

磁珠富集法与小片段克隆法筛选鲤微卫星的比较研究

孙效文, 贾智英, 魏东旺, 鲁翠云, 梁利群

(中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要:用2种方法克隆黑龙江鲤(*Cyprinus (Cyprinus) carpio haematopterus*)的微卫星序列。这2种方法分别是:①经典的小片段DNA克隆库,用末端标记的 $[\gamma^{32}]$ ATP的CA重复序列为探针筛选;②将酶切获得的小片段DNA用结合有磁珠的并连接有15个CA重复序列的生物素进行富集,获得的含有CA重复的DNA片段并经过两次PCR扩增再克隆的方法获得富集微卫星片段的克隆库。从前一个方法的克隆库中筛选2000个菌落,获得阳性克隆45个,有22个含有微卫星,完美型的占63.6%,非完美型的占22.7%,混合型的占13.7%,重复次数超过10的有9个,占40.9%;从方法②的克隆库中筛选2600个菌落,获得阳性克隆1300个,测序其中的390个克隆,微卫星314个,完美型的占79.0%;非完美型的占14.3%;混合型的占6.7%,重复次数超过10的有293个,占93.3%。结果表明,用生物素结合磁珠富集法克隆微卫星效率高,成本低,所获微卫星质量高,是一种值得推荐的微卫星制备方法。

关键词:磁珠富集;小片段克隆;鲤;微卫星

中图分类号:Q959.468 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2005)02-0126-07

微卫星分子标记的共显性特征决定其在水产养殖生物的基因组和品种选育等研究中获得越来越多的应用。微卫星已用于虹鳟(*Oncorhynchus mykiss* Walbaum)^[1-3]、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[4-6]、大西洋鲑(*Salmo salar*)^[7]等多种养殖鱼类的研究工作中。鲤鱼(*Cyprinus (Cyprinus) carpio haematopterus*)是世界上池塘养殖量最多的鱼类,其微卫星克隆及使用也有一些报道^[8-10],但制备出的微卫星在数量上还不足以进行基因组研究^[11]。

微卫星分子标记的使用主要受限于微卫星及其旁侧特异引物区的分离。微卫星DNA的克隆主要有2种方法:一种是构建目标生物基因组小片段DNA文库^[8,12-15],通过杂交筛选出含有微卫星序列的阳性克隆,但是筛选过程较复杂,筛选效率低,需要大量的人力和资金的投入;另一种方法是用生物素结合磁珠富集技术先将富含微卫星的DNA片段富集,经PCR扩增后,再建立DNA文库的方法。从网上公开发表的基因组序列资源中筛选微卫星DNA也是一种方便的途径,但目前鲤科鱼类的基因组DNA序列资源还很有限,难以获得足够于群体

遗传学分析所需的标记。

本研究利用传统的小片段DNA克隆法和磁珠富集法克隆鲤鱼的微卫星,并对2种方法的优劣进行比较分析,旨在筛选出一个效率高,成本低的微卫星克隆技术,同时开发出一批鲤鱼的微卫星DNA资源。

1 材料与方法

1.1 小片段克隆法

1.1.1 鲤鱼总DNA的提取和酶切 实验用鲤为黑龙江鲤(*Cyprinus (Cyprinus) carpio haematopterus* Temminck et SchlageL,以下简称鲤),采自黑龙江抚远县江段。取1尾体重约1 kg鲤的肝脏0.1 g,加入0.5 mL裂解液(0.5%的十二肌胺酸钠,200 μ g/mL蛋白酶K,0.5 mol/L EDTA),50.00 $^{\circ}$ C温育1~2 h。然后用酚、酯和氯仿混合液、氯仿各抽提1遍,乙醇沉淀后,再用70%乙醇洗1次。自然干燥,加100 μ L 1/10 TE溶解。取5 μ g鲤DNA,用5~8单位的*Sau*3A I酶切,使切出的片段大部分在350~700 bp,乙醇沉淀回收。

