

铲鲟微卫星引物对中华鲟的适用性研究

邵昭君 赵娜 朱滨 周发林 常剑波

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: 将 21 对铲鲟 (*Scaphirhynchus platyrhynchus* Rafinesque) 的微卫星引物在中华鲟 (*Acipenser sinensis* Gray) 基因组 DNA 上进行 PCR 扩增, 14 对 (约占 67%) 引物得到了扩增产物, 其中有 10 对 (约占 48%) 表现为多态性, 但只有 2 对 (9.5%) 引物 Sp1 100 和 Sp1 168 的多态性较高, 且带型清晰, 可直接作为分子标记应用于相关的研究。此外, 对具有特异性扩增, 但有 Stutter band 现象的 4 对引物的部分可分离 PCR 产物进行了回收和测序, 并对其中的 3 对引物的序列进行了重新设计, 最后得到两对可应用于中华鲟的引物 As 100 和 Sp1 170b。研究结果表明, 对相近种的微卫星引物进行优化设计来获得一个物种的微卫星引物是一条简捷有效的途径。

关键词: 中华鲟; 铲鲟; 微卫星引物; 引物重新设计

中图分类号: 596.5.215 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2002)06-0577-08

在鲟鱼类微卫星的研究中, May 等在湖鲟的基因组文库中筛选出 11 个微卫星位点, 并在 6 种鲟属鱼类和 2 种铲鲟属鱼类上进行了测试^[1]。随后, McQuown 等又在铲鲟的 3 个亚基因组富集文库中选取 172 个克隆进行测序, 对其中的 113 个序列进行了引物设计, 最终得到 108 对特异性的微卫星引物, 并分别在苍铲鲟 (*Scaphirhynchus albus* Forbes & Richardson), 高首鲟 (*Acipenser transmontanus* Richardson), 湖鲟 (*A. fulvescens* Rafinesque) 和中吻鲟 (*A. medirostris* Ayres) 上进行了测试^[2]。朱滨等从 11 对湖鲟的微卫星引物^[12]中筛选出 4 对引物在中华鲟上进行了测试, 并评价了它们应用于中华鲟亲子关系分析研究的可行性^[3]。另外, Zhu 等利用从湖鲟的 3 个多态性较高的微卫星位点以及铲鲟的 Sp1 168 位点作为分子标记, 对中华鲟人工放流个体占长江口幼鲟群体的比例进行了估算^[4]。作者从铲鲟的 108 对微卫星引物中^[2], 选择 21 对引物对中华鲟基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 除筛选出对中华鲟可直接应用的微卫星引物外, 还对一些扩增效果不理想的引物进行了优化设计, 获得了对中华鲟具有高度特异性、有别于铲鲟的微卫星引物。本文是对这一研究的详细报道。

收稿日期: 2002-07-16; 修订日期: 2002-07-26

基金项目: 中国科学院生物科学与生物技术研究特别支持费 (STZ-00-14); 中国科学院知识创新工程项目 (KSCX2-F03) 资助

作者简介: 邵昭君 (1976—), 女, 浙江天台人; 硕士研究生; 研究方向: 鱼类分子生态学。shaozhaojun@21cn.com

通讯作者: 常剑波, E-mail: jibchang@ihb.ac.cn

1 材料与方法

1.1 中华鲟基因组 DNA 的提取 中华鲟样本为 2000 年 10 月从葛洲坝集团中华鲟研究所采到的 11 个亲本(2000 L-101, 2000-R 301, 2000-R-101, 102, 201, 202, 302, 303, 304, 305, 401)和 2000 L-101 与 2000 R 301 的 8 个子代(A1-1, A1-2, ..., A1-8), 以及 2001 年 12 月在中国水产科学院长江水产研究所采到的一对亲本 2001 L-9, 2001-R 8 和其 5 个子代(B-1, B-2, ..., B-5)。样本编号中的 L 表示雄鱼, R 表示雌鱼。亲本取肌肉或鳍条样本保存在无水乙醇中, 子代以整体保存在 80% 的乙醇中, 按 CTAB 法提取基因组 DNA^[5]。

