

## 牙鲆微卫星标记的筛选及群体多态性分析

陈 微, 张全启, 于海洋, 胡景杰, 齐 洁, 包振民

(中国海洋大学 生命科学与技术学部, 海洋生物遗传与种质工程研究室, 山东 青岛 266003)

**摘要:**以牙鲆(*Paralichthys olivaceus* Temminck et Schlegel)为材料, 基因组 DNA 经 *Sau3A* I 进行部分酶切后, 选取 400~1 200 bp 大小的片段连接到经 *Bam*HI 酶切的 pUC19 质粒中, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 构建牙鲆酶切片段基因组文库。采用菌落杂交的方法, 以 (AC)<sub>10</sub>、(AG)<sub>10</sub> 为探针从文库中筛选阳性克隆 16 个, 共得到 20 个微卫星序列, 其中完全型 13 个, 不完全型 5 个, 复合型 2 个。对其中 18 个进行引物设计, 有 11 对引物扩增出目的片段, 其中 8 对引物在群体中具有扩增多态性。在威海野生牙鲆 30 个个体中, 各座位上得到的等位基因数为 4~19 个, 观测杂合度 ( $H_o$ ) 为 0.4138~0.9655。其中有 3 对引物扩增的等位基因数超过 17 个, 表现出高度多态性。本研究旨在为进一步的牙鲆遗传多样性分析、家系分析及遗传图谱的构建等提供基础依据。

**关键词:**牙鲆; 菌落杂交; 微卫星; 多态性

**中图分类号:** Q959.486 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2005)06-0682-06

微卫星 (SSR) 又称短序列重复 (simple sequence repeat, SSR)、短串联重复 (short tandem repeat)、简单序列长度多态性 (simple sequence length polymorphism)。与其他分子标记技术相比, 微卫星标记具有多态性高, 呈共显性遗传, 可用 PCR 扩增检测位点, 且等位条带便于识别等特点。因此在群体遗传多态性分析、系谱认证、连锁图谱构建及数量性状连锁分析等工作中, 微卫星标记已得到广泛的应用<sup>[1-5]</sup>。

国外鱼类微卫星标记用于水产养殖的报道已有很多, 特别是在利用微卫星标记构建遗传连锁图谱方面, 在虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[2]</sup>、罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)<sup>[6]</sup>、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)<sup>[7]</sup>、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)<sup>[8]</sup>、香鱼 (*Plecoglossus altivelis*)<sup>[9]</sup> 等多种鱼中取得了重要进展。在中国, 魏东旺等<sup>[10]</sup>用放射性同位素标记探针进行菌落杂交的方法, 获得 20 多个鲈微卫星, 孙效文和梁利群<sup>[11]</sup>利用部分微卫星标记和其他标记构建了鲈的遗传连锁图谱。而关于其他经济鱼类微卫星分离、鉴定和遗传连锁图谱构建等研究则少有报道。

牙鲆 (*Paralichthys olivaceus* Temminck et Schlegel) 是一种重要的经济鱼类, 主要分布在中国

渤海、黄海、南海以及朝鲜、日本、俄国远东沿岸海区。对于牙鲆微卫星的研究, 日本学者不仅分离了大量的微卫星, 而且将微卫星应用于群体遗传多样性分析<sup>[12-13]</sup>和遗传图谱的构建<sup>[8]</sup>等。韩国学者 Kim 等<sup>[14]</sup>分离了大量的牙鲆微卫星 DNA, 并应用于种群遗传分析。国内关于牙鲆微卫星的报道仅见利用已有的微卫星标记对牙鲆野生和养殖群体的分析研究<sup>[15-16]</sup>, 这与中国牙鲆养殖业的发展, 以及由此而产生的遗传育种研究的迫切要求不相适应。本研究通过构建牙鲆基因组文库, 利用 (AC)<sub>10</sub>、(AG)<sub>10</sub> 作为探针进行杂交, 筛选牙鲆微卫星序列, 并进行初步的遗传多样性分析, 旨在摸索一套筛选牙鲆微卫星的方法, 获得更多的牙鲆微卫星标记, 为牙鲆群体遗传结构的分析和遗传资源的保护利用, 并为构建牙鲆连锁图谱和进行分子标记辅助育种等打下基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 牙鲆部分基因组文库的构建

