

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2012.01156

大黄鱼微卫星标记的开发及其遗传方式分析

叶 华^{1,2} 任 鹏² 刘 洋² 刘贤德² 王志勇²

(1. 西南大学, 鱼类繁育与健康养殖研究中心, 重庆 402460; 2. 集美大学水产学院, 农业部东海海水健康养殖重点实验室, 厦门 361021)

摘要: 采用 FIASCO 方法构建大黄鱼(*AC*)_n 微卫星富集文库, 从文库中随机挑选 90 个白色克隆, 经过菌液 PCR 筛选得到 60 (66.7%)个阳性克隆进行测序, 其中有 56 个克隆(93.3%)含有 CA/GT 重复数大于 5 的微卫星序列。56 个微卫星序列中, 二核苷酸微卫星 51 个(91.1%), 三核苷酸微卫星 5 个; 二核苷酸重复中有 48 个为(AC)_n 重复, 占二核苷酸总数的 94.1%。根据 Weber 的微卫星分类规则, 完美型占 75.0%, 非完美型占 8.9%, 复合型微卫星占 16.1%。共设计引物 52 对, 在 1 个大黄鱼家系中 35 对引物所在位点具有多态性, 28 个(80.0%)位点子代基因型为 1 1 1 1(AB × CD/AB × AC)分离类型, 6 个位点属 1 1 1 1分离类型, 1 个位点属 1 2 1(AB × AB)分离类型。35 个位点中有 32 个位点的分离符合孟德尔分离比($P > 0.05$), 另外 3 个位点(LYC0137、LYC0139、LYC0152)明显偏离 1 1 1 1或者 1 1 1 1的孟德尔分离比($P < 0.05$)。本研究开发的微卫星标记为大黄鱼微卫星遗传连锁图谱构建以及群体遗传学、分子进化和系统发育等研究提供了有用的分子工具。

关键词: 大黄鱼; 微卫星; 孟德尔分离

中图分类号: Q173 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2012)06-1156-08

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)属于鲈形目、石首鱼科、黄鱼属, 俗称黄花鱼、黄瓜鱼、黄鱼, 是我国主要海洋经济鱼类之一, 也是我国目前养殖量最大的海水鱼类^[1, 2]。微卫星是由串联的 1—6 bp 的简单序列重复排列(如: AC、CCA 或者 GATA、SSR)组成^[3]。微卫星标记因多态性高、含量丰富、共显性遗传及片段小等优点而成为非常有用的遗传标记, 已广泛用于群体遗传学研究、亲缘关系鉴定、及遗传连锁图谱构建和 QTL 分析中^[4-6]。近年来, 国内外的研究者公开发表的大黄鱼微卫星引物有 66 对^[7-11], 其主要用于大黄鱼群体遗传结构和多样性分析、雌核发育鉴定、亲子鉴定等研究中^[6]。由于缺乏足够的微卫星标记, 在大黄鱼第一代遗传连锁图上仅整合 11 个微卫星标记。目前获得的大黄鱼 SSR 标记还远远满足不了构建微卫星遗传连锁图谱的要求。因此,

本文采用基于 AFLP 技术的 FIASCO (Fast Isolation by AFLP Sequences Containing repeats)方法构建微卫星富集文库, 结合蓝白斑法和 PCR 法筛选阳性克隆, 获得大量微卫星标记, 并在大黄鱼 F₁ 代家系中检测其中部分位点的分离情况, 以确定其是否能应用于构建遗传连锁图谱。

1 材料与方法

1.1 实验材料

采用 2006 年捕于福建省宁德市官井洋海区的野生个体用于文库的构建。分离方式分析所用的 F₁ 代家系构建于 2007 年 3 月, 用来自不同群体、遗传差异较大的 4 尾雄鱼和 4 尾雌鱼为亲本混合繁殖, 构建了一个 4♀×4♂混合繁育群体。在亲鱼产卵前检查其健康状况及性成熟度, 并采用人工催产措施确

收稿日期: 2012-04-19; 修订日期: 2012-08-22

基金项目: 国家自然科学基金(30771663); 国家公益性行业(农业)科研专项(200903029-04); 集美大学创新团队科研基金(2011A001)资助

作者简介: 叶华(1981—), 女, 四川广元人; 博士; 主要从事水产动物遗传育种与生物技术研究。E-mail: yhlh2000@126.com

通讯作者: 王志勇(1963—), 男, 福建安溪人; 教授, 博导; 主要从事水产生物遗传育种与生物技术研究。E-mail: zywang@jmu.edu.cn

保亲鱼能同步产卵。亲鱼产卵结束后剪取亲本部分背鳍以 75%乙醇固定保存, 同时收集受精卵, 于室内孵化培育, 鱼苗全长大于 2.0 cm 后转移至海区网箱养殖。2008 年 4 月从此群子代(13 月龄)中随机选取 389 尾, 剪取部分背鳍固定于 75%的乙醇, 用于亲子鉴定分析^[12], 根据亲子鉴定结果从♀3×♂1 家系中随机选择 46 尾用于微卫星标记分离方式分析。

