

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.01384

半滑舌鳎微卫星标记的开发及其在 F_1 家系中分离方式分析

姜黎明¹, 于海洋¹, 张全启¹, 刘志鹏¹, 刘俊伟¹, 王旭波¹, 王志刚¹, 翟介明²

1. 中国海洋大学 海洋生物遗传学与育种教育部重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 山东莱州明波水产有限公司, 山东 莱州 261418

摘要: 利用富集文库-菌落原位杂交的方法筛选半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)微卫星标记, 构建富含(AC)和(AG)序列重复的半滑舌鳎微卫星富集文库, 随机从文库中挑选 1060 个克隆, 筛选得到 883 个(83.3%)阳性信号, 菌落 PCR 检测 742 个阳性克隆片段的长度在 500~1 200 bp 范围内, 随机挑选其中 50 个克隆进行测序, 共设计引物 33 对, 进行退火温度优化、多态性检测后, 共得到 20 个多态的半滑舌鳎微卫星标记。对其进行分离方式分析, 其中有 17 个位点符合孟德尔分离定律, 共表现 5 种分离方式, 可用于半滑舌鳎遗传连锁图谱的构建; 另外有 3 个位点偏离孟德尔分离定律($P < 0.05$)。结果同时证明富集文库-菌落原位杂交是半滑舌鳎微卫星标记大量筛选和高密度遗传连锁图谱构建的一种行之有效的方法。

关键词: 半滑舌鳎; 微卫星; 富集文库-菌落原位杂交; 孟德尔分离

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)06-1384-08

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)为暖温性大型底层鱼类, 属鲽形目(Pleuronectiformes), 舌鳎科(Cynoglossidae), 舌鳎属, 是黄渤海区珍稀、名贵的大型鱼类。其个体硕大, 肉质细嫩、味道鲜美、营养丰富, 是中国沿海优良的海水养殖品种, 具有营养等级低、食性温和、雌性个体大、生长速度快和市场价值高等优点, 目前已实现了工厂化人工养殖^[1-2]。

微卫星 DNA 目前已被广泛应用于遗传连锁图谱的构建、分子标记辅助育种、基因定位克隆、遗传多样性研究、亲缘关系鉴定和系谱确认等领域。用微卫星标记构建的遗传连锁图谱可以彼此整合, 便于向物理图谱过渡, 是当前构建中高密度连锁图谱所用的一种重要的分子标记^[3-5]。近年来, 有关半滑舌鳎分子标记特别是微卫星标记

的研究有了长足的进步, Liu 等^[6]从半滑舌鳎 cDNA 文库中寻找微卫星位点并设计引物, 得到了 11 个多态的微卫星标记; Liu 等^[7]利用已有的 RAPD 标记开发微卫星标记, 也得到了 11 个多态的微卫星标记; Wang 等^[8]利用 fosmid 文库末端测序技术在测得的序列中筛选得到了 64 个多态的微卫星标记; Zhong 等^[9]利用富集文库-菌落原位杂交的方法得到了 20 个多态的微卫星标记。但是, 这些已有的微卫星标记还远远不能满足构建舌鳎遗传连锁图谱所需要的数目要求, 必须获得更多多态性良好的微卫星标记, 同时, 必须对已获得微卫星标进行孟德尔遗传分析。本研究通过富集文库-菌落原位杂交的方法开发半滑舌鳎的微卫星标记, 并将其中部分位点在半滑舌鳎单对杂交家系 F_1 中检测其分离情况, 以确定其是否能应

收稿日期: 2011-03-15; 修订日期: 2011-06-02.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30901098).

作者简介: 姜黎明(1985-), 男, 博士研究生, 研究方向为鲆鲽鱼类分子标记的开发及其遗传连锁图谱的构建.

E-mail: jiangliming 1985@163.com

通信作者: 于海洋, 讲师. E-mail: mouriyu@hotmail.com

用于构建遗传连锁图谱。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验中微卫星标记筛选所用的半滑舌鳎于 2007 年取自渤海莱州湾, 3 雌 3 雄, 取肌肉组织液氮速冻后于 -80°C 保存。分离方式分析所用的 F_1 家系构建于莱州明波水产有限公司, 亲本采用山东近海野生个体, 于 2008 年 4 月进行单对人工授精和育苗, 取培育的子代个体 200 尾, 用 70%乙醇固定带回实验室常温保存。

