

## 方正银鲫微卫星序列的筛选及 PCR 扩增产物的初步检测

贾智英<sup>1,2</sup>, 梁利群<sup>1</sup>, 孙效文<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所 农业部北方鱼类生物工程育种重点开放实验室, 黑龙江 哈尔滨 150070; 2. 上海水产大学 生命科学与技术学院, 上海 200090)

**摘要:** 采用小片段克隆法构建了方正银鲫 [*Carassius auratus gibelio* (Block)] 部分基因组文库, 并采用非影印的方法将转化子转移到硝酸纤维素滤膜上。用人工合成、并经放射性同位素 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP 标记的 (CA)<sub>15</sub> 探针构建的基因组文库进行筛选, 获得 137 个阳性克隆, 经测序得到微卫星序列 130 个, 其中完美型、非完美型、混合型分别占 64.3%、16.9% 和 18.8%。应用引物设计软件 Primer Primer5.0 进行引物设计, 得到引物 103 对。合成 30 对引物, 随机选取其中 5 对进行 PCR 扩增。结果表明, 这 5 对引物均可以稳定扩增, 并且观测杂合度均较高。[中国水产科学, 2006, 13(6): 990-994]

**关键词:** 雌核发育; 银鲫; 微卫星 DNA

中图分类号: Q959.46

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2006)06-0990-05

方正银鲫 [*Carassius auratus gibelio* (Block)] 是黑龙江水系行天然雌核发育的两性型种群<sup>[1]</sup>, 是发育学家、遗传学家、细胞学家共同感兴趣的生物, 它的特殊生殖机制和起源的解决将对生物的性别决定、天然雌核发育的进一步阐明、物种的进化、水产动物遗传育种等方面的研究起到很大的推动作用。众多的细胞学研究揭示其受精生物学过程中精子只起激发卵子的作用, 精子入卵后, 保持致密状态, 不形成雄性原核<sup>[2]</sup>。而蒋一珪等<sup>[3]</sup>研究发现异源精子不仅能刺激银鲫卵雌核发育, 且还影响雌核发育子代生长、性比和体色等性状, 即“异精生物学效应”。DNA 是生物遗传物质的载体, 因而从 DNA 序列上进行分析能直接反映生物的遗传特性。自从 20 世纪 90 年代以来, 随着 RAPD 技术的广泛使用, 很多学者应用 RAPD 技术检测了银鲫子代与父本的遗传特性<sup>[4-6]</sup>, 但由于受技术本身稳定性及重复性等方面因素的影响, 得出的实验结果并不一致。

微卫星分子标记 (microsatellite marker) 是随着 PCR 技术的发展而建立起来的, 而示踪微卫星位点 (Sequence Tagged Microsatellite Site, STMS) 概念的提出使这种分子标记受到广泛重视<sup>[7]</sup>。目前微卫星分子标记技术已经从个体水平和种群水平对生物

的遗传特性进行了大量的研究, 已获得了鱼类、虾蟹类、贝类、棘皮动物等种类的部分微卫星分子标记<sup>[8]</sup>, 并在遗传连锁图谱的构建、种群遗传结构的分析、遗传多样性的保护及血缘关系分析等方面得到了大量的应用。对于研究银鲫这种行天然雌核发育且又以两性融合生殖方式繁殖的生物来说, 微卫星分子标记研究和应用将对揭示其特殊生殖机制提供新的思路。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 实验鱼** 构建基因组文库所用方正银鲫取自黑龙江水产研究所松蒲实验场, 用做模板进行 PCR 扩增的取自黑龙江省方正县双凤水库, 两处方正银鲫经流氏细胞仪检测均为三倍体。

**1.1.2 质粒、菌种和试剂** 质粒 pGEM-3ZF(+) 和 DH5 $\alpha$  取自农业部北方鱼类生物工程育种重点实验室; 各种限制性内切酶购自 Promega 公司; T4 DNA 连接酶购于 MBI 公司; 硝酸纤维素滤膜购自 Pharmacia 公司; 探针 (CA)<sub>15</sub> 及 PCR 合成引物均由上海生物工程合成。

收稿日期: 2005-02-25; 修订日期: 2006-03-31.

基金项目: 国家自然科学基金(30271010).

