

中华绒螯蟹微卫星单引物扩增产物的初步分析

张菁, 陆仁后, 邱涛

(中国科学院水生生物研究所, 湖北武汉 430072)

摘要:采用人工合成的6个串联重复寡聚核苷酸单引物, 以及2个加锚的二核苷酸引物, 利用SPAR和ASSR技术, 对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)基因组进行PCR扩增, 结果发现, 对于GC含量丰富的三、四核苷酸引物如(CGA)₅、(GACA)₄, 在不同退火温度的PCR反应中, 都能扩增出清晰的条带, 可以作为PCR扩增引物; 反之, GC含量<50%的(CATA)₄和(GATA)₄很难检测到扩增产物; 在基本PCR条件下, 2个加锚的二核苷酸引物能扩增出可分辨的条带, 但随着退火温度的升高, 其中部分条带消失; 对于不加锚的二核苷酸引物如(AC)₈、(GA)₈, 无论怎样改变退火温度, 终难形成清晰条带。将不同引物扩增产物分别克隆到T-Vector上, 选取其中9个阳性克隆进行序列测定, 发现在(GACA)₄引物扩增的2个片段中, 序列结构相似, 除引物序列外, 都出现了2~3个内部重复序列和高含量的AT; 其余7个片段在引物序列间都未见内部重复序列。

关键词:中华绒螯蟹; 微卫星; 扩增产物; SPAR; ASSR

中图分类号: Q78; Q959.223

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737(2002)01-0005-05

微卫星(Microsatellite)是由串联重复序列组成, 其核心序列为1~4个核苷酸。微卫星广泛分布于真核生物基因组中, 因重复单元数目不同而呈现高度多态性, 已成为非常重要的分子遗传标记之一^[1~3]。SPAR和ASSR是2种微卫星单引物扩增技术^[4,5], 这2种技术利用PCR简单的优点, 结合简单重复序列变异性好的特点, 快速简便, 因而也成为行之有效的分子标记技术。

利用微卫星分子标记技术对十足目甲壳动物进行遗传分析, 在虾类中已有少量报道^[6]。但应用SPAR和ASSR技术进行甲壳动物遗传分析, 到目前为止尚无报道, 本实验尝试利用SPAR和ASSR技术对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)进行PCR扩增, 主要探讨退火温度对扩增反应的影响, 从中选择出合适的具有稳定可靠的引物; 通过对部分扩增产物进行序列测定, 初步了解重复序列之间的序列情况, 并着重讨论(GACA)₄引物扩增片段的序列结构。

收稿日期: 2001-04-04。

基金项目: 国家“九五”攻关项目资助(96-008-01-03-05)。

作者简介: 张菁(1964-), 女, 助理研究员, 从事生物化学与分子遗传学研究。

1 材料和方法

1.1 中华绒螯蟹

1996年春季采自长江上海崇明江段, 雌、雄各10只, 平均体重20.00g。

1.2 模板的制备

取用乙醇固定的肝胰脏组织, 按谢浩^[7]方法, 抽提基因组DNA, 然后用DNA纯化试剂盒纯化。

1.3 重复序列的寡聚核苷酸引物

由加拿大Sangon生物工程公司上海分公司合成; PCR仪, 华美生物工程公司产品。引物序列见表1。PCR反应体系: 反应总体积为25 μl, 其中包括10 mmol/L Tris-Cl (pH 8.0), 50 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl₂, 0.001% gelatin, 0.2 μmol/L引物, 4种核苷酸dCTP、dGTP、dATP、dTTP各0.1 mmol/L, 模板质量浓度约20 ng/μl, 1 U Taq酶(BioStar)。PCR扩增条件基本参照Weising^[4]方法, 94℃预变性4 min, 94℃变性20 s, 退火时间60 s, 72℃延伸20 s, 40个循环, 最后在72℃延伸6 min。扩增产物在1.4%琼脂糖凝胶中电泳, 经溴化乙锭染色, 紫外检测照相。

