

剑尾鱼微卫星 DNA 的筛选

李霞^{1,2}, 白俊杰¹, 吴淑勤¹, 叶星¹, 劳海华¹, 简清¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室, 广东广州 510380;
2. 上海水产大学渔业学院, 上海 200090)

摘要:以剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)为材料, 经 *Mbo* I 限制性内切酶消化基因组 DNA 后, 选取 500~2 000 bp 的片段连接到经 *Bam*H I 酶切的 pUC18 载体上, 转化大肠杆菌 DH5 α 构建部分基因组文库。采用设计合成的 (AC)_n、(GT)_n 重复序列为引物, PCR 筛选部分基因组文库, 对其中 9 个重组阳性克隆进行测序, 结果共获得 24 个微卫星序列, 其中 Perfect (完美型) 13 个, 占 54.2%; Imperfect (非完美型) 3 个, 占 12.5%; Compound (混合型) 8 个, 占 33.3%。表明 (AC/GT)_n 在剑尾鱼的基因组 DNA 中含量非常丰富。同时, 根据其中 3 个克隆微卫星的侧翼序列设计引物, PCR 扩增剑尾鱼基因组 DNA, 结果均扩增到目的片段。而且, 这 3 对引物扩增出来的微卫星片段在非选育的剑尾鱼中显示出多态性, 而在近交系 19 代则表现为单态, 为剑尾鱼的实验动物化遗传研究提供了理论依据。

关键词:剑尾鱼; 微卫星; 序列

中图分类号:Q959.475 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2004)03-0196-05

剑尾鱼 (*Xiphophorus helleri* Heckel 1848) 为鳉形目、花鳉科、剑尾鱼属的小型热带淡水鱼类。具有体型小、繁殖周期短、繁殖力强、易饲养等特点, 可在实验室条件下进行纯化培养。20 世纪 80 年代起, 中国水产科学研究院珠江水产研究所开始对剑尾鱼进行实验动物化培育, 目前已近交繁殖达 21 代。生物学特性、营养与饲料、疾病及监控等方面的研究表明, 剑尾鱼在遗传学研究、水环境污染监测、细菌性疾病研究方面已初步显示出较好的应用前景^[1-2]。

目前, 微卫星作为多态 DNA 标记在群体进化研究、核基因研究、遗传连锁分析和进行基因组作图及基因定位等方面已得到广泛应用^[3-5]。同样, 微卫星也是遗传背景分析 (家系、家谱分析) 和群体遗传结构和遗传纯度分析的有效手段^[6-8]。在水产动物方面, 如对大西洋鲑 (*Salmo salar* L.)、海鲈 (*Lates calcarifer*)、鲤鱼 (*Cyprinus carpio*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、尼罗罗非鱼 (*Tilapia nilotica*)、金枪鱼 (*Thunnus thunnus*)、香鱼 (*Plecoglossus altivelis*) 等的微卫星筛选及应用进行了许多的研究工作^[3,7,9-14], 其中斑马鱼作为脊椎动物发育生物学的模式动物, 已经构建

了以微卫星为主的遗传连锁图谱。剑尾鱼实验动物化培育工作正在进行中, 欲将其作为标准实验动物应用, 就要对其遗传基础有足够的认识, 其中微卫星是比较重要的研究工具。因此本实验进行了剑尾鱼微卫星 DNA 的筛选工作, 旨在为剑尾鱼的实验动物化育种工作提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

红色剑尾鱼来自市场和珠江水产研究所培育的 19 代近交系 (RR-B 系, 红眼红体) 剑尾鱼。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶及相关试剂购自 Promega 公司或华美生物工程公司。DNA Gel Extraction Kit、Agarose Gel DNA Extraction Kit 和 Wizard DNA Purification System 分别为上海生工、ROCH 和 Promega 公司产品。引物 (AC)_n、(GT)_n 重复序列由上海生工公司合成。大肠杆菌 DH5 α 和质粒 pUC18 由本实验室保存。

