

·研究简报·

鳙鱼微卫星分子标记的筛选

鲁翠云^{1,2}, 孙效文¹, 梁利群¹

(1. 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070; 2. 大连水产学院, 辽宁 大连 116023)

摘要:采用常规方法从鳙鱼(*Aristichthys nobilis*)血液中提取基因组DNA, 经限制性内切酶 *Sau3AI* 酶切后, 选取250~750 bp 大小的片段构建鳙鱼基因组文库。采用人工合成的重复序列(CA)₁₅、(AG)₁₂、(AAG)₈ 用同位素标记作为探针, 通过原位杂交筛选基因组文库, 获得鳙鱼的微卫星序列。进一步用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计引物。通过杂交获得99个阳性克隆, 经测序筛选出82个微卫星序列, 设计引物65对。

关键词:鳙鱼; 微卫星; 分子标记

中图分类号:Q959.46 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2005)02-0192-05

鳙鱼(*Aristichthys nobilis*)以浮游动物为食, 是淡水生态系统中的重要环节。近几十年来, 由于污染和养殖的原因, 致使鳙鱼的品种退化严重, 自然水体中鳙鱼的种质资源也遭到了不同程度的破坏。为了保护和开发我国这一独特的淡水鱼类资源, 了解和研究其遗传特性具有重要价值。我国学者用各种现代生物学技术, 对鳙鱼的生化、遗传、发育等方面做了大量研究^[1-4]。

已有用 RAPD 分子标记研究鳙鱼的多样性的报道^[5-7], 但是由于 RAPD 分子标记的重复性较差, 所获结果还应该进一步的验证。微卫星(microsatellite)是近十几年来发展起来的一种新的分子标记, 是指以少数几个核苷酸(1~6个)为单位多次串联重复的简单序列, 其中以双核苷酸重复最为常见。由于微卫星在真核生物基因组中是随机分布的, 作为分子标记又有着非常高的多态性和共显性, 在物种遗传多样性检测^[8], 遗传图谱的构建^[9], 亲缘关系鉴定^[10]等方面备受青睐。水产动物微卫星的分离和应用还处于起步阶段, 可用的微卫星分子标记较少, 亟待分离和筛选新的分子标记, 为进一步研究提供强有力的支持。本实验通过构建鳙鱼基因组文库, 利用微卫星探针筛选鳙鱼的微卫星序列, 并用计算机软件设计了可作为分子标记的 PCR 引物。

1 材料与方法

1.1 鳙鱼部分基因组文库的构建

1.1.1 质粒 pGEM-3Zf(+) 的提取和酶切 碱裂解法抽提质粒 pGEM-3Zf(+), 然后用限制性内切酶 *Bam*HI 进行

酶切, 再用小牛肠碱性磷酸酶 CIAP 去除 5' 端磷酸。

1.1.2 鳙鱼总 DNA 的提取和酶切 采新鲜鳙鱼血液, 每 0.1 mL 血液加 0.9 mL 裂解液(0.5% 的十二烷基硫酸钠, 200 μg/mL 蛋白酶 K, 0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)), 空气浴振荡 37℃ 消化过夜。然后用酚、氯仿、异戊醇混合液(体积比为 25:24:1), 抽提 3 遍, 1 L 透析液(50 mmol/L Tris-Cl(pH 8.0), 10 mmol/L EDTA(pH 8.0))透析 16 h, 无水乙醇沉淀, 70% 乙醇洗 1 次。自然干燥后, 加 200 μL 0.1×TE 溶解, 1% 琼脂糖电泳检测定量。取 100 μg 鳙鱼总 DNA, 用限制性内切酶 *Sau3AI* 部分酶切, 使酶切片段大部分在 250~750 bp, 有机抽提法终止反应, 无水乙醇沉淀回收, 溶于 200 μL 0.1×TE, 参照《分子克隆试验指南》^[11] 进行蔗糖密度梯度离心, 分离 250~750 bp 大小的片段, 透析, 乙醇沉淀回收备用。

1.1.3 连接及转化 取去磷酸化质粒 300 ng, 约 300 ng 酶切后的鳙鱼 DNA, 加入 2 U_T DNA 连接酶, 加无酶水补足 10 μL, 20℃ 温育 3 h。参照《分子克隆试验指南》^[11] 用 CaCl_2 法制备感受态细胞。取 5 μL 连接反应液进行转化, 涂在已制备好的含有 100 μg/mL 氨苄青霉素(Amp)的 LB 平板上, 获得大量克隆。用双酶切法(*Eco*RI & *Hind*III)检测重组率, 获得重组克隆的大概数目。

