

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00194

三疣梭子蟹微卫星富集文库的构建与群体遗传分析

李晓萍^{1,2}, 刘萍², 宋协法¹

1. 中国海洋大学, 山东 青岛 266003;

2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071

摘要: 采用富集文库-菌落原位杂交法分离了 30 个三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)的微卫星标记。三疣梭子蟹基因组 DNA 经 *Hae*III 酶切连接后, 用固定了(AC)₁₅ 和(AG)₁₅ 探针的尼龙膜(Hybond N⁺)捕捉含有微卫星的片段, 转化至大肠杆菌 DH5α 中, 构建三疣梭子蟹微卫星富集文库。菌落原位杂交后, 任意选取 150 个克隆进行测序, 阳性克隆率为 85.48%。利用软件设计了 105 对微卫星引物, 筛选到稳定扩增标记 56 对, 采用 30 个三疣梭子蟹个体进行多样性评价, 30 个位点均表现出多态性。观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)及多态性信息含量(PIC)的范围分别为 0.222 2~1.000 0、0.436 7~0.909 9 和 0.350~0.892。本研究筛选的微卫星位点将为下一步三疣梭子蟹遗传多样性分析、家系分析、遗传图谱构建和 QTL 定位等研究提供基础依据。[中国水产科学, 2011, 18(1): 194–201]

关键词: 三疣梭子蟹; 富集文库; 菌落原位杂交; 微卫星标记; 遗传多样性

中图分类号: S917

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)01-0194-08

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)广泛分布于中国北至辽东半岛、山东半岛, 南到广东、广西的各海区, 以及日本、朝鲜、马来西亚群岛等水域^[1-2], 是中国重要的海水养殖对象^[3]。但目前, 三疣梭子蟹养殖业的蟹苗主要依赖于野生资源, 几乎没有经过人工选育。近年来随着三疣梭子蟹养殖规模的不断扩大, 集约化程度不断提高, 各种病害接踵而至, 给产业和区域经济发展造成重大损失^[4-6]。同时由于环境恶化和过度捕捞导致野生资源急剧下降, 因此迫切需要开展三疣梭子蟹的遗传育种工作。

遗传标记是遗传育种研究的重要手段, 因此开发特异性良好的遗传标记尤为必要, 微卫星标记由于具有多种优点成为开发的首选。目前国内学者已开发了中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)^[7-8]、远海梭子蟹(*Portunus pelagicus*)^[9]、锯缘

青蟹(*Scylla serrata*)^[10]、蛛雪蟹(*Chionoecetes opilio*)^[11]、邓杰内斯蟹(*Cancer magister*)^[12]、青蟹(*Scylla paramamosain*)^[13]等经济蟹类的微卫星标记, 关于三疣梭子蟹微卫星的研究仅见于宋来鹏等^[14]和王建平^[15]的报道, 目前处于初级研究阶段。本研究采用富集文库-菌落原位杂交法对三疣梭子蟹微卫星位点进行筛选, 开发了 30 个微卫星标记, 并估算了这些位点的主要遗传学参数, 为后继大量开发三疣梭子蟹微卫星标记提供了一种可行性方法, 同时为开展其群体遗传多样性分析、遗传连锁图谱的构建和 QTL 定位奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料及基因组 DNA 的提取

所用三疣梭子蟹样品于 2005 年取自辽宁省丹东鸭绿江口的野生群体, 共 30 只, 取其大螯,

收稿日期: 2010-01-18; 修订日期: 2010-03-24.

基金项目: 国家 863 高技术研究发展计划项目(2006AA10A406); 国家自然科学基金项目(30871933, 40806067); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2008-ts-11).

作者简介: 李晓萍(1983-)女, 硕士, 主要从事海洋生物种质资源与遗传多样性研究. E-mail: lxp0532lx@163.com

通讯作者: 刘萍, 研究员. E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

-80℃保存。基因组 DNA 提取的主要方法参照 Liu 等^[16]的方法, DNA 溶于无菌水中, 琼脂糖检测及核酸定量仪定量后, -20℃保存备用。

1.2 三疣梭子蟹微卫星富集文库的构建

实验方法主要参照 Karagyozev 等^[17]、Edwards 等^[18]和战爱斌等^[19]的方法, 在 DNA 的酶切回收连接、杂交、洗脱温度和克隆的筛选等步骤做了相应的调整和优化。