**1.1.1 牙鲆基因组 DNA 的提取与酶切** 所用牙鲆来自山东威海近海野生群体。血液样品的采集、保存及基因组 DNA 提取参照张全启等<sup>[17]</sup>的方法。

收稿日期: 2005-02-25; 修订日期: 2005-04-28。

基金项目: 国家“863”高技术研发项目 (2003AA623130)。

作者简介: 陈 微 (1979-), 女, 硕士研究生, 主要从事鱼类遗传育种方面的研究。

通讯作者: 张全启, E-mail: qzhang@ouc.edu.cn

取30个个体,体长13~15 cm,分别提取其基因组DNA用于微卫星多态性检测。取5个个体的等量混合DNA样品10  $\mu$ g,用限制性内切酶 *Sau*3A I 进行部分酶切(通过预备实验确定酶的浓度和酶切时间),酶切产物经3%的低熔点琼脂糖凝胶电泳后,回收400~1 200 bp 大小的片段用于文库构建。

**1.1.2 连接与转化** 取pUC19质粒2  $\mu$ g,用限制性内切酶 *Bam*HI 进行完全酶切,经小牛碱性磷酸酶(CIAP)去磷酸化处理后,回收酶切质粒。将载体和基因组DNA片段按照1:3比例(摩尔比)混合于20  $\mu$ L  $T_4$  DNA连接酶的反应体系中,于16  $^{\circ}$ C温浴过夜。取5  $\mu$ L连接产物转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞,最后涂布在均匀涂布了X-gal和IPTG的氨苄青霉素LB平板上,37  $^{\circ}$ C培养过夜。

## 1.2 微卫星的筛选

**1.2.1 杂交膜的制备和探针标定** 将每个平板影印一张硝酸纤维素膜(爱普),并做好相应的方位标记,将平板放入37  $^{\circ}$ C培养箱中继续培养,直到重新长出菌落。将影印好的杂交膜干燥10 min后用裂解液(1.5 mol/L NaCl, 0.5 mol/L NaOH)裂解7 min,干燥后,再用中和液(1.5 mol/L NaCl, 0.5 mol/L Tris/HCl, pH 7.2, 1 mmol/L EDTA-Na<sub>2</sub>)处理5 min。最后将杂交膜放入80  $^{\circ}$ C烘箱中烘烤2 h。

本实验采用ECL标记试剂盒(安马西亚 Gene Images 5'-Oligolabelling Module RPN5770),将合成的探针(AC)<sub>10</sub>和(AG)<sub>10</sub>按照ECL试剂盒上的说明进行5'末端的标定。

**1.2.2 杂交与筛选** 根据Hu等<sup>[18]</sup>的方法,将杂交膜放入杂交袋中,并加入杂交液5  $\times$  SSC, 0.1% SDS(W/V),稀释20倍的封闭液(试剂盒自带),0.5%(W/V)硫酸葡聚糖(MW500 000),42  $^{\circ}$ C预杂交3 h。之后倒出预杂交液,加入新的杂交液,并加入10  $\mu$ L浓度为1.25 mol/ $\mu$ L的探针,42  $^{\circ}$ C杂交12~16 h。将杂交膜先用5  $\times$  SSC(含0.1% SDS)在37  $^{\circ}$ C下洗5 min,洗两次,再用1  $\times$  SSC(含0.1% SDS)42  $^{\circ}$ C下洗15 min。之后按照ECL检测试剂盒提供的方法进行处理,在暗室中压上感光胶片,感光1 h后,进行显影及定影处理。

按照事先标定的方位,将感光胶片、硝酸纤维素膜、平板三者进行对照。在杂交阳性信号的相应位置上挑出阳性克隆,用灭菌牙签转移到新的平板上进行培养。待菌落长出后,用上述方法重新制备杂交膜,

对挑出的克隆进行二次杂交筛选,以去除假阳性克隆的影响。挑取两次杂交均为阳性的菌落,用菌落PCR反应检测阳性克隆插入片段大小,并对目标克隆提取纯化质粒后进行测序,分析序列中的微卫星DNA。

菌落PCR反应体系为20  $\mu$ L,模板1  $\mu$ L(挑取单克隆到10  $\mu$ L超纯水中,混合均匀后取1  $\mu$ L作为模板),2  $\mu$ L的10  $\times$  PCR buffer,1.2  $\mu$ L的25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, dNTP(2.5 mmol/L)1.6  $\mu$ L, M-48和M-47(2  $\mu$ mol/L)各2  $\mu$ L, 0.2  $\mu$ L *Taq* 酶(Promega)(10 U/ $\mu$ L)。

