

牙鲆基因组 (CAG)_n 微卫星 DNA 特征分析

王蕾^{1,2}, 刘继红^{1,2}, 张立冬¹, 孙效文²

(1. 大连水产学院 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023; 2. 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要: 通过磁珠富集法筛选牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 的微卫星分子标记, 采用限制性内切酶 *Sau* 3A I 对牙鲆完整基因组 DNA 进行酶切; 通过蔗糖溶液梯度离心, 收集 400~900 bp 大小的片段, 连接 Brown 接头, 构建牙鲆基因组文库。用生物素标记的微卫星探针 (CAG)₁₅ 对基因组文库进行杂交, 利用磁珠富集含有微卫星的 DNA 单链序列, 并对其 PCR 扩增; 将扩增产物连接到 pMD18-T 载体后转入感受态大肠杆菌 DH5 α 中, 得到微卫星序列文库。利用大量质粒检测法进行二次筛选, 成功地从牙鲆基因组中分离出含有 CAG 重复的微卫星序列, 测序其中的 3 000 个单菌落, 获得 2 805 个 (占 93.5%) 含有微卫星序列的克隆, 其中含有微卫星座位 3 120 个, 完美型 1 808 个, 占 57.97%; 非完美型 226 个, 占 7.25%; 混合型 1 085 个, 占 34.78%。从中选出 186 个微卫星序列设计 120 对引物并合成, 经过筛选, 74 对引物可扩增清晰条带, 其中 68 对呈多态性。[中国水产科学, 2009, 16 (6): 807-815]

关键词: 牙鲆; 微卫星; 磁珠富集

中图分类号: Q94

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2009)06-0807-09

牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 俗称牙片、偏口、比目鱼, 是名贵的海产鱼类, 又是中国重要的海水增殖养殖鱼类之一。它的个体硕大、肉质细嫩鲜美, 是做生鱼片的上等材料, 深受消费者的喜爱, 市场十分广阔, 经济价值很高。近年来, 随着养殖规模的不断扩大, 出现了牙鲆种质下降、易发病等问题, 采用分子手段对牙鲆展开种质鉴定和改良是保护和保存牙鲆优良性状及种质、防止生产过程中的混杂和退化、提高养殖产量的有效途径。

近些年, 国内外许多学者采用微卫星标记对野生及养殖牙鲆进行了研究, 陈微等^[1] 筛选出 8 对微卫星引物, 并对威海野生牙鲆 30 尾进行了群体多态性分析。常玉梅等^[2] 采用生物素选择杂交法与放射性同位素杂交法相结合的技术, 对牙鲆 CA/GT 微卫星标记进行了筛选, 并对 8 个人工雌核发育家系的亲本进行了遗传背景分析。刘海金等^[3] 利用微卫星

标记对 5 个牙鲆养殖群体进行了遗传多样性比较。日本学者不仅开发了大量的微卫星标记, 并将微卫星应用于群体遗传多样性分析^[4-5] 和遗传图谱的构建^[6-7]。但对于牙鲆的深入研究还远远不够, 本实验通过生物素标记的微卫星探针 (CAG)_n 开发了大量的牙鲆微卫星标记并通过质粒检测的方法对所得微卫星序列进行了二次筛选, 成功获得含有微卫星序列的阳性克隆片段, 以期对牙鲆遗传多样性、群体的遗传结构分析、亲子鉴定、遗传图谱的建立、种质资源的保护和微卫星 DNA 指纹库的建立等提供更多的工具^[8]。

1 材料与方法

1.1 实验材料

样品采自中国水产科学研究院北戴河中心实验站, 取牙鲆鳍条样品 48 尾, 保存于 -80 °C 冰箱备用。

收稿日期: 2009-04-17; 修订日期: 2009-06-29.

基金项目: 国家科技基础条件平台建设资助项目 (2005DKA30470-005).

作者简介: 王蕾 (1983-), 女, 在读硕士, 从事水产动物遗传育种研究. E-mail: zxyky2007@sina.com

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

1.2 实验方法

1.2.1 提取、纯化并酶切基因组 DNA 参照《分子克隆实验指南》从牙鲆的鳍条中提取基因组 DNA^[9], 用限制性内切酶 *Sau* 3AI (10 U/ μ L) 的酶切缓冲体系 (200 μ L) 于 37 °C 温育 5 h 后, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 酶切片段在 100 ~ 2 000 bp。不同质量浓度梯度的蔗糖溶液 (100 g/L、200 g/L、300 g/L、400 g/L) 进行离心 (22 000 r/min, 22 h), 收集 400 ~ 900 bp 目的片段。

1.2.2 接头的制备和连接 制备 Brown 接头: 等比例混合 2 组寡核苷酸链 A (5'-GATCGTCGACGGTACC GAATTCT-3') 寡核苷酸链 B (5'-GTCAAGAATTCGG TCGGTACCGTCGAC-3'), 95 °C 下变性 10 min, 经 4 h 缓慢冷却至 10 °C, 最终形成的双链接头:

5' GATCGTCGACGGTACCGAATTCT A 链
3' CAGCTGCCATGGCTTAAGAACTG B 链

建立 20 μ L 连接体系, 其中酶切片段 5 μ L, 接头 10 μ L (25 μ mol/L), T_4 DNA 连接酶 1 μ L, 10 \times Buffer 2 μ L, dNTP 0.5 μ L, 16 °C 水浴中过夜。用 PCR 纯化试剂盒去除多余接头, 终体积为 20 μ L, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 利用接头连接片段构建“基因组 PCR 文库”

