

DOI: 10.1360/yc-007-0355

勒氏笛鲷微卫星位点的筛选及特征分析

郭昱嵩¹, 王中铎², 刘楚吾^{1,2}, 刘筠¹

1. 湖南师范大学生命科学院, 长沙 410081;
2. 广东海洋大学水产学院, 湛江 524025

摘要: 采用PCR法快速筛选勒氏笛鲷(*Lutjanus russelli*)基因组文库, 以获得(CA)_n微卫星位点。勒氏笛鲷基因组DNA经限制性内切酶HaeIII+ Dra I 双酶切后, 连接T-载体克隆, 构建基因组文库。以通用引物M13+/-与重复序列引物(CA)₁₅对基因组文库进行筛选, 二次筛选后得到121个可能含有微卫星位点的阳性克隆。进行序列测定, 共获得53个CA(n≥7)重复序列, 重复次数主要分布于7~15(80.77%)。在所得微卫星序列中, 重复单元除CA外, 还观察到单碱基、三碱基、四碱基、五碱基重复单元。根据侧翼序列设计48对引物, 通过优化PCR反应条件, 可获得清晰可重复的目的条带。研究旨在为勒氏笛鲷遗传多样性研究及遗传图谱的构建等奠定基础, 为勒氏笛鲷资源的合理开发利用提供参考。

关键词: 微卫星; 勒氏笛鲷; PCR

Rapid isolation and characteristics analysis of microsatellites from *Lutjanus russelli*

GUO Yu-Song¹, WANG Zhong-Duo², LIU Chu-Wu^{1,2}, LIU Yun¹

1. College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, China;
2. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China

Abstract: The (CA)_n DNA sequences in *Lutjanus russelli* were isolated through PCR arrays, and the characteristics of the microsatellite were analyzed. DNA was extracted from a sample of *Lutjanus russelli*, and digested with Hae III + Dra I. The fragments were ligated to pUCm-T vector and transferred into DH5α to construct a genomic library. The positive clones were isolated with universal M13 reverse and forward primers, M13 forward primer and the simple sequence repeats (SSRs) probes (CA)₁₅, M13 reverse primer and (CA)₁₅. After twice isolation, 121 positive clones, whose PCR products with M13 forward primer and probes (CA)₁₅ or M13 reverse primer and (CA)₁₅ were smaller than those with universal M13 reverse and forward primers probably contained microsatellites, were obtained. Then, 53 (CA)_n(n≥7) microsatellites were obtained by sequencing. The repeat length mainly distributed in 7-15(80.77%). Besides (CA)_n repeats, other repeat motifs, such as A_n, (CAC)_n and (AACCA)_n, were also obtained. Scorable and constant amplification of DNA fragments were observed with 48 pairs of SSR primers designed from the flank sequences. This research makes a positive contribution to exploring genomes of *Lutjanus russelli*, offers genetic tools to examine the genetic variations and constructs genetic linkage map.

Keywords: microsatellite; *Lutjanus russelli*; PCR

收稿日期: 2006-06-12; 修回日期: 2006-09-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 30671610), 广东科技兴海重大项目(编号: A200099A01), 湖南师范大学蛋白质化学与发育生物学教育部重点实验室开放课题资助[Supported by The National Natural Science Foundation of China (NSFC) (No. 30671610), Marine Science and Technology Programmer of Guangdong Province(No. A200099A01), and open-programmer of Key Laboratory of Protein Chemistry and Fish Developmental Biology of National Education Ministry, Hunan Normal University]

作者简介: 郭昱嵩(1980—), 女, 湖南省桂东县人, 博士研究生, 研究方向: 水产经济动物种质资源与遗传育种。

通讯作者: 刘楚吾(1952—), 男, 湖南省湘乡人, 教授, 湖南师范大学博士生导师, 研究方向: 水产经济动物繁殖生物学研究。Tel: 0759-2382044; E-mail: swjjs@gdou.edu.cn

