

FIASCO 法筛选鳊鱼微卫星标记

匡刚桥^{1,2}, 刘臻¹, 鲁双庆¹, 刘红玉³, 张建社¹, 唐建洲¹

(1. 长沙大学 生物工程与环境科学系, 湖南 长沙 410003; 2. 湖南农业大学 动物科技学院, 湖南 长沙 410128; 3. 湖南大学 环境科学与工程系, 湖南 长沙 410082)

摘要:通过 FIASCO (Fast Isolation by AFLP Sequences Containing repeats) 法构建鳊鱼 (*Siniperca chuatsi*) 基因组微卫星富集文库, 分离微卫星 DNA 序列并对其进行特征分析。鳊鱼基因组 DNA 经 *Mse*I 限制性内切酶消化后, 选取 200~800 bp 的片段与 *Mse*I 接头连接, 用生物素标记的寡核苷酸探针 (AC)₈、(CT)₈、(AT)₇、(GATA)₈、(GATT)₇ 与其杂交, 杂交复合物结合到包被有链霉亲和素的磁珠上, 变性洗脱获得单链目的片段, 经 PCR 扩增形成双链, 然后克隆到 pGEM-T 载体上, 转化至 DH5 α 中, 首次成功构建鳊鱼基因组微卫星富集文库。对其中 100 个阳性克隆进行测序, 60 个 (60%) 含有微卫星序列 (GenBank Accession Number: DQ789247~DQ789306)。成功设计了 47 对鳊鱼微卫星引物, 并合成 21 对引物进行 PCR 扩增, 结果筛选出 18 个多态性微卫星标记。结果表明: FIASCO 法能有效提高筛选微卫星标记的效率。本研究筛选的微卫星标记可以用于鳊鱼遗传背景分析和遗传连锁图谱构建, 并将为鳊鱼基因组结构分析、标记辅助育种以及数量性状位点 (QTL) 基因的定位等研究提供候选微卫星标记。[中国水产科学, 2007, 14 (4): 608-614]

关键词:鳊鱼; 微卫星标记; 富集文库

中图分类号: Q959.483

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2007)04-0608-07

微卫星 (Microsatellite) 是一类广泛存在于真核生物基因组中的具有高度变异性的简单重复 DNA 序列^[1]。它具有按照孟德尔方式分离、多态信息含量丰富、呈共显性遗传等特点, 并能应用于简便快速的基因型检测^[2]。目前, 微卫星标记技术已被广泛应用于鲤鱼 (*Cyprinus carpio* L.)^[3]、黄鳝 (*Monopterus albus*)^[4]、鲫 (*Carassius auratus*)^[5]、虹鳉 (*Salmo gairdneri*)^[6-7]、斑马鱼 (*Danio rerio*)^[8-9]、鲶 (*Silurus spp.*)^[10] 和日本对虾 (*Penaeus japonicus*)^[11] 等多种水产动物的遗传背景分析和遗传连锁图谱构建等研究。

鳊鱼 (*Siniperca chuatsi*) 俗称桂花鱼, 隶属鲈形目 (Perciformes)、鳊亚科 (Sinipercinae), 是原产于中国各主要江河湖泊的珍贵淡水鱼类。随着中国鳊鱼养殖业的迅速发展, 由养殖群体的近亲交配和遗传漂变所导致的种质退化越来越明显, 养殖病害的暴发日趋严重; 而且由于一些鳊鱼养殖品种生长缓慢, 也严重制约了鳊鱼养殖产业化发展。鉴于鳊鱼养殖业的可持续发展以及恢复与保护野生鳊鱼资源的需要, 有必要对鳊鱼的种质遗传基础和种质资源鉴定开展深入的研究。目前, 有关鳊鱼群体遗传背景方面的研究很少, 仅见于方展强等^[12]对鳊鱼野生群

体和养殖群体进行了 RAPD 分析。然而, 迄今为止, 尚未见有关鳊鱼微卫星标记研究方面的报道, 这严重制约了微卫星标记在鳊鱼遗传学研究中的应用。因此, 筛选多态信息含量丰富的鳊鱼微卫星标记, 分析鳊鱼群体遗传结构用于标记选择育种等, 具有重要的理论意义和应用价值。

然而, 利用微卫星标记最关键的一步就是微卫星位点的分离和富集。目前, 常用的富集微卫星标记的方法主要有 3 种: ①构建目标生物小片段插入基因组 DNA 文库, 通过含有重复序列的探针筛选含有微卫星的阳性克隆^[13-14]; ②通过生物素探针结合链霉亲和素包被的磁珠进行微卫星 DNA 片段的富集^[15-17]; ③从公共核酸序列数据库资源中筛选微卫星^[18]。其中, 传统的构建小片段插入基因组文库和利用磁珠富集技术筛选微卫星的方法非常繁琐, 不仅需要大量的时间和经费, 而且获得微卫星的效率较低^[19]; 在当前公共核酸数据库中也并没有足够的有用序列来进行微卫星标记的筛选^[20]。这严重阻碍了微卫星技术在许多物种上的推广和应用^[21]。因此, 必须发展新的方法来解决这道难题。

FIASCO (Fast Isolation by AFLP Sequences

收稿日期: 2006-09-18; 修订日期: 2006-12-20.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30571414); 湖南省自然科学基金项目 (06JJ20056); 湖南省教育厅项目 (06C165).

