

三角帆蚌微卫星富集文库的构建、鉴定及多态性分析

许巧情^{1,2}, 谢骏¹, 张书环³, 赵朝阳¹, 袁汉文²

(1. 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 农业部淡水鱼类遗传育种和养殖生物学重点开放实验室, 江苏 无锡 214081; 2. 长江大学 动物科学学院, 湖北 荆州 434025; 3. 中国科学院 水生生物研究所, 湖北 武汉 430072)

摘要: 通过磁珠富集法构建了三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)微卫星富集文库。共获得 800 个阳性克隆, 其中的 100 个阳性克隆经测序分析, 共获得微卫星序列 54 个。利用这些微卫星序列可设计 33 对引物, 经过 PCR 扩增筛选获得了 25 对可用引物。利用聚丙烯酰胺凝胶电泳, 对洞庭湖 1 个种群的 30 只三角帆蚌进行扩增, 发现 13 对引物呈现多态性, 等位基因数在 4~9。观测杂合度在 0.254 3~0.982 7, 期望杂合度在 0.362 9~0.821 7, 信息多态含量平均为 0.519 8。由于存在无效等位基因, 两个微卫星基因座(GenBank 登录号为 GQ302651 和 GQ302658)明显地偏离哈代-温伯格平衡, 但没有发现连锁不平衡现象。这说明利用磁珠富集法构建的三角帆蚌微卫星文库质量较好, 13 对多态性微卫星引物可为三角帆蚌微卫星连锁图谱构建、分子进化和系统发育研究、分子标记辅助育种以及经济性状的 QTL 定位提供帮助。[中国水产科学, 2010, 17(6): 1200~1207]

关键词: 三角帆蚌; 微卫星富集文库; PCR 扩增; 多态性

中图分类号: S96

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)06-1200-08

微卫星 DNA, 或简单序列重复(Simple Sequence Repeats, SSRs), 或简单序列长度多态(Simple Sequence Length Polymorphisms, SSLPs)是由 1~6 个碱基组成的短串联重复序列。微卫星位点高度丰富, 并且散布于整个真核生物基因组。微卫星 DNA 两端一般为较保守的单拷贝序列, 故可以用来设计引物, 然后经 PCR 扩增、电泳分析。因重复次数不同而显示出不同基因型个体间的长度多态性和特异性。微卫星标记具有大量可检测的变异位点、共显性遗传、符合孟德尔遗传分离规律, 并密集地分布在基因组中。因此它在群体遗传学、分子生态、家系鉴定和基因组作图等领域有广泛的应用^[1], 甚至在系统进化领域也有应用前景^[2-3]。国外对软体动物贝类微卫星的研究较多^[4-7], 而国内对贝类微卫星研究较少, 尤其是对淡水贝类微卫星研究更少, 仅见

对三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)和褶纹冠蚌(*Cristaria plicata*)微卫星开展了少量研究^[8-11]。本研究尝试用磁珠富集的方法筛选三角帆蚌微卫星分子标记, 丰富水产动物分子标记资源, 旨在为三角帆蚌养蚌育珠品系的优化, 遗传多样性检测以及遗传图谱构建等打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

用于文库构建的三角帆蚌来源于湖北省荆州市江陵区一珍珠养殖场, 共 10 只, 解剖后取三角帆蚌的外套膜, 保存于-70℃。实验所用试剂均购自 Promega 公司, 磁珠购自 NEB 公司。接头序列: *Mse*I A: 5'-TACTCAGGACTCAT-3'; *Mse*I B: 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'; *Mse*I-N 引物: 5'-GATGAGTCCTGAGTAAN-3'; 生物素标记探针: 5'-

收稿日期: 2010-04-23; 修订日期: 2010-05-06.

基金项目: 农业部淡水鱼类遗传育种和养殖生物学重点开放实验室开放基金资助项目(BZ2009-16); 湖北省教育厅科研基金资助项目(Q20081204).

