第13卷第2期
2006年3月

中国水产科学
Journal of Fishery Sciences of China

Vol.13 No.2
March 2006

哲罗鱼基因组微卫星富集文库的构建与分析

佟广香[1,2],鲁翠云[1],匡友谊[1],梁利群[1],尹家胜[1],孙效文[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:采用磁珠富集法构建哲罗鱼(*Hucho taimen* Pallas)基因组微卫星文库。哲罗鱼基因组DNA经*Mbo*I限制性内切酶消化后,选取400~900 bp的片段,用生物素标记的简单重复序列$(ACA)_{15}$作探针与其杂交,杂交复合物结合到包被有链霉亲和素的磁珠上,获得目的片段,连接T载体克隆,构建基因组微卫星富集文库。再用同位素标记的$(ACA)_{15}$探针进行二次筛选,筛选出686个阳性克隆,阳性克隆率为35.94%。对其中140个阳性克隆进行测序,共获得149个微卫星序列,4个小卫星序列,其GenBank Accession Number为DQ110955~DQ121108。其中perfect(完美型)62个,占41.61%;imperfect(非完美型)92个,占61.74%;compound(混合型)5个,占3.36%,重复次数主要分布于6~45(81.21%),平均重复次数为32.5,这表明$(ACA/TGT)_n$在哲罗鱼基因组DNA中含量非常丰富。本研究旨为从DNA水平上研究哲罗鱼种群结构、遗传多样性及目前群体现状等方面提供有效工具。[中国水产科学,2006,13(2):181-186]

关键词:哲罗鱼;微卫星;磁珠富集
中图分类号:Q959.466　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1005-8737-(2006)02-0181-06

微卫星标记也称简单序列长度多态性(simple sequence length polymorphism, SSLP),是真核生物基因组中广泛分布的简单重复DNA片段,一般每个重复单位仅1~6个碱基,重复数为10~20次。微卫星具高度的可变性,即丰富的多态性信息含量(PIC),主要体现在其可变的等位基因长度。这种可变性可能来源于复制过程中复制酶的滑动,也可能由不等价交换造成,还可能是在微卫星侧翼序列上插入或缺失引起重复数目改变的结果[1-2]。这种标记具有种属保守性、共显性遗传和多态性程度高等遗传特点。目前这一标记已广泛应用于遗传连锁图谱的制备、基因定位、品种鉴定等方面[3-5]。同样,微卫星也是遗传背景分析(家系、家谱分析)、群体遗传结构和遗传纯度分析的有效手段[6-8]。

哲罗鱼(*Hucho taimen* Pallas)属鲑形目(Category),鲑科(Salmonidae),为北极淡水鱼类区系复合体的鱼类,其肉质细嫩鲜美,营养价值高,具有较高的经济价值和广阔的开发应用前景。历史上,哲罗鱼在中国的东北、西北、华北等地广泛分布,近几十年来由于森林破坏、过渡捕捞等因素,现在仅黑龙江省的乌苏里江、呼玛河水系和新疆咔纳斯湖生存着很小的繁殖群体,其他水域很难见到[9-11]。目前,该鱼的自然资源基本枯竭,现被编入《中国濒危动物红皮书》中[12]。因此,充分了解哲罗鱼的种群结构、遗传多样性现状,对其保护性开发具有重要意义。本研究应用磁珠富集法构建哲罗鱼微卫星文库,旨为从DNA水平上研究哲罗鱼种群结构,遗传多样性及目前群体现状等方面提供了有效的工具,这在哲罗鱼的种质资源的保护及开发利用方面具有十分重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

哲罗鱼样品于2004年从黑龙江水产研究所渤海冷水性鱼实验站获得,-80 ℃冻存。

1.2 基因组DNA提取

将样品取出,放入1.5 mL离心管中,加入10倍质量体积的裂解液(200 μg/mL蛋白酶K,0.5%十二烷基肌氨酸钠,200 mmol/L EDTA pH 8.0),50 ℃消化,用酚、氯仿、异戊醇混合液(体积比为25:24:1)抽提3次,预冷的无水乙醇沉淀,70%乙醇洗涤1次,室温干燥,0.1×TE溶解。