1.2 基因组 DNA 的提取

亲本肌肉组织用常规的酚/氯仿抽提的方法^[10]提取, $0.1\times\text{TE}$ 溶解备用。

子代个体由于个体较小, DNA 需要量较多, 采用 omega 公司的 Cycle-Pure Kit(D6492-01*)提取, $0.1\times\text{TE}$ 溶解备用。用实验室开发的半滑舌鳎雌雄特异引物通过 PCR 扩增及琼脂糖电泳检测鉴别雌雄。

1.3 富集文库-菌落原位杂交

富集文库的构建方法主要参照陈微^[5]、Lucezar^[11]和 Elaine^[12]的方法, 在部分关键步骤做了进一步的优化。

1.3.1 基因组 DNA 的酶切、回收、连接接头 取约 $1\ \mu\text{g}$ 半滑舌鳎基因组 DNA, 在 $20\ \mu\text{L}$ 反应体系中加入 $1\ \mu\text{L}$ ($10\ \text{U}/\mu\text{L}$) 限制性内切酶 *Sau3AI*, 37°C 水浴处理 1 h。用 1.5% 琼脂糖电泳检测, 回收 $500\sim 1\ 200\ \text{bp}$ 的片段。构建 $20\ \mu\text{L}$ 连接体系, 包括 $1\ \mu\text{L}$ T_4 连接酶(TaKaRa), $2\ \mu\text{L}$ $10\times T_4$ Buffer, $2\ \mu\text{L}$ 接头(人工合成寡核苷酸片段: 19-mer: $5'\text{-GGGTCGAATTCGAGCTCAG-3'}$ 和经磷酸化处理的 23-mer: $5'\text{-GATCCTGAGCTCGAATTCGACCC-3'}$), 回收的 DNA 片段, 加水补足 $20\ \mu\text{L}$ 体系, 16°C 连接过夜。用接头引物进行 PCR 扩增, 扩增体系包括连接产物 $2\ \mu\text{L}$, 接头引物 $0.2\ \text{mmol/L}$, $200\ \mu\text{mol/L}$ dNTPs, Mg^{2+} $2.5\ \text{mmol/L}$, $1\times\text{PCR Buffer}$, $1\ \text{U}$ *rTaq* (TaKaRa), 灭菌三蒸水补足体系至 $20\ \mu\text{L}$; PCR 反应为: 95°C 预变性 5 min; 每个循环包括 95°C 变性 30 s, 50°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s; 最终 72°C 延伸

30 min。为避免因 PCR 循环数过多导致重复片段增加, 文库质量下降, 预实验将扩增循环数预设为 24 个循环, 从 16 个循环开始每增加两个循环取出一管产物, 即做 16、18、20、22、24 个循环梯度, $5\ \mu\text{L}$ PCR 产物上样, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 选择扩增条带清晰可辨的最少循环数为正式 PCR 使用的循环数, 最终定为 18 个循环。PCR 产物 4°C 保存备用。

1.3.2 富集 DNA 所用尼龙膜的制备 取浓度为 $100\ \mu\text{mol/L}$ 的寡核苷酸探针(AC)₂₀ 和(AG)₂₀ 各 $1\ \mu\text{L}$ 点在直径约 5 mm 的尼龙膜(Hybond⁺, Amersham)上, 空气晾干后置于 80°C 烘箱烘烤 2 h 固定探针。然后置于 $500\ \mu\text{L}$ 杂交液[50%(V/V)的甲酰胺、7%(W/V)的 SDS、 $5\times\text{SSC}$ 、 $50\ \text{mmol/L}$ 的磷酸钠(pH 7.0)]中 37°C 处理 48 h。

1.3.3 含有微卫星 DNA 片段的富集 在对微卫星序列进行富集时, 微卫星核心序列不同, 洗脱温度不同, 富集效率会有所差异。在严谨度较低的杂交及洗脱条件下, 与探针不完全匹配的重复单元和重复较短的微卫星序列也能较牢固的与探针结合在一起; 随着洗脱温度的升高, 杂交严谨度升高, 得到的微卫星序列重复次数增加, 各种类型微卫星所占的比例也会改变, 洗脱过程的 3 个步骤中第 3 次洗脱温度对实验的影响较大。针对如上原因, 为了得到较高质量的富含微卫星的 DNA 片段, 对洗膜严谨度进行温度梯度优化, 即对第 3 次洗膜温度进行 80°C 、 90°C 、沸水的温度梯度实验。