1.2.1 DNA 的酶切、回收及连接 取 100 μg 基因组 DNA, 利用限制性内切酶 *Hae*III 在 37℃ 培养箱内酶切 4 h, 1% 琼脂糖电泳检测后, 采用天根琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收 400~1 200 bp 大小的片段用于文库构建。建立 20 μL 的连接反应体系, 采用 T₄DNA 连接酶, 人工接头为 21-mer 单链短核苷酸: 5'-CTCTTGCTTGAATTCGGACTA-3' 和 5'端磷酸化的 25-mer 单链短核苷酸: 5'-pTAG TCCGAATTCAAGCAAGAGCACACA-3' 经退火形成, 16℃ 下反应过夜。

1.2.2 尼龙膜的制备及预杂交 探针 (AG)₁₅ 和 (AC)₁₅ 由上海生工生物工程技术有限公司合成, 取浓度为 100 μmol/L 的 2 种探针各 1 μL, 点在直径约为 5 mm 的尼龙膜 (Hybond N⁺, Amersham 公司) 上, 空气中晾干后于 80℃ 烘烤 2 h 固定探针以备用。将固定好探针的 Hybond N⁺ 膜放在杂交液 [50% (V/V) 的去离子甲酰胺、7% (W/V) 的 SDS、5×SSC、50 mmol/L 的磷酸三钠 (pH 7.0)] 中 37℃ 预杂交 48 h, 不时晃动, 之后将膜在 1% 的 SDS 中沸水浴 10 min, 洗脱未与膜结合牢固的探针。

1.2.3 尼龙膜的杂交和洗膜 富集好的 PCR 产物沸水浴 5 min, 迅速插至冰面变性, 和预杂交好的 Hybond N⁺ 膜一同加到 500 μL 杂交液中, 37℃ 杂交 24 h。洗膜采用如下方法: 500 μL 的 2×SSC, 1% SDS (W/V) 洗脱液在 60℃ 下洗脱 2 次, 每次 15 min; 500 μL 的 2×SSC, 1% SDS (W/V) 洗脱液在 65℃ 下水浴 30 min; 500 μL 的 0.5×SSC, 1% SDS (W/V) 洗脱液在 90℃ 下水浴 20 min。将膜取出, 在洗脱液中加入 50 μL 的 7.5 mol/L NH₄Ac、600 μL 的异丙醇和 3 μL 的胎贝糖原, 放入 -20℃ 沉淀 30 min, 4℃ 13 000 r/min 离心 10 min, 70% 乙醇洗

涤 2 次, 晾干溶于 20 μL 无菌水中。

1.2.4 连接与转化 建立 40 μL 的恢复 PCR 反应体系, 以 10 μL 的洗脱 DNA 为模板, PCR 反应程序为: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 45 s, 55℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 25 个循环; 72℃ 延伸 35 min。取 4 μL PCR 产物电泳检测, 观察产物是否集中于 500~1 500 bp。将载体和 PCR 产物按照 1:3 比例 (摩尔比) 混合于 10 μL T₄ 连接酶的反应体系中, 16℃ 过夜, 克隆到 PMD18-T 载体 (Takara) 中。次日将所有连接产物转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中, 均匀涂布在氨苄青霉素 LB 平板上, 37℃ 培养 10~14 h, 建立微卫星富集文库。

1.3 菌落原位杂交

1.3.1 菌落重排及转膜 将平板背面画成十字小格, 用灭菌牙签挑取生长良好的单个菌落接种于新固体培养基上, 37℃ 培养 5~6 h, 将每个平板转印至 1 张硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上, 并做好相应的方位标记。NC 膜在变性液 (0.5 mol/L NaOH, 1.5 mol/L NaCl) 中变性 7 min, 滤纸上晾干 10 min; 在中和液 (0.5 mol/L Tris-HCl, pH 7.2; 1.5 mol/L NaCl; 1 mol/L EDTA, pH 8.0) 中处理 2 次, 每次 5 min, 最后将 NC 膜在 120℃ 下烘烤 30 min。

1.3.2 NC 膜的杂交及洗膜 杂交系统采用 Roche 公司的 DIG Luminescent Detection Kit 试剂盒, 将合成的探针 (AC)₁₅ 和 (AG)₁₅ 按照试剂盒上的说明进行地高辛标定。将烘烤好的 NC 膜放入含 10 mL Hyb 高效杂交液的杂交袋中, 37℃ 预杂交 30 min, 去除杂交液, 再加入 10 mL Hyb 高效杂交液和地高辛标记的探针 (5~10 ng/mL), 37℃ 振荡杂交过夜。将杂交过夜的 NC 膜置于 2×SSC, 0.1% SDS 洗脱液中室温振荡洗脱 2 次, 每次 5 min; 在含有 0.5×SSC, 0.1% SDS 的洗脱液中 37℃ 水浴振荡洗脱 2 次, 每次 15 min。