表 1 14 对铲鲟微卫星引物在中华鲟的扩增条件及结果

Primer	GenBank Accession	Repeat motif	Annealing Tem- perature (Ta/℃)	PCR results	PCR product size (bp)	Allele number
Spt-16	AF276124	(TG) ₁₆	57	P/F	190—217	—
Spt-27	AF276135	(CA) ₂₁	57	M/G	270	1
Spt-42	AF276150	(TC) ₂₇	60	M/G	200—250	2
Spt-54	AF276162	(GA) ₅₀	63	P/F	200—250	—
Spt-100	AF276169	(TCTR) ₂₀	60	P/G	147—190	11
Spt-104	AF276173	(TCTR) ₁₂	58	Y	309—500	—
Spt-106	AF276175	(GATA) ₁₂ * (TAAA) ₉ (GAAA) ₄	60	P/F	180—240	—
Spt-114	AF276183	(TCTA) ₁₄	58	P/P	—	—
Spt-116	AF276185	(TATC) ₁₅ (TAGC) ₅ (TATC) ₂	60	P/P	—	—
Spt-123	AF276191	(CTAT) ₁₁ * 无 No	52	Y	210—270	—
Spt-163	AF276205	(GATA) ₁₇ * (GATA) ₇	58	P/F	160—217	—
Spt-168	AF276210	(TATC) ₁₈	58	P/G	201—309	6
Spt-169	AF276211	(TAGA) ₁₇	59	P/P	—	—
Spt-170a	AF276213	(GAT) ₅ (ATAG) ₁₁ * (GAT) ₁₀ (ATAG) ₁₅	58	P/F	190—309	—

注: M: 单态性; P(斜杠前): 多态性; Y: 非特异性扩增; G: 扩增效果很好; F: 等位基因较清楚, 但有 stutter band 现象; P: 或者尽管有特异性扩增, 但个体中等位基因很难分辨。星号(*): 该核心序列来自中华鲟, 短横杠(—): 无法确定。
Notes: M: monomorphic; P (before/): polymorphic; Y: non specific/ did not amplify in all individuals; G(good): Product amplification is considered good with clear and sharp alleles without stutter bands; F(fair): alleles were clear but stutter bands existed; P(poor): multiple loci amplified or individual alleles could not be distinguished although product amplification was evident; asterisk(*): the repeat motif had been found in Chinese sturgeon; (—): uncertainty. PCR products sizes were estimated by pBR322 DNA/Msp I Markers.

1.2 引物的来源 在 McQuown 等为铲鲟所设计的微卫星引物中, 根据这些引物在湖鲟、高首鲟、中吻鲟和铲鲟中扩增的结果, 选取在不同种类都能表现较高多态性, 且扩增效果较好的 21 对引物 (Sp1 16, Sp1 27, Sp1 42, Sp1 54, Sp1 100, Sp1 101, Sp1 102, Sp1 104, Sp1 105, Sp1 106, Sp1 113, Sp1 114, Sp1 116, Sp1 117, Sp1 123, Sp1 163, Sp1 168, Sp1 169, Sp1 170 α , Sp1 173, Sp1 176) 对中华鲟基因组 DNA 进行 PCR 扩增。引物由上海博亚生物技术有限公司合成, 每种引物为 2 个 OD 值, 均经过 PAGE 纯化。

1.3 PCR 扩增及电泳 PCR 扩增都采用 GeneAmp 2400 型 PCR 仪, 反应体系如下: 2 μ L 的 10 $\times$ buffer (Bio star 公司), MgCl₂ 终浓度为 1.5 mmol/L, 3.5 μ L 的 dNTP (Promage 公司, 浓度为 1.25 mmol/L), 各 2 μ L 浓度为 6 μ mol/L 的前引物和后引物, 0.5-1 单位的 Taq 酶 (Bio star 公司, 浓度为 2U/ μ L), 10-15 ng 的 DNA 模板, 加双蒸水补足到 20 μ L。PCR 反应热循环程序: 94 $^{\circ}$ C 变性 4 min, 进入循环: 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s (表 1) 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 充分延伸 6 min。将 10 μ L 的扩增产物与 1 μ L 上样缓冲液混匀后点在含有 EB 的 4% 的 Metaphor 琼脂糖凝胶上, 于 0.5 $\times$ TBE 缓冲液中, 5V/cm 的电压下电泳 2-3 h 或更长时间后, 在 Bio-Red 公司的紫外凝胶图像处理系统上成相后保存。分子量标记为 pBR322 DNA/Msp I Markers (华美生物工程公司)。