收稿日期:2005-07-20; 修订日期:2005-10-19.
基金项目:国家"973"重点基础研究发展计划项目资助(2004CB117405).
作者简介:佟广香(1978-),女,在读硕士,从事水产动物遗传育种研究. E-mail: Tongguangxiang@yahoo.com.cn
通讯作者:孙效文. Tel: 0451-84842646; E-mail: Sunxw2002@163.com

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.com.cn

1.3 酶切获得目的片段

用限制性内切酶 *Mbo* Ⅰ酶切基因组 DNA，1%琼脂糖凝胶电泳检测酶切效果，蔗糖密度梯度离心回收 400~900 bp 片段。

1.4 连接接头

1.4.1 接头序列 用单链寡核苷酸合成双链接头，每种寡核苷酸的浓度为 50 μmol/L。所用接头序列为 Olig A:

5'-GATCGTCGACGGTACCGAATTCT -3';

Olig B: 5'-GTCAAGAATTCGGTACCGTCG AC-3'。

等比例混合两种寡核苷酸，使每种的终浓度为 25 μmol/L。95 ℃变性 10 min，经 4 h 缓慢冷却至 10 ℃，最终形成双链接头：

5' GATCGTCGACGGTACCGAATTCT A

3' CAGCTGCCATGGCTTAAGAACTG B

Mbo Ⅰ——*Sal* Ⅰ——*Eco*R Ⅰ

1.4.2 连接接头 建立 20 μL 的连接体系，其中包含 3 μL(约 600 ng)酶切片段，10 μL 接头，6 weiss T_4 DNA 连接酶(Promega，USA)，于 16 ℃水浴中连接过夜。

1.5 创建全基因组 PCR 文库

用旋离柱(Centrifugal Concentrators，PALL FILTRON)去除多余的接头并浓缩至 10 μL 左右，1%琼脂糖凝胶电泳检测接头是否除净。取 3 μL DNA 片段为模板，以 Oligo B 为引物，进行 25 μL 体系的 PCR 预扩增(PE 9700)。PCR 程序为：94 ℃ 3 min；94 ℃ 1 min，60 ℃ 1 min，72 ℃ 2 min，10 个循环；72 ℃ 10 min。反应完毕后，去除多余的引物、dNTP 等，将 PCR 产物浓缩至 15 μL 左右。电泳检测其浓度及片段大小。

1.6 杂交并富集微卫星序列

1.6.1 配制杂交液 50 μL 体系组成为：1.5 μL (10 μmol/L) Probe[为生物素标记的$(ACA)_{15}$]；5 μL Oligo B (50 μmol/L)，15 μL 20×SSC，0.5 μL 10%SDS，16 μL ddH_2O，混合，68 ℃预热。取 12 μL (276 ng)DNA 片段于 95 ℃变性 10 min，立刻加入到 68 ℃预热的杂交液中，杂交 1 h。

1.6.2 平衡磁珠 在 1.0 mL 离心管中加入 100 μL 包被有链霉亲和素(streptavidin)的磁珠，用 200 μL 洗液 A[1 mmol/L EDTA (pH 8.0)、10 mmol/L Tris-Cl(pH 8.0)、2 mmol/L NaCl]洗涤 2 次，将离心管放在磁力架上使磁珠吸附在管壁上，弃除上清液，用 200 μL 洗液 B(6×SSC 0.1%SDS)洗涤磁珠 3~5 次，直到磁珠变得顺滑易脱落。加入 150 μL 洗液 B 室温放置。

1.6.3 亲和捕捉 杂交结束后将杂交液加入到已平衡好的磁珠中，25 ℃温浴 20 min，使生物素和链霉亲和素结合。温育结束后，去除上清液。分别用洗液洗涤磁珠：洗液 B 25 ℃ 2 次，每次 10 min，洗液 C (3×SSC 0.1%SDS) 68 ℃ 2 次，每次 15 min，洗液 D(6×SSC) 2 次，200 μL 0.1×TE 2 次，加入 30 μL 0.1×TE，95 ℃变性 10 min，小心吸出上清，上清液即为含有微卫星序列的单链 DNA 片段。以 Oligo B 为引物，进行 PCR 扩增，PCR 程序为：94 ℃ 5 min；94 ℃ 1 min，58 ℃ 1 min，72 ℃ 2 min，20 个循环；72 ℃ 10 min。反应完毕后，用旋离柱去除多余的引物、dNTP 等，将 PCR 产物浓缩至 15 μL 左右。电泳检测，并定量。

