

微卫星三重 PCR 基因扫描技术在中国明对虾家系标识中的应用

孔杰¹, 高焕², 于飞³, 罗坤³, 王伟继¹, 孟宪红¹, 刘萍¹, 张天时¹

(1. 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 2. 淮海工学院 江苏省海洋生物技术重点建设实验室, 江苏 连云港 222005; 3. 上海水产大学, 上海 200090)

摘要:在开发中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)微卫星引物的基础上, 利用 3 对微卫星引物, 克隆编号分别为 H081、RS0683 和 RS1101, 构建中国明对虾的三重 PCR 稳定扩增体系。在此基础上, 进一步利用荧光标记引物的基因扫描技术(Genescan)对利用精英移植技术建立的中国明对虾 7 个半同胞家系和 16 个全同胞家系进行识别研究。结果表明, 该项技术可以准确地把 7 个半同胞家系的子代个体间、16 个全同胞家系的子代个体间以及总的 31 个全同胞家系的子代个体间区别开, 且能准确把这些家系产生的任意子代个体定位到各个家系。该技术可以满足大批量家系材料样本的分析, 具有较好的应用价值。[中国水产科学, 2007, 14(1): 59—66]

关键词:微卫星; 三重 PCR; 基因扫描; 中国明对虾; 家系识别

中图分类号: S966

文献标识码: A

文章编号: 1005—8737—(2007)01—0059—08

中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)是中国黄、渤海、朝鲜半岛西海岸和南海岸生存和养殖的主要经济虾类。但自 1993 年暴发白斑综合征病毒症(WSSV)以来, 其生产养殖规模急剧下降, 迫切需要通过遗传选育方式培育抗病抗逆新品种。其中, 家系选育是重要的环节之一。由于对虾类自身生长规律的限制, 其混养家系标识问题成为迫切需要解决的一个课题。目前对中国明对虾家系和个体的标识主要有 2 种方式: (1)物理标记, 包括眼柄标记、挂牌和注射荧光染料标记等方式; (2)分子标识, 其中应用广泛的是微卫星分析方法。

微卫星呈共显性遗传, 在亲代和子代之间遵从孟德尔遗传分离和自由组合规律, 加之其突变率较低(人类中的突变率为 1×10^{-3} ^[1-2], 果蝇中的突变率为 5×10^{-6} ^[3]), 因而可以比较“忠实”地再现各个家系的特征。目前, 对中国明对虾微卫星家系标识研究已经初步开展^[4], 如果采用多个位点同时标识的方式, 则其家系区分能力将大大提高, 这在一些水产养殖经济动物中已经得到了应用, 如大西洋比目鱼(*Hippoglossus hippoglossus*)^[5]、大马哈鱼(*Oncorhynchus spp.*)^[6]、美国龙虾(*Homarus americanus*)^[7]。同时, 采用测序仪荧光标记引物的基因扫描(Genescan)技术, 将大大提高分析的精度, 也可以

突破普通聚丙烯酰胺凝胶不能准确地对不同凝胶电泳结果中的个体基因型同时比较分析的难点。本研究借助于一次性同时检测多个微卫星位点的多重 PCR 基因扫描技术, 进行中国明对虾家系的分子标识研究, 以期将来进行大规模的分子辅助育种提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究采用的中国明对虾材料分为 2 个部分: (1)由雄性亲本建立起来的 7 个半同胞家系(采用整个精英移植法建立), 共 7 个雄性亲本和 15 个雌性亲本, 子代个体 6~10 个; (2)16 个全同胞家系的 16 个父本和对应的 16 个母本及每个家系子代个体 6~10 个。

采用 Liu 等^[8]的方法, 提取以上家系个体的基因组 DNA, DNA 的浓度由 GeneQuant Pro 核酸定量仪(Pharmacia Biotech Ltd.)测定。

