

牙鲆微卫星标记的开发及多态性分析

张潇岨^{1,2}, 徐亘博², 廖小林², 张家波¹, 陈松林^{2*}

(1. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071)

摘要: 将牙鲆基因组 DNA 经限制性内切酶 *Rsa* I 和 *Bst* UI 双酶切后采用 FIASCO 法构建酶切片段基因组文库。共挑取 269 个克隆, 177 个为阳性克隆, 阳性克隆率为 65.79%。经测序后获得 191 条微卫星序列, 其中完美型占 74.35%; 非完美型占 14.66%; 混合型占 10.99%。用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计引物 153 对, 挑选其中的 50 对合成并在 32 个野生牙鲆个体中进行扩增, 共 31 个位点具有多态性, 统计结果后使用 POPGENE 软件进行分析, 平均等位基因个数为 3.939 4, 平均有效等位基因数为 3.052 2, 平均观测杂合度为 0.650 1, 平均期望杂合度为 0.586 6, 各引物的 Hardy-Weinberg 平衡指数在 0.012 587 ~ 0.984 917 变动。这些筛选出的多态性微卫星标记可应用于进一步的牙鲆遗传多样性分析、家系分析及遗传图谱的构建等工作中。

关键词: 牙鲆; 微卫星; FIASCO; 多态性

中图分类号: Q 958.1; S 917

文献标志码: A

微卫星 DNA (microsatellite DNA), 又称短串联重复序列 (short tandem repeats, STRs) 或简单序列重复 (simple sequence repeats, SSRs)。目前, 由于微卫星 DNA 具有多态性高, 共显性等特点, 已经被广泛应用于海洋鱼类的遗传多样性分析、遗传图谱的构建及数量性状连锁分析等工作。国内一些学者相继开展了不同淡海水鱼类微卫星标记分离、多态性分析及其在种质鉴定和遗传结构分析等方面的研究^[1-14]。不过, 上述方法大多是采取传统技术进行微卫星标记的筛选, 而传统方法通常都是采用单一限制性内切酶对基因组 DNA 进行酶切, 得到阳性克隆的效率较低^[15]; 有的采用二次筛选的方法有效地提高了获得微卫星序列的效率^[16], 但是实验操作较为繁琐。因此, 如果能采用双酶切方法进行微卫星标记的筛选, 那将会提高微卫星标记筛选的效率, 有利于获得更多的多态性微卫星标记。

牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*), 属鲽形目 (Pleuronectiformes)、鲽亚目 (Pleuronectoidei)、鲆

科 (Bothidae)、牙鲆属 (*Paralichthys*), 是一种重要的经济鱼类, 主要分布在我国渤海、黄海、南海以及朝鲜、日本、俄罗斯远东沿岸海区。由于牙鲆经济价值高, 自然资源逐步减少, 其养殖业迅速发展起来, 近十年来逐渐成为我国北方乃至南方海域的重要增殖鱼类品种。对于牙鲆微卫星的研究, 日本学者分离了一些微卫星标记, 同时将微卫星标记应用于群体遗传多样性分析^[17-19]和遗传图谱的构建^[11]等。KIM 等^[20]也分离了牙鲆微卫星 DNA, 并应用于种群遗传分析。国内也有一些关于牙鲆微卫星标记筛选的报道以及利用微卫星标记对牙鲆野生和养殖群体的分析研究的报道^[21-22]。陈微等^[23]曾用菌落杂交法获得了 20 个微卫星序列, 但有关牙鲆微卫星标记开发的数量仍然较少, 满足不了进行牙鲆高密度遗传连锁图谱构建和 QTL 定位的需要。因此, 牙鲆良种选育和种质鉴定研究迫切需要开发出更多的多态性微卫星标记资源。

本研究以牙鲆为材料, 首先对基因组 DNA 酶切方法进行了改进, 采用了基因组 DNA 双酶

收稿日期: 2011-01-10 修回日期: 2011-04-23

资助项目: 国家“九七三”项目 (2010CB126303); 国家自然科学基金项目 (30871918); 山东省农业种质资源项目资助

通讯作者: 陈松林, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

切方法,通过优化的 FIASCO 法构建基因组文库,利用 $(GA)_{13}$ 作为探针进行杂交,旨在摸索出一套简便且高效的大量筛选微卫星序列的方法,同时对获得的牙鲆微卫星序列进行了多态性分析。