作者简介: 许巧情(1976-), 女, 副教授, 主要从事分子免疫学研究. E-mail: xuqiaoqing@163.com

biotin-(AC)₁₃-3'。所用感受态为自己制作的 *E.coli* DH5 α 。实验中所用引物及探针均由上海生物工程有限公司合成。

1.2 微卫星富集文库的构建

1.2.1 基因组 DNA 的提取、酶切和接头连接 利用平衡酚-氯仿法从三角帆蚌外套膜中分离纯化基因组 DNA。取约 100 ng 基因组 DNA 放入含有 50 U 的内切酶 *Mse* I (NEB 公司) 的 eppendorf 管中进行酶切。酶切产物经 2% 的低熔点琼脂糖凝胶电泳后, 回收 200~1 000 bp 大小的片段用于文库构建。取 10 μ L 的酶切反应产物, 在 *T*₄ DNA 连接酶 (TaKaRa) 作用下与 *Mse* I AFLP 接头 (*Mse* I A 和 *Mse* I B 混合物) 进行连接反应。

1.2.2 PCR 扩增接头连接 DNA 片段 在 25 μ L 的 PCR 反应混合物中含有稀释 10 倍后的 5 μ L 酶切-连接产物、终浓度为 0.4 μ mol/L 的 *Mse*I-N 引物、1 $\times$ PCR 缓冲液 (Fermentas, 含 Mg²⁺)、0.2 μ mol/L 的 dNTP 以及 1 U 的 *Taq* 聚合酶 (Fermentas)。PCR 反应在 MJ Research PTC-100 PCR 仪上进行。反应条件为: 首先 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后在 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 53 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 进行 *n* 个循环 (先要进行 10-14-17-20-24-27-30-35 个循环以确定最佳循环数, *n*=最佳循环数), 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.2.3 用生物素标记的微卫星探针和磁珠杂交并富集微卫星序列 25 μ L 经 PCR 产物纯化试剂盒纯化后的预扩增产物与 5 μ L 浓度为 20 mmol/L 的探针 5'-biotin-(AC)₁₃-3' 杂交。杂交缓冲液为 6 $\times$ SSC+0.1% SDS, 反应总体积为 100 μ L。杂交条件为: 95 $^{\circ}$ C 下变性 5 min, 然后在 58 $^{\circ}$ C 下杂交 30 min。冷却至室温的杂交产物加入 300 μ L 的 TEN₁₀₀ (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl, pH 7.5) 溶液。混匀后置于 4 $^{\circ}$ C 保存。

将杂交反应液加入经过预处理的磁珠中, 待磁珠吸附完毕后, 用磁力架固定磁珠, 移去杂交混合液。首先进行 3 次非严谨性洗脱 (使用 TEN₁₀₀₀ (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mol/L NaCl, pH 7.5)) 于室温下洗涤 PCR 产物-生物素探针-磁珠, 再进行 3 次严谨性洗脱 (使用 0.2 $\times$ SSC+

0.1% SDS 洗涤), 每次 5 min。洗涤完毕, 加入 50 μ L TE (pH 8.0), 然后于 95 $^{\circ}$ C 下水浴 5 min。用磁力架固定磁珠后, 迅速吸出上清液, 经 DNA 纯化试剂盒纯化后用于 PCR 扩增。

取纯化后目的 DNA 洗脱片段进行 PCR 扩增, 扩增循环数选择前面 PCR 预扩增最佳的循环数, 其他条件同预扩增。PCR 产物经纯化后与 pMD18-T 载体 (Takara) 连接, 再转入 *E.coli* DH5 α 感受态中, 最后涂布在含氨苄青霉素、X-gal 和 IPTG 的 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。

1.2.4 微卫星的筛选 克隆通过 PCR 的方法筛选。PCR 反应的总体积为 12.5 μ L, 内含 1 μ L 菌液作为模板, 0.2 μ mol/L 的引物 (*Mse*I-N 引物), 0.5 U 的 *Taq* 酶, 0.1 μ mol/L 的 dNTP, 1 $\times$ PCR 缓冲液。PCR 反应为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后以 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 53 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 进行 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。阳性克隆送上海华大基因公司测序。