1.2 DNA 提取

剪取鳍条约 50 mg 用于抽提 DNA, 提取方法采用标准氯仿-异戊醇-酒精提取程序^[13]。用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测 DNA 的纯度和浓度, 并稀释成 30 ng/μL 的工作液, 置于 4℃ 备用。

1.3 微卫星富集文库的构建

基因组酶切及接头连接 微卫星富集文库的构建主要参照 Zane, *et al.*^[14]的方法, 用 0.5 μL (10 u/μL) 限制性内切酶 *TaqI* 对 500 ng 大黄鱼基因组 DNA 进行酶切反应, 65℃ 酶切 2h, 总反应体系为 10 μL。酶切产物用 T4 DNA 连接酶进行接头连接, 总反应体系为 20 μL, 其中酶切产物 10 μL、超纯水 7 μL、ATP (10 mmol/L) 1 μL、*TaqI* adaptors (50 μmol/L) (5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'、5'-CGCTCAGGAC TCAT-3') 1 μL 及 T4 DNA 连接酶(1U/μL) 1 μL。连接条件为 16℃ 反应 2h, 然后放置室温过夜。

用 *TaqI* Primer (5'- GACTGCGTACCAATTC-3') 对连接产物进行 PCR 扩增。反应总体积 20 μL, 连接产物 1 μL, 10× PCR buffer (with Mg²⁺) 2 μL, dNTPs (10 mmol/L) 0.4 μL, *TaqI* Primer (10 μmol/L) 0.4 μL, *Taq* 酶 (5U/μL, TAKARA) 0.2 μL, 超纯水 16 μL。反应条件: 首先 94℃ 变性 2 min, 再 94℃ 30s, 56℃ 30s, 72℃ 30s 共 20 个循环, 15℃ 保存。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

探针杂交与磁珠筛选 在 1.5 mL 离心管中放入 100 μL 磁珠, 用磁铁吸附迅速去上清。用 200 μL 1× Washing/Binding Buffer 进行洗涤后用磁珠吸附并去上清。重复操作一次。再加入 200 μL 2× Washing/ Binding Buffer 重悬, 加入 2 μL 100 nmol/L 的 5'端生物素标记的(CA)₁₅ 探针和 198 μL 灭菌双蒸水。室温放置 30min, 同时每隔几分钟轻摇一次, 始终保持磁珠悬浮。之后用磁铁吸附, 弃上清。再用 400 μL 1× Washing/Binding Buffer 洗一次, 400 μL 6× SSC 洗 2 次。最后用 50 μL 6× SSC 重悬磁珠, 并保持温度 70℃ 备用。

取 15 μL PCR 产物与 15 μL 20× SSC 和 20 μL H₂O 混匀, 95℃ 变性 10min, 然后与磁珠混合, 70℃ 保持 30min, 同时每隔几分钟将磁珠吹起一次, 保持磁珠悬浮。接着用磁铁吸附快速去上清, 并加入 100 μL 2× SSC 洗涤, 重悬磁珠, 用磁铁吸附去上清。再用 600 μL 2× SSC 洗涤 3 次, 600 μL 1× SSC 洗涤 3 次。然后用 50 μL 超纯水重悬磁珠, 95℃ 加热 2min, 用磁铁快速吸附磁珠, 吸取上清保存。重复 2 次, 后两次的上清另放一管保存。

目的 DNA 片段的扩增及载体连接 以最后回收的目的 DNA 片段为模板, 进行 PCR 扩增并在末端加 A。反应总体积 50 μL, 筛选到的目的 DNA 片段 42 μL, 10×*Taq* buffer (with Mg²⁺) 5 μL, dNTPs (10 mmol/L) 1 μL, *TaqI* Primer (10 μmol/L) 1.5 μL, *Taq* 酶 (5U/μL, TAKARA) 0.5 μL。反应条件为: 94℃ 2min; 再 94℃ 30s, 56℃ 30s, 72℃ 40s, 共 20 个循环; 最后 72℃ 5min; 4℃ 保存。

取 4 μL PCR 产物与 pMD18-T 载体连接, 连接反应体系 10 μL, 其中 PCR 产物 4 μL, pMD18-T Vector 1 μL, Solution I 5 μL。16℃ 连接 2h, 放置室温过夜。连接产物用 PEG 法沉淀后加 10 μL 超纯水溶解, 4℃ 冰箱保存。

高效感受态细胞的准备 挑取 TOP 10 菌株的单克隆菌落到 10 mL LB 液体培养基中, 37℃、200 r/min 培养 8—10h。再从中取 1 mL 菌液倒入 100 mL LB 液体培养基中, 37℃、150 r/min 培养, 当 A₆₀₀ 值达到 0.5—0.6 时(约 2—3h), 停止培养。将菌液预冷 15min, 随后分装到 250 mL 预冷的离心瓶中, 4℃、7200 r/min 离心 20min, 弃上清。离心瓶中加入 100 mL 预冷的超纯水重悬沉淀, 4℃、7200 r/min 离心 20min, 弃上清。加 50 mL 预冷的超纯水重悬菌体, 4℃、7200 r/min 离心 10min, 弃上清。加入 1 mL 冰冷的超纯水重悬菌体, 然后将菌液按 200 μL/管分装于离心管中, 将离心管插入冰中待用, 如果不及时使用则放置于 -80℃ 保存。