1.2 剑尾鱼部分基因组文库的构建

1.2.1 剑尾鱼总 DNA 的提取和酶切 取肝脏 20

收稿日期: 2003-01-24; 修订日期: 2004-03-06。

基金项目: 国家公益研究专项资金资助项目 (34043)。

作者简介: 李霞, 女 (1977-), 硕士研究生, 研究方向为水产动物医学。E-mail: sfu-lixia@163.com

通讯作者: 吴淑勤。Tel: 020-81616813, E-mail: sqwxm@163.net

1) Wu Shuqin, Huang Zhibin, Yu Huilan, et al. Approach for the application of *Xiphophorus helleri* as experiment animal[J]. Proceeding of the Fourth Asian Fisheries Forum, 1995: 101-107.

mg,用 Wizard 基因组 DNA 提取与纯化试剂盒介绍的方法提取基因组 DNA。电泳检测 DNA 的完整性和纯度并估计其浓度。按体积比 1:1 混合 2 尾鱼的总 DNA,经 *Mbo* I 限制性内切酶部分酶切后(通过设计酶切梯度来确定酶的量),1% 琼脂糖凝胶电泳酶切产物,切下含有 500~2 000 bp 片段的凝胶,用 DNA Gel Extraction Kit 回收纯化 DNA。

1.2.2 连接与转化 质粒 pUC18 用 *Bam*H I 完全酶切后,小牛碱性磷酸酶(CIAP)去磷酸化,经 Agarose Gel DNA Extraction Kit 试剂盒纯化后,将载体与回收的目的 DNA 按 1:3 的比例连接,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,涂布于表面涂有 X-Gal 和 IPTG 的氨苄青霉素 LB 平板上,37℃ 培养过夜。

1.3 PCR 筛选含有微卫星序列的阳性克隆

重组质粒的提取参照《分子克隆》(J. Sambrook et al. 1989) 的碱裂解法。以重组质粒为模板,pUC18 多克隆位点两侧的 M13 pUC Sequencing/Reverse Sequencing Primer 和人工设计合成的重复 7 次的 (AC)₇ (GT)₇ 双核苷酸引物分别进行 PCR 扩增,即: M13S/(AC)₇、M13SR/(AC)₇、M13S/(GT)₇、M13SR/(GT)₇。25 μ L 的反应体系中含有 10 \times Buffer 2.5 μ L, Mg²⁺ 2 mmol/L, dNTPs 200 μ mol/L, 5' 和 3' 端引物各 1 pmol/ μ L, *Taq* 酶 1.5 U。PCR 反应程序为 94℃ 预变性 3 min 后进入循环体系,94℃ 变性 1 min,50℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1 min,30 个循环,最后 72℃ 延伸 7 min。将扩增产物于含有 EB (0.5 μ g/mL) 的 1% 的琼脂糖凝胶中电泳,电泳结果用 UVP 凝胶分析仪 M-20 观察并拍照存盘。

1.4 阳性克隆的序列测定及结果分析

选取含有微卫星序列的重组阳性克隆,用 Wizard DNA Purification System 的方法提取纯化质粒后,在 ABI PRISM™ 377 全自动荧光测序仪上测序,DNA 分析软件 vector NTI suite 6.0 分析找出序列中的微卫星 DNA。

1.5 设计微卫星引物 PCR 扩增剑尾鱼基因组 DNA

根据其中 3 个克隆微卫星的侧翼序列设计引物,PCR 扩增剑尾鱼基因组 DNA,引物序列及退火温度见表 2。扩增的 PCR 产物通过 10% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。

1.6 PCR 产物的序列测定

克隆 5 的引物分别扩增野生型和近交系的剑尾鱼基因组 DNA,扩增产物经 PCR Clean up Kit 纯化后,在 ABI PRISM™ 377 全自动荧光测序仪上测序。

DNA 分析软件 vector NTI suite 6.0 分析测序结果。

2 结果

(1) 通过 (AC)₇、(GT)₇ 引物对剑尾鱼的部分基因组文库的 120 个重组阳性克隆(白色菌落)的 PCR 扩增筛选,初步获得 9 个(7.5%) 含有微卫星序列的克隆。对这 9 个阳性克隆测序,结果获得 24 个微卫星序列(表 1)。其中 (GT/CA)_n 12 个,占 50%;(TC)_n 7 个,占 29%;(TA)_n 3 个,占 12.5%。根据 Weber(1990) 提出的分类标准,这些微卫星可分为 3 类,即 Perfect(完美型)、Imperfect(非完美型)和 Compound(混合型)。Perfect 指没有中断的或附近无其他重复序列的重复序列;Imperfect 指 2 个或 2 个以上的同种重复序列,被 3 个碱基以下的非重复序列所间隔;Compound 指一种重复序列与其他种类的重复序列被 3 个碱基以下的非重复序列所间隔。对本实验获得的 24 个微卫星序列进行划分,其中 Perfect 13 个占 54.2%、Imperfect 3 个占 12.5% 和 Compound 8 个占 33.3%。另外,本次筛选到的微卫星重复次数多数为 3~10 次。