1.2 微卫星的筛选

1.2.1 杂交膜的制备 杂交膜为硝酸纤维素膜, 直径与平板的内径相同。准备完全对称的两套含有 Amp 的底部有小方格的 LB 平板, 做好标记, 将转化获得的菌落按小方格转移到滤膜上, 同时在对应的另一个平板的相应位置划横线, 作为主板, 保留待筛选出阳性克隆。杂交膜的制备参照文献^[11]。

收稿日期: 2004-06-16; 修订日期: 2004-08-14。

基金项目: 国家“863”计划资助项目(863-101-05-02-01)。

作者简介: 鲁翠云(1980—), 女, 硕士在读, 从事水产动物遗传育种研究。E-mail: wley_123@163.com

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

1.2.2 探针的制备 取人工合成的寡核苷酸 (CA)₁₅; (AG)₁₂; (AAG)₈ 50 pmol, T₄ 多核苷酸激酶 10 U 最后加入 12 μ Cl γ -³²P-ATP, 反应体积为 50 μ L, 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min。通过 Sephadex G-100 凝胶柱回收探针标记液。

1.2.3 杂交 取干净的杂交瓶, 依次放入杂交膜 (每只杂交瓶可放 4~5 张直径为 12 cm 的膜), 40~50 mL 50 $^{\circ}$ C 预热的杂交液 (6 $\times$ SSC, 0.5% SDS, 5 $\times$ Denhardt), 50 $^{\circ}$ C 预杂交 1 h, 加入终浓度为 1×10^6 ~ 1.5×10^6 cpm/mL 的探针标记液, 50 $^{\circ}$ C 杂交 24 h。用 2 $\times$ SSC (含 0.1% SDS) 在室温洗 2 次, 每次 5 min; 再用 1 $\times$ SSC (含 0.1% SDS) 于 50 $^{\circ}$ C 洗 2 次, 每次 15 min。用同位素探测仪检测, 若背景仍然很高, 可用 0.1 $\times$ SSC 于 65 $^{\circ}$ C 洗涤。暗室中压上 X 光底片, -70 $^{\circ}$ C 放射自显影约 7 d (可视信号的强弱增减放射自显影的时间)。

1.2.4 阳性克隆的挑取 按照原先确定的标记, 将 X 光底片、硝酸纤维素膜和主平板三者对照, 在相同的位置上挑出阳性克隆, 并转移到新的平板上, 生物公司 (上海博亚生物技术公司) 测序。

2 结果与分析

2.1 合适基因组片段的筛选

通过蔗糖密度梯度离心的方法筛选所需的基因组片段。选用 10%、20%、30%、40% 的蔗糖密度梯度, 超速离心机 22 000 r/min, 离心 22 h 可达到充分分离 DNA 片段的目的。用针刺管底的方法, 按每管约 400 μ L 的量分管收集含 DNA 片段的蔗糖溶液, 1% 琼脂糖电泳检测, 选取所需大小的片段。分管透析。异丁醇浓缩后, 加入 10 mol/L 乙酸铵使终浓度为 2 mol/L, 无水乙醇沉淀回收, 溶于 20 μ L 0.1 $\times$ TE 备用。

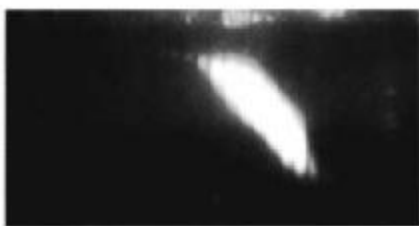


图1 蔗糖密度梯度离心收集产物的电泳图
注: 用针刺管底的方法, 按每管约 400 μ L 的量分管收集, 1% 琼脂糖电泳检测, 每管点样 15 μ L。

Fig.1 Electrophoretogram of collecting with sucrose density gradients centrifugation

Note: The separated sucrose solution was proximately aliquot 400 μ L to each fresh tube by piercing the bottom of centrifugation tube with a big needle. 15 μ L was electrophoresed by 1% agarose gel.

