

湖鲟微卫星 DNA 引物应用于中华鲟 亲子关系分析的初步研究

朱 滨^{1,2} 常剑波^{1,2} 谭细畅¹ 虞功亮¹ 肖从学³ 吴志强¹

(¹ 中国科学院水生生物研究所; ² 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072;

³ 加拿大多伦多大学动物学系, M4Y 1R5)

摘要 利用湖鲟(*Acipenser fulvescens*)的 4 对微卫星引物对中华鲟随机个体样本进行 PCR 扩增, 分析电泳结果发现, 4 对引物均可在中华鲟个体中得到稳定的同源序列, 其中 2 对引物所探测到的等位基因数目较多, 在个体间表现出较高的多态性, 利用它们产生的 DNA 指纹图谱, 能够对 1999 年度获得的中华鲟亲鱼样本进行有效的个体区分. 并且这两对湖鲟的微卫星引物在对 1999 年度已知亲本的同一家系中的中华鲟随机个体的分析中, 表现为按照孟德尔方式进行共显性遗传. 证明这 2 对微卫星引物可以用于鉴别中华鲟人工放流个体和自然繁殖个体.

关键词 中华鲟, 微卫星 DNA, 亲子鉴定

鱼类亲子关系的鉴定主要依靠合适的遗传标记. 早期使用的遗传标记主要是细胞抗原、同工酶电泳、限制性酶切片段长度多态性(RFLP)和随机扩增多态性 DNA(RAPD)等. 除 RAPD 外, 前述方法的多态信息含量普遍较低, 而随机扩增多态性 DNA 的重复性、稳定性和可比性又比较差, 在其结果的解释上存在很大的困难^[1]. 此后, 研究重点转向 VN-TRs 位点 (Variable Number Tandem Repeat loci), 即小卫星位点 (Minisatellite loci) 和微卫星 DNA (Microsatellite DNA). 小卫星位点对于样本 DNA 提取物的质量要求比较高, 且片段长, 难以获得; 而微卫星 DNA 对用于 PCR 扩增的 DNA 提取物的要求不高, 形式也更为简单, 部分降解的组织同样可以获得较好的扩增产物^[2].

微卫星 DNA 具有丰富的多态性和简单的遗传方式, 近年来已成为分子生态学的研究热点之一, 在遗传多样性的维持、濒危物种的保护、良种选育和基因作图等领域得到了广泛的应用. 目前国际上对鱼类微卫星位点的研究主要集中在区分种群、研究种群性质^[3-12]和物种进化^[13-15], 对于利用微卫星 DNA 进行鲟鱼类亲子关系鉴定的研究尚未见报道. 微卫星 DNA 的一个重要的潜在价值就是一个物种产生的引物有可能适用于相关的分类群^[16], 如果能证明某物种的微卫星引物在相关种中具有广泛的适用性, 那么既可以省去烦琐耗时基因组文库的构建, 同时可解决某些物种已知微卫星引物数目少的困难. 本工作旨在研究国外相关种鲟鱼微卫星引物对中华鲟的适用性, 并建立一种高度灵

收稿日期 1999-11-20; 修订日期 1999-12-21

基金项目 三峡工程生态环境保护项目[SX(98)15/KHBJJ], 淡水生态与生物技术国家重点实验室基金(批准号 1999FB02)和王宽诚教育基金.

作者简介 朱滨(1976-), 男, 湖北省宜昌市人, 硕士研究生

通讯作者 常剑波

敏、非损伤性的亲子鉴定方法,在此基础上鉴别中华鲟自然繁殖和人工繁殖的个体。

1 材料与方法

1.1 引物的选择 May 等从湖鲟的基因组文库筛选出 11 个微卫星位点,均为 3 或 4 碱基单位的重复序列,这些位点的引物在欧洲鲟(*Acipenser sturio*)、短吻鲟(*A. brevirostrum*)、高首鲟(*A. transmontanus*)、墨西哥湾鲟(*A. oxyrinchus desotoi*)、中吻鲟(*A. medirostris*)、苍铲鲟(*Scaphirhynchus albus*)等的个体中均能得到稳定的同源扩增产物^[5]。其中有 4 对微卫星引物(表 1)的扩增产物能够在与中华鲟亲缘关系最近的高首鲟和中吻鲟中表现出稳定的多态性^[17]。因此,我们选择这 4 对引物来研究它们对中华鲟(*Acipenser sinensis* Gray)的适用性,并对它们的亲子鉴定能力做出评价。引物由上海生工公司合成,每种引物为 5 个 OD 值,均经过 PAGE 纯化。