作者简介: 贾智英(1976.07-), 女, 博士, 从事水产动物遗传育种研究, E-mail: xiaojiade\_4@163.com

通讯作者: 孙效文. E-mail: xws1999@hotmail.com, Tel: 0451-84842646.

## 1.2 方法

### 1.2.1 银鲫总基因组 DNA 的提取与文库构建

按照梁利群等<sup>[9]</sup>的方法,提取基因组 DNA。文库构建主要参考魏东旺<sup>[10]</sup>方法,并略加修改。限制性内切酶 *Sau3AI* 对基因组 DNA 进行部分消化后,用蔗糖密度梯度离心筛选片段大小为 250 ~ 1 000 bp DNA。

**1.2.2 杂交膜的制备及阳性克隆的筛选** 准备两套含有氨苄青霉素的 LB 平板,将其中一套铺上硝酸纤维素滤膜,在每一块平板(带滤膜和不带滤膜)的底部画出方格(方格大小 0.5 cm<sup>2</sup>,直径 9.0 cm 培养皿大约可画出 120 ~ 150 个方格)。用无菌牙签或接种环将菌落逐一转移至两套 LB 平板上,按照平板下方的方格将菌落划成 2 ~ 3 mm 的短线或点倒置平板于 37 ℃ 培养至菌线的宽度长至 0.5 ~ 1.0 cm。用镊子揭下琼脂板上的硝酸纤维素滤膜,将细菌裂解后,变性并固定于硝酸纤维素滤膜上。具体杂交方法参考魏东旺<sup>[10]</sup>的方法。

**1.2.3 测序及引物设计** 将阳性克隆穿刺培养在 LB 固体培养基中,由上海生工进行测序。用 Primer Primer5.0 软件对所测序列进行引物设计。

**1.2.4 引物合成及初步检测** 从实验室已合成的 30 对引物(表 1)中随机选取 5 对(SCM01、SCM05、SCM08、SCM10 和 SCM12),以 13 条方正县双凤水库方正银鲫为模板,分别用选取的引物按照设计条

件 PCR 扩增,扩增产物分别用 2% 琼脂糖和 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测分析。

## 2 结果

### 2.1 转化子的数目及转化子的转膜

实验共获得 4 700 个转化子,每个平板转移 120 个菌落,一共转移 40 个板。

### 2.2 放射自显影结果

放射自显影后一共有 137 个阳性杂交信号,每张滤膜上 1 ~ 8 个,平均为 4 个。

### 2.3 测序及引物设计结果

经测序后,130 个序列为微卫星序列,其余 7 个为假阳性克隆,占 5.11%。按照 Weber<sup>[11]</sup>提供的标准将微卫星序列进行划分,其中完美型占 64.3%,非完美型占 16.9%,混合型占 18.8%。除去重复次数少和重复序列侧翼太短的 17 个序列无法设计外,一共设计 103 对引物(可在农业部北方鱼类生物工程育种重点实验室网站 [www.fishbreeding.org](http://www.fishbreeding.org) 上查询)。

### 2.4 合成引物初步检测结果

扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶观察,能检测到的等位基因数较少;而用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳银染,检测到等位基因数较多(图 1)。同时还检测到群体中观测杂合度较高,但多态信息含量较低。

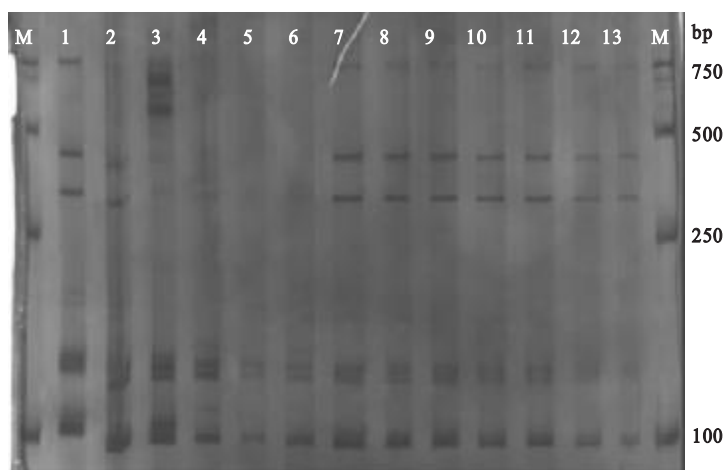


图 1 方正银鲫 SCM08 基因位点的聚丙烯酰胺凝胶电泳

M: 引物; 1 ~ 13: 方正县双凤水库银鲫样本

Fig. 1 Electrophoretic patterns of PCR products for the SCM08 locus in *Carassius auratus gibelio*

M: Primer. 1 - 13: C. a. gibelio samples from Shuangfeng Reservoir.