将处理过的杂交膜置于 1% SDS 中沸水浴 10 min 2 次, PCR 产物经 95°C 变性后冰浴 10 min 防止复性, 将变性产物和膜置于 $600\ \mu\text{L}$ 杂交液中, 37°C 处理 24 h。最终洗膜采用如下严谨度: 将膜置于 60°C 水浴中 $600\ \mu\text{L}$ 洗脱液 I [$2\times\text{SSC}$, 1% SDS(W/V)] 洗两次, 每次 15 min; 65°C 水浴中 $600\ \mu\text{L}$ 洗脱液 I 洗 30 min; 沸水浴中 $500\ \mu\text{L}$ 洗脱液 II [$0.5\times\text{SSC}$, 1% SDS(W/V)] 洗 30 min; 向其中加入 $50\ \mu\text{L}$ $7.5\ \text{mol/L}$ 醋酸铵, $600\ \mu\text{L}$ 异丙醇, -20°C 沉淀过夜, 4°C $12\ 000\ \text{r/min}$ 离心 10 min, 沉淀溶于 $20\ \mu\text{L}$ 灭菌三蒸水中, 4°C 保存备用。

1.3.4 TA 克隆 将沉淀产物进行恢复 PCR, PCR 程序及循环数确定方法如 1.3.1, 模板采用沉淀产物 2 μL , 循环数改为 25 个。将产物纯化后连接到 PMD18T 载体(TaKaRa)上, 转化到大肠杆菌 DH5 α 中。

1.3.5 菌落重排转膜 待菌落长至合适大小随机挑选部分菌落用 M13 引物进行菌落 PCR, 验证转化效率。用牙签将大小合适的单菌落挑至新的预先做好标记的固体培养基上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至合适大小, 将硝酸纤维素膜(nylon membranes, positively charged, Roche)剪至略小于培养皿大小(9 cm \times 9 cm)覆盖于培养基表面, 使菌落转至膜上, 将膜在空气中干燥 10 min, 在裂解液(1.5 mol/L NaCl, 0.5 mol/L NaOH)中处理 7 min, 待其稍微干燥后在中和液[1.5 mol/L NaCl, 0.5 mol/L Tris-Cl(pH 7.2), 1.0 mmol/L EDTA(pH 8.0)]中处理 2 次, 每次 5 min, 待其完全干燥后置于 80 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘烤 2 h 或者 120 $^{\circ}\text{C}$ 中 30 min。

1.3.6 阳性克隆的筛选 寡核苷酸探针(AC)₂₀ 和 (AG)₂₀ 使用 DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit 2nd Generation(Roche)试剂盒标记, 将烘烤过的硝酸纤维素膜置于杂交袋内, 加入 15 mL DIG Easy Hyb(Roche), 将气泡挤出后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱内预杂交 1 h。将预杂交好的膜稍微晾干加入 10 mL DIG Easy Hyb(Roche)中, 加入标记好的寡核苷酸探针 5 μL (使用前稀释 25 倍), 挤干净气泡, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱内杂交 24 h, 每隔 4~6 h 挤一次气泡。杂交后的膜用洗膜液 I [2 \times SSC, 0.1%SDS(W/V)] 室温处理两次, 每次 5 min, 用洗膜液 II [0.5 \times SSC, 0.1%SDS(W/V)] 42 $^{\circ}\text{C}$ 处理两次, 每次 15 min。硝酸纤维素膜的封阻和信号检测使用 DIG Luminescent Detection Kit(Roche)。用 X 胶片显影定影后挑选阳性克隆, 检测阳性克隆中插入片段大小合适者送测序。

1.4 序列分析及引物设计

使用 Chromas 软件选择主峰清晰可信的测序结果, 再经 blast 比对去除载体序列, 然后用 Lasergene 6.0 中的 SeqMan 比对去除重复序列, 最

后选择 Primer Premier 5.0 软件为候选位点设计 PCR 引物。引物合成后利用梯度 PCR 优化引物的退火温度, 反应体系如 1.3.1。为避免个体差异, 模板采用 6 个个体的混合 DNA, 程序中将退火温度设为 45~65 $^{\circ}\text{C}$ 区间内, PCR 产物用 1.5%琼脂糖电泳检测, 选择扩增主带最清晰的温度作为该引物的最佳退火温度。

1.5 多态性筛选及分离方式分析

将能够扩增出清晰条带的引物以 6 个野生半滑舌鲷个体基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 20 μL 体系包括模板约 1.0 ng/ μL , 引物 0.2 mmol/L, 2 \times PCR Mix(SinoBio 2 \times Taq Master Mix)10 μL , 加灭菌三蒸水补足 20 μL ; PCR 反应为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 每个循环包括 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 最佳温度退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共 30 个循环; 最终 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。PCR 产物用 10%聚丙烯酰胺凝胶在 300 V 条件下、电泳 90 min 检测, 挑选扩增产物多态性明显的引物, 在 1 个 F₁ 家系 48 个个体(雌雄比例 1:1)中检测分离方式。PCR 体系、扩增程序及 PAGE 检测方法同多态筛选。