1.4 PCR 产物片段回收与 T 载体的连接与转化 PCR 产物的回收采用 QIAGEN 公司生产的胶回收试剂盒 (QIAquickTM Gel Extraction Kit)。T 载体选用大连宝生物公司的产品 pMD 18T vector。所有操作均按说明书上进行。将全量 10 μ L 的连接液转化至 100 μ L 自制的 Top10 感受态细胞中。转化按文献操作^[6]。

1.5 DNA 测序 将含有插入片段的菌液用引物 M13F(-47), 在 ABI PRISMTM 全自动基因分析仪上测序, 由上海博亚生物有限公司完成。

1.6 引物设计 遵循 PCR 引物设计原则^[7-8], 所用软件为 Primer premier 5.0 (PREMIER Biosoft International)。

1.7 序列比较 中华鲟与铲鲟对应位点间的序列比较及序列间差异值的计算都用 Clustal X v. 1.81^[9] 程序来完成, 铲鲟的序列是根据序列号在 Genbank 中查得。

2 结果

2.1 可在中华鲟上直接应用的铲鲟微卫星引物

将 21 对铲鲟微卫星引物对中华鲟基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 根据电泳结果不断优化反应程序, 调整退火温度及时间, 最终有 14 对引物在中华鲟上能得到 PCR 产物 (约占总数的 67%), 其中有 10 对引物 (约占 48%) 表现为多态性。但是, 在上述引物中只有 Sp1 100 和 Sp1 168 这 2 对引物 (约占总数的 9.5%) 在中华鲟上能稳定扩增, 电泳条带之间的界限清晰, 并具有较高多态性。引物 Sp1 100 在 10 个个体中共检测到 11 个等位基因, 引物 Sp1 168 在 10 个个体中共检测到 6 个等位基因, 2 对引物在来自一个家系的亲本与子代的扩增结果都表现出孟德尔共显性遗传方式 (图 1)。

除 Sp1 100 和 Sp1 168 外, 其他 12 对引物虽然也能在中华鲟上找到对应的结合位点, 并得到 PCR 产物, 但大部分表现出电泳条带之间界限模糊, 很难分辨不同的等位基因 (如 Sp1 16, Sp1 54, Sp1 106, Sp1 163, Sp1 170 α), 或者不同个体扩增的稳定性较差 (如 Sp1 104,

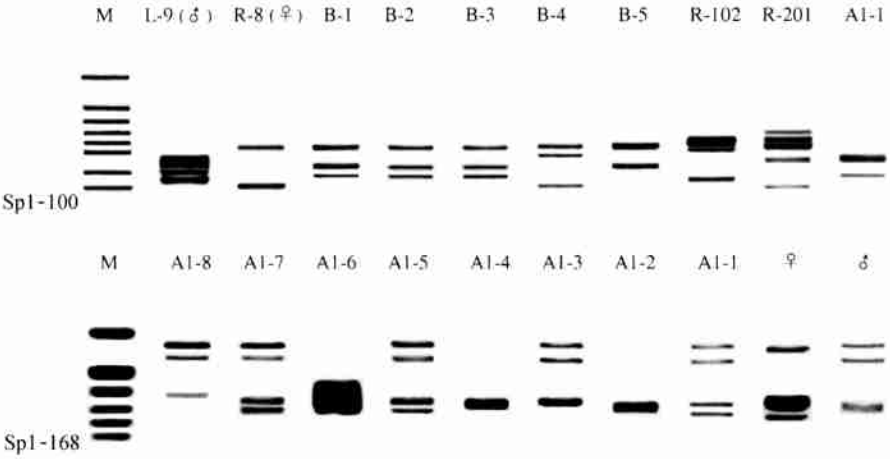


图 1 引物 Sp1 100 与 Sp1 168 在中华鲟上扩增的电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretic patterns of PCR products amplified by two primers in Chinese sturgeon

