

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, 结合简短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, 雄、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、dTTP、dATP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/℃ Annealing temperature
二核苷酸 Dinucleotide	(AC) ₈ (GA) ₈	48
三核苷酸 Trinucleotide	(CGA) ₅	50
四核苷酸 Tetrancleotide	(GACA) ₄	48
	(CATA) ₄	40
	(GATA) ₄	
带锚头核苷酸 Anchored-dinucleotide	(CT) ₈ GG 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)₅、(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)₅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℃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-λDNA (*Eco*I/*Hind* III); 1, 2-(AC)₈, (GA)₈ primer; 3(♂), 4(♀)-(CT)₈GG primer; 5(♂), 6(♀)-GG(AC)₈ primer; 7(♂), 9(♀)-(GACA)₄ primer; 8-(CGA)₅ primer(♂); 10(♂), 11(♀)-(GATA)₄ primer; 12(♂), 13(♀)-(CATA)₄ primer.



图2 退火温度对于(CGA)₅引物扩增的影响

Fig. 2 Influence of annealing temperature on microsatellite-primer PCR products obtained from (CGA)₅ primer 1.48 ℃; 2.50 ℃; 3.52 ℃; 4.56 ℃; 5.60 ℃ M λDNA (*Eco*I/*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)₅、(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)_n-GG(CA)_m-(CT)_l-GG 引物扩增影响

Fig.3 Influences of annealing temperature on microsatellite-primer PCR products obtained from $(GACA)_{11}$, $(CT)_{11}GG$ and $GG(CA)_{11}$ 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), 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

GACAGACAGACAGACAGAAAGGCAGAAAGACAACCAGATAGACAGGAAAGAAAATAATGAATGAACGACTGATAATAA 80
AAGAAAAAAGAGAAGCAAGGAAATCAAAGCAATGAAAAAGAAAACAAAAGAATACAAGCAAAAAAATAGCAAGAT 160
GGAGTCTCTCTCAACACAAGACAGAGAAGTGGAGGACGTGGGAAAGCCTGTGTCGTACAGTGAAACGTGTAATA 240
CCCGATGATGATGATGATGATGATGATGAAATTATGAAGAGGAAAGTCACTTGAATAAAAAGCAAAACATACATATTCAA 320
ACACTAAATCTGCATCACAAACACAATCTTTTTTTATATATCTATCCATCAATCTCTCTAACCTCTACGAT 400
ATCTATCATATATCTATCTCATCTACTTCOCTACTGACTTAATCACATACGGACATATACATCTATTCTCTGTCAGTT 480
ATGTATCGTCCTATATCCAGGCTTTCGCTATATGCTCCTATCTATATCTATCTATCTATTGCTGCTGCTGCTG 558

一、为重叠序列 (Repeating 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

图 5 所示为 781 bp 核苷酸序列, 一端与引物序列紧密相连的是 1 个重复了 9 次的四核苷酸序列 (TAGG), 在 141 bp 和 444 bp 处 2 次出现 GTCA 重复序列, 重复次数分别是 7 次和 5 次, 另外在 339 bp

处还有 1 个重复 4 次的 GAGT 序列;此片段中出现 6 个(A)₄~(A)₇ 和 8 个(T)₄~(T)₇ 的重复序列, AT 含量为 61.8%。

图 5 781 bp 片段核苷酸序列

Fig.5 Nucleotide sequence of 781 bp DNA fragment

从以上 2 个片段的序列可以看到, 2 个片段的序列在结构上存在部分的相似, 即在引物序列的一端都出现 1 个与引物序列紧密相连的四核苷酸重复序列; 另外在 2 个序列中都出现了 A 或 T 碱基的串联重复现象, 且 AT 的含量超过了 50%, 分别达到了 63% 和 61.8%。Nadir^[10] 在对人基因组的研究发现, A 丰富的微卫星区是和逆转座子并排在一起的, 并认为大多数微卫星由逆转座子生成, 到目前为止还没有看到更多的资料验证这一观点。本研究中出现的 A 碱基较为丰富是否与逆转座子有关, 尚待进一步研究。

本研究经过 PCR 扩增和扩增产物的序列分析, 初步确定 $(CGA)_5$ 和 $(GACA)_4$ 可以作为微卫星单引物, 用于中华绒螯蟹基因组的 PCR 扩增; 在中华绒螯蟹中发现 GACA 和 GATA 短重复序列, 验证其与中华绒螯蟹性别分化关系的研究正在进行; GACA 重复序列间存在的相似的序列结构, 以及丰富的 AT 含量是否与基因组的功能区相关联, 我们认为有必要进行深入地研究。

参考文献：

- [1] 张艳, 张树义. 微卫星方法简介[J]. 动物学杂志, 1999, 34(2): 42-48.

- [2] 姜运良, 卫 星. 小卫星和微卫星 DNA – 真核生物基因组的串状重复序列[J]. 生命的化学, 1998, 18(3): 29 – 31.
 - [3] 季 静, 王 罂. 植物基因组分析中的分子遗传标记系统及其应用[J]. 生物化学和分子生物学动态, 1995, 1(1): 14 – 19.
 - [4] Weising K, Atkinson R G, Richard C G. Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR: a critical evaluation[J]. PCR methods Appl, 1995, 4: 249 – 255.
 - [5] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics, 1994, 20: 176 – 183.
 - [6] Wolfus G M, Garcia D K, Alcivar-Warren A. Application of the microsatellite technique for analysing genetic diversity in shrimp breeding programs[J]. Aquaculture, 1997, 152: 35 – 47.
 - [7] 谢 浩, 陆仁后, 项超美, 等. 利用 RAPD 技术对三种绒螯蟹亲缘关系的研究[J]. 水生生物学报, 1999, 23(2): 120 – 125.
 - [8] Epplen J T, McCarrey J R, Sutou S, et al. Bas sequence of a cloned snake W-chromosome DNA fragment and identification of a male specific putative mRNA in the mouse [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1982, 79: 3 798 – 3 802.
 - [9] Pelliccia F, Di Castro M, Lanza V, et al. GATA repeat in the genome of *Asellus aquaticus* (Crustacea, Isopoda) [J]. Chromosoma, 1991, 100: 152 – 156.
 - [10] Nadir E, Margalit H, Gallily T, et al. Microsatellite spreading in the human genome: Evolutionary mechanisms and structural implications [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(13): 6 470 – 6 475.

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 dinucleotid repeat primers were used to amplify the genomic DNA sample from *Eriocheir sinensis*. At different annealing temperatures the GC-rich trinucleotid and tetranucleotid, 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 dissapper at higher annealing temperatures. For the unanchored dinucleotid 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》”。这对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。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