1.3.3 液体封阻、信号检测与筛选 NC 膜的液体封阻和信号检测等按照试剂盒提供的方法进行处理, 暗室中压上 X-胶片, 暗盒中感光 1 h 后, 进行显影和定影处理。按照原先标定的方位, 将 X-胶片、NC 膜、平板三者进行对照, 在平板上做出标记并在杂交阳性信号的相应位置上挑出阳性克隆,

37℃摇菌过夜,甘油保种,送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.4 引物设计与多态性分析

序列测定后,去除载体序列,利用 Vector NTI Suite 8.0 软件包中的 Contig Express 程序去除冗余序列。根据引物设计原则,利用软件 Primer Premier 5.0 进行 PCR 引物的设计。

从 30 个三疣梭子蟹个体中随机选取 5 个个体的基因组 DNA 等量混合,取 100 ng 混合 DNA 作为模板进行初步筛选,2%琼脂糖电泳检测后,根据梯度 PCR 结果确定各引物的最佳退火温度,选取有目的片段的引物进行多态性筛选,再将优化好的微卫星位点用于 30 个个体的扩增及检测。所用 PCR 反应体系为 25 μ L,包括 10 $\times$ PCR buffer、2.0 mmol/L Mg^{2+} 、0.2 mmol/L dNTP、0.8 μ mol/L 引物、1 U *Taq* DNA 聚合酶。PCR 程序为:94℃预变性 5 min;94℃变性 40 s,退火 1 min,72℃延伸 1 min,25 个循环;72℃延伸 5 min,4℃保存,各引物退火温度见表 1。PCR 扩增产物用 8%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测(图 1),银染法进行显色、定影,待凝胶干燥后对每个微卫星位点的等位基因数目进行统计。采用 Popgene 32 version 1.31 和 Genepop V4 软件进行数据处理,完成观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)和多态性信息含量(PIC)的计算。多态性信息含量参照 Botstein 等^[20]的方法:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^m P_i^2 - \sum_{i=1}^{m-1} \sum_{j=i+1}^m P_i^2 P_j^2$$

式中: P_i 、 P_j 分别为群体中第 i 个和第 j 个等位基因频率, m 为等位基因数。

多态位点杂合度观测值 H_o 为杂合子观察数与样本含量之比。

多态位点杂合度期望值 $H_e = 1 - \sum P_i^2$ 式中 P_i 为该位点上第 i 个等位基因的频率。

2 结果与分析

2.1 三疣梭子蟹微卫星克隆与测序结果

经杂交筛选和检测显影后,随机选取 10 个菌落进行 PCR 检测,插入片段都在 400~1 200 bp 之间。从中随机选取 150 个克隆进行测序,得到 124

条序列,其中 18 个克隆的核心序列重复数太少或不含有重复序列,106 个含重复序列的克隆中均只含有微卫星位点,阳性克隆率为 85.48%。利用 Vector NTI Suite 8.0 中的 Contig Express 程序去除冗余部分,得到 103 个独立克隆序列,共 176 个微卫星位点,GenBank 注册号为 GQ466018-GQ466043 和 GU177130-GU177207,部分序列见表 1。

2.2 引物设计及 PCR 优化结果

利用 Primer Premier 5.0 对所得微卫星位点进行引物设计,共设计了 105 对微卫星引物。经过 PCR 反应条件优化,筛选到稳定扩增标记 56 对。对 30 个野生三疣梭子蟹个体进行多态性评价,结果显示 30 个位点表现出多态性(表 1)。

2.3 多态性检测

统计 30 个位点等位基因数共获得了 238 个等位基因,平均每个位点扩增得到 8.0 个等位基因。不同引物获得的等位基因数差异较大,从 3 至 13 个不等,其中 *PTR6b*、*PTR8a*、*PTR33a*、*PTR81* 这 4 个位点分别获得了 11、11、10、13 个等位基因,而 *PTR103b* 和 *PTR131* 这 2 个位点分别只获得了 4 个和 3 个等位基因。多态信息含量在 0.350~0.892 之间,有 28 个位点的 PIC 值高于 0.5,显示出高度多态性;只有 *PTR103b* 和 *PTR131* 2 个位点的 PIC 值介于 0.25 到 0.5 之间,显示中度多态性,同时多态性的高低反映在期望杂合度与观测杂合度的差异上。

3 讨论

对于大多数物种,在开始开展微卫星研究前首先需要分离微卫星序列,开发特异性扩增引物。目前,在蟹类中微卫星分离方法主要有经典法(routine protocols)、杂交选择法(hybridization selection)和 FIASCO 法^[21]。传统经典方法是将内切酶处理后的 DNA 片段重组入质粒载体,建立小插入片段基因组文库,但相关研究表明经典方法的阳性克隆率很低,如英国学者 Hanfling 等^[22]分离中华绒螯蟹微卫星,从 1 728 个克隆里得到 87 个阳性克隆,阳性克隆率为 5.03%,筛选出 12 个微卫星位点。杂交选择法是目前在海洋水产动