1.2 样本来源、收集和 DNA 的提取 中华鲟样本由葛洲坝中华鲟研究所提供。1999 年度用于人工繁殖的亲本全部在宜昌葛洲坝下江段捕获,用干净的剪刀采集的鱼体的胸鳍或尾鳍约 2-4cm²,浸没于无水乙醇中保存。另取当年孵化出 7d 的人工繁殖的子一代保存于无水乙醇中。每尾鱼取 1-1.5cm² 的样品(对当年的子一代,由于每尾长度只有 1cm,则整尾取样提取 DNA),尽量晾干样品中的乙醇后,按 CTAB 法提取中华鲟基因组 DNA^[18],待其完全溶解于 TE(PH=8.0)中后,用紫外分光光度计于 260nm 下测量 DNA 的浓度及纯度,并吸出适量 DNA 稀释到同样浓度备用,其余样品置于-20℃ 保存。

表 1 选用的 4 对湖鲟微卫星引物的基本性质

Tab.1 The characters of four pairs of microsatellite primers isolated from Lake sturgeon (*A. fulvescens*)

Locus	GenBank Accession	Insert size (bp)	Repeat motif	Clone size (bp)	MgCl ₂ (μmol/L)	dNTP (μmol/L)
LS-19	U72730	267	(TTG) ₉	133	1.5	175
LS-54	U72735	500	(GATA) ₆ (GACA) ₇	177	1.5	175
LS-57	U72736	1100	(GAA) ₂₉	206	1.5	100
LS-68	U72739	1500	(GATA) ₁₃	120	1.5	100

1.3 进行引物适用性研究时的 PCR 及电泳条件 用所选的 4 对湖鲟微卫星引物在 Amplitron II 型 PCR 仪上按如下程序进行扩增:94℃ 解链 5min;循环过程如下,94℃ 变性 1min、58℃ 退火 50s、72℃ 延伸 50s,共 35 个循环;72℃ 充分延伸 5min。反应总体积为 25μL,其中 Taq 酶 1unit(Bio-star 公司),每种引物的终浓度为 0.4μmol/L, dNTP(Promage 公司)终浓度为 100μmol/L 或 175μmol/L(表 1),MgCl₂ 终浓度为 1.5mol/L,每管加 DNA 模板 8-10ng, 10×Buffer(Bio-star)2.5μL。将扩增产物 15μL 与上样缓冲液均匀混合后点于 2% 的普通琼脂糖凝胶(5×10×0.5cm),于 1×TAE 的 Buffer 中,200V 下进行电泳 60min。将电泳结果由 EB 染色 20min 后,用蒸馏水漂洗 15min,在 Bio-Rad 公司的紫外凝胶图像处理系统上照相,初步判断是否能扩增出稳定出现的同源序列及其大小范围。每次进行扩增时,均设置阴性对照,并多次重复以验证结果。

1.4 进行个体鉴定和亲子分析时的 PCR 及电泳条件 此步骤的 PCR 条件同 1.3, 电泳介质采用 FMC 公司的高分辨率的 Metaphor Agarose Gel (分辨率达到 2%), 将可稳定扩增出同源带引物的 PCR 产物取 15 μ L, 与上样缓冲液按 1:5 混匀后点于 4% 的 Metaphor 琼脂糖凝胶 (10 \times 20 \times 0.5cm), 置于预冷的 0.5 \times TBE 缓冲液中, 按照厂家说明书中的最适条件电泳 3h. 同时采用水循环对电泳液进行冷却, 保持其在电泳过程中温度始终低于 25 $^{\circ}$ C. 将电泳结果由 EB 染色 20min, 用蒸馏水漂洗 15min, 采用 Bio-rad 公司的紫外凝胶图像处理系统照相.

2 实验结果

2.1 四对湖鲟微卫星引物对中华鲟随机个体的电泳图谱

2.1.1 引物 Ls-19 引物 Ls-19 在中华鲟不同个体中, 均可稳定的扩增出一条带, 且所有个体中所扩增出的带大小均相同 (图 1-a), 且高分辨率的 4% 的 Metaphor 琼脂糖凝胶电泳结果与图 1-a 相同.