M: Marker; ♀ : 母本 Mother(R 301), ♂ 父本 Father(Lr 101), L: 雄鱼 Male,
R: 雌鱼 Female; B n or A1 n: 子代 Offspring

Sp1 123), 或者有非特异性扩增带存在(如 Sp1 114, Sp1 116, Sp1 169), 或者多态性较低(如 Sp1 27, Sp1 42)。Sp1 27 在所有个体中都只有一个等位基因, 说明这一位点是单态的, Sp1 42 则在每个个体中都检测到相同的两个等位基因, 可能此位点在该群体中均为杂合子, 或杂合子比例极高。

2.2 引物的优化设计

在上述引物中, 选取带型相对清晰, 多态性较高的 Sp1 106, Sp1 123, Sp1 163 及 Sp1 170α 等 4 对 PCR 产物进行测序, 发现引物 Sp1 123 结合的位点没有重复核心序列, 不是微卫星位点。用 Primer Premier 5. 0 程序对 Sp1 106, Sp1 163 和 Sp1 170α 的寡聚核苷酸序列进行重新定位和修改, 分别命名为 Sp1 106a, Sp1 163a 和 Sp1 170b(表 2)。在中华鲟上的 PCR 扩增结果显示, 引物 Sp1 106a 消除了 Sp1 106 中存在的 Stutter band 现象, 带型非常清晰, 但多态性略有下降(图 2); 引物 Sp1 163a 与 Sp1 170b, 没有找到更合适的引物结合位点, 因而在原引物的基础上, 手工修改少数碱基, 以消除二级结构, 使各项参数符合引物设计基本原则的要求。但 Sp1 163a 最终在中华鲟上没有得到 PCR 扩增产物, 而 Sp1 170b 的扩增效果得到了一定的改善(图 2)。

Sp1 106a 与 Sp1 106 在中华鲟中检测到的位点的核心序列为 (AAC)₂ (TAAA)₉ (GAAA)₄, 与在铲鲟中 Sp1 106 位点的核心序列(TAGA)₁₁ 不同。据此判断 Sp1 106a 是中华鲟的特异性引物, 故将其重新定名为 As 100。而 Sp1 163 与 Sp1 170α 这两个位点除侧翼序列有少数碱基的变异外, 它们在铲鲟与中华鲟之间是非常保守的。用 Clustal X v. 1. 81 程序进行序列比对的结果显示, 两种鲟鱼在上述四个位点的序列差异值分别为, 44. 90% (Sp1 123), 4. 07% (Sp1 106), 0. 59% (Sp1 163) 和 1. 75% (Sp1 170α)。

表 2 重新优化设计的中华鲟微卫星引物的基本性质

Tab. 2 The characteristics of three pairs of microsatellite primers redesigned for Chinese sturgeon

Primer	Repeat motif	Product size (bp)	(Ta) °C	Primer sequence (5'-3') Forward (upper), Reverse (lower)
As 100	(AAC) ₂ (TAAA) ₉	171(210)	58	GGGAGAAAAC TGGGCTAAA
Sp1 106a	(GAAA) ₄			CCAAAAGAAGAATGCTAGACGG
Sp1 163a	(TATC) ₇	159(169)	58	TGCTTGTAAACTGCCCCAC
				GTTCCTACAGCCGAGTCT
Sp1 170b	(ATCT) ₁₄ (ATC) ₁₁	247(247)	60	CACCAGACACGCAGATTTC
				GGACGCAGTAGACAGGCTTT

注: 表中第三列括弧里的数字表示原引物扩增产物的大小。The data bracketed in the third column are the products size produced by original primers.