表1 30对合成微卫星引物及其特性

Tab. 1 30 pairs of primer and their characterization

| 序列号<br>Number | 退火温度/℃<br>Annealing temperature | 引物序列<br>Primer sequence                         | 片段大小/bp<br>Fragment length | 重复序列<br>Repeat motif                   |
|---------------|---------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------------------|
| SCM01         | F 51.5<br>R 51.7                | GCGAATAGGTCTGTGCTTC<br>TCCGGCTCGTATGTTGT        | 276                        | (AC) <sub>14</sub> GA(CT) <sub>4</sub> |
| SCM02         | F 48.3<br>R 48.5                | GCGGAATACTGTGAGTCTAG<br>ACCATGATTACGCCAAG       | 222                        | (CA) <sub>13</sub>                     |
| SCM03         | F 61.0<br>R 61.1                | CGCCCGATCAAAATGACTAA<br>GGTTTTTCTGGGGGTTTGA     | 216                        | (TG) <sub>23</sub> N(CT) <sub>3</sub>  |
| SCM04         | F 49.3<br>R 49.4                | TTCCTAGAACAGCAGGAGT<br>ACAATGGTAACAGGGACAC      | 137                        | (CA) <sub>18</sub>                     |
| SCM05         | F 59.1<br>R 60.5                | CAGCAATGGTAACAGGTCACA<br>TAAAACGACGGCCAGTGAAT   | 240                        | (GT) <sub>18</sub>                     |
| SCM06         | F 59.9<br>R 60.0                | ATACGCTTGGTTTGTGCTGCT<br>ATATGACTGGGGCCACAAGAGG | 231                        | (TG) <sub>35</sub>                     |
| SCM07         | F 60.0<br>R 60.3                | TTGATGTTCCTTTGCTCAG<br>CGCCAAGCTATTTAGGTGACA    | 242                        | (GT) <sub>15</sub>                     |
| SCM08         | F 50.5<br>R 51.4                | GCTGTTTGTCTCAGGGAC<br>TGGAGGAGGGTTAGGGT         | 258                        | (GA) <sub>17</sub>                     |
| SCM09         | F 59.4<br>R 60.0                | GCTTGTTTTGTGCTCAAGA<br>ATATGACTGGGGCCACAGAGG    | 226                        | (TG) <sub>35</sub>                     |
| SCM10         | F 60.0<br>R 60.8                | GAGCCGCTCTTACCTTGATG<br>GTCTCATCCGCTCCAAACTG    | 156                        | (GT) <sub>14</sub>                     |
| SCM11         | F 60.1<br>R 60.3                | AACTTCCATGCTCGGTATGC<br>CGCCAAGCTATTTAGGTGACA   | 242                        | (GT) <sub>3</sub> TT(GT) <sub>12</sub> |
| SCM12         | F 60.2<br>R 59.5                | AAGCACCGGAGATCATTTCTG<br>GGGGCCTCTCTGTATTTCCT   | 248                        | (AC) <sub>10</sub>                     |
| SCM13         | F 60.2<br>R 59.9                | AAGCACCGGAGATCATTTCTG<br>GTTTGGGATCGAGGTAAGC    | 166                        | (AC) <sub>10</sub>                     |
| SCM14         | F 60.5<br>R 60.8                | ACCGGGGATCTGCATTTTAT<br>TGCCAATTCAATGCAGACAG    | 227                        | (TA) <sub>34</sub> (CA) <sub>11</sub>  |
| SCM15         | F 59.4<br>R 60.1                | AAGACTTGCTTTGTGGTCCAG<br>TGTGGAATTGTGACGGATA    | 236                        | (AC) <sub>11</sub> (AT) <sub>19</sub>  |
| SCM16         | F 60.0<br>R 60.1                | CCGGGGATCTGCATTTATATT<br>GCCAATTCATTGCAGACAGT   | 224                        | (TA) <sub>34</sub> (CA) <sub>11</sub>  |
| SCM17         | F 58.0<br>R 60.0                | TGAATCAGTCACCAAGTCAGAG<br>CGACAGACGCATGAGGTAGA  | 153                        | (GT) <sub>3</sub> T(TG) <sub>32</sub>  |
| SCM18         | F 59.3<br>R 60.1                | CCGGGGAATCTGATATCTTG<br>TGTGGAATTGTGACGGATA     | 219                        | (AC) <sub>19</sub>                     |
| SCM19         | F 60.1<br>R 59.8                | GAATAGGGTCAGTGCCAGA<br>CAGGGAGGCTCTGACAGAAG     | 168                        | (GT) <sub>17</sub>                     |
| SCM20         | F 60.2<br>R 60.1                | TGTACGCTGGTTTGCATGT<br>GACCATGATTACGCCAAGCTA    | 229                        | (GT) <sub>4</sub> (TG) <sub>16</sub>   |
| SCM21         | F 60.2<br>R 60.2                | CCGCAGTATGCTCTGCTGT<br>CTAGAGGATCCGCATGGA       | 177                        | (AG) <sub>11</sub> (TG) <sub>18</sub>  |
| SCM22         | F 60.0<br>R 60.1                | CGGAGACAGTCTTGACGAG<br>GGCATCATTTGCTTTGACCT     | 231                        | (GT) <sub>14</sub>                     |
| SCM23         | F 60.5<br>R 60.8                | ACCGGGGATCTGCATTTTAT<br>TGCCAATTCATTGCAGACAG    | 227                        | (TA) <sub>34</sub> (CA) <sub>11</sub>  |
| SCM24         | F 60.0<br>R 57.6                | TTGATGTTGCCCTTTGCTCAG<br>GGTCGACTCTAGAGGATCAAAA | 191                        | (GT) <sub>15</sub>                     |
| SCM25         | F 48.1<br>R 47.4                | GGGGATCTAATTGCACA<br>CCCAGGCTTACACTTT           | 223                        | (AC) <sub>10</sub>                     |
| SCM26         | F 61.0<br>R 60.1                | CGGGGAATCTCTGAGGAAAC<br>AATGTGCAGCATTTTGTCCA    | 182                        | (GT) <sub>10</sub>                     |
| SCM27         | F 57.7<br>R 60.3                | ATGCTCTGCTTCAGACTGTGT<br>CGCCAAGCTATTTAGGTGACA  | 246                        | (CA) <sub>10</sub>                     |
| SCM28         | F 60.0<br>R 60.1                | TTGGGAGGAGAAATGAGTG<br>GGCATCATTTGCTTTGACCT     | 221                        | (GT) <sub>14</sub>                     |
| SCM29         | F 60.3<br>R 60.1                | GGGGATCACTGCAGACATTG<br>CATCAGCTTCAGCTCCATCA    | 178                        | (TG) <sub>13</sub>                     |
| SCM30         | F 60.0<br>R 60.1                | CGGAGACAGTCTTGAGGAG<br>GGCATCATTTGCTTTGACCT     | 231                        | (GT) <sub>14</sub>                     |