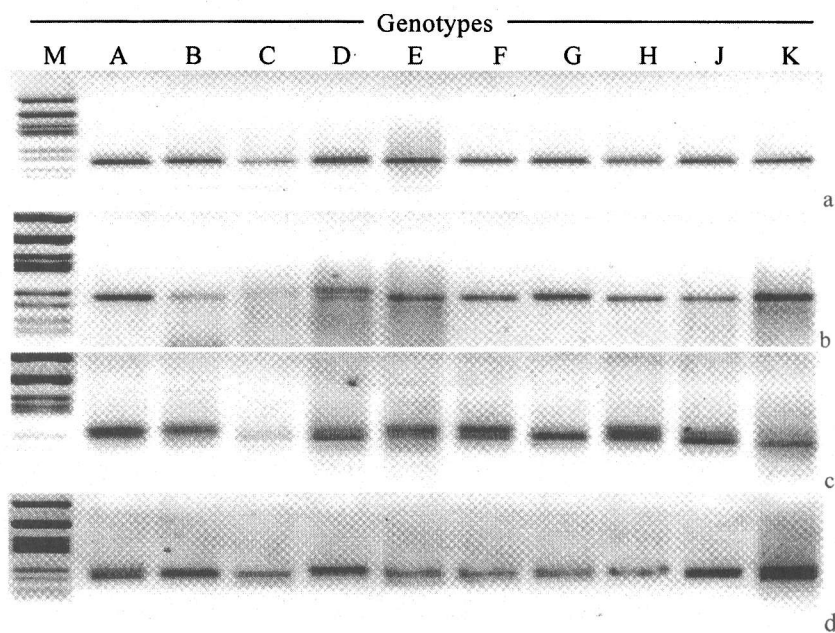


图 1 湖鲟 4 对微卫星引物在中华鲟随机个体中扩增产物于 2% 琼脂糖凝胶的电泳图谱 (右侧为标记) a. 引物 Ls-19; b. 引物 Ls-54; c. 引物 Ls-57; d. 引物 Ls-68.

Fig. 1 Four microsatellite primers' PCR products of randomly selected Chinese sturgeon running on 2% agarose gel a. Primer Ls-19; b. Primer Ls-54; c. Primer Ls-57; d. Primer Ls-68.

2.1.2 引物 Ls-54 引物 Ls-54 除在样品 C、D 中扩增出两条带外, 在其它个体中均只扩增出相同大小的一条带, 即该引物可以检测到中华鲟该微卫星位点上的 2 个等位基因 (图 1-b), 4% 的 Metaphor 琼脂糖凝胶电泳结果与图 1-b 相同.

2.1.3 引物 Ls-57 2% 的普通琼脂糖凝胶电泳结果表明, 引物 Ls-57 对中华鲟不同个

体均可稳定的扩增出 1 到 2 条较宽的亮带(图 1-c). 在使用 4% 的 Metaphor 琼脂糖凝胶作为分离介质后, 较宽的亮带被分离开(图 2-a), 每个个体均有 2-4 条带(123-217bp). 1999 年度的中华鲟亲鱼样本除个体 2 和 7, 个体 3、12 和 18 在该微卫星位点上具有相同的基因型外, 其余个体在该位点上均可以有效的被区分开, 且在该微卫星位点未发现纯合子.

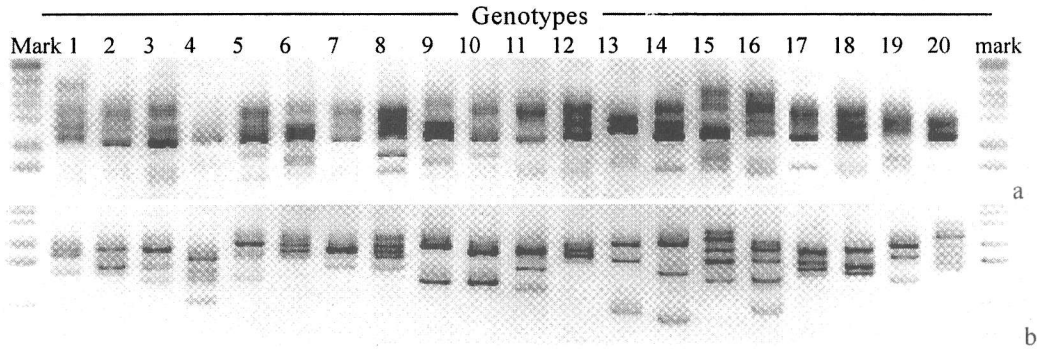


图 2 引物 Ls-57(a)、引物 Ls-68(b)对 1999 年度中华鲟亲本的扩增产物于 4% Metaphor 琼脂糖凝胶的电泳图谱(右侧为标记) a. 引物 Ls-57; b. 引物 Ls-68.