PCR反应条件:首先94  $^{\circ}$ C 5 min,再94  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 60 s,循环35次,最后4  $^{\circ}$ C保存。用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果,根据marker确定插入片段的大小。

## 1.3 微卫星引物设计与多态性分析

选取两端侧翼序列足够长的微卫星序列,用引物设计软件 primer5 设计引物。然后在牙鲆基因组DNA中进行PCR扩增分析。PCR反应体系为25  $\mu$ L,包括50 ng牙鲆基因组DNA, 0.6  $\mu$ mol/L正向和反向引物, 150  $\mu$ mol/L dNTP, 1U *Taq* 酶(Promega), 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub> (Promega), 和1  $\times$  buffer (Promega)。反应在PE 9700 PCR仪上进行。35个循环的PCR反应条件为:94  $^{\circ}$ C变性10 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s,退火30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C延伸10 min,各对引物的退火温度有所不同(表1)。

PCR产物在12%的非变性聚丙烯酰胺凝胶中分离,EB染色,经紫外成像后对电泳条带进行统计分析。然后用Popgene 32 version 1.31软件进行数据处理,完成等位基因数、观测杂合度( $H_o$ )与期望杂合度( $H_e$ )的计算,并进行多态性信息含量(PIC)的计算。

多态性信息含量<sup>[20]</sup>:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^m P_i^2 - \sum_{i=1}^{m-1} \sum_{j=i+1}^m P_i^2 P_j^2$$

式中, $P_i$ 、 $P_j$ 分别为群体中第*i*个和第*j*个等位基因频率, $m$ 为等位基因数。

## 2 结果与分析

### 2.1 杂交筛选

经过两次杂交筛选后,本实验共得到23个阳性克隆。菌落PCR检测结果表明,这些阳性克隆的插入片段大小都在400~1 200 bp(图1)。经测序后

表1 牙鲆8对微卫星引物及其评价  
Tab.1 Eight pairs of microsatellite primers and evaluation in *Paralichthys olivaceus*

| 微卫星标记<br>Name | 引物序列(5'→3')<br>Primer sequence(5'→3')                  | 重复序列<br>Repeat motif                  | 退火<br>温度/℃<br>$T_m$ | 等位基因数<br>No. of alleles | 等位基<br>因大小/bp<br>Allele size range | 观测杂合度<br>$H_o$ | 期望杂合度<br>$H_e$ | 多态性信息含量<br>PIC |
|---------------|--------------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------|-------------------------|------------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| POG001        | F: CGCTGTCTCTGCTCTGTTCT<br>B: CTGCTGCTTCTCTCATTTCTAACA | (GT) <sub>20</sub>                    | 62                  | 12                      | 177~253                            | 0.8967         | 0.9238         | 0.900          |
| POG002        | F: CGCTGTCTCTGCTCTGTTCT<br>B: CTGCTGCTTCTCTCATTTCTAACA | (TG) <sub>25</sub>                    | 62                  | 18                      | 165~253                            | 0.9310         | 0.9516         | 0.931          |
| POG003        | F: AGGTGCAGGAAGGACAGGAC<br>B: CCTTTGAGAGGCTCTGAAATC    | (TG) <sub>27</sub> C(OC) <sub>7</sub> | 67                  | 19                      | 177~246                            | 0.9655         | 0.9613         | 0.942          |
| POG004        | F: AACCGAACTGAGGCGGACAC<br>B: ACACACGCTTGCTAGATTGACC   | (CA) <sub>11</sub>                    | 63                  | 17                      | 230~298                            | 0.8966         | 0.9456         | 0.937          |
| POG005        | F: TCTTTCTCTGCGAGGTTTC<br>B: TGATCTGCTGAGGGATGAG       | (CTC) <sub>5</sub>                    | 63                  | 4                       | 112~130                            | 0.4138         | 0.7356         | 0.676          |
| POG006        | F: CCAACGACACACCTGAATAA<br>B: TCAGACTGTGAATCTCCGACCTC  | (CA) <sub>19</sub>                    | 71                  | 11                      | 183~243                            | 0.8956         | 0.9195         | 0.908          |
| POG007        | F: TTGCTCATGTACTGTGCTGTG<br>B: AGTGCCGAGCGGATAAAGT     | (GT) <sub>8</sub>                     | 57                  | 11                      | 142~174                            | 0.6207         | 0.8462         | 0.814          |
| POG008        | F: AAAGCTGGTGCAAGATGTGAC<br>B: GCGTTTAGCGCATCATTTGTTA  | (TG) <sub>10</sub>                    | 66                  | 6                       | 150~174                            | 0.6552         | 0.7175         | 0.663          |