(2) PCR 法筛选含有剑尾鱼微卫星序列的部分阳性克隆的电泳图见图 1,2 号克隆在 A、D 两组引物均扩增出特异带,即泳道 A2 和 D2,大小分别为 1 000 bp 和 200 bp 和用正反 M₁₃ 引物 PCR 检测到插入片段大小 1 200 bp 相符,说明 2 号克隆中含有微卫星序列。

M A1 A2 A3 B1 B2 B3 C1 C2 C3 D1 D2 D3

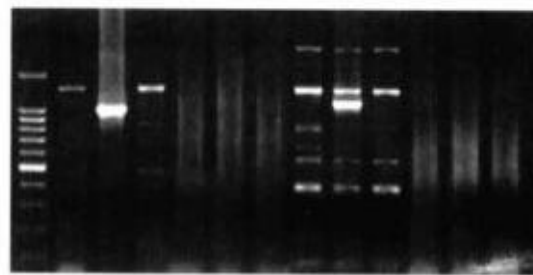


图 1 PCR 法筛选剑尾鱼微卫星序列的电泳图

A1、A2、A3 为引物 M₁₃SR/(AC)₇ 对 1-3 号克隆的扩增结果,B1、B2、B3 为引物 M₁₃SR/(GT)₇ 的扩增结果,C1、C2、C3 为引物 M₁₃S/(AC)₇ 的扩增结果,D1、D2、D3 为引物 M₁₃S/(GT)₇ 的扩增结果。

Fig. 1 Analysis of PCR products for screening clones containing microsatellites in *Xiphophorus helleri*

M: 100 bp Marker; A1 - A3: The products of Clones 1 - 3 by M₁₃ SR/(AC)₇; B1 - B3: The products of Clones 1 - 3 by M₁₃ SR/(GT)₇; C1 - C3: The products of Clones 1 - 3 by M₁₃ S/(AC)₇; D1 - D3: The products of Clones 1 - 3 by M₁₃ S/(GT)₇.

(3) 根据3个克隆的微卫星序列所设计的引物扩增剑尾鱼基因组 DNA, 均扩增到目的片段, 其大小分别为 440 bp 左右、360 bp 左右和 370 bp 左右 (表 2)。

(4) 3 对引物对非选育种和近交系 RR - B 系

19 代的扩增, 结果这 3 个微卫星在非选育剑尾鱼中显示出多态性, 而在 19 代近交系的品系则呈现单态。其中 Clone 5 引物的扩增结果及序列比较结果分析见图 2、3。

表 1 剑尾鱼微卫星 DNA 的核心序列及旁侧序列

Table 1 Microsatellites repeat motifs and 5'- and 3'- flanking sequences of *Xiphophorus helleri*

