

黄鳍鲷基因组微卫星的分离

夏军红, 朱彩艳, 苏天凤, 江世贵

(中国水产科学研究院 南海水产研究所, 广东 广州 510300)

摘要:采用磁珠富集法构建黄鳍鲷 (*Acanthopagrus latus* Houttuyn) 基因组微卫星富集文库。共挑选 60 个克隆进行测序, 分析发现 58 个克隆分别含 (GA)_n 或 (CA)_n 两碱基重复单元。进一步通过序列比对, 最终获得 41 个具有特异微卫星序列的阳性克隆。其中, 23 个克隆含有 (GA)_n 或 (CT)_n 两碱基重复序列, 17 个克隆含有 (GT)_n 或 (CA)_n 重复序列, 另 1 个含有以上两种重复类型。获得的微卫星序列中, 单一型及间断型序列各有 20 条, 另有 1 条属于复合型序列。序列长度为 117 ~ 512 bp, 平均 259 bp。微卫星核心序列两碱基重复 5 到 38 次, 绝大多数序列重复次数大于 10。基于微卫星两端的侧翼序列设计并获得了 3 对能够在黄鳍鲷基因组有效扩增的微卫星引物。本研究旨在为进一步开展黄鳍鲷分子育种及资源评价分析提供基础资料。[中国水产科学, 2007, 14 (2): 321 - 325]

关键词: 黄鳍鲷; 基因组; 微卫星

中图分类号: Q959.483

文献标识码: A

文章编号: 1005 - 8737 - (2007) 02 - 0321 - 05

微卫星 (Microsatellite) 或叫简单序列重复 (SSR, Simple Sequence Repeats) 是基因组中广泛分布的 1 到 6 个碱基的重复序列, 具有高水平的遗传变异^[1]。目前微卫星标记已成为基因组研究的非常有效的遗传标记, 已用于遗传作图、基因定位、分子标记辅助选择、亲子鉴定、指纹识别、群体遗传学和生物资源的保护和管理等研究领域^[1-3]。

黄鳍鲷 (*Acanthopagrus latus* Houttuyn) 是名贵的海产经济鱼类之一, 也是中国南方海水鱼类网箱养殖的重要对象^[4]。为了对黄鳍鲷进行种群遗传学、分子育种及保护遗传学研究, 解决遗传资源应用、保护和管理过程中的一些关键问题, 需要有足够数量的有效的微卫星标记。由于磁珠富集法具有高效富集微卫星 DNA 的作用, 因而被广泛应用于微卫星位点的筛选^[5-6]。本研究采用磁珠微卫星富集法从黄鳍鲷基因组中分离出一批微卫星位点, 并设计相应 PCR 扩增引物, 为进行黄鳍鲷微卫星种群遗传学及育种学提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 样品收集及基因组 DNA 提取

从深圳盐田海鲜市场购买 14 尾野生黄鳍鲷 (体长 5 ~ 10 cm), 品种鉴定后冻存于 -70 ℃。采用常

规酚 - 氯仿 DNA 抽提方法从肌肉组织样品中提取黄鳍鲷基因组 DNA。

1.2 微卫星富集文库构建及克隆测序

参照 Fleischer 和 Loew 方法^[7]及链霉素磁珠试剂盒 (BioMag® Nuclease-Free Streptavidin, QIAGEN) 操作说明书构建黄鳍鲷基因组微卫星富集文库。实验方法简述如下: 基因组 DNA 被限制性内切酶 Mbo I 完全消化。割胶分离纯化 200 ~ 800 bp 片段, 然后加入 T4 DNA 连接酶与 SAU 接头序列 (SAULA: 5' - GCG GTA CCC GGG AAG CTT GG - 3'; SAULB: 5 - GAT CCC AAG CTT CCC GGG TAC CGC - 3') 进行连接。取连接混合物作为 PCR 扩增模板, 用 SAULA 序列作为引物进行 PCR 扩增。PCR 热循环程序如下: 首先 95 ℃ 预变性 2 min, 接着进行 PCR 循环。循环参数为: 95 ℃ 变性 1 min, 60 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 2 min, 循环 25 次, 最后 72 ℃ 延伸 5 min。