1.7 连接 T-载体、克隆

建立 10 μL 连接反应体系：2×连接缓冲液(缓冲液中包含连接酶) 5 μL，载体 pMD18-T vector 1 μL (购自 TaKaRa 公司)，DNA 片段 3 μL，加无菌去离子水补足至 10 μL，同时 T 载体自身连接作为对照。16 ℃连接 3 h。用 $CaCl_2$ 制备的感受态大肠杆菌 DH5α(参照《分子克隆试验指南》[13])进行转化，得到基因组微卫星文库。用双酶切法(*Eco*R Ⅰ & *Hin*d Ⅲ)检测重组率，计算获得克隆的数目。

1.8 同位素探针二次筛选

通过原位杂交对微卫星文库进行二次筛选。将克隆转化到杂交膜上，同时保留完全相同大小的菌板，以待杂交后挑取阳性克隆。用同位素标记的$(ACA)_{15}$进行杂交，压 X 光片，-70 ℃放射自显影 7 d 后显影。挑取阳性克隆进行测序分析。

1.9 微卫星序列测定

阳性克隆交由北京诺赛基因组研究中心有限公司进行测序。

1.10 序列分析与引物设计

获得的微卫星序列按完美型、非完美型和混合型分类，并用引物设计软件 Primer Premier 5 对所得的微卫星序列进行引物设计，利用 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶检测。

2 结果

2.1 哲罗鱼微卫星克隆与测序结果

本研究共获得基因组微卫星文库 2 100 个菌

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.com.cn

落,T载体自连的比例为9.09%,得到的重组克隆为1 909个。通过杂交进行二次筛选,阳性克隆686个,阳性克隆率为35.94%。选140个阳性克隆测序,除3个克隆信号较弱(含2次重复)外,在剩余的137个克隆中含有149个微卫星,4个小卫星,其GenBank注册号为DQ120955－DQ121108,其部分序列见表1。

