

一种筛选微卫星位点的改进方法及其在小熊猫微卫星基因文库构建上的应用

艳 丽 · 刘志瑾* 魏辅文 李 明**

(中国科学院动物研究所, 北京, 100080)

摘要: 微卫星基因位点是在各个遗传学领域被广泛使用的分子标记。而对于首次研究的物种, 必须筛选出可以应用的微卫星位点。对于分离微卫星位点来说由于只有大约 0.5% ~ 2% 的重组体含有微卫星位点, 所以标准的基因组文库需要至少产生 5 000 个重组体。传统的筛选方法就是通过检测大量重组体来定位这些少量的位点。近几年来出现了一些新的筛选方法, 采用“富集”微卫星序列的技术将包含微卫星位点的重组体比例提高了 10 ~ 100 倍。这样就降低了筛选工作的时间和劳动强度, 大大提高了筛选微卫星位点的效率。本文在结合了几种筛选微卫星位点技术路线的基础上, 采用生物素标记探针杂交、富集和 PCR 筛选技术, 对原有技术路线进行了改进。主要实验步骤为: 1) 基因组 DNA 的提取和消化; 2) 生物素标记探针富集; 3) 克隆建库; 4) “PCR”筛选; 5) 引物设计和多态性检测。新的方法在小熊猫微卫星基因文库的构建中取得成功, 获得了 10 个具有多态性的 (CA)_n 重复序列微卫星位点。

关键词: 微卫星; 基因组文库; 筛选; 小熊猫

中图分类号: Q954.53

文献标识码: A

文章编号: 1000 - 1050 (2005) 04 - 0339 - 06

An Improved Method for Isolation of Microsatellite DNA and Application In Red Panda (*Ailurus fulgens*)

YAN Li LIU Zhijin* WEI Fuwen LI Ming**

(Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100080, China)

Abstract: Microsatellite loci have become one of the most popular molecular markers used in many genetics fields. However, it is crucial that polymorphic microsatellite loci need to be selected or isolated for the studied species at first. The task of microsatellite isolation can be quite involving in terms of effort and time because it traditionally consists of screening genomic libraries with appropriate probes. The number of positive clones that can be obtained by means of this traditional method usually ranges from 14% to less than 0.04%. Several new protocols, based on the “enrichment” protocol, have appeared in the last few years, which can increase the number of positive clone, but the high cost and complexity counteract their applicability. Thus, we proposed an economical and easy protocol, which was a combination and amelioration of different methods, based on “biotin ligated primer”, “enrichment” and “PCR Screening” protocols. The main step involves: 1) Isolation and Digestion of the Genomic DNA, 2) Enrichment using the “biotin ligated primer”, 3) Clone and Lib construction, 4) “PCR Screening”, and 5) Primer design and Variability test. Using this new method, we have isolated and characterized 10 polymorphic (CA)_n microsatellite loci in red panda (*Ailurus fulgens*), and these loci of high variability and stability will be useful in population genetic studies of red panda.

Key words: Genomic DNA library; Isolation; Microsatellite; Red panda (*Ailurus fulgens*)

微卫星 (Simple Sequence Repeat, SSR) 是在原核生物和真核生物基因组中广泛存在的随机短片断重复序列, 在编码区和非编码区均有分布, 重复单位 1 ~ 6 个碱基不等, 如 (CA)_n、(ACC)_n 等。微卫

星标记便于分型, 多态性高, 在众多遗传学研究领域得到越来越广泛的应用 (Litt and Luty, 1989; Tautz, 1989; Weber and May 1989)。在对多个物种的基因组绘图中, 微卫星位点已被证明是非常有价值

基金项目: 国家杰出青年基金资助项目 (30125006); 国家自然科学基金资助项目 (30230080 和 30270215); 中国科学院知识创新工程项目 (KSCX2-1-03)