作者简介: 匡刚桥 (1982-), 男, 硕士研究生, 主要从事水产动物分子生物学研究. E-mail: kuanggangqiao@163.com

通讯作者: 鲁双庆 (1963-), E-mail: lsq4250440@yahoo.com.cn

Containing Repeats)法^[19]是一种高效率筛选微卫星标记的方法,即基于 AFLP 技术酶切-连接反应的高效性,利用链霉亲和素包被的磁珠,在液相杂交体系中将微卫星片段与生物素探针进行特异性杂交,通过形成共价键结合在磁珠上,然后通过一系列的洗脱过程,达到富集微卫星标记的目的。因此,本研究拟采用 FIASCO 法探讨一套高效、快速、经济的鳊鱼基因组微卫星富集文库的构建技术,以期筛选出多态信息含量丰富的鳊鱼微卫星标记,为鳊鱼遗传背景分析、遗传图谱构建及分子标记选择育种等提供候选微卫星标记。

1 材料与方法

1.1 材料

采集湖南沅江流域的鳊鱼野生群体,共 20 尾,采用改进的苯酚-氯仿法^[22]从其血液中提取 DNA,调整 DNA 浓度至 100 ng/μL。磁珠为链霉亲和素包被的磁珠(NEB 公司)。生物素标记探针:(AC)₈-biotin, (CT)₈-biotin, (AT)₇-biotin, (GATA)₈-biotin, (GATT)₇-biotin。MseI 人工接头序列为:

Oligo-MseI A: HO5'-TACTCAGGACTCAT-3'
OH;

Oligo-MseI B: HO5'-GACGATGAGTCCT-GAG-3' OH;

Mse I-N 引物组:5'-GATGAGTCCTGAGTAA(N)-3'

实验所用生物素标记探针、接头及引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的酶切、连接及特定大小 DNA 片段的获得 取鳊鱼基因组 DNA 1 μg, Mse I 酶切 3.5 h。酶切片段与 Mse I A/Mse I B 接头连接后,用 Mse I-N 组对 1/10 倍稀释的连接混合液进行 PCR 预扩增,PCR 反应成功的标志是电泳产物中出现 1 个 Smear 区域(200~800 bp)。

1.2.2 生物素探针杂交 取上述 PCR 预扩增产物 25 μL, 95℃ 水浴变性 10 min, 加入 55℃ 预热的杂交缓冲液(6×SSC, 0.1% SDS) 70 μL 和生物素标记探针 5 μL, 构成 100 μL 杂交体系。PCR 仪中 55℃ 反应 30 min, 取出后, 缓慢冷却至室温, 加入 300 μL TEN₁₀₀ buffer 混匀, 4℃ 保存备用。

1.2.3 磁珠富集微卫星 DNA 片段 取 1~2 mg 的

链霉亲和素磁珠, 加入 200 μL TEN₁₀₀ buffer 仔细洗涤 3 次, 每次洗涤都用磁架固定磁珠。洗涤完毕后, 用 40 μL TEN₁₀₀ buffer 重悬磁珠, 接着加入到生物素探针杂交液中, 室温反应 30 min, 待磁珠吸附完毕, 用磁架固定磁珠, 移去杂交液。磁珠用 300 μL TEN₁₀₀ 溶液室温下洗涤 3 次, 将与磁珠非特异性结合的 DNA 片段洗脱。然后用 300 μL 0.2×SSC, 0.1% SDS 室温下洗涤磁珠 3 次, 再于 50℃ 下洗涤 10 min, 最后使用 300 μL 0.2×SSC 室温下洗涤磁珠 10 min。每次洗涤都需要用磁架固定磁珠, 并不时搅动或轻轻用移液器吹打。

1.2.4 目的 DNA 片段的洗脱和纯化 加入 100 μL TE(pH 9.0), 然后于 95℃ 下水浴 10 min, 用磁架固定磁珠后, 迅速吸取上清液, 按 1:2 的体积比加入 200 μL 冰乙醇, 再加入 10 μL 5 mol/L 的醋酸钠助沉, 4℃, 13 000 r/min 离心 20 min, 弃上清后, 用 70% 酒精再清洗 2 遍, 4℃, 13 000 r/min 离心 20 min, 小心的移去乙醇, 真空干燥机中干燥 10 min, 加入 50 μL 无菌水溶解沉淀。