表1　哲罗鱼微卫星分子标记及其引物

Tab.1　Microsatellite markers and their primers in *Hucho taimen* Pallas

微卫星标记 Microsatellite marker	克隆号 Clone No.	引物序列 5'-3' Primer sequence 5'-3'	大小/bp Size	最适退火温度/℃ Optimum annealing temperature	核心序列 Motif	GenBank Accession No.
HLJ2001	ZA-3	F AGAGGTGGTTAGAATAGG R GAGGTAGCAGTTTAGACT	245	52.0	$(CAA)_{14}(CAG)_2(CAA)_3(CAG)_2(CAA)(CAG)_2(CAA)_4(CAG)_2(CAA)_4$	DQ121033
HLJ2003	ZA-6	F CACTGGAAGGAAGCGGTCAA R AGCAGGTCAGGTGGGCAGA	267	62.5	$(CT)_{23}$	DQ121065
HLJ2004	ZA-14	F TCTGTCCTGCTGTCTCCG R GATGCGTAACGACCAAAA	278	53.5	$(TTG)_{44}$	DQ121017
HLJ2005	ZA-22	F TCTGATAAGGATTGGAGT R GAATGATGCCTAAGTGAA	281	53.5	$(TGT)_{16}$	DQ121024
HLJ2007	ZA-25	F CAGCGTTGGTGCTCGTCA R CTGCCACAGTTTGGTGTAGTTG	379	56.5	$(AAC)_6AAT(AAC)_{12}AAG(AAC)_7$	DQ121027
HLJ2008	ZA-36	F TCTGTCCTGCTGTCTCCG R CAGGCTTTACACTTTATGCTTC	400	55.5	$(TTG)_{31}$	DQ121040
HLJ2009	ZA-37	F TCTGGAGGTAGCAGTTTAG R AGGGCTTCGTGAATAGGT	300	55.5	$(TTG)_{26}$	DQ121041
HLJ2010	ZA-38	F TCTGGAGGTAGCAGTTTAG R TTACGAGGATACAGGTTGA	483	60.5	$(TTG)_8TGC(TTG)_3(TGC(TTG)_2(TGC)_3(TTG)_4(TGC)_2(TTG)_4(TGC)_3(TTG)_8$	DQ121042
HLJ2011	ZA-42	F CTTGAGCTTCCCTGGAGA R TATTGGGGTGGGGTTTAG	191	56.0	$(TTG)_3GTG(TTG)_3(TTG)_{11}$	DQ121047
HLJ2012	ZA-60	F TCTGTCCTGCTGTCTCCG R ATGGGTCTGTAAACCAAACGAA	167	52.0	$(GTT)_{14}$	DQ121067
HLJ2013	ZA-62	F GCTGCCATTCAGTCCTTC R TCTTCCTTTGTCAGGTGGT	404	53.5	$(AAC)_{15}$	DQ121069
HLJ2015	ZA-92	F TTACGAGGATACAGGTTG R TATTGGCACTGATTAGGT	328	49.5	$(CAA)_5CAG(CAA)_4CAG(CAA)_2TAG(CAA)_{17}$	DQ121100
HLJ2016	ZA-93	F TACTTGCTGATTTGACTG R TGATAAGGATTGGAGTGT	289	50.0	$(ACA)_8GCA(ACA)ACTA(CAA)_3CT(ACA)_{18}$	DQ121101
HLJ2017	ZB-31	F ATACCAGGCGATGTCAGA R GAATGCGGGATAAAGTGA	485	61.5	$(AC)_{19}$	DQ120978
HLJ2021	ZA-17	F TGGCTGCCTTAGAACTCC R ATCTGTCCTGCTGTCTCC	496	61.0	$(CAA)_{20}(CAG)_2(CAA)_4(CAG)_3(CAA)_{27}$	DQ121020
HLJ2022	ZA-58	F CTGCCTCTGTGAATCTGG R GGATGAGGAGCACAATAA	285	53.5	$(GTT)_{12}GCT(CTT)_7GCT(GTT)_4GCT(GTT)_5GCT(GTT)_{20}$	DQ121063
HLJ2023	ZA-64	F CAAGAGGCTCCGCAGGTT R CTGGCAGTTTGCTCAGAT	252	55.5	$(ACA)_{50}$	DQ121071
HLJ2024	ZA-12	F AGTTACGGGCTTGTGGAG R TGGTGTTGGTGGTGTTAT	117	61.0	$(ACA)_{20}$	DQ121014
HLJ2025	ZA-59	F GAGGCTATGACGAAGACC R TAAGGAAGCTGTGATGTG	260	54.0	$(CAA)_{17}$	DQ121064
HLJ2027	ZB-6	F ACACCACAACAACGACAT R GAATAATCCACGCTCACA	488	53.5	$(ACA)_{40}$	DQ120996
HLJ2028	ZB-17	F TAGACCACCGTAGGACAC R GCAACACCAATAACAACA	240	53.5	$(TGT)_6TGC(TGT)_{10}TGC(TGT)_2$	DQ120964
HLJ2029	ZB-14	F TCTGGAGGTAGCAGTTTA R CACCGGATACAGGTTGAA	404	50.0	$(TGT)_{25}$	DQ120962
HLJ2030	ZB-7	F TCTGGAGGTAGCAGTTTA R TGACTTGAAGGTATGGGT	252	50.0	$(TGT)_8(TGC)(TGT)_2(TGC)(TGT)_3(TGC)_3(TGT)_4(TGC)_2(TGT)_{21}(GA)_{14}$	DQ120997

注:F—正向引物;R—反向引物.

Note: F－Forward primer;R－Reverse primer.