克隆编号 Clone No.	座位 Locus	5'旁侧序列 5'-Flanking sequence	核心序列 Core repeat sequence	3'旁侧序列 3'-Flanking sequence	类别 Repeat type
Clone 1	<i>Xh001</i>	Incomplete	(TC) ₃	ATTTATGTCG	Perfect
	<i>Xh002</i>	CTGACCTTCT	(AG) ₃ (GCC)(TC) ₇ CT(TC) _{4,5}	ACCCATTTTG	Compound Imperfect
	<i>Xh003</i>	CCTATTTGTA	(TCC)(T) ₄ (CTT)(TCC) ₃	ATTCAAAGCT	Compound Imperfect
	<i>Xh004</i>	TCCTTTCTGC	(CT) ₃ TG(CT)(T) ₄ (CT) ₂ GT(CT) _{2,5}	ACTCCTTCTT	Imperfect
	<i>Xh005</i>	CACGGCCACG	(CA) ₃	TGCAATTCIT	Perfect
	<i>Xh006</i>	CGGCCTGAAA	(CA) ₃ G(CA)GG(CT) _{3,5} A (CA)AA(CA)GGAA(TG) ₃	GGAATCTCCC	Compound Imperfect
Clone 2	<i>Xh007</i>	TCATTAAAA	(TA) ₂ CTG(TA) ₈ CA(TA) ₈	GTTAAAGATA	Imperfect
Clone 3	<i>Xh008</i>	TATGTCCAAT	(A) ₂ CTG(A) ₁₀ TG(TA) ₃	AGTGTAATCT	Compound Imperfect
Clone 4	<i>Xh009</i>	CGCAATACCA	(GT) ₄	Incomplete	Perfect
	<i>Xh010</i>	ACTCAATCAT	(CT)TC(CT)G(CT) ₃	GGACTCCAGT	Imperfect
Clone 5	<i>Xh011</i>	ACAAAAAGTT	(CA) ₃	TAAACATACA	Perfect
	<i>Xh012</i>	AACAAGTGA	(TCAG)(AC)(TCAG)(AC) ₄	CTGCAGTTT	Compound Perfect
	<i>Xh013</i>	TGCCAGCGGT	(A) ₄ (CAAA)AA(CAAA)A(CAAA) ₁₀	AAACTAGGCT	Compound Perfect
	<i>Xh014</i>	CAGTATAAA	(AT) _{3,5}	GAAGCAGAAA	Perfect
	<i>Xh015</i>	CCACTAGCTT	(GA) ₃	CGCCTCGATG	Perfect
	<i>Xh016</i>	TGCTCAGTGA	(CT) ₃	TFTGACAGAA	Perfect
Clone 6	<i>Xh017</i>	TGTTTCTCC	(TG) _{4,5}	CCCTGTCTCC	Perfect
	<i>Xh018</i>	AATGTCACGT	(TC) _{3,5}	GTTTAAACAC	Perfect
	<i>Xh019</i>	CTGATAAACC	(CA)A(CA) ₃	AGCCTCAACA	Perfect
Clone 7	<i>Xh020</i>	TTTGTGGGA	(T) ₁₂ A(TC) ₃ (AAAAG) ₂	TCTTACACA	Compound Perfect
	<i>Xh021</i>	TCAAAGTATC	(CA) ₈	TCCTTGTA	Perfect
	<i>Xh022</i>	ATCAGTCAGA	(CA) ₃	AATGCAAGGT	Perfect
Clone 8	<i>Xh023</i>	TACCCCTCCG	(AC) ₂ AT(AC)TC(AC)C(AC) ₄	CCTGTTTCTT	Imperfect
Clone 9	<i>Xh024</i>	TTCCACTCTT	(AC) _{3,5}	GTAGCTCTGG	Perfect

表 2 微卫星标记及其引物

Table 2 Microsatellite markers and their primers in swordtail

克隆编号 Clone No.	引物序列 Primer sequence	扩增片段大小/bp Size of amplified fragment	重复序列 Repeat sequence	退火温度/°C T _a
Clone 1	F ₁ :TCATTTATGTCGCTCCTTCG R ₁ :TTACCAGCTTCAGATCCAGG	440	(TC) ₃ ... (AG) ₃ (GCC)(TC) ₇ CT(TC) _{4,5} ... (TCC)(T) ₄ (CTT)(TCC) ₃ ... (CT) ₃ TG(CT) (T) ₄ (CT) ₃ GT(CT) _{2,5} ... (CA) ₃ ... (CA) ₃ G (CA)GG(CT) _{3,5} A(CA)AA(CA)GGAA(TG) ₃	52
Clone 2	F ₂ :TGATGTCAGATGCCACCGT R ₂ :CGCATGGCTGAATTATCTG	360	(TA) ₂ CTG(TA) ₈ CA(TA) ₈	58
Clone 5	F ₃ :GGCTACTGGCTGACAACCTGT R ₃ :AGACCGCCTAAAGTATTGC	370	(A) ₄ (CAAA)AA(CAAA)A(CAAA) ₁₀ ... (AT) _{3,5} ... (GA) ₃	58

(5) Clone 5 引物的扩增的 PCR 产物,测序得到 3 个等位基因,其大小分别为 343 bp、370 bp、385 bp (箭头所示),近交系的扩增条带单一,均为 385 bp。其序列比较结果见图 3。

