扩增仪上进行。PCR反应为25个循环,每个循环包括: 95°C 变性30 s, 55°C 退火30 s, 72°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°C 再延伸1 h。将PCR产物纯化后克隆到pMD18-T载体(Takara),转化大肠杆菌DH5 α 菌株中,构建微卫星富集文库。

1.3 菌落原位杂交

菌落转膜 用牙签将白斑挑起,接种于新的固体培养基上, 37°C 培养至大小合适的菌落并转印至硝酸纤维素膜(Immobilon-NC Transfer Membranes, Millipore)上。硝酸纤维素膜在空气中干燥10 min,在变性液(0.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH, 1.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl)中变性7 min,空气干燥10 min;在中和液(0.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7.2; 1.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl; 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, pH 8.0)中处理2次,每次5 min;最后将硝酸纤维素膜在 80°C 下烘烤2 h。

阳性克隆的筛选 寡核苷酸探针(GA)₁₅和(CA)₁₅的标记采用Amersham公司的Gene Images 3'-Oligolabelling Module试剂盒。将硝酸纤维素膜放入杂交液[$5\times\text{SSC}$, 0.1%(W/V) SDS, 稀释20倍的液体封阻(Amersham公司的Gene Images ECL Detection试剂盒), 0.5%(W/V)多聚硫酸葡聚糖(dextran sulphate, MW 500000)]中预杂交1 h,然后加入足量的杂交液(0.125~0.250 $\text{mL}\cdot\text{cm}^{-2}$)和标记的探针(5~10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 37°C 振荡杂交过夜。杂交过夜的硝酸纤维素膜在 $5\times\text{SSC}$, 0.5% SDS(W/V)的洗脱液中室温振荡洗脱2次,每次5 min;在含有

1×SSC,0.5% SDS(W/V)的洗脱液中 37 °C 振荡洗脱 15 min;在含有 1×SSC,0.5% SDS(W/V)的洗脱液中 42 °C 振荡洗脱 15 min。硝酸纤维素膜的封阻和检测等反应均参照试剂盒的说明。X-胶片显影后挑选阳性克隆测序。

1.4 序列的处理

阳性克隆序列测定后,利用 VecScreen 程序去除载体序列,然后利用 Vector NTI Suite 8.0 (Invitrogen)软件包中的 Contig Express 程序进行序列的拼接和独立克隆的识别。将独立序列与公用数据库中已有的序列比对,去除冗余序列。

1.5 PCR 引物的设计和优化

利用软件 Primer Premier 5.0 (Premier Biosoft International)对候选位点进行 PCR 引物的设计。PCR 引物的优化在温度梯度 PCR 系统 (Biometra T-Gradient PCR)上完成。PCR 程序为在 95 °C 下预变性 5 min,95 °C 变性 30 s,温度梯度 (50~70 °C)退火 30 s,72 °C 延伸 45 s,反应进行 30 个循环。反应体系为 20 μL,含有正反引物各 0.2 μmol·L⁻¹、200 μmol·L⁻¹的 dNTP、1×PCR buffer、1.2 mmol·L⁻¹的 Mg²⁺、1 U 的 Taq 酶(TaKaRa),从 48 个个体中任意取 5 个个体的 DNA 等量混合,取 80 ng 混合 DNA 作为 PCR 反应的模板。

1.6 位点主要遗传学参数的估算

PCR 产物的电泳分离及个体基因型的判读参照战爱斌等^[15]的方法;参照 Botstein 等^[16]的方法计算微卫星位点的多态性信息含量值 (polymorphism information content, PIC):

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

计算每个微卫星位点的观测杂合度 (observed heterozygosity, H_o) 和期望杂合度 (expected heterozygosity, H_e), H_o 为杂合子观察数与样本含量之比; $H_e = 1 - \sum P_i^2$ 。

式中 P_i 、 P_j 分别为群体中第 i 和第 j 个等位基因的频率, n 为等位基因的数目。等位基因频率采用软件 GenPop (version 1.44) 计算得出。微卫星位点的哈迪-温伯格平衡性 (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE) 采用马尔可夫链法 (Markov chain tests) 检测,检测软件采用 POPGENE 在线版本 (<http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop/>)。

