

脊尾白虾微卫星富集文库的构建与多态性标记的筛选

贾舒雯^{1,2}, 刘萍^{2*}, 韩智科², 李健², 潘鲁青¹

(1. 中国海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要: 采用人工合成的生物素标记(AG)₁₅探针及磁珠富集法构建了脊尾白虾基因组微卫星富集文库。将脊尾白虾基因组DNA经Hae III酶切后,收集400~1 200 bp片段,连接特定接头,与生物素标记(AG)₁₅探针杂交并捕获含有微卫星的DNA片段,然后连接到pMD18-T载体中,构建脊尾白虾微卫星富集文库。随机挑取947个克隆,经菌落PCR检验,其中667个为阳性克隆。从阳性克隆中随机选取184个克隆进行测序,有150个克隆含有微卫星序列,共获得199个微卫星序列,其中完美型158个(79.4%),非完美型27个(13.6%),复合型14个(7.0%)。根据微卫星序列,设计了119对微卫星引物,64对扩增出稳定的具有特异性的条带,经30个脊尾白虾个体进行多样性评价后,有26个位点表现出多态性。26个微卫星位点获得的等位基因数从3~16个不等,平均每个位点扩增得到6.5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0.111~0.929、0.246~0.932、0.231~0.909。本研究开发的微卫星位点将为脊尾白虾种群多样性研究、家系识别和种质鉴定提供有效的工具。

关键词: 脊尾白虾; 富集文库; 微卫星标记; 遗传多样性

中图分类号: S 917

文献标志码: A

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)系热、温带海区底栖虾类,广泛分布于中国大陆沿岸和朝鲜半岛西岸的浅海低盐水域,以渤海和黄海数量最大,为重要的小型经济虾类之一^[1]。由于脊尾白虾具有广温性、广盐性、广食性、生长快、养殖周期短、繁殖力高等特点,近年来,脊尾白虾养殖发展迅速,已经成为池塘单养,混养和虾池秋冬季养殖的重要品种^[2]。但是脊尾白虾的苗种主要依赖野生资源,良种选育工作进展缓慢,而且随着养殖规模的增加,脊尾白虾病害也有显现^[3-4]。因此保护脊尾白虾种质资源,开展良种选育工作,培育抗病能力强、抗逆性强的良种是脊尾白虾养殖业急需解决的问题。

目前,我国已报道的脊尾白虾的研究主要集中在养殖繁育技术,生物学和生态学^[5-8],而在种群遗传结构方面的报道较少。遗传多样性和种群

结构研究是保护野生脊尾白虾种质资源和选育良种的基础,因此需要有效的分子标记研究遗传多样性和种群结构,为脊尾白虾资源保护和良种选育提供有效数据。

微卫星(microsatellite),由1~6个核苷酸的串联重复片段构成,均匀分布于真核生物基因组中,具有含量丰富、高多态性、共显性、遵循孟德尔遗传定律等优点,已经广泛应用于水产动物的种质鉴定,遗传多样性分析,基因定位,遗传图谱的构建等方面^[9]。目前国内外学者已开发了日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)^[10]、中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)^[11]、斑节对虾(*Penaeus monodon*)^[12]、中国龙虾(*Panulirus stimpsoni* Hoehuis)^[13]等虾类的微卫星标记。

本研究利用(AG)₁₅探针构建脊尾白虾微卫星富集文库筛选微卫星标记,为今后脊尾白虾遗

收稿日期:2011-07-06 修回日期:2011-09-27

资助项目:国家自然科学基金项目(30871933,40806067);科技部农业科技成果转化资金项目(2010GB23260589)

通讯作者:刘萍,E-mail:liuping@ysfri.ac.cn

传多样性分析、遗传图谱构建、遗传育种评估、亲子代鉴定提供有效的遗传标记。

1 材料与方法

1.1 样品来源

实验用31尾脊尾白虾采自黄海的海州湾,实验室-80℃保存。

1.2 脊尾白虾微卫星富集文库的构建

参照宋春妮等^[14]微卫星富集方法构建脊尾白虾基因组微卫星富集文库。

基因组DNA的提取,酶切及接头连接参照刘萍等^[15]的方法,从脊尾白虾腹部肌肉中提取基因组DNA,溶解于灭菌ddH₂O中。利用限制性内切酶Hae III建立50 μL的酶切反应体系,包括DNA(600 ng/μL)10 μL,5 μL 10× Buffer,2 μL Hae III(10 U/μL),33 μL ddH₂O。37℃水浴4 h,80℃灭活30 min。用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物,用DNA胶回收试剂盒回收400~1 200 bp DNA片段。接头为OligoA(5'-CTCTTGCTTGAATTTCGGACTA-3')和OligoB(5'-pTAGTCCGAATTCAAGCAAGAGCACA-3)经退火形成。接头连接采用20 μL反应体系:约500 ng DNA片段,2 μL 10× Buffer,约100 ng接头,1 μL T₄ DNA连接酶,ddH₂O补至20 μL。16℃下连接过夜。