1 材料与方法

1.1 牙鲆基因组文库的构建

牙鲆基因组 DNA 的提取与酶切 所用牙鲆采自山东省海阳市近海野生群体。鱼体鳍条的采集、保存及基因组 DNA 的提取参照马洪雨等^[24]的方法。取 32 个个体的鳍条,分别提取其基因组 DNA 用于微卫星多态性检测。再取 1 个个体的 DNA 样品,用限制性内切酶 *Rsa* I (NEB) 和 *Bst* UI (NEB) 进行双酶切,酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,回收 250 ~ 1 500 bp 大小的片段。

连接 使用 2 μ L 10 \times *Xmn* I buffer (NEB), 0.2 μ L 100 \times bovine serum albumin (BSA) (NEB), 0.5 μ L *Xmn* I (NEB), 7 μ L 双链接头, 2 μ L T_4 DNA ligase (NEB), 1 μ L 10 \times ligase buffer 及 15 μ L DNA 酶切片段,反应在 PTC-100 thermocycler (MJ Research) 中 16 $^{\circ}$ C 过夜。之后用连接双接头后的 DNA 酶切片段为模板,以接头引物为 PCR 引物进行扩增,扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,回收 300 ~ 1 000 bp 的片段。

1.2 微卫星的筛选

杂交与磁珠吸附 首先用生物素微卫星探针与连有双接头的 DNA 片段进行杂交。100 μ L 的杂交体系包括: 70 μ L 杂交液 (6 \times SSC + 0.1% SDS), 25 μ L 前一步获得的 PCR 产物, 5 μ L 生物素微卫星探针 DNA $(GA)_{13}$ (Invitrogen Biotechnology) 混匀后在 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 然后 65 $^{\circ}$ C 温浴下杂交 30 min。

杂交混合溶液冷却至室温后再与 600 μ L 的 Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles 磁珠 (Promega) 混匀。DNA—探针—磁珠混合物在室温下放置 30 min, 期间每隔 5 min 轻柔吹打一次, 避免磁珠沉淀。磁珠吸附完毕后用 MagneSphere Magnetic Separation Stand 磁力架 (Promega) 固定磁珠。用移液枪移去溶液后, 先用 400 μ L TEN1000 (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L NaCl, pH 7.5) 进行非严谨洗脱 3 次, 每次 5 min; 再用 400 μ L 0.2 \times SSC + 0.1% SDS 进行 3 次严谨洗脱, 每次 5 min,

去除不含微卫星的序列。最后用 1 \times SSC 洗脱 2 次, 每次 5 min, 以去除 SDS。再加入 70 μ L TE (pH 8.0) 95 $^{\circ}$ C 水浴 5 min, 其间不时地吹打均匀。用磁力架固定磁珠后, 迅速吸出的上清液即为含有微卫星的目的 DNA 片段。

转化与 TA 克隆筛选 以上一步所得洗脱产物为模板, 用接头引物进行 PCR 扩增。扩增 16 个循环的 PCR 产物用 DNA 回收试剂盒回收。回收 DNA 产物与 pGEM-T Easy 载体 (Promega) 连接, 10 μ L 的连接体系包括: 2 \times rapid ligation buffer, 1 μ L vector (50 ng/ μ L), 1 μ L T_4 DNA ligase (3 U/ μ L) 和 3 μ L 含微卫星 DNA 片段产物。于 4 $^{\circ}$ C 温浴中放置 16 h。用连接后的质粒载体与 TOP10 感受态细胞 (TIANGEN) 进行转化。每个含有 100 mg/L 氨苄青霉素 (ampicillin) 平板上涂抹 50 μ L 的悬浮细胞液, 将平板放入 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养, 直到长出菌落。

之后用菌落 PCR 技术筛选阳性克隆, 10 μ L 的 PCR 体系包括模板 1 μ L (挑取单克隆到 10 μ L 超纯水中, 混合均匀后取 1 μ L 作为模板) 10 \times *Taq* Buffer 1 μ L, $MgCl_2$ (25 mmol/L) 0.6 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 0.8 μ L, 相应接头引物 (5 mmol/L) 1 μ L, *Taq* 酶 (5 U/ μ L) 0.1 μ L, 超纯水 4.5 μ L, 所得 PCR 产物在 1% 的琼脂糖上电泳, 用 DL2000 marker 判断产物有无及其大小, 挑选阳性重组克隆送上海联合基因和北京六合华大基因测序 (ABI 3730)。