1.2.5 回收的单链 DNA 片段的 PCR 扩增 以上述单链目的 DNA 片段为模板, 用 Mse I-N 引物组进行 PCR 扩增获得双链目的片段。20 μL 反应体系中包含: 10×PCR buffer 2 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.2 μL, dNTP (2.5 mmol/L) 1.6 μL, 120 ng Mse I-N 引物组, Taq 酶 (1 U/μL) 1 μL, 模板 DNA 5 μL。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5 min, 经 30 个循环(94℃ 变性 1 min, 53℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min)后, 72℃ 放置 20 min 以完成末端加 A 步骤。

1.2.6 微卫星富集文库的构建 将 PCR 产物回收纯化, 连接到 pGEM-T 载体中, 转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 铺板于含有 Amp 的 LB 固体培养基中, 即构建成鳊鱼基因组微卫星富集文库。

1.2.7 微卫星序列的抽样鉴定和引物设计 经过蓝白斑筛选, 挑取白色克隆到含有 Amp 的 LB 液体培养基中, 37℃ 培养过夜。直接以菌液为模板, Mse I-N 为引物进行 PCR 扩增, 确定插入片段分布范围。挑取含有 120~500 bp 扩增片段的阳性克隆送出测序, 将测序结果注册到 GenBank。挑选两侧翼区都足够长的微卫星序列, 用 Primer 5.0 软件设计引物, 并做 PCR 优化各引物的反应条件。

1.2.8 应用微卫星标记的多态性检测 以鳊鱼野生群体 20 个个体的基因组 DNA 为模板进行 PCR

扩增,PCR反应体系为 25 μL , 包含模板 DNA 50 ng, 10 $\times$ buffer 2.5 μL , 25 mmol/L MgCl_2 2.5 μL , dNTPs 1.0 mmol/L, 引物 0.4 $\mu\text{mol/L}$, *Taq* DNA 聚合酶 1.0 U。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 退火 45 s, 退火温度依引物而异, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 经 35 个循环后, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。扩增产物先在 1.5% 琼脂糖凝胶上检验扩增效果, 然后在 8.0% 聚丙烯酰胺凝胶经垂直电泳分离后, 银染法检测。

根据 PCR 扩增片段变异范围和特征, 直接从表型获知其基因型, 利用 Popgene 软件包 (Version 1.32, <http://www.ualberta.ca/fyeh/>) 统计其等位基因个数及基因杂合度。

2 结果与分析

2.1 微卫星片段的富集

将基因组 DNA 的酶切-连接混合液经过 PCR 预扩增、生物素标记探针杂交、磁珠富集、洗脱液洗脱等一系列处理, 获得含有微卫星序列的单链目的片段, 然后用 *Mse* I-N 引物组进行 PCR 扩增获得双链目的片段。图 1 显示, 磁珠与生物素探针亲和结合的微卫星目的片段主要集中在 100~500 bp, 说明磁珠富集的目的片段适合微卫星文库的构建。

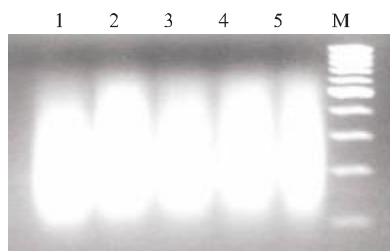


图 1 富集的微卫星片段的 PCR 扩增结果

1~5: 微卫星富集片段; M: 100 bp ladder marker.

Fig.1 PCR amplification result of microsatellite-enriched fragment

Lanes 1-5: Microsatellite-enriched fragments of Amplification; M: 100 bp ladder marker.

2.2 阳性克隆的筛选

将富集的微卫星 DNA 片段与 pGEM-T 载体连接, 转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞进行克隆, 蓝白斑筛选结果表明, 每个 LB 平板中均匀分布的白色菌落约 1 500 个, 说明本研究构建的鳊鱼微卫星富集文库质量较高。随机挑取 150 个白色克隆接

种于 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。直接以菌液为模板, 用 PCR 法快速筛选含有目标微卫星序列的重组克隆, 结果发现其中 100 个重组克隆的插入片段大小在 120~500 bp 之间, 重组率为 66.7%。对这 100 个扩增片段长度在 120~500 bp 之间的阳性克隆进行测序, 结果发现其中 60 个含有微卫星序列 (GenBank 登录号 DQ789247~DQ789306), 即 PCR 法筛选微卫星阳性克隆的准确率为 60%。

对这 60 个微卫星序列进行分析, 除探针中含有的 AC、CT、GATA、GATT 重复单元外, 还发现了具有 TCTG、TGAT、ATCA、ATCT、GACA、TCAA 和 ATC 等重复序列的微卫星类型, 但未发现具有探针中使用的 AT 重复序列的微卫星类型。微卫星重复次数主要集中在 5~29 次, 占 90%。鳊鱼基因组中部分微卫星重复类型所占比例及微卫星序列特征见图 2 和图 3。