表 1 三疣梭子蟹 30 个微卫星标记的基本特征及主要遗传学参数
Tab. 1 Characterization of 30 novel microsatellite markers for *Portunus trituberculatus*

位点名称 locus name	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	退火温度/°C anneal. temp.	核心重复序列 core repeat	等位基因 数目 allele no.	等位基因 大小范围/bp allele size range	P 值 P value	PIC	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	注册号 access. no.
<i>PTR5b</i>	F:CTCCCATGCTTCTCCC R:TCCACGCCCTAGTATCCC	55.0	(CCT) ₅ ...(TC) ₂₃ ...(CT) ₁₆	8	224–283	0.0484	0.680	0.6333	0.7288	GQ466018
<i>PTR6b</i>	F:CAGGCCAACCTCTAAATT R:TTCGGCATCACTCTTCTC	56.4	(AC) ₃₃ ...(CA) ₁₁	11	241–366	0.2490	0.796	0.7333	0.8260	GQ466019
<i>PTR8a</i>	F:AAGGACAGACCGAGGAT R:TTCAGGGCATAAACAAGG	55.5	(TG) ₂₂ ...(GT) ₂₁	11	202–233	0.0095	0.783	0.6333	0.8198	GQ466021
<i>PTR10</i>	F:TGGTGTATGCGCAACT R:CAAACGAAGGGTTAATGT	54.4	(TC) ₁₄ (TG) ₃₅ ...(GT) ₃₀ (TG) ₁₄	8	195–245	0.0016*	0.735	0.4333	0.7785	GQ466023
<i>PTR16a</i>	F:TTGCGGAAGTAAATAACG R:TGACGGAGATCGGTTGTG	53.4	(CA) ₂₃ ...(AC) ₁₉ ...(AG) ₂₁	9	112–154	0.0000*	0.745	0.3000	0.7915	GQ466024
<i>PTR23b</i>	F:AGAGGAGGAGGTATAAGGA R:TGAGCGTGCTAACCCTA	56.0	(AG) ₁₄ ...(CA) ₃₀ ...(CA) ₇	8	209–234	0.0770	0.744	0.7000	0.7910	GQ466025
<i>PTR30</i>	F:CCATTCTGCTTGTCTTC R:TCTTACCCATTACGGAGC	58.7	(AC) ₁₁ (AC) ₂₈	7	246–367	0.0183	0.767	0.7000	0.8068	GQ466028
<i>PTR33a</i>	F:ACAACGCCAACAATAGCA R:CACCGCACTTACAGCAC	63.0	(CT) ₁₆ ...(GT) ₃₉	10	359–442	0.7910	0.817	0.8667	0.8503	GQ466030
<i>PTR33b</i>	F:ACAAGAATCTTTCAGCCGTGAT R:AGGGAGTCGTTCGGGCAGCAT	61.2	(CT) ₁₆ ...(GT) ₃₉	8	283–374	0.1933	0.830	0.7778	0.8400	GQ466030
<i>PTR39a</i>	F:CTTGGCGTGGCTTGTGCT R:ATGCGATCTAAAGTGACTGA	57.6	(GA) ₁₉ ...(AGG) ₁₀ ...(AG) ₁₈	8	147–186	0.0000*	0.804	0.3000	0.8401	GQ466031
<i>PTR45</i>	F:AGAGGAGTGACTGGAGGGTA R:TAAGGCTAAGGACAGGATGA	63.0	(AC) ₁₅ ...(CA) ₁₁	9	250–317	0.3845	0.807	0.8000	0.8401	GQ466032
<i>PTR54</i>	F:TGAGCTGGATGGATTGAA R:GGTCCTCTGGCTTGTGAA	57.6	(AC) ₃₂	8	250–353	0.9140	0.762	0.9000	0.8006	GQ466033
<i>PTR65</i>	F:CTCAGTCCTACCCGAAGA R:AATTGCCAGTTCCCTTAC	57.6	(CA) ₁₅ ...(AC) ₁₈	8	206–238	0.5529	0.679	0.7000	0.7311	GQ466034
<i>PTR70</i>	F:CAACAATACAGAACCCAC R:TGTAGTCCTAACAGTGCC	57.6	(CA) ₂₉	9	283–350	1.0000	0.783	1.0000	0.8181	GQ466035
<i>PTR76</i>	F:ACATCACCGTCAGGGACA R:ATTGCGCTCGTGCTAACC	61.2	(CA) ₂₁	8	203–283	0.0000*	0.827	0.4483	0.8512	GQ466036
<i>PTR81</i>	F:GCAAAGGTGCCACAGTCC R:TCACCCAGCCAGTCTTCC	61.2	(AC) ₃₅	13	367–438	1.0000	0.892	1.0000	0.9099	GQ466037