微卫星DNA意指广泛存在于真核和原核基因组中的一类短的、简单的、串连的重复序列,又称为短小串联重复序列(short tandem repeats, STRs)或简单重复序列(Simple sequence repeats, SSRs),由1~6个核苷酸组成,在脊椎动物中尤以二核苷酸重复序列(CA/GT)_n最为常见。通常认为重复序列的产生是由于在遗传物质复制过程中DNA滑动或在有丝分裂、减数分裂期染色体不对等交换所致。微卫星分子标记已运用于虹鳟[1]、罗非鱼[2]、鲤鱼[3]、西大西洋笛鲷[4]等重要经济鱼类。由于微卫星在水产动物的研究和应用落后于陆生动植物,已分离可利用的资源较少,而筛选大量的高效、多态、共显性标记是进行连锁图谱构建、QTL定位基因、分子标记辅助育种的基础,是繁琐而又必需的工作。

勒氏笛鲷(*Lutjanus russelli*, Bleeker)隶属于鲈形目(Perciformes) 笛鲷科(Lutjanidae)笛鲷属(*Lutjanus*),在我国南海和东海海域均有分布,是我国重要的捕捞与养殖对象。本研究获得的勒氏笛鲷的微卫星分子标记,为勒氏笛鲷及邻近种属相关种群遗传多样性的研究,遗传选育及遗传图谱构建等研究的进一步开展做好准备,推动微卫星分子标记在水产养殖动物的研究和应用。

1 材料和方法

1.1 实验材料与DNA提取

实验用野生勒氏笛鲷于2002年6月至2003年6月期间采自湛江近海。尾静脉取血,加1/6的ACD(每100 mL含4.8 g柠檬酸、13.2 g柠檬酸钠、14.7 g右旋葡萄糖)抗凝,-70 低温保存。基因组DNA的制备参照卢圣栋[5]、金冬燕[6]等,沉淀溶解于TE溶液中,4 保存。

1.2 基因组文库的构建

将勒氏笛鲷基因组DNA经平末端限制性内切酶Hae + Dra 进行双酶切反应,1%琼脂糖凝胶电泳分离酶切产物,检测酶切效果。酶切产物加A尾,50 µL的体系如下:酶切产物20 µL,1×PCR buffers, MgCl₂ 1.5 mmol/L, dATP 1.2 mmol/L, Taq聚合酶5 U。72 温育2 h。以等体积苯酚/氯仿(1:1)抽提,4 8,000 r/min 离心,取上清;等体积氯仿抽提1次,4 8,000 rpm离心,取上清;冰冷无水乙醇沉淀,4 10,000 r/min离心5 min,沉淀用10 µL灭菌ddH₂O溶解。利用T-载体PCR产物克隆试剂盒(Sangon)将

T-载体与回收的目的DNA 按约1:3的比例(摩尔比)连接,在T4 DNA连接酶反应体系于在16 连接3 h。转化感受态大肠杆菌 DH5α,随机挑取白色菌落扩大培养, M13通用引物 PCR 检测阳性克隆的外源片段大小,1%琼脂糖电泳分离产物,证实成功构建文库后将全部白菌挑出,-80 保存待筛选。

1.3 PCR 法筛选含有微卫星序列的阳性克隆

参照Lunt等[7]的方法,做以下相对应的调整。即以通用引物M13+/-与重复序列引物(CA)₁₅作为筛选引物,反应体系如下:总体积10 µL,含1×PCR buffer, MgCl₂ 1.5 mmol/L, dNTPs 0.2 mmol/L,引物各0.5 µmol/L, Taq聚合酶1U,基因组DNA约30 ng。1%琼脂糖电泳分离产物,选择M13+/(CA)₁₅或者M13-/(CA)₁₅有带且条带比M13+/-扩增产物小的阳性克隆。将其进行二次筛选,若再次出现同样大小的条带,进行序列测定。