1.3 微卫星序列的分析和引物设计

用 Tandem Repeats Finder 软件查找重复序列^[12], 并辅以人工检查和核对。在微卫星序列上利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物。

1.4 多态性微卫星引物的筛选及分析

从洞庭湖中采集 30 只三角帆蚌, 取每只蚌的外套膜提取基因组 DNA。对 30 个模板 DNA 用 25 对可用引物分别进行 PCR 扩增, 每对引物通过改变 Mg²⁺ 浓度探索最适反应体系, 每对引物扩增的温度见表 1。PCR 扩增产物在 10% 变性聚丙烯酰胺中电泳, 然后银染, 利用 pBR322 (Tiagen) 显示微卫星条带的大小。

利用 Popgene version 1.32 检测引物的多态性^[13], 利用 Bonferroni correction 预测等位基因座是否偏离哈代-温伯格平衡, 用 Micro-checker v2.2.3 软件分析无效等位基因出现的概率^[14]。

2 结果与分析

2.1 微卫星富集文库的构建

高质量的基因组 DNA 是微卫星 DNA 文库构建的重要一步。本研究所提取的 DNA 经分光光

度计进行浓度和纯度的检测,测定结果显示 $1.8 \leq A_{260}/A_{280} \leq 2.1$, 质量浓度在 1.2~5.8 g/L, 表明 DNA 的纯度较高。琼脂糖凝胶电泳显示基因组 DNA 比较完整,证实 DNA 质量良好。

利用 *Mse* I 对基因组 DNA 进行酶切,酶切效果进行电泳检测,酶切片段的主要范围在 200~1 000 bp, 说明 DNA 已完全被酶切,可满足构建微卫星 DNA 文库的需要。PCR 预扩增特定 DNA 片段在 10、14、17、20、24、27、30 和 35 个循环后分别取样电泳,结果显示(图 1)在扩增 17 个循环后出现了一个 Smear 区域(200~750 bp)。将富集的微卫星 DNA 片段与 pMD18-T 载体连接,转化至大肠杆菌 DH5a 感受态细胞进行克隆。

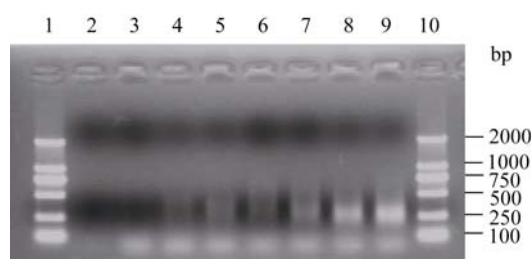


图 1 PCR 预扩增特定 DNA 片段

1、10: DL2000 Marker; 2~9: 分别为循环数为 10、14、17、20、24、27、30、35 的 PCR 扩增结果。

Fig.1 DNA Electrophoresis by different PCR cycles

1, 10: DL2000 Marker; 2~9 different PCR cycles, 2: 10 cycle, 3: 14 cycle, 4: 17 cycle, 5: 20 cycle, 6: 24 cycle, 7: 27 cycle, 8: 30 cycle, 9: 35 cycle

2.2 微卫星富集文库的鉴定

在构建的三角帆蚌微卫星富集文库中共得到 800 个阳性克隆, 取其中的 100 个送去测序。根据测序结果可知, 有 54 个克隆含有微卫星序列, 插入片段大小在 149~452 bp, 完美型有 33 个, 占 61.0%; 非完美型有 16 个, 占 29.63%; 混合型有 5 个, 占 9.27%。可见, 完美型的微卫星占大多数。在这些微卫星序列中, 重复单元除 CA/GT 外, 还观察到 CT、GA、TCAC、TACA 等重复序列。

