

大黄鱼微卫星标记的富集与筛选

郝君^{1,2}, 孙效文^{1,2}, 梁利群¹, 鲁翠云¹

(1. 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 农业部北方鱼类基因工程育种试验室, 黑龙江 哈尔滨 150070; 2. 大连水产学院 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023)

摘要:根据生物素与链霉亲和素的亲和原理, 采用生物素-磁珠富集微卫星, 与传统放射性同位素杂交法相结合, 构建筛选大黄鱼的微卫星文库。用生物素-微卫星捕捉单链限制性酶切片段(含有接头和大黄鱼微卫星序列), 经PCR扩增单链目的片段形成双链, 然后连接至T载体上, 转化感受态细胞。将移至硝酸纤维素膜的重组菌用³²P标记的放射性同位素探针5'-[γ -³²P]ATP(CA)₁₅筛选出阳性克隆菌。测序结果发现, 阳性克隆率为71.9%, 105个微卫星位点。其中选取设计合成30对并筛选出22对可用引物。说明所建大黄鱼微卫星文库是一个高质量的文库, 可为大黄鱼基因组结构分析、大黄鱼精密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定位提供大量的微卫星标记。[中国水产科学, 2006, 13(5): 762-766]

关键词:大黄鱼; 微卫星; 磁珠; 生物素

中图分类号: Q959.483 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2006)05-0762-05

由于酷渔滥捕和环境污染, 从20世纪80年代起大黄鱼 [*Pseudosciaena crocea* (Richardson); large yellow croaker] 资源严重枯竭。现存大黄鱼多为人工养殖。连续几代的人工繁殖和养殖导致大黄鱼的经济性状出现了明显的退化, 急需进行遗传改良^[1]。采用分子标记辅助育种, 可以改良大黄鱼种质, 实现良种化养殖, 提高其养殖产量与经济效益。迄今, 已有全成干等^[1-2]报道了大黄鱼养殖群体9种同工酶多态性方面的研究, 王军等^[3]报道了官井洋大黄鱼遗传多样性的RAPD分析, 王志勇等^[4]报道了福建官井洋大黄鱼ALFP指纹多态性研究, 但关于大黄鱼微卫星标记方面的研究未见报道。

微卫星均匀分布于基因组中, 并具有多态性丰富、遵循孟德尔分离定律、共显性遗传、易于PCR扩增等特点, 目前已广泛应用于各种生物资源的家系分析、基因连锁分析、遗传图谱构建、遗传多样性分析等许多研究领域^[5-6]。传统制备微卫星是采用直接杂交筛选法, 即将内切酶处理后的DNA片段重组入质粒载体中, 建立小片段基因组文库, 再用含重复序列的寡核苷酸探针筛选克隆。该方法存在效率低、成本高的缺点, 对于那些基因组中含有量不是

很丰富的微卫星序列, 用此方法进行分离很困难。由于构建精密微卫星连锁图谱, 开展基因连锁分析需要大量的微卫星标记, 因此迫切需要开发容易获得大量阳性克隆的微卫星高效分离方法。用生物素结合磁珠富集法克隆微卫星效率高、成本低, 所获微卫星质量高, 是一种值得推荐的微卫星制备方法^[7]。本实验采用生物素-磁珠富集法筛选大黄鱼的CA重复微卫星序列, 可为大黄鱼基因组结构分析、大黄鱼精密微卫星连锁图谱构建、分子进化和系统发育研究等提供参考。

1 材料与方法

1.1 大黄鱼DNA的提取

大黄鱼采集自福建省宁德市官井洋海区, 随机选取2尾养殖个体用于引物筛选。参照《分子克隆实验指南》^[8]中的方法提取基因组DNA。

1.2 引物合成

1.2.1 接头序列 实验室所用接头为Brow接头A序列为5'-GATCGTCGACGGTACCGAATTCT3', B序列为5'-GTCAAGAATTCTGGTACCGTCGAC3'。

1.2.2 生物素标记探针 微卫星寡核苷酸探针

收稿日期: 2005-07-29; 修订日期: 2005-11-14。

基金项目: 国家重大基础研究计划项目(2004CB117405)。

作者简介: 郝君(1980-), 女, 硕士研究生, 从事水产动物基因组研究。Tel: 0451-84842646; E-mail: junao1980@sina.com.cn