作者简介: 艳丽, 女, 硕士研究生, 主要从事濒危哺乳动物保护遗传学研究。

收稿日期: 2005 - 01 - 07; **修回日期:** 2005 - 05 - 15

* 同为第一作者

** 通讯作者, correspondence author, E-mail: lim@ioz.ac.cn

的遗传标记。

然而对于首次研究的物种, 必须筛选出可以应用的微卫星位点。使用传统方法筛选微卫星位点的工作是非常繁琐的, 得到的阳性克隆数目只占到总数的 0.04% ~ 14% 不等 (Toth *et al.*, 2000), 并且这种方法只对微卫星位点丰富的物种 (如脊椎动物) 适用, 得到的位点数也有限。而在进行群体调查和亲缘鉴定时, 如果等位基因数目足够多, 那么相对少的微卫星位点 (一般少于 7 个) 也可以得到较好的结果 (Benatchez and Duchesne, 2000)。但是统计结果的可信性不仅基于微卫星位点的多少, 还基于每个位点的多态性和样本数的多少。所以, 利用有限数量的微卫星位点来进行研究很难得到满意的结果 (Cooper *et al.*, 1997)。为了提高筛选微卫星位点的效率, 近几年来国外学者设计了一些新的方法, 采用“富集”微卫星序列的技术, 大大提高了筛选微卫星位点的效率 (Kandpal *et al.*, 1994)。但是这些方法所需的仪器、药品及试剂盒国内实验室不易得到, 且价格不菲。本文在结合了几种筛选微卫星位点技术路线的基础上, 提出了一种快速有效且经济的改进方法, 并在小熊猫 (*Ailurus fulgens*) 微卫星基因文库的构建中取得成功。

1 材料与方 法

1.1 材 料

7 只小熊猫血液样品采自合肥野生动物园, 加柠檬酸抗凝剂后 - 70℃ 保存 (Gustafson *et al.*, 1987)。8 只小熊猫的肌肉样品采自四川省蜂拥寨野生动物园, - 20℃ 保存; 11 只小熊猫的皮张样品来自林业公安部门收缴的皮张 (5 个来自四川, 3 个来自云南, 1 个来自西藏), 常温保存。

1.2 方 法

1.2.1 基因组 DNA 的提取

所有个体基因组 DNA 均采用传统酚-氯仿抽提 (Sambrook *et al.*, 1989), 采用一个血液样品基因组 DNA 作为建库材料, 其余 DNA 样品用于今后的多态性分析。

1.2.2 基因组 DNA 的酶切

加入 2 ~ 3 U *Mob* I 消化血液样本基因组 DNA 约 3 μ g, 37℃ 温育过夜。反应结束时, 取 5 μ l 反应液和 DNA Maker 在 1% 琼脂糖凝胶中电泳。应该出现从小片段到大片段的连续图谱。使用纯化试剂盒 (Promega) 纯化剩余的酶切产物以去除 *Mob* I, 50 μ l ddH₂O 溶解 DNA。

1.2.3 富集

1.2.3.1 连接 Linker 和基因组 DNA 酶切产物

200 ng DNA 片段加入 2 μ g 退火 linker 序列, 使用 T4 Taq 聚合酶将二者连接。Linker 按照 Hamilton (1999) 的方法用 SAULA (5' - GCGGTACC-CGGGAAGCTTGG - 3') 和 SAULB (5' - GATCC-CAAGCTTCCCGGGTACCGC - 3') 合成。

1.2.3.2 连接产物的扩增

使用 SAULA 或 SAULB 作为引物, Linker 和基因组 DNA 片段连接产物作为模板进行扩增, 反应体系为: 10 \times Buffer 5 μ l, 4 μ l dNTP (10 mM), 4 μ l MgCl₂ (20 mM), *Taq* 酶 (TaKaRa 公司, 5 U/ μ l) 1.25 μ l, SAULA 或 SAULB (10 mM) 2 μ l, BSA (10 mg/ml) 0.5 μ l, 1 ~ 5 μ l 模板 DNA, 使用 ddH₂O 将反应体系补至 50 μ l。循环条件为: 72℃ 5 min; 95℃ 变性 30 s, 67℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2 min, 35 个循环后 72℃ 补齐 5 min。注意此反应要有阴性对照, 其中不加入模板 DNA, 其它条件相同。PCR 反应结束后取 5 μ l 反应液在 1% 琼脂糖凝胶中电泳检测。

1.2.4 片段筛选

取剩余 PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶中电泳, 切下 400 ~ 1 000 bp 的片段, 使用凝胶回收试剂盒 (Promega) 回收 DNA, 50 μ l ddH₂O 溶解 (Kandpal *et al.*, 1994)。