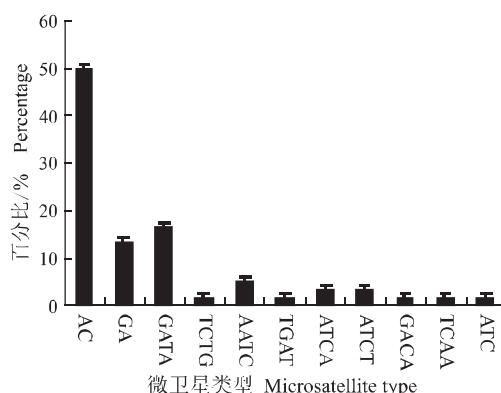


图 2 鳊鱼微卫星重复类型所占比例

Fig.2 Percentage of microsatellite types in *Siniperca chuatsi*

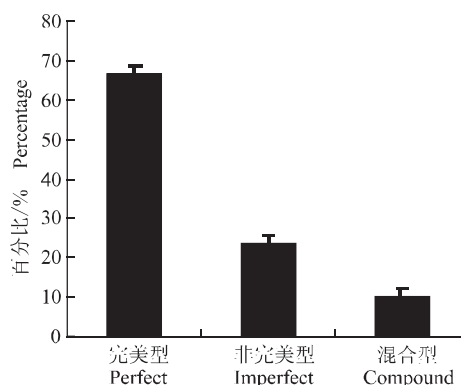


图 3 鳊鱼微卫星序列特征

Fig.3 Characteristic of microsatellite types in *Siniperca chuatsi*

2.3 微卫星引物的设计及鳊野生群体多态性鉴定

在获得的 60 个微卫星序列中,除了 13 个因两侧翼序列太短不能用于设计引物外,从其余 47 个序列中均成功获得鳊鱼微卫星引物(表 1)。合成其中的 21 对引物,以鳊野生群体共 20 个个体的基因组

DNA 为模板进行 PCR 扩增,结果有 20 对引物获得预期的 PCR 产物,且扩增条带清晰,扩增出的条带数目均为 1~2 条,经多态性分析,最终筛选获得 18 对多态性微卫星引物,预期基因杂合度在 0.355 6~0.911 1 之间(表 2)。

表 1 根据鳊鱼微卫星序列设计的 47 对微卫星引物

Fig. 1 47 pairs of microsatellite primers designed according to microsatellite sequences in *Siniperca chuatsi*