续表 1

位点名称 locus name	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	退火温度 /°C anneal. temp.	核心重复序列 core repeat	等位基因 数目 allele no.	等位基因 大小范围/bp allele size range	P 值 P value	PIC	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	注册号 access. no.
<i>PTR93</i>	F:AAGACAAAGCGACAAGCC R:CGCAATAACTCCCAACAA	56.0	(TG) ₉ ...(TG) ₃₃	7	250-321	0.6510	0.784	0.8333	0.8243	GQ466039
<i>PTR95</i>	F:CCTTGCCCTTTCATAACAC R:GACCCACTTGTTATCGTTTT	58.7	(GT) ₃₁ ...(CCT) ₅ ...(TCA) ₅ (TCT) ₆	7	312-359	0.5880	0.782	0.8333	0.8237	GQ466041
<i>PTR98a</i>	F:GGATGAAGAGGAGGACTG R:TGGTGGAGGATTATGAGA	56.0	(CTA) ₇ ...(CTA) ₁₄ ...(TC) ₃₁	8	169-204	0.0362	0.738	0.6667	0.7785	GQ466042
<i>PTR100</i>	F:ACCTATTTATTGCTAAGTGA R:CAAGTGATTGTGCTGTCT	53.4	(GT) ₉ (GT) ₈ (GT) ₂₁	9	250-367	0.0002*	0.788	0.5667	0.8254	GQ466043
<i>PTR103b</i>	F:GGAGTGTTGGTGGTGGGT R:AGGATTGGTATGCCGAGA	61.5	(GT) ₂₈ ...(TGT) ₈	4	258-283	0.6925	0.449	0.5667	0.5435	GU177171
<i>PTR112</i>	F:AGGACCAGTGCCAACCAA R:TTCACGCAGCCCATCTTC	61.5	(GT) ₃₄ ...(CT) ₂₈	6	308-375	0.2211	0.739	0.7333	0.7853	GU177179
<i>PTR113</i>	F:GCCAACTGTTCTTATGTG R:AGTCTTAGCACTTTACCG	56.0	(CA) ₇ (AC) ₁₆	5	336-445	0.0000*	0.660	0.2222	0.6492	GU177180
<i>PTR124</i>	F:GTAATAACCCACAACAAATCC R:AGTAGGTCGTTTCGCTTCG	61.5	(CA) ₂₉ (AC) ₁₀	7	220-250	0.1249	0.778	0.8519	0.7841	GU177188
<i>PTR125</i>	F:TAACGCAGATAGTCATAAT R:TGAGGTAAGCAACAAAGC	56.0	(AG) ₂₁ ...(AG) ₁₁ ...(GT) ₂₉	9	345-431	0.0000*	0.816	0.4138	0.8409	GU177189
<i>PTR131</i>	F:GTGGAACAGTAGGCAAACG R:AACCCAAACAAAGGTAGTGAAG	65.0	(AC) ₁₆	3	375-404	0.2313	0.350	0.3667	0.4367	GU177193
<i>PTR135</i>	F:TTACACTCTTGGCTCCTG R:ATTGGCTTATGTCACCTC	56.0	(TG) ₁₄ ...(AG) ₁₂	7	227-268	0.0004*	0.734	0.4667	0.7819	GU177196
<i>PTR145</i>	F:ATCGTCATCGCCGAATAA R:GAGTGAGGAAGCCCAACC	56.0	(ATC) ₇ ...(TC) ₂₃	8	310-388	0.2832	0.799	0.8000	0.8362	GU177204
<i>PTR148</i>	F:AGTGGAAGGTCGTGGATG R:GTGGGATTGTGAAATGCTTA	63.4	(GA) ₃₈ ...(CA) ₁₆ ...(CA) ₂₈	7	400-450	0.7876	0.780	0.8571	0.7974	GU177206
<i>PTR149</i>	F:GCCATGACACCGAAACTC R:AGAATCGCAAACAGGACA	61.5	(TG) ₃₀	8	195-225	0.0528	0.750	0.6667	0.7960	GU177207

注: *表示明显偏离哈迪-温伯格平衡的位点($P<0.05$).

Notes: *means significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) ($P<0.05$).