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.com.cn

2.2 微卫星序列分析

根据 Weber[14]提出的测序标准，哲罗鱼微卫星序列中完美型 60 个，占 39.22%；非完美型 89 个，占 58.17%；复合型 4 个，占 2.61%。所测得的哲罗鱼基因组中微卫星的特征序列见图 1。哲罗鱼微卫星序列最大重复次数为 131 次，平均重复次数为 32.5，集中在 6～45 次，占 81.21%；最高在 16～20 次，为 17.45%；50 次以上的频率为 16.78%(图 2)。

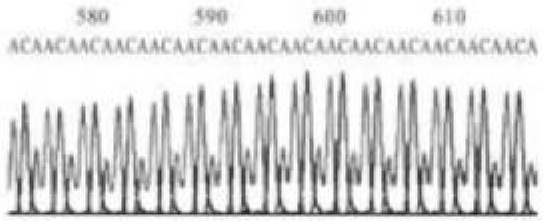

图 1 哲罗鱼基因组中微卫星特征的$(ACA)_n$重复序列

Fig.1 Typical $(ACA)_n$ repeat sequence in *Hucho taimen* genomic microsatellite

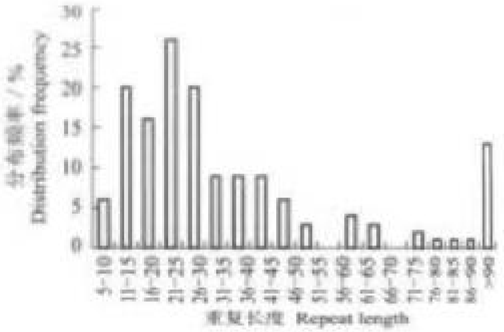

图 2 哲罗鱼微卫星长度分布频率

Fig.2 Distribution frequency of microsatellite repeat length in *Hucho taimen*

2.3 引物设计

利用引物设计软件 Primer Premier 5 对所得的 149 个微卫星序列进行引物设计，除去一些侧翼序列较短不能设计的引物外，其余共设计 117 对引物(78.52%)，其部分引物见表 1。这些引物通过优化 PCR 反应条件，在适当的退火温度，可获得目的条带，图 3 为 HLJZ023 号引物扩增出的结果。

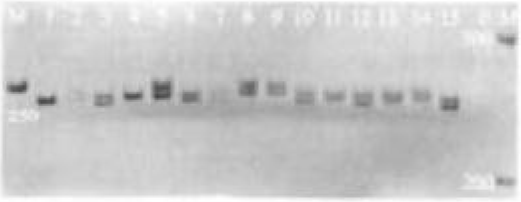

图 3 HLJZ023 号引物扩增的抓吉哲罗鱼群体图谱

M:分子量标准;0:阴性对照;1－15:15 个个体

Fig.3 Amplificatioin profile generated by primer HLJZ023 of *Hucho taimen* in Zhuaji population

M:Molecular weight maker;0:Negative;1－15:15 individuals

3 讨论

磁珠富集法是一种快速、高效的分离微卫星分子标记的方法，可以在一周内完成，且获得的微卫星重复序列的比例比小片段克隆的比例高[15]，根据 Weber[14]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。本研究磁珠富集克隆的哲罗鱼微卫星重复次数大部分都在 10 次以上，可为哲罗鱼遗传多样性、种质鉴定等遗传研究，以及濒危物种的保护、利用等方面，提供大量的可利用的微卫星标记。目前作者所在实验室已用该方法成功构建了鲤(*Cyprinus carpio*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙(*Aristichthys nobilis*)、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)等十几种水产动物的微卫星标记，为中国水产动物种质研究提供了基础数据(www.fishbreeding.org)。

本研究首次应用磁珠富集法成功地构建了哲罗鱼微卫星文库，149 个微卫星序列中$(ACA/TGT)_n$119 个，可见哲罗鱼基因组中 ACA/TGT 含量非常丰富。与其他水产动物相比，哲罗鱼微卫星序列中完美型较低，而非完美型较高(表 2)。哲罗鱼微卫星序列中非完美型比例较高的原因可能与哲罗鱼的进化及环境变迁有关，有学者认为哲罗鱼自冰河期从 *Salvelinus* 属分离进化而来，在进化的过程中，逐渐从海洋迁徙到内陆淡水中生活，并永久居住于淡水中[16]，早期哲罗鱼为世界分布最广的鲑科鱼类，从黑龙江流域直到欧洲的多瑙河等各流域都有分布，但是由于自然环境的变迁及人为因素，其栖息范围越来越窄[9-10,16-17]，迫使其基因组在复制传递过程中造成更多的变异，出现碱基替换、插入、缺失、错配和不等交换等，增加其遗传多样性，以缓解生存压力。