1.1.2 连接及转化 取300 ng质粒DNA,80 ng酶

收稿日期:2004-07-01; 修订日期:2004-09-17。

基金项目:国家“863”高技术研究发展项目(863-101-05-02-01)。

作者简介:孙效文(1955-),男,研究员,研究方向:水产遗传育种学。Tel:0451-84842646。E-mail:xsw1999@hotmail.com

通讯作者:梁利群。E-mail:lq-1019@163.com

切后的鲤 DNA,加入 T4DNA 连接酶 1 个单位,加无菌水补足 50 μL , 12~16 $^{\circ}\text{C}$ 反应约 15 h。感受态细胞的制备参照文献[15]。取 5 μL 连接液进行转化,最后涂到事先制备好的含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氨苄青霉素的 LB 平板上,平板表面涂有 X-Gel 和 IPTG,每个平板上菌落控制在 600 以内。

1.1.3 杂交膜的制备 由于白色菌落占的比例不高(约 50%),用无菌牙签把白色菌落转移到底部画有方格线的新的平板上,每个平板上约 400 个菌落。杂交膜为硝酸纤维素滤膜,直径与平板的内径相同。杂交膜的制备参照参考文献[15]。每个平板影印一张杂交膜,并作一致的方位标记。影印后的平板放于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中直到重新长出菌落。

1.1.4 探针的制备 用人工合成的 CA 重复 15 次的序列(CA)₁₅ 20 pmol, T4 多核苷酸激酶 2 个单位,最后加入 $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP 50 μCi , 反应体积 50 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h。通过自制的 Sephadex G-50 凝胶柱回收探针 DNA。

1.1.5 杂交 取 1 支干净的杂交瓶,先放入杂交膜,再取 25 mL 50 $^{\circ}\text{C}$ 预热的杂交液(0.25 mol/L NaCl, 0.125 mol/L Na₂HPO₄, 1 mmol/L Tris·HCl pH 7.4, 0.7% SDS, 10% PEG-6000),加入煮沸变性的小牛胸腺 DNA 2.5 μg , 50 $^{\circ}\text{C}$ 预杂交 2 h。倒出预杂交液,加入 25 mL 50 $^{\circ}\text{C}$ 预热的杂交液,加入终浓度为 $1 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6$ cpm 的探针(CA)₁₅, 50 $^{\circ}\text{C}$ 杂交 12~16 h。依次用 2 倍 SSC(含 0.1% SDS)、0.1 倍 SSC(含 0.1% SDS)、0.1 倍 SSC 在 50 $^{\circ}\text{C}$ 各洗涤 15 min。暗室中压上 X-光底片, -70 $^{\circ}\text{C}$ 放射自显影约 16 h。

1.1.6 阳性克隆的挑取 按照原先确定的方位,将 X-光底片、硝酸纤维素滤膜和模板平板三者对照,在相同的位置上挑出阳性克隆。

1.2 磁珠富集法

1.2.1 接头的制备 用单链的寡核苷酸做接头,每种寡核苷酸的浓度均为 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。所用接头:寡核苷酸链 A: 5' - GATCGTCGACGGTACCGAATTCT; 寡核苷酸链 B: 5' - GTCAAGAATTCG-GTACCGTCGAC。等比例混合两组寡核苷酸 A、B,使其每组的终浓度为 25 $\mu\text{mol}/\text{L}$,退火以形成带有限制性酶切位点(*Sau*3AI, *Sal*I, *Eco*RI)的双链接头。退火方法:95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min,然后用 4 h 冷却到 10 $^{\circ}\text{C}$ 。缓慢降温形成接头的过程非常重要,可以根

据实验室条件选用 PCR 仪,设计程序进行。最终形成的接头为:

5' GATCGTCGACGGTACCGAATTCT A
3' CAGCTGCCATGGCTTAAGAACTG B
*Sau*3AI---*Sal*I-----*Eco*RI

1.2.2 片段间接头的连接 建立 20 μL 的反应体系,每次反应应用 10 μL 接头,由于接头对于 DNA 片段是过量的,所以可以把一次回收的 DNA 片段 50 $^{\circ}\text{C}$ 烤干使用。16 $^{\circ}\text{C}$ 过夜连接。