2 结果与分析

2.1 富集文库-菌落原位杂交

随机挑选 1 060 个菌落重排于 4 个培养板上, 经筛选后得到 883 个阳性信号, 阳性信号率为 83.3%。

菌落 PCR 检测阳性克隆片段长度, 共 742 个克隆大小在 500~1 200 bp 范围内(图 1), 随机挑选其中的 50 个送测序。

2.2 微卫星标记分析

去除不能设计引物和测序不成功的序列, 共设计引物 33 对, 经过多态性筛选后得到多态位点 20 个(图 2)。

将这 20 个位点在 F₁ 家系 48 个个体中检验其分离方式, 引物的相关参数见表 1。

结果显示, 这 20 个位点中, 共有 5 种分离方式(♀ \times ♂)(图 3), 分别为 AA \times AB(6 个)、AB \times AA(3 个)、AB \times AB(2 个)、AB \times AC(6 个)、AB \times CD(3 个), A、B、C、D 分别代表不同的等位基因(表 1)。

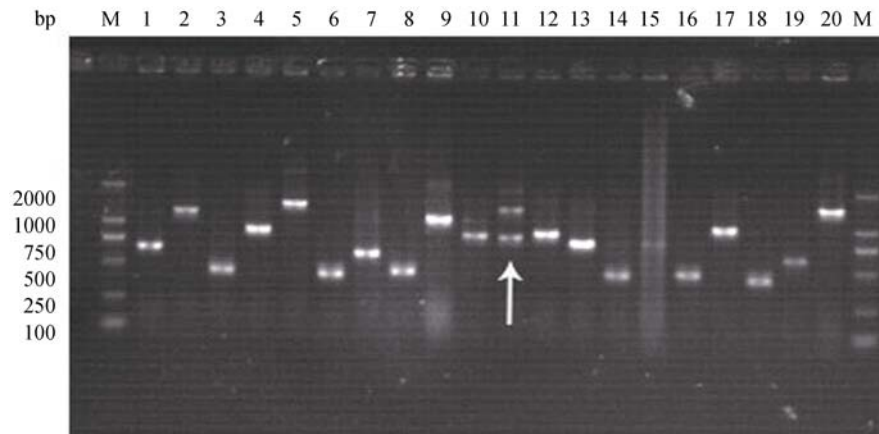


图 1 部分菌落 PCR 检测结果

M: D2000 marker; 箭头所指泳道为两条带可能是因为所挑克隆不是单菌落.

Fig.1 Colony PCR results

M: D2000 marker; arrow shows the colony may not be singleness.

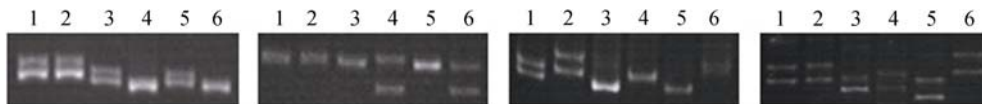


图 2 筛选获得的 4 个多态性位点电泳检测结果

同一编号泳道代表同一个体扩增结果.

Fig.2 Electrophoresis results of 4 polymorphic markers

The same number means the same sample.

图 3 中 a、b、c、d、e 图分别是 *Cse17JL*、*Cse05JL*、*Cse06JL*、*Cse09JL*、*Cse20JL* 5 个位点的检测结果, 在所有 20 个位点中, 有 17 个位点的分离符合孟德尔分离, 其 P 值为 0.111 6~1.000 0(表 1), 另外 3 个位点 *Cse02JL*、*Cse04JL*、*Cse09JL* 的分离方式明显偏离 1:1 或者 1:1:1:1 的孟德尔分离比例($P<0.05$), 不能用于接下来遗传图谱的构建, 其他位点均符合孟德尔分离, 能够用于图谱的构建。

3 讨论

分子标记的偏分离现象在水产动物中广泛存在 [13-16], 在斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)、栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*)、海胆 (*Strongylocentrotus nukus*)、中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 等物种中均有发现。微卫星标记的偏分离现象也有所报道 [17-18], 本实验研究的 20 个微卫星位点中有 3 个位点偏离孟德尔分离 ($P<0.05$), 其中有 2 个严重偏离 ($P<$