可见,微卫星重复序列部分及最接近重复序列的侧翼序列的碱基变异比较大,其变异除了重复次数的差异以外,还有碱基的插入、缺失和突变等。

3 讨论

(1) 目前,多数研究是采用同位素标记的简单重复核苷酸探针杂交筛选小片段基因组文库,灵敏度较高,但因其操作对人体有一定的危害,且步骤繁琐,包括探针的合成、同位素标记、转膜和放射自显影等步骤^[13-15]。用 PCR 的方法筛选,操作简便快

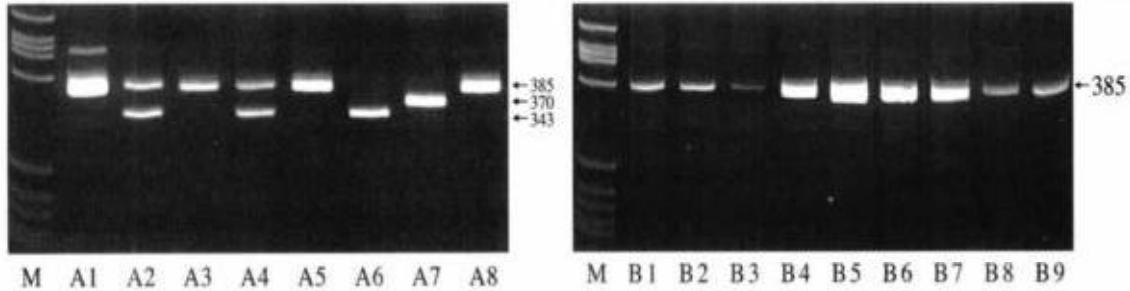


图 2 克隆 5 的引物对非选育的和 19 代近交系扩增的聚丙烯酰胺凝胶电泳图
(左:A1~A8 为非选育剑尾鱼不同个体;右:B1~B8 为 19 代近交系 RR-B 系不同个体)

Fig. 2 Analysis of PCR products for Clone 5 primers amplifying genomic DNA of swordtails

(Left: different individuals of wild swordtails; Right: different individuals of RR-B inbred strain)

M: pBR322 DNA/Hae III Marker

Allele1	(1)	TTCAACATGCTGGTAAA-----ATTACTTTANACTTGAATCTGCCAG
Allele2	(1)	-TCAACATGCTAGTAAAATTT-AAAATTACTTTACAGTA-AATCTGCCAG
Allele3	(1)	TTCAA-ATNNTNGTNA--TTACAGAATTACTTTA-ACTTGAATNTGCCAG
RR-B 近交系	(1)	TNGAN-ATGCTGGTAAAATTACTGAATTACTTTACACTTGAATCTGCCNG
Consensus	(1)	TTCAACATGCTGGTAAAATTACAGAATTACTTTACACTTGAATCTGCCAG
Allele1	(51)	TGGTAAAAAA--AACCAACAAACAAACAA----GCAACTAGNCTGAACTG
Allele2	(51)	CGGTAAAAAA-CAAAAACAAAACAAAACAAAACAAAACAAACA-AACAA
Allele3	(51)	CGGTAAAAAAACAACAACAAAACAAAACAA-AAAAANCTAGGCTGACCTG
RR-B 近交系	(51)	CGGTAAAAAAACAACAACAAAACAAAACANCAAAAANAAC TAGGCTGACCTG
Consensus	(51)	CGGTAAAAAAACAACAACAAAACAAACA AAAACAAC TAGGCTGACCTG
Allele1	(101)	TCATTTCCACAA----GATCAGC-----
Allele2	(101)	ACAAACAAACAA-----AAAAC TAGGCTGCACTGTCAT-----TG
Allele3	(101)	TCNTTTCCACAAC TTTGNTAACATATTAACAAAGTAATATGTTAATACTT
RR-B 近交系	(101)	TCNTTTCCACAAC TTTGNTAACATATTAACAAAGNAATATGTTAATACTT
Consensus	(101)	TCNTTTCCACAAC TTTGNTAACATATTAACAAAGTAATATGTTAATACTT
Allele1	(151)	-CCAGTATTAACATATTTGAAAGCAGAACGCCATTAAAATAAGCACATTA
Allele2	(151)	TCCAGTATTAATAATATAGAAGCAGAAAGCCATTAAAAAAGCACATTA
Allele3	(151)	TCAAGTATTAACATATTTGAAAGCAGAACACCATTAAAATAAGCACATTA
RR-B 近交系	(151)	TCAAGTATTAACATATTTGAAAGCAGAACACCATTAAAATAAGCACATTA
Consensus	(151)	TCCAGTATTAACATATTTGAAAGCAGAACGCCATTAAAATAAGCACATTA