GenBank 序列号	重复序列	正向引物 (5' - 3')	反向引物 (5' - 3')	退火 温度 /℃	预期片 段大小 /bp
GenBank acc. no.	Repetitive sequence	Forward primer (5' - 3')	Reverse primer (5' - 3')	Anneal temp	Expected fragment size
DQ789260	(CA) ₅ CG(CA) ₃	AGCCATCAACATCTGCTTA	TGTGCGGTGCTCTGTATTCTG	56	123
DQ789248	(AC) ₆	GCTCGTAAAGTCCAGGTGAT	CAATGAGCACGCATAGAAG	54	100
DQ789261	(GT) ₁₀	AGGTGGGAAACGATAGAGG	AGTGTATTATGCCCTCTGTCA	54	114
DQ789247	(TG) ₁₄	GCCATCTATCATCAACAAAATC	TCCAGTTATTCACCTCCAT	54	133
DQ789257	(GT) ₅ ... (GT) ₂ ... (CA) ₁₈	TTCCCATGCAGCAAAGGT	TAGGGGGCTGAGAGCATAA	57	199
DQ789249	(TG) ₁₀	TGCGACAACCTACTCTGCT	TCTGTTTTTGACCGAGGG	53	80
DQ789250	(TG) ₇ ... (TG) ₄	ACAGATAACAACCTGAGGGAGCA	AATCCTGTACAGCCTCTCTC	57	167
DQ789262	(CA) ₅ CG(CA) ₃ ... (CA) ₃	AGCCATCACCATCTGCTTAC	CACTAAAACCTGCCTCC	57	176
DQ789253	(GA) ₇ ... (AC) ₈	TGGGTTACAGAGCAGGAGGT	TCTGATCACAGGTCTGTAGGCT	52	231
DQ789254	(GT) ₁₁	GAACGAGTATCGCATTAGCC	GAAAGTTGTGCAATGCGC	55	135
DQ789255	(CA) ₁₁ A(CA)	TGGTCTGGTCTGTTTGTGTC	GGCATGTAGCATGACATGCA	58	223
DQ789263	(TG) ₄ CG(TG) ₂ ... (CT) ₅	TGCTGCTTGCTGGGGATT	TCCAGCCAGGGAGCAAGTGA	64	64
DQ789256	(GT) ₁₁	GCAGTTTCTGCTTACTCTCTC	GCTTTGCTGAGTGGTTAGAGT	56	157
DQ789252	(GT) ₅ ... (GT) ₂ ... (CA) ₁₈	TCCCATGCAGCAAAGGT	GGGGGCTGAGAGCATAAG	57	195
DQ789258	(TG) ₈ CT(TG) ₃	AGGAAGGATTTAGTCAAGGTG	ACAAGCTCCAGCCTGAT	53	153
DQ789259	(TG) ₂ C(TG) ₁₀	CGTGAGCTTTCTTTTCACTCTG	CGTTCTTGGTGGTTCTCTATG	55	128
DQ789264	(GT) ₇ CA(GT) ₄ (GT) ₅	ACACAGCGAACATGATCCAGTC	GGGCTTCCAGATCTGTCTC	60	119
DQ789265	(GT) ₅ ... (GT) ₈	GGACTGAAATCACTTCCCAA	GCTGCTGACAATGGCTACTA	55	100
DQ789266	(AC) ₁₁	TCTGTTTTTGACCGAGGG	CACTTCACTTGGTTCACTGC	54	99
DQ789267	(CA) ₅ (CA) ₂ AA(CA) ₈	CCACACAGTCAAACCCGAGT	TGCCCTTGCTCCACCTAA	58	126
DQ789268	(TG) ₂₈	AAGGGTTAGGGTAAGTCTCC	CTGATCTGTGTGAGCACCA	52	147
DQ789269	(CA) ₇ ... (CA) ₄	TACTGTACAGGTCAAAGGTG	TGTGTGGTGCAGGTGGT	58	150
DQ789270	(CA) ₇ ... (CA) ₆	CGTCAGTTTCCACAGGCT	AGACCTCCGCTGTCTCTGT	53	142
DQ789271	(AC) ₁₀	TGAGTGGTTAGAGTTAGGGACG	GCAGTTTCTGCTGTTACTCTC	57	148
DQ789273	(ATC) ₆ ... (GATA) ₂₁	TGCTAGAACCACCTACAAA	TCATACCACAGCATCTCAATAG	54	221
DQ789274	(TCTG) ₆	GCTAGTCCCTGTTGGCTTT	CCAAATGTGGCAGAGTGAC	54	162
DQ789275	(CA) ₃ CT(CA) ₇ TC(CA) ₁₀	TCCTGAAGGAAGAGGTGGT	TGCTATCATACTCCATCTCTCTC	54	155
DQ789276	(ATAG) ₂₂	CTGTGAGTAATGTGCAGTGTC	AGGTACTATCTATCTATCATCTA	51	138
DQ789277	(AATC) ₁₀	COGTCTTCTTCTCTGTGT	TTGGTGTGTTGGAAGGTG	56	189
DQ789279	(GATA) ₁₇	TCCCTCGTTTCAGCTTC	CACTCACGTTGTGAGTTATCA	55	159
DQ789281	(GA) ₆ GT(GA) ₆	TCTGAGTCTGAGGCTGTTA	TTCGGTTTCAGACAAGCT	53	141
DQ789284	(TGAT) ₇	CATTGATAAGAAGATGAGAAGCA	TCCCTCAGGAAGTTTGGTT	55	285
DQ789285	(GT) ₁₃	TGGGTGAAGCAGGTGGCA	GGACGGAGAACAGAGGCACT	59	113
DQ789287	(GA) ₁₃	GTGTCTTTGTTTATGGAGTGAT	GAGCACTAAACTCAATCAAACA	51	140
DQ789290	(AGAT) ₁₈	CACAAGAAATCCCTCGTT	CACTCACGTTGTGAGTTATCAC	55	168
DQ789291	(ATCT) ₁₈	CACTCACGTTGTGAGTTATCAC	TCCCTCGTTTCAGCTTC	55	159
DQ789293	(TG) ₁₀	CTGCAGGACGGTGTATGTG	ACACTGTTGCATGGCTGA	55	101
DQ789294	(TG)(AG) ₁₈ (TG) ₁₇	TGGACCTGCTGTAATCTCTGT	ATCGGGTAACATCTCTCTCAC	55	251
DQ789295	(ATCA) ₆	TTACACTCACAGGCCAATC	ATGGACTATGGGTCTGGAAA	56	219
DQ789296	(GACA) ₈	AOCTCTCTCTGCTGTGCTT	CGCACTCAGACTGCTCACTC	56	128
DQ789297	(ATCA) ₁₀	ATAGCGAAACCGCAAGCA	CTGGGTGAGGAAAGTGGATT	58	301
DQ789300	(AATC) ₆	COGTCTTCTTCTCTGTGT	CGGTTGTGTTGGAAGGTGCT	56	187
DQ789303	(GATT) ₈	GCGTCAGCATTTCTTTGG	TTGTTCTTGCGCTTTCA	55	213
DQ789304	(TG)CA(TG)TA(TG) ₅	TGACTGCTAATGAGCTGCCA	GCCAAAGACCTTCCACTG	58	259
DQ789305	(TCAA) ₇	GGTGAGTTTGTACCAAGAGGA	GCATGTAGAGCAGGGCAAT	54	289
DQ789306	(TAGA) ₁₂	TACCATAACACTCAGACCCAC	CAAGGGAGCTTGCTCAA	52	131
DQ789301	(ATCT) ₂₇	CCCATCGGGTATGACTTT	GAGAGAGTGCTGGATGTCTAT	52	240