2 结果

转化后共得到约 8500 个菌落,其中白斑约

占 85.5%。随机从文库中抽取 20 个白斑进行插入片段长度的估算,结果显示插入片段的长度范围为 435~1100 bp,平均长度为 735 bp。任选 1200 个重组克隆重新均匀地排布于 4 张培养基上进行阳性克隆的筛选。菌落原位杂交结果显示,每张平板得到的阳性克隆数目从 126 个到 149 个不等,阳性克隆率平均为 44.3% (图 1)。

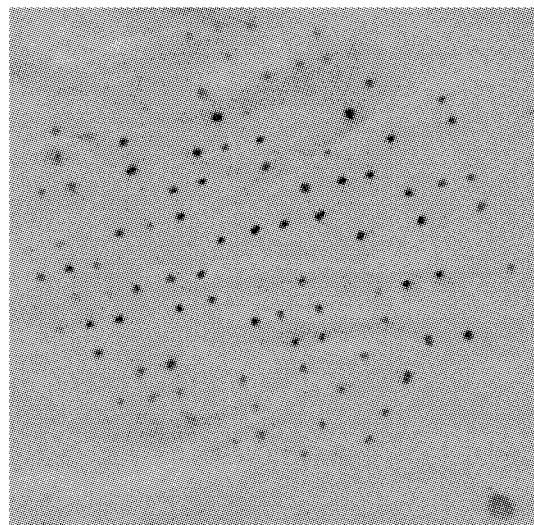


图 1 自显影显示的含有微卫星的阳性克隆,右下方大黑点为 100 ng 基因组 DNA 做阳性对照
Fig. 1 The positive clones identified by southern hybridization. The big black blot at the bottom showed the positive control of 100 ng of genomic DNA

从阳性克隆中任意选取 100 个克隆进行测序,结果显示所有的克隆 (100.0%) 均含有微卫星 DNA。Vector NTI Suite 8.0 聚类分析结果表明 11 个序列聚为 5 个簇,其它 89 个为独立序列。分析表明,1 个 (1.1%) 位点 (CFAD055) 和 Zhan 等^[11] 报道的位点 (位点名称 CFMSM014, GenBank 索引号: DQ104705) 重复。在 93 个候选微卫星位点中,28 个 (29.8%) 位点由于侧翼序列太短或者 GC 含量过低外,其他 65 个 (69.1%) 位点均可设计 PCR 引物。通过 PCR 优化,发现 40 对 (61.5%) 引物能够扩增出与期望值大小相等或相近的片段。

用 48 个野生栉孔扇贝个体对 40 个位点进行多态性评价,结果显示每个实验个体在各个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,其中 37 个 (92.5%) 位点具有多态性。读取全部位点在所有个体中的基因型,37 个位点共获得了 258 个等位基因,平均每个多态性位点扩增得到 7.0 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1。不同的位点获得的等位基因数为2~14个不等,部分位点的聚丙烯酰胺凝胶电泳见图2。其中位点CFKD079、CFOD069和CFWP007 3个位点获得的等位基因数目最多,为14个;CFLP083和CFOD056位点次之,为12个;有2个位点(CFJJ029和CFSSRI089)仅获得

了2个等位基因(表1)。除了几个微卫星DNA较短的位点外(表1),其它位点的多态性均较高。其中有26个位点的PIC值高于0.5,显示出高度多态性;有9个位点的PIC值介于0.25到0.5之间,显示中度多态性。微卫星标记较高的多态性也同样反应在杂合度上(表1)。