1.4 阳性克隆的序列测定及结果分析

以M13+/-为测序引物,对2次PCR筛选均有稳定条带的阳性克隆进行序列测定。测得的序列,剪切载体序列以后,利用SSR Finder软件进行SSR重复序列的寻找,确定重复次数以及两端侧翼序列。

1.5 设计微卫星引物与引物适用性分析

根据重复序列两端的保守序列利用Primer Premier 5.0 软件进行引物设计,并对勒氏笛鲷群体进行PCR扩增,8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,银染[8],分析引物的适用性。

2 结果

2.1 筛选含有微卫星序列的阳性克隆

基因组文库构建共获得2,318个阳性克隆。第一次筛选得到可能含有SSR位点的阳性克隆144个(图1),二次筛选排除了23个不稳定克隆(图2)。送测121个阳性克隆。

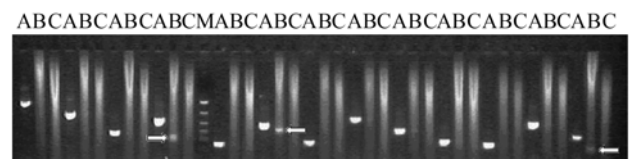


图1 第一次筛选DNA文库的电泳图谱
Fig. 1 The first isolation of DNA library for screening clones containing microsatellites
A: M13+/-; B: M13+/(CA)₁₅; C: M13-/(CA)₁₅; M: DNA ladder.

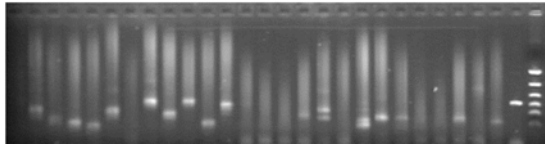


图 2 第二次筛选含有微卫星序列的阳性克隆电泳图谱 (M13+/(CA)₁₅)

Fig. 2 The second isolation of the positive clones containing microsatellites (M13+/(CA)₁₅)

2.2 测序结果及序列分析

除 6 个阳性克隆信号弱无法测序外, 得到 115 个克隆序列均含有微卫星序列。图 3 是阳性克隆 L48 重复序列 (CA)₃₀ 及侧翼序列。根据高焕等^[9,10]的分类标准: 14 或 14 个拷贝以上的单碱基重复序列; 7 或 7 个拷贝以上的双碱基重复序列; 5 或 5 个拷贝以上的三碱基重复序列; 4 或 4 个拷贝以上的四碱基重复序列; 3 或 3 个拷贝以上的五六碱基重复序列。本研究

符合此标准的微卫星位点有 68 个, 双碱基重复 (n=7) 53 个, 如图 4 所示, 重复次数主要分布于 7~15 (80.77%); 还获得单碱基重复 (n=14) 4 个, 三碱基重复 (n=5) 3 个, 四碱基重复 (n=4) 7 个, 五碱基重复 (n=3) 1 个。

2.3 两碱基重复序列的引物设计

根据两碱基重复序列两端的保守序列利用 Primer Premier 5.0 软件进行引物设计, 除去一些侧翼序列较短不能设计引物外, 共设计引物 48 对, 部分引物见表 1。

2.4 引物对群体的适用性分析

设计的引物通过优化 PCR 反应条件, 在适当的复性温度, 可获得清晰可重复的目的条带。图 5 为 Lru012 位点在勒氏笛鲷 16 个个体的分布情况。

表 1 勒氏笛鲷部分微卫星标记及引物

Table 1 Partial microsatellite markers and their primer pairs in *Lutjanus russelli*