1.2 方法

1.2.1 引物信息及荧光标记 实验共采用了 3 对微卫星引物, 克隆编号分别为 H081、RS0683 和 RS1101, 有关这 3 对引物的信息见表 1。

收稿日期: 2006—04—06; 修订日期: 2006—06—20。

基金项目: 国家自然科学基金项目(30500378); 国家高技术研究发展计划 863 项目(2005AA60310)。

作者简介: 孔杰(1963—), 男, 研究员, 主要从事中国明对虾遗传育种方面研究。E-mail: kongjie@sina.com

表1 RS1101、RS0683和H081三对微卫星引物的基本信息
Tab.1 Basic information of three pair primers, RS1101, RS0683 and H081

项目 Item	引物名称 Name of primer		
	H081	RS0683	RS1101
GenBank 注册号 Accession number of GenBank	未注册	AY132823	AY132811
最佳退火温度/℃ Optimum anneal temperature	62	64	52
扩增片段长度/bp Length of DNA fragments amplified	194	278	441
引物序列(5'-3') The primer sequences			
正向 Former	TGAAACACAT	TGACTCACTT	GCAGTGGCAG
反向 Reverse	CTTAGAGAGG	ATCACACCAA	ATTCCCCAC

在3对引物的正向引物的5'端标记上荧光标记, H081和RS1101引物分别标记上FAM, RS0683引物标记上HEX。FAM被激发后的光颜色为蓝色; HEX被激发后的光颜色为绿色(结果中的图为黑白图, 故没有显示颜色)。引物合成及荧光修饰在上海生物工程有限公司完成。

1.2.2 三重PCR反应体系构建和聚丙烯酰胺凝胶电泳 通过调整PCR体系中的 Mg^{2+} 、dNTP和引物等的使用量, 以及采用Touch-down PCR程序后, 获得了由表1中3个引物组成的三重PCR 15 μ L反应体系。体系参数为: $10\times$ Buffer 1.3 μ L, $MgCl_2$ (2.5 mmol/L) 1.0 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 1.0 μ L, RS1101和RS0683引物(正、反)各0.25 μ L, H081引物(正、反) 1.0 μ L (引物浓度均为20 pmol/ μ L), DNA模板1.5 μ L (50 ng/ μ L), ddH₂O 7.0 μ L, 0.2 μ L Taq聚合酶(5 U/ μ L)。PCR反应在PTC-200 PCR扩增仪(MJ Research)上进行扩增: 94℃预变性5 min后进行循环1: 94℃变性40 s, 66℃退火1 min, 72℃延伸1 min, 共循环6次; 随后进行循环2: 94℃变性40 s, 66℃退火1 min, 退火温度每个循环降低0.5℃, 72℃延伸1 min, 循环进行12次; 再进行循环3: 94℃变性40 s, 60℃退火1 min, 72℃延伸1 min, 共循环14次。最后72℃延伸10 min, 4℃保存并结束程序。

PCR产物经8%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 采用硝酸银染色的方法显示结果, 待凝胶干燥后利用扫描仪扫描记录电泳图像。

1.2.3 基因扫描分析(Genescan) 利用荧光标记的引物, 采用15 μ L反应体系获得三重PCR的扩增产物, 取1.5 μ L扩增产物与9 μ L内标体系(甲酰胺: 内标 GeneScan™-500 LIZ Size Standard = 8: 1)

充分混合后, 在PCR扩增仪中保持95℃变性5 min, 结束后迅速放在冰水混合物中冷却。处理好后的变性产物上样于3700测序仪(Applied Biosystems, ABI, 美国应用生物系统公司), 利用其中的Genescan功能及Gene Mapper(3.0)软件进行基因型分析。

2 结果与分析

2.1 三重PCR的构建

15 μ L三重PCR反应体系扩增优化的结果见图1, 图中的结果为8%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱, 其中的19~21这3个位置的扩增条件较好, 21最好, 即设定为该体系的最佳条件。