Fig. 2 Two microsatellite primers' PCR products of Chinese sturgeon sampled in 1999 running on 4% Metaphor agarose gel stained with Ethidium Bromide. a. Primer Ls-57; b. Primer Ls-68.

2.1.4 引物 Ls-68 引物 Ls-68 同样可以在中华鲟随机个体中得到稳定的扩增产物(图 1-d). 但与引物 Ls-57 的结果不同的是, Ls-68 的扩增产物在不同个体之间的差异要更明显, 1999 年度的所有的中华鲟亲鱼样本在该位点上表现出明显的差异(图 2-b), 引物 Ls-57 未能区分开的 5 个个体在该引物上也得到了有效的区分. 在 4% 的 Metaphor 琼脂糖凝胶电泳结果上, 可以辨认出该位点有至少 11 个等位基因(110-180bp), 且所有中华鲟亲鱼在该微卫星位点都是杂合子.

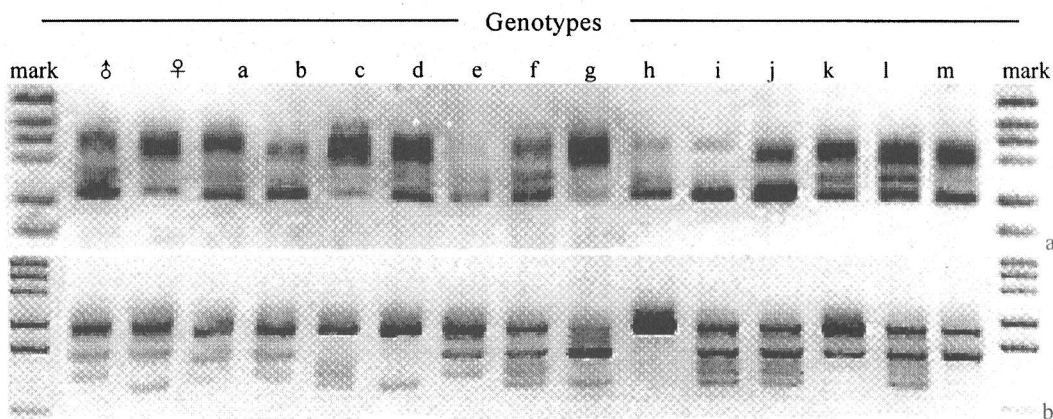


图 3 引物 Ls-57(a)、引物 Ls-68(b)对 1999 年度已知亲本的中华鲟子一代的扩增结果. a. 引物 Ls-57; b. 引物 Ls-68

Fig. 3 Ethidium bromide stained 4% Metaphor agarose gel of Chinese sturgeon products from 13 progeny from a family and their parents segregating for Ls-57(a) and Ls-68(b) sampled in 1999.

2.2 引物 Ls-57 和 Ls-68 对已知亲本的同一家系中华鲟个体的电泳图谱

中华鲟研究所于 1999 年 10 月对编号为 3(♂)和 11(♀)的中华鲟进行了人工繁殖(图 2),采集 13 尾子一代幼鱼及亲本样品,并在相同条件下用引物 Ls-57 和 Ls-68 对它们进行 PCR 扩增,电泳结果表明 13 个随机子一代在这两个微卫星位点上均得到了成功的扩增.在引物 Ls-57 对该家系子一代的 PCR 结果中,并没有观察到子代具有亲本所没有的带,即子一代个体所具有的带型都可以在双亲之一中找到(图 3-a),且 13 个子一代在该位点均呈杂合态.在引物 Ls-68 对该家系成员的扩增结果中,父本和母本只有一个等位基因的差异,除个体 i 和 j 外,所有个体的等位基因均来源于亲本(图 3-b).个体 i 和 j 既具有 2 个亲本的所有特征条带,但同时还出现了一条亲本所不具有的非 4 碱基突变带(Ls-68 位点为 4 碱基重复单位的微卫星,表 1).在位点 Ls-68 上,除个体 h 表现为纯合态外,其余个体均呈杂合态,突变个体占子一代随机样本总数的 15%.