1.2.3 过柱除去多余接头 用旋离柱(Centrifugal Concentrators, PALL FILTRON 公司产品)离心去除多余的接头,并最终浓缩到 15 μL 左右,1% 琼脂糖凝胶电泳检测,看接头是否去除干净。由于多余的寡核苷酸接头会影响后面的 PCR 扩增,所以一定要把多余的接头去除干净。

1.2.4 创建“基因组 PCR 文库” 用连有接头的 DNA 片段作为模板,寡核苷酸链 B 作为引物进行 PCR 扩增(PE9700 型 PCR 仪),创建基因组 PCR 文库。程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 58 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。反应完毕,过旋离柱去除多余引物和未参加反应 dNTP,并浓缩到 15 μL 左右。电泳检测。

1.2.5 用生物素标记的微卫星探针和 Dynal 磁珠杂交并富集微卫星序列

(1) 50 μL 反应体系的建立 体系组成为:1.5 μL (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) Probe[为生物素标记的 (CA)₁₅]; 5 μL (50 $\mu\text{mol}/\text{L}$) Primer B, 15 μL 20 $\times$ SSC, 0.5 μL 10% SDS, 16 μL ddH₂O。

以上混合液 68 $^{\circ}\text{C}$ 预热后加入 12 μL (276 ng) DNA, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min 加入预热的杂交混合液, 68 $^{\circ}\text{C}$ 杂交 1 h。杂交过程中平衡磁珠。

(2) 磁珠的平衡 将磁珠轻轻摇匀,吸出 100~500 μL 的硅化离心管中,放在磁力架上(MPC) 1~2 min,轻轻吸出盐溶液。用 200 μL B&W 洗液(10 mmol/L Tris-Cl, 1 mol/L EDTA, 2 mol/L NaCl)洗涤 2 次,再用 200 μL 洗液 I(6 $\times$ SSC, 0.1% SDS)反复洗涤平衡,直到磁珠外观变得顺滑易洗脱。加入 200 μL 洗液 I,室温放置直到杂交完毕。

(3) 磁珠富集 磁珠上包被有链霉亲和素(Streptavidin),可与探针上的生物素结合,从而通过磁力将探针连同所需的微卫星序列一同分离出来。

将杂交完毕的杂交液加入已平衡好的磁珠中, 25 $^{\circ}\text{C}$ 温育 20 min,并轻轻摇动,使生物素和链霉亲

和素结合。温育结束后,将离心管放置到磁力架上,去除溶液。依次用洗液Ⅰ($6\times\text{SSC}$, 0.1% SDS),洗液Ⅱ($3\times\text{SSC}$, 0.1% SDS),洗液Ⅲ($6\times\text{SSC}$)洗涤磁珠,去除不含有微卫星的序列。洗涤方法是:洗液Ⅰ在室温洗2次,每次静置10 min;洗液Ⅱ在68℃洗2次,每次静置15 min;洗液Ⅲ在室温快速洗2次,即可基本将不含微卫星的序列去除干净。

(4) 捕获含有微卫星序列的单链 DNA 用 $200\mu\text{L}$ $0.1\times\text{TE}$ 在室温快速洗2次,加入 $50\mu\text{L}$ $0.1\times\text{TE}$, 95℃变性10 min, 释放出含有微卫星序列的单链 DNA, 放在磁力架上吸出备用。

1.2.6 PCR 扩增含有微卫星序列的 DNA 片段 PCR 反应体系 $25\mu\text{L}$, 内含4种 dNTP 的混合 PCR 缓冲液 $18\mu\text{L}$, 引物(为寡核苷酸链 B) $0.5\mu\text{L}$, Taq 酶 $0.5\mu\text{L}$, 根据 DNA 模板的浓度加入不多于 $4\mu\text{L}$ 的模板, 加无菌水补足 $25\mu\text{L}$, PE9700 型 PCR 仪进行扩增。程序为 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 1 min, 58℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。反应完毕后, 过旋离柱以去除多余的引物和没有参加反应的 dNTP, 并浓缩到 $15\mu\text{L}$ 左右。电泳检测, 并定量。