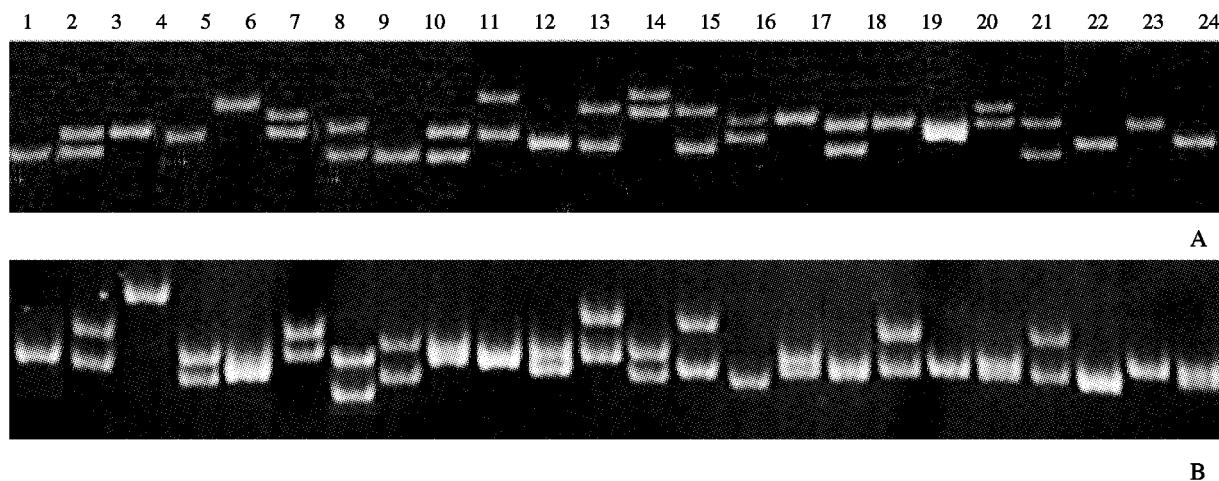


图2 位点CFWP007(A)和CFEEM003(B)在栉孔扇贝24个个体中扩增得到的电泳图谱

Fig. 2 Loci CFWP007 (A) and CFEEM003 (B) amplified in 24 Zhikong scallop (*C. farreri*) individuals

3 讨论

微卫星标记的开发耗时费力^[17-19],研究者大多采用传统的筛选小插入片段基因组文库的方法分离微卫星DNA^[20]。栉孔扇贝的小插入片段基因组文库中,含有(AC/GT)重复序列的克隆仅占1.18%^[11];贝类的其他相关研究也表明,利用传统的方法筛选得到的阳性克隆比例较低(0.1%~6.4%,平均1.96%)^[20]。为了降低微卫星标记开发的成本,近年来,国内外陆续报道了多种筛选方法,其中富集文库法由于阳性克隆率高、操作简单而被广泛采用^[20]。本文利用微卫星富集文库和菌落原位杂交相结合的方法,筛选了40个栉孔扇贝的微卫星标记。结果表明该方法适用于大规模筛选目标物种的微卫星DNA。

两个重要因素会影响到富集文库-菌落原位杂交法的效率:TA-克隆时PCR的循环数和杂交时的洗脱严谨度。第一个因素决定了富集文

库中独立克隆的数目,循环数多将增加重复克隆的数目,而循环数少会降低TA-克隆的效率^[21];同时,过度扩增还可能改变富集文库的组成结构^[20]。洗脱严谨度决定了富集文库中阳性克隆的比例^[20-22],甚至导致富集文库构建的失败^[21-22]。Cordeiro等^[22]指出:构建不同物种的微卫星富集文库时,洗脱严谨度必须优化。本文根据已有的报道^[18,20-22],对上述几个环节进行了优化,成功地筛选得到了栉孔扇贝的微卫星标记。同时,本文的优化条件也为其它海洋生物微卫星富集文库的构建提供了实验依据和参考。

研究表明,虽然不同物种微卫星的含量、分布和重复类型的丰度都各不相同,但两碱基重复在大多数生物的基因组中是最丰富的类型之一^[11,17-20],故本研究采用了两碱基探针(AG)和(AC)构建栉孔扇贝的微卫星富集文库。从测序的结果来看(表1),(AG/CT)重复的比例明显高于(AC/GT)重复。已有的研究表明,大多数动物中二碱基重复(AC/GT)的丰度高于(AG/CT)