连接产物预扩增 接头连接产物经DNA纯化试剂盒纯化后,用作模板,OligoA作为引物,进行PCR预扩增。建立20 μL反应体系:2.0 μL 10× PCR Buffer,1.6 μL dNTPs(各2.5 mmol/L),1.2 μL MgCl₂(25 mmol/L),1.0 μL引物(100 μmol/L),0.2 μL Taq酶(5 U/μL),连接产物2.0 μL,ddH₂O补至20 μL。PCR反应程序:95℃预变性5 min;95℃变性45 s,55℃退火45 s,72℃延伸45 s,25个循环;72℃延伸5 min。

杂交并富集含有微卫星序列的DNA片段采用生物素探针(AG)₁₅与预扩增产物杂交。杂交体系:6×SSC+0.1% SDS 70 μL,PCR产物25 μL,Biotin(AG)₁₅探针5 μL,ddH₂O补足至100 μL。杂交条件为:95℃变性5 min,然后在68℃下杂交30 min,杂交反应在PCR仪中进行。冷却至室温的杂交产物加入300 μL的TEN₁₀₀溶液,然后将杂交混合液加到经过洗涤重悬的磁珠中,在室温下放置30 min。然后用400 μL缓冲液TEN₁₀₀₀于室温下洗

涤3次,每次5 min。再用400 μL 0.2×SSC+0.1% SDS于室温下洗涤3次,每次5 min。最后用1×SSC洗脱2次。加入50 μL TE(pH 8.0),于95℃水浴5 min,其间不时吹打均匀。然后用磁力架固定磁珠后,迅速吸出上清液。以含有目的DNA片段的上清液为模板,OligoA为引物,进行PCR扩增。反应体系及反应程序同预扩增。

连接T-载体与克隆 将纯化后的PCR产物与pMD18-T载体(TaKaRa)相连,转化进大肠杆菌感受态细胞Top10中。经蓝白斑筛选后,挑取白色菌落到盛有1 000 μL含有Amp的LB液体培养基中,37℃生长过夜,4℃保存。

用菌落PCR检测阳性克隆,OligoA作为引物,反应体系:2.0 μL 10× PCR Buffer,1.6 μL dNTPs(2.5 mmol/L),1.2 μL MgCl₂(25 mmol/L),1.0 μL引物(100 μmol/L),0.2 μL Taq酶(5 U/μL),菌液1.0 μL,ddH₂O补至20 μL。反应程序同预扩增。PCR产物用2%的琼脂糖检测,阳性克隆送到上海桑尼生物科技有限公司测序。

1.3 序列分析、引物设计及筛选

去除载体及接头后,使用SSRhunter软件查找微卫星位点。然后用DNAMAN(version 6.0)软件查找冗余序列。按高焕等^[16]的标准选取14个或14个重复以上的单碱基重复序列,7个或7个重复以上的2碱基重复序列,5个或5个重复以上的3碱基重复序列,4个或4个重复以上的4碱基重复序列并且侧翼序列足够长的微卫星位点,利用软件Primer Premier 5.0进行引物设计。从31尾脊尾白虾中随机选取5个个体的DNA等量混合作为模板,使用梯度PCR进行选择最佳退火温度。然后使用5个个体的DNA进行多态性筛选,再用30个体进行群体验证。

1.4 数据分析

用POPGENE32计算等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、期望杂合度(H_e)、观测杂合度(H_o)和检验Hardy-Weinberg平衡。用BOTSTEIN等^[17]的公式计算微卫星位点多态信息含量(polymorphism information content, PIC)。

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

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。

多态位点杂合度(观测值), 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), $H_e = 1 - \sum P_i^2$, P_i 为该位点上第 i 个等位基因的频率。