0.01), 偏分离比例为 15%, 这个数值明显低于斑点叉尾鲷 [13]、栉孔扇贝 [14]、海胆 [15]、中国对虾 [16] 等用 AFLP 标记构建遗传连锁图谱的偏分离比例, 与牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) [17]、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) [18] 等用微卫星标记构建遗传连锁图谱的偏分离比例大体相当。偏分离标记产生的原因有很多: (1) 受精过程中配子间存在竞争和选择 [19]; (2) 个体 DNA 损伤 [20]; (3) 较高的遗传负荷及生长过程中环境对某些致死基因进行了选择 [21]; (4) 样本量较少及取样过程存在的误差 [22-23] 等, 本实验中偏分离的产生可能与实验用的样本量较小 (48 个) 有关。

微卫星标记的无效等位基因在很多物种中都有报道, 目前比较公认的无效等位基因产生的原因是较高频率的突变和复制滑动的存在, 有研究表明在进行 PCR 反应时, 3'-端一个类似于重复序列的四碱基缺失是造成无效等位基因的原因 [24], 同时还有一些研究表明即使是在引物的中部甚至

表 1 检测的 20 个多态微卫星微点的相关信息
Tab.1 Information of 20 polymorphic microsatellite markers

引物 primer	引物序列 primer sequence	$T_m/^\circ\text{C}$	核心序列 core Sequence	片段长度 fragment length	分离方式 separation form	基因型比例 genotype proportion	P
<i>Cse01 JL</i>	F:AGTATGGAGTGAGGGACG R:CACTAACGAGGCTACGC	48.2	(AG) ₂₃	202	AB×AC	AA:AB:AC:BC 9:16:9:14	0.3666
<i>Cse02 JL</i>	F:CTGACGGGAAGTGGGACT R:GGAATGGCTGCTGTGATG	48.2	(AC) ₅ -(AC) ₁₄	194	AB×AC	AA:AB:AC:BC 1:15:16:16	0.0037*
<i>Cse03 JL</i>	F:CAGGCGAAATAAAGGAAGA R:AAACAAGGCGAACGGGAT	48.2	(AGG) ₆	110	AB×AC	AA:AB:AC:BC 12:13:10:13	0.9189
<i>Cse04 JL</i>	F:GAGGCAGGATTTACAGT R:GCACAACGAACAGAGGGT	48.2	(TG) ₁₂	220	AA×AB	AA:AB 15:33	0.0094*
<i>Cse05 JL</i>	F:CAAACGTATGTGAACGACGAG R:TCCATCCAGAATCCCACC	48.2	(AG) ₁₁	149	AB×AA	AA:AB 20:28	0.2482
<i>Cse06 JL</i>	F:GGAGCCACAGCAGGAATG R:GCCTTGAGTTTGACAGGTAT	48.2	(AC) ₁₈	206	AB×AB	AA:AB:BB 9:25:14	0.5698
<i>Cse07 JL</i>	F:TTTCTTCCAACAGTTCA R:GATTAGGATTCTCGCATT	48.2	(TG) ₉	146	AB×AC	AA:AB:AC:BC 8:8:14:18	0.1116
<i>Cse08 JL</i>	F:GCTCCAACCTCGGGTAAGAC R:CACCGGACATCCTGTACT	53.4	(AC) ₁₁	263	AB×CD	AC:AD:BC:BD 6:11:17:14	0.1386
<i>Cse09 JL</i>	F:TCCCAGGCATTTGAGCAG R:ATCACCATTGGTGGCAAAG	53.4	(AC) ₁₁	136	AB×AC	AA:AB:AC:BC 5:13:11:19	0.0396*
<i>Cse10 JL</i>	F:ATTGCCTGGCATTATTC R:ATGTCAACAGGTTAGAGGG	53.4	(TG) ₂₂	203	AB×CD	AC:AD:BC:BD 12:11:14:11	0.9189
<i>Cse11 JL</i>	F:TCCTCCTCACTCCTGTCTG R:AGTGGGAAAAGAGCGTCT	53.4	(TG) ₁₇	220	AB×AC	AA:AB:AC:BC 9:13:9:17	0.2998
<i>Cse12 JL</i>	F:GAATATTAAGCTGGGGATG R:ACTGGAGACGCTGTTGGA	53.4	(AC) ₉ -(TG) ₈ -(AG) ₁₈	253	AA×AB	AA:AB 21:27	0.3865
<i>Cse13 JL</i>	F:GGAATAAATTGCACCTC R:TTGTCCTCCTCACTCAC	53.4	(AC) ₁₃	121	AB×AA	AA:AB 22:26	0.5637
<i>Cse14 JL</i>	F:GCACTCGTCCCTTCTG R:TCATGTCTGTCTCGTCCA	53.4	(TG) ₁₂	100	AB×AA	AA:AB 29:19	0.1489
<i>Cse15 JL</i>	F:GTCCTTCAACGTCGTGGTC R:ACGGCAGTCAGTCCCTC	53.4	(TG) ₁₂	175	AB×AB	AA:AB:BB 12:25:11	0.9394
<i>Cse16 JL</i>	F:CTCAGTGCAGCCCTCAGCT R:GTGAGACATTGTAAAGCCAGTAGA	53.4	(TGC) ₄ (TCA) ₈	226	AA×AB	AA:AB 23:25	0.7728
<i>Cse17 JL</i>	F:TTTCATCCCTATAACTGGTC R:CAACTCCCTGCAACAAGA	53.4	(AC) ₁₆	211	AA×AB	AA:AB 24:24	1.0000
<i>Cse18 JL</i>	F:TAAGAGGCTAACTCCACAG R:GAAATGAACACCACCAAC	53.4	(TG) ₁₀	367	AA×AB	AA:AB 26:22	0.5637
<i>Cse19 JL</i>	F:TTTCTTCTCCCTTCATTGC R:CCACTTCTTACCCTACCAC	53.4	(TG) ₉	185	AA×AB	AA:AB 24:24	1.0000
<i>Cse20 JL</i>	F:AAAACATTGGGTGGTAGG R:AGTAAAGGAACTGGTGCTA	53.4	(TG) ₁₁	199	AB×CD	AC:AD:BC:BD 13:9:11:15	0.6444