图 2 为三角帆蚌微卫星重复次数的频率分布图, 从中可以看出, 微卫星重复次数主要集中在 11~30 次, 所占比例达 80.95%; 重复次数最高在 16~20 次, 占 38.09%; 重复次数在 30 次以上的频率为 11.09%, 最长的微卫星重复次数达 95 次。

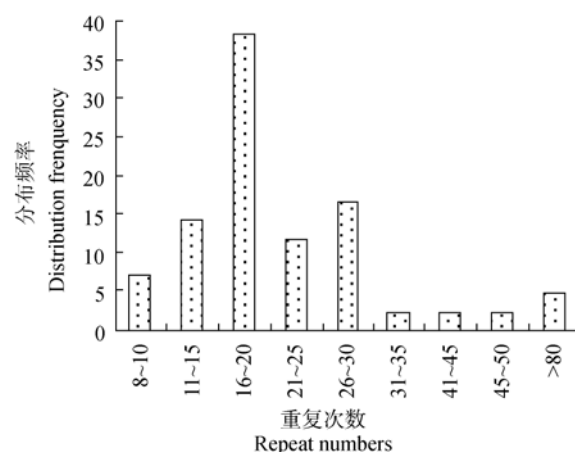


图 2 三角帆蚌微卫星重复次数的频率分布

Fig.2 Percentage of microsatellite repeat numbers in *H. cumingii*

2.3 微卫星序列及其引物特征

在 54 个微卫星序列中除去重复次数少和重复序列侧翼太短的 21 个序列无法设计外, 一共设计 33 对引物(表 1)。

2.4 微卫星多态性引物的筛选

33 对引物分别进行 PCR 优化条件扩增, 结果有些引物在 1 个种群的 30 个个体中均扩增不到特异性条带(GenBank 登录号为: GQ302635, GQ302642, GQ302650, GQ302662, GQ302667), 有些引物只在部分个体中扩增出条带(GenBank 登录号为: GQ302637、GQ302647、GQ302651、GQ302658、GQ302664), 最后从这 33 对引物中筛选出 25 对可用引物。比对分析显示: 这 25 对引物所包含的序列与 Li 等^[8]所报道的三角帆蚌微卫星序列均不相同。

利用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳从这 25 对可用引物中成功地筛选出 13 对多态性微卫星引物(表 1)。等位基因数为 4~9, 平均为 6.54, 期望杂合度在 0.362 9~0.821 7, 平均为 0.644 4; 观测杂合度在 0.254 3 到 0.982 7 之间, 平均为 0.583 9。多态信息含量平均为 0.519 8。2 个基因座(GenBank 登录号分别为 GQ302651 和 GQ302658)明显地偏离哈代-温伯格平衡, Micro-checker v2.2.3 软件发现是由于存在无效等位基因的缘故。在任何一对基因座上均未发现连锁不平衡现象。图 3 显示其中一个微卫星位点的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱。

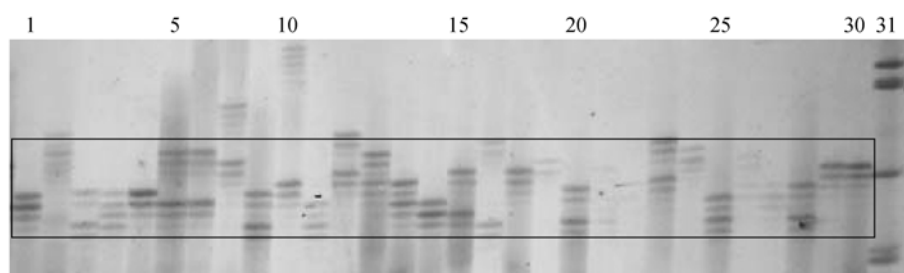


图 3 一个微卫星位点(GenBank no. GQ302641)在三角帆蚌中的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

1-30: 为 1 条微卫星多态性引物在 30 只三角帆蚌中的扩增图; 31: pBR322 DNA/Msp I; 黑色方框指示目的条带.