2 结果

2.1 克隆与测序结果

随机挑取 947 个菌落,经菌落 PCR 检测后,共有 667 个阳性克隆,阳性克隆率为 70.43%。随机选取 184 个阳性克隆进行测序,利用 DNAMAN (version 6.0) 软件除去冗余序列后,有 150 个 (81.52%) 克隆含有微卫星序列,共获得 199 个微卫星序列。脊尾白虾微卫星分布情况见表 1。

在脊尾白虾基因组中,微卫星核心序列 (AG)_n 在所有微卫星序列中最多,所占的比例为 88.94% (177/199),其次是 (AC)_n 为 5.03%,此外还检测到

(A)_n、(GC)_n、(CAC)_n、(CTC)_n、(ATC)_n、(TAC)_n、(CTT)_n、(TCA)_n、(TTA)_n、(AGAT)_n 等核心序列类型,共占检测到的微卫星数目的 6.03%。根据 WEBER^[18] 提出的标准,将微卫星序列进行分类,共发现完美型 (perfect) 微卫星 158 个 (79.4%),非完美型 (imperfect) 微卫星 27 个 (13.6%),复合型 (compound) 微卫星 14 个 (7.0%)。

2.2 引物设计及 PCR 优化结果

选取侧翼序列足够长的微卫星位点,利用软件 Primer Premier 5.0 进行引物设计,共设计 119 对引物。共有 64 对扩增出稳定的具有特异性的条带。经 30 尾脊尾白虾基因组 DNA 检测,有 26 对有良好多态性。脊尾白虾 26 个微卫星标记的基本特征及主要遗传学数据的估算见表 2。

表 1 脊尾白虾基因组微卫星分布情况

Tab. 1 Characterization of microsatellites in *E. carinicauda*

脊尾白虾微卫星核心序列碱基的频率分布 the frequency distribution of nucleotides of microsatellite core sequence of <i>E. carinicauda</i>			脊尾白虾微卫星长度的频率分布 length distribution of microsatellite in the genome of <i>E. carinicauda</i>		
核心序列的碱基数 nucleotides number of core sequence	个数 numbers	百分比/% percentage	重复次数 repeat numbers	个数 numbers	百分比/% percentage
单碱基 single nucleotide	2	1.0	7 ~ 10	31	15.58
两碱基 dinucleotide	186	93.47	11 ~ 20	52	26.13
三碱基 trinucleotide	10	5.03	21 ~ 30	88	44.22
四碱基 tetranucleotide	1	0.5	31 ~ 40	28	14.07

表 2 脊尾白虾 26 个微卫星标记的基本特征及主要遗传学数据的估算

Tab. 2 Levels of variability at 26 polymorphic microsatellite loci in *E. carinicauda*

位点 名称 locus	登录号 accession number	核心重 复序列 repeat motif	引物序列 (5'-3') primer sequence	退火 温度/℃ annealing temperature	等位基 因数 no. of alleles	等位基 因大小 范围/bp size range	观测 杂合 度 H_o	期望 杂合 度 H_e	P 检验 value	PIC
EC1316	JF912420	(TC) ₁₆	F:CTTCGGGTGATGGCAGTA R:ACGGGACAGTGTGTTTCT	54	16	356 ~ 545	0.929	0.932	0.830	2 0.909
EC814	JF912421	(TC) ₅	F:TCTTACGGACATCGTTGCCCTTA R:GCACTGTCAAGTCTTGCCAGAT	61	9	248 ~ 361	0.333	0.845	0.000	0* 0.843
EC708	JF912423	(GA) ₂₅	F:TATCTTGCCTTTGTTTCAG R:CTTCATTTCCCATCCTC	54	10	180 ~ 235	0.640	0.838	0.407	9 0.802
EC1018	JF912425	(CT) ₃₆	F:TCCTCCACCATTATTACC R:CCATCCCATTATCTGTTC	51	4	299 ~ 323	0.689	0.692	0.942	7 0.615
EC1210	JF912426	(AG) ₂₄	F:TCAGCAGGTGCTGGAGT R:TCACCGTCCTGTCTTG	60	8	302 ~ 356	0.414	0.794	0.000	0* 0.752
EC1212	JF912427	(CT) ₁₀	F:AACCAAGTTCAACATAAAGGACAT R:TAAAGGAGAAAATGACAGTATGCG	54	4	380 ~ 426	0.500	0.603	0.730	9 0.516
EC1109	JF912428	(TC) ₂₅	F:TTTGACGGACGGAAACAC R:CAGGCATGACAGTGACGATA	58	7	242 ~ 329	0.357	0.797	0.000	0* 0.758
EC1101	JF912429	(TC) ₃₁	F:CCCCGAGAAGAATGTAGT R:ACGCCTCTGGTATCTATC	58	5	465 ~ 550	0.367	0.652	0.000	0* 0.577
EC1020	JF912430	(AG) ₂₂	F:TCTACTTACCTTCTATCG R:TGTGAAATCATTACATAAC	47	5	240 ~ 267	0.111	0.707	0.000	0* 0.645

