

团头鲂微卫星标记的快速制备

李绍戊^{1,2}, 常玉梅¹, 梁利群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. 上海水产大学 生命科学与技术学院, 上海 200090)

摘要:采用磁珠富集法与放射性杂交相结合开发团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)基因组微卫星资源。以团头鲂基因组 DNA 为材料, 经 *Sau* 3A I 限制性内切酶消化后, 选取 400~900 bp 的片段进行 PCR 全基因组扩增, 并利用生物素标记的 (CA)₁₅ 探针进行微卫星片段的富集。将得到的片段与 T 载体连接后转入 DH5α 大肠杆菌中, 然后利用 γ -³²P 标记的放射性同位素探针进行第二轮杂交。结果表明, 共获得微卫星基因组文库 2 000 个菌, 杂交前菌落 PCR 检测阳性克隆率为 50%; 杂交后得到的阳性克隆为 230 个, 占 11.5%。从得到的 230 个阳性克隆中挑出 120 个进行测序, 有 94 个克隆含有重复次数大于 5 次的微卫星序列, 其中 46 个 (48.94%) 有随机侧翼区, 可以设计引物; 14 个缺乏足够的侧翼序列。在得到的微卫星序列中, 重复单元除 CA/GT 外, 还观察到 CT、AG、CG、CAA、CTCA 等重复单元。在单一型标记中, 完美型占 53.15%, 非完美型为 37.84%; 混合型标记占 9.01%。另外, 微卫星重复次数主要集中在 5~30 次, 占 75.68%。本研究旨在对团头鲂基因组资源的开发利用起到一定的促进作用, 并为团头鲂养殖品系的优化、遗传多样性的检测及遗传图谱的构建等奠定基础。[中国水产科学, 2006, 13(2): 187~192]

关键词:团头鲂; 微卫星; 磁珠富集

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2006)02-0187-06

团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 俗称武昌鱼, 原产于长江中游的一些大、中型湖泊中, 系草食性经济鱼类。自该鱼被驯养以来, 由于大量人工放流和广泛的人工繁殖、近亲交配, 致使团头鲂群体出现退化现象, 生长优势明显减弱, 鱼病发病率较高, 种质资源正受到衰退和混杂的威胁。改良团头鲂品种, 提高其生长速度, 成为遗传育种学家的研究目标之一。李思发等^[1]从 1985 年开始对团头鲂进行选育, 采用系统选育与生物技术结合的方法, 培育出团头鲂“浦江 1 号”, 并于 2000 年被农业部公布为适宜推广的水产优良品种。邹曙明等^[2]对团头鲂选育群体采用人工诱导雌核发育获得了纯系, 并将其与选育群体在酯酶上存在的稳定差异作为该雌核发育群体与正常发育群体区分的生化遗传标志。李思发等^[3]采用形态判别、同工酶分析和 RAPD 分析相结合的方法, 从 3 个层次研究分析了鲂属团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*)、三角鲂 (*M. terminalis*) 和广东鲂 (*M. hoffmanni*) 的种间亲缘关系和种内遗传差异, 并找出 3 种鲂的种间分子标记。但迄今为止, 并

没有一种非常有效的分子标记对团头鲂种群进行鉴定并进行分子辅助育种。

微卫星标记以其重复性好、共显性、孟德尔方式遗传^[4]等特点, 加快了重要经济性状数量位点 (QTL) 在连锁图谱的定位以及基因组结构特性的研究。目前这一标记已广泛应用于遗传连锁图谱的制备、品种鉴定、种群多样性分析等方面^[5-7]。团头鲂微卫星 DNA 的分离在国内尚无报道, 本研究尝试用磁珠富集的方法筛选团头鲂的微卫星分子标记, 以期在这一方法在水产动物方面的应用做一些探索, 并分离出一些团头鲂的微卫星分子标记, 为其养殖品系的优化、遗传多样性的检测及遗传图谱构建^[6]等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 团头鲂基因组 DNA 的提取

利用蛋白酶 K 和苯酚等从团头鲂的鳍条中分离纯化基因组 DNA。参照《分子克隆实验指南》第六章 (第三版)^[8]。

收稿日期: 2005-07-14; 修订日期: 2005-10-24.