电转化与克隆筛选 取 5 μL 纯化后的载体连接产物加入到 200 μL 感受态细胞内, 并混匀。然后移到预冷过的电击杯中, 用 2 mm 电转化杯 2500 V 电击。电击后迅速向杯中加入 1 mL 37℃ 预热过的 SOC 培养基, 并轻柔吹吸几次, 最后将其吸入 15 mL 培养管中, 放入培养箱, 37℃、100 r/min 复苏 1h。

取 7 μL 异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)和 30 μL 5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷(X-Gal), 混匀后涂于含有氨苄青霉素(60 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 LB 平板上, 静置 3h。再用 100 μL 复苏后的菌液涂板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16h, 之后将平板置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 使其充分显色。经过蓝白斑筛选, 挑取白色克隆到含有 Amp 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。

PCR 法筛选克隆 以菌液为模板, M13-47 (5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3')、RV-M(5'-TAA TACGACTCACTATAGGG-3')及(AC)₈作引物, 对白色克隆进行 PCR 扩增。反应体系为: 无菌水 15.2 μL , 10 $\times$ buffer 2.0 μL , dNTP (10 mmol/L) 0.4 μL , M13-47 引物 0.4 μL , RV-M 引物 0.4 μL , (AC)₈ 引物 0.4 μL , Taq 酶 0.2 μL , 菌液 1.0 μL , 总体积 20.0 μL 。扩增条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30s, 退火温度 56 $^{\circ}\text{C}$ 30s, 延伸温度 72 $^{\circ}\text{C}$ 30s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10min。

1.4 引物设计

挑取插入片段大小 300—800 bp 的单克隆送到英骏公司测序。所得序列用 Blast 比对去除载体序列, 再用 SSR Hunter 1.3 (<http://www.bio-soft.net/dna/SSR/Hunter.html>)软件查找重复序列, 挑选含有微卫星的序列, 并在微卫星序列侧翼区利用 Primer Premier 5.0 (<http://www.premierbiosoft.com/>)设计引物。

1.5 多态性筛选与多态位点的遗传分析

先用微卫星引物对前述家系的两个亲本(♀3 和 ♂1)进行 PCR 扩增分析, 筛选出在此家系中具有多态的引物(即在两个亲本中至少一个亲本是处于杂合状态)用于子代的基因分型。反应总体积为 10 μL , 其中模板 DNA 1.0 μL (30 ng), 10 $\times$ PCR buffer (with Mg^{2+}) 1.0 μL , 10 mmol/L dNTPs 0.2 μL , 10 mmol/L 正向与反向引物各 0.2 μL , 5 U/ μL Taq 酶 0.1 μL , 灭菌超纯水 7.3 μL 。扩增条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30s, 退火温度(表 1)30s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30s, 循环 30 次; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

PCR 产物用 Bio-Rad 公司 Sequi-Gen Sequencing Cell 垂直电泳系统进行电泳, 采用 6%聚丙烯酰胺变性凝胶电泳分离: 10 μL 扩增产物加入 2 μL 上样缓冲液混匀, 然后取 3 μL 产物在 6%变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离, 电泳功率恒定在 80 W, 电泳时间根据扩增片段大小决定, 并用银染法进行显色。凝胶银染参照 Wang, *et al.* 方法进行^[15]。等位基因大小用 10 bp DNA Ladder (Invitrogen, USA)为参照标准

进行判读。

根据每个个体产生的条带位置确定其基因型, 用 SPSS15.0 软件中的卡方检验分析多态性位点在子代中的分离比是否符合孟德尔遗传。

2 结果

2.1 接头连接、载体连接和磁珠富集结果

大黄鱼基因组 DNA 经 TaqI 酶切、连接、PCR 扩增后, 用 1%的琼脂糖检测扩增产物(图 1 A), 片段集中在 400—1000, 完全能满足构建文库的需要。经过探针杂交和磁珠富集之后, 获得含有微卫星序列的单链目的片段, 然后以相应的引物进行 PCR 扩增来变为双链并加 A 尾。图 1 B 和图 1 C 分别显示磁珠富集片段的 PCR 扩增结果和载体连接结果。目的片段主要集中在 300—1000 bp。

2.2 阳性克隆筛选

从文库中随机挑选 90 个白色克隆, 经过菌液 PCR 筛选得到 60 (66.7%)个阳性克隆, 对这 60 个阳性克隆进行测序, 其中有 56 个克隆(93.3%)含有 CA/GT 重复数大于 5 的微卫星序列。