续表 2

位点名称 locus	登录号 accession number	核心重复序列 repeat motif	引物序列 (5'-3') primer sequence	退火温度/℃ annealing temperature	等位基因数目 no. of alleles	等位基因大小范围/bp size range	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	P 检验 P value	PIC
EC703	JF912431	(TC) ₂₆	F:GCCAGGACTAATGGGATGACTA R:CGCTTTAGCAGAGTTAGGTGTG	60	8	287 ~ 334	0.192	0.842	0.000 0*	0.791
EC137	JF912432	(CT) ₂₈	F:ATACCAAAGCGGACAGAT R:CAACTAAATTCATTGATGATT	51	8	313 ~ 419	0.467	0.773	0.215 7	0.748
EC106	JF912433	(AGAT) ₇	F:GTGGCGTTGAATGAATAT R:ATCTGATGTCTTTGGTGG	51	3	104 ~ 130	0.467	0.371	0.466 4	0.309
EC1013	JF912434	(TC) ₃₂	F:TCATTCCGCTAATCACCA R:TCCCGTTGTGGAGGATTA	55	8	265 ~ 319	0.700	0.845	0.190 0	0.808
EC135	JF912435	(GA) ₁₇ GG(GA) ₉	F:ATTCCTTTGCCCTTGTGTTG R:CTAATGCTTGACCCACAT	55	5	312 ~ 350	0.633	0.787	0.050 5	0.632
EC1102	JF912444	(CT) ₂₄	F:CAACAGAAATAGAATACGAACT R:TGAAAACCAGCAGAAAACA	54	8	257 ~ 318	0.125	0.889	0.000 0*	0.845
EC1211	JF912436	(TC) ₂₆	F:GGAAATGGTAACTCAGACCCAA R:CGGCGAACTCAATTACTGC	60	4	208 ~ 240	0.400	0.663	0.004 2	0.575
EC1021	JF932291	(CT) ₃₂	F:AACTGGTTTTCTTTCC R:AGCCTTGATTTTATGATCTGTC	50	5	298 ~ 381	0.333	0.379	0.009 4	0.356
EC1110	JF912438	(GA) ₂₃ GG(GA) ₆	F:CGTTGGTGATAAACTGGA R:CACGCTTAGCATGGACTA	58	7	238 ~ 279	0.586	0.835	0.065 9	0.802
EC819	JF912439	(AG) ₂₅	F:GGCAAATAATAGTCATAAAAAC R:TATCAAACAACCTTACATCACAT	54	4	419 ~ 437	0.167	0.671	0.000 0*	0.595
EC801	JF912440	(TC) ₂₆	F:TAGCATCAGCACCGTAAA R:GCATCCATTATCCCTTAT	54	5	419 ~ 470	0.448	0.473	0.757 1	0.429
EC1122	JF912441	(TC) ₅ TG(TC) ₂₃	F:CTGACCATCAAGGTGTAA R:GCCAGGAAGGAGAAAATA	58	6	417 ~ 480	0.179	0.751	0.000 0*	0.697
EC709	JF912442	(AG) ₆ ACAG ₅ AGAA(AG) ₄ AT(AG) ₇	F:CTTTGCCCTACTAACTGTGTC R:ACGACTGACCTGAGAAAATCCCT	56	4	380 ~ 404	0.267	0.246	0.996 2	0.231
EC1112	JF932292	(GA) ₃₁	F:CTGGAACCATTAAGAAAC R:CTGACCATCAAGGTGTAA	49	7	404 ~ 490	0.600	0.824	0.087 7	0.787
EC104	JF932293	(GA) ₃₄	F:TTGTGCGGAAGATAAAGAAAG R:GACGAGGAATTGATAGGTTG	52	9	100 ~ 167	0.500	0.823	0.005 4	0.779
EC103	JF912422	(TC) ₂₇	F:AGGCAACAGGACATAACA R:CGTACAGATAGACGGAGA	52	7	287 ~ 334	0.240	0.787	0.000 0*	0.746
EC812	JF912443	(GA) ₂₈	F:AAATCTCTACTACGAATGCCTC R:AGTCTCTATGTTATTGTCACG	57	3	287 ~ 318	0.143	0.603	0.000 5*	0.517

注: * 表示显著性标准经 Bonferroni 法校正后仍严重偏离 Hardy-Weinberg 平衡的位点。

Notes: * Significant departure from expected Hardy-Weinberg equilibrium conditions after correction for multiple tests.