取适量连有接头的 DNA 片段作为模板, 寡核苷酸链 B 为引物, 在 PE 9700PCR 仪上进行扩增, 创建基因组 PCR 文库。程序为 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 1 min, 60 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 2 个循环; 94 °C 变性 1 min, 59 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 2 个循环; 94 °C 变性 1 min, 58 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 16 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。反应完毕后, 用 PCR 纯化试剂盒去除多余的引物和过量的 dNTP 等, 并使体积浓缩到 15 μ L 左右。

1.2.4 牙鲆微卫星文库的构建

(1) 杂交 建立 50 μ L 反应体系: 生物素标记的 (CAG)₁₅ 探针 1.5 μ L (10 μ mol \cdot L⁻¹); Primer B 5 μ L (50 μ mol \cdot L⁻¹); 20 \times SSC 15 μ L; 10 % SDS 0.5 μ L; ddH₂O 16 μ L。以上混合液 64 °C 预热, 待用。12 μ L (约 300 ng) 模板 DNA, 95 °C 变性 5 min 加入以上预热的

杂交混合液, 64 °C 杂交 1 h。

用生物素标记的微卫星探针筛选牙鲆“基因组 PCR 文库”。64 °C 预热杂交液 [10 μ mol \cdot L⁻¹ 生物素标记的 (CAG)₁₅ 探针、50 μ mol \cdot L⁻¹ 引物 (寡核苷酸链 B)、6 \times SSC、0.1% SDS] 50 μ L, 将双链 DNA 片段 12 μ L (约 300 ng) 95 °C 变性 5 min 后快速加入预热杂交液中, 64 °C 杂交 1 h。利用杂交过程等待的时间进行磁珠平衡。

(2) 磁珠的平衡 将磁珠轻轻摇匀, 吸出 100 μ L 到 500 μ L 的硅化离心管中, 放在磁力架上 (MPC) 1 ~ 2 min, 吸出盐溶液。用 200 μ L B 和 W 洗液 (10 mmol \cdot L⁻¹ Tris \cdot Cl, 1 mmol \cdot L⁻¹ EDTA, 2 mol \cdot L⁻¹ NaCl) 洗涤 2 次, 再用 200 μ L 洗液 I (6 \times SSC, 0.1 % SDS) 反复洗涤平衡, 直到磁珠变得顺滑易洗脱。沿着磁珠所在的一侧加入 150 μ L 洗液 I 混匀, 室温放置待用。

(3) 磁珠吸附富集 将杂交完毕的杂交液加入已平衡好的磁珠中, 25 °C 温育 20 min, 并轻轻摇动, 使生物素和链霉亲和素结合。温育结束后, 将离心管放置到磁力架上, 去除溶液。依次用洗液 I、洗液 II (3 \times SSC, 0.1 % SDS)、洗液 III (6 \times SSC) 洗涤磁珠, 去除不含有微卫星的序列。洗涤方法是: 洗液 I 在室温洗 2 次, 每次静置 10 min; 洗液 II 在 64 °C 洗 2 次, 每次静置 15 min; 洗液 III 在室温快速洗 2 次, 即可基本将不含微卫星的序列去除干净。

(4) 洗脱含有微卫星序列的单链 DNA 用 200 μ L 0.1 \times TE 在室温快速洗 2 次, 加入 30 μ L 0.1 \times TE, 95 °C 变性 10 min, 释放出含有微卫星序列的单链 DNA, 放在磁力架上吸出备用。

1.2.5 PCR 扩增含有微卫星序列的 DNA 片段 以获得的单链 DNA 为模板, 寡核苷酸链 B 为引物进行 PCR 扩增, PCR 反应体系、程序同前。反应完毕后, 过旋离柱以去除多余的引物和没有参加反应 dNTP, 并浓缩到 15 μ L 左右。

1.2.6 连接 T-载体, 克隆 建立 10 μ L 连接反应体系: 2 \times Buffer 5 μ L, pMD 18-T vector 1 μ L (购于 Promega 公司), Insert DNA 2 μ L, T_4 DNA ligase 3U, 加无菌去离子水补足 10 μ L, 4 °C 连接过夜。用 CaCl₂ 制备的感

受态大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 进行转化, 得到微卫星基因组文库。

1.2.7 质粒二次检测微卫星标记的插入率 灭活的液体培养基 1 000 mL (蛋白胨 10 g/1 000 mL、NaCl 10 g/1 000 mL、酵母 5 g/1 000 mL), 待培养基温度达到 40 $^{\circ}$ C 时加入 2 000 μ L 氨苄, 取 1.5 mL 已灭菌的离心管, 每管加 80 μ L 的培养基, 将菌用牙签划下插入每只装有液体培养基的离心管中, 将离心管放在摇床(温度 37 $^{\circ}$ C) 上过夜, 放大转速。次日将离心管取出离心(12 000 r/min, 5 min), 然后取出倒掉每支管中的液体培养基, 在每支管中加入 30 μ L 溴芬兰、20 μ L 氯仿异戊醇、20 μ L 苯酚。剧烈震荡 4 h 左右然后再离心(12 000 r/min, 5 min), 取出液体部分, 1.5% 琼脂糖凝胶检测, 经检测插入率为 98%。