通讯作者: 孙效文。E-mail: xsws@2002@163.com

(CA)₁₅均由上海生物工程有限公司合成。

1.3 菌株载体

实验用菌株 *E. coli* DH5α 由本实验室自行保存,载体 pGEM-T 购自 Promega 公司。

1.4 药品

T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司;生物素磁珠购自 Dynal Biotech ASA 公司;磁力架购自 Promega 公司;100 kD 旋离柱购自 Pall 公司;硝酸纤维素膜购自 Promega 公司。

1.5 微卫星富集与筛选^[8-9]

约 4 μg 大黄鱼的 DNA 样品,用限制性内切酶 *Sau*3AI 部分酶切,得酶切片段 250~1 000 bp。经蔗糖密度梯度离心,分离出 400~900 bp 大小的片段,透析,乙醇沉淀回收。

将碱基互补的寡核苷酸 A (5' GATCGTC-GACGGTACCGAATTCT3') 和磷酸化的寡核苷酸 B (5' GTCAAGAATTCGGTACCGTCGAC3') 等摩尔混合,95 ℃ 变性 10 min,然后缓慢降温至 10 ℃,此过程大约需要 4 h,最终形成双链接头 A/B。在 20 μL 的反应体系中加入 4 μL 酶切回收片段,10 μL 接头,2 μL T4 DNA 连接酶和 2 μL T4 DNA 连接酶 buffer,16 ℃ 连接过夜。

使用 100 kD 旋离柱去除多余的接头,并浓缩反应液至 10 μL 左右,取 2 μL 接头连接产物作为模板,进行 25 μL 体系,10 个循环的第一次 PCR 反应。寡核苷酸 B 为引物,复性温度 58 ℃ 适用于以后所有的 PCR 反应。

PCR 产物与生物素标记的微卫星探针进行杂交,富集和捕获微卫星标记:(1)95 ℃ 预变性带有接头,PCR 扩增的基因组片段 5 min;(2)基因组片段与生物素标记探针 5' - Biotin - ATAGAATAT (CA)₁₅ 于 68 ℃ 预杂交 1 h;(3)预先用 6×SSC 平衡好的包裹有链霉亲和素的磁珠在 25 ℃ 捕获探针-目标片段 20 min,静置磁力架上去除液体;(4)洗涤磁珠以减少非特异性杂交,洗涤过程包括:6×SSC,0.1% SDS 室温洗涤 2 次,每次 10 min;预热的 3×

SSC,0.1% SDS 于 68 ℃ 洗涤 2 次,每次 15 min;6×SSC 于室温快速洗涤 2 次或 2 次以上;0.1×TE 于室温洗涤 2 次;(5)最后通过 95 ℃ 变性 10 min,用 0.1×TE (30~50 μL) 洗脱单链微卫星序列。

取 5 μL 单链微卫星序列作为模板,进行第二次 PCR 扩增,反应条件同第一次 PCR 扩增。过柱浓缩 PCR 产物并 1% 琼脂糖电泳检测。约 100 ng PCR 产物与 TA 克隆载体 pGEM-T 连接,并转化到自制的感受态 *E. coli*。随即选取 10 个菌落作 PCR 初步检测,得阳性克隆率为 40%。重组菌转至硝酸纤维素膜,³²P 标记的放射性同位素探针 5' - [γ-³²P]ATP (CA)₁₅, 进行第 2 轮杂交。筛选出阳性克隆菌落,送至北京诺塞基因组研究中心有限公司测序,测序所得序列用 Premier Primer 5.0 软件包进行引物设计。

2 结果

2.1 微卫星文库中含有微卫星的序列

微卫星文库中选取 146 个克隆测序得 105 微卫星序列,这些微卫星序列占测序数的 71.9% (表 1)。其中 (GT/CA)_n 102 个,占 97.14%; (CT)_n 1 个,占 0.95%; (GAA)_n 2 个,占 1.91%。根据 Weber^[10] 提出的分类标准,这些微卫星可分为:完美型 (74.29%)、非完美型 (24.76%) 和复合完美型 (0.95%)。核心序列重复数低于 10 次的仅占 12.38% (表 2)。