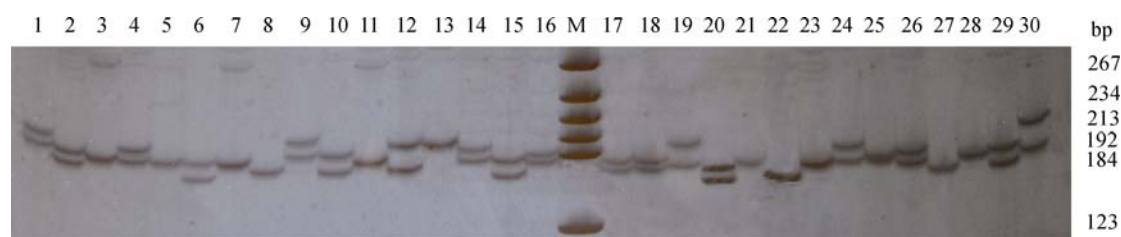


图 1 GQ466042 位点在三疣梭子蟹 30 个个体中扩增得到的电泳图谱

1-30: 30 个三疣梭子蟹个体. M: marker: 267、234、213、192、184、123.

Fig.1 Electrophoresis of Locus GQ466042 amplified in 30 *Portunus trituberculatus* individuals
1-30: 30 *Portunus trituberculatus* individuals. M: markers.

物中广泛应用的一种方法, 根据所使用的介质不同可分为 2 种: 尼龙膜杂交法和磁珠富集法^[23]。本实验采用的富集文库-菌落原位杂交法就是以尼龙膜为介质, 它是一种快速、高效的分离微卫星标记的方法, 已在多个物种中得到应用, 如陈微等^[24]利用菌落原位杂交法对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)微卫星进行分离, 得到 23 个阳性克隆, 阳性克隆率为 69.56%, 获得 11 对微卫星引物; 战爱斌等^[19]对栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)经过二次筛选得到的 100 个克隆均含有微卫星序列, 阳性克隆率为 100%, 成功筛选到 40 个微卫星标记。本实验通过此法在短期内获得大量的阳性克隆, 阳性克隆率为 85.48%, 筛选出 30 对多态性微卫星引物。与王建平等^[15]通过磁珠富集法筛选三疣梭子蟹微卫星位点相比, 在阳性克隆率(87.5%)上基本一致; 冗余序列比例为 2.83%, 小于磁珠富集法得到的冗余序列比例(4.08%), 同时本实验得到的微卫星位点均为新位点。由此可见, 2 种方法虽介质不同, 但效果相当, 均是开发微卫星标记的可行方法。

微卫星 DNA 序列广泛且随机分布在真核生物基因组中, 特别是两碱基重复类型(AC)_n 在基因组中的含量十分丰富^[25], 如在中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)中 CT/GA 的含量非常高^[26], 对斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)的分析表明, 两碱基重复类型占总数的 71.7%, 其中 CA/GT 和 CT/GA 分别占 67%和 21%^[27]。宋来鹏等^[14]的研究证明三疣梭子蟹中两碱基重复类型所占的比例最高, 其中又以(AG)_n 和(AC)_n 最为丰

富, 因此本实验采用(AG)₁₅ 和(AC)₁₅ 为探针筛选三疣梭子蟹微卫星, 得到多个多态性丰富的微卫星标记, 且与磁珠富集法采用的(GT)₁₅ 探针互为补充。但由于本实验开发成本较高, 下一步希望寻找一种经济高效的方法开发更多的三疣梭子蟹微卫星, 为后续选择育种、遗传连锁图谱的构建和 QTL 定位工作奠定基础。

微卫星具有的高度多态性特点, 使其能很好的揭示群体遗传变异水平。多态信息含量(PIC)能反映出某个标记所包含或所提供的遗传信息容量, 当 PIC>0.5 时, 表明该标记可提供丰富的遗传信息; 当 0.25<PIC<0.5 时, 表明该标记能较为合理的提供遗传信息; 当 PIC<0.25 时, 表明该标记可提供的遗传信息较差^[28]。本研究中 28 个位点的 PIC 值高于 0.5, 2 个位点的 PIC 值介于 0.25 到 0.5 之间, 说明所筛选的引物大部分可提供丰富的遗传信息, 为群体遗传学分析提供有效的依据。

杂合度作为一个重要的参数, 其大小可以反映群体等位基因的丰富和均匀程度以及群体遗传变异的高低。杂合度高的群体, 其本身具有的适应环境变化和自然选择的能力更强, 也具有更多的优良性状^[29-30]。对结果进行分析发现, PIC>0.5 的 28 对引物的观测杂合度(H_o)为 0.222 2~1.000 0, 期望杂合度(H_e) 0.649 2~0.909 9; PIC 值介于 0.25 到 0.5 之间的 2 个位点, 其 H_o 和 H_e 分别为 0.366 7~0.566 7 和 0.436 7~0.543 5, 表明三疣梭子蟹种群具有较高的遗传多样性, 这与同工酶^[31] 分析的结果相吻合。