1.2.8 序列分析与 PCR 引物设计 经 2 轮筛选的阳性克隆菌挑 96 孔培养板中, 北京诺塞基因组研究中心有限公司测序, 返回序列在去除载体及接头序列后根据微卫星序列 2 端足够长的侧翼序列用 Primer3.0 软件设计引物, 引物长度为 20 bp 左右, (G+C)% 为 40%~60%, T_m 值为 55~60 $^{\circ}$ C, 产物长度 100~400 bp, 委托上海生工生物工程技术有限公司合成。

2 结果与分析

2.1 克隆及测序结果

挑选 3 000 个克隆进行测序, 成功测序 2 805 个, 微卫星含量达到 93.5%。其中(CAG/CTG)_n 42 个, 占 51.9%; (TGC)_n 14 个, 占 17.3%; (GCA)_n 12 个, 占 14.8%; (AGC)_n、(GTC)_n、(GCT)_n、(GGA)_n 等其他重复序列各自所占的比例都很小。另外在核心序列当中也出现了二碱基(TG)_n、(GA)_n、(CT)_n、(AC)_n 及四碱基(ATGG)_n、(TATC)_n、(GTCA)_n 等。在牙鲆微卫星核心序列中, 重复次数多集中在 5~25, 可以占到 95%。按照 Weber^[10] 提出微卫星的评价标准, 本实验获得的牙鲆微卫星序列中完美型(Perfect) 1 808 个, 占 57.97%; 非完美型(Imperfect) 226 个, 占 7.25%; 混合型(Compound) 1 085 个, 占 34.78%。

2.2 引物设计与扩增结果

采用 Primer Premier3.0 软件包进行引物设计, 其中有 34 个序列由于侧翼序列不完全无法设计, 共设计引物 120 对, 采用常规 PCR, 利用一个野生牙鲆群体对合成的引物进行筛选, 结果有 74 对引物可扩增出目的片段, 其中 68 对引物具有多态性(表 1) 可以用于牙鲆的遗传学分析, 其中部分引物(用 * 标示) 是用梯度形式进行筛选, 引物在高退火温度扩增 5 个循环, 然后在低退火温度扩增 27 个循环。图 1 为质粒二次筛选检测结果, 图 2 为筛选出的多态性引物 HLJYP24 在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) 群体(来自北戴河野生群体) 的扩增结果。

3 讨论

微卫星分子标记以其独特的优点, 现已被广泛应用于水产动物种质鉴定、遗传育种等领域的研究^[11-12]。微卫星的获得有很多种, 现主要通过如下 3 种途径^[13] 获得: (1) 从已知的核酸序列中进行检索, 或者根据其他物种已知微卫星的侧翼序列设计引物, 但是可检索的资源相对有限; (2) 用克隆方法建立含微卫星的基因文库, 通过杂交等方法从文库中筛选出含有微卫星序列的阳性克隆; (3) 通过测序法获得, 包括全基因组和部分基因法及转录组测序等。本实验采用的是生物素结合磁珠富集法获取微卫星, 目前已广泛应用于水产动物微卫星标记的分离^[14-15]。在实验所得到的 3 000 个阳性克隆中共获得 3 120 个微卫星位点, 其中完美型占 57.97%、非完美型占 7.25% 和混合型占 34.78%。二次筛选中, 现在广泛应用的是同位素探针筛选, 赵莹莹等^[13] 获取虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*) 微卫星时, 筛选的 192 个菌落中获得 136 个阳性克隆, 获得微卫星序列 179 个; 鲁翠云等^[16] 获得白鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*) 微卫星时, 得 149 个阳性克隆, 获得微卫星序列 138 个; 孙效文等^[17] 在制备草鱼(*Ctenopharygodon idella*) 微卫星分子标记时获得阳性克隆 132 个, 其中 86.36% 含有微卫星序列; 郝君等^[18] 在建立大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*) 微卫星文库时, 测序所得阳性克隆率为 71.9%。本实

表 1 牙鲆微卫星核心序列及其引物
Tab. 1 Microsatellites repeat motifs and their primers in *Paralichthys olivaceus*