1.3 微卫星引物设计与多态性分析

选取两端侧翼序列足够长的微卫星序列, 用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计引物。然后选取 50 对引物对牙鲆基因组 DNA 进行 PCR 扩增分析。PCR 反应体系为 15 μ L, 包括 50 ng 牙鲆基因组 DNA、0.5 μ L 正向和反向引物、0.6 μ L dNTP (2.5 mmol/L)、0.1 μ L *Taq* DNA 酶, 1.5 μ L 10 \times Buffer 和 10.8 μ L 超纯水。35 个循环的 PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。各对引物的退火温度有所不同 (表 1)。

PCR 产物在 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶中分离, 硝酸银染色, 显色成像后对电泳条带进行统计分析, 然后用 POPGENE 软件进行数据处理, 完成等位基因数、观测杂合度 (H_o) 与期望杂合度 (H_e) 及平衡偏离指数 (P_{hw}) 的计算。

表 1 微卫星标记引物序列、等位基因频率、大小及杂合度、Hardy-Weinberg 平衡偏离指数统计

Tab. 1 Information on the microsatellite markers: primer sequences, allele frequency, size, heterozygosity and Hardy-Weinberg parameters

| 位点名称 locus | 核心重复序列 repeat motif | 引物序列 (5'-3') primer sequence | 等位基因数 allele number | 扩增产物大小 大小/bp size range | 退火温度/°C annealing temperature | 观测杂合度 H_o | 期望杂合度 H_e | 平衡偏离指数 P_{hw} | GenBank 登录号 accession no. |
|---------------|--|---|------------------------|-------------------------------|----------------------------------|----------------|----------------|--------------------|------------------------------|
| newpao207 | (AC) ₉ | F:GAATGCCTGCTCTGGTCTC R:TGGCAGTGGAAAGAGGTGAG | 4 | (210 ~ 224) | 57.2 | 1.000 0 | 0.648 3 | 0.000 025 * | HQ528209 |
| newpao221 | (TCTG) ₃ | F:GACGTCCCAGTGTCTCTGC R:CAGGAAGTGAACCTGCTACTG | 8 | (210 ~ 224) | 56.8 | 0.875 0 | 0.839 3 | 0.425 486 | HQ528214 |
| newpao65 | (AG) ₁₂ (G) ₄ (AG) ₇ | F:CCTGATTTCCTCTCTCTTC R:AGCTGGTGGCTAGTTAGCTT | 2 | (275 ~ 279) | 58 | 0.781 2 | 0.705 9 | 0.934 935 | HQ528101 |
| newpao241 | (AG) ₁₂ | F:GCACCAGATCTGTGTCAGCATAGT R:GAACCAGGCAAGGACACGT | 4 | (190 ~ 206) | 57.2 | 0.516 1 | 0.531 5 | 0.934 935 | HQ528221 |
| newpao248 | (TG) ₁₀ TC(TG) ₂₂ | F:CTCATCCACTGATGATTTTCC R:AATCCATCCTTGGAGTCTCTC | 9 | (228 ~ 238) | 57.6 | 1.000 0 | 0.869 9 | 0.000 000 * | HQ528228 |
| newpao82 | (TC) ₇ | F:CCTTTCCTCTCCGCTTCCC R:TCCTGAGGTGGTTGATTAGAA | 4 | (262 ~ 268) | 58.1 | 0.322 6 | 0.291 4 | 0.984 917 | HQ528112 |
| newpao206 | (AC) ₂₁ | F:GCCCCGTCGGTGAATGAAAC R:CATTCTGCCTCCAAGGCC | 2 | (210 ~ 214) | 59.3 | 0.451 6 | 0.355 4 | 0.119 779 | HQ528208 |
| newpao40 | (TG) ₈ CG(TG) ₄ | F:CGCTGTTTCAGCTGTCTAGTT R:TTGGGAGCCACAGCAGCC | 2 | (210 ~ 224) | 58.7 | 0.625 0 | 0.436 5 | 0.012 587 | HQ528078 |
| newpao59 | (CA) ₃₀ | F:CAGGTCCTGAGGGTAGG R:CACCGCCCTTCTGGTTAATG | 9 | (124 ~ 136) | 57.1 | 0.793 1 | 0.886 9 | 0.002 203 | HQ528095 |
| newpao50 | (GA) ₁₄ | F:AATCCGAGGCGGTGGAGTC R:TAACGCCCGTCACTTCTCT | 6 | (157 ~ 169) | 58.9 | 0.933 3 | 0.803 4 | 0.013 874 | HQ528086 |
| newpao151 | (TG) ₄ TC(TG) ₁₀ | F:TCACCAGCGGAGATAAGCCC R:GTATCCGCACCAGGAAGGATG | 5 | (136 ~ 170) | 59.5 | 0.875 0 | 0.739 6 | 0.134 484 | HQ528167 |
| newpao174 | (AC) ₇ | F:CACACTCTCAGTGCTTGAGG R:CTTTAACGCCAGGTTCTC | 3 | (195 ~ 205) | 58.3 | 0.312 5 | 0.322 9 | 0.817 395 | HQ528185 |
| newpao46 | (GT) ₅ GA(GT) ₃ GAGTGA(GT) ₆ | F:GCACAATGACCCGCTATAAT R:CCCCTCTCTCTCACACAC | 6 | (193 ~ 201) | 58.1 | 0.413 8 | 0.830 0 | 0.000 012 * | HQ528082 |
| newpao06 | (TC) ₇ C(TC) ₂ | F:CTGCGACCAAAGTCATTTCAA R:GCCAATCAGATTTAGCTGGG | 2 | (156 ~ 168) | 58.4 | 0.625 0 | 0.500 0 | 0.150 55 | HQ528058 |
| newpao183 | (AG) ₅ | F:TGATACTGTGTGGCGTGA R:GGAGCCTGGAGAGGAGAAGA | 3 | (208 ~ 216) | 59 | 0.593 8 | 0.563 5 | 0.643 468 | HQ528194 |
| newpao262 | (TCC) ₃ | F:TCGCATTCAGTCATTTAAGC R:CTCCCTCTCTCCACCTC | 5 | (234 ~ 240) | 57.7 | 0.645 2 | 0.693 3 | 0.117 040 | HQ528240 |
| newpao56 | (TG) ₇ (AG) ₃₁ | F:ATCGGCCAAGAGAAACACAC R:GTCGTCATCTGTGGGACTT | 5 | (217 ~ 223) | 58.9 | 0.806 5 | 0.789 5 | 0.000 18 * | HQ528092 |
| newpao247 | (AG) ₇ | F:AGGAGCAGGAGTGCTGATGT R:ATCGACTCTGCTTCCATTCG | 3 | (285 ~ 291) | 58.6 | 0.645 2 | 0.647 3 | 0.000 243 * | HQ528227 |
| newpao249 | (TC) ₂₇ TT(TC) ₇ | F:GGTGGATAATTGTGGGATGTC R:GCGAATTCATAGGTGATGT | 3 | (235 ~ 245) | 58 | 0.875 0 | 0.636 4 | 0.028 076 | HQ528229 |
| newpao251 | (AG) ₁₆ | F:CGATAACATGAACCACACGTA R:TGTATCCCATCATCCTTTGC | 4 | (195 ~ 199) | 57.9 | 0.968 8 | 0.751 5 | 0.131 526 | HQ528231 |
| newpao202 | (CA) ₂₀ C | F:AGAGGGAGAGAGAGGAGAAGAA R:GGCCACAAAGCAAGTCCC | 2 | (193 ~ 195) | 58.8 | 0.406 2 | 0.328 9 | 0.168 474 | HQ528205 |