2.3 测序结果及序列分析

在 56 个微卫星序列中, 二核苷酸微卫星 51 个 (91.1%), 三核苷酸微卫星 5 个; 二核苷酸重复中有 48 个为(AC)_n 重复, 占二核苷酸总数的 94.1%。根据 Weber^[16]的微卫星分类规则: 56 个微卫星中完美型占 75.0%, 非完美型占 8.9%, 复合型微卫星占 16.1%。由于 4 条序列因本身结构或侧翼序列太短无法设计引物, 因此仅设计微卫星引物 52 对。

2.4 多态位点的遗传分析

52 个位点中经过多态性筛选后得到 35 个多态位点。由表 1 可知, 35 个位点中有 28 个位点子代具 4 种基因型, 为 1 1 1 1 (AB $\times$ CD/AB $\times$ AC) 的分离类型; 6 个位点属 1 1 分离类型, 其中 4 个为雌亲杂合雄亲纯合, 2 个为雄亲杂合雌亲纯合; 1 个位点属 1 2 1 (AB $\times$ AB)分离类型。在 35 个位点中有 32 个位点的分离符合孟德尔分离比($P>0.05$), 另外 3 个位点(LYC0137、LYC0139、LYC0152)明显偏离 1 1 或者 1 1 1 1 的孟德尔分离比($P<0.05$)。图 2 显示部分位点在此家系中的分离情况, 其中位点 LYC0184 出现了无效等位基因, 有 10 个子代缺少父本的等位基因扩增条带, 显示其父本为包含无效等位基因的杂合体。

表 1 大黄鱼的 35 个多态性微卫星标记的相关信息
Tab. 1 The information of 35 polymorphic microsatellite markers

微卫星位点 Locus	核心重复序列 Repeat motif	引物序列(5'—3') Primer sequence	退火温度(°C) Annealing temperature	片段大小范围 Size range	亲本基因型(♀×♂) Parental genotypes	子代基因类型及比率 Segregation ratio	P 值 P-value
LYC0120	(GT) ₈ ...(TG) ₇	F: CCGCCGTATGAACAGAAA R: CACAGCGAACAGACCACC	55	176—198	AB×CD	AC:AD:BC:BD 11:7:17:11	0.218
LYC0122	(AC) ₁₀	F: TTCGAGGAAAGGAAGTGC R: CCGTGGTGATTGAGGGA	60	190—196	AB×AA	AA:AB 24:22	0.768
LYC0124	(TG) ₁₈ ...(TG) ₁₇	F: TTCCTCTTCCTCGCTGAT R: TCCATCCAGTCGGTCTTT	55	110—149	AB×CD	AC:AD:BC:BD 10:14: 14:8	0.503
LYC0125	(CA) ₃₄	F: CCTGGAAGTATAATAACCC R: GAGAAATGGAAACGGAGAC	55	180—225	AB×AC	AA:AB:BC 12:14:10:10	0.812
LYC0126	(TG) ₁₄	F: GGTCCACTGGAGTCTGT R: ACAGAGTGGTGCTTTCA	55	199—223	AB×CD	AC:AD:BC:BD 14:7: 12:13	0.471
LYC0127	(CA) ₁₃	F: GAGCGAGGACCAATCTTA R: ACTCGGAGTCTGCTAT	55	166—176	AB×AA	AA:AB 28:18	0.140
LYC0128	(CA) ₈ (AC) ₈	F: CTTGAGCGAACTAGACAA R: ATGAGGTGAAGTA	55	135—141	AB×AC	AA:AB:AC:BC 13:14:9:10	0.687
LYC0130	(AC) ₁₁	F: GCAATGCTGGTTTACTGG R: GAGGGATGAAGGTTTGCTA	55	164—178	AB×CD	AC:AD:BC:BD 11:11:15:9	0.648
LYC0137	(TG) ₉	F: CGGTAGAGGTGAGTTTC R: CACAGCGTCCCAACTTAT	55	112—154	AB×CD	AC:AD:BC:BD 5:18:9:13	0.041
LYC0138	(AC) ₂₉	F: GCTGAGTGACGGGTAATA R: CTCAACGCAGCACTTTAC	55	160—200	AB×CD	AC:AD:BC:BD 11:7:15:13	0.385
LYC0139	(GT) ₁₄	F: TGAGTCAGGGAGAACAGA R: GCACTCGGATTATGTTAG	55	203—220	AA×AB	AA:AB 15:31	0.018
LYC0142	(CA) ₁₉	F: AGCCCTGACCACTCCTC R: AGCCCATCATGCTCAAGTA	60	233—275	AA×AB	AA:AB 24:22	0.768
LYC0143	(GT) ₁₂	F: GGGTTCCTGTTTGTGGAAA R: AGATGACAAACAGCATAACT	55	206—233	AB×AC	AA:AB:AC:BC 12:15:8:11	0.537
LYC0145	(AC) ₁₆	F: CAGGCTCAGGGACCAAT R: ACGGCACAATCGTGGAGA	60	102—124	AB×CD	AC:AD:BC:BD 11:14:12:9	0.770
LYC0148	(TG) ₃₀ (GT) ₉	F: GGGGCTGAACATAACAAT R: GTGACAAACGCAGGAATA	51	200—218	AB×CD	AC:AD:BC:BD 15:13:9:9	0.503
LYC0149	(AC) ₁₉	F: ATGTGGCTACAGGATTA R: CTGCCTGAAATGATGTTG	53	105—115	AB×AC	AA:AB:AC:BC 8:18:8:12	0.120
LYC0152	(TG) ₇	F: GCCTGATGTGGATGCTTT R: TCCGCTCAAAATAAACATAAC	53	201—219	AB×AC	AA:AB:AC:BC 1:19:15:11	0.001*