微卫星标记 Microsatellite marker	引物序列 5'-3' Primer sequence 5'-3'	片段大小 /bp Size	重复序列 Repeat sequence	退火温度 / °C Annealing temperature	GenBank accession no.
HLJYP4	F: CGTGTTTATCATGCAGCTGGT R: GATGTGTATGAAGCCGAGCAG	140 ~ 168	(CAG) ₁₃ N (TG) ₃ N (GT) ₁₂ C (TG) ₄	55	FJ914991
HLJYP5	F: AGAGACGAATAAACGCAGCA R: ACAACCAGCTCACTGCAACA	128 ~ 156	(GCA) ₁₀	55	FJ914992
HLJYP8	F: CACATTCAAACAGCAGCAG R: CTGTGAACTCCACGTTGC	127 ~ 186	(CAG) ₁₂	60	FJ914993
HLJYP9*	F: ATCTGAAGCGGCAATAAAGC R: GTGTGAGCGGCATTAAGGT	123 ~ 210	(GCA) ₈ (GCG) ₅	64/58	FJ914994
HLJYP11	F: TAAGCGCACACAACCTCCATC R: CGGGACGAATGAGAAGAAGA	135 ~ 196	(CAG) ₇	55	FJ914995
HLJYP13	F: GGTCAGTGTGTGAGAGTATGTGC R: CAGGACATTCATTGAGCCTCTT	151 ~ 198	(GA) ₃ N (GCA) ₃ CC (GCA) ₈	60	FJ914996
HLJYP14	F: AAGTGGCAGAGCTGGTTCAT R: GGTGTTGATGGTCCCTCTGT	135 ~ 210	(GA) ₃ N (CCT) ₅ N (CT) ₈	60	FJ914997
HLJYP15	F: CTCTCTCCTGCATCCTCTGG R: TTGGGAGAAGCTTCTTCTGG	170 ~ 276	(TC) ₄ N (AC) ₂₀	55	FJ914998
HLJYP16	F: GTTTGGTGCATGTTCCCTCT R: GCCCGTTAGTTGCTGTTAGC	145 ~ 210	(TCC) ₃ N (TGC) ₇ N (GA) ₃ N (GT) ₃	55	FJ914999
HLJYP18*	F: CGCTACAGCATCGGTATCTG R: GGATCAGCTTGTGTGCTGGA	148 ~ 198	(CAG) ₁₀	59/54	FJ915000
HLJYP20*	F: TTTCACAGTACAGCCGCAAG R: CATCAGCAGGCATCTTGTGA	140 ~ 198	(TCC) ₄ N (GCT) ₈ N (ATG) ₆	64/59	FJ915001
HLJYP21	F: GCTCCTGTGGAAGGTGAAAG R: AAACCCAAGAAGACCAGCTT	135 ~ 218	(GCA) ₆	55	FJ915002
HLJYP22	F: CGTTTGTGACTGAGGACTGG R: AAGGCCGATTGTCTTAAAT	210 ~ 332	(GCA) ₇	55	FJ915003
HLJYP23	F: CATCTCAGTCCAGTGCATTTGT R: ACATACGCTCTGAAGTCCAGGT	163 ~ 210	(GCT) ₈	55	FJ915004
HLJYP24	F: AATGGCACTTAGGGTGGTTG R: CCTGACAGCTGACACGTTCT	128 ~ 310	(TG) ₂₂	55	FJ915005
HLJYP29*	F: CTGCTAGAGCCATGGGTGA R: CTGCTGTTGGCCTGACTG	214 ~ 298	(TGG) ₅ N (CAG) ₅ N (CAG) ₈	64/59	FJ915006
HLJYP30	F: CTGGTGATTCAAAGCCAACA R: TGCTCAGTGAAAAAGGGAAC	253 ~ 288	(CAG) ₈	55	FJ915007
HLJYP31	F: CTTGGAAGTTGTTTGCACCA R: AGTAGAAGTGAGCGGCTCCA	165 ~ 221	(GCA) ₅	60	FJ915008
HLJYP33	F: GTCCTCGTCCGACTTGAGGT R: TTCATTCGCTCTTCGCTGAT	156 ~ 231	(TGC) ₈ N (AT) ₆ N (CTG) ₁₂	60	FJ915009
HLJYP35*	F: CGTTGGTAAAGCAGCACTGG R: GCTGCTGCAAAAAGAACAGC	139 ~ 190	(CTG) ₇	64/59	FJ915010
HLJYP38	F: TGTGAGTCAAGCCTTGACAGG R: GTCAGAGCATGGAGGAAGGA	220 ~ 239	(TGC) ₇ N (GAG) ₉	60	FJ915011
HLJYP42	F: GCAGGCCAAAGACAAAGTGT R: TTACCGTCTTACCAGCAC	130 ~ 243	(CAG) ₇	55	FJ915012
HLJYP45*	F: CATATTCACGCCTCGTCAGA R: AGGGAGCACTCACTCCACAG	186 ~ 246	(GGA) ₁₂	64/59	FJ915013
HLJYP46	F: GCGTGACTGTTATTGCCACT R: GGACGCTGTATCTGGCACT	196 ~ 256	(AC) ₄ N (CTG) ₇ N (TG) ₃	55	FJ915014
HLJYP48	F: GTTAAACGCGAACGTGAAGGT R: CGCTCGTTTCTCAAGTCTTG	210 ~ 278	(CA) ₃ N (AGC) ₆ (AGG) ₉	55	FJ915015