注：“*”表示该位点显著偏离孟德尔分离定律($P<0.05$)。

Note: “*” means the segregation ratio of the marker was deviated from Mendelian law ratio ($P<0.05$).

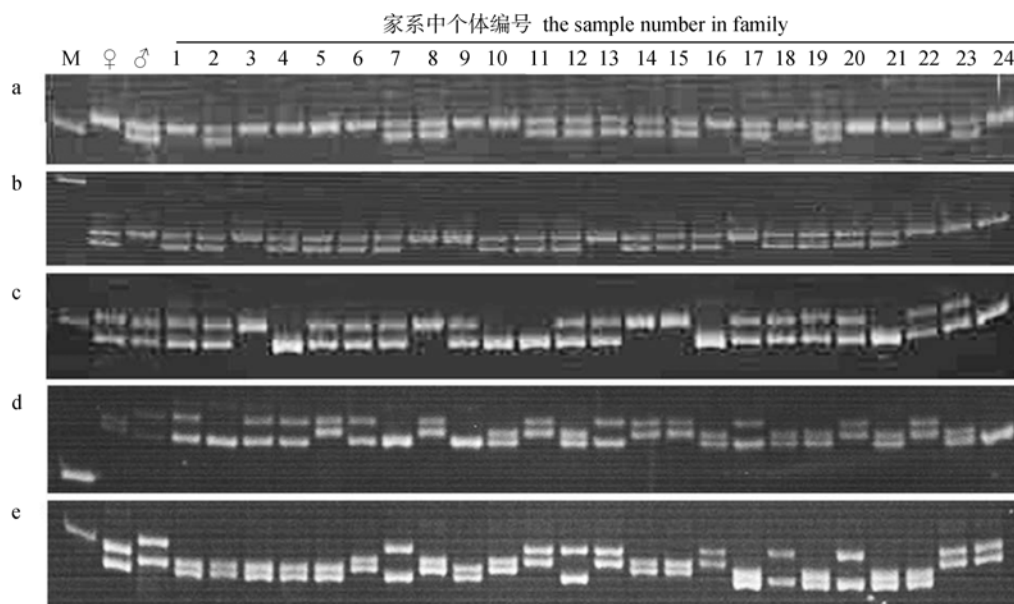


图 3 所检测位点中存在的 5 种分离方式

a、b、c、d、e 图代表 AA×AB、AB×AA、AB×AB、AB×AC、AB×CD 5 种分离方式; M 为 marker; ♀、♂ 代表雌雄亲本。1-24 表示家系中 24 个个体。

Fig.3 5 segregations in markers amplified in family

a, b, c, d, e: the segregations of AA×AB, AB×AA, AB×AB, AB×AC, AB×CD; m: marker; ♀, ♂: male and female parent. 1-24: individual code in the family.