表2 鳊鱼18个微卫星标记及特征

Tab.2 Characterization of 18 microsatellite markers isolated from *Siniperca chuatsi*

基因座 Locus	核心序列 Core sequence	引物序列 (5' - 3') Primer sequence (5' - 3')	镁离子浓度 /(mmol·L ⁻¹) MgCl ₂	退火温 度/℃ Temp	产物大 小/bp Size	等位基 因数 Allele number	观 测 杂合度 <i>H_o</i>	期 望 杂合度 <i>H_e</i>
DQ789266	(AC) ₁₁	TCTGTTTTTGACCGAGGG CACTTCACCTTGGTTCACCTGC	1.2	57	95~139	2	1.000 0	0.555 6
DQ789271	(AC) ₁₀	TGAGTGGTTAGAGTTAGGGACG GCAGTTTCTGTTTACTCTC	1.5	57	148~188	4	1.000 0	0.555 6
DQ789273	(ATC) ₆ ... (GATA) ₂₁	TGCTAGAAOCCACTACAAA TCATACCACAGCATCTCAATAG	1.2	58	203~305	4	0.000 0	0.800 0
DQ789274	(TCTG) ₆	GCTAGTCCCTGTTGGCTTT CCAAATGTGGCAGAGTGAC	1.2	58	162~186	2	0.000 0	0.800 0
DQ789277	(AATC) ₁₀	CCGTCCTTCTTCTCTGTGT CCGTCCTTCTTCTCTGTGT	1.5	57	189~229	2	0.200 0	0.511 1
DQ789294	(TG) ₃ AG (TG) ₁₈ AG (TG) ₁₇	TGGACCTGCTGTAATCTCTGT ATCGGGTAACATCTCTCAC	1.2	57	184~251	3	0.000 0	0.355 6
DQ789295	(ATCA) ₆	TTACACTCACCAGGCCAATC ATGGACTATGGGTCTGGA	1.5	57	171~243	6	0.600 0	0.911 1
DQ789296	(GACA) ₈	ACCTCTCTGCGCTGTGCTT CGCACTCAGACTGCTCACTC	1.5	56	96~160	6	0.200 0	0.911 1
DQ789297	(ATCA) ₁₀	ATAGCGAAACCGCAAGCA CTGGGTGAGGAAAGTGATT	2.0	54	271~341	4	0.000 0	0.800 0
DQ789303	(GATT) ₈	GCGTCAGCATTTCTTTGG TTGTTCTTGCGCTTTCA	1.5	55	213~245	4	0.000 0	0.800 0
DQ789265	(GT) ₅ ... (GT) ₈	GGACTGAAATCACTTCCCAA GCTGCTGACAATGGCTACTA	1.5	56	95~142	4	1.000 0	0.711 1
DQ789279	(GATA) ₁₇	TCCCTCGTTTCAGCTTC CACTCAOCTTGTGAGTTATCA	1.5	56	159~227	5	0.200 0	0.822 2
DQ789290	(AGAT) ₁₈	CACAAGAAATCCCTCGTT CACTCAOCTTGTGAGTTATCAC	1.5	57	168~240	6	0.200 0	0.911 1
DQ789291	(ATCT) ₁₈	CACTCAOCTTGTGAGTTATCAC TCCCTCGTTTCAGCTTC	1.5	57	123~231	5	0.400 0	0.888 9
DQ789300	(AATC) ₆	CCGTCCTTCTTCTCTGTGT CGGTTGTTGGAAGGTGCT	1.5	57	163~235	6	1.000 0	0.911 1
DQ789306	(TAGA) ₁₂	TACCATAACACTCAGACCCAC CAAGGGAGCTTGCTCAA	1.5	57	179~227	2	0.600 0	0.466 7
DQ789254	(GT) ₁₁	GAACGAGTATCGCATTAGCC GAAAGTTGTGCAATGCGC	1.5	57	135~157	2	1.000 0	0.555 6
DQ789256	(GT) ₁₁	GCAGTTTCTGTTTACTCTC GCTTTGCTGAGTGGTTAGAGT	1.5	57	157~179	2	1.000 0	0.555 6

3 讨论

富集微卫星标记的方法很多,然而传统的微卫星分离方法效率较低而又耗时,且阳性克隆率大多在0.04%~12%之间^[19]。对于鱼类等富含微卫星的生物体来说,利用多种不同的生物素探针与链霉亲和素磁珠杂交来构建富含微卫星序列的基因组文库是切实可行的^[23-24]。本研究利用FIASCO法在短短1周时间内完成鳊鱼基因组微卫星富集文库的

构建,且检测到阳性克隆率为60%左右,说明使用本方法构建的鳊鱼微卫星文库质量较高,可用于大规模测序筛选鳊鱼微卫星。因此,FIASCO法是一种极为快速、高效的微卫星标记分离方法,可以推广到其他物种微卫星标记的研究中去。