表 1 栉孔扇贝 40 个微卫星标记的基本特征及主要遗传学数据的估算

Tab. 1 Characterization of 40 novel microsatellite markers for *C. farreri*

位点名称 locus name 索引号 accession No.	引物序列(5-3) primer sequence(5-3)	退火 温度(°C) Ta	核心重 复序列 core repeats	等位基因 大小范围 allele size range	等位基 因数 allele No.	PIC 值 PIC value	观测杂合度 H_o 期望杂合度 H_e
CFBD159	F: TTACGTGGATGCCATTCATCG	56	(GA) ₂₁	300~322	10	0.6373	0.6250
EF392880	R: TTTTCTGCCAGTGCACCATAC						0.6472
CFBD185	F: CTCTCCTAGACATAAAGCA	54	(AG) ₁₇	147~167	5	0.4512	0.3958
EF552127	R: GACCACAATCCACATCATC						0.4612
CFEEM003	F: ATGAGTGGGTAATACTCTACTCG	60	(AC) ₁₄	100~124	10	0.8921	0.8750
EF552128	R: CATGTCTGTCGTAAGCAAGC						0.9072
CFFD018	F: AAATCAAGGCGAGTAGTG	56	(AG) ₃₈	168~210	5	0.4721	0.2500*
EF552129	R: ACAGTGGAACCTCGATAACT						0.4822
CFFD028	F: AAGAAGAACGAAATGTGGAT	56	(AG) ₂₃	88~148	8	0.7794	0.5000*
EF552130	R: GCAACAAATAACAAGGAGA						0.7829
CFFD074	F: GATTAGAGCCCTTTCCCT	54	(GA) ₁₅	144~158	6	0.5102	0.1250*
EF556219	R: GAAATTGGTTCGTTCACTCAC						0.5342
CFHD004	F: GACACCGTCTCGCAATCTG	60	(CT) ₃₆	251~281	9	0.8278	0.5000*
EF552131	R: GCAACGTAATAAGGCACAAC						0.8393
CFHP049	F: GACATGAAAAGTAGGTATGGTGA	54	(TC) ₁₈	227~235	4	0.3682	0.3750
EF552132	R: TCATTTGCACACAGGGAAG						0.3785
CFHP060	F: CACACTAGGAAACTTACTCAC	52	(GA) ₃₅	189~201	5	0.6681	0.6250
EF552133	R: TTGTACGCTCTGTTGGGTC						0.6871
CFID005	F: CACACAAATGGATTGGGCAC	58	(GA) ₃₁	233~282	8	0.6201	0.5000*
EF552134	R: GACCGAAATCCACATCATCTA						0.6382
CFJD002	F: GAGCTGCCTTCATCAGGTG	60	(CT) ₁₂	97~138	9	0.7838	0.7342
EF552135	R: CTTTACATCGTGGACATCATC						0.8032
CFJD023	F: GCGTTCACCAAGTTATGTAG	54	(CT) ₂₇	126~140	6	0.5892	0.5833
EF392897	R: CAGTTGTTGTAAGGGTATGTC						0.6073
CFJJ001	F: TCAAACACTACATCGCTGGC	58	(AG) ₁₄	212~252	7	0.6471	0.5882
DQ207775	R: CAAATCCCGTTTCTGGTA						0.6667
CFJJ013	F: GCATCAGTCCTTTCGTTGT	50	(TC) ₂₁	140~180	4	0.5996	0.5000
EF552136	R: CGATTGCTGAAGAAATAGTGA						0.6190
CFJJ024	F: CCACAACATAGGTAAACGG	52	(CT) ₂₆	190~248	7	0.7932	0.7778
EF552137	R: GGTAATAAATAGCGGAGGGA						0.8159
CFJJ029	F: TGTCACGAAATAGGCAAGAG	52	(GA) ₂₃	130~132	2	0.1172	0.1250
EF552138	R: ACTTCATGGTTGAGGAGCA						0.1197
CFKD049	F: GAAGGACGACGGTGGGAAGA	50	(CAAA) ₃ ...(AG) ₁₃	111~135	8	0.7814	0.5833
EF552139	R: GGAAGAAATGGATAAACTGG						0.7942
CFKD077	F: CATATAGGGCAGGAATTGCG	53	(AG) ₂₇	207~231	4	0.3982	0.1250
EF552140	R: GTCAAGTGATGATGGACATAGC						0.4037
CFKD079	F: AACTTTATGCACATACCAG	56	(AG) ₄₂	267~321	14	0.8863	0.6250
EF552141	R: AAGCAGGTAACCTGTTTCC						0.9024
CFLD147	F: GGCTGAATCTGTAAAGAACCG	60	(GA) ₂₅	160~172	4	0.3867	0.3750
EF552142	R: GAGGCAAAAGATGAACTGTC						0.3983
CFLP061	F: AGCAAGATGTCTCCATACCTC	50	(CT) ₂₀ ...(GT) ₅ ... (GT) ₄ ...(GT) ₄	300~324	7	0.6901	0.6250
EF552143	R: TCAGCACCTCATAACCTCAAC						0.7021
CFLP083	F: GATTACCAGTCATAAGTTTCC	58	(CT) ₂₀	171~231	12	0.8891	0.8542
EF552144	R: CCAGGACAAGACGAATCAGAAC						0.9023
CFLP086	F: GGGCGAAAGCTAGAAATCCAC	55	(AG) ₂₆	199~211	4	0.3731	0.3333
EF552145	R: CATTGCAAACAGTAAGGATG						0.3823