续表

微卫星位点 Locus	核心重复序列 Repeat motif	引物序列(5'—3') Primer sequence	退火温度(℃) Annealing temperature	片段大小范围 Size range	亲本基因型(♀×♂) Parental genotypes	子代基因类型及比率 Segregation ratio	P 值 P-value
LYC0154	(GT) ₂₂	F: GGGCACAAACAATAAGCAG R: ACAGCAGCCTCACTCTTA	55	145—157	AB×CD	AC:AD:BC:BD 17:13:8:8	0.175
LYC0158	(TG) ₂₁	F: TACTTTGCCCTGCCTAAC R: CAGCCAATGGTTCTTCA	53	180—200	AB×CD	AC:AD:BC:BD 13:11:12:10	0.933
LYC0159	(GT) ₁₂	F: AAAGCAGCCTCAGATAAA R: TGAACCGACTGAAGAIGA	53	143—169	AB×AC	AA:AB:AC:BC 13:9:13:11	0.812
LYC0160	(TG) ₁₀	F: ATAACACCGCAACCAAGA R: CTGAGCGATGCACATTTT	53	124—140	AB×AC	AA:AB:AC:BC 9:16:9:12	0.412
LYC0161	(TG) ₇	F: GCAAGCTCCCAATGCAAT R: CCGTATCCAGCGGTAGTT	55	186—200	AB×AC	AA:AB:AC:BC 11:11:14:10	0.854
LYC0165	(GT) ₈	F: TAACGCAATGAGCTACAGT R: TCCAGTTTACACGGCTTT	53	160—170	AB×AC	AA:AB:AC:BC 10:9:14:13	0.687
LYC0167	(TG) ₁₂	F: GGTTCCTCCTCTAATGCT R: GTTCCCTGAATTTGCTTG	53	182—214	AB×CD	AC:AD:BC:BD 15:10:12:9	0.609
LYC0172	(TG) ₇	F: AATCAGCACTTTGGGACA R: CTGTCAGACTGTGGTGGC	55	120—138	AB×CD	AC:AD:BC:BD 8:10:15:13	0.471
LYC0184	(CA) ₆	F: AATGTCAGCTCTCCAAT R: AAATCCCGTGAATACTG	55	208—218	AB×AC	AA:AB:AC:BC 14:17:5:10	0.071
LYC0223	(CA) ₁₅	F: CACGGTGACTGCGAGAAC R: CATGGGTGAATTGCCTCA	60	200—280	AB×AC	AA:AB:AC:BC 11:15:9:11	0.648
LYC0225	(TG) ₁₁	F: AAGAAACAAATAACGGCATG R: AGCGCAGTGTGTGTAAAT	51	200—220	AB×AA	AA:AB 26:20	0.376
LYC0226	(CA) ₂₀	F: ATGTCCAGGAGACTAACCA R: CAGAGCGCAGTAAAGAGAT	60	148—190	AB×CD	AC:AD:BC:BD 13:12:4:17	0.052
LYC0227	(TG) ₄₀	F: AGATTGGCACTGTCTGTC R: CTGAAGTCTAATAGGGAAC	55	156—188	AB×CD	AC:AD:BC:BD 13:16:8:7	0.179
LYC0228	(TG) ₂₅	F: ATCTGCCAAATCCCACCT R: GGTCTCTGTTCTCGTAGC	53	183—200	AB×AC	AA:AB:AC:BC 7:7:13:19	0.035
LYC0229	(TG) ₁₂ (GTGTGA) ₇ ...(GTGA) ₁₄ (GT) ₁₀	F: TGACGGACGAAGAGAGA R: CAGCGACATCGTCTCTAA	55	250—274	AB×AA	AA:AB 22:24	0.768
LYC0230	(CA) ₁₇	F: GCTGATGGCAGTTGATA R: ATTTGTACGATGGCTTG	53	236—263	AB×CD	AC:AD:BC:BD 10:13:5:18	0.520
LYC0231	(CA) ₁₁	F: GGCAGAGATGGAATGAAA R: TCACTTGTCTGCCTGCTT	55	154—168	AB×CD	AC:AD:BC:BD 12:15:9:10	0.609
LYC0232	(TG) ₂₀	F: AACCAACCTCATGACTGC R: AACCGCCTGAATAATAC	53	109—150	AB×AB	AA:AB:BB 13:22:11	0.107