基金项目: 国家“973”重点基础研究发展计划项目 (2004CB117405).

作者简介: 李绍戊 (1982-), 男, 在读硕士, 从事水产动物遗传育种研究. E-mail: swli_1982@163.com

通讯作者: 孙效文. Tel: 0451-84842646; E-mail: sunxw2002@163.com

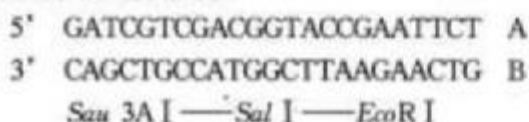
1.2 酶切并回收特定片段大小的 DNA 片段

将提取的 DNA 在 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 粗估其含量为 100 ng/ μL 。取约 3 μg 团头鲂的基因组 DNA, 在含有限制性内切酶 *Sau* 3A I (10 U/ μL) 的酶切缓冲体系 (50 μL) 中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 3.5 h 后, 1% 的低熔点琼脂糖凝胶电泳检测, 并切下 400 ~ 900 bp 大小的片段, 根据 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, CA) 提供的方案进行回收纯化。

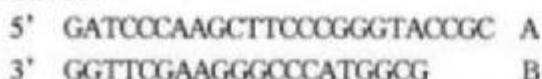
1.3 接头的制备及连接

采用两种接头, 分别为 Brown 接头和 Whitney 接头。

Brown 接头的制备: 等比例混合两组寡聚核苷酸链 A (5' GATCGTCGACGGTACCGAATTCT3') 和 B (5' GTCAAGAATTCGGTACCGTCGAC3'), 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min, 然后经过 4 h 缓慢冷却至 10 $^{\circ}\text{C}$, 最终形成的双链接头为:



Whitney 接头的制备: 与 Brown 接头不同的是利用了不同的寡聚核苷酸链 A (5' GCGGTACCGGGAAGCTTGG3') 和 B (5' GATCCCAAGCTTCCCGGTACCGC3'), 其他条件同上, 最终形成的双链接头为:



建立 20 μL 的连接体系, 其中包含 5 μL 酶切片段, 10 μL 接头, 6 Weiss T4 DNA 连接酶 (Promega, USA), 于 16 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中过夜 12 ~ 14 h。

1.4 利用接头片段创建团头鲂“基因组文库”

用旋离柱 (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 接头片段为模板, 进行 25 μL 体系的 PCR 预扩增 (PE 9700)。反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 min, 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 20 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。反应完毕, 去除多余的引物、dNTP 等, 同时将 PCR 产物浓缩至 10 μL 左右。电泳检测其浓度及片段大小。

1.5 用生物素标记的微卫星探针和 Dynal 磁珠与基因组文库杂交, 捕获和富集微卫星

将连有接头、经 PCR 扩增的 DNA 片段于 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 然后迅速加入到杂交液 (10 $\mu\text{mol/L}$ 生

物素探针 (CA)₁₅, 50 $\mu\text{mol/L}$ 引物, 15 μL 20 $\times$ SSC, 0.5 μL 10% SDS, 加水补足到 50 μL) 中于 68 $^{\circ}\text{C}$ 杂交炉中温育 1 h。杂交的同时准备磁珠的平衡: 取 1 mg (10 mg/mL) 磁珠放于一个 500 μL 低黏性的硅化管中, 将硅化管放在磁力架 (MPC) 上 1 ~ 2 min, 轻轻吸出盐溶液。加入 200 μL B&W (10 mmol/L Tris-Cl, 1 mmol/L EDTA, 2 mol/L NaCl) 洗涤两遍, 再用 200 洗液 I (6 $\times$ SSC, 0.1% SDS) 洗涤两遍, 最后加入 200 μL 洗液 I, 静置待杂交结束。