(续表 1)

位点名称 locus name 索引号 accession No.	引物序列(5-3) primer sequence(5-3)	退火 温度(°C) Ta	核心重 复序列 core repeats	等位基因 大小范围 allele size range	等位基 因数目 allele No.	PIC 值 PIC value	观测杂合度 H_o 期望杂合度 H_e
CFOD046	F: CGTCAGTGTCGGGAAAGGGGA						0.6667
EF552146	R: CTAATATACAAAAGGGATTGGCA	58	(TC) ₉ ...(CT) ₁₂	288~302	8	0.6693	0.6813
CFOD056	F: TGATGAAGCAAAGTCAAGAG		(CT) ₅ GT(CT) ₅ GT				0.7500*
EF552147	R: GAGTCTGAAAGTTCTGTAAGCC	50	(CT) ₄ ...(CT) ₁₆	237~285	12	0.9001	0.9045
CFOD062	F: GCTGGAAAGCAAATCATGTAAGG		(AG) ₇ ...				0.4167*
EF552148	R: GAGATGAACCAGAAGTAAGTAAAG	58	(AG) ₉ (AC) ₅ (AG) ₁₀	217~241	7	0.6313	0.6432
CFOD069	F: GATGACGTTTGTAGTTGCCTTC		(AG) ₈ ...(AG) ₉				0.9167
EF552149	R: CATTCAAATCTCACTGCCAAG	60		271~319	14	0.9319	0.9422
CFOD083	F: GCTAGAGTGTTCTTGCATTGAG		(AG) ₂₅				0.4583*
EF552150	R: CCTGTAGATTCTAGCTCACT	54		167~258	8	0.7715	0.7882
CFWP005	F: ACTGGCTGTTCACTGTTGGC		(CA) ₈ (CG) ₂ (CA) ₇				0.6667
EF552151	R: GCACTGGATGCAAACAATTCTC	54		154~186	8	0.7081	0.7252
CFWP007	F: GTGGTCAGTGTCAACCTCTGCGT		(CT) ₂₆				0.5000
EF552152	R: CTACTTCTATGCTCTGGCAGGACG	55		211~258	14	0.9782	0.9831
CFSSRC004	F: CTTTACCATTTGATGTGGTG		(GT) ₆ ...(GT) ₇ ...(GT) ₄				—
AY682113	R: TCTTACGACTCATCAGTTC	52		119	1	—	—
CFSSRC086	F: CCAGACTACACCCACACAG		(AC)A(AC) ₄				0.1333*
AY682115	R: GATGTAAGGGTCAGGCTC	54	TAT(AC) ₂	189~195	3	0.2699	0.2867
CFSSRI089	F: AGAATAGGGGATTAAGCG		(CA) ₆				0.1800
AY682117	R: TTGTACGTTAGATAGCACG	50		122~124	2	0.1978	0.2012
CFSSRK070	F: ACGACCTCCTCTGTATGC		(GT) ₂ A(GT)				—
AY682119	R: GCTGGGTGTATTCGGTAG	50	ACAA(GT) ₅	157	1	—	—
CFSSRO068	F: ACCCAATAGGCCCAATG		(TG) ₄ T(TG) ₂ T(TG)				0.1000*
AY682121	R: GAACGTGCTGCACTTAC	54		221~227	3	0.3716	0.3821
CFSSRO096	F: ATTTAATCCTGTTCCAGCC		(TG)TC(TG) ₆ (T)4TTT				—
AY682122	R: CACTAGAACTATTTTCCCGG	56	(TG) ₂ ...(GTT) ₃ ...(T) ₂₁	273	1	—	—
CFZM006	F: GAGTTGAGAATGACAATGGCTG		(GA) ₈ AA(GA) ₄₁				0.7222
EF552153	R: TTGACCGTTATCACTGAAGGA	55		124~168	6	0.7886	0.8111
CFZM010	F: GAGCAGCGTGTAGAGCGT		(GA) ₁₉ ...(GA) ₆ ...(GA) ₇				0.8000
EF552154	R: AAGTAAGGTCAGTCTGTCCGT	50	...(GA) ₅ ...(AGAC) ₈	120~226	4	0.6244	0.6460
CFZM015	F: ATTCAAGAAAATACCACTG		(AG) ₂₄				1.0000
EF552155	R: TCTCATCACCTTAGTTTAG	50		222~336	7	0.8203	0.8750
CFZM029	F: AACGACCATACTTTCAACA		(GA) ₃₀				0.2727
EF552156	R: CCAATCAATCGGCAAAATAAC	50		138~162	4	0.2841	0.2907