接上表 Continued

HLJYP52	F: ATGTAGCCACATGCAGCAGA R: GCAGCTGCACTGAGACTGAG	165 ~ 268	(TGC) ₁₀ N (CT) ₃ N (GCT) ₄	60	FJ915016
HLJYP57	F: CTTGCTGTTGGCCTGACTG R: CTGCTAGAGCCATGGGTGA	167 ~ 256	(CTG) ₈ N (TGC) ₅	60	FJ915017
HLJYP58	F: AGACGAGTCTCCGCCTCACT R: ATGACCGTCTTCAGCTTGT	156 ~ 231	(GA) ₃ N (CAG) ₇ C (AGG) ₄	60	FJ915018
HLJYP60	F: TTTTCCACCAACACGACTGA R: CACGGGCTTCACTCTGACT	145 ~ 210	(CTG) ₇	60	FJ915019
HLJYP61*	F: TGCTCCTTCATTTCTGTCC R: TGGTCGCTACATGACCACAT	186 ~ 289	(CT) ₃ N (AGC) ₇	64/59	FJ915020
HLJYP62*	F: CTTTGGCAGCACCACAGTAA R: ACATACAATCTCCGTTTGC	156 ~ 289	(GCA) ₈ N (GC) ₃	64/55	FJ915021
HLJYP63*	F: GCTGCTGCAAAAAGAACAGC R: GCCCATCACAGCACAAATTA	215 ~ 300	(ACC) ₃ AA (CAC) ₃ N (CAA) ₂ N (CAG) ₈	64/55	FJ915022
HLJYP65*	F: CGAGATGGAGTGAACGGATT R: TCACTTGACGATCGCTATGC	210 ~ 268	(AGC) ₆	64/55	FJ915023
HLJYP66*	F: CGACTGAGGACCTGGAACAT R: TATCTGAGAGGGCTGCAGGT	145 ~ 220	(GCT) ₂₂	64/55	FJ915024
HLJYP67*	F: TACTCTTCTCTGGCGTGTCT R: CGGATTGAGTTTTCTGTTGCT	122 ~ 289	(GCA) ₁₀	64/59	FJ915025
HLJYP68*	F: AGATGGAACAGGGCTGCTG R: GAAAAGGTCTTTGGGCTGAG	256 ~ 345	(TGC) ₄ N (TGC) ₁₁ N (TGC) ₄	64/55	FJ915026
HLJYP69*	F: TGTTTTTCTCCCTGTGAGCAG R: GAGCCACAGAATCTGGGAAA	210 ~ 278	(AGC) ₇	64/59	FJ915027
HLJYP70*	F: TCGTCCCAGAAAAGTCAA R: CGGACTGGAACAGAGTACC	178 ~ 210	(TGC) ₁₃	64/55	FJ915028
HLJYP71*	F: TGCAGTAGGTGGTTGGTGAA R: CAAGCCCTCACTGTTACAGG	229 ~ 300	(AGC) ₇	64/59	FJ915029
HLJYP72*	F: TGTGAGTCAGCCTTGACAGG R: GTCAGACCATGGAGGAAGGA	217 ~ 310	(TGC) ₆	64/59	FJ915030
HLJYP73*	F: CTTGCTGTTGGCCTGACTG R: TGACGCTACAGCATCGGTAT	180 ~ 256	(CTG) ₅ N (TGC) ₇	64/59	FJ915031
HLJYP74*	F: GTCACCCATGGCTCTAGCA R: ACTTCAAGCACTGGCTCAGG	116 ~ 214	(CCA) ₅	64/59	FJ915032
HLJY P75*	F: CGGTCCAGCTTTTATGGATG R: ACAGTCAGCCGTCTCCAGTC	158 ~ 200	(ATGG) ₃ N (AGC) ₁₀	64/59	FJ915033
HLJYP76*	F: GCATGAAAAGACTTCAAGCAG R: CTCCTTACAGATACCGATGCTG	188 ~ 265	(TGG) ₅	64/59	FJ915034
HLJYP77*	F: CTGCTAGAGCCATGGGTGA R: CTTGCTGTTGGCCTGACTG	202 ~ 289	(CAG) ₁₁	64/59	FJ915035
HLJYP80*	F: TCCTTACAGTCAAGTCTCTC R: CATGGGTCGATGACACACAC	187 ~ 230	(CTG) ₇	64/59	FJ915036
HLJYP81	F: GAAGGGGAAGGACAAGTTCC R: GGGATGTCAAGGACGGTTTA	120 ~ 210	(CAG) ₁₂	60	FJ915037
HLJYP82	F: GCTCCTGTGGAAGGTGAAAG R: AAACCCAAGAAGACCAGCTT	137 ~ 289	(GCA) ₆	60	FJ915038
HLJYP83	F: AGGTCAGAATCCTGGTGGTG R: CCTGGACAGCACTGACTCAA	239 ~ 289	(AGC) ₆	55	FJ915039
HLJYP85*	F: CCAAGTTGCCTGTTCTCCTT R: CTTCAAGCAGTGGCTCAGGT	167 ~ 287	(CTG) ₁₀ N (CCA) ₅	64/55	FJ915040
HLJYP87*	F: CGGGCCAGATAAGAAGTGAG R: TGAGCCACTGGAATCTGTC	128 ~ 216	(GCA) ₁₀	64/59	FJ915041
HLJYP89*	F: AGCAGCCGGACCAAAGAT R: GGGCTCCTGTGACATGCT	157 ~ 218	(CAG) ₃ N (CAG) ₇	64/59	FJ915042