1.4 PCR产物克隆及测序

将 $(GACA)_4$ 、 $(CGA)_3$ 、 $(AC)_8$ 、 $(GA)_8$ 引物的扩增产物进行1%琼脂糖电泳,然后将条带切割下来,经DNA纯化试剂盒纯化,分别克隆到T-载体上,并转化到DH5 α 菌中,用蓝白斑进行筛选,随机选取其中9个阳性克隆经质粒纯化试剂盒纯化质粒,用PE公司测序仪Model377测序。

表1 引物序列及退火温度

Table 1 Primer sequences and basic annealing temperature

基本单位 Basic unit	碱基序列 Primer sequence	退火温度 $t/^\circ\text{C}$ Annealing temperature
二核苷酸 Dinucleotide	$(AC)_8$ $(GA)_8$	48
三核苷酸 Trinucleotide	$(CGA)_3$	50
四核苷酸 Tetranucleotide	$(GACA)_4$	48
	$(CATA)_4$ $(GATA)_4$	40
带锚头核苷酸 Anchored-dinucleotide	$(CT)_8GG$ $GG(AC)_8$	56

2 结果与讨论

2.1 PCR 分析

首先在基本PCR条件下,用8个引物对中华绒螯蟹的雌雄个体进行PCR扩增。基本PCR退火温度按解离温度计算(表1)。结果表明,雌雄之间未出现差别,而不同引物的扩增出现3种类型的情况(图1)。对于GC含量丰富的 $(CGA)_3$ 、 $(GACA)_4$ 引物都能扩增出较清晰的条带,加锚二核苷酸引物也能扩增出条带,但条带较模糊;不加锚的二核苷酸引物扩增产物模糊不清;GC含量小于50%的 $(CATA)_4$ 、 $(GATA)_4$ 引物很难检测到扩增产物,出现这种情况的原因可能是由于引物和模板之间没有配对位点,或者即使有配对的位点,但AT含量过高,引物和模板之间结合不稳定容易过早地解离。

从理论上讲,SPAR和ASSR技术的扩增产物都应该是重复序列之间的DNA序列,但是由于两者的引物与RAPD的随机引物都是单引物,因而扩增产物可能会出现与RAPD扩增产物类似的情况。为了验证这一点,实验在保证引物量和模板量不变的情况下,以基本退火温度为基准,逐步提高退火温度。结果出现了几种情况,其中对于2组二核苷酸引物,无论怎样提高退火温度,终不能扩增出清晰的

条带(未显示),原因可能是河蟹基因组中存在高数量的二核苷酸引物结合位点,并且散布于DNA序列中。在 $(CGA)_3$ 引物中,随着温度的升高(图2),原有的600 bp条带变得不甚清晰,750 bp和1 kb的条带逐渐加强,另外在约2 kb处出现1条新的条带;温度的升高对 $(GACA)_4$ 引物扩增产物影响不大,条带相对稳定(图3, B);当退火温度提高到60 $^\circ\text{C}$ 时,对于3'端锚定引物,扩增条带全部消失,5'端锚定引物,扩增产物仍为模糊条带(图3, A)。上述结果可以说明SPAR和ASSR扩增产物可能有部分条带类似于RAPD,产生RAPD类似条带的原因也是由引物与模板产生错配引起,即在PCR第1次循环时引物与模板发生错配,在延伸过程中Taq酶允许引物和模板错配,一旦错配发生,在随后的循环中就与正常配对竞争,这样就会产生一些不稳定的条带,这些因错配产生的条带一般来说会通过提高退火温度而逐步消失^[4]。



图1 不同微卫星引物对中华绒螯蟹雌雄个体的扩增图谱

Fig. 1 Amplification from male and female individuals of *E. sinensis* by different microsatellite-primers.

M- λ DNA (*Eco*RI/*Hind*III); 1, 2-(AC) $_8$, (GA) $_8$ primer; 3(♂), 4(♀)-(CT) $_8$ GG primer; 5(♂), 6(♀)-GG(AC) $_8$ primer; 7(♂), 9(♀)-(GACA) $_4$ primer; 8-(CGA) $_3$ primer (♂); 10(♂), 11(♀)-(GATA) $_4$ primer; 12(♂), 13(♀)-(CATA) $_4$ primer.