利用这个体系在家系材料中进行扩增, 同样得到了很好的基因扫描结果, 如图2所示。图中的H081引物对应的峰图为132 bp, RS1101对应的峰图为444 bp, 中间RS0683位点对应的峰图分别为253 bp(左侧)和263 bp(右侧), 表明该位点是由两个不同等位基因组成的杂合子。

2.2 半同胞家系的家系区分

利用精英移植法, 共获得了62个由雄性亲本建立起来的半同胞家系。其中父母本保存完好的家系共有7个, 除了其中1个雄虾与3个雌虾人工授精产生了3个全同胞家系外, 其他半同胞家系均为2个全同胞家系的组合。各半同胞家系的基因扫描分型结果见表2。编号为1的全同胞家系中的♀绿20产生的10个子代基因型列于表3。从表3中可以看出, 子代个体基因型除了在个别位点没有扩增产物外, 其他位点均符合亲本基因型的孟德尔遗传分离规律。由于子代个体数目很多, 在此不再一一列出其他家系子代个体的具体基因型。

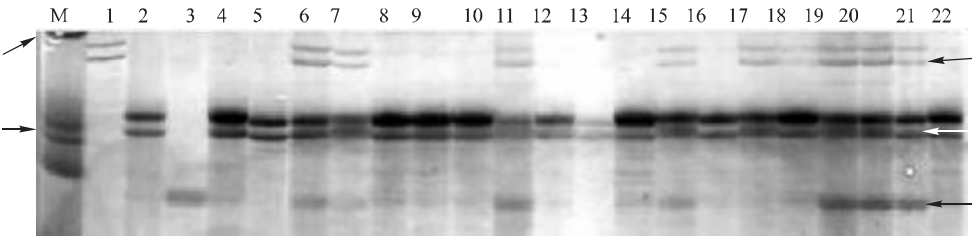


图 1 三重 PCR 优化筛选结果

注:M 为 Marker DL2000,左边箭头从上到下分别表示 500 bp 和 250 bp;1、2 和 3 分别为 RS1101、RS0683 和 H081 单个引物的扩增结果;4 为 1 个基础 PCR 体系(10×Buffer1.3 μL,MgCl₂1.0 μL,dNTP1.0 μL,RS1101、RS0683 和 H081 正、反向引物各 0.5 μL,DNA 模板 1.5 μL,ddH₂O 7.0 μL,0.2 μL Taq 聚合酶);5、6 和 7 分别为 Buffer 梯度;8、9、10 和 11 分别为 MgCl₂梯度;12、13、14 和 15 分别为 dNTP 梯度;16 至 22 均为引物量梯度,其中 21 的扩增结果最好,即梯度为 RS1101 和 RS0683 正反向引物各 0.25 μL,H081 正反向引物各为 1.0 μL;右边箭头分别指示 3 个位点的扩增结果.

Fig. 1 Amplified results of triplex PCR according to screened frame

Note:M is Marker DL2000,and the arrows in the left show respectively 500 bp and 250 bp from the top down;1,2 and 3 are single amplified results of primers RS1101,RS0683 and H081,respectively;4 is designated as basic amplification system(10×Buffer 1.3 μL,MgCl₂ 1.0 μL,dNTP 1.0 μL,0.5 μL of each forward or reverse primer,1.5 μL template DNA,7 μL ddH₂O,0.2 μL Taq Polymerase(1 U));5,6 and 7 show the different gradient Buffer;8,9,10 and 11 show MgCl₂ gradient;12,13,14 and 15 show dNTP gradient;16 to 22 show the concentration gradient of primers among which the results of 21 look the best,and the dosages of each forward and each reverse primer are both 0.25 μL for RS1101 and RS0683 and 1.0 μL for H081,respectively.