接上表 Continued

HLJYP90*	F: AGCATTACCAACACCCATT R: TGCAGGTTTCGCTACAGACA	223 ~ 310	(TGC) ₇	64/59	FJ915043
HLJYP91*	F: TGTGGAAGGTGAAAGAATGG R: AAACCCAAGAAGACCAGCTT	191 ~ 289	(GCA) ₆	64/59	FJ915044
HLJYP92*	F: CAGATGGTCGGGTCAGAATC R: AAGAGCGCCAAGAAAACATT	150 ~ 186	(CTG) ₁₂	64/59	FJ915045
HLJYP93*	F: CTTCAAGCAGTGGCTCAGGT R: GTCACCCATGGCTCTAGCA	150 ~ 178	(TGG) ₅	64/59	FJ915046
HLJYP94*	F: TGACGCTACAGCATCGGTAT R: CTTGCTGTTGGCCTGACTG	161 ~ 231	(CGA) ₇ N (CAG) ₅	64/59	FJ915047
HLJYP95*	F: GCTTAGTCATCACGCCACT R: CTGCAGCTGACTCTGTTTTCG	158 ~ 267	(GA) ₄ C (GA) ₄ GG (GA) ₄ (CAG) ₁₂	64/59	FJ915048
HLJYP98*	F: CGTTTGTGACTGAGGACTGG R: AGGCCGCATTGTCTTAAATG	173 ~ 146	(GCA) ₇	64/59	FJ915049
HLJYP99*	F: TCCCAAACACTGTGTCCACT R: ACCTGCATGGTCTGATTGTG	168 ~ 210	(TATC) ₃ N (GCA) ₆	64/59	FJ915050
HLJYP100*	F: GGGTCATTGACAAAGGAAGC R: AAGGCATTTGTGACCTCAGC	139 ~ 310	(CAG) ₂₃	64/59	FJ915051
HLJYP101*	F: CGTCCATGTCAGTCAGGTCT R: TGGATGTCTTCTGGCTCTTG	180 ~ 257	(TGC) ₈	64/59	FJ915052
HLJYP103*	F: CATGAAGATCGCAAACCTGA R: ACATGTTGGATCGCTGTTGA	211 ~ 289	(CAG) ₃ N (CAG) ₈	64/59	FJ915053
HLJYP107*	F: CACGGGTCACACAGCTTTTA R: CTCTCCTTCAGAGCCTGGTC	157 ~ 218	(GCT) ₆	64/59	FJ915054
HLJYP110*	F: CCCTAGGTCCTGCAACAGAG R: TGTGTGCCATGACTTCTCC	189 ~ 324	(CGA) ₃ N (CAG) ₆	64/59	FJ915055
HLJYP112*	F: ACTGATGGTTGCTGTTGCTG R: CAGGACCAAGGTGAGGAAAA	267 ~ 342	(TGC) ₈ N (TGC) ₇	64/59	FJ915056
HLJYP115*	F: TGTGAGTCAGCCTTGACAGG R: AGCGTGTTCCTCCTCAAAA	260 ~ 298	(CTG) ₆ N (GTCA) ₃	64/59	FJ915057
HLJYP116	F: CTGCTGAATGCCATTTCTTG R: CTATGACATCCCCCTCCACT	238 ~ 318	(GCT) ₈	60	FJ915058

注: F- 正向引物; R- 反向引物.

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

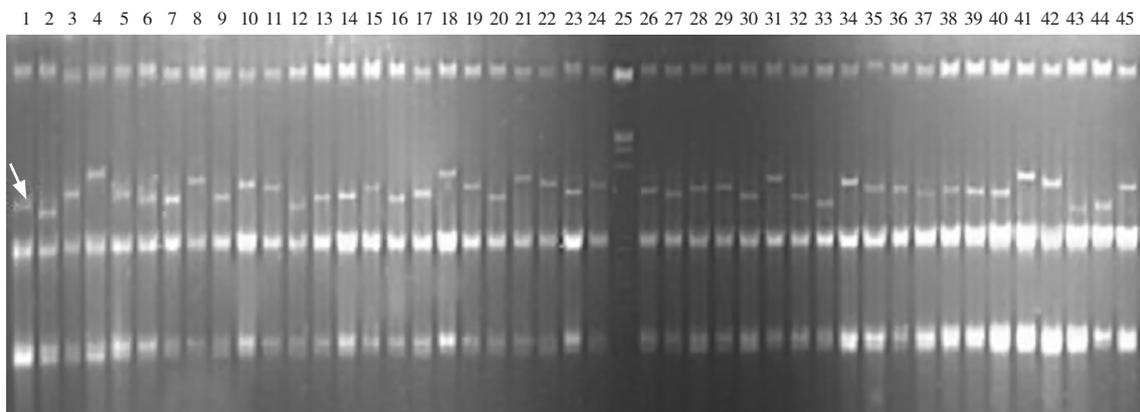


图1 牙鲆质粒二次筛选检测结果

注: 箭头所指目标电泳带为检测的含有目标片段的质粒.

1-45: 牙鲆个体.

Fig. 1 Plasmid detected in *Paralichthys olivaceus*

Note: Arrow point to the plasmid of containing targeted fragment.

1-45: *Paralichthys olivaceus* individuals.

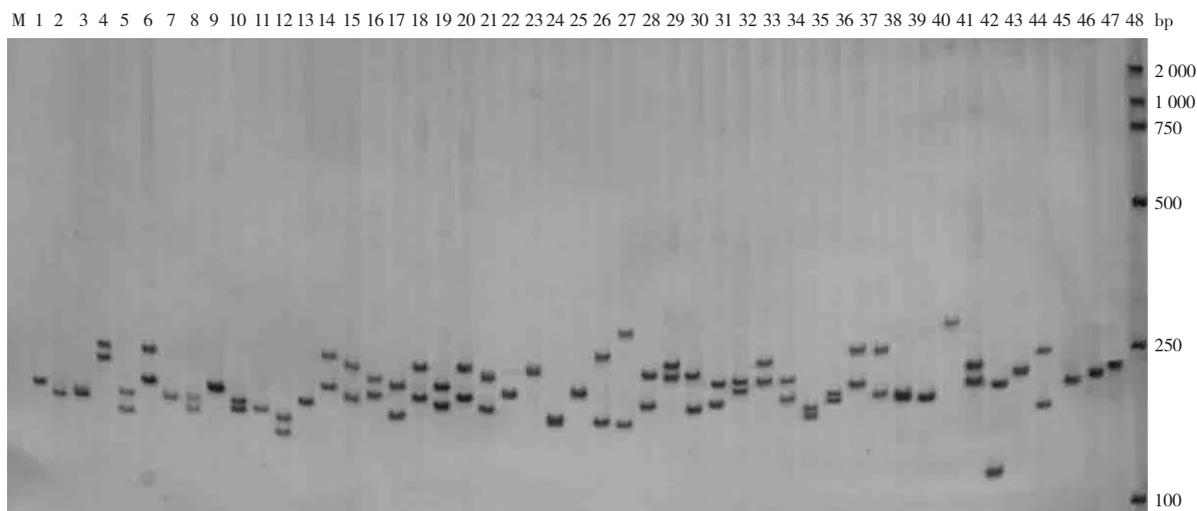


图2 引物 HLJYP24 的扩增结果

M: DNA 分子量标准 DL2000; 1-48: 48 个牙鲆个体.