5'-端出现错配碱基也有可能造成 PCR 反应的失败^[25]。在不同的物种中无效等位基因的频率有着较大的差距, 在虹鳟^[26]和长牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[21]中分别为 16%和 51%。本实验中 *Cse07JL*、*Cse10JL*、*Cse14JL* 3 个位点也存在无效等位基因, 但由于其分离方式特殊, 能够区分雌雄亲本, 依然可以用于遗传连锁图谱的构建。而有些位点由于无效等位基因的存在, 在亲本中扩增失败, 不能为作图提供有用的信息, 这可能导致作图效率降低。

本实验所采用的富集文库-菌落原位杂交筛选半滑舌鲷微卫星标记的方法与陈微在牙鲆^[5]、钟其旺在半滑舌鲷^[9]中等得到的实验结果类似, 经过条件优化后微卫星标记的阳性率较高, 是一种在非模式物种中快速高效开发微卫星标记的方法。随着育种技术的不断发展, 分子标记辅助育种(MAS)技术也在不断进步, 对于一些经济价值较高的物种, 构建其高密度的遗传连锁图谱, 进行数量性状分析(QTL), 能够极大的促进育种的效率。构建高密度遗传连锁图谱的位点可以有

种来源, 除了从 EST 数据库中筛选^[6]、近缘物种间通用^[27]等方法, 利用富集文库-菌落原位杂交等技术手段开发新的标记位点是一种行之有效的方法。本实验对随机选取新开发多态标记的分离方式的研究表明, 使用富集文库-菌落原位杂交方法开发的微卫星标记多态性较好, 且大多数标记(本研究为 85%)的分离方式符合孟德尔分离定律, 能够用于半滑舌鲷遗传图谱的构建, 且效率较高。本文的实验结果对进一步大量开发半滑舌鲷及其他非模式物种的微卫星标记, 并进行遗传连锁图谱构建的工作有一定的应用价值。

参考文献:

- [1] 雷霖霖. 海水鱼类养殖理论与技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 647.
- [2] 李思忠, 王惠民. 中国动物志 硬骨鱼纲 鲷形目[M]. 北京: 科学出版社, 1995: 68, 334.
- [3] 王广旭, 吴永英, 王立群. 微卫星标记及其在动物遗传育种中的应用[J]. 生物信息学, 2006, 4: 85-87, 94 .
- [4] 李宏俊, 刘晓, 杜雪地, 等. 海湾扇贝微卫星标记开发及其分离方式分析[J]. 海洋科学, 2009, 33(12): 4-8.

- [5] 陈微, 张全启, 于海洋, 等. 牙鲆微卫星标记的筛选及群体多态性分析[J]. 中国水产科学, 2005, 12(6): 682-687.
- [6] Liu Y G, Sun X Q, Gao H, et al. Microsatellite markers from an expressed sequence tag library of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) and their application in other related fish species[J]. Mol Ecol Res, 2007, 7(6): 1242-1244.
- [7] Liu Y G, Bao B L, Liu LX, et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from RAPD product in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) and a test of cross-species amplification[J]. Mol Ecol Res, 2008, 8(1): 202-204.
- [8] Wang X B, Zhang Q Q, Sun X H, et al. Isolation and characterization of 64 novel microsatellite markers from a fosmid library of female half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. Mol Ecol Res, 2008, 8: 1303-1306.
- [9] Zhong Q W, Yu Y, Zhang Q Q, et al. Isolation and characterization of twenty novel microsatellite markers for half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. Conserv Genet, 2009, 10(5): 1617-1620.
- [10] 张全启, 徐晓斐, 齐洁. 牙鲆野生群体与养殖群体的遗传多样性分析[J]. 中国海洋大学学报, 2004, 34(5): 816-820.
- [11] Karagoyozov L D, Kalcheva I M, Chapman V. Construction of random small-insert genomic libraries[J]. Nucl Acids Res, 1993, 21(16): 3911-3912.
- [12] Ostrander E A, Jong P M, Rine J, et al. Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences for microsatellite repeat sequences[J]. Genetics, 1992, 89: 3419-3423.
- [13] Liu Z J, Karsi A, Li P, et al. An AFLP-based genetic linkage map of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) constructed by using an interspecific hybrid resource family[J]. Genetics, 2003, 165: 687-694.
- [14] Li L, Xiang J H, Liu X, et al. Construction of AFLP-based genetic linkage map for zhikong scallop, *Chlamys farreri* Jones et Peston and mapping[J]. Aquaculture, 2005, 245: 63-73.
- [15] Zhou Z C, Bao Z M, Dong Y, et al. AFLP linkage map of sea urchin constructed using an interspecific cross between *Strongylocentrotus nucus*(♀) and *S.intermedius*(♂) [J]. Aquaculture, 2006, 259: 56-65.
- [16] 李健, 刘萍, 王清印, 等. 中国对虾遗传连锁图谱的构建[J]. 水产学报, 2008, 32(2): 161-173.
- [17] Coimbra M R, Kobayashi K, Koretsugu S, et al. A genetic linkage map of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. Aquaculture, 2003, 220: 203-218.
- [18] Rexroad C E, Palti Y, Gahr S A, et al. A second generation genetic map for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. BMC Genet, 2008, 9: 74.
- [19] Lyttle T W. Segregation distorters[J]. Annu Rev Genet, 1991, 25: 511-557.
- [20] Pardo-Manuel de Villena F, Sapienza C. Nonrandom segregation during meiosis: the unfairness of females[J]. Mamm Gen, 1998, 12: 331-339.
- [21] 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.
- [22] Yu Z N, Guo X M. Genetic linkage map of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*[J]. Biol Bull, 2003, 204: 327-338.
- [23] Li L, Guo X M. AFLP-based genetic linkage maps of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg[J]. Mar Biotechnol, 2004, 6: 26-36.
- [24] Holm L, Loeschcke V, Bendixen C. Elucidation of the molecular basis of a null allele in a rainbow trout microsatellite[J]. Mar Biotechnol, 2001, 3: 555-560.
- [25] 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.
- [26] Ardren W R, Borer S, Thrower F, et al. Inheritance of 12 microsatellite loci in *Oncorhynchus mykiss*[J]. J Hered, 1999, 90: 529-536.
- [27] Iyengar A, Piyapattanakorn S, David M S, et al. Identification of microsatellite repeats in turbot (*Scophthalmus maximus*) and dover sole (*Solea solea*) using a RAPD-based technique characterization of microsatellite markers in dover sole[J]. Mar Biotechnol, 2000, 2: 49-56.