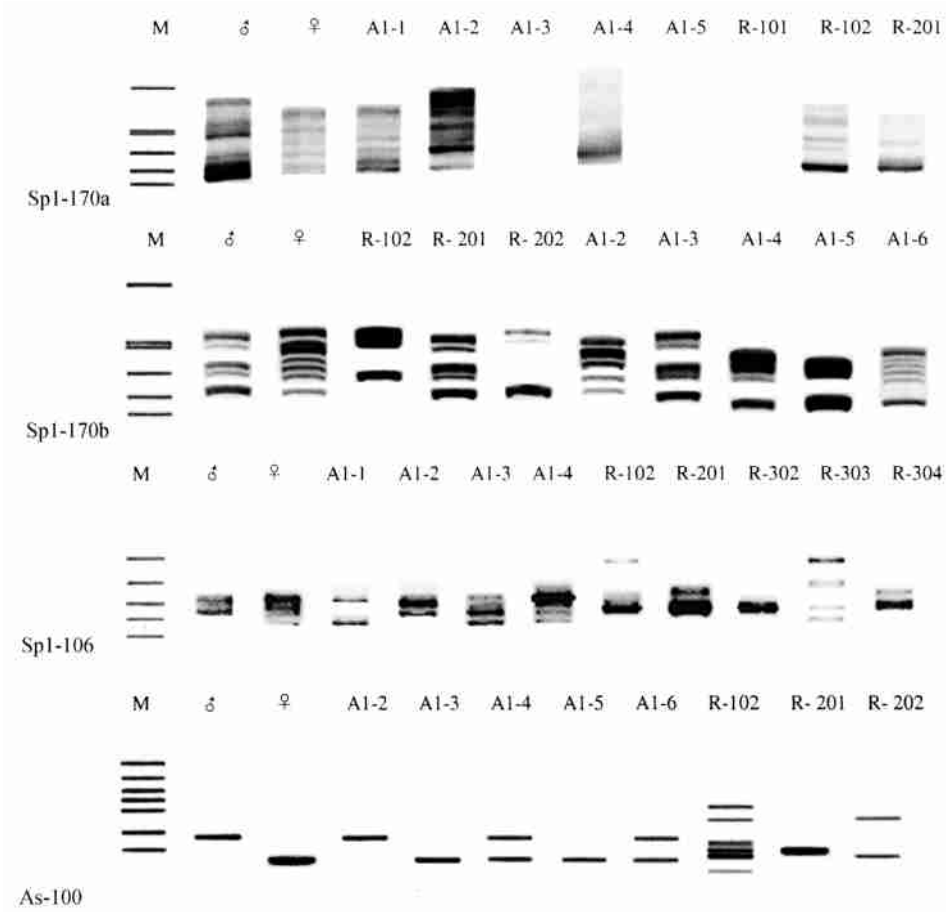


图 2 原始引物与优化设计引物在中华鲟上扩增结果的比较

Fig. 2 Comparison of PCR results generated by two redesigned primers (Sp1 170b & As 100) and two original primers (Sp1 170a & Sp1 106) in Chinese sturgeon.

♀: 母本 Mother(R-301), ♂: 父本 Father(L-101), R: 雌鱼 Female; A1: 子代 Offspring

3 讨论

微卫星位点在种间具有的保守性是其得以广泛应用的原因之一。因此,利用现有的 DNA 数据库资料(GENBANK, GDB, EMBL 等)和已发表的文章,从已知相近种的微卫星 DNA 的 PCR 引物中筛选是寻找一个物种微卫星位点的一个有效而简捷的途径。本文选用的 21 对铲鲟微卫星引物,67% 的引物能在中华鲟上扩增出 PCR 产物,其中 48% 表现为多态性。这一结果与 McQuown 等将铲鲟微卫星引物在鲟属其他种中测试的结果基本一致。108 对铲鲟引物中,能在高首鲟、湖鲟和中吻鲟中成功扩增的引物分别占 65%, 80% 和 68%, 表现出多态性的比例则分别为 42%, 58%, 47%^[2]。朱滨等将 11 对湖鲟的微卫星引物在中华鲟上进行测试,其中有 6 对(55%)能在中华鲟上稳定扩增,多态性较高的有 5 对(45%)^[3]。而 11 对湖鲟引物在高首鲟、中吻鲟和铲鲟上成功扩增的比率分别为 82%, 91% 和 82%, 多态性比率为 27%, 36% 和 65%^[1]。由此可见,虽然铲鲟微卫星引物在鲟属物种中成功扩增的比例比鲟属鱼类微卫星引物在其属内物种间成功扩增的比例小,但多态性位点的比例却不低。Primmer 等人曾试图建立起物种间微卫星位点的可用性与进化距离之间的相关关系,但还没有肯定的结论^[10, 11]。