Fig. 2 Amplification result of locus HLJYP24

M: DNA Marker DL2000; 1-48: 48 individuals of *Paralichthys olivaceus* population.

验使用质粒检测的方法,共获得 3 000 个克隆,其中 2 805 个为阳性克隆,阳性克隆率达到 93.5%。由此可见,由生物素结合磁珠富集法获取微卫星,最后通过质粒检测的方法进行二次筛选,可以取得同样良好的效果,而且与同位素杂交的筛选方法相比,具有效率高、成本低等特点,同时避免了同位素对环境的污染和危害身体等缺点^[19-20],是一种值得推荐的提高微卫星制备效率的方法,并可以进一步推广到其他物种微卫星标记的研究中去。

实验中影响微卫星制备效率的因素很多,其中主要包括平衡磁珠、洗液和洗涤温度控制。磁珠使用前需要用盐溶液反复平衡,一般新鲜磁珠较容易平衡,而在 4℃ 存放时间较长的磁珠不易平衡,需要反复多次,直到磁珠顺滑;另一方面,洗液的配置及洗涤温度要严格控制在,以达到清除不含微卫星序列的片段的目的。应用磁珠富集法构建微卫星文库,理论上阳性克隆率可达 100%^[21]。但实际操作当中往往达不到,本研究的阳性克隆率 93.5%,可能是在二次杂交的过程中由于操作上的某些原因,导致一些单链 DNA 没有暴露出来,因而降低了阳性克隆率。

许多研究表明,鱼类二碱基微卫星占全基因

组中微卫星总数的比例较大,而在二碱基微卫星中又以 CA/GT 和 CT/GA 的数量居多^[22-25],本次实验利用三碱基(CAG)_n 作为探针,得到(CAG)_n 和(TGC)_n、(GCA)_n、(AGC)_n、(GCT)_n、(GGA)_n 等三碱基核心序列,并得到少量的二碱基及四碱基核心序列。本研究所得完美型(Perfect)的微卫星占大多数(57.97%),这与剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)^[26]、鲤(*Cyprinus carpio*)等^[27]鱼类的微卫星情况基本一致。另外,本次实验中,核心序列的重复次数在 5~25 次之间的占到了 95%,与 Ellegren^[28] 分析微卫星的结论相似,验证了在真核生物中微卫星的核心序列重复次数大多小于 30 次。

目前,微卫星克隆技术已趋于成熟,在国内鲤^[27]、银鲫(*Carassius auratus gibelio*)^[29]、青石斑鱼(*Epinephelus merra* Bloch)^[30]、对虾(*Penaeus vannamei*)^[31-33]、扇贝^[34]等多个物种已分离出微卫星分子标记,但总体来说现有的微卫星资源还远远不能满足研究和应用的需要。本次实验克隆的是三碱基重复的微卫星序列并筛选出种类较多的核心序列,是较好的微卫星资源,经过筛选结果证明具有高度的多态性,可以用于牙鲆群体的遗传变异水平、近交衰退和性状退化等方