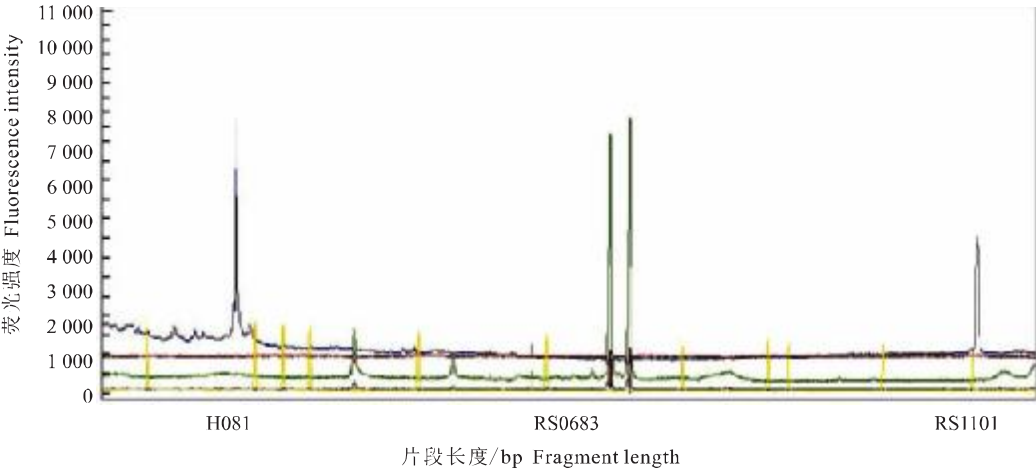


图 2 三重 PCR Genescan 基因扫描图

Fig. 2 Genescan results of the triplex PCR

表2 半同胞家系的基因型
Tab. 2 Genotypes of males and females in half-sibs

父本 Male	H081	RS0683	RS1101	母本 Female	H081	RS0683	RS1101
1. ♂ RHY5	208/212	253/277	420/446	♀绿 20 ♀G20	207/250	263/263	410/446
				♀绿 339 ♀G339	198/201	263/307	420/452
2. ♂ SKF2	207/229	263/271	410/412	♀绿 329 ♀G329	202/258	253/271	421/446
				♀绿 313 ♀G313	203/203	249/253	446/446
3. ♂ RHY4	—	257/277	420/452	♀绿 59 ♀G59	202/211	253/283	444/466
				♀绿 62 ♀G62	203/218	257/257	446/446
4. ♂ RHY2	203/203	263/297	446/446	♀绿 3 ♀G3	—	273/273	442/452
				♀绿 97 ♀G97	207/209	249/253	412/420
				♀绿 51 ♀G51	204/220	257/289	420/452
5. ♂ RHY3	211/230	257/263	412/420	♀绿 12 ♀G12	—	277/301	420/420
				♀绿 323 ♀G323	205/208	257/283	412/420
6. ♂ 绿 100	—	267/299	420/452	♀绿 305 ♀G305	205/214	263/263	420/420
♂ G100				♀绿 98 ♀G98	199/205	257/257	420/446
7. ♂ 绿 309	—	263/263	444/444	♀绿 63 ♀G63	202/218	263/291	412/446
♂ G309				♀绿 18 ♀G18	199/220	277/277	412/446

注: ♂ 绿 100 和 ♀ 绿 20 等均为实验室对虾的编号, 其中英文注释中相应的写作 ♂ G100 和 ♀ G20。

Note: “♂ G100” and “♀ G20” et al are the codes of shrimp samples used in our research, and the same as the following tables.

表3 ♀ 绿 20 家系子代个体的基因型
Tab. 3 Genotypes of offspring in Parentage ♀ G20

位点	♀ 绿 20 子代个体基因型 Genotype of ♀ G20 offspring									
Locus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
H081	208/250	208/250	208/207	—	208/250	212/207	212/250	208/207	212/250	212/207
RS0683	253/263	277/263	277/263	253/263	277/263	277/263	253/263	—	253/263	277/263
RS1101	446/446	—	410/446	410/446	420/410	—	420/410	410/446	420/410	446/446