1.2.5 (CA)_n 重复序列的获取

1.2.5.1 PCR 产物与生物素标记的微卫星探针杂交

将 PCR 产物加入 1.5 ml 离心管, 沸腾 10 min 以变性, 之后立即在冰上冷却。加入 5 μ g 结合了生物素的微卫星探针 5' - biotin - ATAGAATAT (CA)₁₅ - 3' (Kandpal *et al.*, 1994), 并加磷酸钠缓冲液至 500 μ l。在 50℃ 下缓慢摇动 5 ~ 18 h 杂交。

1.2.5.2 与生物素吸附剂结合

(1) 将 50 mg 生物素吸附剂 (Vectrex-Avidin) 加入 15 ml 离心管中, 并加入 5 ml Buffer A (150 mM NaCl, 100 mM Tris, pH 7.5), 室温振荡 30 min。3 000 r/min 离心 2 min, 弃上清, 用 10 ml Buffer A 重悬生物素吸附剂 (Hammond *et al.*, 1998)。

(2) 生物素吸附剂溶液中加入杂交产物。缓慢震动 30 ~ 40 min, 使二者充分结合。3 000 r/min 离心 2 min, 小心弃上清液, 保留沉淀物。

1.2.5.3 洗脱 (CA)_n 重复序列

(1) 用 4 ml 0.1 \times Buffer A 重悬沉淀物, 55℃ 30 min, 离心弃上清。再加入 4 ml ddH₂O 重悬沉淀, 65℃ 30 min。65℃ 高于探针 T_m 10℃, 使目标

基因组 DNA 从生物素吸附剂中分离, 探针仍与生物素吸附剂结合 (Hammond *et al.*, 1998)。

(2) 12 000 g 离心 5 min, 吸取上清液至新的 2.0 ml 离心管。将上清液通过纯化柱 (Promega)。再用 50 μ l ddH₂O 溶解。

(3) 对单链 DNA 进行 PCR 扩增, 反应体系为: 10 \times Buffer 5 μ l, 4 μ l dNTP (10 mM), 4 μ l MgCl₂ (20 mM), *Taq* 酶 (TaKaRa 公司, 5U/ μ l) 1.25 μ l, SAULA 或 SAULB (10 mM) 2 μ l, BSA (10 mg/ml) 0.5 μ l, 1~5 μ l 模板 DNA, 使用 ddH₂O 将反应体系补至 50 μ l。循环条件为: 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 67 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 补齐 5 min。

1.2.6 微卫星序列的克隆、筛选及引物设计

1.2.6.1 克隆

使用 p-GEM-T 克隆试剂盒 (Promega) 将上一步 PCR 产物克隆。将连接了微卫星片段的载体转化到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109 菌株中。在摇床中震荡 37 $^{\circ}$ C 8 h。转移到含有 AMP、IPTG、X-GAL 的平板培养基上, 在培养箱中 37 $^{\circ}$ C 培养 8 h。挑取白色单菌落 (阳性克隆), 每个在 1 ml LB 液体培养基中活化 8 h。

1.2.6.2 PCR 筛选阳性克隆

使用 p-GEM-T 载体克隆位点两端的 M13 引物和微卫星探针序列 (CA)₁₀ 进行筛选。每一个阳性克隆同时进行 2 次 PCR 反应。反应体系分别为: A) 200 nM dNTPs, 100 pM M13 正向引物, 100 pM M13 反向引物, 100 pM (CA)₁₀, 1.5 nM MgCl₂, 0.6 U *Taq* 聚合酶 (Promega), 1 \times PCR Buffer, 1.0 μ l 菌液, 加 ddH₂O 补至 25 μ l; B) 200 nM dNTPs, 100 pM M13 正向引物, 100 pM M13 反向引物, 1.5 nM MgCl₂, 0.6 U *Taq* 聚合酶 (Promega), 1 \times PCR Buffer, 1.0 μ l 菌液, 加 ddH₂O 补齐 25 μ l; 反应时间为: 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 补齐 5 min。对于一个克隆, B 反应的 PCR 产物长度 > 300 bp, 说明克隆成功。如果 A 反应在 B 反应的基础上多出一条较短的 PCR 产物, 说明此克隆含有 (CA)_n 重复序列 (Lunt *et al.*, 1999)。

1.2.6.3 引物设计

将含有 (CA)_n 重复序列的克隆进行测序, 根据 (CA)_n 重复序列两侧的保守侧翼序列, 使用 Oligo™ 6.0 软件 (Molecular Biology Insights) 进行引物设计。