注: * 表示严重偏离哈迪-温伯格平衡的位点

Notes: Significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE)

重复^[20]。为了进一步证实以上实验结果,避免富集过程中造成的偏向性,以(AG)₁₅和(AC)₁₅为探针进行点杂交实验,结果显示(AG/CT)重复的丰度大约是(AC/GT)重复的5.4倍。

微卫星位点的多态性一般用3个指标评价:等位基因的数目、杂合度和多态性信息含量值(PIC)。其中等位基因数目和杂合度能较好地反映微卫星位点上等位基因的丰富程度和均匀

程度,而多态性信息含量值反映了微卫星位点能够提供的遗传信息容量^[16-17]。Weber^[23]认为:上述3个指标和微卫星DNA核心重复序列的重复次数相关。例如,CFSSRO068和CFSSRI089等重复次数较少的微卫星位点提供的等位基因的数目、杂合度和多态性信息含量值均较小,而其它重复次数较多的位点提供的多态性较高(表1)。Sibly等^[24]通过最大似然法分析证实,重复

次数在 4 次以下的微卫星序列在复制过程中几乎不可能发生滑动错配而导致多态性水平较低。因此,在开发微卫星标记时,为筛选到多态性较好的位点,应该选取核心序列重复次数多的序列设计引物。