将 PCR 产物与生物素标记的探针 [(CA)₁₂ GCT TGA - biotin 及 biotin - (AG)₁₂] 58 ℃ 杂交过夜。加入亲和素标记磁珠, 43 ℃ 杂交 4 h 后通过磁场将磁珠 - 探针 - DNA 混合物进行分离。采用 1 × SSC 及 0.1% SDS 漂洗液按照室温、43 ℃、58 ℃ 顺序分别进行 3 次漂洗, 然后采用 1 × SSC 漂洗液

收稿日期: 2005 - 09 - 25; 修订日期: 2005 - 11 - 24。

基金项目: 国家自然科学基金资助 (30500376); 中国水产科学研究院重点开放实验室开放基金 (170)。

作者简介: 夏军红 (1975 -), 男, 博士, 研究方向: 鱼类遗传学。E-mail: flyxia936@163.com

通讯作者: 江世贵。Tel: 020 - 84195176。E-mail: jiangsg@21cn.com

室温漂洗 1 次,最后加入 50 μL TE 溶液, 95 $^{\circ}\text{C}$, 10 min 将 DNA 从磁珠-探针-DNA 混合物中分离。取 5 μL 作为 PCR 模板,采用以上 PCR 扩增方法再次进行扩增。采用常规酚-氯仿方法纯化扩增产物,TA 克隆,构建微卫星富集文库。随机挑选部分白斑克隆,利用 3' 端非生物素化的探针序列作为引物与 T 载体两端通用引物进行组合筛选阳性克隆。最后通过测序对阳性克隆进行鉴定。

1.3 序列分析、引物设计及实验条件优化

为了鉴定获得的微卫星重复序列的有效性,并为黄鳍鲷分子育种及种质资源分析提供有效的分子标记,进一步利用 ClustalX^[8]及 Oligo6 软件对序列特征进行分析,并基于部分微卫星侧翼序列设计了 3 对 PCR 扩增引物。随后对各引物设置不同退火温度梯度以摸索实验条件,优化实验体系,并利用 14 个样本进行群体分析。PCR 产物通过 6.0% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 分离,银染技术检测 (Promega 公司产品说明书)。应用软件 Labimage (ver2.6, by Kapelan, <http://www.labimage.de>) 相对于分子量标记 (100 bp DNA Ladder, U-gene) 确定等位基因大小。PCR 扩增反应体系如下: DNA 模板 4 μL (约 50 ng); 每种引物浓度为 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 1.7 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mg^{2+} ; 0.16 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs; 1 U Taq DNA 聚合酶 (BBST 公司); 1 $\times$ PCR 缓冲液; 补充灭菌双蒸水至终体积 25 μL 。PCR 热循环程序如下: 首先 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min, 接着进行 PCR 循环。循环参数为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 引物退火温度下退火 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s; 循环 30 次, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 充分延伸 7 min。本实验所用引物均由赛百盛生物技术有限公司合成, PAGE 纯化。

2 结果与分析

2.1 微卫星富集文库构建及阳性克隆筛选

2 个黄鳍鲷基因组 DNA 样本首先等体积混合, 然后进行酶切, 接头连接, 杂交, 磁珠筛选及克隆, 随机挑选 96 个白斑克隆通过 PCR 反应进行初步鉴定。阳性克隆 PCR 鉴定标准为: 采用 3 条引物对克隆进行 PCR 反应所获得的结果如与仅采用 2 条通用引物进行 PCR 扩增时得到的产物不一致, 就初步视此克隆为阳性克隆。随后基于以上实验结果, 共挑选 60 个阳性克隆送联合基因公司进行测序。