Isolation and characterization of microsatellite markers for half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) and an analysis of segregation in the F₁

JIANG Liming¹, YU Haiyang¹, ZHANG Quanqi¹, LIU Zhipeng¹, LIU Junwei¹, WANG Xubo¹,
WANG Zhigang¹, ZHAI Jieming²

1. Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding, Exploitation of Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Laizhou Mingbo Aquatic Co. LTD., Laizhou 261418, China

Abstract: Microsatellite (or simple sequence repeat, SSR) marker is an important tool for molecular research. We isolated and characterized microsatellite markers for half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) by constructing an enriched genomic library and conducting colony *in situ* hybridization. The genomic library was enriched for (AC) and (AG) of half-smooth tongue sole. We detected 883 positive signal from 1 060 random clones by colony *in situ* hybridization (positive ratio was 83.3%). The majority of positive clones were between 500–1 200 bp in length. We randomly selected 50 clones for sequencing using 33 pairs of primers that were designed with Primer Premier 5.0. Twenty SSRs were polymorphic. A polymorphism analysis of 48 F₁ individuals revealed that 17 SSRs were consistent with Mendelian segregation and could be used to construct the linkage map. Conversely, 3 SSRs deviated from Mendelian segregation ($P < 0.05$). Our results suggest that our approach was useful for isolating large numbers of microsatellite markers and construction of a high density genetic linkage map.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; microsatellite; enriched genomic library; colony in situ hybridization; Mendelian segregation ratio

Corresponding author: YU Haiyang. E-mail: mouriyu@hotmail.com

欢迎订阅 2012 年《上海海洋大学学报》

《上海海洋大学学报》为上海海洋大学主办, 面向全国的以海洋、水产科学技术为主的综合性学术刊物。主要刊登研究论文, 少量刊登综述、评述、简讯, 并酌登学术动态和主要书刊评介等。目前学报是《中国科学引文数据库》来源期刊, 《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊, 《中国期刊网》、《中国学术期刊(光盘版)》全文收录期刊, 万方数据-数字化期刊群全文收录期刊, 中国科技论文统计源核心期刊, 水产渔业类中文核心期刊, RCCSE 中国核心学术期刊。

本刊为双月刊, 大 16 开, 国内外公开发行。每期单价:10.00 元。国际标准刊号: ISSN 1674-5566, 国内统一刊号: CN31-2024/S。国内邮发代号: 4-604, 国际发行代号: 4822Q。读者可在当地邮局订阅, 也可直接汇款至编辑部订阅。

编辑部联系地址: 上海市临港新城沪城环路 999 号, 上海海洋大学 201 信箱

邮政编码: 201306

联系人: 郭丰红

联系电话: 021-61900229

传 真: 021-61900227

E-mail: xuebao@shou.edu.cn