1.2.7 多态性检测与基因分型

使用设计的荧光引物对不同小熊猫个体的基因组 DNA 进行扩增, 反应体系为: 10 \times Buffer 5 μ l, 4 μ l dNTP (10 mM), 4 μ l MgCl₂ (20 mM), *Taq* 酶 (TaKaRa 公司, 5 U/ μ l) 1.25 μ l, 每对引物 (10 mM) 各 1 μ l, BSA (10 mg/ml) 0.5 μ l, 1~5 μ l 模板 DNA, 加 ddH₂O 补至 50 μ l。反应时间为: 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55~58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 补齐 15 min。

使用 ROX 500 内标在 ABI PRISM 3100 测序机 (Applied Biosystems) 对荧光标记的 PCR 产物进行基因分型 (GENESCAN), 然后用 GeneScan version 2.0 (Applied Biosystems) 软件对基因片断大小进行多态性分析。

2 结果

通过酚-氯仿抽提, 得到 24 个个体的基因组 DNA。血液样品抽提的基因组 DNA 质量较好, 很少降解 (图 1)。肌肉样品和皮张样品的基因组 DNA 有所降解 (图 2)。

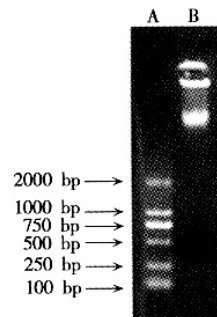


图 1 小熊猫血样基因组 DNA 电泳图

A: DL 2000 Marker; B: 血液基因组 DNA

Fig.1 Electrophoresis map for Genomic DNA from blood of *Ailurus fulgens*

A: DL 2000 Marker; B: Genomic DNA from blood

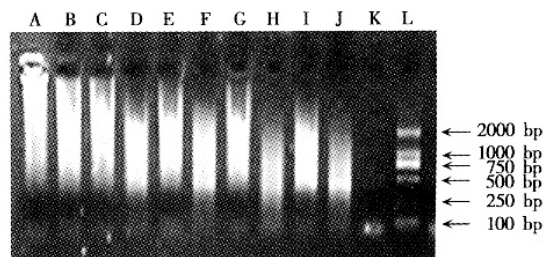


图 2 小熊猫肌肉和皮张提取 DNA 电泳图

A~K: 肌肉和皮张提取的 DNA; L: DL 2000 Marker

Fig.2 Electrophoresis map for genomic DNA from muscles and skins of *Ailurus fulgens*. A~K: Genomic DNA from muscles and skins; L:

DL 2000 Marker

取血液样本的基因组 DNA 的酶切产物5 μDNA Maker 在 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 出现从小片段到大片段的连续图谱 (图 3)。

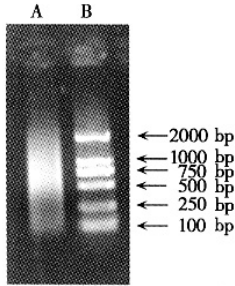


图 3 基因组 DNA 消化产物电泳图

A: 消化产物; B: DL 2000 Marker

Fig.3 Digested genomic DNA alongside DNA marker

A: Digested Genomic DNA; B: DL 2000 Marker

通过对酶切产物的 PCR 扩增, 得到了富集的基因组 DNA 片断, 取5 μl PCR 反应产物在 2% 琼脂糖凝胶中电泳, 出现明亮的连续图谱, 且阴性对照为空白 (图 4)。

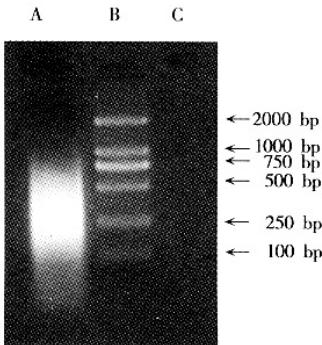


图 4 连接产物 PCR 电泳图

A: 连接产物 PCR 结果; B: DL 2000 Marker; C: 阴性对照

Fig.4 Electrophoresis map for PCR result of ligated DNA

A: PCR result of ligated DNA; B: DL 2000 Marker; C: Control sample

经过生物素吸附后, 回收的 DNA 单链经过 PCR 扩增后, 取5 μl PCR 反应产物在 2% 琼脂糖凝胶中电泳, 得到分子量在 400 ~ 1 000 bp 的明亮弥散条带 (图 5)。此次 PCR 产物中富含微卫星片断。阴性对照应为空白。