2.2 阳性克隆测序及序列分析

测序结果表明共有 58 个克隆中含有微卫星重

复序列, 进一步通过序列比对发现其中有 41 条不同的序列 (表 1), 因此, 共有 17 条序列被重复测序。

含微卫星重复序列的插入片段大小为 117~512 bp, 平均 259 bp ($n=35$)。核心序列有 (GA)_n 及 (CA)_n 两种两碱基重复类型。23 个阳性克隆含有 (GA)_n 或 (CT)_n 重复序列, 17 个含有 (GT)_n 或 (CA)_n 重复序列, 另 1 个含有以上两种重复类型。核心序列两碱基重复 5 到 38 次, 绝大多数重复都大于 10 次。另外, 微卫星序列具有多种碱基突变的形式, 如 C 转变为 A 或 G, A 转变为 G, C 转变为 G, G 转变为 A, CT 互变等。

Jarne 和 Lagoda^[2] 根据核心序列两碱基重复的模式, 将微卫星分为单一型 (P: pure)、复合型 (C: compound) 和间断型 (I: interrupted) 3 种类型。根据此分类标准, 本研究获得的黄鳍鲷微卫星序列中, 属于单一型序列的有 20 条, 间断型序列的有 20 条, 另有 1 条属于复合型序列。

2.3 PCR 引物设计及反应条件优化

通过序列分析后, 挑选 3 条两端侧翼区较长的序列进行了 PCR 引物的设计。然后, 基于 Taq 聚合酶的反应条件并通过对各引物的最佳退火温度进行摸索, 最终确定了 3 对微卫星标记引物的最佳退火温度条件 (表 2)。然后, 利用 14 个黄鳍鲷基因组 DNA 样本对这些微卫星标记的有效性进行了初步的评价。研究结果显示获得的微卫星标记在群体中扩增稳定, 带型清晰, 片段大小与预期结果基本一致, 因此, 这 3 对微卫星标记引物可以应用于黄鳍鲷的遗传分析。

3 讨论

分离微卫星位点有多种方法, 如部分文库法 (Partial genomic library)、富集文库法 (Enriched library)、微卫星序列 PCR 分离法 (PCR-based isolation of microsatellite arrays, PIMA) 及 AFLP 微卫星位点分离法 (Fast isolation by AFLP of sequences containing repeats site, FIASCO) 等^[9]。由于通过经典的构建和筛选部分基因组文库分离微卫星序列的方法获得的阳性克隆的效率很低, 只有 1%~3%^[9], 因此对于大多数研究而言寻找一种高效简单的分离方法就成了研究的目标。富集文库法具有高效富集微卫星 DNA 的作用, 自提出后被迅速广泛地应用于微卫星位点的筛选^[5-6]。采用磁珠微卫星富集文库法对大西洋多春鱼 (*Mallotus villosus*) 进

行的研究表明此方法的富集效率接近 60%, 排除重复后的阳性克隆率则为 8.7%^[10], 对鲑鱼 (*Salvelinus confluentus*) 基因组微卫星富集的效率为 44.3%, 排除重复后的阳性克隆率则为 34.9%^[11], 而对多线鱼 (*Pleurogrammus monopterygius*) 进行微卫星分离的富集效率约为 40%^[12]。本研究构建的黄鳍鲷基因组微卫星富集文库的阳性克隆效率达到 60.4% (58 /

96), 排除重复后阳性克隆率则为 42.7% (41 / 96)。相比较而言, 本研究的实验效率要远大于经典的构建和筛选基因组文库的方法, 而接近或超过以上几个物种的微卫星分离效率。因此, 通过采用磁珠微卫星富集法本研究建立了一套黄鳍鲷基因组微卫星高效率分离的技术体系。