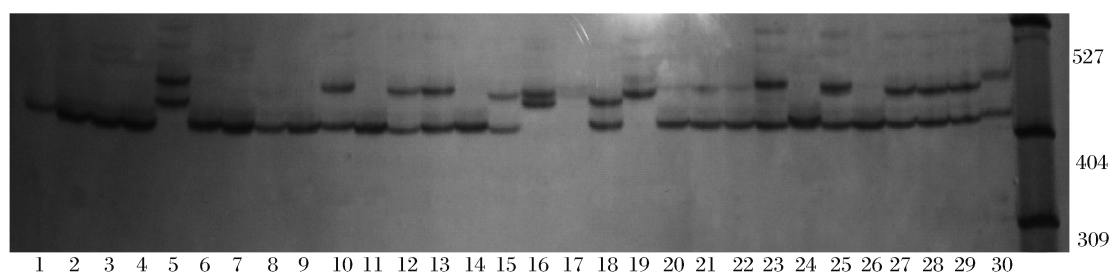


图 1 JF912440 位点在脊尾白虾 30 个个体中扩增得到的电泳图谱

Fig. 1 Loci JF912440 amplified in 30 *E. carinicauda*

2.3 微卫星位点的多态性

统计 26 个位点共获得 169 个等位基因,每个微卫星位点获得的等位基因数差异较大,从 3 ~ 16 个不等,平均每个位点扩增得到 6.5 个等位基因。其中 EC1316、EC708 两个位点分别获得了 16、10 个等位基因,而 EC106、EC812 两个位点分别只获得了 3、3 个等位基因。期望杂合度为 0.246 到 0.932,观测杂合度为 0.111 到 0.929, PIC 值介于 0.231 与 0.909 之间。经 Hardy-Weinberg 平衡检验,显著性标准经 Bonferroni 法校正 ($P < 0.002$) 后,有 11 个微卫星位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡。

3 讨论

3.1 引物设计时微卫星序列的选取

微卫星序列广泛且随机分布在真核生物基因组中,但是不同核心重复序列在基因组中的丰度不同。在甲壳类动物基因组中存在丰富的 (AT/TA)_n、(CT/GA)_n 重复序列。如斑节对虾的 (CT/GA)_n 重复最多^[12];三疣梭子蟹中 (AG/TC)_n 和 (AC/TG)_n 最为丰富^[19];罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 中 (AG/CT)_n 重复最多^[20-21];本实验采用 (AG/TC)₁₅ 为探针筛选脊尾白虾微卫星,结果 88.94% (177/199) 的微卫星核心序列为 (AG/TC)_n,说明 (AG/TC)_n 在脊尾白虾基因组含量丰富。然而,对此也有不同的报

道。如冯建彬等^[10]检测到的日本沼虾微卫星序列中,(CA/GT)_n 最多占 59.09%;而中国对虾基因组中 (AT/TA)_n 最丰富^[16]。这可能是由于种类不同和实验所采用探针与方法不同。本研究仅采用了 (AG/TC)₁₅ 一种类型的生物素探针,因而对脊尾白虾微卫星的类型和分布规律的认识有一些局限性。为了充分了解脊尾白虾微卫星的类型和分布规律,需要对脊尾白虾基因组随机测序或同时使用类型丰富的探针,大量挑取克隆进行测序。

研究表明,微卫星位点的多态性与其核心序列重复次数相关^[16-17,22]。在本研究中除微卫星位点 EC709、EC106 (重复 7 次) 外,其余位点重复次数都在 16 次以上,并且相应的 EC709、EC106 的等位基因的数目、杂合度和多态性信息含量值均较低,而其他位点提供的多态性较高。通过与其他种类相比较 (表 3),在高度多态性微卫星位点中,核心序列重复次数 10 次以上的占的比例较多,除中国蛤蜊 (*Macra chinensis*) 外,其余种类都在 70% 以上,在凡纳滨对虾、脊尾白虾的研究中达到了 100%。这些也充分说明核心序列重复次数与微卫星位点的多态性相关,且高度多态性微卫星位点中,核心序列的重复次数较多。所以在设计引物时,应该选取核心序列重复次数多的序列。