1.2.7 连接 T-载体, 克隆 建立 $10\mu\text{L}$ 连接反应体系: $2\times$ 连接酶缓冲液 $5\mu\text{L}$, pGEM-T vector $1\mu\text{L}$ (购于 Promega 公司, 随载体提供连接酶), 插入 DNA 片段 $2\mu\text{L}$, T4 DNA 连接酶 $1\mu\text{L}$ ($3\text{U}/\mu\text{L}$), 加无菌去离子水补足 $10\mu\text{L}$, 同时 T 载体自身连接作为对照。4℃ 连接过夜。用 CaCl_2 制备的感受态大肠杆菌 DH5 α 进行转化^[15], 得到微卫星基因组文库。

1.2.8 DNA 测序 碱裂解法抽提并纯化质粒 DNA。利用 ABI 377 DNA 序列自动分析仪进行测序, 测序试剂盒为 BigDye™ Terminator Sequencing Ready Reaction DNA Sequencing Kit。

1.2.9 序列分析与引物设计 获得的具有微卫星序列按完美型, 不完美型和混合型分类, 并用引物设计软件 Primer Premier 5 (Version 5.00) 对所得的微卫星序列进行引物设计。

2 结果

2.1 小片段克隆法所获克隆、测序结果与分析

2.1.1 克隆及测序结果 用探针 $(\text{CA})_{15}$ 对 2 000 个菌落进行筛选, 共获得阳性克隆 45 个 (2.25%)。

除了 13 个克隆信号较弱或没有微卫星序列以外, 在其余 32 个克隆中共得到 22 个微卫星序列, 其中 $(\text{GT}/\text{CA})_{19}$ 个, 占 86.4%。

2.1.2 微卫星的分类 可分成 3 类: 完美型, 占 63.6%; 非完美型, 占 22.7%; 混合型, 占 13.7%。其中重复次数在 10 以上的有 9 个, 为 40.9%。

2.2 磁珠富集法所获克隆、测序结果与分析

2.2.1 所获克隆及测序结果 用探针 $(\text{CA})_{15}$ 对 600 个菌落进行筛选, 共获得阳性克隆 1 300 个 (50.0%)。送去测序的克隆为 390 个, 假阳性克隆 29 个, 测得有序列的克隆数为 348 个, 得到微卫星序列 314 个, 其中 $(\text{GT}/\text{CA})_{314}$ 个, 为 100%。

2.2.2 微卫星的分类 可分成 3 类: 完美型 248 个, 占 79.0%; 非完美型 45 个, 占 14.3%; 完美混合型 13 个, 占 4.1%; 非完美混合型 8 个, 占 2.6%。重复次数在 20 次以上的 204 个占 65.0%; 10~19 次的 89 个占 28.3%, 重复次数超过 10 的合计为 293 个, 是总数的 93.3%。

2.3 引物设计

利用引物设计软件 Primer Premier 5 设计引物: 小片段克隆法获得的 22 个微卫星序列有 5 个两侧序列太短而无法设计引物, 其他 17 个序列设计的引物列于表 1。磁珠富集法获得的 314 个微卫星序列, 可以设计引物的有 298 个, 选其中的 30 个列在表 2 中。其他序列和引物信息可在本实验室的网站 www.fishbreeding.org 上查询。

3 讨论

3.1 两种方法所获结果的比较

小片段克隆法获得的微卫星序列中, 完美型的比例为 63.6%, 磁珠富集法获得的完美型序列的比例是 79.0%; 另外富集法获得的微卫星中重复次数超过 10 次的有 293 个, 占总数的 93.3%, 而小片段克隆方法仅为 40.9%。根据 Weber^[17] 等的观点, 重复次数高的微卫星在种群中表现出的多态性较高, 因此磁珠富集法获得的微卫星在今后的研究中将更有利用价值。磁珠富集法获得的微卫星克隆中具有 $(\text{GT}/\text{CA})_{19}$ 重复的是 100%, 所有的克隆都是目的克隆; 而小片段克隆法的微卫星克隆中具有 $(\text{GT}/\text{CA})_{19}$ 重复的为 86.4%, 有 13.6% 为非目的克隆。

表1 鲤鱼微卫星引物及其核心重复序列(小片段克隆法)

Tab.1 Microsatellite markers and their primers in common carp (small inserted fragments cloning)