表1 黄鳍鲷微卫星序列

Tab.1 Microsatellite sequences of yellowfin seabream

编号 Code	微卫星结构域 ^a SSR motif	含 SSR 片段大小 /bp Size of fragment containing SSR	SSR 类型 SSR Type
1	(GT) ₈	238	P
2	(CA) ₁₄ ; (CA) ₈	221	I
3	(CA) ₁₀	128	P
8	(CA) ₁₇ ; (CA) ₈ ; (CA) ₁₃	208	I
12	(CA) ₃₁	288	P
13	(CA) ₉ ; (CA) ₂₉	305	I
14	(CA) ₂₂	218	P
15	(GT) ₂₀	187	P
16	(CA) ₂₁	512	P
18	(GT) ₁₉	231	P
19a	(CA) ₂₀	497	P
27	(GT) ₃₈	239	P
30	(CA) ₃₈	309	P
32	(GT) ₂₀	479	P
34	(GT) ₃₀	214	P
35a	(GT) ₂₀	510	P
38	(CT) ₁₈ ; (CT) ₈ ; (CT) ₅	208	I
41	(GA) ₃₀	305	P
43	(CT) ₇	147	P
45	(GA) ₁₅ ; (GA) ₉ ; (GA) ₉	233	I
46a	(CA) ₃₆	331	P
47	(CT) ₆ ; (CT) ₆ ; (CT) ₈ ; (CT) ₈	178	I
49	(CT) ₆ ; (CT) ₅ ; (CT) ₇ ; (CT) ₇	272	I
50	(CT) ₂₅ ; (CT) ₄ ; (CT) ₅	"?"	I
51	(GA) ₉ ; (GA) ₆ ; (GA) ₂₅	152	I
52	(CT) ₁₆ ; (CT) ₂ ; (CT) ₈	"?"	I
53	(CT) ₃₀ ; (CT) ₉	132	I
63	(CT) ₁₃ ; (CT) ₁₆ ; (CT) ₈ ; (CT) ₇	153	I
64	(GA) ₇ ; (GA) ₇ ; (GA) ₈	232	I
66	(CT) ₂₅ ; (CT) ₄ ; (CT) ₅ ; (CT) ₅ ; (CT) ₁₇	"?"	I
70	(CT) ₂₅ ; (CT) ₄ ; (CT) ₅	"?"	I
73	(CT) ₁₀ ; (CT) ₈ ; (CT) ₆ ; (CT) ₆ ; (CT) ₆ ; (CT) ₇	246	I
74	(CA) ₆ ; (GA) ₃₈	235	C
75	(CT) ₂₇	117	P
77	(GA) ₆ ; (GA) ₂₆	196	I
78	(CT) ₂₅	"?"	P
80	(CT) ₆ ; (CT) ₆ ; (CT) ₆ ; (CT) ₇	178	I
81	(CT) ₁₉	267	P
82	(CT) ₆ ; (CT) ₅ ; (CT) ₇ ; (CT) ₆ ; (CT) ₇	272	I
84	(CT) ₁₉	"?"	P
85	(CT) ₈ ; (CT) ₆ ; (CT) ₁₆ ; (CT) ₂₂ ; (CT) ₁₃ ; (CT) ₆	427	I

注: "a"表示具有 4 次以上重复的序列被提供; "?"显示末端测序出现问题。P—单一型; C—复合型; I—间断型。

Note: "a" The sequence with more than four repeats was provided; "?" indicated the end of the sequence is in question. P—Pure; C—Compound; I—Interrupted.

表 2 黄鳍鲷微卫星标记引物序列

Tab.2 Primer sequences of microsatellite markers of yellowfin seabream

座位 Locus	引物 Primer	序列 (5' → 3') Sequence (5' → 3')	退火温度 /℃ Annealing temperature	等位基因数 Number of alleles
S2	2F	TTCAACATGTGCGGCACG	58	5
	2R	TATTGCCCTGCACAGTGCTCCC		
S13	13F	GACACAACCAAATTTAAACA	58	10
	13R	AGATGGTCCCTCTAATTC		
S18	18F	CGTTTCACTGGAAAACACC	58	12
	18R	TCTGTGACAGGATGCTGACTTA		