表 3 不同水产动物的多态性微卫星位点核心序列重复次数比较

Tab. 3 The comparison of polymorphic microsatellite core sequence repeats of different aquatic animals

种类 species	多态性微卫星位点 ($P < 0.05$) 核心序列重复次数 core sequence repeats of polymorphic microsatellite loci				重复 10 次以上 / % repeat 10 times more proportion of core sequence	参考文献 references
	3 ~ 10	10 ~ 20	21 ~ 30	30 以上		
栉孔扇贝 <i>Chlamys farreri</i>	2	4	3	1	70.00	[23]
凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	0	0	1	3	100.00	[24]
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	1	6	10	11	96.43	[25]
日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>	5	11	11	3	83.33	[26]
中国蛤蜊 <i>Macra chinensis</i>	8	5	4	1	55.56	[27]
日本蟳 <i>Charybdis japonica</i>	3	8	9	2	86.36	[14]
日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>	2	6	3	1	83.33	[10]
脊尾白虾 <i>Exopalaemon carinicauda</i>	0	2	16	5	100.00	

本文根据 WEBER^[18] 提出的分类标准,研究了脊尾白虾核心序列重复类型的分布特征,结果表明,完美型最多,占 79.4%,这与斑节对虾^[12,28]、日本蟳^[14] 等的研究结果一致。而在日本

沼虾基因组中复合型非常丰富占 53.80%,完美型仅占 25.75%^[10],在中国对虾基因组中非完美型和完美型均有占大多数^[11,16]。上述研究得出不同的结论,可能与不同甲壳动物基因组间的差

异较大或微卫星分离的方法不同相关。如高焕等^[16]采用基因组随机测序研究中国对虾基因组微卫星的分布情况;而徐鹏等^[11]利用中国对虾小片段部分基因组文库进行研究。

3.2 脊尾白虾的遗传多样性

多态信息含量(PIC)是一个遗传标记多态性可提供的信息量的度量,是衡量基因变异程度高低的重要指标。多态信息含量越大,在一个群体中该座位杂合子比例会越大,提供的遗传信息就越多^[29]。当PIC大于0.5时,为高度多态位点;0.25 < PIC < 0.5时为中度多态位点;PIC小于0.25时为低度多态位点^[17]。本研究中23个微卫星位点PIC大于0.5,为高度多态性位点;2个位点(EC1021, EC106)的PIC值介于0.25到0.5之间,为中度多态性位点。海州湾脊尾白虾群体的PIC均值为0.6563。刘楚吾等^[13]开发的15个中国龙虾微卫星位点的PIC均值为0.60;吴勤超等^[30]等开发的36个黄颡鱼微卫星位点PIC均值为0.5511,均低于本研究,所以海州湾脊尾白虾群体的遗传多样性较高。由此可见,所筛选的大部分微卫星位点多态性信息含量丰富,用于遗传多样性分析能获得较好的效果,能为脊尾白虾遗传学分析提供有效的依据。

杂合度是反映群体遗传多样性高低的主要参数。观测杂合度是实际观测到的杂合子在样本中所占的比例;期望杂合度也称基因多样性;有效等位基因数目,主要表示等位基因在群体分布的均匀程度。群体的杂合度高,表明该群体的遗传变异大,群体遗传多样性高。三疣梭子蟹的观测杂合度(H_o)为0.2222~1.0000,期望杂合度(H_e)为0.4367~0.9099^[25];日本螯的观测杂合度(H_o)为0.1875~0.8125,期望杂合度(H_e)为0.2608~0.8136^[14];凡纳滨对虾的观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)分别为0.0345~0.7941、0.5276~0.9291^[24];中国龙虾期望杂合度(H_e)范围为0.48到0.87,平均值为0.71^[13]。与上述种类相比较,脊尾白虾的期望杂合度(H_e)介于0.246~0.932,观测杂合度(H_o)介于0.111~0.929,表明脊尾白虾海州湾群体群体的遗传变异较大,具有较高的遗传多样性,遗传潜力相对较高,对其进行良种选育和种质资源挖掘可能性较高。