Fig. 3 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis patterns of microsatellite loci (GenBank no. GQ302641) in *H. cumingii*
1-30: PCR products amplified with one pair polymorphism microsatellite primers in 30 triangle mussel *Hyriopsis cumingii*;
31: pBR322 DNA/Msp I. Black box indicates the location of the aim band.

3 讨论

生物素结合磁珠富集法制备微卫星文库具有效率高、成本低、所获微卫星质量高等特点, 是一种值得推荐的微卫星制备方法。本实验采用此种方法从 100 个阳性克隆中共获得 54 个微卫星序列, 其中完美型占 61.0%, 非完美型占 29.63%, 混合型占 9.27%。这与大多数鱼类的研究结果是一致的^[15]。

每种生物基因组中均有微卫星序列, 但其重复单元存在差异。在大多数动物中微卫星重复单元主要是二核苷酸的(AC/TG)_n。例如在人类基因组中(AC)_n是最常见的微卫星重复序列。在鱼类中也是如此, 如在河鲢(*Takifugu rubripes*)、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)、鲤(*Cyprinus carpio*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、虎鲨(*Ginglymostoma cirratum*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)中 CA/GT 微卫星是最丰富的^[16-17]。而同样生活在水中的软体动物其微卫星重复单元也较多, 在 *Mytilus galloprovincialis* 基因组中发现除了大量重复单核苷酸外, (AC/TG)_n 是最丰富的微卫星重复基序, 每 429 kb 就有 1 个(AC)_{n>5} 的重复基序^[18]。在 *Alasmidonta heterodon*^[5]、*Margaritifera margaritifera*^[6]、*Mizuhopecten yessoensis*^[7]等贝类中 (CA/GT)_n 微卫星的含量也极为丰富。在已报道的三角帆蚌^[8]以及同为淡水育珠蚌的褶纹冠蚌^[11]的微卫星中同样是以(CA/GT)_n 最为丰富。因此, 本研究采用了(AC)₁₃ 寡核苷酸探针成功地筛选到了

许多微卫星序列, 达到了预期的效果。总之, 在大多数真核生物中微卫星重复单元主要是二核苷酸的(AC/TG)_n, 但在酵母和真菌基因组中二核苷酸和四核苷酸的微卫星重复单元很少^[19]。而在植物基因组中微卫星重复单元主要是以(AT)_n 为主^[20]。

本实验构建的微卫星文库, 最后设计了 33 对引物, 利用这些引物对 1 个种群的 30 个个体进行扩增, 结果显示有些引物在部分个体中, 无论如何优化实验条件均不能扩增到特异性产物, 这说明存在无效等位基因, 可能是因为微卫星引物的结合部位的点突变、插入或缺失阻碍微卫星的扩增^[17]。但这种突变在同 1 个种群中又存在差异, 一部分个体只有一部分等位基因被扩增出来, PCR 扩增出现条带, 但这种条带在聚丙烯酰胺凝胶电泳时, 实际为杂合的位点, 由于仅出现单条电泳带而呈现纯合现象, 另一部分个体则可能由于含有 2 个无效等位基因而得不到相应的扩增产物。因此在聚丙烯酰胺凝胶电泳中就筛选到 2 个基因座中出现无效等位基因, 从而导致观测杂合度与期望杂合度偏离的现象。

Ellegren^[21]研究报道真核生物中微卫星长度大多在 30 次重复以下。本研究分离到的微卫星主要分布在 16~20 个重复, 其所占比例达 38.09%, 30 次重复以下的比例为 88.91%, 最高的重复次数达 95, 这与 Ellegren^[21]分析结果一致的, 表明采用重复数为 13 的寡核苷酸探针可以分离到足够长的三角帆蚌微卫星序列。