图 3 克隆 5 的 PCR 产物序列比较结果

注:阴影表示相同的碱基序列

Fig. 3 Comprison of PCR sequence produced by Clone 5

Note: Shadows mean the same base sequence

捷,且没有同位素污染等特点^[16],但 PCR 方法过于灵敏,经常会出现非特异带,但可以通过改善 PCR 条件如调节退火温度来减少非特异带的产生或通过阴性克隆的对照来筛选。徐鹏等^[15]曾以菌液为模板 PCR 法筛选到中国对虾 31 个微卫星 DNA,本实验为了排除大肠杆菌基因组 DNA 的影响,以碱裂解法提取的质粒为模板 PCR 法筛选到 24 个剑尾鱼的微卫星 DNA,从而证明了此方法的可行性。

(2) 微卫星自 20 世纪 90 年代初用于分子标记以来,已经广泛应用于遗传连锁图谱的构建、种质鉴定、家系分析以及遗传疾病的诊断等方面。但在剑尾鱼的微卫星筛选及应用上,除最近 Seckinger 等^[8]从 *X. montezumae* 筛选到 10 个微卫星以外,未见有其他报道。本实验筛选到剑尾鱼 24 个微卫星,为以后用微卫星来评价剑尾鱼近交系遗传纯度打下了基础。

对鱼类的微卫星研究可知,鱼类微卫星中以 (GT/CA)_n 的数量居多,因此,本实验以重复 7 次的 (AC)(GT) 双核苷酸为引物,从剑尾鱼的部分基因组 DNA 文库中的 120 个阳性克隆中筛选到 9 个含有微卫星序列的克隆,测序得到 24 个微卫星序列中 (GT/CA)_n 12 个,占 50%,表明在剑尾鱼的基因组 DNA 中,(GT/CA)_n 的含量非常丰富。

利用其中 3 个克隆序列的核心序列及旁侧序列设计引物,扩增到了剑尾鱼多态性的等位片段,而扩增近交系 RR-B 系的结果则呈单一的一条带,李霞等^[17]曾用 RAPD 的方法证明近交系 RR-B 系的遗传纯度为 0.984 0,3 对微卫星引物对近交系的扩增结果进一步佐证了 RR-B 系的纯合度。因而这 3 个序列可以作为标记来进行剑尾鱼的遗传结构和多样性分析、种质鉴定、家系分析等方面的应用。但其具体的等位基因数目、大小及利用这些微卫星检测剑尾鱼近交系的遗传纯度等工作还有待于进一步的实验研究。

(3) 从测序得到的 Clone 5 的 3 个等位片段的序列看,除了核心重复序列 (CAAA) 的重复次数的不同外,还包括重复片段和其最近的旁侧序列的碱基的插入、缺失和突变,所以微卫星的变异机制是非常复杂的,不能单从片段的长度认为微卫星重复次数的差异是造成个体间等位基因大小不同的原因。

参考文献:

[1] 黄志斌,吴淑勤,石存斌,等. 剑尾鱼的若干生物学特性研究

[J]. 中国水产科学, 2000, 7(3):107-109.