用包裹有链霉亲和素的磁珠于 25 $^{\circ}\text{C}$ 捕获连有生物素探针的微卫星序列, 缓慢摇动 20 min, 以使链霉亲和素与生物素充分结合, 然后将硅化管置于磁力架 (MPC) 上。洗涤磁珠去除非特异性 DNA 片段: 6 $\times$ SSC, 0.1% SDS 室温洗涤两次, 每次静置 10 min; 3 $\times$ SSC, 0.1% SDS 于 68 $^{\circ}\text{C}$ 洗涤两次, 每次静置 15 min; 6 $\times$ SSC 室温快速洗涤 3 次; 0.1 $\times$ TE 室温快速洗涤 3 次; 最后加入 30 μL 0.1 $\times$ TE, 于 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min, 以洗脱含有微卫星序列的单链 DNA。以单链 DNA 为模板进行第 2 次 PCR 扩增, 30 个循环, 其他程序同第 1 次 PCR。过柱, 并浓缩 PCR 产物至 10 μL 左右。

1.6 富含微卫星序列的 PCR 产物的克隆及序列分析

取 3 μL PCR 产物与 TA 克隆载体 pGEM-T (Promega, USA) 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中过夜连接 12 ~ 14 h, 同时以 T 载体自连作为对照, 将连接产物转化到用 CaCl_2 制备的感受态 *E. coli* (DH5 α 品系) 中。含重组子的菌落转移至硝酸纤维素膜上 (Promega, USA), 并用 γ -³²P 标记的放射性同位素探针 (CA)₁₅ 进行第 2 轮杂交, 具体方法参照《分子克隆实验指南》(第 3 版)。挑取阳性克隆, 送至北京诺基基因组研究中心有限公司测序, 返回序列采用 Premier Primer 5.0 软件包进行引物设计。

2 结果

2.1 测序结果及序列分析

本研究共获得微卫星基因组文库 2 000 个菌落, 在杂交前通过菌落 PCR 检测阳性克隆率为 50%, 杂交后得到的阳性克隆为 230 个, 占 11.5%。挑出其中的 120 个克隆进行测序, 得到 106 个序列, 其中有 94 个克隆含有微卫星序列。在 94 个序列中含有微卫星座位 111 个, 其中 CA/GT 占绝大多数, 为 88.3%。另外, 本实验对两种接头 (Brown 和

Whitney)的富集效果进行了比较,发现利用 Whitney 接头得到 121 个阳性克隆,而利用 Brown 接头只得到 109 个阳性克隆。

根据 Weber^[9]提出的微卫星标记的分类标准以及 Colbourne 等“根据每个微卫星重复单元的情况而可以将混合型细分为完美型和非完美型”的理论,对 111 个微卫星进行划分,其中,perfect 共 59 个,占 53.15%; imperfect 42 个,占 37.84%; compound perfect 8 个,占 7.21%; compound imperfect 2 个,占 1.80%。可见,perfect 的微卫星占大多数,此结果与鲤鱼等^[10]淡水鱼类的微卫星情况大体相符。在这些微卫星克隆中,重复单元除 CA/GT 外,还观察到 CT、AG、CG、CAA、CTCA 等重复序列。图 1 为团头鲂微卫星长度的频率分布情况。从图 1 中可以看出,微卫星重复次数主要集中在 5~30 次,占 75.68%;最高在 10~15 次,为 19.82%;30 次以上的频率 23.32%。

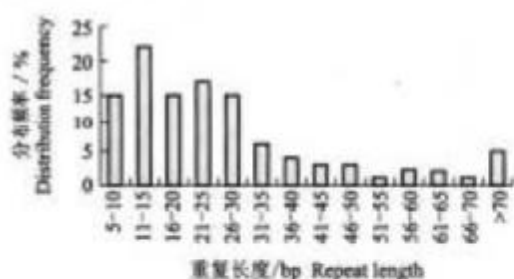


图1 团头鲂微卫星长度的频率分布

Fig.1 Length distribution of microsatellite in the genome of *Megalobrama amblycephala*