续表 1

| 位点名称 locus | 核心重复序列 repeat motif | 引物序列 (5'-3') primer sequence | 等位基因数 allele number | 扩增产物大小 小/大 bp size range | 退火温度/°C annealing temperature | 观测杂合度 H_o | 期望杂合度 H_e | 平衡偏离指数 P_{hw} | GenBank 登录号 accession no. |
|---------------|--|--|------------------------|--------------------------------|----------------------------------|----------------|----------------|--------------------|------------------------------|
| newpao194 | (TGC) ₃ | F:GACATCCCAGTGTGAGTCCT R:ACACAGAGCGTGAGAAGTGA | 3 | (226~236) | 58.9 | 0.516 1 | 0.611 8 | 0.284 347 | HQ528200 |
| newpao02 | (GA) ₂₀ | F:CATCACTGCACCTTGGAAATGT R:GGCCTAATCCCACACAAAT | 6 | (207~217) | 58.1 | 0.678 6 | 0.728 6 | 0.072 594 | HQ528055 |
| newpao209 | (TC) ₅ | F:GAAGAGTGCTCCAGCTCAGT R:GAGGAGGAGGAGGATAAGGA | 2 | (264~276) | 58.6 | 0.406 2 | 0.328 9 | 0.168 474 | HQ528211 |
| newpao220 | (TG) ₄₁ | F:ATTTGTCAAAGGCTCGTCAT R:TCCTTCAGCAAAGACTCACA | 7 | (215~229) | 57.9 | 0.774 2 | 0.859 9 | 0.03 226 | HQ528213 |
| newpao199 | (TG) ₅ | F:TCAGGGTTACAGGAGCTGAT R:AGCTTGACAAGTCCCACCTA | 2 | (286~306) | 58.7 | 0.625 0 | 0.436 5 | 0.012 587 | HQ528203 |
| newpao198 | (AG) ₄ CACG(CT) ₇ | F:CCGTGTTGTGAAATAGCAAA R:CAGGCATTACACCAATCAGA | 2 | (242~244) | 57.7 | 0.500 0 | 0.381 0 | 0.069 370 | HQ528202 |
| newpao60-1 | (GGA) ₃ | F:GATGGTTTATGCTCGACAAC R:CTGTGCTTACCCTCACTGCT | 3 | (275~279) | 57.9 | 0.812 5 | 0.645 3 | 0.012 913 | HQ528096 |
| newpao60-2 | (TCTG) ₆ (TGTCTG) ₂ | F:GACATTCTGTGGGATTAGCTG R:AGTGACTCACATTGCCAGAAC | 3 | (201~207) | 58.2 | 0.677 4 | 0.677 4 | 0.929 096 | HQ528096 |
| newpao39 | (GGA) ₆ | F:AGCCTGGAGAGGAGAAGAGAG R:CCATGTTGACAAAGCTCGG | 2 | (190~206) | 59.2 | 0.500 0 | 0.381 0 | 0.069 370 | HQ528077 |
| newpao195 | (TTG) ₃ | F:GGCCTCTGTTCAAAAGCTC R:ACAGCTGAGGGGACAAGGG | 2 | (228~238) | 58.5 | 0.406 2 | 0.328 9 | 0.168 474 | HQ528201 |