表 1 大黄鱼不同核心类型微卫星的比例

Tab.1 various repeat motif of microsatellite in large yellow croaker

微卫星类型 Type	数量 Number	百分比/% Percentage ratio
perfect(CA) _n	78	74.28
Imperfect(CA) _n	24	22.86
Perfect(CT) _n	1	0.95
Imperfect(GAA) _n	2	1.91
Total	105	100

表 2 大黄鱼微卫星各种类型重复序列的比例

Tab.2 Percentage of various repeat sequence type of microsatellite in large yellow croaker

项目 Item	完美型 Perfect repeats	非完美型 Imperfect repeats	复合完美型 Compound repeats	重复数 Repeat numbers						
				5-10	10-20	20-30	30-40	40-50	>50	
数量 Number	78	26	1	13	28	26	14	11	13	
百分比/% Percentage	74.29	24.76	0.95	12.38	26.67	24.76	13.33	10.47	12.38	

2.2 微卫星引物设计及初步筛选

105个微卫星位点设计出80对引物,选取30对引物并合成。经PCR优化筛选得22对可用引物(图1、表3)。

3 讨论

微卫星分子标记以其独特的优点和特点被广泛应用于水产动物种质鉴定、遗传育种等领域的研究。获得微卫星的方法有多种,如检索 GenBank、EMBL



图1 引物 DH-2、DH-10、DH-16 的筛选图

注:1,2,样本;3,对照

Fig.1 The selection of primer DH-2, DH-10, DH-16

Note: 1, 2, sample; 3, Blank control

表3 大黄鱼30个微卫星序列

Tab.3 characteristics of 30 microsatellite loci in large yellow croaker

编号 Number	温度/℃ T	重复序列 Repeats	引物序列 motif Primer sequence(5' - 3')	产物长度/bp Product size
HLJ DH-1	55	(CA) ₃₄	F: AACAGACACTACAAAGACCCAA R: TACCCAGTAACAGTGAAGGATT	169
HLJ DH-2	50	(TG) ₁₅	F: CATTTGTCTAAGTCTCCGTG R: GAGCCGTTAATTTTGTGG	232
HLJ DH-3	46.5	(TG) ₁₄	F: TATGCTTCAAATTCAAACA R: CACAGATGCGTAAGGAGA	181
HLJ DH-6	50	(CA) ₂₅	F: CACGCAAAACCGCTAAAGT R: GGAAGGGAGAATGGAACG	157
HLJ DH-7	45	(GT) ₁₅	F: CTCTGGATTTTCTTTTGG R: AGGCATAAACTCTGGAT	131
HLJ DH-8	45	(TG) ₄₁	F: CACTGGCACTCCCACTTA R: CGGTGTCAAGCATTCTTG	183
HLJ DH-9	46.5	(CA) ₇₂	F: AACTACAATGCACCACAG R: TATCATCCCAACCACTTA	265
HLJ DH-10	45	(CA) ₃₀	F: ACAGGAACGGAGGATAAT R: CGAGTGGAGCAGTGAATA	259
HLJ DH-12	45	(CA) ₂₉	F: TTCTTTTCTCTCTACTTT R: AACCACTCTCTGGACTG	281
HLJ DH-14	45	(GT) ₃₀	F: AAACCTGCAACTGACAC R: CCACTCCGTCAGGTAAAG	136
HLJ DH-15	50	(CA) ₂₀	F: GAAGTGTGCTCTGGTAA R: CAATGCTGTAAGATGAAAT	262
HLJ DH-16	45	(CAA) ₆	F: CCCCATTCCAGTCTCAAC R: TGTGTTCACTCAGCCAC	223
HLJ DH-17	50	(CA) ₁₉	F: CTCACCTCACCGACATAG R: ACGATCAGAAGGCAACAC	245
HLJ DH-18	50	(AC) ₃₃	F: AATCACATCAGTCAGGGC R: GCAGTATTTGTTGCAGGG	173
HLJ DH-19	50	(CA) ₆₈	F: ATGCTTAGGCTTTACAA R: AGTCAAAGGTTTCCATC	263
HLJ DH-20	50	(AC) ₂₇	F: TCCCTCTTTTCTATCTCAC R: ACTCACTGTCTTTTTCAC	126
HLJ DH-21	50	(TG) ₁₃	F: TGTAGAGGAAACGAGCGTA R: CGATCAGCAAACCTGTCATA	188
HLJ DH-22	50	(CA) ₂₇	F: TACAGAACCTCAGGAACA R: AACAAACCGCACAGATAAG	143
HLJ DH-23	50	(CA) ₁₈	F: TCTGATAGCGGCTGAAAT R: CACTCCGTGACATACC	147
HLJ DH-24	50	(CA) ₃₄	F: CATGCGATTCTCTTCCA R: TTTACACCATCCGAGCTAG	197
HLJ DH-27	45	(TG) ₁₀	F: ATCATTGAGGGAAAGAAAC R: GAATACAGAGCGAGGTAA	144
HLJ DH-29	50	(AC) ₂₀	F: TTTAGGAATGGAAGTACC R: GAGCGTCAATCATAATGT	178