2.2 引物设计

在 94 个微卫星序列中,除了一些微卫星序列因本身结构或侧翼序列太短不能设计引物外(40.42%),其余微卫星利用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计引物。选择该生物软件主要是由于 Primer Premier 有着在同类型的生物软件中具有最强且方便使用的引物自动搜索功能。主要根据以下 4 个重要指标:包括发夹结构(Hairpin)、二聚体(Dimer)、错误引发情况(False Priming)及上下游引物之间二聚体形成情况(Cross Dimer),从而根据软件可以自动分析最为合适的 PCR 引物扩增位点,最终分析其结果是否可以将微卫星核心序列包含在内。共设计引物 46 对,占 48.94%,其部分引物见表 1。

图 2 为 MAC31HLJ 号引物扩增出的结果。所

用群体为江苏太湖良种养殖厂养殖的团头鲂浦江 1 号,共 30 个样品。

3 讨论

3.1 磁珠富集法制备微卫星的优点

微卫星的制备方法主要有传统法、PIMA 法^[10-11]、富集法(包括选择性杂交法^[12-13]和 FI-ASCO 法^[14])、EST-SSR 法^[15]等。应用传统方法制备微卫星文库,耗时长且产率低;而富集法,尤其是选择性杂交法已经成为目前最受欢迎的微卫星标记制备方法,且获得的微卫星重复序列的比例比小片段克隆的比例高^[16-17]。本研究采用了新型的磁珠富集法结合放射性杂交法分离团头鲂微卫星,简便快速,整个过程可在 1 周内完成。微卫星作为串联重复 DNA 类型中最可变的一种,广泛存在于真核生物基因组中,特别是二核苷酸重复(CA)_n或(TG)_n。在基因组中的含量十分丰富,在哺乳类基因组中 50~150 kb 就会出现一次^[18],而且当 $n \geq 16$ 时,提供的多态信息含量(polymorphism information content, PIC)在 0.5 以上^[18-21],主要体现在其可变的等位基因长度。Valdes 等^[22]认为在人类中重复次数低于 5 的微卫星,几乎检测不出多态性。Smulders^[23]认为重复次数多的微卫星既能在种间又能在种内产生多态性,但重复次数少的微卫星,仅能在种间产生多态性。本研究得到的微卫星序列有 86.49%其重复次数在 16 次以上(图 1),表明可以提供较高的多态信息含量。

3.2 磁珠富集法制备微卫星过程中出现的问题

事实上,应用磁珠富集法构建微卫星文库,阳性克隆率可达 100%^[24]。如果利用蓝白斑筛选,每一个白色菌斑都应该含有微卫星序列。但本研究得到的阳性克隆率仅为 11.5%,作者认为主要有 3 个方面原因:①洗脱的严谨性。在利用生物素标记的探针捕获含有微卫星序列的 DNA 片段之后,一系列的洗脱过程并未能将非特异性片段完全去掉。②磁珠的质量及其平衡。Reddy 等^[25]认为,贮存于 4℃ 的磁珠其可利用期限为自出厂日期起 6 个月,如果超过 6 个月,将极大地影响第 2 次 PCR 扩增产物的产量,由此将导致含有微卫星标记的阳性克隆率从 100%降低到 20%~30%,并且在洗涤磁珠的过程中必须严格控制洗液的质量和洗脱温度。③在利用同位素进行第 2 次杂交时 DNA 裂解不充分,也会导致一些单链 DNA 分子没有暴露出来,从而降低了阳性克隆率。