注: F, 正向引物; R, 反向引物。

Note: F, forward primer; R, reverse primer.

### 3 讨论

#### 3.1 细菌转膜方法

目前一般采用影印的方法将细菌从固体培养基上转移到硝酸纤维素滤膜上,这种方法简单、快速,缺点是细菌之间容易发生交叉污染,获得的阳性克隆多数由多个细菌组成,经常需要多次放射自显影才能达到实验目的。同时由于杂交菌落比较小,放射自显影后时间很难把握,如果时间长,显影定影后,阳性信号强,会强烈干扰菌落与X-光片上阳性信号的核对;如果时间短,信号不清楚,部分阳性信号会被遗漏,影响实验结果。

而本实验中采用的是用牙签将细菌直接转移到LB平板上的硝酸纤维素滤膜上,只需一次放射自显影就能够得到由单个细菌组成的阳性克隆,这种方法虽然比影印工作量大,但减少了同位素的反复使用对人体的伤害。同时应用本方法转移到膜上的菌落长2.0~3.0 mm,宽0.5~1.0 mm,放射自显影后,阳性杂交信号清晰易辨,而且即使自显影时间长,彼此间也很少有相互干扰的现象,即减少假阳性克隆的比率,又提高了筛选率,因而本方法是一种值得推荐的方法。