- [2] 潘厚军,吴淑勤,李凯彬,等. 剑尾鱼在检测细菌毒力方面的应用[J]. 水产学报, 2000, 24(5):467-471.
- [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] 吴晓林,李梅,Merete Fredholm. 连续近交下家猪微卫星基因组杂合度与经济性状的相关性研究[J]. 遗传学报, 2001, 28(1):20-28.
- [5] 赵淑清,武维华. DNA 分子标记和基因定位[J]. 生物技术通报, 2000(6):1-4.
- [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; comparison of microsatellite DNA and allozyme and mitochondrial DNA variation[J]. Aquaculture, 1999, 173:459-469.
- [8] Seckinger J, Brinkmann H, Meyer A. Microsatellites in the genus *Xiphophorus*, developed in *Xiphophorus montezumae*[J]. Molecular Ecology Notes, 2002, 2(1):4-9.
- [9] 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.
- [10] Ashie T N, Daniel G B, Edward P C, et al. Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers[J]. Aquaculture, 2000, 182:73-83.
- [11] Aliah R S, Motohiro Takagi, Shi Dong, et al. Isolation and inheritance of microsatellite markers in the common carp *Cyprinus carpio*[J]. Fisheries Science, 1999, 65(2):235-239.
- [12] Motohiro Takagi, Eijiro Shoji, Nobuhiko Taniguchi. Microsatellite DNA polymorphism to reveal genetic divergence in Ayu, *Plecoglossus altivelis*[J]. Fisheries Science, 1999, 65(4):507-512.
- [13] Motohiro Takagi, Teturo Okamura, Seinen Chow, et al. PCR primers for microsatellite loci in Tuna species of the genus *Thunnus* and its application for population genetic study[J]. Fisheries Science, 1999, 65(4):571-576.
- [14] de Leon F J Garcia, Cannon M, Quillet E, et al. The application of microsatellite markers to breeding programmes in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*[J]. Aquaculture, 1998, 159:303-316.
- [15] 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.
- [16] 胡维,向华,周艳,等. 用 PCR 法直接快速筛查重组阳性克隆[J]. 生物技术通报, 1999, 15(6):39-40.
- [17] 李霞,吴淑勤,白俊杰. 剑尾鱼近交系遗传纯度的 RAPD 分析[J]. 中国实验动物学报, 2003, 11(1):15-18.

Isolation of microsatellite DNA in swordtail fish *Xiphophorus helleri*

LI Xia, BAI Jun-jie, WU Shu-qin, YE Xing, LAO Hai-hua, JIAN Qing

(1. Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fish Breeding & Cultivation, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China; 2. Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Swordtail fish (*Xiphophorus helleri* Heckel 1848) is a kind of small-scaled tropic freshwater fish which belongs to Cyprinodontiformes, Cyprinodontidae, *Xiphophorus*. Pearl River Fisheries Research Institute began to inbreed it as laboratory animal in 1987 and by now several inbred strains have been obtained. Researches on its biological character, diet and nutrition, disease and disease monitoring etc. indicate that swordtail fish is suitable for genetics, toxicology, bacteriology, malnutrition symptom study and so on. In this paper, we describe the first isolation of microsatellites from swordtail fish and their preliminary application on genetic structure analysis. A partial swordtail genomic library was constructed. Nine recombinant positive clones were isolated by screening 120 clones of the genomic library through PCR with simple tandem repeats primers (AC)₇ and (GT)₇. 24 microsatellites were obtained after these 9 positive clones were sequenced. Among the 24 microsatellites, there were 13 perfect ones (54.2%), 3 imperfect ones (12.5%) and 8 compound ones (33.3%). The results indicate that microsatellite sequences characterized by (AC/GT)_n are abundant in genomic DNA of swordtails. Three pairs of primers were designed according to three of these microsatellite-flanking sequences to amplify the genomic DNA of swordtails by PCR and the target fragments were obtained. The amplified fragments are polymorphic in wild swordtails but monomorphic in inbred strain. Furthermore, mutations in flanking sequence were also found from the alignment of the three alleles for Clone 5, which indicates that the mechanism of polymorphism of microsatellites is more complicated than what we assumed. The difference of repeating numbers of core repeat sequence may cause the polymorphism. These microsatellite sequences isolated in this study are expected to be useful as marker for genetic study of swordtails.

Key words: swordtail; microsatellite; sequence

Corresponding author: WU Shu-qin. E-mail: sqwxm@163.net

会讯——2004年水产科技论坛

2004年9月,中国水产科学研究院将在上海举办2004年水产科技论坛。此次论坛是继成功举办2003水产科技论坛后第二次举办。

本次论坛主题为设施渔业,主要包括:(1)集约化工厂化水产养殖技术及设施;(2)深海网箱养殖技术及设施;(3)人工鱼礁设施与技术。

此次论坛将邀请有关行业主管部门领导,本专业领域著名学者和知名企业代表出席。会议期间,将进行学术研讨、成果展示和产业经验交流等方面的活动,欢迎从事设施渔业装备、集约化养殖、营养饲料、病害防治及相关工作的科技人员及企业代表积极投稿并踊跃参加。

论坛论文提交、参会要求及相关事宜请登陆中国水产科学研究院网站查询,网址 <http://www.cafs.ac.cn>

中国水产科学研究院