3 讨论

本研究采用改进的 FIASCO 方法构建了大黄鱼的微卫星富集文库, 用菌液 PCR 筛选得到 60 (66.7%) 个阳性克隆进行测序, 其中有 56 个克隆 (93.3%) 含有 CA/GT 重复数大于 5 的微卫星序列, 说明本研究构建的微卫星富集文库质量较高。FIASCO 方法已广泛用于多个物种的微卫星富集文库构建中, 但在不同物种中文库的效率有很大的差异, 由最低的 50% 到最高的 95% 不等^[14, 17, 18], 这可能是由不同物种基因组中微卫星含量差异所引起。富集文库的效率可能与内切酶的选择、探针的选择和杂交筛选时条件的控制有关。

内切酶种类的选择会影响标记开发的效率。例如, Ren, *et al.*^[19] 使用内切酶 *TruI*(*MseI*) 构建杂色鲍的微卫星富集文库, 发现从杂色鲍的微卫星文库中获得的 114 条序列, AT 含量最低为 56.4%, 最高为 73.1%, 较高 AT 含量与酶切时所使用的限制性内切酶 *TruI* 的识别位点有关, *TruI* 的识别位点 A[^]ATT 丰富的区域肯定是一贫 GC 区, 这导致微卫星序列的两翼 AT 含量过高不适于引物设计^[20]。本研究选择内切酶 *TaqI* 用于酶切, 对最终 53 条含有微卫星的序列进行分析, 发现平均的 GC% 含量约为 45%, 这与其他脊椎动物的研究结果一致^[20, 21]。这在一定程度上表明内切酶 *TaqI* 更适合用于构建微卫星富集文库。

酶切片段大小会影响文库的质量。因此, 本研

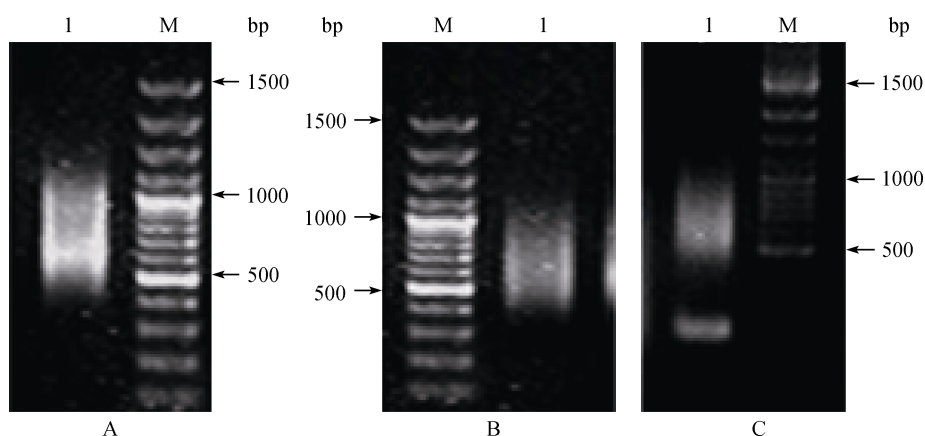


图 1 接头连接后 PCR 产物(A)、磁珠富集片段的 PCR 产物(B)、载体连接的检测(C)图

Fig. 1 A, PCR product after ligation of adaptors; B, PCR product of fragments after bead enrichment; C, The result of ligation with vector
M. 分子标记; l. 产物 M. Marker; l. Product

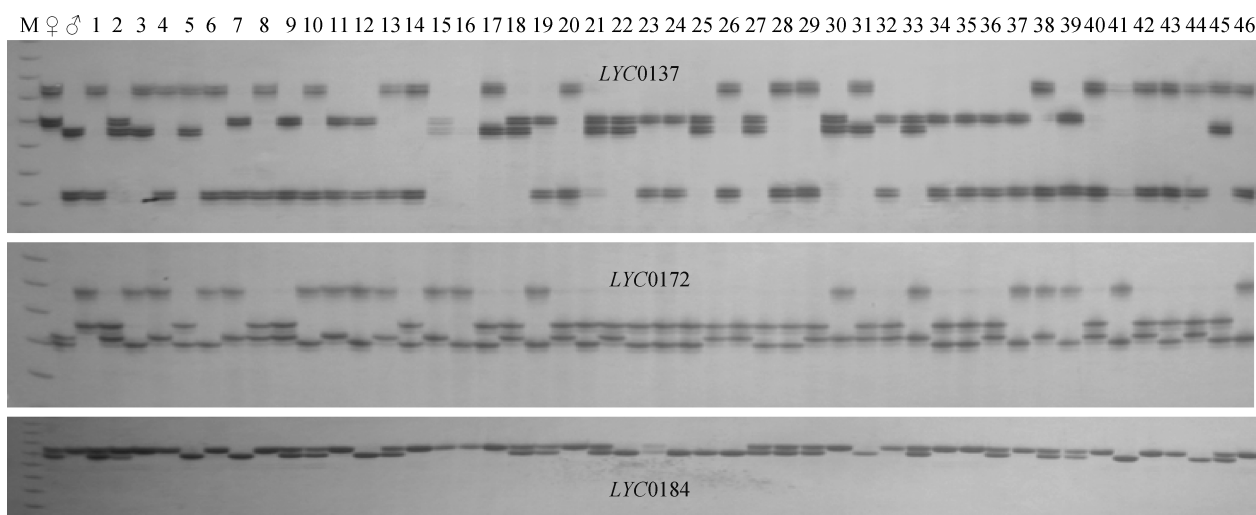


图 2 部分位点(LYC0137、LYC0172、LYC0184)在亲本及子代中的分离

Fig. 2 Segregation pattern of locus LYC0137, LYC0172 and LYC0184 in the family

M 为 10 bp DNA Ladder; ♀为母本, ♂为父本; 图中数字表示个体编号

M was 10 bp DNA Ladder; ♀was dam, ♂was sire; Numbers in the figure were individual number