取5 μl PCR 筛选的反应产物在 2% 琼脂糖凝胶中电泳, 根据电泳图谱判断其中是否含有 (CA)_n 重复序列。

以 5' - biotin - ATAGAATAT (CA)₁₅ - 3' (Kandpal et al., 1994) 为探针, 对小熊猫进行微卫星基

因位点建库, 获得了 458 个克隆, 其中 68 个呈阳性, 富集率达到 14.8%。将阳性克隆测序后, 其中 21 个含有较长的 (CA)_n 重复序列 (n ≥ 8; 一般重复序列越长, 多态性越好)。针对这 21 个序列设计特异性引物, 并对 24 个小熊猫个体的基因分型, 其中 10 个位点具有多态性, 其序列结果已提交 GenBank, 序列登录号为 AY685403 ~ AY685412, 其它具体数据见表 1 (Liu et al., 2005)。

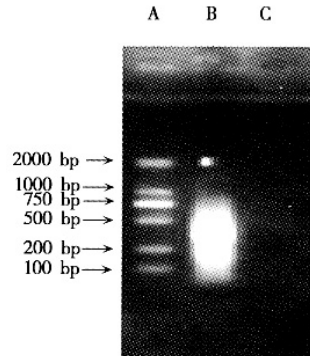


图 5 富集产物 PCR 结果电泳图

A: DL 2000 Marker; B: PCR 产物; C: 阴性对照

Fig.5 PCR results of enriched DNA. A: DL 2000 Marker; B: PCR result of enriched DNA; C: Control sample

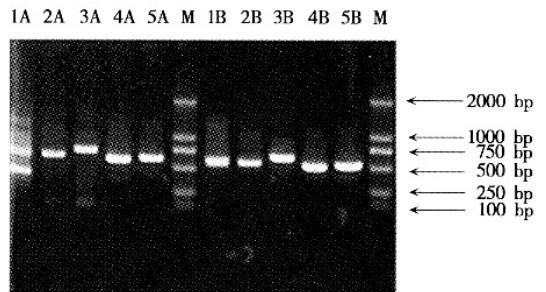


图 6 PCR 筛选阳性克隆结果电泳图; 1 号克隆含有 (CA)_n 重复序列

Fig.6 PCR screening of clones. No.1 clone indicates a microsatellite

我们使用 GENEPOP (3.40) 软件分析了种群遗传学数据 (Raymond and Rousset, 1995), 每个位点的等位基因 3 ~ 12 个不等, 有 7 个位点具有 7 个以上 (含 7 个) 的等位基因; 同时这些位点的观察杂合度从 0.50 到 1.00, 期望杂合度从 0.60 到 0.90 不等。说明其具有高度的多态性, 并且每个位点之间没有显著的连锁关系 (P > 0.05, Fisher 检测), 非常适合进行种群遗传学研究。

表 1 小熊猫微卫星位点数据

Table 1 Characterization of rad panda microsatellite locus

位点 Locus	重复序列 Array	片断大小 Size (bp)	等位基因数 No. of alleles	退火温度 T _a (°C)	观察杂合度 H _O	期望杂合度 H _E	P-value	GenBank 序列号 GenBank Accession no.
RP-1	(GT) ₅ AT (GT) ₁₀	159-207	11	58	0.84	0.86	0.240	AY685403
RP-11	(AC) ₁₂	131-135	3	58	1.00	0.60	0.000	AY685404
RP-20	(AC) ₃ AA (AC) ₁₈	225-245	10	55	0.88	0.85	0.636	AY685405
RP-101	(AG) ₂₀	156-176	10	58	0.89	0.80	0.038	AY685406
RP-102	(CG) ₄ (TG) ₁₀	199-211	4	58	0.68	0.61	0.814	AY685407
RP-108	(TG) ₃ (CA) ₃ CTTA (CA) ₁₆	226-264	12	55	0.89	0.90	0.195	AY685408
RP-133	(AC) ₁₆	205-225	11	58	0.85	0.84	0.003	AY685409
RP-137	(AC) ₁₆ (AG) ₁₂	147-159	7	55	0.60	0.78	0.035	AY685410
RP-215	(TG) ₁₅	371-375	3	58	0.50	0.60	1.000	AY685411
RP-219	(GC) ₁₀ (AC) ₃₀	194-228	10	58	0.77	0.88	0.018	AY685412