注: * 代表显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡。

Notes: * indicated significant deviation from HWE.

2 结果

2.1 微卫星阳性克隆的筛选

经菌落 PCR 筛选后,本次实验共挑取 269 个克隆,得到 177 个阳性克隆,阳性克隆率为 65.79%。菌落 PCR 检测结果表明,这些阳性克隆的插入片段大小为 200~800 bp。经测序后发现仅 6 个克隆不含微卫星序列,微卫星序列阳性率达到 96.95%。共获得微卫星序列 191 条,提交 GenBank 后获得相应登录号为 HQ528054-HQ528244。除探针中使用的 CA 重复外,还得到 TC、AG、ACA 等其它类型的重复序列。使用 BLAST 软件将这 191 条微卫星序列与已公布的微卫星序列进行比对,未发现有重复。

对所有微卫星序列按照 Weber 划分标准进行划分,其中完美型(perfect)142 个,占 74.35%;非完美型(imperfect)28 个,占 14.66%;混合型(compound)21 个,占 10.99%。在所获得的微卫星序列中,两碱基的重复类型最多,占 87.91%;三碱基重复占 8.45%;四碱基重复占 3.02%;其

余不到 1%。

2.2 引物设计与多态性检测

在获得的 191 条微卫星序列中,有 38 个序列由于侧翼序列不完全无法设计引物,共设计引物 153 对,挑选 50 对引物合成并进行扩增。经过优化 PCR 反应条件进行扩增后,对海阳牙鲆野生群体 32 个体进行遗传多态性分析,结果表明,31 对引物在群体中能稳定扩增出相应的产物(图 1),其扩增片段具有多态性。其余 19 对引物扩增产物呈单态性 or 无产物。

用 POPGENE 软件对微卫星多态性进行分析,不同的引物扩增出的等位基因数差异较大,从 2 到 9 不等,所检测到的扩增片段长度范围为 156~306 bp,共计 132 个等位基因,平均等位基因数(A)为 3.939 4,平均有效等位基因数(N_e)为 3.052 2,平均观察杂合度(H_o)为 0.650 1,平均期望杂合度(H_e)为 0.586 6。各位点的 Hardy-Weinberg 平衡指数在 0.012 587~0.984 917 变动。其中有 5 个位点出现显著偏离,其偏离原因可能为取样数过少所致(表 1)。