采用磁珠微卫星富集文库法构建的富集文库很可能含有较多的重复克隆,如 Gordos 等构建的大西洋多春鱼基因组微卫星富集文库中的阳性克隆重复率达到 51.3%^[10]; Dehaan 等构建的鲑鱼富集文库中的阳性克隆重复率达到 9.4%^[11],本研究构建的黄鳍鲷基因组微卫星富集文库中也含有较多的阳性重复克隆,约占整个富集文库的 17.7% (17/96)。这一现象的出现可能与实验中对微卫星富集产物前后多次进行 PCR 扩增有关。因此,为了避免发生类似的问题,进行微卫星分离时,应该尽量提高起始研究对象基因组 DNA 的使用量,从而在进一步的研究中不使用或减少 PCR 扩增的次数。另外,3 种微卫星分类类型中,本研究获得的复合型的微卫星序列相对较少,仅占 2.4% (1/41),且核心序列仅有 (GA)_n 及 (CA)_n 两种重复类型。而李琪及木岛明博利用磁珠富集法在获得的长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 微卫星序列中,单一型占 54.2%,间断型的占 20.2%,复合型占 24.2%。除探针中使用的 CA 重复单元外,他们还观察到 CT、ACT、CGCA、CACT、GACT、GCAC、CCTTA 和 CCTCA 的重复序列^[13]。相对而言,本研究分离得到的微卫星两碱基重复单元较为单一,较好地反应了杂交所使用的寡核苷酸探针的序列。推测出现这种差异的主要原因可能与实验中使用了较高的杂交及漂洗温度等高温反应条件及较长杂交时间有关。李琪等^[13]的实验中所采用的杂交温度为 56℃,20 min,漂洗温度最高仅为 30℃,而本实验相应的杂交及最高漂洗温度都为 58℃,采用过夜杂交,因此,充分的杂交时间、较高的反应温度保证了反应的有效进行,并且降低了分子间非特异杂交结合的可能性;另外,还采用 1×SSC 及 0.1% SDS 漂洗液在 42℃、58℃ 下进行漂洗,提高了反应的严谨条件。因此,本研究获得的微卫星序列较好的反应了所使用的探针序列。另一方面,出现这种差异的原因还可能与不同物种的基

因组特征有关,不同的研究结果反应了两物种的基因组微卫星序列特征。

目前应用分子标记技术对黄鳍鲷种群遗传背景进行评价的研究报道相对较少,而且起步较晚,也不够深入。研究报道主要有朱友芳等^[14]、刘红艳等^[15]、江世贵等^[16]、邓思平和刘楚吾^[4]及杨慧荣等^[17]应用同工酶、线粒体 DNA D-loop 及 RAPD 等分子标记所做的研究。然而,微卫星标记技术目前在黄鳍鲷的种群遗传与分子育种等研究中还没有相应的报道,而以“*Sparus latus*”或“*Acanthopagrus latus*”和“microsatellite”为关键词组合在 NCBI 数据库中仅可搜索到 2 条黄鳍鲷微卫星序列 (www.ncbi.nlm.nih.gov/; 9/2005)。本研究通过采用磁珠富集法分离了一批黄鳍鲷基因组微卫星位点,并通过引物设计与条件摸索最终获得了能够在黄鳍鲷基因组稳定扩增的多个微卫星标记,为进一步对黄鳍鲷进行分子分析提供了基础资料。

参考文献:

- [1] Dietrick W, Katz H, Linclon S E. A genetic map of the mouse suitable for typing intraspecific crosses[J]. *Genetics*, 1992, 131: 423–447.
- [2] Jarne P, Lagoda P J L. Microsatellites: from molecules to populations and back[J]. *Trends in Ecology and Evolution*, 1996, 11: 424–429.
- [3] Dick W, Hamilton M B. Microsatellites from the Amazonian tree *Dinizia excelsa* (Fabaceae) [J]. *Molec Ecol Notes*, 1999, 8: 1753–1768.
- [4] 邓思平, 刘楚吾. 黄鳍鲷不同组织同工酶的研究[J]. *海洋通报*, 2004, 23: 92–96.
- [5] Edwards K J, Barker J H, Daly A, et al. Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants [J]. *Biotechniques*, 1996, 20: 758–760.
- [6] 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.
- [7] Fleischer R C, Loew S. Construction and screening of microsatel-