3 分析及讨论

3.1 关于湖鲟的 4 对微卫星引物对中华鲟的适用性

四对湖鲟的微卫星引物均能够在中华鲟随机个体中稳定的扩增出相应的同源序列(图 1),其中引物 Ls-57 和 Ls-68 所探测到的等位基因数目较多,它们在中华鲟随机个体中一般可扩增出 2-6 条带(图 2),Ls-19 和 Ls-54 可扩增出 1 或 2 条带.所有引物的扩增重复性和稳定性都非常好,完全适用于中华鲟.引物 Ls-57 和 Ls-68 的扩增结果表明,这两个湖鲟的微卫星位点的侧翼序列在其相关物种中具有较强的保守性,在 May 等(1997)所测试的 8 种鲟鱼中,这两对引物的 PCR 结果也表现出较高的多态性^[5].

微卫星 DNA 的多态性来源于其核心序列的重复次数的变化.这四对引物除 Ls-68 和 Ls-57 在高首鲟和中吻鲟中表现为多态性外,其它两对引物在所研究的 8 种鲟鱼中均呈单态性^[5].引物 Ls-68 在湖鲟上的位点为 1-3 个,而当扩增中华鲟时,该引物在基因组上的可扩增位点明显增多,引物 Ls-68 在中华鲟基因组中所探测到的等位基因就有 11 个.研究表明,对于某些物种而言,重复次数较多的多态微卫星位点在相关种应用时,无论在种间还是在种内产生的多态性都比较丰富,而且,在种内,个体的遗传距离越远,多态性则越丰富^[19].湖鲟微卫星位点 Ls-57 和 Ls-68 核心序列的拷贝数分别为 29 和 13,都要高于位点 Ls-19 和 Ls-54.而重复次数较少的微卫星,仅可能在种间产生一定的多态性.

3.2 关于湖鲟的 4 对微卫星引物应用于中华鲟亲子关系鉴定

湖鲟的 4 对微卫星引物均能够在中华鲟随机个体中扩增到稳定的同源序列,除引物 Ls-19 外只得到一条带外,其余三对引物均能够在中华鲟基因组中探测到多于一个的等位基因.引物 Ls-57 和 Ls-68 所探测到的等位基因数目较多,表现出十分丰富的多态性,1999 年度所采集的所有中华鲟随机亲本在这 2 个位点可以有效的被区分开.在亲本能够被完全区分开的前提下,我们采用微卫星引物 Ls-57 和 Ls-68 对已知亲本家系中的子一代中华鲟随机个体进行分析,并将子代和父本、母本的基因型进行比较,结果表明,这 2 个微卫星 DNA 位点的确是按照孟德尔方式,进行共显性遗传的,且子一代个体的杂合度极高,子代中还存在一定的变异.我们没有发现与性别连锁遗传的等位基因,所以,这 2 个微卫星 DNA 位点是位于常染色体上.这 2 对湖鲟多态微卫星引物对中华鲟的适用性较理

想,而且具有比较强的亲子鉴定能力.利用它们所产生的高度特异性的 DNA 指纹图谱,可以鉴别中华鲟人工放流个体和自然繁殖个体.

对于子一代个体 i 和 j 在 Ls-68 位点上的非 4 碱基变异,由于数据有限,我们很难判断是一步变异或是多步变异的结果,这还有待于进一步研究更多的个体,并测定各等位基因的 DNA 序列才可弄清,而这对于了解中华鲟微卫星 DNA 的进化机制无疑是十分必要的.另外,在中华鲟人工放流的实际工作中,往往是多雄一雌、一雄多雌甚至多雄多雌进行人工繁殖,亲子关系复杂,区分开同一家系后代中不同的股群、划分个体属性及来源对微卫星位点的多态性要求很高.从这个角度而言,多态性较高且存在一定变异的微卫星 Ls-68 的作用可能更大.利用该微卫星引物产生的个体特异性 DNA 指纹图谱,我们可以选择遗传背景较远的个体为亲本,尽量减少个体间共有等位基因的出现的频率,从而降低亲子鉴定的难度.同时,分析更多的中华鲟个体,建立中华鲟的微卫星 DNA 指纹库,可以有效的控制中华鲟种群的遗传多样性并科学的指导人工放流.

3.3 关于引物 Ls-19 在中华鲟不同个体中扩增产物呈单态表现的意义

引物 Ls-19 从不同属性的中华鲟个体中均只扩增出一条带,且带的大小上没有区别,由于微卫星 DNA 遵循孟德尔方式,进行共显性遗传,表明中华鲟在该位点上只有一个基因.由于该引物在湖鲟、欧洲鲟、短吻鲟、高首鲟、苍铲鲟和湾鲟中表现出多态性^[5],其有可能位于一个结构基因的可转录非翻译区^[20].因侧翼序列在碱基组成上与湖鲟有较大的差异(如发生突变等),而造成引物 Ls-19 在突变处不能互补结合.因此,在这个位点上存在着一些进化上的限制,Ls-19 所扩增出这条带有可能是中华鲟这个种所具备的特征带,其在研究鲟鱼进化和系统发育上具有很重要的意义,我们将另文详细阐述.