本研究获得的 37 个多态性基因座位中有 14 个座位的观测杂合度和期望杂合度有显著的差异(表 1);哈迪-温伯格平衡检验发现,这些位点的偏离是由于杂合子的严重缺乏($P < 0.005$)造成的。在海洋无脊椎动物中,很多研究都报道了杂合子缺乏(纯合子过剩)的现象,相关的分析指出杂合子缺乏大都是由于无效等位基因(null allele)引起的^[2, 22]。很多生物的微卫星位点都含有无效等位基因,如人的微卫星位点中 30% 含有无效等位基因^[25];燕子(*Hirundo rustica*)^[26]和虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[27]含有无效等位基因的位点比例分别为 25% 和 16%。在海洋贝类中,含有无效等位基因的位点比例比其它生物高,这似乎是海洋贝类的一个重要特点^[28]。皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)7 个微卫星位点中有 5 个含有无效等位基因^[29];构建太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)的微卫星连锁图谱时发现,含有无效等位基因的位点高达 51.0%^[2, 28]。研究表明:引物结合部位的点突变、插入或缺失是引起无效等位基因的主要原因^[27-28]。海洋双壳类微卫星侧翼序列碱基突变率较其它生物高,某些种甚至高到 1 bp/40 bp~1 bp/80 bp。海洋双壳类较大的群体及较高的怀卵量导致较高的碱基突变率,这是无效等位基因广泛存在的主要原因^[28-29]。

参考文献:

- [1] Toth G, Gaspari Z, Jurka J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis [J]. *Genome Res*, 2000, 10: 967-981.
- [2] Hubert S, Hedgecock D. Linkage maps of microsatellite DNA markers for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. *Genetics*, 2004, 168: 351-362.
- [3] Lee B Y, Lee W J, Streebman J T, et al. A second-generation genetic linkage map of tilapia (*Oreochromis* spp.) [J]. *Genetics*, 2005, 170: 237-244.
- [4] Baranski M, Loughnan S, Austin C M, et al. A microsatellite linkage map of the blacklip abalone, *Haliotis rubra* [J]. *Anim Genet*, 2006, 37: 563-570.
- [5] Song Q J, Marek L F, Shoemaker R C, et al. A new integrated genetic linkage map of the soybean [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 109: 122-128.
- [6] Lin Z, He D, Zhang X, et al. Linkage map construction and mapping QTL for cotton fibre quality using SRAP, SSR and RAPD [J]. *Plant Breeding*, 2005, 124: 180-187.
- [7] Jackson T R, Danzmann R G, Ferguson M M, et al. Identification of two QTL influencing upper temperature tolerance in three rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) half-sib families [J]. *Heredity*, 1998, 80: 143-151.
- [8] Jones E S, Hughes L J, Drayton M C, et al. An SSR and AFLP molecular marker-based genetic map of white clover (*Trifolium repens* L.) [J]. *Plant Sci*, 2003, 165: 531-539.
- [9] Hua J, Xing Y, Wu W, et al. Single-locus heterotic effects and dominance by dominance interactions can adequately explain the genetic basis of heterosis in an elite rice hybrid [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2003, 100: 2574-2579.
- [10] 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.
- [11] Zhan A B, Bao Z M, Yao B, et al. Polymorphic microsatellite markers in the Zhikong scallop *Chlamys farreri* [J]. *Mol Ecol Notes*, 2006, 6: 127-129.
- [12] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual* [M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- [13] Karagyozov L, Kalcheva I D, Chapman V M. Construction of random small-insert genomic libraries highly enriched for simple sequences repeats [J]. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21: 3911-3912.
- [14] Edwards K J, Baker J H, Daly A, et al. Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants [J]. *Biotechniques*, 1996, 20: 758-760.
- [15] 战爱斌,包振民,陆维,等. 仿刺参的微卫星标记 [J]. *水产学报*, 2006, 30(2): 192-196.
- [16] 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.
- [17] Zhan A B, Bao Z M, Wang X L, *et al.* Microsatellite markers derived from bay scallop *Argopecten irradians* expressed sequence tags [J]. *Fisheries Sci*, 2005, 71: 1341–1346.
- [18] Zhan A B, Hu J J, Wang X L, *et al.* A panel of polymorphic EST-derived microsatellite loci for the bay scallop (*Argopecten irradians*) [J]. *J Mollus Stud*, 2006, 72: 436–438.
- [19] Hu J J, Nakatani M, Mizuno K, *et al.* Development and characterization of microsatellite markers in sweet potato [J]. *Breeding Sci*, 2004, 54: 177–188.
- [20] Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation: a review [J]. *Mol Ecol*, 2002, 11: 1–16.
- [21] Jakse J, Javornik B. High throughput isolation of microsatellites in hop (*Humulus lupulus* L.) [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2001, 19: 217–226.
- [22] Cordeiro G M, Maguire T L, Edwards K J, *et al.* Optimisation of a microsatellite enrichment technique in *Saccharum* spp [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1999, 17: 225–229.
- [23] Weber J L. Informativeness of human (dC-dA)_n-(dG-dT)_n polymorphisms [J]. *Genomics*, 1990, 7: 524–530.
- [24] Sibly R M, Whittaker J C, Talbot M. A maximum-likelihood approach to fitting equilibrium models of microsatellite evolution [J]. *Mol Biol Evol*, 2001, 18: 413–417.
- [25] Callen D F, Thompson A D, Shen Y, *et al.* Incidence and origin of null alleles in the (AC)_n microsatellite markers [J]. *Am J Hum Genet*, 1993, 52: 922–927.
- [26] Primmer C R, Møller A P, Ellegren H. Resolving genetic relationships with microsatellite markers; a parentage testing system for the swallow *Hirundo rustica* [J]. *Mol Ecol*, 1995, 4: 93–498.
- [27] Ardren W R, Borer S, Thrower F, *et al.* Inheritance of 12 microsatellite loci in *Oncorhynchus mykiss* [J]. *J Hered*, 1999, 90: 529–536.
- [28] Zhan A B, Bao Z M, Hui M, *et al.* Inheritance pattern of EST-SSRs in self-fertilized larvae of the bay scallop *Argopecten irradians* [J]. *Ann Zool Fennici*, 2007, 44: 259–268.
- [29] Hedgecock D, Li G, Hubert S, *et al.* Widespread null alleles and poor cross-species amplification of microsatellite DNA loci cloned from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* [J]. *J Shellfish Res*, 2004, 23: 379–385.