3 讨论

构建动物 DNA 基因文库的技术路线为: 1) 目标动物基因组的提取和片段化; 2) 目标片断的富集; 3) 文库的构建; 4) 筛选; 5) 微卫星位点引物设计及多态性检测。本方法的主要原理是利用生物素标记的微卫星探针, 对分子量大小合适的 DNA 片断进行杂交, 含有微卫星序列的片断被选择, 然后将选择的 DNA 片断进行 PCR 扩增以富集, 达到提高筛选效率的目的。我们摒弃了传统方法中实验要求过高的步骤和价格过高的药品, 根据实际情况对传统方法进行了改进。改进方法并没有改变实验的可靠性和重复性。从实验结果看, 每一步都取得了正确的结果, 同时筛选效率提高至 14.8%, 这已大于传统方法富集效率的上限; 传统方法需要至少筛选 5 000 个克隆才能得到足够的位点, 而本方法筛选了 458 个克隆就得到了 10 个多态性位点。这些都证明新的改进方法是有效可行的。

本研究方法与传统方法相比主要的改进之处表现在以下几个方面:

第一, 生物素标记的微卫星探针的应用。以往筛选微卫星的方法一般在克隆前不进行富集或者利用印迹杂交、放射性自显影等技术达到富集的目的。这些方法都存在明显的不足之处。前者要从大量的重组体中找到含量很低的目的 DNA 片段, 耗时长并且成功率低。后者操作过程复杂繁琐另外对实验室的条件有很高的要求。生物素标记的微卫星探针在此显示出了极大的优越性。只要通过几步简单的操作就能得到富含微卫星位点的 DNA 片段。本方法中使用到的实验技术有 DNA 提取、酶切、电泳、PCR、克隆等, 均为常规分子生物学方法, 使用到的仪器主要有高速离心机、恒温水浴

锅、PCR 仪、超静工作台, 所用药品试剂国内均可购得, 价格也相对便宜。这些仪器和药品对一般分子生物学实验室均能满足。特别值得一提的是, 我们使用 PCR 筛选方法而没有使用传统的放射性同位素杂交法, 降低了实验成本, 缩短了实验周期, 同时也避免了放射性同位素对试验人员的潜在危害。另外本研究中在酶切片断两端添加了 linker, 其目的是能方便地对富集到的片断进行 PCR 扩增, 从而弥补了在实验操作中 DNA 片段的损失, 保证了有足够的 DNA 进行克隆。

第二, 酶切后对 DNA 片断大小的选择。克隆时载体总是优先与小片断的外源 DNA 结合。因此最后筛选到的微卫星片断就可能包含的侧翼序列太短而无法设计引物。为了避免这种情况发生, 我们在酶切后对 DNA 片断的大小进行了选择, 只选择 300~1 000 bp 的片断, 排除了小片断对后续实验的影响。

第三, 筛选阳性克隆中的改进。我们利用了三引物法对单克隆菌株进行筛选, 即用一对 M13 引物和一个微卫星特异引物进行菌落 PCR。其中 M13 引物的作用是显示克隆进载体的外源 DNA 片断大小, 微卫星特异引物的作用是验证外源 DNA 片断中是否含有微卫星位点。传统方法或使用放射性探针杂交筛选, 或对全部克隆都进行测序。前者试验步骤繁琐, 且涉及放射性物质的使用, 具有一定的危险性; 后者要花费大量资金, 既不经济也不实际。本文提供的新方法与这二者相比, 具有明显的优势。

另外, 本研究方法扩展性强, 使用不同的探针, 可以针对各种不同序列的微卫星位点进行文库构建。如 (AT)_n, (AAC)_n, (AAAG)_n 等, 此时只需要将生物素标记探针 [5'-biotin-ATA-

GAATAT (CA)₁₅ - 3'] 中的 (CA) 改成其它序列即可, 同时重复数 (n) 也相应改变。对于双碱基重复单元的微卫星序列, n = 15, 例如本文中使用的 [5' - biotin - ATAGAATAT (CA)₁₅ - 3']。在三碱基重复单元的微卫星探针序列中 n = 8, 例如 [5' - biotin - ATAGAATAT (AAC)₈ - 3']; 四碱基重复单元微卫星探针序列中 n = 6, 例如 [5' - biotin -