面的分析,通过建立分子遗传选育技术方法,为遗传育种、种质鉴定、种苗放流等提供理论依据,实现牙鲆的种质资源科学管理及持续利用,如果进一步开发牙鲆分子标记,则可以用来构建牙鲆遗传连锁图谱,这对于品种选育、种系评估都具有重要意义。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 常玉梅,孙效文,李绍武,等. 牙鲆 CA/GT 微卫星标记的筛选[J]. 动物学研究,2005,26(6): 652-656.
- [3] 刘海金,朱晓琛,孙效文,等. 牙鲆 5 个养殖群体的遗传多样性分析[J]. 中国水产科学,2008,15(1): 30-37.
- [4] Sekino M, Hrara M. Isolation and characterization microsatellite DNA loci in Japan flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Mol Ecol, 2000,9: 2201-2203.
- [5] Sekino M, Hrara M, Taniguchi N. Loss of microsatellite and mitochondrial DNA variation in hatchery strains of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Aquaculture, 2002,213: 101-122.
- [6] Coimbra M R M, Kobayashi K, Koret sugu S, et al. A genetic linkage map of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. Aquaculture, 2003,220: 203-218.
- [7] Sánchez C C, Kobayashi K, Coimbra M R M, et al. Genome mapping and genomics in fishes and aquatic Animals [M]. Heidelberg: Springer Berlin, 2008,2: 135-148.
- [8] 常玉梅,孙效文. 水产养殖动物遗传连锁图谱及 QTL 定位研究进展[J]. 动物学研究,2006,27(5): 533-540.
- [9] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W. 分子克隆试验指南: 第 3 版 [M]. 黄培堂译. 北京: 科学出版社,2002: 30-35.
- [10] Weber J L. Informativeness of human (dC-dA)_n, (dG-dT)_n, polymorphisms [J]. Genomics, 1990,7: 524-530.
- [11] Ozaki A, Sakamoto T, Khoo S, et al. Quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Mol Genet Genomics, 2001,265(1): 23-31.
- [12] O'malley K G, Sakamoto T, Danzmann R G, et al. Quantitative trait loci for spawning date and body weight in rainbow trout: testing for conserved effects across ancestrally duplicated chromosomes [J]. J Hered, 2003,94: 273-284.
- [13] 赵莹莹,朱晓琛,孙效文,等. 磁珠富集法筛选虾夷扇贝微卫星序列[J]. 中国水产科学,2006,5(13): 749-755.
- [14] 李琪,木岛明博. 长牡蛎微卫星克隆快速分离及特征分析[J]. 海洋与湖沼,2004,35(5): 364-370.
- [15] 孙效文,贾智英,魏东旺,等. 磁珠富集法与小片段克隆法筛选鲤微卫星的比较研究[J]. 中国水产科学,2005,12(2): 192-196.
- [16] 鲁翠云,孙效文,曹洁,等. 磁珠富集法筛选白鲢的微卫星分子标记[J]. 农业生物技术学报,2005,13(6): 772-776.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] Bronw J, Hardwick L J, Wright A F. A simple method for rapid isolation of microsatellites from yeast artificial chromosomes [J]. Molec Cellul Probes, 1995,9: 53-58.
- [20] Kandpal R P, 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.
- [21] Reddy O U K, Pepper A E, Abdurakhmonov I, et al. New dinucleotide and trinucleotide microsatellite marker resources for cotton research [J]. J Cott Sci, 2001,5: 103-113.
- [22] Maguire T L, Edwards K J, Saenger P, et al. Characterization and analysis of microsatellite loci in mangrove species, *Avicennia marina* (Fork.) Vierh. (Avicenniaceae) [J]. Theor Appl Genet, 2000,101: 279-285.
- [23] Brenner S, Elgar G, Sandford R, et al. Characterization of the pufferfish (*Fugu*) genome as a compact model vertebrate genome [J]. Nature, 1993,366: 256-259.
- [24] Serapion J, Kucuktas H, Feng J, et al. Bioinformatic mining of type I microsatellites from expressed sequence tags of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. Mar Biotechnol, 2004,6: 364-377.
- [25] Crooijmans R P M A, Beirbooms N A F, Komen J, et al. Microsatellite markers in common carp [J]. Animal Genetics, 1997,28: 129-132.
- [26] 李霞,白俊杰,吴淑勤,等. 剑尾鱼微卫星 DNA 的筛选[J]. 中国水产科学,2004,11(3): 197-201.
- [27] 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.
- [28] Ellegren H. Microsatellite evolution: a battle between replication slippage and point mutation [J]. Trends Genet, 2002,18: 70.
- [29] 姬长虹,孙效文. 磁珠富集法快速制备银鲫微卫星标记[J]. 大连水产学院学报,2007,6(22): 460-464.
- [30] 刘丽,刘楚吾,郭昱嵩,等. 青石斑鱼微卫星 DNA 标记的筛选及群体遗传多样性分析[J]. 中国水产科学,2008,1(15): 22-29.

- [31] 徐鹏,周岭华,相建海,等. 中国对虾微卫星 DNA 的筛选[J]. 海洋与湖沼,2001,32(3): 255-259.
- [32] 徐鹏,周岭华,相建海. 用 PCR 法快速筛选中国对虾含微卫星的重组阳性克隆[J]. 水产学报,2001,25(2): 127-130.
- [33] 徐鹏,周令华,田丽萍,等. 从中国对虾 ESTs 中筛选微卫星标记的研究[J]. 水产学报,2003,27(3): 213-218.
- [34] 李红蕾,宋林生,王玲玲,等. 栉孔扇贝 EST 中微卫星标记的筛选[J]. 高技术通讯,2003,12: 72-75.

Characterization of (CAG)_n microsatellite in *Paralichthys olivaceus* genome

WANG Lei^{1,2}, LIU Ji-hong^{1,2}, ZHANG Li-dong¹, SUN Xiao-wen²

(1. Institute of Life Science and Technology, Dalian Fisheries College, Dalian 116023, China; 2. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China)

Abstract: Magnetic beads enriched method was used to isolate microsatellite DNA from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) genome. Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) genomic DNA was extracted and then digested with restriction enzyme *Sau* 3A I. Targeted segments of 400–900 base pairs were collected by centrifugation of sucrose density gradient and a whole genome PCR library was created. This genomic DNA was hybridized with a biotin-labeled microsatellite probe (CAG)₁₅. The hybrid mixture was incubated with magnetic beads coated. After the non-microsatellite fragments were removed, the single-stranded DNA was obtained. The selected DNAs were then amplified using primers designed complementary to the linkers, cloned into the pMD18-T vector and transformed into competent *Escherichia coli* DH 5 α , and finally a microsatellite library was obtained. The second screen was performed with plasmid detected method. By isolating (CAG)_n microsatellite in Japanese flounder genomic, three thousands positive clones were obtained. From these positive clones, 2 805 microsatellite sequence clone were isolated and 3 120 microsatellite loci were obtained. From these sequences, 1 808 repeat motifs (about 57.97 %) were perfect, 226 repeat motifs (about 7.25 %) were imperfect, and 1 085 repeat motifs (about 34.78 %) were compound. This allowed us to design 120 pairs of primers from 186 microsatellite sequences with the software Primer Premier 3.0 and to compose them. As a result, 74 pairs were screened and used successfully to amplify special fragments, among which 68 pairs were polymorphism. [Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16 (6): 807–815]

Key words: *Paralichthys olivaceus*; microsatellite; enrichment by magnetic beads

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