尽管近缘种微卫星 DNA 引物扩增的成功率和多态性比例都较高,但可直接应用的引物必须是能得到可清楚分辨的等位基因^[4]。因此,从近缘种得到能直接应用的引物的机率往往不高。如根据 McQuown 等的数据进行统计,108 对铲鲟引物在高首鲟、湖鲟和中吻鲟上扩增,能得到清晰条带的引物所占的比例分别为 9.2%, 22.2% 和 11%, 在中华鲟上则只有 9.5%, 但铲鲟本身,这一比例达到 31.5%。说明大部分在铲鲟上扩增效果很好的引物,在其他鲟鱼上应用时不能得到同样的效果。目前许多研究都证明了与微卫星位点有关的引物序列的保守性^[10, 12-15],但大多数位点仍然是复杂而可变的^[11]。位点中变异的存在,可能是导致那些多态信息含量较高位点的引物,在近缘种之间扩增时出现 Stutter band 的主要原因。对这些位点的寡聚核苷酸序列进行适当修饰后,有可能消除 Stutter band,得到合适的特异性引物。如本文对 3 对铲鲟引物进行了优化设计后应用到中华鲟上,其中 Sp1 106a 和 Sp1 170b 都成功消除了 Stutter band。尽管 3 对引物中 Sp1 163a 没有得到 PCR 扩增产物,但通过重新优化设计的途径消除 Stutter band 的成功率($2/3=66.7\%$)还是相当高的。统计分析这 3 个位点在铲鲟与中华鲟间的 DNA 序列的差异(Sp1 106: 4.07%; Sp1 163: 0.59%; Sp1 170: 1.75%)则发现,微卫星引物序列在物种间的变异程度越高,优化设计成功的可能性就越大。但这些推测尚有待进一步的研究来证实。到目前为止,从相近种鲟鱼的微卫星引物中,共得到了 7 对在中华鲟上能稳定扩增,且多态信息含量丰富,电泳条带间界限分明的引物,其中有 3 对选自湖鲟^[3], 2 对来自铲鲟,还有 2 对是将铲鲟引物优化设计后获得(表 3)。

表 3 对中华鲟具适用性的 7 对引物的基本性质

Tab. 3 The characters of seven applicable micrasatellite primers in Chinese sturgeon

Primer	Original primer source	Repeat motif	Primer sequence (5'-3')		(Ta °C)	Range of product size (bp)	Allele number	Data source
			Forward	Reverse				
Afir 39	[1]	(GTT) ₁₀	TTCTGAAGTTCACACATTG	58	110—123	4(65)	[4]	
			ATGGAGCATTATTGGAAGG					
Afir 54		(GAT A) ₆ (GA CA) ₇	CTCTAGTCTTTGTTGATTACAG	58	160—180	5(55)	[3]	
			CAAAGGACTTGAAACTAGG					
Afir 68		(GACA) ₁₃	TTATTGCATGCTGTAGCTAAAC	58	110—160	11(52)		
			AGCCCAACACAGACAATATC					
SpF 100	[2]	(TCTR) ₂₀	CCATGCCTGTTCATAATTGTTT	60	147—190	11(10)	Results of this study	
			TTTTACCAATTGGGTGTTCA					
SpF 168		(TATC) ₁₈	CACTGATTGGCTACAACCGT	57	201—309	6(10)		
			AGAAGGACTTGCAGTCCGAA					
As 100		(AAC) ₂ (TAA A) ₉ (GAAA) ₄	GGGAGAAAACCTGGGTAAA	58	123—190	8(10)		
			CCAAAAGAAGAATGGTAGACGG					
SpF 170b		(GAT) ₁₀ (ATA G) ₁₅	CACCAGACACGGCAGATTTC	60	201—404	11(10)		
			GGACGCAGTAGACAGGCTTT					

The bracket numbers in allele number column are the number of individuals of Chinese sturgeon tested.