#### 3.2 方正银鲫微卫星序列特点

本次实验共得到4 700个转化子数,EcoR I和Hind III双酶切检测重组载体所占的比率为95%,所以重组子数为4 465,杂交后共获得阳性克隆137个,约占3.07%,这与Zane等<sup>[8]</sup>所报道的“在鱼类中用小片段克隆法筛选微卫星序列时阳性克隆所占比例为0.006%~8.91%,平均为3.10%”的结果相符。在所得到的微卫星序列中,(CA)<sub>n</sub>重复次数大多在4~15,最高的为35次,25次以上的较少(图2)。在所测得

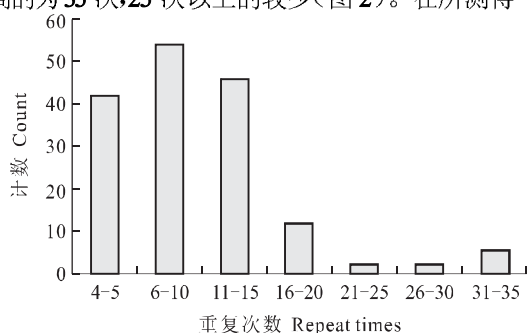


图2 方正银鲫(CA)<sub>n</sub>重复序列的分布

Fig. 2 (CA)<sub>n</sub> repeat sequence distribution of silver crucian carp

的序列中,除(CA)<sub>n</sub>重复序列外,还含有非目的重复序列:(AT)<sub>n</sub>、(GA)<sub>n</sub>、(CT)<sub>n</sub>、(AAAT)<sub>n</sub>、(TGTA)<sub>n</sub>、(CAT)<sub>n</sub>,但大部分包含在目的微卫星序列中,只有3个例外,这可能是筛选时偶然性造成的。在130个微卫星序列中,含(CA)<sub>n</sub>的序列有127个,而本实验获得的重组子为4 465个,因而平均每35个克隆就含有一个微卫星序列。在所筛选阳性克隆中片段大小集中在750~800 bp,平均为775 bp,因此可计算出在方正银鲫基因组中大约每隔 $2.7 \times 10^4$  bp就有一个(CA)<sub>n</sub>重复序列,这与人类及其他动物中统计的数字(每隔10~35 kb出现一次)相符<sup>[12]</sup>。

#### 3.3 方正银鲫遗传机制

微卫星DNA的侧翼序列使微卫星特异性地定位在染色体的一定位置,因而理论上,微卫星分子标记在基因组中是单拷贝的。而实验中5对引物在每个个体中均能扩增出多条带,这可能与方正银鲫倍性有关。实验所用的微卫星分子标记有的能扩增出6~8条带,这暗示方正银鲫有可能是六倍体或是八倍体,即 $2n=6x$ 或 $2n=8x$ ,周莉等<sup>[13]</sup>也进行了类似的推测,但不排除在基因组中有多拷贝的可能性。有的学者根据目前世界上多数鱼类二倍体的染色体数在 $50 \pm$ ,同时通过细胞光度学分析,染色体为 $2n=100$ 的鱼类的体细胞DNA含量较 $2n=50$ 的鱼类的DNA含量近似于成倍增加。因此,他们认为某些染色体数为100的鱼类,可能是 $2n(\rightarrow 4n?)=100$ 的类型,而具 $150 \pm$ 染色体的银鲫可能是 $2n(\rightarrow 6n)=150 \pm$ 的类型<sup>[14]</sup>。那么,方正银鲫到底应该为几倍体?如果是六倍体或是八倍体,其形成的原因有待做进一步的探讨。

自然界中的生物为适应环境的改变而时时刻刻发生着遗传物质的变化。行雌核发育银鲫在自然水体中能够生存下来本身就是一个奇迹,实际上,在黑龙江省方正县双凤水库中的银鲫是以优势种群生存下来的,二倍体鲫鱼只以很少的数量存在。而实验所使用引物扩增结果说明,方正银鲫基因位点多是以杂合态存在的,这可能就是行雌核发育银鲫在天然水体中能以优势种群生存下来的原因。目前为止,众多的细胞学研究<sup>[15]</sup>说明,银鲫成熟分裂时虽然有纺锤体形成但没有见到染色体移向两极及第一极体排出现象。而人工雌核发育的生物一般认为是通过抑制极体的排出或第一次有丝分裂形成的,前者形成后代的基因应该是杂合的,后者应该是纯合