表1 团头鲂部分微卫星标记

Tab.1 Parts of microsatellite primer pairs for *Megalobrama amblycephala*

微卫星座位 Microsatellite locus	引物序列 5'~3' Primer sequence 5'~3'	大小/bp	最适退火温度/℃ Optimum annealing temperature	核心序列 Motif
MAC04HLJ	F: TTTTCTCA GGGTCTCGT R: TACTACTTCCCGACAAGG	259	52.0	(CA) ₁₄
MAC05HLJ	F: GAACCGTTGACATGATTAC R: TGAGGGCACAGATGAGAT	188	52.0	(GT) ₂₄
MAC09HLJ	F: GCCTGAAGCCTTAAACAC R: TGGATGACGGTAGTTTGC	118	51.0	(CA) ₂₁
MAC18HLJ	F: CCGGAACGTATCTCATGC R: ATTACTCGTCAGGGTCGC	255	54.0	(GT) ₂₈
MAC21HLJ	F: TTTCCAGTTCAGTCGGT R: CAAGCAAATCAAGCCATC	211	53.0	(CA) ₄₇
MAC24HLJ	F: TCTGGCAACAGGCTACAC R: GCAGCGAGCTGAATGAGT	138	52.0	(CA) ₄₆
MAC31HLJ	F: GCATCGGTAACAGTCAAA R: CAGGGATAATGTAGGAAGAA	204	50.0	(GT) ₂₈
MAC36HLJ	F: ATCCTCCGACATCACAGT R: TATAAATGGAGCTGACCC	285	50.0	(GT) ₃₆
MAC38HLJ	F: CATTACCAAAAGAGGACG R: AAGAGCCCATCTAAAGCA	205	50.0	(GT) ₂₃
MAC40HLJ	F: TAAAAGTCAGTGGGGTCC R: GTAATGATGGGTGTTGTG	236	49.0	(GT) ₂₈
MAC46HLJ	F: TACAAGAGCAGGTAAGCA R: CAGCCACTGACTGAACAT	184	48.0	(GT) ₁₂
MAC50HLJ	F: GGTATCGTGCTTGCTTGT R: TTCCATTTAGAGCTACGG	192	51.0	(GT) ₁₈
MAC53HLJ	F: AGCGGGTCTGTGCTAATC R: CGGCCAGTTCCAAAGAGT	209	54.0	(GT) ₂₈
MAC56HLJ	F: TTCAACGGCGAGACTCAA R: CGACTACACCTGGAACCTG	110	56.0	(GT) ₂₉
MAC58HLJ	F: GACGATCTTTCAGCCATT R: CTGTGGTTTTTGCTTCCTT	123	52.0	(GT) ₈
MAC63HLJ	F: TTGTGCCGTGATTACTGT R: AAGTTTGAGCTTGTGGGT	297	54.0	(GT) ₃₈
MAC72HLJ	F: TCCAAGCATCAGCAGACT R: GCATAAATGCGTGAGGG	284	52.0	(GT) ₂₄ (GT) ₃₆
MAC73HLJ	F: TCACGGTCA AATGCTCAC R: GAACCGAATCATTGTCCAG	167	52.0	(TG) ₁₈
MAC95HLJ	F: TACGGGTAGCTCCAGTCT R: GGAAGGTCCATGCAACAC	138	50.0	(CA) ₈

注: F—正向引物; R—反向引物。

Note: F—forward primer; R—reverse primer.