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.com.cn

表 2　不同类型的微卫星在水产动物中的分布

Tab.2　Distribution of different types of microsatellites in aquatic animals

项目 Item	哲罗鱼 *Hucho taimen*	中国对虾[18] *Fenneropenaeus chinensis*	剑尾鱼[19] *Xiphophorus helleri*	长牡蛎[20] *Crassostrea gigas*	鲤[15] *Cyprinus carpio*
完美型/% Perfect	39.22	74	54.2	54.7	53.15
非完美型/% Imperfect	58.17	7	12.5	20.8	37.84
复合型/% Compound	2.61	19	33.3	24.5	9.01
统计的微卫星数/个 Total	153	31	24	53	314

本研究构建了哲罗鱼基因组微卫星文库,获得了大量的可利用的微卫星序列,可以利用这些序列筛选出多态性的微卫星标记,对哲罗鱼的遗传多样性进行分析,揭示其种群的遗传结构、有效群体的大小、种群分化程度及种群遗传背景。哲罗鱼是名贵冷水性鱼类,具有较高的经济价值,它是目前所知生长速度最快的冷水性鱼类,人工驯化养殖已获成功,推广应用前景广阔[11,21-23]。利用微卫星标记可以鉴别哲罗鱼的不同地理种群,分析其亲缘关系,这对于哲罗鱼选育种尤为重要。共显性分子标记可以进行哲罗鱼家系选育,培育出经济性状优良的鲑科鱼类养殖新品种。另外,大规模的微卫星分析也为数量性状的定位、为最终实现哲罗鱼的分子标记辅助育种提供了可行之路。

致谢:本研究得到大连水产学院杨房泰、高俊生同学及上海水产大学李绍成等同学的大力支持,在此表示感谢。

参考文献:

[1] Li J, Macaubas C, Hallmaer A, et al. Mutation rate varies among alleles at a microsatellite locus: phylogenetic evidence[J]. Proc Natic Acad Sci USA. 1996, 93: 15 285 - 15 288.

[2] Oris G, Pearse D E, Avise J. Phylogenetic assessment of length variatioin at a microsatellite locus[J]. Proc Natic Acad Sci USA, 1997, 94: 10 745 - 10 749.

[3] Chen X, Temnykh S, Xu Y, et al. Development of a microsatellite framework map providing genome wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Theor Appl Genet, 1997, 5: 557 - 567.

[4] 樊叶杨,庄杰云,吴建利,等. 应用微卫星标记鉴别水稻籼粳亚种[J]. 遗传,2000,22(6): 392 - 394.

[5] 李云海,肖　晗,张庆春,等. 利用微卫星 DNA 标记检测中国主要杂交水稻亲本的遗传差异[J]. 植物学报,1999,41(10): 1 061 - 1 066.

[6] 张亚平,王　文,宿　兵,等. 大熊猫微卫星 DNA 的筛选及其应用[J]. 动物学研究,1995,16(4):301 - 306.

[7] Anne Reilly, Elliott N G, Grewe P M, et al. Genetic differentiation between Tasmanian cultured Atlantic salmon(*Salmo salar* L.)and their ancestral Canadian population: comparion of microsatellite DNA and allozyme and mitochondrial DNA variation [J]. Aquaculture, 1999, 173: 459 - 469.

[8] Seckinger J, Brink mann H, Meyer A. Microsatellites in the genus *Xiphophorus*, developed in *Xiphophorus montezumae* [J]. Molecular Ecology Notes, 2002, 2(1): 4 - 9.

[9] 张觉民. 黑龙江省鱼类志[M]. 哈尔滨:黑龙江科学技术出版社. 1999. 50 - 52, 106 - 108.

[10] 乐佩琦,陈宜瑜. 中国濒危动物(鱼类)红皮书[M]. 北京:科学出版社,1998. 29 - 31.

[11] 尹家胜,徐　伟,曹顶臣,等. 乌苏里江哲罗鲑的年龄结构、性比和生长[J]. 动物学报,2003,49(5):687 - 692.

[12] 董崇智,李怀明,赵春刚. 濒危名贵哲罗鱼保护生物学的研究[J]. 水产学杂志,1998,11(2):34 - 45.