发现,有7个克隆的核心序列重复数太少或不含微卫星,其余16个克隆中共得到20个微卫星序列。



图1 牙鲆基因组文库中微卫星阳性克隆的插入片段电泳图谱

Marker为 $\Phi$ X174/Hinc II digest; 1-13为13个微卫星阳性克隆

Fig.1 Electrophoretic pattern of inserted fragments in microsatellite containing clones of *P. olivaceus* genomic library

M:  $\Phi$ X174 Hinc II digest; lanes 1-13: microsatellite containing clones

在得到的20个完整的微卫星序列中,完全型(perfect)微卫星13个,占65%;不完全型(imperfect)5个,占25%;复合型(compound)2个,占10%。其中,(AG/CT)<sub>n</sub>4个,占20%;(AC/GT)<sub>n</sub>16个,占80%;另外还观察到了一个(GC)<sub>7</sub>和一个(CTC)<sub>5</sub>重复序列(表1)。

图2所示为获得的微卫星长度的频率分布,20个微卫星的平均重复次数为21.25次,其中重复次数在10~20之间的最多,占35%;其次为重复次数在5~10次和30~40次者,各占25%,最长微卫星重复60次。

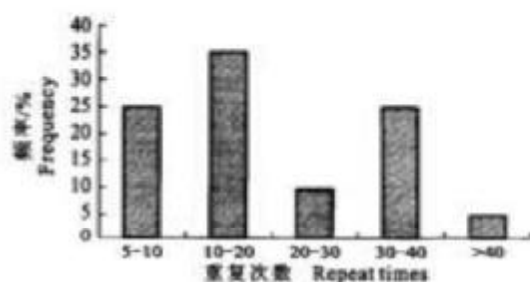


图2 牙鲆微卫星长度的频率分布

Fig.2 Length frequency distribution of microsatellites in *P. olivaceus*

## 2.2 遗传多态性检测

在这20个微卫星序列中,除了2个因两端序列

太短不能设计引物外,对其余18个微卫星分别设计了20~24碱基的引物。

经过优化PCR反应条件,共有11对引物能够得到清晰的预期长度的扩增片段。对威海牙鲆野生群体30个个体进行遗传多态性分析结果表明,8对引物在群体中都能稳定地扩增出相应的序列,其扩增片段具有多态性(图3),这8个微卫星分别被命名为POG001-POG008(表1),另外3对引物扩增产物呈单态性。



图3 牙鲆微卫星POG001(A)和POG007(B)在11个牙鲆个体中的扩增图谱

M:  $\Phi$ X174/Hinc II digest; 1-11为牙鲆个体编号;箭头指示没有扩增产物的个体

Fig.3 Amplified alleles of microsatellite POG001(A) and POG007(B) in 11 individuals of *P. olivaceus*

M:  $\Phi$ X174 Hinc II digest; lanes 1-11: individual numbers; arrows show the individuals giving no products

PCR扩增结果显示,不同的引物扩增出的等位基因数差异较大,从4到19不等,平均等位基因数为12.25,其中POG002、POG003、POG004分别获得了18、19、17个等位基因,呈现高度的多态性,POG005在30个个体中仅获得了4个等位基因,POG007在27个个体中获得了11个等位基因,而在其余3个个体中未能获得扩增产物(图3)。

用POPGENE软件对微卫星多态性进行分析的结果表明,各座位上观测杂合度与各座位的等位基因数相关,等位基因数越多杂合度越高,其中POG003的杂合度最高为0.9655。但等位基因数较多的POG007的观测杂合度却较低,仅为0.6207;POG005和POG007的观测杂合度与期望杂合度有较大差异。由于POG005和POG008座位上等位基因数较少,因此所提供的多态信息含量较低,分别只有0.676和0.663,各座位的平均PIC值为0.846(表1)。