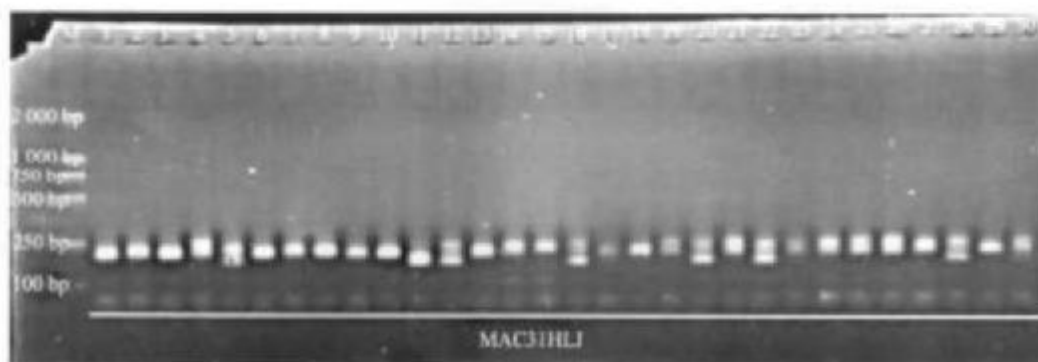


图2 引物 MAC31HLJ 的扩增结果

M: DNA 分子量标准 DL2000; 1~30: 30 个团头鲂个体

Fig. 2 Amplification result of locus MAC31HLJ

M: DNA Marker DL2000; 1~30: 30 individuals of *Megalobrama amblycephala* population

3.3 微卫星克隆中不同方法的比较

本实验采用了两种不同的接头,即 Brown 接头和 Whitney 接头,前者两端均为黏性末端,而后者一端平末端,一端黏性末端。实验发现,利用 Whitney 接头富集得到的阳性克隆数目要高于 Brown 接头。这也与 Carleton 等的结果一致^[13]。究其原因,可能是由于 Brown 接头两端均为黏性末端,DNA 分子在与其连接时必须去选择和识别具有酶切位点的一端,而 Whitney 接头则无此缺点,DNA 分子只需要去连接接头的黏性末端,无需识别,即其连接的速度和效率要高于 Brown 接头。

自 20 世纪 90 年代初期以来,微卫星标记已经广泛应用于人类和一些重要种类动植物连锁群的构建和物理图谱的绘制,但从团头鲂中筛选分离微卫星至今还未见报道^[25]。本研究构建了团头鲂部分基因组微卫星文库,获得了大量的可以利用的微卫星序列,根据得到的微卫星序列设计了适当的引物,可以用做团头鲂种群遗传学分析和多样性鉴定,为遗传育种、种质鉴定和种苗放流等提供理论依据和指导。

致谢:本研究得到大连水产学院高俊生、佟广香等同学的大力支持,在此表示感谢。

参考文献:

- [1] 李思发. 团头鲂浦江 1 号[J]. 科学养鱼, 2002(5): 12.
- [2] 邹瑞明, 李思发. 团头鲂良种雌核发育群体的建立及其遗传变异[J]. 水产学报, 2001, 25(4): 311~317.
- [3] 李思发, 朱泽闻, 邹瑞明, 等. 鲂属团头鲂、三角鲂及广东鲂种间遗传关系及种内遗传差异[J]. 动物学报, 2002, 48(3): 339~345.
- [4] 何平. 真核生物中的微卫星及其应用[J]. 遗传, 1998, 20(4): 42~47.
- [5] Dib C, Faure S, Fizames C, et al. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5 624 microsatellites[J]. Nature, 1996, 380: 152~154.
- [6] 曹双庆, 刘 珊, 刘红玉, 等. 鲫鱼 4 群体基因组 DNA 遗传多样性及亲缘关系的微卫星分析[J]. 中国水产科学, 2005, 12(4): 371~376.
- [7] 刘志毅, 相建海. 微卫星 DNA 分子标记在海洋动物遗传分析中的应用[J]. 海洋科学, 2001, 25(6): 11~13.
- [8] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南(第 3 版)[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 8.
- [9] Weber J L. Informativeness of human (dC-dA)_n(dG-dT)_n polymorphisms[J]. Genomics, 1990, 7: 524~530.
- [10] 魏东旺, 楼光东, 孙放文, 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] Lunt D H, Hutchinson W F, Carvalho G R. An efficient method for PCR-based isolation of microsatellite arrays (PIMA) [J]. Molecular Ecology, 1999, 8: 891~894.
- [12] Fisher P J, Gardner, Richardson T E. Single locus microsatellites isolated using 5' anchored-PCR [J]. Nucleic Acids Research, 1996, 24(21): 4369~4371.
- [13] Carleton K L, Streelman J T, Lee B Y, et al. Rapid isolation of CA microsatellites from the tilapia genome [J]. Animal Genetics, 2002, 33: 140~144.
- [14] Lavric M. Isolation of microsatellite markers by FIASCO method[J]. Kmet Zooteh, 2002, 80(2): 203~211.
- [15] 李永强, 李宏伟, 高丽锦, 等. 基于表达序列标签的微卫星标记(EST-SSRs)研究进展[J]. 植物遗传资源学报, 2004, 5(1): 91~95.
- [16] 孙放文, 贾智英, 魏东旺, 等. 磁珠富集法与小片段克隆筛选鲤鱼微卫星的比较研究[J]. 中国水产科学, 2005, 12(2): 18~28.