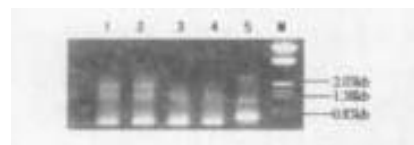


图2 退火温度对于 $(CGA)_3$ 引物扩增的影响

Fig. 2 Influence of annealing temperature on microsatellite-primer PCR products obtained from $(CGA)_3$ primer 1. 48 $^\circ\text{C}$; 2. 50 $^\circ\text{C}$; 3. 52 $^\circ\text{C}$; 4. 56 $^\circ\text{C}$; 5. 60 $^\circ\text{C}$ M- λ DNA (*Eco*RI/*Hind*III)

从以上实验可以看到,对于GC含量较丰富的3,4核苷酸引物如 $(CGA)_3$ 、 $(GACA)_4$ 在PCR扩增中相对稳定,并且扩增条带也清晰;扩增片段的长度

在 500~1 000 bp, 对于 PCR 扩增来讲也较合适, 因此可以选择这 2 个重复序列作为 PCR 扩增的引物。

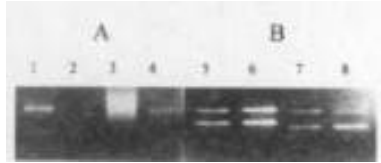


图 3 退火温度对 (GACA)₄, GG(CA)₈, (CT)₈GG 引物扩增影响

Fig. 3 Influences of annealing temperature on microsatellite-primer PCR products obtained from (GACA)₄, (CT)₈GG and GG(CA)₈ primers.

1, 3, 56 °C; 5, 6, 48 °C; 2, 4, 7, 8, 60 °C A: 1, 2 (CT)₈GG primer (♂); 3, 4 GG(CA)₈ primer (♂); B: 5, 7 (♂), 6, 8 (♀) (GACA)₄ primer

2.2 扩增产物的序列分析

本实验随机选取的 9 个阳性克隆, 经序列测定, 发现两端微卫星引物序列都是完整的。Weising 等^[4]通过对西红柿 (*A. chinensis*) 的微卫星单引物扩增产物 8 个片段的序列测定, 发现没有 1 个片段显示出有内部重复序列的存在。本实验的 9 个阳性克隆中 (表 2), 有 7 个情况与 Weising 的结果相似, 未见内部重复序列出现, 但是以 (GACA)₄ 为引物的 2 个片段, 却出现了频率相对较高的重复序列。具体序列为: 558 bp 片段中 (图 4), 在 248 bp 序列处出现了 1 个重复 8 次的三核苷酸 GAT 序列; 在引物互补序列一端与其紧密相连的是 1 个四核苷酸重复和二核苷酸重复相间隔的重复序列; 12 个 (A)₄~(A)₇ 重复序列分布在整个序列中, AT 含量为 63%。

(GACA)₄ 与 (GATA)₃ 两者的互补序列紧密相连。关于 GACA 和 GATA 重复序列最早是由 Epplen^[8] 从 *Elaphe radiata* 蛇的雌性个体中分离出来, 并被证实在蛇、老鼠等物种中是与性染色体分化相关联的, 通常表现为性染色体在分化时大量富集在异型染色体上, 但是 GACA 和 GATA 重复序列的存在, 并不代表一定与性染色体有关, 在甲壳动物等十足目的 *Asellus aquaticus* 中含有大量的 GATA 重复序列, 但经杂交和原位杂交实验证实, 这与性染色体和性分化都无关^[9]。本实验的 *E. sinensis* 雌雄个体 PCR 产物中都存在 558 bp 片段, 经测序序列也基本相同, 而且我们将 558 bp 片段标记, 与经 *Pst*I 酶切的基因组 DNA 杂交, 雌雄个体都出现了类似的阳性信号 (另文报道)。到目前为止, GACA 和 GATA 重复序列是否与中华绒螯蟹性分化有关, 还需要经过更多的杂交与原位杂交来验证。