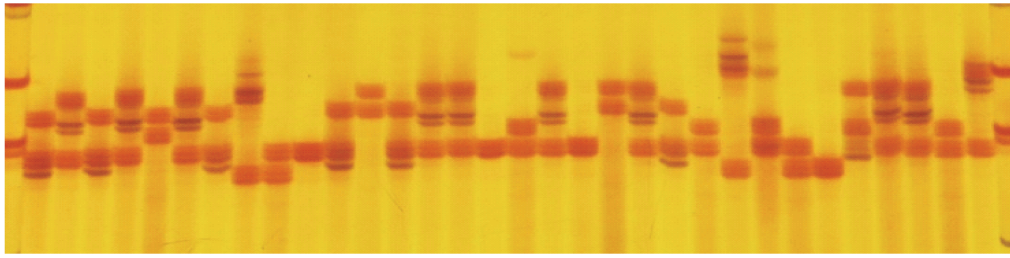


图1 微卫星引物 Newpao151 对牙鲆基因组 DNA PCR 扩增电泳图

Fig.1 Genomic DNA of olive flounder by primer Newpao151

3 讨论

目前,使用磁珠富集法进行微卫星序列的筛选已被广泛应用。在已有的研究中,具体步骤上的区别主要是内切酶和接头的选用,以及磁珠筛选杂交的后续操作。可以用 *Mbo*I 酶酶切基因组,使基因组片段分布在 1 000 ~ 200 bp;也可以不选用限制性内切酶,而是雾化基因组 DNA,用一个平末端接头 SNX 连接到经过酶切的基因组 DNA 片段上^[25]。但是利用磁珠富集法获取阳性克隆的效率一般都较低,如从斑节对虾基因组中分离微卫星位点,通过杂交筛选,在总共 2 417 个克隆中,有 406 个为阳性克隆,阳性克隆率仅为 16.8%。

近几年研究者采用了将磁珠吸附微卫星富集与放射性同位素相结合的方法,进行微卫星富集文库的构建^[26-28]。此种方法在磁珠吸附微卫星富集方法的基础上,增加了使用含有重复序列的同位素探针对初次转化所得的克隆进行二次筛选。此种方法灵敏度高、目的性强,且获得的阳性克隆微卫星含量一般都较高,KANDPAL 等^[26]为 90%,李齐发等^[27]为 77%,EDWARDS 等^[28]为 70%。此种方法可获取多态信息含量高的微卫星标记,但由于此种方法需要使用同位素进行二次筛选,若使用此种方法进行大规模的微卫星标记开发,则显得较为繁琐。

本研究对传统磁珠富集法的酶切步骤进行了改进,采用了双酶切体系,双酶切体系 *Rsa*I 和 *Bst* UI 能够产生平末端的 DNA 片段,并且能够获得多样性高的基因组 DNA 片段。同时由于两种酶切都产生平末端,因此不需要根据不同的内切酶来设计不同的连接接头。酶切后的连接反应也是非常关键的一步,在此连接体系中多加入了限制性内切酶 *Xmn*I。*Xmn*I 能够有效阻止接头的自连,提高了下一步的效率。本方法获得的富集文库阳性克隆率

高,在总共挑取的 269 个克隆中,有 177 个为阳性克隆,阳性克隆率为 65.79%,与传统方法相比有显著提高;所测 177 个阳性克隆中,共有 171 个含有微卫星,微卫星序列含量达到 96.95%。说明此种方法具有优势,一次可获得大量的微卫星序列,且操作简便易行、节约经费,可使用此方法进一步大规模开发牙鲆基因组 DNA 微卫星标记。

微卫星核心序列突变率相对较高 ($10^{-5} \sim 10^{-3}$),微卫星长度的变化是微卫星多态性的基础^[29]。WEBER^[30]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多态信息含量 (polymorphic information content, PIC),当 $n \geq 16$ 时,可提供的 PIC 在 0.5 以上^[31]才可以进行相应的多态性分析。SMULDERS 等^[32]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,但重复次数少的微卫星,仅能在种间产生多态性。本研究在磁珠富集的过程中,磁珠经过多个洗涤的过程,可以将一些因重复数目较少而附着不牢固的微卫星序列洗去,使所获得的微卫星序列较长,重复次数较多,避免了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。本研究所得到的微卫星序列重复数在 10 次以上的有 168 个,占总数的 88.39%,这对筛选多态信息含量高的分子标记,进行种群遗传多样性研究具有一定的参考价值。

本研究得到的微卫星标记可以用于牙鲆群体多样性鉴定和遗传学分析,从分子水平对中国牙鲆养殖群体的性状退化、变异水平和近交衰退进行有效分析,建立分子遗传选育技术方法,为种质鉴定、种苗放流等提供理论依据,实现牙鲆种质资源的科学管理及持续利用。另外,微卫星标记也是用于基因作图的一种重要的分子标记,如果开发出更多的牙鲆微卫星标记,则可以用来构建牙鲆的微卫星标记遗传连锁图谱,这对于种系评估、

品种选育都具有重要的意义。

参考文献:

- [1] 刘萍,孟宪红,何玉英,等. 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)黄、渤海3个野生地理群体遗传多样性的微卫星 DNA 分析[J]. 海洋与湖沼,2004,35(3):232-257.
- [2] SAKAMOTO T, DANZMANN R G, GHARBI K, et al. A microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) characterized by large sex-specific differences in recombination rates [J]. Genetics,2000,155(3):1331-1345.
- [3] 刘福平,白俊杰,宋红梅,等. 尼罗罗非鱼微卫星标记与主要生长性状的相关性分析[J]. 水产学报,2010,34(2):169-177.
- [4] OZAKI A, SAKAMOTO T, KBOO S, et al. Quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Molecular Genetics and Genomics,2001,265(1):23-31.
- [5] O' MALIEY K G, SAKAMOTO T, DANZMANN R G, et al. Quantitative trait loci for spawning date and body weight in rainbow trout: testing for conserved effects across ancestrally duplicated chromosomes [J]. Journal of Heredity,2003,94(4):273-284.
- [6] CHEN S L, MIAO G D, SHAO C W, et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from fat greenling (*Hexagrammos otakii*) [J]. Conservation Genetics,2009,10(5):1429-1431.
- [7] XING S C, XU G B, YANG G P, et al. Isolation and characterization of 30 novel polymorphic microsatellite loci from Japanese halfbeak, *Hyporhamphus sajori* (Temminck et Schlegel, 1846) [J]. Conservation Genetics,2009,10(6):1927-1930.
- [8] 陈松林. 水产生物技术研究的回顾、最新进展及前景展望[J]. 水产学报,2007,31(6):825-840.
- [9] 徐田军,董秋芬. 青石斑鱼微卫星标记的筛选及群体多态性分析[J]. 水产学报,2007,31(6):841-847.
- [10] 战爱斌,胡景杰,包振民,等. 富集文库-菌落原位杂交法筛选栉孔扇贝的微卫星标记[J]. 水产学报,2008,32(3):353-361.
- [11] 白俊杰,叶星,全英春,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.
- [12] 张玉勇,白庆利,贾智英,等. 虹鳟、山女鳟及其杂交子代(虹鳟♀×山女鳟♂)的微卫星分析[J]. 水产学报,2009,33(2):188-195.
- [13] 孙效文,鲁翠云,梁立群. 磁珠富集法分离草鱼微卫星分子标记[J]. 水产学报,2005,29(4):482-486.
- [14] 孙效文,梁立群. 磁珠富集法制备大口鲶的微卫星分子标记[J]. 水产学报,2006,30(2):185-191.
- [15] WELLINGTON M, DANIEL DS, KARINA P, et al. New softwares for automated microsatellite marker development [J]. Nucleic Acids Research,2006,34(4):4691-4695.
- [16] 孙效文,梁利群. 磁珠富集法筛选虾夷贝类微卫星序列[J]. 中国水产科学,2006,13(5):749-755.
- [17] COIMBRA M R M, KOBAYASHI K, KORETSUGU S, et al. A genetic linkage map of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Aquaculture,2003,220(1-4):203-218.
- [18] SEKINO M, HRARA M. Isolation and characterization microsatellite DNA loci in Japan flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Molecular Ecology,2000,9:2201-2203.
- [19] SEKINO M, HRARA M, TANIGUCHI N. Loss of microsatellite and mitochondrial DNA variation in hatchery strains of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Aquaculture,2002,213:101-122.
- [20] KIM W J, KIM K K, LEE J H, et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Molecular Ecology Notes,2003,3:491-493.
- [21] 王伟,尤锋,高天翔,等. 山东近海牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)自然和养殖群体10个微卫星基因座位的遗传多态性分析[J]. 海洋与湖沼,2004,35(6):530-537.
- [22] LIU Y, CHEN S, LI B. Assessing the genetic structure of three Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) stocks by microsatellite markers [J]. Aquaculture,2004,243(1-4):103-111.
- [23] 陈微,张全启,于海洋,等. 牙鲆微卫星标记的筛选及群体多样性分析[J]. 中国水产科学,2005,12(6):682-687.
- [24] 马洪雨,姜运良,岳永生. 一种从鱼类肌肉组织中提取基因组 DNA 的简易方法[J]. 生物技术通讯,2005,16(5):531-532.
- [25] JAMES P C. A high through-put procedure for capturing microsatellites from complex plant genomes [J]. Plant Molecular Biology Reporter,1998,16:341-349.
- [26] KANDPAL R P, KANDPAL G, WEISSMAN S M. Construction of libraries enriched for sequence