微卫星标记 Microsatellite marker	引物序列 5'-3' Primer sequence	大小/bp Size	重复序列 Repeat sequence	最适退火温度/℃ Optimum annealing temperature
HLJ001	F gettgattgcnagagccaat R tectcgatggtagagaggttg	124	(TG) ₈	50
HLJ002	F tcnatttgcacttaagtattacca R cctggggattttataggttca	192	(TG) ₃ (T) ₃ (TG) ₆	51
HLJ003	F ctataccgctctgtctgaaca R ggccitttagatcaaggtcagg	104	(GT) ₁₈	51
HLJ004	F tcaantagccttgggtgagctt R ttctctcttcaaccacag	195	(GT) ₉	50
HLJ005	F gacgtgtggccaagattg R csagagcagcttccaaatcc	200	(CA) ₅ TA(CA) ₈	51
HLJ006	F tcagtctctcagatccatcg R ggctcccaattgacttccata	194	(GT) ₁₀	50
HLJ007	F tcnagggggaattgtgttta R gtgtgtgtgtctctccaaag	194	(TG) ₁₁ (A) ₁₂	52
HLJ008	F gagactcaaacacaggaan R tttagcaaatataatgtttgttc	179	(AT) ₁₈	50
HLJ009	F gagggtctgtgtgtgtctt R cggggggaattgtttanagt	200	(TC) ₇ (AC) ₁₁	51
HLJ010	F tagtgggcactgcactgtc R caftcatlgtcatlittgagaaagg	234	(CAA) ₉	50
HLJ011	F ttagccagccagagacnagc R cactgocacaaaccatcta	200	(CA) ₁₆	50
HLJ012	F ccaagttggaaacagtcttgc R ctguccecauattactgacca	184	(A) ₃₁	51
HLJ013	F naaaagcctgagcagcnaat R gatcngcctgttccaggaag	193	(CA) ₁₈ (A) ₇	50
HLJ014	F tgggttttaggttttggaaatga R ggatcaacctacgcaccttig	188	(TG) ₁₀ (T) ₃ (TG) ₄	50
HLJ015	F gatgtccaacacatgectca R ttggatgtacgccagata	199	(GT) ₈	50
HLJ016	F tggtcagttaatttggagctcng R gngtgggggaacagttctgc	235	(T) ₂₃	51
HLJ017	F gtccgaggtttttgtcatte R tgacaacacatttgcctcaa	254	(AT) ₂₈	50

F:正向引物;R:反向引物

F: Forward primer; R: Reverse primer

3.2 两种方法的技术差异

磁珠富集法比小片段克隆法获得的完美型序列比例高,高重复序列的比例也比较高。原因主要是方法的差异。

本研究在磁珠富集法中使用两次筛选微卫星序列的筛选,一是用生物素联结的CA重复序列做探针,在杂交洗脱时将大部分低重复序列除去,同时较标准的磁珠富集法^[14]又增加了最后CA重复序列的同位素探针进行第2次筛选,使大部分低重复序列被剔除。富集法的两次筛选过程可能是其微卫星序列质量较好的原因。

3.3 两种方法的性价比分析

小片段克隆法较磁珠富集法简单,所用的实验材料较少。本研究所使用的小片段克隆法是将

DNA酶切片段直接插入质粒,而不是一般的方法中将片段先连接到有酶切位点的接头上^[18-19],因此成本比较低,适用于小规模克隆研究。如本研究中小片段克隆法的费用合计3000元,获得17对微卫星引物,平均每对引物成本为176元,如果获得阳性克隆数为100个,成本每对约30元;磁珠富集法的费用约5300元人民币,获得1300个阳性克隆,按已测序列的比例应该获得1046对微卫星引物,即每对引物成本约5元人民币,如果克隆100个,成本约50元,且磁珠在6个月内将失效,成本则会更高。由此建议克隆目标在100~200个以下的,从经济上讲使用小片段克隆法较适宜;如果目标是200个以上克隆,磁珠富集法成本更低些,效率也更高。

表2 鲤鱼微卫星引物及其核心重复序列(磁珠富集法)

Tab.2 Microsatellite markers and their primers in common carp (Magnetic beads enriched cloning)