等数据库或者利用亲缘性比较近的物种的微卫星等。但要获得大量的微卫星还应采用构建富含微卫星序列的基因组文库的方法。本实验采用的是生物素结合磁珠富集法获取微卫星,与经典的小片段DNA克隆库,用末端标记的 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 的CA重复序列为探针筛选的方法相比具有效率高、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^[7]。本次实验中,146个阳性克隆中获得105个微卫星位点,其中完美型占74.29%、非完美型占24.76%和复合完美型占0.95%。核心序列重复数低于10次的只占12.38%,这与李明芳等^[11]所得结论不一致,可能与实验操作有关。

已有研究认为,鱼类微卫星的核心序列以(CA)_n、GT)_n数量居多,故本次实验使用(CA)₁₅探针进行富集微卫星。从大黄鱼的微卫星文库中的146个阳性克隆中得到105个微卫星位点。其中(GT/CA)_n102个,说明大黄鱼基因组中富含以(GT/CA)_n为核心的微卫星。此外,在大黄鱼微卫星序列中,完美型78个,占74.29%;非完美型26个,占24.76%;复合完美型1个,占0.95%。非完美型所占比例较低与其他养殖动物相一致^[12],究其原因,(1)可能是养殖环境单一,选择方向单一化,减少了碱基替换、错配合不等交换的几率,使得遗传多样性降低;(2)可能是抽样的数目还不足以反映微卫星的分布情况。

许多养殖动物利用微卫星标记进行种质鉴定、种质改良和辅助育种等已取得良好的效果^[12-16]。大黄鱼是目前中国养殖最多的海水鱼类之一,由于开始没有注意定向选育,导致抗病力减弱等种质退化现象的出现。借助微卫星进行标记辅助选择将具有很广阔的应用前景。本次实验筛选出的22对大黄鱼微卫星引物,为以后辅助改良鱼种奠定了基础。实验结果表明,该方法构建的微卫星富集文库质量很高,可以大规模测序筛选大黄鱼微卫星,用于构建大黄鱼的遗传连锁图谱、数量性状定位和标记辅助选择等方面的研究。

致谢:集美大学水产学院王志勇教授提供的大黄鱼样品,全迎春、佟广晋同学在实验中给与帮助谨表致谢!

参考文献:

- [1] 王 军,全成干,苏永全,等.官井洋野生与养殖大黄鱼同工酶的研究[J].海洋与科学,2001,25(6):39-41.
- [2] 全成干,王 军,丁少雄,等.大黄鱼养殖群体遗传多样性的同工酶[J].厦门大学学报(自然科学版),1999,38(4):584-587.
- [3] 王 军,全成干,苏永全,等.大黄鱼群体遗传多样性的RAPD分析[J].海洋学报,2001,23(3):87-91.
- [4] 王志勇,王艺磊,林利民,等.福建官井洋大黄鱼 AFLP 指纹多态性的研究[J].中国水产科学,2002,9(3):198-201.
- [5] 李 琪,木岛明博.长牡蛎微卫星克隆快速分离及特性分析[J].海洋与湖沼,2004,35(4):364-370.
- [6] 杜长城,孙孝文,楼允东,等.微卫星在水产动物种质资源研究方面的应用[J].水产学杂志,2000,13(1):68-73.
- [7] 孙放文,贾智英,魏东旺,等.磁珠富集法与小片段克隆法筛选微卫星的比较研究[J].中国水产科学,2005,12(2):126-132.
- [8] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W.分子克隆实验指南(第3版)[M].北京:科学出版社,2002.8.
- [9] 曹翠云,孙放文,梁利群.鳊鱼微卫星分子标记的筛选[J].中国水产科学,2005,12(2):192-196.
- [10] Weber J L. Informativeness of human (dC-dA)_n-(dG-dA)_n polymorphisms[J]. Genomics,1990,7:524-530.
- [11] 李明芳,郑学勤.开发 SSR 引物方法之研究动态[J].遗传,2004,26(5):769-776.
- [12] 李齐发,赵兴波,罗晓琳,等.牦牛基因组微卫星富集文库的构建与分析[J].遗传学报,2004,31(5):489-494.
- [13] 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):196-201.
- [14] 曹 阳,金海国,臧延青,等.5个微卫星座位在肉牛群体中的遗传变异分析[J].吉林农业大学学报,2003,25(5):563-567.
- [15] Yong Zhu, Monica Landi, Queller, et al. Polymorphic microsatellite loci for primitively eusocial Stenogastrine wasps[J]. Molecular Ecology, 2000, 9: 2155-2234.
- [16] Nicolas Juillet, Hervé Freymond, Loïc Degen, et al. Isolation and characterization of highly polymorphic microsatellite loci in the bladder carpion, *Silene vulgaris* (Caryophyllaceae)[J]. Molecular Ecology Notes, 2003, 3: 358-359.

Enrichment of large yellow croaker genome microsatellite markers using magnet beads

HAO Jun^{1,2}, SUN Xiao-wen^{1,2}, LIANG Li-qun¹, LU Cui-yun¹

(1. Key Laboratory of Bioengineering Breeding of Northern Finfish, Ministry of Agriculture, Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Harbin 150070, China; 2. College of Aquaculture Science and Technology, Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China)

Abstract: Microsatellite, as a kind of molecular markers, have many advantages in construction of genetic linkage map, QTLs analysis, kinship identification and so on. This study reports the isolation and characterization of 22 microsatellite markers from large yellow croaker. Construction the first microsatellite-enriched library of large yellow croaker according to the strong affinity between biotin and streptavidin was carried out. A biotin-labelled (CA)₁₅ oligonucleotide probe was used to enrich for homologous sequences. The library was screened for microsatellite repeats with 5' - [γ - ³²P] ATP (CA)₁₅ using standard hybridization and wash conditions. Of 146 positive clones identified, 105 were sequenced. Among 105 clones containing microsatellite arrays, 30 unique clones with sequences of suitable length of flanking regions were selected for primer design. Among 30 primer pairs designed, 8 failed to amplify and 22 yielded scorable amplification products. The results showed that this method is very efficient to isolate microsatellite markers. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(5): 762 - 766]

Key words: large yellow croaker; microsatellite; magnetic beads; biotin

2007年《水产科学》征订启事

《水产科学》杂志是由辽宁省水产学会主办的水产科技期刊,1982年创刊,国内外发行。是中文水产、渔业类核心期刊和全国农业系统优秀期刊之一。现已被美国《化学文摘》、《剑桥科学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、英国《动物学记录》、《国际农业与生物科学研究中心》、中国科学引文(遴选)数据库、中国学术期刊综合评价数据库、《中国学术期刊(光盘版)》、中国期刊网和万方数字化期刊群、中文科技期刊数据库、台湾华艺数据库、中国生物学数据库收录。杂志主要刊载渔业资源、海淡水捕捞、水产养殖与增殖、水产生物病害及防治、水产饲料与营养、水产品保鲜与加工综合利用、渔船、渔业机械与仪器及水产基础科学等方面研究的新进展、新技术、新方法等。设有研究与应用、综述与专论、建议与探讨、渔业信息等栏目。读者对象为水产科技工作者,大中专院校水产、生物、环保等专业师生,渔业行政、事业和企业单位有关管理和技术人员及广大知识渔民。

本刊为月刊, A4开本, 56页, 每月25日出版, 定价5.00元/期, 全年60.00元。邮发代号8-164。

地 址: 大连市沙河口区黑石礁街50号 辽宁省海洋水产科学研究院

《水产科学》编辑部

邮政编码: 116023

电 话: (0411) 84679512

传 真: (0411) 84671027

E-mail: shchlxjb@yaho. com. cn