微卫星标记 Microsatellite marker	克隆号 Clone No.	引物序列(5' 3') Primer sequence(5' 3')	大小(bp) Size(bp)	复性温度() Optimum annealing temperature	核心序列 Repeat motif
Lru001	L48	F: TCCTCTGTTGTTGAAAG R: CCTGATCTCGATAGTGCC	149	51	(CA) ₃₀
Lru002	L1322	F: AGGTCTCCCCTGCAACAG R: CACAACCCCACTTCAAAA	196	50	(AC) ₂₂
Lru003	L1336	F: GCATCTGCCTGGGAACCT R: GCAAGAGGCTGTGCGTGT	158	53	(AC) ₄₃
Lru004	L1698	F: GATGGCAATGGAAGGCACA R: CTGGGATCTATGAAAGCAAGAG	100	51	(CA) ₁₄
Lru005	L1760	F: AACAGGCACATTTTCACA R: GAAGGAGCAGTACCAAGA	216	49	(AC) ₅₈
Lru006	L1994	F: CCAAACCTTTCATTCTAACA R: TACCGTAATACGACTCACTA	147	49	(AC) ₁₄
Lru007	L2134	F: ACTGTCTGGGCTGTAATA R: AAAGGGTAACTAAAGATGAC	204	47	(CA) ₁₄
Lru008	L373	F: CAGTCTTCCACTTTTCATT R: TTGCTACAGTTTCAACCC	130	46	(CA) ₁₅
Lru009	L734	F: TACCGTAATACGACTCACT R: ATATGCACTCATTTTCCT	181	49	(AC) ₂₂
Lru010	L740	F: GCAAACGGAGGAAACAAA R: CTGAAGCTCGGATGAGGA	153	52	(CA) ₂₈
Lru011	L876	F: TGTGCTGCTGAGGACTGA R: CACCCTGCGTGCGTAAGT	165	51	(AC) ₁₈
Lru012	L913	F: ATGTTGGCTGAATCGTAG R: GACCAGGTCTCCTTGAGGTT	250	50	(AC) ₃₂
Lru013	L1182	F: CATCGGGTATTAGACAAA R: AGTGCCAACTACTGCTTT	212	48	(CA) ₂₃
Lru014	L1275	F: TGGAGGAAAATCTGTCTA R: AGAGTAGCAGGTTTGATG	216	47	(AC) ₁₉
Lru015	L662	F: AGAACCAAACCGACCTGA R: ACCTGTGCCTGTGCTTAC	198	49	(CA) ₈ GA(CA) ₅ GA(CA) ₅ GA(CA) ₂
Lru016	L764	F: AGTTCTTGTAGCACCTTT R: TTGTAGTTTCACGAGCAG	221	49	(AC) ₁₁
Lru017	L1049	F: GGCTGTGAACCTGCTGACT R: GTGGAGGAGATAAAGAACT	212	48	(AC) ₈
Lru018	L1087	F: TTGGGGACGGCAGATACA R: GAGGTGGAGTGAAAGAAGATAA	113	51	(CA) ₁₀
Lru019	L1163	F: AAATGCGACATCAACCAAC R: TTAGCGTAACCTCAAACCTCC	120	51	(AC) ₈
Lru020	L1557	F: CACCAAGTACACTCATG R: GTGCAGCTTCTCCGTAT	190	48	(CA) ₁₀

注: F-正向引物; R-反向引物。

Note: F- forward primer; R- reverse primer.