Isolation and characterization of microsatellite markers for Zhikong scallop by screening SSR-enriched library

ZHAN Ai-bin, HU Jing-jie, HU Xiao-li, WANG Ming-ling,
PENG Wei, LI Yan, LI Ji-qin, BAO Zhen-min

(Laboratory of Marine Genetics and Breeding,
College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: In this study, 40 microsatellite markers were isolated and characterized for Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) using the method of screening SSR-enriched library. DNA fragments containing microsatellites were captured by a piece of nylon membrane (Hybond N⁺) bound with the probe combinations of (AG)₁₅ and (AC)₁₅. The nylon membrane was washed three times in 2 × SSC, 1% SDS at 62 °C, two times for 15 min with the final wash for 30 min. The captured DNA was eluted in 0.1 × TE buffer and used to construct an SSR enrichment library. After transformation, the clones were regularly re-arrayed in a new agar plate with the density of about 300 clones per plate and screened with (AG)₁₅ and (AC)₁₅ probes labelled by the ECL system (Amersham). A total of 1200 clones derived from the enrichment library were screened and 532 clones gave the positive response. One hundred clones were randomly selected for sequencing and the results showed that all of the clones contain at least one microsatellite. Sixty-five primer pairs were designed using the software Primer Premier 5.0, of which 40 pairs can be amplified scorable PCR products. The polymorphisms of these scorable loci were assessed using 48 *Chlamys farreri* individuals, and the results showed that 37 loci were polymorphic. The number of alleles per polymorphic locus ranged from 2 to 14 with an average of 7.0 alleles per locus, and the values of *H_o*, *H_e* and *PIC* varied from 0.1000 to 1.0000, 0.1197 to 0.9831 and 0.1172 to 0.9782, respectively. The results indicated that the method of screening SSR-enriched library is efficient and suitable to isolate a large amount of microsatellite markers for the target species of interest.

Key words: *Chlamys farreri*; enrichment library screening; colony hybridization; microsatellite markers; polymorphism