经Hardy-Weinberg平衡检验,12个微卫星位点的观测杂合度和期望杂合度之间没有显著差

异,处于Hardy-Weinberg平衡($P > 0.05$),其他位点的显著性标准经Bonferroni法校正($P < 0.002$)后,仍有11个微卫星位点显著偏离Hardy-Weinberg平衡,并表现出显著的杂合子缺失。Hardy-Weinberg平衡,受人为干扰、自然选择、种群的不完全是随机交配、迁移等因素的影响。入海州湾河流的周边有着工业、农业、海水养殖企业、居民日常的生活生产产生的污水排放,污水中含有大量重金属、化肥、农药以及水产养殖废水等,已有报道近年来该海域Zn、Pb和Hg的污染明显加重,还存在Cu的污染,而且该海域氮、磷等污染严重,在7年间发生3次赤潮^[31-32]。由于上述原因海州湾脊尾白虾的遗传多样性可能已经受到环境污染、过度捕捞的影响,导致基因频率发生变化,偏离Hardy-Weinberg平衡。造成杂合子缺失的原因很多,比如自然选择、种内杂交、亚等位基因等^[33]。由于海州湾环境的污染,海州湾脊尾白虾的杂合子缺失可能是由于自然选择引起的,但是确定原因还需进行多方面的研究。

从本研究来看,海州湾脊尾白虾群体具有较高的遗传多样性,但是海水不断的受到污染,脊尾白虾资源面临着严重的威胁。所以应加强对脊尾白虾资源的保护,维持脊尾白虾的自然资源和遗传多样性,以保证脊尾白虾资源的可持续开发利用。

参考文献:

- [1] 李新正,刘瑞玉,梁象秋. 中国长臂虾总科的动物地理学特点[J]. 生物多样性, 2003, 11(5): 393-406.
- [2] 王兴强,曹梅. 低盐和低温对脊尾白虾生长和能量收支的影响[J]. 水生态学杂志, 2010, 3(2): 66-71.
- [3] XU W, XIE J, SHI H, et al. Hematodinium infections in cultured ridgetail white prawns, *Exopalaemon carini cauda* in eastern China [J]. Aquaculture, 2010, 300: 25-31.
- [4] 梁象秋,李亚娟,周昭. 脊尾白虾的幼体发育[J]. 水产学报, 1998, 12(2): 157-168.
- [5] 李多云. 池养脊尾白虾的繁殖,生长及其最大持续轮捕量的初步探讨[J]. 水产学报, 1994, 18(2): 85-92.
- [6] 王绪峨. 脊尾白虾繁殖生物学的初步观察[J]. 动物学杂志, 1987, 22(1): 7-10.
- [7] 陈贤龙,沈江平,沈爱苗. 脊尾白虾人工繁育试验