的。结合细胞学观察结果,推测银鲫可能以不发生第一次减数分裂的方式行雌核发育,从而卵子中含有与体细胞相同数量的遗传物质。实验筛选了方正银鲫微卫星分子标记,并对部分标记进行了初步检测分析,如果能进一步利用所得到的微卫星标记对方正银鲫做全面的研究分析,必将对最终阐明其雌核发育机理有所帮助。

#### 参考文献:

- [1] 沈俊宝,王国瑞,范兆廷. 黑龙江主要水域鲫鱼倍性及地理分布[J]. 水产学报,1983,7(2):87-94.
- [2] 丁军,蒋一珪. 雌核发育银鲫和两性融合发育红鲤卵母细胞成熟的细胞学比较研究[J]. 水生生物学报,1991,15(2):97-104.
- [3] 蒋一珪,梁绍昌,陈本德,等. 异源精子在银鲫雌核发育子代中的生物学效应[J]. 水生生物学集刊,1983,8(1):1-13.
- [4] 陈洪,杨靖,薛国雄,等. RAPD技术在异精激发方正银鲫比较研究中的应用[J]. 科学通报,1993,39(7):661-663.
- [5] 滕春波,孙孝文,沈俊宝,等. 利用异源精子激发雌核发育的银鲫及亲本的RAPD分析[J]. 水产学报,1999,23(4):420-423.
- [6] Zhou L, Wang Y, Gui J F. Analysis of genetic heterogeneity among five gynogenetic clones of silver crucian carp, *Carassius auratus gibelio* Bloch based on detection of RAPD molecular markers[J]. Cytogenet Cell Genet, 2000, 88:133-139.
- [7] Beckman J S, Weber J L. Survey of human and rat microsatellites[J]. Genomics, 1992, 12:627-631.
- [8] Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation: a review[J]. Molecular Ecol, 2002, 11(1):1-10.
- [9] 梁利群,孙孝文,王鹏,等. 利用鳍条提取样品总DNA初探[J]. 生物技术,1994,4(1):45-46.
- [10] 魏东旺. 鲤鱼微卫星分子标记的筛选及其在遗传连锁图谱上的定位[D]. 上海:上海水产大学,2001.
- [11] Weber J L. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub> (dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms[J]. Genomics, 1990, 7:524-530.
- [12] Tautz D. Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers[J]. Nucleic Acid Res, 1989, 17:6463-6471.
- [13] 周莉,刘静霞,桂建芳. 应用微卫星标记对雌核发育银鲫的遗传多样性初探[J]. 动物学研究,2001,22(4):257-264.
- [14] 沈俊宝,范兆廷,王国瑞. 黑龙江一种银鲫(方正银鲫)群体三倍体雄鱼的核型研究[J]. 遗传学报,1983,10(2):133-136.
- [15] 周嘉申,沈俊宝,刘明华. 黑龙江方正银鲫雌核发育的细胞学初步探讨[J]. 动物学报,1983,29(1):11-15.

## Isolation of microsatellites in Fangzheng silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* (Block)) and preliminary detection of PCR products

JIA Zhi-ying<sup>1,2</sup>, LIANG Li-qun<sup>1</sup>, SUN Xiao-wen<sup>1</sup>

(1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China; 2. College of Aqu-life Sciences and Technology, Shanghai Fisheries university, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** The partial genome library of the silver crucian carp was constructed by method of small fragments DNA cloning and transferred to filter membrane by nonphotocopy method. The probe (CA)<sub>15</sub> was synthesized and labeled with [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP, and was used to screen the library. One hundred and thirty-seven positive clones were obtained. After sequencing, there are 130 microsatellite sequences and perfect, imperfect and compound ones take up 64.3%, 16.9% and 18.8%, respectively. One hundred and three pairs of primer were designed with Primer Premier5.0 software and 30 pairs of them were synthesized. Five primers were selected randomly and amplified. The results show they can give good bands and the observed heterozygosity is high. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(6):990-994]

**Key words:** gynogenetic; *Carassius auratus gibelio*; microsatellite DNA