### 3 讨论

在许多动物中,CA/GT和CT/GA微卫星相对较丰富,如在河豚(*Takifugu fasciatus*)中CA/GT微卫星是最丰富的,其次是CT/GA微卫星<sup>[20]</sup>;对斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)基因组的生物信息学分析表明,2碱基微卫星占微卫星总数的71.7%,而在2碱基微卫星中CA/GT和CT/GA微卫星分别占67%和21%<sup>[21]</sup>;Crooijmans等<sup>[22]</sup>对鲤鱼微卫星做了研究,估计每30~35 kb就有1个CA/GT类的微卫星。在中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、虎鲨(*Ginglymostoma cirratum*)等海洋生物中也分离到了大量的CA/GT和CT/GA类的微卫星<sup>[23-25]</sup>,表明在海洋生物中CA/GT和CT/GA类的微卫星含量也是极为丰富的。在已有的牙鲆微卫星相关研究中,同样是CA/GT和CT/GA微卫星较多<sup>[13]</sup>。因此,本研究首先采用了(AC)<sub>10</sub>和(AG)<sub>10</sub>为寡核苷酸探针筛选牙鲆微卫星,显示了良好的效果,获得了多个多态性丰富的微卫星,说明在牙鲆中CA/GT和CT/GA微卫星也极为丰富,下一步有必要继续以(AC)<sub>10</sub>和(AG)<sub>10</sub>为探针寻找更多的牙鲆微卫星,为牙鲆遗传连锁图谱的构建和分子标记选育奠定基础。

据Ellegren分析<sup>[26]</sup>,真核生物中微卫星长度大多在30次重复以下,本实验分离到的微卫星最长为30个重复,最短为7个重复,与Ellegren的分析结果一致,表明采用重复数为10的寡核苷酸探针可以分离到足够长的牙鲆微卫星序列。

本实验所获得的8个基因座位中有2个座位(POG005和POG007)的观测杂合度与期望杂合度有较大的差异,这种现象可能是因为两个座位上出现了无效等位基因所引起的。微卫星在进行PCR扩增时偶尔会出现无效等位基因(null allele)的现象,即无特异性的扩增产物。这可能是微卫星引物的结合部位的点突变、插入或缺失阻碍微卫星的扩增<sup>[27]</sup>,而且这种突变并没有在群体中被固定,则只有一部分等位基因没有被扩增出来,因此在电泳时,实际为杂合的位点,仅出现单条电泳带而呈现纯合现象,另一部分个体则可能由于含有两个无效等位基因而得不到相应的扩增产物。本研究在利用POG007引物进行扩增时,就有3个个体不能顺利地得到扩增产物,可能是由于上述原因造成的。所

以无效等位基因如果不被识别出来,则会导致群体中纯合子过剩或杂合子缺失的现象,从而出现观测杂合度与期望杂合度偏离的现象。

#### 参考文献:

- [1] 刘 萍,孟宪红,何玉英,等.中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)黄、渤海3个野生地理群体遗传多样性的微卫星DNA分析[J].海洋与湖沼,2004,35(3):232-257.
- [2] Sakamoto T, Danzmann R G, Gharbi K, et al. A microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) characterized by large sex-specific differences in recombination rates [J]. Genetics, 2000, 155: 1 331-1 345.
- [3] Norris A T, Bradley D G, Cunningham E P. Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers [J]. Aquaculture, 2000, 182: 73-83.
- [4] Onaki A, Sakamoto T, Khoo S, et al. Quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Mol Genet Genomics, 2001, 265(1): 23-31.
- [5] O'malley K G, Sakamoto T, Danzmann R G, et al. Quantitative trait loci for spawning date and body weight in rainbow trout: testing for conserved effects across ancestrally duplicated chromosomes [J]. J Hered, 2003, 94: 273-284.
- [6] Kocher T D, Lee W J, Sobolewski H, et al. A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Genetics, 1998, 148: 1 225-1 232.
- [7] Waldbauer G C, Bosworth B G, Noneman D J, et al. A microsatellite-based genetic linkage map for channel catfish, *Ictalurus punctatus* [J]. Genetics, 2001, 158: 727-734.
- [8] Coimbra M R M, Kobayashi K, Koretsugu S, et al. A genetic linkage map of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. Aquaculture, 2003, 220: 203-218.
- [9] Watanabe T, Fujita H, Yamazaki K, et al. Preliminary study on linkage mapping based on microsatellite DNA and AFLP markers using homozygous clonal fish in Ayu (*Plecoglossus altivelis*) [J]. Mar Biotechnol, 2004, 6: 327-334.
- [10] 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.
- [11] 孙效文,楼允东.鲤鱼的遗传连锁图谱(初报)[J].中国水产科学,2000,7(1):1-5.
- [12] Sekino M, Hiras M. Isolation and characterization microsatellite DNA loci in Japan flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Mol Ecol, 2000, 9: 2 201-2 203.
- [13] Sekino M, Hiras M, Taniguchi N. Loss of microsatellite and mitochondrial DNA variation in hatchery strains of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Aquaculture, 2002, 213: 101-122.
- [14] Kim W J, Kim K K, Lee J H, et al. Isolation and characteris-