参考文献:

[1] May B, Krueger C C, Kincaid H L. Genetic variation at microsatellite loci in sturgeon: primer sequence homology in *Acipenser* and *Scaphirhynchus* [J]. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1997, **54**: 1542—1547

[2] McQuown E C, Sloss B L, Sheehan R J, et al. Microsatellite analysis of genetic variation in sturgeon (*Acipenseridae*): new primer sequences for *Scaphirhynchus* and *Acipenser* [J]. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 2000, **129**: 1380—1388

[3] 朱滨, 常剑波, 谭细畅等. 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[J]. 水生生物学报. 1999, **23**(6): 547—553

[4] Zhu B, May B, Zhou F, et al. Analysis of genetic variation in the Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*: estimating the contribution of artificially produced larvae in a wild population [J]. *J. App. Ichthyol.* (In press)

[5] Saghai Maroof M A, Soliman K M, Jorgensen R A, et al. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 1984, **81**: 8014—8018

[6] J·萨姆布鲁克, E·F·弗里奇, T·曼尼阿蒂斯著. 分子克隆实验指南. 第二版[M]. 北京: 科学出版社, 1998

[7] 周鹏. 引物间同源性和裂口对 PCR 扩增的影响[J]. 生命科学研究, 2000, **4**(1): 35—40

[8] Laurel V. George, Alkami biosystems primer design tips [M]. In: Alkami Quick Guide for PCR: A laboratory reference for the Polymerase Chain Reaction. Alkami Biosystems, Inc. <http://www.alkami.com/primers/refpmr.htm>, 1999. 19—21

[9] Thompson J D, Higgins D G and Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice [J]. 1994, *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673—4680

- [10] Primer C R, Möller A P, Ellegren H. A wide range survey of cross species microsatellite amplification in birds [J]. *Mol. Ecol.*, 1997, **5**: 365—378
- [11] Rosenbaum H C, Deinard A S. 三思而后行——对生态和进化生物学中微卫星分析的回顾[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [12] Morin P A, Moore J J, Chakraborty R, et al. Kin selection, social structure, gene flow, and the evolution of chimpanzees [J]. *Science*, 1994a, **265**: 1193—1201
- [13] Pépin L, Amigues Y, Lépingle A, et al. Sequence conservation of microsatellites between *Bos Taurus* (cattle), *Capra hircus* (goat) and related species. Examples of use in parentage testing and phylogeny analysis [J]. *Heredity*, 1995, **74**: 53—61
- [14] Strassman J E, Solis C R, Barefield K, et al. Trinucleotide microsatellite loci in a swarm founding neotropical wasp, *Parachartergus colobopterus* and their usefulness in other social wasps [J]. *Mol. Ecol.*, 1996, **5**: 459—461
- [15] Valsecchi E, Palsbøll P J, Hale P, et al. Microsatellite genetic distances between oceanic populations of the humpback whale [J]. *Mol. Biol. Evol.*, 1997, **14**: 355—362

APPLICABILITY OF MICROSATELLITE PRIMERS DEVELOPED FROM SHOVELNOSE STURGEON IN CHINESE STURGEON

SHAO Zhaojun, ZHAO Na, ZHU Bin, ZHOU Fulin and CHANG Jianbo

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract: Twenty-one pairs of microsatellite primers developed from shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platyrhynchus*) were tested on Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*). About 67% (14 loci) of the *S. platyrhynchus* primers amplified successfully with 48% (10 loci) being polymorphic. However, only 9.5% (2 loci) of these primers (Sp100 & Sp168) produced clear and sharp products without stutter bands. Several amplified fragments produced by four pairs of the rest primers, which generated stutter bands in Chinese sturgeon, were sequenced. One of these four loci (Sp123) was proved without repeat motif. Then, the other three, Sp106, Sp163, and Sp170a, were redesigned with *Primer premier 5.0* software and renamed as Sp106a, Sp163a, and Sp170b. Further amplifications using these primers in Chinese sturgeon showed that Sp106a and Sp170b could give clear and polymorphic bands without any stutter, but Sp163a did not get any bands. Moreover, motif sequences obtained by both Sp106 and Sp106a in Chinese sturgeon are the same but differ to those in shovelnose sturgeon. It seems that the redesigned primer Sp106a could be a species-specific primer for Chinese sturgeon, and we finally renamed it as As100. This result indicates that it is viable to obtain species-specific microsatellite primers by redesigning from the primers of related species.

Key words: *Acipenser sinensis*; *Scaphirhynchus platyrhynchus*; Microsatellite primer; Primer redesign