- [17] 鲁翠云,孙放文,梁利群,等. 鳊鱼微卫星分子标记的筛选[J]. 中国水产科学,2005,12(2):192-196.
- [18] HANCOCK J M. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms[Z]. Microsatellites. Evolution and applications, 1999: 1-9.
- [19] 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.
- [20] Ostrander E A, Jong P M, Rine J, et al. Construction of small - insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992,89:3 419-3 423.
- [21] Pfeiffere A, Olivieri A M, Mogante M. Identification and characterization of microsatellites in Norway Spruce(*Picea abies* K) [J]. Genome, 1997,40: 411-419.
- [22] Valdes A M. Allele frequencies at microsatellite loci: the step-wise mutation model revisited[J]. Genetics, 1993,133:737-749.
- [23] Smulders M J M. Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species[J]. Theor Appl Genet, 1997, 97: 264-272.
- [24] Reddy O U K, Alan E P, Ibrahim A, et al. New dinucleotide and trinucleotide microsatellite marker resources for cotton genome research[J]. J Cott Sci,2001,5:103-113.
- [25] 徐 鹏,周岭华,相建海,等. 中国对虾微卫星 DNA 的筛选[J]. 海洋与湖泊,2001,32(3):255-259.

Rapid isolation of microsatellites from genome of Bluntnose black bream (*Megalobrama amblycephala*)

LI Shao-wu^{1, 2}, CHANG Yu-mei¹, LIANG Li-qun¹, SUN Xiao-wen¹

(1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China; 2. School of Life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: The CA DNA sequences in Bluntnose black bream (*Megalobrama amblycephala*) were isolated through combining biotin capture method and radioactive labeling hybridization, and the characteristics of the microsatellites were analyzed. DNA was extracted from a Bluntnose black bream, and digested with *Sau* 3A I, and 400-900 bp fragments were selected and ligated to different adaptors (Brown and Whitney). Then the purified ligated-DNA was hybridized with biotin-labeled simple sequence repeats (SSR) probes (CA)₁₅. After capture of target fragments by magnetic beads and PCR amplification, a microsatellite genomic library containing 2 000 colonies was constructed. Two hundred and thirty positive colonies (11.5%) were obtained through twice screens by radioactive γ -³²P-ATP labeling hybridization. Sequencing of 120 positive colonies confirmed that 94 contained 111 microsatellite loci (number of repeats ≥ 5). Of the 94 sequences, only 10 contained compound repeat motifs (9.01%), and of the remaining sequences, 59 perfect (53.15%) and 42 imperfect (37.84%) repeat motifs were included. Forty-six (48.94%) pairs of PCR primers were designed through software package, while the remaining sequences were not chosen because of their insufficient flanking sequences. Besides the motif of CA/GT contained in the colonies, there were also CT/AG, CG, CAA and CTCA repeat motifs. In addition, the microsatellites with repeat times at 5-30 were more abundant than others. This research makes a positive contribution to explore genomes of Bluntnose black bream, offer genetic tools to check the genetic variations and construct genetic linkage map. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(2): 187-192]

Key words: *Megalobrama amblycephala*; microsatellite; magnetic beads enrichment

Corresponding author: SUN Xiao-wen. E-mail: sunxw2002@163.com