2.2 双酶切检测重组率

通过转化获得基因组文库共 6 000 个克隆, 每个培养板上约 300 个, 随机挑选几个平板, 每个平板随机挑 10 个克

隆, 碱裂解法提取质粒, 用双酶切 (*Hind*III & *Eco*RI) 的方法检测重组克隆率。结果在每个平板 10 个克隆中约有 6 个属于重组克隆, 重组率为 60%。因此, 此基因组文库约有 3 600 个属于重组克隆。

2.3 序列分析

利用探针 (CA)₁₅、(AG)₁₂、(AAG)₈ 对鳊鱼基因组文库的 6 000 个克隆进行筛选, 共得到阳性克隆 99 个, 占重组克隆 (3 600 个) 的 2.75%。其中有 11 个由于测序的原因没有得到序列, 剩余的 88 个阳性克隆中, 有 13 个克隆信号较弱 (含 3 次重复) 或不含微卫星。在剩余的 75 个克隆中共得到 82 个微卫星序列。

根据 Weber^[12] 提出的测序标准, 按完美型 (perfect 指没有中断的或附近无其他重复序列的重复序列)、非完美型 (imperfect 指 2 个或 2 个以上的同种重复序列, 被 3 个碱基以下的非重复序列所间隔)、复合型 (compound 指 1 种重复序列与其他种类的重复序列被 3 个以下的非重复序列所间隔) 3 种类型对所获得的微卫星序列进行分类, 在所筛选的 82 个微卫星序列中 perfect 共 46 个, 占 56.10%; imperfect 26 个, 占 31.71%; compound 10 个, 占 12.20% (表 1)。其中, perfect 的微卫星占大多数, 此结果与鲤鱼^[13]、对虾^[14]等水产动物的微卫星情况大体相符。

表1 鳊鱼微卫星的不同类型重复序列所占比例
Tab.1 Percentage of various repeat sequence type of microsatellite in bighead carp

项目 Item	微卫星类型 Repeat sequence type		
	Perfect	Imperfect	Compound
数目 Number	46	26	10
比例/% Ratio	56.10	31.71	12.20

注: 微卫星数目为 82 个。

Note: Microsatellite number is 82.

2.4 引物设计

用引物设计软件 Primer Premier 5.0 对所得的微卫星序列进行引物设计, 除去一些两端序列较短和其他原因, 不能设计引物以外, 其余共设计引物 65 对, 从设计的引物中挑选 30 对 (表 2)。

这些引物通过优化 PCR 反应条件, 在适当的退火温度, 可以获得目的条带。

3 讨论

微卫星是串联重复 DNA 类型中最可变的一种, 广泛存在于真核生物基因组中, 特别是二核苷酸微卫星重复 (CA)_n 或 (GT)_n 在基因组中的含量十分丰富, 在哺乳类基因组中 50~150 kb 就会出现 1 次^[15], 在本次实验所获得的 82 个微卫星序列中, CA/GT 重复 45 个 (54.88%), 可见, CA/GT 重复在鳊鱼的基因组中非常丰富。

表2 鳊鱼微卫星分子标记及其引物

Tab.2 Microsatellite markers and their primers in bighead carp

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
HL01	F CTTCGCGAGTTGTCTTTG R CCAGGCTTTACACTTTAT	299	(GT) ₁₁ (ATT) ₅	48.9
HL02	F CATTCACTAAGAAGGCAGAC R CTCCTCATTAGGCACCC	290	(CT) ₅ CA(CT) ₄	50.2
HL03	F TAACTGCTTTAOCCTGCCAATA R ATGGCTTCAGACACTCATCACA	128	(GT) ₄	50.2
HL04	F CCTTGCCCTTACAACATC R ACCAATGCACTGAGACA	187	(AC) ₆	50.5
HL05	F CTTTCACCTCCCTTGTGC R GTGGCTGTGTGTGTTTGT	242	(GA) ₄	50.2
HL06	F GCCAAATCCACTTTCTCA R TCATTCTTAATGCACCC	129	(CA) ₇ TATA(CA) ₈	50.1
HL07	F CTGACTTGATTCCCAACC R CAGGCTTTACACTTTATGCT	212	(GC) ₄	51.1
HL08	F ACGGTGCTAGTTATCATCC R CCAGGCTTTACACTTTATG	290	(GA) ₁₀	49.1
HL09	F AGGAGGAAGCGTGCTAAA R TCAGTGAGGGCAGTGGTC	261	(CT) ₈ (CA) ₁₀	54.3
HL10	F GGGGATCTATGTTTACGG R AGAACCATTGAGCAGGA	334	(CA) ₁₀ (GA) ₂₀ (GT) ₅	50.9
HL11	F TTGAAGATGCTTTGTCCC R GATGGTGGTGTGTTTGT	201	(CA) ₈	49.6
HL12	F AGTGCCAGTGCTTCCCTC R TCCGGCTGGTATGTTGTG	230	(CT) ₁₀	52.5
HL13	F TGGAGCTTAATGGTGGGG R GAAAACAGGGCAGGTGGC	106	(CA) ₈	51.0
HL14	F TATCTTCAATGCGCTAA R CAGGCTTTACACTTTATGCT	227	(CA) ₄	49.3
HL15	F GATTCACTCAAGCCTGTC R TTAATGCAAGTATAACTCG	189	(CT) ₁₁ (CA) ₁₁	50.9
HL16	F AACAGCCACATAACCAAT R AGATAGCCGTTGTCATTC	243	(GA) ₁₈ AA(GA) ₁₂	49.6
HL17	F TGAAATTGTTATCCGCTC R CAATACGCAAAACCGCTC	186	(CA) ₄	53.2
HL18	F TGACTTTATACGAGGGTGC R GACCATGATTACGCCAAG	234	(GT) ₁₁	50.5
HL19	F GCTATCGGGTGAAATGA R CAATGGGGAAGTTAGGG	203	(CA) ₇ TA(CA) ₅	48.8
HL20	F GCATTCTTTGTGGGGATA R GTGCCCATTAAGGTTAT	187	(CA) ₁₈	48.7
HL21	F TACAGCCGTGTGTTTAG R GTGGAGGGGTGTTGTTT	177	(CT) ₁₄ (CT) ₁₂	50.9
HL22	F AACAGGTAGGGCTGAGATG R CCCAGGCTTTACACTTTATG	275	(CA) ₄	51.8