- tion of polymorphic microsatellite loci in the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Mol Ecol Notes*, 2003, 3: 491-493.
- [15] 王 伟, 尤 楠, 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): 530-537.
- [16] Liu Y, Chen S, Li B. Assessing the genetic structure of three Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) stocks by microsatellite markers [J]. *Aquaculture*, 2004, 243(1-4): 103-111.
- [17] 张全启, 徐晓雯, 齐 洁, 等. 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.
- [18] Hu J, Nakatani M, Mizuno K, et al. Development and characterization of microsatellite markers in sweet potato [J]. *Breed Sci*, 2004, 54: 177-188.
- [19] Botstein P, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *Am J Hum Genetic*, 1980, 32: 314-331.
- [20] Brenner S, Elgar G, Sandford R, et al. Characterization of the pufferfish (*Fugu*) genome as a compact model vertebrate genome [J]. *Nature*, 1993, 366: 256-259.
- [21] Serapion J, Kuruktas H, Feng J, et al. Bioinformatic mining of type I microsatellites from expressed sequence tags of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Mar Biotechnol*, 2004, 6: 364-377.
- [22] Crocijsmans R P M A, Beirbooms N A F, Komen J, et al. Microsatellite markers in common carp [J]. *Animal Genetics*, 1997, 28: 129-132.
- [23] 徐 鹏, 周岭华, 相建海. 中国对虾微卫星 DNA 的筛选[J]. *海洋与湖沼*, 2001, 32(3): 255-259.
- [24] Morris D B, Richard K R, Wright J M. Microsatellites from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their use for genetic study of salmonids [J]. *Can J Fish Aquat Sci*, 1996, 53: 120-126.
- [25] Heist E J, Jenks J L, Keeney D B, et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in nurse shark (*Ginglymostoma cirratum*) [J]. *Mol Ecol Notes*, 2003, 3: 59-61.
- [26] Ellegren H. Microsatellite evolution: a battle between replication slippage and point mutation [J]. *Trends Genet*, 2002, 18: 70.
- [27] Ede A M, Crawford A M. Mutations in the sequence flanking the microsatellite at the KAP8 locus prevent the amplification of some alleles [J]. *Anim Genet*, 1995, 26: 43-44.

## Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)

CHEN Wei, ZHANG Quan-qi, YU Hai-yang, HU Jing-jie, QI Jie, BAO Zhen-min

(Laboratory of Marine Genetics and Breeding, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** Total DNA was extracted from blood of olive flounder (*Paralichthys olivaceus* Temminck et Schlegel). Partial genomic library was constructed by ligating *Sau3A*I digested genomic DNA (400-1200 bp) to pUC19 vector and transforming the constructed plasmids to the *E. coli* strain DH5 $\alpha$ . By using (AC)<sub>10</sub> and (AG)<sub>10</sub> as probes, 20 microsatellites were identified from 16 positive clones screened, among which 13 were perfect ones, 5 imperfect ones and 2 compound ones. Sixteen (80%) microsatellite sequences showed (AC/GT)<sub>n</sub> repeat motif which are abundant in other marine species studied. From the primers designed for the 18 microsatellite loci, 11 could amplify expected PCR products. Of the 11 loci 8 were found to be polymorphic with variable numbers of alleles and observed heterozygosities (*H<sub>a</sub>*) ranging from 0.413 8 to 0.965 5 in a wild population consisting of 30 individuals. Three loci had 17-19 alleles, which were highly polymorphic. These microsatellite markers are likely to be useful for studies of genome mapping, parentage determination and population genetics in this species.

**Key words:** *Paralichthys olivaceus*; colony hybridization; microsatellite; polymorphism

**Corresponding author:** ZHANG Quan-qi. E-mail: qzhang@ouc.edu.cn