微卫星序列广泛分布于真核生物基因组中,并且是随机分布的。本研究筛选的鳊鱼微卫星类型中除探针所使用的AC、CT、GATA、GATT重复单元外,还发现了TCTG、TGAT、ATCA、ATCT、GACA、

TCAA 和 ATC 等重复序列,重复次数主要集中在 5~29 次。在这些微卫星序列中,最频繁出现的双碱基重复类型是 (AC/GT)_n, 约占 50%, 其次是 (GA)_n, 约占 13%; 这与在所有动物基因组中 (AC)_n 微卫星的含量最为丰富, 其次是 (CT)_n 微卫星的结论相一致^[25]; 4 碱基重复类型中 (GATA)_n 占 20% 左右; 实验中仅观察到一个 3 碱基重复类型 (ATC)_n, 这可能与没有使用 3 碱基重复序列的探针有关。然而, 却未发现具有探针中所使用的 AT 重复类型的微卫星序列, 这可能是因为鳊鱼基因组 DNA 中 (AT)_n 微卫星类型非常稀少。

根据 Weber^[2]提出的标准, 可以将微卫星序列分为完美型 (Perfect)、非完美型 (Imperfect) 和混合型 (Compound) 3 种类型, 本研究分离得到的 60 个鳊鱼微卫星序列中完美型共 40 个, 占 66.7%; 非完美型共 14 个, 占 23.3%; 混合型共 6 个, 占 10.0%。由于生物生存环境的变化会导致其微卫星重复次数和长度发生变化^[26-27]。本研究中鳊鱼的完美型微卫星序列非常丰富, 表明鳊鱼生存的生态环境还未受到严重污染, 受到的选择压力较小, 基因组中发生的碱基替换、错配和不等交换等现象较低。

本研究采用 PCR 法快速筛选阳性克隆, 通过电泳检测其插入片段大小, 随机挑取 100 个 120~500 bp 之间且相差较远的单个克隆进行测序, 结果发现 60 个含有微卫星序列, 且没有出现重复的克隆。PCR 法筛选微卫星阳性克隆的准确率达 60%, 这说明 PCR 法在筛选微卫星阳性克隆中是切实可行的。在 60 个微卫星序列中, 除了 13 个因两侧翼序列太短不能设计引物外, 本研究成功获得 47 对微卫星引物。随机挑选合成 21 对引物进行 PCR 扩增, 结果有 20 对引物能稳定扩增出预期产物, 且扩增条带清晰, 扩增出的条带数目均为 1~2 条。经过多态性分析, 最终筛选获得 18 对多态性微卫星引物, 预期基因杂合度在 0.355 6~0.911 1 之间。这些微卫星标记为下一步进行鳊鱼遗传背景分析、遗传图谱构建、标记辅助育种提供了大量候选微卫星标记, 并将为鳊鱼养殖品系的优化、经济性状的 QTL 定位等研究奠定基础。

参考文献:

- [1] Schlotterer C, Tautz D. Slippage synthesis of simple sequence DNA[J]. Nucl Acid Res, 1992, 20: 211-215.
- [2] Weber J L. Informativeness of human (dC-dA)_n (dG-dT)_n polymorphism[J]. Genomics, 1990, 7: 524-530.
- [3] 孙效文, 梁利群. 鲤鱼的遗传连锁图谱(初报)[J]. 中国水产科学, 2000, 7(1): 1-5.
- [4] 鲁双庆, 刘少军, 刘红玉, 等. 黄鳍微卫星引物筛选及其在保护遗传学上的应用[J]. 水产学报, 2005, 29(5): 612-618.
- [5] 鲁双庆, 刘臻, 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.
- [6] 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: 1331-1345.
- [7] Nichols K M, Young W P, Danzmann R G, et al. A consolidated linkage map for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Anim Genet, 2003, 34: 102-115.
- [8] Postlethwait J H, Johnson S, Midson C N, et al. A Genetic Linkage Map for the Zebrafish [J]. Science, 1994, 264(29): 699-703.
- [9] Knispik E W, Goodman A, Ekker M, et al. A nuncnattelhte genetic linkage map for the Zebrafish [J]. Genes Dev, 1998, 18: 338-342.
- [10] Liu Z J, Karsi A, Li P, et al. An AFLP-based genetic linkage map of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) constructed by using an interspecific hybrid resource family [J]. Genetics, 2003, 165: 687-694.
- [11] Li Y, Byrne K, Miggiano E, et al. Genetic mapping of the kuruma prawn *Penaeus japonicus* using AFLP markers [J]. Aquaculture, 2003, 219: 143-156.
- [12] 方展强, 陈军, 郑文彪, 伍育源, 等. 鳊野生群体与养殖群体的 RAPD 分析 [J]. 大连水产学院学报, 2005, 20(1): 16-19.
- [13] Rassmann K, Schlotterer C, Tautz D. Isolation of simple sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting [J]. Electrophoresis, 1991, 12: 113-118.
- [14] Luchezar K, Iveta D K, Verne M C. Construction of random small insert genomic libraries highly enriched for simple sequence repeats [J]. Nucl Acids Res, 1993, 21(16): 3911-3912.
- [15] Kandpal R, Kandpal G, Weissman S M. Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping clones, and hybridization selection for region-specific markers [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 88-92.
- [16] Elaine A O, Pam M J, Rine J, et al. Construction of small insert genomic DNA libraries highly enriched for micro-satellite repeat sequences [J]. Proc Natl Acad Science, 1992, 89: 3419-3423.
- [17] Huang H B, Song Y Q, Hsei M, et al. Development and characterization of genetic mapping resources for the Turkey (*Meleagris gallopavo*) [J]. J Hered, 1999, 90(1): 240-242.
- [18] Ramsay L, Macaulay M, Degli S I, et al. A simple sequence repeat-based linkage map of barley [J]. Genetics, 2000, 156: 1997-2005.
- [19] Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite

- isolation: a review[J]. Mol Ecol, 2002, 11: 1–16.
- [20] Li C D, Rossnagel B G, Scoles G J. The development of oat microsatellite markers and their use in identifying relationships among *Avena* species and oat cultivars [J]. Theor Appl Genet, 2000, 101: 1 259–1 268.
- [21] 沈富军, Phill W, 张志和, 等. Dynal 磁珠富集大熊猫微卫星标记[J]. 遗传学报, 2005, 32 (5): 457–462.
- [22] 刘臻, 鲁双庆, 肖调义. 鲫鱼基因组 DNA 提取方法的探讨[J]. 水利渔业, 2004, 24 (6): 20–22.
- [23] 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.
- [24] 孙效文, 鲁翠云, 梁利群. 磁珠富集法分离草鱼微卫星分子标记[J]. 水产学报, 2005, 29 (4): 482–486.
- [25] Brenner S, Elgar G, Sandford T, et al. Characterization of the pufferfish (*Fugu*) genome as a compact model vertebrate genome [J]. Nature, 1993, 366: 265–268.
- [26] Vigouroux Y, Jaqueth J S, Matsuoka Y, et al. Rate and pattern of mutation at microsatellite loci in maize [J]. Mol Biol Evol, 2002, 19: 1 251–1 260.
- [27] Santibanez K M, Gangeswaran R, Hancock J M. A relationship between lengths of microsatellite and nearby substitution rates in mammalian genomes [J]. Mol Bio Evol, 2001, 18: 2 119–2 123.

Isolation and characterization of microsatellite loci from *Siniperca chuatsi*

KUANG Gang-qiao^{1,2}, LIU Zhen¹, LU Shuang-qing¹, LIU Hong-yu³, ZHANG Jian-she¹, TANG Jian-zhou¹

(1. Department of Biotechnology & Environment Science, Changsha University, Changsha 410003, China; 2. College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 3. Department of Environmental Science & Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract: A microsatellite-enriched genomic library of *Siniperca chuatsi* was constructed by using the method of FIASCO (Fast Isolation by AFLP Sequences Containing Repeats), and the microsatellite sequences and their characteristics were analyzed in this study. *Siniperca chuatsi*'s genomic DNA was digested with restriction enzyme *Mse*I, then the fragments of 200–800 bp were ligated with *Mse*I adaptors, and hybridized with biotinylated oligoprobes (AC)₈, (CT)₈, (AT)₇, (GATA)₈ and (GATT)₇. The hybrid mixture was attached to streptavidin-coated magnetic beads. After the non-SSRs fragments were removed by washing, single-stranded DNA containing the selected microsatellite DNA was collected. Then the single-stranded DNA was amplified using *Mse*I – N primers to obtain double-stranded targeted fragments. The double-stranded fragments were cloned into pGEM-T vectors and transformed into DH5α strain, and then the microsatellite-enriched library of *Siniperca chuatsi* was triumphantly constructed. One hundred clones which were 120–500 bp in size were isolated and sequenced from *Siniperca chuatsi* microsatellite libraries. Sixty clones (60%) of them contained microsatellites (GenBank Accession Number: DQ789247–DQ789306). We designed 47 pairs of SSR-primers and synthesized 21 pairs of them, 18 polymorphic microsatellite markers were screened out. The results indicate that FIASCO is a good method for enhancing the efficiency of development of microsatellite markers. These microsatellite markers are useful for genetic background analyzing and genetic linkage mapping construction of *Siniperca chuatsi*. Therefore, they provide various of candidates for comparative genome analysis, marker-assisted selection and analysis of quantitative trait loci location of *Siniperca chuatsi*. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (4): 608–614]

Key words: *Siniperca chuatsi*; microsatellite marker; enriched-library

Corresponding author: LU Shuang-qing. E-mail: lsq4250440@yahoo.com.cn