表 2 9 个片段的序列分析结果

Table 2 Sequencing results of 9 fragments

序列长度/bp Sequence length	引物序列 Primer sequence	内部重复序列 Internal repeat sequence	AT 含量/% Content of AT
1 031	(CGA) ₅	/	50.2
1 329	(CGA) ₅	/	48.7
1 091	(CGA) ₅	/	39.3
979	(CGA) ₅	/	42.8
437	(AC) ₈	/	55.0
527	(GA) ₈	/	60.3
460	(GA) ₈	/	65.7
558	(GACA) ₄	Yes	63.0
781	(GACA) ₄	Yes	61.8

```

GACAGACAGACAGACA GAAAGGCAGAAAGACAAGCAGATAGACAGGGAAGAAAATAATGAATGAACGACTGATAATAA 80
AAGAAAAAGAAAGCAAGGAAAAATCAAAAGCAATGAAAAAGAAAAACAAAAAGAATACAAGCAAAAAATAGCAAGAT 160
GGAGTTCTCTCTCAACACAAGACAGAGAGTGGAGGACGTTGGAAAAAGCCTTGTTGGTGTGACAGTGAACGTGTAATA 240
CCCGATGATGATGATGATGATGATGATGAATTATGAAGAGGAAAAGTCACTTGAATAAAAAAGCAAAACATACATATTCAA 320
ACACTAAATCTGCATCACAACACAATCTATTTTTTTTATATATCTATCCATCAATCTCTCTGTACCTCTGTACGCAT 400
ATCTATCATATATCTATCTGATCTACTTCCTACTGACTTAATCACATACGACATATACATCTATTTCTGTGAGTTT 480
ATGTATGCTCTATATCCAGCCTTTGCGATATGTCTCCATCTATATCTATCTATCTATTTGTCGTGTCTGTCTGTC 558
  
```

—为重复序列 (Repeat sequences);

GACAGACAGACAGACA TGTCTGTCTGTCTGTC 为引物序列 (Primer sequences)

图 4 558 bp 片段核苷酸序列

Fig. 4 Nucleotide sequence of 558 bp DNA fragment

Amplification products by singly microsatellite-primed PCR in *Eriocheir sinensis*

ZHANG Jing, LU Ren-hou, QIU Tao

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: Six microsatellite-primers and two anchored dinucleotide repeat primers were used to amplify the genomic DNA sample from *Eriocheir sinensis*. At different annealing temperatures the GC-rich trinucleotide and tetranucleotide, such as (CGA)₅ and (GACA)₄, can generate distinct amplification bands, so they can be used as the PCR primers. However, when GC content < 50%, such as (CATA)₄ and (GATA)₄, the products of primers are difficult to detect. Under normal PCR condition, the two anchored-dinucleotide primers can produce distinct bands, but some of them disappear at higher annealing temperatures. For the unanchored dinucleotide such as (AV)₈ and (GA)₈, no distinct bands are produced at any annealing temperatures. When the different amplified products are cloned to T-Vector and nine positive clones are selected to determine their sequences, the sequences of the two fragments derived from (GACA)₄ primer reveal high frequency of internal repeat, while the sequences of the other seven fragments do not reveal internal repeat.

Key words: *Eriocheir sinensis*; microsatellite; amplification products; SPAR; ASSR

《中国水产科学》声明

为了加强信息交流和扩大期刊影响,本刊已于 1996 年首批加入了《中国学术期刊(光盘版)》,1998 年 12 月入网“ChinaInfo(中国信息)网络资源系统《电子期刊》”。这使我们充分利用信息交流的集团化优势,提高期刊及其作者的知名度和扩大国内国际影响有着重大意义。本刊作为光盘版的入编期刊,充分尊重作者的著作权益。在此本刊提请所有来稿作者注意,除非作者来稿时另有声明,一般均视为已同意来稿由本刊代为向《中国学术期刊(光盘版)》投稿,本刊支付的稿费中亦已包括这部分稿费。凡有不同意见将自己稿件纳入上述系统交流的作者,请事先声明。

《中国水产科学》编辑部