通过每个家系 6~10 个子代实际分析及父母本基因型的分析, 此三重 PCR 可以区分 7 个半同胞家系间和家系内不同母本间的个体, 识别率为 100%。如半同胞家系 1 (♂ RHY5) 和 2 (♂ SKF2) 在 H081、RS0683 和 RS1101 3 个位点上的基因型各不相同, 其子代个体也在这 3 个位点上达到完全识别, 同时半同胞家系 1 (♂ RHY5) 内部的 2 个全同胞家系中, 由于母本 ♀ 绿 20 和 ♀ 绿 339 的基因型虽然在 RS0683 位点有 1 个共同的等位基因 (263 bp), 但在 H081 和 RS1101 位点各不相同, 也完全可以区分它们的子代个体。另外, 在 H081 微卫星位点上, ♂ RHY4 (3)、♂ 绿 100 (6)、♂ 绿 309 (7)、♀ 绿 3、♀ 绿 12 没有得到相应的基因型。

2.3 全同胞家系的区分

父母本都保存完好的全同胞家系共有 16 个, 它们在 3 个位点基因型分别如表 4 所示。

通过每个家系 6~10 个子代及父母本基因型的分析, 此三重 PCR 可以区分以上的 16 个全同胞家系的子代个体, 识别率为 100%。尽管在某些等位基因位点, 如全同胞家系 1 (母本为 ♀ 绿 93) 的父本 ♂ 绿 76 在 H081 位点没有得到理想的等位基因扩增产物, 但通过母本的 H081 位点以及 RS0683 和 RS1101 引物位点的基因型也可以把其子代和其他家系的子代完全区分开。

在以上分析的基础上, 把半同胞家系中的 15 个全同胞家系和以上的 16 个全同胞家系合并分析, 共 31 个全同胞家系, 在 3 个等位基因位点上也同样可以把它们的子代两两鉴别出来。在这 3 个引物中, 通过基因扫描分析, RS1101 位点的等位基因数目较少, 只有 6 个, 但 RS0683 的等位基因多达 24 个, H081 引物也多至 24 个, 显示了它们的组合有很强的家系和个体识别能力。

表 4 全同胞家系的基因型
Tab. 4 Genotypes of males and females in full-sibs

母本 Female	H081	RS0683	RS1101	父本 Male	H081	RS0683	RS1101
1. ♀ 绿 93 ♀ G93	202/214	277/277	446/446	♂ 绿 76 ♂ G76	—	257/337	420/420
2. ♀ 绿 56 ♀ G56	212/264	257/257	446/446	♂ 绿 328 ♂ G328	221/224	303/303	
3. ♀ 绿 2 ♀ G2	199/210	263/263	446/452	♂ SKC6	—	271/307	420/446
4. ♀ 蓝 104 ♀ B104	188/208	249/333	446/446	♂ 乳山 2 ♂ RS2	—	273/273	420/446
5. ♀ 绿 71 ♀ G71	202/202	283/283	—	♂ 绿 338 ♂ G338	—	263/337	—
6. ♀ 蓝 178 ♀ B178	—	293/293	—	♂ 绿 92 ♂ G92	—	257/329	420/452
7. ♀ 绿 319 ♀ G319	—	263/273	452/452	♂ RHY1	183/199	273/279	446/446
8. ♀ 绿 79 ♀ G79	—	253/253	446/452	♂ SKF1		263/287	420/452
9. ♀ 绿 324 ♀ G324	201/204	263/267	444/444	♂ 35968	188/204	263/271	452/452
10. ♀ 蓝 136 ♀ B136	—	253/253	—	♂ 绿 78 ♂ G78	—	323/329	412/416
11. ♀ 绿 15 ♀ G15	215/223	227/227	410/446	♂ 绿 311 ♂ G311	—	251/291	412/412
12. ♀ 绿 316 ♀ G316	—	263/263	—	♂ 绿 34 ♂ G34	189/202	263/267	412/446
13. ♀ 绿 70 ♀ G70	—	293/303	412/446	♂ SKC7	190/202	273/279	420/452
14. ♀ 绿 17 ♀ G17	—	277/277		♂ 绿 11 ♂ G11	210/220	235/277	446/446
15. ♀ 绿 5 ♀ G5	—	257/337	446/446	♂ 绿 25 ♂ G25	—	257/283	420/446
16. ♀ 绿 325 ♀ G325	199/203	257/283	420/420	♂ 绿 43 ♂ G43	176/209	253/271	446/446