三角帆蚌是中国特有的淡水贝类, 由于其具

有数量多、珍珠插片操作方便、育珠产量高等特征,因而成为中国培育珍珠的主要贝类。随着珍珠产业地不断发展,珍珠产量也越来越多,但珍珠质量却越来越差。另一方面,过度开发和水质的不断恶化导致自然种群的三角帆蚌种质出现退化现象^[22-24]。本研究开发的 13 对有多态性的微卫星标记为三角帆蚌进行种质鉴定、种质改良和辅助育种奠定了基础。为进一步构建三角帆蚌遗传连锁图谱、数量形状定位和标记辅助选择等方面的研究提供帮助。

参考文献:

- [1] O'Connell M, Wright M. Microsatellite DNA in fishes[J]. Rev Fish Biol Fisher, 1997, 7: 331-363.
- [2] Zhu Y, Queller D C, Strassmann J E. A phylogenetic perspective on sequence evolution in microsatellite loci[J]. J Mol Evol, 2000, 50: 324-338.
- [3] Arévalo E, Zhu Y, Carpenter J M, et al. The phylogeny of the social was subfamily Polistinae: evidence from microsatellite flanking sequences, mitochondrial COI sequence, and morphological characters[J]. BMC Evol Biol, 2004, 4: 8.
- [4] Fernando C, Montse P, Pablo P. Distribution and abundance of microsatellites in the genome of bivalves[J]. Gene, 2005, 346: 241-247.
- [5] Shaw K M, King T L, Lellis W A, et al. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Alasmidonta heterodon* (Bivalvia: Unionidae)[J]. Molec Ecol Not, 2006, 6: 365-367.
- [6] Geist J, Rottmann O, Schröer W, et al. Development of microsatellite markers for the endangered freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* L.(Bivalvia: Unionoidea)[J]. Molec Ecol Not, 2003, 3: 444-446.
- [7] Sato M, Kawamata K, Zaslavskaya N, et al. Development of microsatellite markers for Japanese scallop (*Mizuhopecten yessoensis*) and their application to a population genetic study[J]. Mar Biotechnol, 2005, 7: 713-728.
- [8] Li J L, Wang G L, Bai Z Y, et al. Ten polymorphic microsatellites from freshwater pearl mussel, *Hyriopsis cumingii*[J]. Molec Ecol Not, 2007, 7: 1357-1359.
- [9] Bai Z Y, Yin Y X, Hu S N, et al. Identification of genes involved in immune response, microsatellite, and SNP markers from expressed sequence tags generated from hemocytes of freshwater pearl mussel (*Hyriopsis cumingii*)[J]. Mar Biotechnol, 2009, 11: 520-530.
- [10] Li J L, Wang G L, Bai Z Y. Genetic diversity of freshwater pearl mussel (*Hyriopsis cumingii*) in populations from the five largest lakes in China revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR)[J]. Aquacult Int, 2009, 17: 323-330.
- [11] Jia M J, Li J L, Wang S L. Isolation and characterization of 18 polymorphic microsatellite loci from freshwater pearl mussel (*Cristaria plicata*)[J]. Conserv Genet, 2010, 11: 1131-1133.
- [12] Benson G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences[J]. Nucleic Acids Res, 1999, 27(2): 573-580.
- [13] Yeh F C, Boyle T J B. Population genetic analysis of codominant and dominant markers and quantitative traits[J]. Belgian J Botany, 1997, 129: 157.
- [14] Oosterhout C V, Hutchinson W F, Wills D P, et al. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data[J]. Molec Ecol Not, 2004, 4: 535-538.
- [15] 郝君, 孙效文, 梁利群, 等. 大黄鱼微卫星标记的富集与筛选[J]. 中国水产科学, 2006, 13(5): 762-766.
- [16] Brenner S, Elgar G, Sanford R, et al. Characterization of the pufferfish (*Fugu*) genome as a compact model vertebrate genome[J]. Nature, 1993, 366: 256-259.
- [17] 陈微, 张全启, 于海洋, 等. 牙鲆微卫星标记的筛选及群体多态性分析[J]. 中国水产科学, 2005, 12(6): 682-687.
- [18] Cruz F, Perez M, Presa P. Distribution and abundance of microsatellites in the genome of bivalves[J]. Gene, 2005, 346: 241-247.
- [19] Tóth G, Gáspári Z, Jurka J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis[J]. Genome Res, 2000, 10: 967-981.
- [20] Lagercrantz U, Ellegren H, Andersson L. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates[J]. Nucleic Acids Res, 1993, 21: 1111-1115.
- [21] Ellegren H. Microsatellite evolution: a battle between replication slippage and point mutation[J]. Trends Genet, 2002, 18: 70.
- [22] 华丹, 顾若波, 白云飞, 等. RAPD 分析野生和养殖三角帆蚌的遗传多样性[J]. 水产学报, 2003, 27(6): 540-544.
- [23] 汪桂玲, 袁一鸣, 李家乐. 中国五大湖三角帆蚌群体遗传多样性及亲缘关系的 SSR 分析[J]. 水产学报, 2007, 31(2), 152-158.
- [24] 李家乐, 钱荣华, 鲍宝龙, 等. 中国五大湖三角帆蚌群体遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 上海水产大学学报, 2005, 14(1): 1-4.