分析结果发现, 8 个座位的观测杂合度和期望

杂合度存在较大差异, 经哈迪-温伯格平衡检验, 是由于杂合子的严重缺失造成的。相关分析指出杂合子缺失大多由于无效等位基因引起^[32]。无效等位基因是指不被 PCR 扩增的等位基因, 通常是由引物结合部位的点突变、插入或缺失引起的^[33]。由于微卫星序列点突变频率($10^{-2} \sim 10^{-5}$)和复制滑脱频率($10^{-3} \sim 10^{-4}$)很高^[34], 无效等位基因在包括哺乳类、鱼类、甲壳类在内的许多生物中都有报道^[35-37]。所以在种群研究中, 如果无效等位基因存在而不被考虑, 就会导致群体中纯合子过剩或杂合子缺失的现象, 从而出现观测杂合度与期望杂合度偏离的现象。

致谢: 中国海洋大学海洋生命学院贝类遗传学与种质工程实验室彭薇博士和本实验室阮晓红博士在本实验中给予了多方面的指导与帮助, 在此表示衷心的感谢。

参考文献:

- [1] 戴爱云, 杨思谅, 宋玉枝, 等. 中国海洋蟹类[M]. 北京: 海洋出版社, 1986: 213-214.
- [2] 堵南山. 甲壳动物学(下) [M]. 北京: 科学出版社, 1993: 882-883.
- [3] 吴常文, 虞顺成, 吕永林. 梭子蟹渔业技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1996: 28-31.
- [4] 施慧, 徐文军, 徐汉祥, 等. 引起三疣梭子蟹“牛奶病”的酵母菌 18S rRNA 序列测定与分析[J]. 海洋水产研究, 2008, 29(4): 34-38.
- [5] 陈寅儿, 王国良, 金珊, 等. 三疣梭子蟹肌肉乳化病的同工酶病理变化研究[J]. 海洋科学, 2008, 32(5): 36-39.
- [6] 励迪平, 王春琳, 吴丹华. 三疣梭子蟹抗乳化病相关基因的初步研究[J]. 水生态学杂志, 2008, 1(1): 125-128.
- [7] 朱泽远, 顾洪如, 施用晖, 等. 高效中华绒蟹微卫星文库的构建及其七个位点的特征分析[J]. 江苏农业学报, 2008, 24(2): 285-289.
- [8] Chang Y M, Liang L Q, Li S W, et al. A set of new microsatellite loci isolated from Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* [J]. Mol Ecol Notes, 2006, 6(4): 1237-1239.
- [9] Yap E S, Sezmis E, Chaplin J A. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Portunus pelagicus* (Crustacea: Portunidae)[J]. Mol Ecol Notes, 2002, 2 (1): 30-32.
- [10] Gopurenko D, Hughes J M, Ma J. Identification of polymorphic microsatellite loci in the mud crab *Scylla serrata* (Brachyura: Portunidae) [J]. Mol Ecol Notes, 2002, 2(4): 481-483.
- [11] An H S, Jeong J H, Park J Y. New microsatellite markers for the snow crab *Chionoecetes opilio* (Brachyura: Majidae) [J]. Mol Ecol Notes, 2006, 7 (1): 86-88.
- [12] Jensen P C, Bentzen P. Isolation and inheritance of microsatellite loci in the Dungeness crab (Brachyura: Cancridae: Cancermagister)[J]. Genome, 2004, 47: 325-331.
- [13] Takano M, Barinova A, Sugaya T, et al. Isolation and characterization of microsatellite DNA markers from mangrove crab, *Scylla paramamosain* [J]. Mol Ecol Notes, 2005, 5(4): 794-795.
- [14] 宋来鹏, 刘萍, 李健, 等. 三疣梭子蟹基因组微卫星特征分析[J]. 中国水产科学, 2008, 15(5): 738-743.
- [15] 王建平, 余晓巍, 沈庞幼. 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)微卫星位点的分离和序列分析[J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(1): 83-87.
- [16] Liu P, Kong J, Shi T, et al. RAPD analysis of wild stock of penaeid shrimp (*Penaeus chinensis*) in Chinese coastal waters of the Huanghai Sea and coastal waters of the Bohai Sea[J]. Oceanol Sin, 2000, 7(2): 86-89.
- [17] Karagoyozov L, Kalcheva I D, Chapman V M. Construction of random small-insert genomic libraries highly enriched for simple sequences repeats[J]. Nucl Acids Res, 1993, 21: 3911-3912.
- [18] Edwards K J, Baker J H, Daly A, et al. Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants[J]. Biotechniques, 1996, 20: 758-760.
- [19] 战爱斌, 胡景杰, 胡晓丽, 等. 富集文库-菌落原位杂交法筛选栉孔扇贝的微卫星标记[J]. 水产科学, 2008, 32(3): 353-361.
- [20] Bostein D, White R L, Skolnick M. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. Am J Hum, 1980, 32: 314-331.
- [21] Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellites isolation: a review [J]. Mol Ecol, 2002, 11: 1-6.
- [22] Hanfling B, Weetman D. Characterization of microsatellite loci for the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* [J]. Mol Ecol Notes, 2003, 3(1): 15-17.
- [23] 胡维, 向华, 周艳, 等. 用 PCR 法直接快速筛查重组阳性克隆[J]. 生物技术通报, 1999, 15: 39-43.
- [24] 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]. 2005, 12(6): 682-687.
- [25] 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.
- [26] 高焕, 刘萍, 孟宪红, 等. 中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 基因组微卫星特征分析[J]. 海洋与湖沼, 2004, 35(5): 424–431.
- [27] 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.
- [28] 梁利群, 常玉梅, 董崇智, 等. 微卫星 DNA 标记对乌苏里江哲罗鱼遗传多样性的分析[J]. 水产学报, 2004, 28(2): 241–244.
- [29] Xu Z, Primavera J P, Pena L D, et al. Genetic diversity of wild and cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites[J]. Aquaculture, 2001, 199: 13–40.
- [30] Beardmore J A, Mair G C, Lewis R I. Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture [J]. Aquac Res, 1997, 28: 829–839.
- [31] 李琪. 海洋贝类微卫星 DNA 标记的开发及其在遗传学研究中的应用[J]. 中国水产科学, 2006, 13(3): 502–509
- [32] 樊祥国, 高保全, 刘萍, 等. 三疣梭子蟹 4 个野生群体遗传差异的同工酶分析[J]. 渔业科学进展, 2009, 30(4): 84–89.
- [33] Callen D F, Thompson A D, Shen Y, et al. Incidence and origin of “null” alleles in the (AC)_n microsatellite markers[J]. Am J Hum Genet, 1993, 52: 922–927.
- [34] Vigouroux Y, Jaqueth J S, Matsuoka Y, et al. Rate and pattern of mutation at microsatellite loci in maize[J]. Mol Biol Evol, 2002, 19: 1251–1260.
- [35] Pemberton J M, Slate J, Bancroft D R, et al. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: A caution for parentage and population studies[J]. Mol Ecol, 1995, 4: 249–252.
- [36] Kordicheva S Y, Rubtsaa G A, Shitova M A, et al. A search for null alleles at the microsatellite locus of chum salmon (*Oncorhynchus keta* Walbaum) [J]. Russian J Genet, 2010, 46(8): 1019–1022.
- [37] Sugaya T, Ikeda M, Mori H, et al. Inheritance mode of microsatellite DNA markers and their use for kinship estimation in kuruma prawn *Penaeus japonicus*[J]. Fish Sci, 2002, 68: 299–305.