微卫星标记 Microsatellite marker	引物序列 5'-3' Primer sequence	大小/bp Size	重复序列 Repeat sequence	最适退火温度/℃ Optimum annealing temperature
HLJ018	F ggaggtctgctctttagg R ccagctttacatttatgct	405	(CA) ₂₀ AA(CA) ₂₁	49.5
HLJ019	F octgctggctcagggaac R agagcgaagatggttagctc	145	(CA) ₂₆	50.0
HLJ020	F cagctactctaccccttgg R ccagctttacatttatg	261	(GT) ₂₄ GA(GT) ₄	47.8
HLJ021	F tatgaagtcgcatctcct R ttgcttagtgcttgaggga	208	(GT) ₈	50.1
HLJ022	F tccctcacactaagcna R agcgggttaacatttca	224C(GT) ₁₄	48.1	
HLJ023	F tctgctctgaggaactt R cttaactcagccttggtt	225	(GT) ₄ GC(GT) ₁₆	50.0
HLJ024	F cagctactgctcggaggga R gcaagagatctatagagcttt	237	(CA) ₂₆	49.5
HLJ025	F atcttgctgctcaggtta R tetgacatttggtcttgc	209	(GT) ₃₂	51.0
HLJ026	F acctccgtatgctgtgce R gacgatacgtctgctct	372	(GT) ₂₇	55.5
HLJ027	F ttcttcacagcagtagg R aaacagctcagcaggttg	111	(CA) ₁₅	49.5
HLJ028	F cactgaacacagcagat R ccaaggaacagctatga	397	(GT) ₃₀	46.6
HLJ029	F tcttcagtagccacagta R taagcattgagctcttct	179	(GT) ₂₁	46.5
HLJ030	F aagctattcttctgctgg R ggctcttggtctgtttat	298	(GT) ₁₃	49.9
HLJ031	F cccatccacatgtctctc R cagccaggttactttgaga	166	(CA) ₃₁	51.5
HLJ032	F tccacagctgtagtgag R aacctgctgtgcatgta	131	(CA) ₃₇	50.2
HLJ033	F gggcttctcagtcagtt R ctctgcatgattctct	318	(GT) ₄₄	50.8
HLJ034	F attgctgctcagtcctt R atgacaaactgctcgt	134	(GT) ₁₈	50.2
HLJ035	F ggcttcataacttcaga R attaaaggttagctgtgc	256	(CA) ₄₇	45.0
HLJ036	F taatcagcagcagcagc R cagcgttcactccatct	173	(GT) ₁₁	50.3
HLJ037	F cgtgagagcataagggat R acagagagcgtacagaaat	139	(CA) ₁₄	54.0
HLJ038	F caccagacagctcagtaa R tgtaaacctcaactcc	139	(CA) ₄₁	46.9
HLJ039	F tttaacctccactgct R agggctttacatttatgct	283	(GA) ₁₃	50.9
HLJ040	F gacgcagactcttctc R ttgctttgcttacttcn	301	(CT) ₈ (CA) ₂₅	50.0
HLJ041	F agaccacccagtaacaa R gactactcagcaccaga	269	(CA) ₂₄	49.2
HLJ042	F attctattcagggctcgtg R gcgagccataaacccaag	150	(CA) ₁₉	55.8
HLJ043	F actgggttagcaggttagctc R agccctgttcacaggtatg	368	(CA) ₂₅ +(CA) ₁₀	60.8
HLJ044	F gtaacagcgtgacagctt R aagttcattggtgctctc	278C(CA) ₂₈	48.8	
HLJ045	F ctctatccctccatctt R tctatctcaccgcacn	395	(CT) ₁₁ (CA) ₂₉	50.0
HLJ046	F aacctgaactcacaaac R caccggaactgagagac	222	(GT) ₁₄	46.6
HLJ047	F tttaacctccagcagtc R tgttcaaggcttcagcata	161	(CA) ₄₂	49.8