续表 continued

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
HL23	F GAACGCTCTACGGAATGG R TCCTGTTACACTATCTGGGT	240	(GT) ₁₄ :(GT) ₈	52.1
HL24	F ACCACATACAGCAGTCCACCTA R CAATACGCAAAACCGCTC	330	(CA) ₈	53.8
HL25	F ATCCGCTCACAATTCCAC R ACGTATTACCGCTTTTG	279	(CA) ₈	54.8
HL26	F ATCCGCTCACAATTCCAC R ATTACGCAAAACCGCTTC	187	(CA) ₈	53.1
HL27	F ACGGTGAGTGATGTGGAG R AAGCGGAATTGGAGTGT	260	(GA) ₁₁ :(GA) ₅	51.2
HL28	F CTGCTCTGACCTTCTTG R CAGGCTTTACACTTTATGCT	249	(CA) ₈	50.4
HL29	F CAGGAGGCGATAACCGAGAA R GCCCAGGACACTGCAAGAG	291	(AG) ₁₃	54.8
HL30	F AGCACCATCCAATCAG R AACCCAGGGCCAATACCC	175	(GT) ₁₀	50.8

F:正向引物(Forward primer);R:反向引物(Reverse primer)

在国内尚未见将微卫星分子标记应用于鲮鱼遗传育种的研究。简纪常克隆了鲮鱼的小卫星 DNA, 获得 1 个鲮鱼小卫星 DNA(pBC174), 并对其序列结构进行了分析^[16-17]。微卫星与小卫星相比, 其核心序列比较短, 易于扩增, 且对用于 PCR 扩增的 DNA 提取物的要求不高, 而且微卫星在基因组中出现的频率比小卫星高许多(微卫星平均每 10 kb 出现 1 次, 小卫星每隔 1 500 kb 出现 1 次)^[18-19]。微卫星的一个具有潜在价值的特征是从一个物种产生的引物可以应用于相关的分类群, 而这一特征总体来说不为小卫星所具有^[20]。

微卫星分子标记的发展主要受限于微卫星及其旁侧特异引物区的分离。由于微卫星在水产动物的研究和应用落后于陆生动植物, 已分离可利用的资源较少, 而筛选大量的高效、多态、共显性标记是进行连锁图谱构建、QTL 定位基因、分子标记辅助育种的基础, 是繁琐而又必需的工作。虽然微卫星两侧的侧翼序列具有高度的保守性, 但在分属于不同属的两种生物中的应用还是有一定局限性的, 所以, 分离具体养殖物种本身的微卫星标记并对其进行研究是十分必要的。本研究获得的鲮鱼的微卫星分子标记, 为鲮鱼及相关种群遗传多样性的研究、遗传选育及遗传图谱构建等研究的进一步开展做好准备, 推动微卫星分子标记在水产养殖动物的研究和应用。

参考文献:

- [1] 樊连春, 崔建勋, 余其兴. 鲮鱼线粒体 DNA 的限制性内切酶图谱[J]. 武汉大学学报, 1994, 40(1): 121-125.
- [2] 蒋建国, 熊全沫, 姚汝华. 青草鲢鳙四种鱼同工酶的比较研究[J]. 遗传, 1998, 20(2): 19-22.
- [3] 李思发, 吕国庆, 贝纳切兹 L. 长江中下游鲢鳙青草四大家鱼线粒体 DNA 多样性分析[J]. 动物学报, 1998, 44(1): 82-93.
- [4] 王朝元, 汤伏生, 龙 华. 鲢、鳙染色体基因文库的构建[J]. 淡水渔业, 1995, 25(3): 27-28.
- [5] 张锡元, 杨建琪, 张德春, 等. 白鲢和鲮鱼的随机扩增多态 DNA 分析[J]. 生物化学与生物物理进展, 1999, 26(5): 469-472.
- [6] 张德春, 张锡元, 杨代淑, 等. 长江鲮遗传多样性的研究[J]. 武汉大学学报, 1999, 45(6): 857-86.
- [7] 张德春. 鲮鱼人工繁殖群体遗传多样性的研究[J]. 三峡大学学报, 2002, 24(4): 379-381.
- [8] 周 莉, 刘静霞, 桂建芳. 应用微卫星标记对雌核发育组群的遗传多样性初探[J]. 动物学研究, 2001, 22(4): 257-264.
- [9] 孙效文, 梁利群. 鲤鱼的遗传连锁图谱(初报)[J]. 中国水产科学, 7(1): 1-5.
- [10] K-A Nash, O Skibinski. Tetranucleotide microsatellites for Indian major carp (*Catla catla*) [J]. Journal of Fish Biology, 1998, (53): 886-889.
- [11] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002. 8.
- [12] Weber J L. Informativeness of human (dC-dA)n(dG-dT)n polymorphisms[J]. Genomics, 1990, 7: 524-530.
- [13] 魏东旺, 楼允东, 孙效文, 等. 鲤微卫星分子标记的筛选[J]. 动物学研究, 2001, 22(3): 238-241.
- [14] 徐 鹏, 周岭华, 相建海, 等. 中国对虾微卫星 DNA 的筛选[J]. 海洋与湖沼, 2001, 32(3): 255-259.
- [15] Orit G, Pearse D E, Avise J. Phylogenetic assessment of length

- variation at a microsatellite locus[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 10 745-10 749.
- [16] 简纪常, 夏德全. 鲢小卫星 DNA 的克隆[J]. 中国水产科学, 1999, 26(4): 18-20.
- [17] 简纪常, 夏德全. 鲢小卫星 pBC174 的序列结构特性分析[J]. 中国水产科学, 2002, 9(2): 186-189.
- [18] 何平. 真核动物中微卫星及其应用[J]. 遗传, 1998, 20(4): 42-47.
- [19] 张艳, 张树义. 微卫星方法简介[J]. 动物学杂志, 1999, 34(2): 42-45.
- [20] Schlotterer C, Arnas W, Tautz D. Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species[J]. Nature, 1991, 354: 63-65.

Isolation of microsatellite markers in bighead carp *Aristichthys nobilis*

LU Cui-yun¹, SUN Xiao-wen², LIANG Li-qun²

(1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China; 2. Dalian Fisheries College, Dalian 116023, China)

Abstract: The bighead carp *Aristichthys nobilis* play an important role in balancing the freshwater ecology by filtering the animal planktons. In recent decades, however, degeneration occurred in the good breed from the farms due to the polluted environment and the bad management, meanwhile, the same saturation occurred in the wild populations. In order to protect this precious species, many related researches involved in biochemistry, genetics and development were implemented by using a lot of biological techniques. Microsatellites, as a kind of molecular markers, have many advantages in construction of genetic linkage map, QTLs analysis, kinship identification and so on. In this experiment, genomic DNA of bighead was extracted from the blood by normal methods. After the genomic DNA was digested by the restriction enzyme (*Sau3A1*), we selected and purified 2 500-750 bp fragments. A genomic DNA pool of bighead carp was constructed by adopting the conventional method. Three isotopic probes of (CA)₁₅, (AG)₁₂ and (AAG)₈ were used to screen the pool to identify the positive clones contained the microsatellite sequences. As a result, 99 positive clones were found out and sequenced, which truly are of 75 clones containing 82 different microsatellite loci. Then, using the software package Primer Premier 5.0, we designed 65 pairs of primers to test the polymorphism in bighead carp.

Key words: *Aristichthys nobilis*; microsatellite; molecular marker

Corresponding author: SUN Xiao-wen. E-mail: xws1999@hotmail.com