究选择 400—1000 bp 的片段用于连接。而探针选择会直接影响文库的富集效率。选择探针的种类通常是选择该物种基因组中含量最丰富的类型,而通常该物种的基因组情况是未知的,因此,我们通过分析已发表的大黄鱼微卫星序列和参考脊椎动物基因组中微卫星核心序列组成,选择(CA)₁₅ 作为探针。因为在脊椎动物基因组中,二核苷酸微卫星最为丰富,其含量大约是三核苷酸微卫星的 10 倍,二核苷酸重复序列中,(AC)_n 含量最为丰富^[22, 23]。优化探针杂交温度和磁珠富集后洗脱条件是提高微卫星序列得率的关键。提高杂交温度能有效避免与探针不完全匹配的重单元和低重复次数的微卫星序列与探针结合,使含高重复数的微卫星序列比例增加^[24]。洗脱的严谨度包括洗脱温度和 SSC 浓度两个主要条件,温度越高,严谨度越高;SSC 浓度越小,严谨度越高。杂交片段的大小不同,杂交温度和洗脱严谨度要求也不同,片段越长,杂交温度及洗脱严谨度要求也越高。因此,杂交温度和洗脱严谨度不同,最终的微卫星类型的比例不同。

微卫星位点中普遍存在无效等位基因现象^[25]。在本研究中,仅一个位点(LYC0184) (2.9%)存在无效等位基因。而在人中无效等位基因达到 25%^[26]。引物序列中的突变被认为是引起无效等位基因的重要原因^[25]。

总之,采用 FIASCO 方法是获得微卫星标记行之有效的手段,不仅大大降低实验难度和实验成本,还提高了筛选效率。本研究开发的 52 个微卫星标记,在 1 个 F₁ 家系中有 35 个标记具有多态性,其中,32 个(97.1%)标记的分离方式符合孟德尔分离定律,可用于构建遗传连锁图谱。因此,本研究为大黄鱼共显性标记遗传图谱的构建提供了一些良好的微卫星标记,这些标记也为大黄鱼群体遗传学以及其他相关研究提供了有用的工具。

参考文献:

- [1] Su Y Q, Zhang C L, Wang J, *et al.* Breeding and Farming of *Pseudosciaena crocea* [M]. Beijing: Maritime Press. 2004, 1—7 [苏永全, 张彩兰, 王军, 等. 大黄鱼养殖. 北京: 海洋出版社. 2004, 1—7]
- [2] Wang Z Y, Xie F J, Cao M Y, *et al.* Aquaculture and Breeding of Large Yellow Croaker in China [R]. Texas, USA, Aquaculture. 2007, 973
- [3] Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers [J]. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17(16): 6463—6471
- [4] Chistiakov D A, Hellemans B, Volckaert F A M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics [J]. *Aquaculture*, 2006, 255(1—4): 1—29
- [5] Liu Z J, Cordes J F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics [J]. *Aquaculture*, 2004, 238(1—4): 1—37
- [6] Ye X J, Wang Z Y, Liu X D, *et al.* Analysis of genetic homozygosity and diversity of two successive generation meio-gynogenetic population in *Pseudosciaena crocea* using microsatellite markers [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, 34(1): 144—151 [叶小军, 王志勇, 刘贤德, 等. 大黄鱼连续两代雌核发育群体的微卫星标记分析. 水生生物学报, 2010, 34(1): 144—151]
- [7] Guo W, Wang Z, Wang Y, *et al.* Isolation and characterization of six microsatellite markers in the large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* Richardson) [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2005, 5(2): 369—371
- [8] An H S, Cho K C, Park J Y. Eleven new highly polymorphic microsatellite loci in the yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2005, 5(4): 866—868
- [9] Chang Y, Liang L, Lei Q, *et al.* Isolation and characterization of 11 microsatellite markers for the large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* [J]. *Conservation Genetics*, 2009, 10(5): 1405—1408
- [10] Hao J, Sun X W, Liang L Q, *et al.* Enrichment of large yellow croaker genome microsatellite markers using magnet beads [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(5): 762—766 [郝君, 孙效文, 梁利群, 等. 大黄鱼微卫星标记的富集与筛选. 中国水产科学, 2006, 13(5): 762—766]
- [11] Ye H, Wang X Q, Gao T X, *et al.* EST-derived microsatellites in *Pseudosciaena crocea* and their applicability to related species [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2010, 29(6): 83—91
- [12] Liu X D, Zhao G T, Wang Z Y, *et al.* Parentage assignment and parental contribution analysis in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) using microsatellite markers [J]. *Current Zoology*, 2012, 58(2): 244—249
- [13] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989, 468—470
- [14] Zane L, Bargelloni L, Patarello T. Strategies for microsatellite isolation: a review [J]. *Molecular Ecology*, 2002, 11(1): 1—16
- [15] Wang Z Y, Tsoi K H, Chuk H. Applications of AFLP technology in genetic and phylogenetic analysis of penaeid shrimp [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2004, 32(4): 399—407
- [16] Weber J L. Informativeness of human (dc-da)_n (dg-dt)_n polymorphisms [J]. *Genomics*, 1990, 7(4): 524—530