2.4 软件模拟分析此三重 PCR 家系标识能力

在以上对家系内及家系间识别研究的基础上,借助 1 个实用的家系分析软件 Cervus (Version 2.0, written by Triston)^[9]对任意子代个体的基因型进行家系定位。首先利用亲本基因型(包括半同胞

家系和全同胞家系)计算 3 个微卫星位点各等位基因的基因频率,进一步利用这些基因频率资料在“Simulation”模块中推算 3 个微卫星位点的家系识别能力,并据此在“Parentage analysis”模块中对家系和各个子代个体的识别情况进行具体分析。结果表

明,把半同胞家系的7个父本和15个母本作为疑似亲本进行软件模拟查找分析,能准确对任意一个子代个体进行家系的定位;把全同胞家系16个父本和母本一起作为疑似父母本,也同样可以把任意一个子代准确定位到其家系。

3 讨论

3.1 基因扫描多重PCR技术在中国明对虾家系中的应用探讨

多重PCR在家系或品系研究中应用较为广泛,谢建云等^[10]利用4个特异性引物对10个小鼠近交品系进行了组合多重PCR研究;在水产动物中,黎中宝等人^[11]则利用微卫星多重PCR技术对黑唇鲍(*Haliotis rubra*)中的微卫星位点进行了研究。本实验室已进行持续多年的中国明对虾微卫星引物开发工作,得到一些多态性信息含量较高,并可以应用于中国明对虾遗传多样性研究的位点^[12-13]。

虽然利用常规的聚丙烯酰胺凝胶电泳方法可以在一块胶板中分析各个个体基因型的差异,但不同胶板中的个体基因型之间的比较却很难,这给大量比较分析不同家系个体间的基因型差异带来了困难。利用测序仪中的Genescan基因扫描功能可以克服这一困难,能较为准确得知各个个体的基因型,甚至只有一个碱基的差异也可以分辨出来。同时这种技术还能鉴别出普通变性聚丙烯酰胺凝胶电泳不能分辨出来的等位基因位点,如RS0683位点通过8%的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳在20个中国明对虾(*F. chinensis*)个体中检测到12个等位基因^[13],而在本实验中等位基因的数目则达到了24个,可见Genescan扫描分析技术能检测出远多于普通变性聚丙烯酰胺凝胶电泳的等位基因位点数目。

利用荧光标记的多重PCR基因扫描技术还可以实现规模化、自动化,同时还具备缩短实验进程等优点^[14]。它一次可以同时满足多至近400个样品的分析,而且在10个小时左右就可以完成从上样到数据分析的全过程,因此在检测水产动物大量子代个体时具有明显的优势。在实际分析中,还有很多位点没有检测到基因型,这主要与PCR没能有效扩增出产物,以及微卫星技术本身可能还存在无效等位基因等缺点有关^[10]。

3.2 微卫星在家系识别中的应用能力

微卫星是一种呈共显性的遗传标记,因而在微卫星座位上任何位点出现的纯合或杂合状态很容易

被检测出来,且基因型的遗传符合孟德尔分离和自由组合规律,因而成为个体识别和家系识别中一类重要的分子标记。在微卫星识别研究上可以分为个体识别(Individual identification)和家系鉴定(Parentage verification)2个层次^[16],而衡量识别能力一般用个体识别力(Discrimination Power, DP)和非父排除率(EPP)这2个概念^[17]。