- repeats and jumping Ys, and hybridization selection for region-specific markers [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1994, 91 (1): 88-92.
- [27] 李齐发,赵兴波,罗晓林,等. 牦牛基因组微卫星富集文库的构建与分析[J]. 遗传学报, 2004, 31(5): 489-494.
- [28] EDWARDS K J, BARKER J H, DALY A, *et al.* Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants[J]. Biotechniques, 1996, 20: 758-760.
- [29] 刘志毅,相建海. 微卫星在海洋动物遗传分析中的应用[J]. 海洋科学, 2001, 25(6): 11-13.
- [30] WEBER J L. Informativeness of human (dC-dA)_nC-(dG-dT)_n polymorphisms [J]. Genomics, 1990, 7: 524-530.
- [31] ORIT G, PEARSE D E, AVISE J. Phylogenetic assessment of length variation at a microsatellite locus [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1997, 94(10): 745-749.
- [32] SMULDERS M J M, BREDEMEIJER G, RUSKORTEKASS W, *et al.* Use of short microsatellites from data base sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esc* Lent mol/L c Ltivars and accessions of other *Lycopersicon* species [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1997, 97: 264-272.

· 会议信息 ·

第八届世界华人鱼虾营养学术研讨会



由中国水产学会水产动物营养与饲料专业委员会主办,上海海洋大学、四川农业大学、通威股份有限公司联合承办的“第八届世界华人鱼虾营养学术研讨会”(简称“世华会”)将于2011年9月6-10日在成都举行。大会主题为“营养健康安全可持续发展”。

一、主要议题

- (1) 蛋白质、氨基酸营养与替代蛋白源;
- (2) 糖类营养;
- (3) 脂肪营养;
- (4) 维生素、矿物质营养;
- (5) 营养、健康与环境;
- (6) 水产品品质与安全;
- (7) 饲料加工工艺与饲养管理;
- (8) 繁殖、仔稚鱼(虾)营养与饲料;
- (9) 其它。

本次“世华会”将设立“饲料企业可持续发展战略论坛”(简称“论坛”),邀请国内外著名饲料企业负责人、知名企业策划人和知名学者就企业管理和技术创新过程中遇到的难题和热点问题展开讨论,包括中国水产饲料行业发展战略;企业管理;产品创新;品牌打造;团队建设等议题。

二、会议日程

2011年9月6日为报到注册时间;9月7-9日为学术活动时间;9月9日下午为“饲料企业可持续发展战略论坛”;9月10日开始会后旅游。

会议地点为四川省人民政府金牛宾馆(成都市金泉路2号)。

三、秘书组联系人

黄旭雄, 华雪铭

通讯地址:上海市临港新城沪城环路999号,上海海洋大学水产与生命学院(邮编:201306)

电话:021-61900416, 61900463; 传真:021-61900416

E-mail: 8shh@shou.edu.cn

Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)

ZHANG Xiao-jun^{1,2}, XU Gen-bo², LIAO Xiao-lin², ZHANG Jia-bo¹, CHEN Song-lin^{2*}

(1. Fisheries College, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fishery Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) is one of economically important fish in China. It is distributed widely over the Bohai Sea, the Yellow Sea and the South Sea in China, North Korea, Japan and along the east coastline of Russia. As its natural resource is exhausting gradually, olive flounder has become an important cultured fish in China. Polymorphic available DNA markers are needed for its genetic research. Microsatellites recently have become an extremely popular marker in a wide variety of genetic investigations. In this research, genomic DNA was extracted from fin of olive flounder collected from one locality along the Chinese coast. The genomic DNA was digested by using both *Rsa* I and *Bst* UI polymerase. And then a microsatellite-enriched genomic library was constructed. By using (GA)₁₃ as probes, 177 positive clones were identified from 269 clones, and 191 microsatellites were found. Among the 191 microsatellites, 74.35% were perfect, 14.66% were imperfect and 10.99% were compound type. 50 markers were assessed using 32 individuals. Of the 50 loci 31 were found to be polymorphic. The result showed that the number of alleles ranged from 2 to 9, with an average of 3.939 4 alleles per locus. The number of effective alleles per locus is 3.052 2. The values of observed and expected heterozygosity per locus is 0.650 1 and 0.586 6, respectively. The values of Hardy-Weinberg equilibrium ranged from 0.012 587 to 0.984 917. These markers will be useful for population structure assessment, molecular marker-assisted selection and genetic linkage map construction for this species.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; microsatellite; FIASCO; polymorphism

Corresponding author: CHEN Song-lin. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

· 勘误 ·

本刊2011年第6期第928页图2中(a)和(b)的照片位置错误,正确的应该是两个照片位置互换,特此更正。