- [17] Guo B Y, Xie C X, Qi P Z, *et al.* Construction and identification of DNA libraries enriched for microsatellite repeat sequences of *Glyptosternum maculatum* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, **35**(6): 908—912 [郭宝英, 谢从新, 祁鹏志, 等. 黑斑原鲮微卫星 DNA 富集文库构建与鉴定. 水生生物学报, 2011, **35**(6): 908—912]
- [18] Jerry D R, Evans B S, Matt K, *et al.* Development of a microsatellite DNA parentage marker suite for black tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. *Aquaculture*, 2006, **255**(1—4): 542—547
- [19] Ren P, Wang Z Y, Yao C L, *et al.* Development of 11 polymorphic microsatellite loci in the small abalone (*Haliotis diversicolor Reeve*) [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2008, **8**(6): 1390—1392
- [20] Bernardi G, Mouchiroud D, Gautier C, *et al.* Compositional patterns in vertebrate genomes: Conservation and change in evolution [J]. *Molecular Evolution*, 1988, **28**(1—2): 7—18
- [21] Sueoka N. On the genetics basis of variation and heterogeneity of DNA base composition [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 1962, **48**(4): 582—592
- [22] Toth G, Gaspari Z, Jurka J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis [J]. *Genome Research*, 2000, **10**(3): 967—981
- [23] Xu P S, Wang L, Liu E, *et al.* Generation of channel catfish BAC end sequences for marker development and assessment of syntenic conservation with other fish species [J]. *Animal Genetics*, 2006, **37**(4): 321—326
- [24] Hauswaldt J S, Glenn T C. Microsatellite DNA loci from the diamondback terrapin (*Malaclemys terrapin*) [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2003, **3**(2): 174—176
- [25] Banks M A, Blouin M S, Baldwin B A, *et al.* Isolation and inheritance of novel microsatellites in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) [J]. *Journal of Heredity*, 1999, **90**(2): 281—288
- [26] Callen D F, Thimpson A D, Shen Y, *et al.* Incidence and origin of “null” alleles in the (AC)_n microsatellite markers [J]. *The American Journal of Human Genetics*, 1993, **52**(5): 922—927

ISOLATION AND GENETIC ANALYSIS OF MICROSATELLITE MARKERS FOR *LARIMICHTHYS CROCEA*

YE Hua^{1, 2}, REN Peng², LIU Yang², LIU Xian-De² and WANG Zhi-Yong²

(1. Fisheries Breeding and Healthy Cultivation Research Centre, Southwest University, Chongqing 402460, China; 2. Key Laboratory of Healthy Mariculture for East China Sea of Agriculture Ministry, PRC, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: We constructed an (AC)_n-microsatellite-enriched library for large yellow croaker *Larimichthys crocea* (Richardson 1846) using the method of FIASCO. Ninety clones were randomly selected for further colony amplification. The rate of positive clones reached to 66.7%, and 56 of the 60 positive clones sequences contained one or more SSR. By the analysis of repeat motif, dinucleotide repeats were the most dominant (91.1%), followed by trinucleotide repeats (8.9%). Among dinucleotides, (AC)_n repeats were the most frequent (94.1%). Using Weber's classification rules, the sequences were divided into three categories, the percentage of perfect repeat sequences, imperfect repeat sequences, and compound repeat sequences was 75.0%, 8.9%, and 16.1, respectively. Fifty two microsatellites primer pairs were designed and synthesized. The result showed that 35 SSRs were polymorphic in 46 F1 generation individuals. Twenty eight (80.0%) loci exhibited a segregation ratio of 1 : 1 (AB × CD/AB × AC), serving as the most useful markers segregating in co-dominant fashion. Six loci exhibited a segregation ratio of 1 : 1, and one loci exhibited a segregation of 1 : 2 : 1. Polymorphism analysis showed that 32 SSRs were consisted with Mendelian segregation ratio and could be used to construct the linkage map, while the other 3 SSRs (*LYC0137*, *LYC0139*, *LYC0152*) were departure from the expected Mendelian segregation patterns. These SSRs should be available for genetic linkage mapping, population genetics studies, molecular evolution and phylogenetic study of large yellow croaker.

Key words: *Larimichthys crocea*; Microsatellite-enriched library; Mendelian segregation patterns