由于对人类基因组微卫星位点已经进行了大量的开发工作,同时在多重PCR方面也进行了规模性、系统性的研究,因而用在法医学上的多重PCR位点数已多达16个^[18]。但相对于水产动物中国明对虾而言,由于其基因组研究和微卫星开发等方面研究还处于起步阶段,想达到同样的程度还有很长的路要走。通过本实验中利用三重PCR技术进行家系识别研究的结果来看,微卫星分子标记在中国明对虾家系识别中有很大的应用价值。本质上,家系和个体识别就是基因型的识别,1个基因型代表着1个可以区别出来的个体。100个家系最多可以产生子代基因型数目为400个,当理论识别率设置为95%时,所需的基因型数目为 $400 \times 95\% = 380$ 种。而粗略的估算达到380种基因型的等位基因位点数目只需要 $n; n(n+1)/2 = 380, n \approx 27$,因此对于1个具有7个等位基因的微卫星座位而言,只需要这样的微卫星座位数为 $27/7 \approx 4$ 个。这种方法只是假设每种等位基因在群体中的分布频率都相同,在考虑等位基因频率有差异的情况下,实际要小于这个数目,具体的详细推算需要进一步统计实际应用中观测到的各基因型频率,统计方法中还要同时考虑偏离哈迪-温伯格平衡和多位点连锁不平衡的问题。在牛的家系识别研究中,5个微卫星位点一起的随机亲代排除率可以达到0.99^[16]。King等^[19]利用12个微卫星位点研究了29个欧洲和北美鲑鱼群体,从地理分布的角度可以100%的进行鉴别,更有83%的个体可以准确的定位到起源地。笔者利用软件模拟分析,把半同胞家系和全同胞家系分别作为疑似父母本,利用任意一个子代个体的基因型进行家系定位分析,结果都可以准确定位到各个家系。

参考文献:

- [1] Brinkmann B, Klitsch M, Neuhuber F, et al. Mutation rate in human microsatellites: Influence of the structure and length of the tandem repeat[J]. Am J Hum Genet, 1998, 62: 1 408-1 415.

- [2] Xu X, Peng M, Fang Z. The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length[J]. *Nat Genet*, 2000, 24(4):396—399.
- [3] Vazquez F, Perez T, Albornoz J, et al. Estimation of the mutation rates in *Drosophila melanogaster*[J]. *Genet Res*, 2003, 76:323—326.
- [4] 孙昭宁, 刘萍, 李健, 等. 微卫星 DNA 技术用于中国对虾家系构建中的系谱认证[J]. *中国水产科学*, 2005, 12(6):694—701.
- [5] Jackson T R, Martin-Robichaud D J, Reith M E. Application of DNA markers to the management of Atlantic halibut(*Hippoglossus hippoglossus*) broodstock[J]. *Aquaculture*, 2003, 220(1—4):245—259.
- [6] Olsen J B, Wenburg J K, Bentzen P. Semiautomated multilocus genotyping of Pacific salmon(*Oncorhynchus* spp.) using microsatellites[J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1996, 5(4):259—272.
- [7] Jones M W, O'Reilly P T, McPherson A A, et al. Development, characterisation, inheritance, and cross-species utility of American lobster(*Homarus americanus*) microsatellite and mtDNA PCR-RFLP markers[J]. *Genome*, 2003, 46(1):59—69.
- [8] Liu Ping, Kong Jie, Shi Tuo, et al. RAPD analysis of wild stock of Penaeid shrimp(*Penaeus chinensis*) in Chinese coastal waters of the Huanghai Sea and Coastal waters of the Bohai Sea[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2000, 19(1):119—126.
- [9] Marshall T C, Slate J, Kruuk L, et al. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations[J]. *Molecular Ecology*, 1998, 7(5):639—655.
- [10] 谢建云, 邵伟娟, 高诚. 多重 PCR 在几个近交系小鼠遗传检测中的应用初探[J]. *中国实验动物学报*, 2003, 11(2):92—95.
- [11] 黎中宝. Appleyard Sharon A, Elliott Nicholas G. 多元 PCR 在黑鲍(*Haliotis rubra*)微卫星遗传研究中的应用[J]. *海洋与湖沼*, 2005, 36(4):319—325.
- [12] 刘萍, 孟宪红, 孔杰, 等. 中国对虾微卫星 DNA 多态性分析[J]. *自然科学进展*, 2004, 14(3):333—337.
- [13] 刘萍, 孟宪红, 何玉英, 等. 中国对虾(*Penaeus chinensis*)黄、渤海 3 个野生地理群遗传多样性的微卫星 DNA 分析[J]. *海洋与湖沼*, 2004, 35(3):252—256.
- [14] He L, Mansfield D C, Brown A F, et al. Automated linkage analysis in psychiatric disorders[J]. *Am J Med Genet*, 1995, 60(3):192—198.
- [15] Kumar D, Dixit S P, Sharma R, et al. Population structure, genetic variation and management of Marwari goats[J]. *Small Ruminant Research*. 2005, 59(1):41—48.
- [16] Usha A P, Simpson S P, Williams J L. Probability of random sire exclusion using microsatellite markers for parentage verification[J]. *Anim Genet*, 1995, 26(3):155—161.
- [17] 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):532—537.
- [18] Krenke B E, Tereba A, Anderson S J, et al. Validation of a 16-locus fluorescent multiplex system[J]. *J Forensic Sci*, 2002, 47:773—785.
- [19] King T L, Kalinowski S T, Schill W B, et al. Population structure of atlantic salmon(*Salmo salar* L.): a range-wide perspective from microsatellite DNA variation[J]. *Molecular Ecology*, 2001, 10:807—821.