F:正向引物;R:反向引物

F:Forward primer;R:Reverse primer

3.4 几种微卫星资源开发方法的评价

3.4.1 直接克隆方法与网上检索方法的比较 直接克隆法显然是耗时费力的方法。如果网上基因组资源丰富的生物,根据网上的微卫星序列,设计引物是一种简便省钱的方法。但对于多数水产养殖生物尤其我国的水产养殖生物,品种多且遗传基础研究较少,从网上几乎找不到微卫星序列;即使能找到,其数量也很难满足研究的需要。因此,直接克隆还是获得微卫星这一工具的最好办法。幸运的是微卫星一旦克隆可以永久使用。网上提供的资源可分为3类,一是已设计好的微卫星引物,如华盛顿大学斑马鱼网站(www.genetics.wustl.edu/fish-Lab)上有一些微卫星引物等等;二是基因组DNA序列;三是cDNA序列。这些序列在许多网站上(如美国国家生物信息中心 www.ncbi.nlm.nih.gov)都可以获得,需要注意的是从cDNA序列设计的引物有可能跨越内涵子,使PCR产量下降或没有产物;同时效率也是很低的,如徐鹏等^[20]从自建的上万个对虾cDNA序列中获得可扩增产物的引物16对。如果从网站上的序列中筛选微卫星由于不清楚内含子位置,可能效果要差得多。从cDNA序列中获得的微卫星的优点是可能更容易获得与性状相关的标记,因为cDNA序列多数是与功能基因有关系的。

3.4.2 几种克隆方法的比较 前面已经比较了小片段克隆方法和磁珠富集法的优缺点及适用目标,可以说这两种方法及稍做改进的一些方法是目前从基因组克隆微卫星的主要方法。如徐鹏等^[21]利用重复序列为引物来检测和筛选阳性克隆,其实这只是检测方法的改变而已,对于每种核心序列占基因组不到2%的阳性克隆而言,这种筛选方法显然是效率很低的方法。还有一些从基因组中克隆微卫星的方法,虽然使用的不多,但也有报道。SAMPL (Selective Amplified Microsatellite Polymorphism Loci)是获得美国专利的一种克隆微卫星技术^[22],这种直接利用微卫星核心序列的方法在作物中使用的较多^[23-24],在其他生物上利用的并不多,其改进的方法就是基于PCR扩增的磁珠富集法。

参考文献:

- [1] Nichols K M, Young W P, Danzmann R G, et al. A consolidated linkage map for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Anim Genet, 2003, 34(2): 102-115.
- [2] Oniki A, Sakamoto T, Khoo S, et al. Quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout [J]. Mol Genet Genomics, 2000, 265: 23-31.
- [3] Sakamoto T, Danzmann R G, Gharbi K. 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.
- [4] Kocher T D, Lee W-J, Sobolewska H, et al. A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Genetics, 1998, 148: 851-858.
- [5] Lee B-Y, Huata G, Kocher T D. Two unlinked loci controlling the sex of blue tilapia (*Oreochromis aureus*) [J]. Heredity, 2004, 92(6): 543-549.
- [6] Stredman J T, Kocher T D. Microsatellite variation associated with prolactin expression and growth of salt-challenged tilapia [J]. Physiological Genomics, 2002, 9(1): 1-4.
- [7] Nelson R J, Beacham T D. Isolation and cross species amplification of microsatellite loci useful for study of Pacific salmon [J]. Animal Genetics, 1999, 30: 228-229.
- [8] 魏东旺, 楼允东, 孙效文, 等. 鲤鱼微卫星分子标记的筛选 [J]. 动物学研究, 2001, 22(3): 238-241.
- [9] Alian R S, Takagi M, Dong S, et al. Isolation and inheritance microsatellite markers in the common carp *Cyprinus carpio* [J]. Fisheries Science, 1999, 65(2): 235-239.
- [10] Crooijmans RPMA, Bierboom VAF, Kozmen J, et al. Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Animal Genetics, 1997, 28: 129-134.
- [11] 孙效文, 梁利群. 鲤鱼的遗传连锁图谱(初报) [J]. 中国水产科学, 2000, 7(1): 1-5.
- [12] Karagryzov L. Construction of random small-insert genomic libraries highly enriched for simple sequence repeats [J]. Nucleic Acid Res, 1993, 21: 3911-3912.
- [13] Alian R S, Takagi M, Dong S, et al. Isolation and inheritance of microsatellite markers in the common carp *Cyprinus carpio* [J]. Fisheries Science, 1999, 65(2): 235-239.
- [14] Brown J L, Hardwick J, Wright A F. A simple method for rapid isolation of microsatellites from yeast artificial chromosomes [J]. Molecular and Cellular Probes, 1995, 9: 53-58.
- [15] Kandpal R P, Kandpal G, Weissman S M. Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping clones, and hybridization selection for region specific markers [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 88-92.
- [16] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南(第2版) [M]. 北京: 科学出版社, 1993.
- [17] Weber J L. Informativeness of human (dC-dA)n(dG-dT)n polymorphisms [J]. Genomics, 1990, 7: 524-530.
- [18] Lee W J, Kocher T D. Microsatellite DNA markers for genetic mapping in the tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. Journal of Fish Biology, 1996, 49: 169-171.
- [19] Knapik E W, Goodman A, Atkinson O S. A reference cross DNA panel for zebrafish (*Danio rerio*) anchored with simple sequence