ATAGAATAT (AAAG)₆ - 3'] (Vignieri, 2003; Fokidis *et al.*, 2003)。动物种类不同, 其基因组中最丰富的重复单元类型也不同, 在进行试验设计时, 要选择目标动物基因组中含量最为丰富的重复单元类型, 以保证较高的筛选效率。本文分别列举了对于灵长目、啮齿目以及整个哺乳动物纲和脊椎动物门的统计数据 (表 2) (Zane *et al.*, 2002)。

表 2 灵长目、啮齿目、整个哺乳动物纲和脊椎动物门最丰富的重复单元类型

Table 2 Best score repeated sequences of Primates, Rodentia, Mammalia and Vertebrata

分类地位 Taxonomic group	最丰富的重复单元序列类型 Best score repeated sequences								
	双碱基重复 Dinucleotides			三碱基重复 Trinucleotides			四碱基重复 Tetranucleotides		
灵长类 Primates	AC	AT	AG	AAT	AAC	AGG	AAAC	AAAT	AAAG
啮齿类 Rodentia	AC	AG	AT	ACC	AGC	AAC	AAAC	AGAT	AAAT
哺乳动物 Mammalia	AC	AG	AT	AGC	AGC	CCG	AAAT	AAAG	ACAG
脊椎动物 Vertebrata	AC	AT	AG	AAT	AGC	AGC	AGAT	AAAT	ACAG

但该方法也有其局限性。因为高质量的基因组 DNA 对于构建微卫星文库非常重要 (Karagoyozov *et al.*, 1993), 因此实验要求较大量的新鲜血液 (至少 2 ml) 或肌肉样品。这对于常规实验动物没有问题, 但是对于濒危保护物种或不易取样的物种, 获得大量的高质量样品则较为困难, 从而限制了该方法的使用范围。如何利用少量基因组 DNA 材料, 甚至是非损伤取样得到的样品 (如皮张、毛发等) 构建微卫星位点基因文库, 是应进一步研究和改进的方向。

参考文献:

Bernatchez L, Duchesne P. 2000. Individual-based genotype analysis in studies of parentage and population assignment: how many loci, how many alleles? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57: 1 - 12.

Cooper S, Bull C M, Gardner M G. 1997. Characterization of microsatellite loci from the socially monogamous lizard *Tiliqua rugosa* using a PCR-based isolation technique. *Molecular Ecology*, 6: 793 - 795.

Fokidis H Bobby, Nancy A Schable, Cris Hagen, Travis C Glenn, Thomas S Risch. 2003. Characterization of microsatellite DNA loci for the southern flying squirrel (*Glaucomys volans*): *Molecular Ecology Notes*, 3: 616 - 618.

Hamilton M B, Pincus E L, Di Fiore A, Flesher R C. 1999. Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *Biotechniques*, 27: 500 - 507.

Hammond R L, Saccheri I J, Ciofi C *et al.* 1998. Isolation of microsatellite markers in animals. In: Karp A, Isaac P G, Ingram D S eds. *Molecular Tools for Screening Biodiversity*. London: Chapman & Hall, 279 - 287.

Kandpal R P, Kandpal G, Weissman S M. 1994. Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping clones, and hybridisation se-

lection for region-specific markers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 91: 88 - 92.

Karagoyozov L, Kalcheva I D, Chapman V M. 1993. Construction of random small-insert genomic libraries highly enriched for simple sequence repeats. *Nucleic Acids Research*, 21: 3 911 - 3 912.

Liu M, Luty J A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, 44: 397 - 401.

Liu Z J, Zhang B W, Wei F W, Li M. 2005. Isolation and characterization of microsatellite loci for the red panda, *Ailurus fulgens*. *Molecular Ecology Notes*, 5: 27 - 29.

Lunt D H, Hutchinson W F, Carvalho G R. 1999. An efficient method for PCR-based isolation of microsatellite arrays (PIMA). *Molecular Ecology*, 8: 891 894.

Gustafson S, Proper J A, Bowic E J W, Sommer S S. 1987. Parameters affecting the yield of DNA from human blood. *Anal Biochem*, 165: 294.

Raymond M, Rousset F. 1995. genepop, Version 1. 2: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86: 248 - 249.

Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Tautz D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17: 6 463 - 6 471.

Toth G, Gspari Z, Jurka J. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*, 967 - 981.

Vignieri S N. 2003. Isolation and characterization of eight highly variable microsatellite markers in the Pacific jumping mouse (*Zapus trinotatus*): *Molecular Ecology Notes*, 3: 638 - 640.

Weber J L, May P E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, 44: 388 - 396.

Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 111 - 16.