Parentage identification of Chinese shrimp(*Fenneropenaeus chinensis*) using microsatellite-based triplex PCR Genescan technology

KONG Jie¹, GAO Huan², YU Fei³, LUO Kun³, MENG Xian-hong¹, LIU Ping¹, ZHANG Tian-shi¹

(1. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China; 3. Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: In 2005, we developed many full- and half-sibs of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). In order to perform the genetic breeding program of Chinese shrimp, the offspring from deferent parentages were needed to cultivate together. Here, the problem is how to distinguish the offspring belonging to each parentage from each other. We attempted to use microsatellite molecular markers to resolve it.

Through developing the microsatellite primers from the random genome sequences of *F. chinensis*, we obtained some microsatellite markers with rich genetic polymorphic information, in which three markers, RS1101, RS0683 and H081 were selected to establish a triplex PCR technique using a touch-down PCR method. The expected bands of three markers were clearly presented in the 8% denature polyacrylamide gel by electrophoresing, and the optimal amplified PCR reaction volume was 15 μL containing 10 $\times$ Buffer 1.3 μL , MgCl_2 (2.5 mmol/L) 1.0 μL , dNTP 1.0 μL (2.5 mmol/L), 0.5 μL of each forward or reverse primer (20 pmol/ μL), 1.5 μL template DNA (50 ng/ μL), 7 μL ddH₂O and 0.2 μL *Taq* Polymerase (1 U). Furthermore, the amplification products of triplex PCR were analyzed using ABI 3700 Prism Genetic Analyzer and GeneScan 4.0 software (Perkin Elmer Applied Biosystems), and Gene Mapper 3.0 software. In seven half-sibs and sixteen full-sibs, 6, 24 and 24 alleles were found on the RS1101, RS0683 and H081 loci, respectively. By the comparative analysis on genotypes between parents and offspring, the results showed that the offspring of seven half-sibs and sixteen full-sibs could be identified from each other. Additionally, by the help of Cervus bio-soft (Version 2.0, written by Triston), any offspring cultivated together could be found which parentage they belong to. So, the triplex PCR is a useful tool for the parentage identification of Chinese shrimps. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(1): 59–66]

Key words: microsatellites; triplex PCR; genescan; *Fenneropenaeus chinensis*; parentage identification

Corresponding author: KONG Jie. E-mail: kongjie@sina.com