参 考 文 献

- [1] O'Connell M, et al, Microsatellite DNA in fishes, *Review in Fish Biology and Fisheries*, 1997, 7:331-363
- [2] Ellegren H, et al, Bacterial coxII DNA typing of museum birds, *Nature*, 1991, 354:113
- [3] Manola C, et al. DNA Fingerprinting in Fish—A New Generation of Genetic Markers, *American Fisheries Society Symposium*, 1990, 7:514-520
- [4] Colbourne J K, et al, DNA fingerprinting of bluegill sunfish using (GT)_n microsatellite and its potential for assessment of mating success, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1996, 53:342-349
- [5] May B, Genetic variation at microsatellite loci in sturgeon: primer sequence homology in *Acipenser* and *Scaphirhynchus*, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1997, 54:1542-1547
- [6] Estoup A, et al. (CT)_n and (GT)_n microsatellites: A new class of genetic marks for brown trout, *Heredity*, 1993, 71:488-496
- [7] Cart R E, et al, The application of DNA fingerprinting in the analysis of gonogenesis of tilapia, *Aquaculture*, 1991, 95:41-52
- [8] Harris A, et al, DNA fingerprinting of tilapia, and its application to aquaculture genetics, *Aquaculture*, 1991, 92:157-163
- [9] Garcia de Leon, et al. Development and use of microsatellites in sea bass, *Mol Biol. Evol.*, 1995, 12:594-603
- [10] Morris D B, et al. Microsatellites from rainbow trout and its use for genetic study of salmonids, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1996, 53:120-126
- [11] Beacham T D, et al Application of microsatellite DNA variation to estimation of stock composition and escapement of

- Nass River sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Can J Fish Aquat Sci*, 1999, **56**:297-310
- [12] McConnell S K et al, Polymorphic microsatellites loci from Atlantic salmon :genetic differentiation of North American and European populations, *Can. J. Fish Aquat Sci.*, 1995, **52**:1863-1872
- [13] Goldstein D B et al, An evaluation of genetic distances for use with Microsatellite loci, *Genetics*, 1995, **139**:463-471
- [14] Nielse E E et al, Genetic variation in time and space: microsatellite analysis of extinct and extant populations of Atlantic salmon, *Evolution*, 1999, **53**(1):261-268
- [15] Neff B D et al, Microsatellite evolution in sunfish, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1999, **56**:1198-1205
- [16] Christian s et al, Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species, *Nature*, 1991, **354**:63-65
- [17] Tagliavin J et al, Mitochondrial DNA sequences of six sturgeon species and phylogenetic relationships within Acipenseridae, *J. Appl. Ichthyol*, 1999, **15**:17-22
- [18] Saghai-Marooof et al, Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1984, **81**:8014-8018
- [19] Smulders M J et al, Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species, *Theor Appl Genet*, 1997, **97**:264-272
- [20] Di Rienzo A, Peterson A C, Garza Valdes A M et al, Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 1994, **91**:3166-3170

APPLICABILITY OF MICROSATELLITE DNA PRIMERS OF LAKE STURGEON FOR THE PARENTAGE ANALYZING OF CHINESE STURGEON

Zhu Bin^{1,2}, Chang Jianbo^{1,2}, Tan Xichang¹, Yu Gongliang¹,
Xiao Congxue³ and Wu Zhiqiang¹

(¹*Institute of hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences;*

²*State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Wuhan 430072;*

³*Department of Zoology, University of Toronto, Toronto, Ontario M4Y 1R5, Canada)*

Abstract Four microsatellite loci of lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) were amplified from the selected individuals of Chinese sturgeon (*A. sinensis*) in random. All loci were amplified well and homologous sequences were obtained from all samples. One locus was monomorphic, and the others polymorphic. Among them, two loci were detected having over three alleles. Each individual of matured Chinese sturgeon captured in 1999 could be distinguished with the fingerprinting maps of the two microsatellite loci. This indicates that the two polymorphic microsatellite loci could be used for analyzing the parentage relationships of Chinese sturgeon, and thus differentiating individuals of the artificial released and the natural propagated ones.

Key words *Acipenser sinensis* (Chinese sturgeon), Microsatellite DNA, Parentage analysis