- lite-enriched genomic libraries [A]. Molecular Zoology: Advances, Strategies and Protocols [M]. New York: Wiley-Liss, 1995: 459 – 468.
- [8] Jeffs P. Multiple sequence alignment with Clustal X[J]. Computer Corner, 1998, 23: 78 – 80.
- [9] 薛辉, 吴孝兵, 晏鹏. 微卫星标记在分子生态学中的应用及其位点的分离策略[J]. 应用生态学报, 2005, 16: 385 – 389.
- [10] Gordos K, Kenchington E L, Hamilton L C, et al. Atlantic capelin (*Mallotus villosus*) tetranucleotide microsatellites [J]. Molec Ecol Notes, 2005, 5: 220 – 222.
- [11] Dehaan P W, Ardren W R. Characterization of 20 highly variable tetranucleotide microsatellite loci for bull trout (*Salvelinus confluentus*) and cross-amplification in other *Salvelinus* species [J]. Molec Ecol Notes, 2005, 5: 582 – 585.
- [12] Spies N B, Lowe S, Hong Y, et al. Development and characterization of seven novel di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite markers in Atka mackerel (*Pleurogrammus monopterygius*) [J]. Molec Ecol Notes, 2005, 5: 469 – 471.
- [13] 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: 364 – 370.
- [14] 朱友芳, 许玉德, 林加涵. 黄鳍鲷 LDH 同工酶的组织特异性研究[J]. 台湾海峡, 2001, 20: 386 – 389.
- [15] 刘红艳, 苏天凤, 周发林, 等. 4 种鲷科鱼种内细胞色素 b 基因序列的保守性[J]. 湛江海洋大学学报, 2003, 23: 8 – 12.
- [16] 江世贵, 刘红艳, 苏天凤, 等. 4 种鲷科鱼类的线粒体细胞色素 b 基因序列及分子系统学分析[J]. 中国水产科学, 2003, 10: 184 – 188.
- [17] 杨慧荣, 江世贵, 苏天凤, 等. 黄鳍鲷 2 个自然群体遗传变异的 RAPD 分析[J]. 热带海洋学报, 2004, 23: 55 – 61.

Isolation of microsatellites from yellowfin seabream *Acanthopagrus latus*

XIA Jun-hong, ZHU Cai-yan, SU Tian-feng, JIANG Shi-gui

(South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract: Microsatellite-Enhanced Genomic Library of the yellowfin seabream *Acanthopagrus latus* was constructed using repeat-enrichment method with biotin-labeled oligos and streptavidin magnetic beads. Sixty positive clones were selected and sequenced, of which 58 clones are discovered to contain microsatellites with two nucleotide repeats of (GA)_n or (CA)_n. By alignment, 41 special microsatellite clones are confirmed finally among which 23 clones contain (GA)_n or (CT)_n, 17 contain (GT)_n or (CA)_n, and one contains (GA)_n and (CA)_n. In addition, the microsatellites can be divided into three types of 20 pure sequences, 20 interrupted sequences and one compound sequence. The sequence sizes range from 117 bp to 512 bp with an average of 259 bp. The repeats of two nucleotides within core sequences are 5 to 38 times, and most of them are more than 10 times. Three microsatellite primer pairs are designed based on the tandem sequences of microsatellites, and further were confirmed to be effective in the amplification of the genome DNA of the yellowfin seabream. This study provides a base for molecular breeding and assessment of germplasm resources of the yellowfin seabream. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (2): 321 – 325]

Key words: *Acanthopagrus latus*; genom; microsatellite

Corresponding author: JIANG Shi-gui. E-mail: jiangsg@21cn.com