[13] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆试验指南(第3版)[M]. 北京:科学出版社,2002.8.

[14] Weber J L. Informativeness of human(dC-dA)n(dG-dT)n polymorphisms[J]. Genomics, 1990, 7: 524 - 530.

[15] 孙效文,贾智英,魏东旺,等. 磁珠富集法与小片段克隆法筛选鲤微卫星的比较研究[J]. 中国水产科学,2005,12(2):126 - 132.

[16] BAJKOV A. Puvod losos rodu hucho[J]. Priroda, 1924, 17: 217 - 220.

[17] Holcik J, Hensel K, Nieslanik J, et al. The Eurasian Huchen, *Hucho hucho*[M]. USA Kluwer Academic Publishers, 12 - 26.

[18] 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.

[19] 李　霞,白俊杰,吴淑勤,等. 剑尾鱼微卫星 DNA 的筛选[J]. 中国水产科学, 2004, 11(3): 196 - 201.

[20] 李　琪,木岛明博. 长牡蛎(*Crassostrea gigas*)微卫星克隆快速分离及特性分析[J]. 海洋与湖沼. 2004, 35(4): 364 - 370.

[21] 徐　伟,尹家胜,姜作发. 哲罗鱼人工繁育技术的初步研究[J]. 中国水产科学, 2003, 10(1): 29 - 34.

[22] 姜作发,尹家胜,徐　伟. 人工养殖条件下哲罗鱼生长的初步研究[J]. 水产学报, 2003, 27(6): 590 - 594.

[23] 姜作发,唐富江,尹家胜. 乌苏里江上游虎头江段哲罗鱼种群结构及生长[J]. 东北林业大学学报, 2004, 32(4): 53 - 55.

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.com.cn

Construction and identification on enriched microsatellite library from *Hucho taimen* Pallas genome

TONG Guang-xiang[1,2], LU Cui-yun[1], KUANG You-yi[1], LIANG Li-qun[1], YIN Jia-sheng[1], SUN Xiao-wen[1]
(1. Heilongjiang River Fisherise Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070; 2. Dalian Fisheries College, Dalian 116023, China)

Abstract: Enrichment of microsatellite DNA with magnetic beads is a simple and efficient DNA isolating method, which was used to construct microsatellite DNAs library from *Hucho taimen* Pallas genome in this study. This project was designed to isolate microsatellite markers from *Hucho taimen* Pallas genome using the biotin capture method, which had been developed as a convenient and efficient method in recent years. Firstly, genomic DNA was extracted and digested with *Mbo* Ⅰ. And 400 − 900 bp fragments were recovered and ligated to a short linker (23 bp). Secondly, the ligated DNAs were hybridized with biotin-labeled simple sequence repeats(SSR)probes $(ACA)_{15}$ and the mixture was incubated with streptavidin-coated magnetic beads. The selected single-strand microsatellite DNA was obtained by removing the SSR-uncombined fragments. After the amplification of the selected microsatellite DNA, the PCR products were ligated to T-vector and transformed to *E. coli* competent cells. Finally, a library containing 2 100 colonies was constructed. Six hundred and eighty six positive colonies were obtained after the screening of the library by radioactive labeling hybridization. Sequencing of 140 positive colonies confirmed 149 microsatellite loci. Of these sequences, only 4 contained compound repeat motifs (2.61%), and the others included 60 perfect (39.22%) and 89 imperfect (58.17%) repeat motifs. In addition, relatively short arrays (6 − 45 repeats) were most abundant (71.7%) and the largest array contained 131 repeats in the microsatellite repeats. According to unique sequences flanking each motif, 117 primers were designed using the software Primer Premier 5. The results indicated that microsatellite sequences were characterized by $(ACA)_n$ abundant in genomic DNA of *Hucho taimen* pallas. The $(ACA)_{15}$-enriched library constructed in this study will be a useful resource for screening additional microsatellite markers from *Hucho taimen* Pallas for further study. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(2): 181 − 186]

Key words: *Hucho taimen* Pallas; microsatellite; enrichment with magnetic beads

Corresponding author: SUN Xiao-wen. E-mail: Sunxw2002@163.com

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.com.cn