- [J]. 水产科技情报,1999,26(3):127-130,133.
- [8] 王兴强,阎斌伦,马姓,等. 脊尾白虾生物学及养殖生态学研究进展[J]. 齐鲁渔业,2005,22(8):21-23.
- [9] 孙效文,张晓锋,赵莹莹,等. 水产生物微卫星标记技术研究进展及其应用[J]. 中国水产科学,2008,15(4):689-703.
- [10] 冯建彬,马克异,李家乐,等. 日本沼虾微卫星引物筛选及群体遗传多样性分析[J]. 水产学报,2010,34(5):688-695.
- [11] 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.
- [12] XU Z, DHAR A K, WYRZYKOWSKI J, *et al.* Identification of abundant and informative microsatellites from shrimp (*Penaeus monodon*) genome [J]. *Animal Genetic*, 1999, 30(2):150-156.
- [13] 刘楚吾,黎锦明,刘丽,等. 中国龙虾微卫星标记的筛选及遗传多样性分析[J]. 遗传,2010,32(7):737-743.
- [14] 宋春妮,李健,刘萍,等. 日本螯微卫星富集文库的建立与多态性标记的筛选[J]. 水产学报,2011,35(1):35-42.
- [15] 刘萍,孔杰,石拓,等. 中国对虾黄、渤海沿岸地理群的 RAPD 分析[J]. 海洋学报,2000,22(5):89-93.
- [16] 高焕,刘萍,孟宪红,等. 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)基因组微卫星特征分析[J]. 海洋与湖沼,2004,35(5):424-431.
- [17] BOTSTEIN 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(3):314-331.
- [18] WEBER J L. Informativeness of human (dC-dA)_n · (dG-dT)_n polymorphisms [J]. *Genomics*, 1990, 7(4):524-530.
- [19] 宋来鹏,刘萍,李健,等. 三疣梭子蟹基因组微卫星特征分析[J]. 中国水产科学,2008,15(5):738-743.
- [20] CHAND V, DE BRUYN M, MATHER P B. Microsatellite loci in the eastern form of the giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2005, 5(2):308-310.
- [21] CHAROENTAWEE K, POOMPUANG S, NAKOM U. Isolation and characterization of microsatellites in giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2006, 6(3):823-825.
- [22] SIBLY R M, WHITTAKER J C, TALBOT M. A maximum-likelihood approach to fitting equilibrium models of microsatellite evolution [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2001,18(3):413-417.
- [23] 战爱斌,胡景杰,胡晓丽,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.
- [24] 贾智英,全迎春,梁利群,等. 凡纳滨对虾微卫星 DNA 的筛选及其特性的研究[J]. 上海水产大学学报,2007,16(1):11-15.
- [25] 李晓萍. 三疣梭子蟹微卫星富集文库的构建及五个野生地理群的多样性分析[D]. 青岛:中国海洋大学,2010.
- [26] QIAO H, LI F J, FU H, *et al.* Isolation and characterization of 40 microsatellite loci for oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) and cross-species utility [J]. *Conservation Genetics Resources*, 2011,3(2):319-322.
- [27] NI L H, LI Q, KONG L F. Isolation and characterization of 19 microsatellite markers from the Chinese surf clam (*Macra chinensis*) [J]. *Conservation Genetics Resources*, 2010, 2(S1):27-30.
- [28] 夏军红,朱彩艳,苏天凤,等. 斑节对虾基因组微卫星分离及其序列特征研究[J]. 南方水产,2006,2(6):1-7.
- [29] 田艳琴,毕伟伟,杨海玲,等. 济宁百日鸡群体遗传多样性的微卫星标记分析[J]. 经济动物学报,2010,14(1):41-45.
- [30] 吴勤超,梁宏伟,李忠,等. 黄颡鱼微卫星标记的筛选及三个野生群体的遗传结构分析[J]. 生物技术通报,2010,(3):154-163.
- [31] 范留邦,陈志远,信锦鸿. 海州湾环境现状评价[J]. 环境工程,2010,28:303-332.
- [32] 张存勇,陈斌林. 海州湾水质模糊综合评价及其演变分析[J]. 海洋环境科学,2010,29(3):411-414.
- [33] ZOUROS E, FOLTZ D W. Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve mollusks [J]. *Malacologia*, 1984,25(2):583-591.

**Construction of microsatellite-enriched library and
isolation of microsatellite markers in the ridgetail
white prawn (*Exopalaemon carinicauda*)**

JIA Shu-wen^{1,2}, LIU Ping^{2*}, HAN Zhi-ke², LI Jian², PAN Lu-qing¹

(1. College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: A microsatellite-enriched library of the ridgetail white prawn (*Exopalaemon carinicauda*) was constructed using the method of magnetic bead hybridization enrichment. Genomic DNA of ridgetail white prawn was digested with the restriction endonuclease *Hae* III. DNA fragments from 400 to 1 200 bp were recycled and ligated to *Hae* III adaptors. The ligated DNA fragments were hybridized with biotinylated probe (AG)₁₅. Then, enriched DNA fragments were ligated to pMD18-T vector. 947 clones were randomly picked and screened by colony PCR. 667 clones were positive. 184 clones were randomly selected and sequenced from positive clones. 150 clones were found to contain 199 microsatellite sequences. Among these microsatellites, 79.4% belonged to perfect type, 13.6% belonged to imperfect type and 7.0% belonged to compound type. From the primers designed for the 119 microsatellite loci, 64 could amplify expected PCR products and 26 were found to be polymorphic. The number of alleles at each locus ranged from 3 to 16. The observed and expected heterozygosities varied from 0.111 to 0.929 and from 0.246 to 0.932, respectively. The PIC value ranged from 0.231 to 0.909. These new loci will be useful in the study of population genetic structure and conservation in this species.

Key words: *Exopalaemon carinicauda*; magnetic bead hybridization enrichment; microsatellite; population genetic diversity

Corresponding author: LIU Ping. E-mail: liuping@ysfri.ac.cn