Construction on enriched microsatellite library and characterization of microsatellite markers from swimming crab

LI Xiaoping^{1,2}, LIU Ping², SONG Xiefa¹

1. Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China

Abstract: Thirty microsatellite markers of swimming crab *Portunus trituberculatus* were isolated and characterized by screening SSR-enriched library. Genomic DNA were digested by *Hae*III, then DNA fragments containing microsatellites were captured by a piece of nylon membrane (Hybond N⁺) bounded with the probe combinations of (AC)₁₅ and (AG)₁₅. After transformation to *Escherichia coli* strain DH5 α , the clones were regularly re-arrayed in a new agar plate with the density of about 300 clones per plate and were screened with (AC)₁₅ and (AG)₁₅ probes labeled by DIG luminescent Detection Kit system (Roche). One hundred and fifty clones were randomly selected for sequencing. One hundred and five primer pairs were designed using the software Primer Premier 5.0, of which 56 pairs could amplify distinct PCR products. Polymorphism of these distinct loci was assessed using 30 swimming crab individuals, and the results showed that the 30 loci were all polymorphic. The values of H_o , H_e and PIC varied from 0.222 2 to 1.000 0, from 0.436 7 to 0.909 9 and from 0.350 to 0.892, respectively. These microsatellite markers would be useful for the studies of genome mapping, QTL, parentage determination and population genetics for this species. [Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(1): 194–201]

Key words: *Portunus trituberculatus*; enrichment library screening; colony hybridization; microsatellite markers; genetic diversity

Corresponding author: LIU Ping. E-mail: liuping@ysfri.ac.cn