- length polymorphisms[J]. *Development*, 1996, 123: 451-460.
- [20] 徐 鹏, 周令华, 田丽萍, 等. 从中国对虾 ESTs 中筛选微卫星标记的研究[J]. *水产学报*, 2003, 27(3): 213-218.
- [21] 徐 鹏, 周令华, 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.
- [22] Morgante M, Vogel J. Compound microsatellite primers for detection of genetic polymorphism [P]. US Patent Appl, 08/326456.
- [23] Morgante M, Oliveri A M. PCR-amplified microsatellite markers in plant genetics[J]. *Plant J*, 1993, 3: 175-182.
- [24] Hayden M J, Sharp P J. Targeted development of informative microsatellite markers[J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29: 44-51.

Comparison between magnetic beads enriched and small inserted fragment library for microsatellite sequences of common carp

SUN Xiao-wen, JIA Zhi-ying, WEI Dong-wang, LU Cui-yun, LIANG Li-qun

(Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China)

Abstract: Microsatellites are important markers for development of genetic maps, germ plasma assessment, quantitative trait loci mapping because of their high polymorphism, abundance, co-dominance, and small locus size. In aquatic species, microsatellite markers have been used for salmon, tilapia, rainbow trout, catfish etc. on genetic map, quantitative trait loci mapping, and population genetics assessment. But only a few local aquaculture species in China, their microsatellite markers have been developed. Because up till now there are not enough microsatellite markers, the technique of RAPD marker is still used in genetic assessment for some important aquatic species such as river crab, common carp, silver crucian carp, silver carp etc. For genetic assessments research, the marker that identifies different populations in one species is very important. Owing to its co-dominant property, microsatellite marker should be a good candidate for this kind of marker. In this test, some microsatellite sequences for common carp were cloned by two methods. One was that traditional inserted DNA fragments libraries were screened by plaque hybridization using oligos (CA)₁₅ as probes, end-labeled with [γ -³²] ATP. The other was that inserted DNA fragments were linked onto linkers and then enriched microsatellite sequences with magnetic beads which was linked with biotinylated (CA)₁₅ probes, finally the PCR-based library was made. 2 000 colonies from the former method were selected and screened, and 45 colonies were positive. In those positive colonies, 22 microsatellite sequences were gotten. Among them, perfect was 63.6%, imperfect was 22.7%, compound was 13.7%, repeated numbers over 10 were 9 and about 40.9%. About 2 600 colonies from the latter method were selected and screened, and 1 300 colonies were positive. From those positive colonies, 390 colonies were sequenced, and 314 microsatellite sequences were gotten. In those microsatellites, perfect was 79.0%, imperfect was 14.3%, compound was 6.7%, and repeated numbers over 10 were 293 and about 93.3%. This result showed that the magnetic beads enriched method could be a high efficiency and low cost method, and microsatellite sequences from it could be of high quality. So, we recommended that magnetic beads enriched method be used in making microsatellite markers.

Key words: magnetic beads enrichment; small fragments DNA cloning; common carp; microsatellite

Corresponding author: LIANG Li-qun. E-mail: llq-1019@163.com