Isolation, characterization and polymorphism of microsatellite markers in triangle mussel *Hyriopsis cumingii*

XU Qiaoqing^{1,2}, XIE Jun¹, ZHANG Shuhuan³, ZHAO Chaoyang¹, YUAN Hanwen²

(1. Key Laboratory of Genetic Breeding and Aquaculture Biology of Freshwater Fishes, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Science, Wuxi 214081, China; 2. School of Animal Science, Yangtze University, Jingzhou 434025, China; 3. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: Microsatellite enriched library of *Hyriopsis cumingii* was constructed according to the strong affinity between biotin and streptavidin. Total DNA was extracted using Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), digested with restriction enzyme *Mse* I and then ligated to the adapters. The treated DNA sample was then pooled and fragments were separated on a 1.2 % agarose gel prior to size selection. The product fragments (200–1 000 bp) were excised, purified and amplified with *Mse* I-N primers. The amplified DNA was hybridized with 5'-biotinylated (CA)₁₃-3' repeat oligos. The hybrid mixture was incubated with magnetic beads coated with streptavidin. The selected DNAs were then amplified using primers designed complementary to the linkers. Cleaned products were ligated into a pMD18-T vector (TaKaRa) and transformed into DH5a competent cells. Recombinant clones were detected by PCR amplification with *Mse* I-N primers. A total of 100 clones with foreign inserts were sequenced. A total of 54 clones were screened for usable microsatellites. Of these clones, 33 were deemed unique, of sufficient length (more than 8 repeats) and possessed adequate flanking regions for primer design. Among 33 primer pairs designed, 25 yielded scorable amplification products. Thirteen polymorphic microsatellite markers were separated on 10% denaturing polyacrylamide gel and visualized by silver staining, pBR322 marker was used as standard for scoring. These loci showed high levels of genetic polymorphism testing on 30 individuals sampled from Dongting Lake of Hunan Province, China. The observed number of alleles per locus ranged from 4 to 12. The ranges of observed and expected heterozygosity were 0.167 8 to 1.000 0 and 0.362 9 to 0.849 2, respectively and the average of polymorphic information content was 0.518 2. Two microsatellite loci were significantly deviated from Hardy–Weinberg equilibrium due to the presence of null alleles and no linkage disequilibrium was found. Construction of microsatellite enriched library of triangle mussel according to the strong affinity between biotin and streptavidin was successful. These microsatellite loci will be useful for assessment of genetic diversity and population structure in *H. cumingii*. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(6): 1200–1207]

Key words: triangle mussel *Hyriopsis cumingii*; microsatellite enrichment library; PCR amplification; polymorphism

Corresponding author: XU Qiaoqing. E-mail: xuqiaoqing@163.com