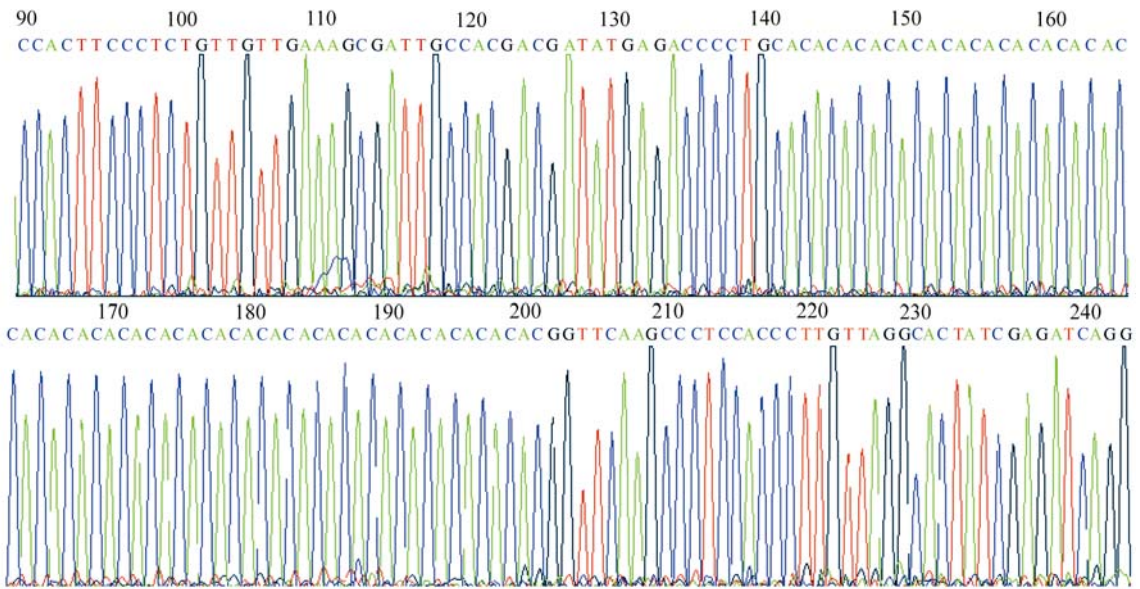


图 3 勒氏笛鲷L48 重复序列(CA)₃₀及侧翼序列
Fig. 3 (CA)₃₀ repeat sequence and flank sequence of L48 in *Lutjanus russelli*

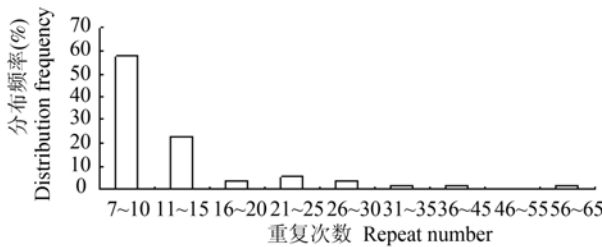


图 4 勒氏笛鲷微卫星(CA)_n类型长度分布频率
Fig. 4 Frequency distribution of microsatellite repeats of (CA)_n in *Lutjanus russelli*

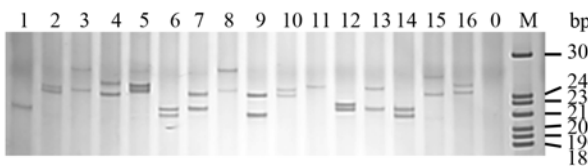


图 5 SSR 位点 Lru012 在勒氏笛鲷群体中的分布
M: pBR322 DNA/Msp I Markers; 0: 阴性对照; 1~16: 16 个勒氏笛鲷个体。

Fig. 5 Amplification profile of the SSR locus Lru012 in *Lutjanus russelli*
M: pBR322 DNA/Msp I Markers; 0: Negative control; 1~16: 16 individuals.

3 结论与讨论

3.1 勒氏笛鲷微卫星序列特征

微卫星本身的重复单位数的变异是形成微卫星标记多态性的基础,总的趋势是微卫星标记越长,多态性越高^[11]。本研究采用了高焕等^[9,10]的分类标准,力求微卫星标记的长度能达到遗传多样性分析

所需。本文所采用的方法得到的双碱基重复(n = 7)53 个,重复次数主要分布于 7~15(80.77%), 30 次以上的频率为 5.76%。李绍戊等^[12]用磁珠富集法与放射性杂交相结合筛选团头鲂微卫星,得到 94 个微卫星序列(n = 5),重复次数主要分布于 5~30(75.68%), 30 次以上的频率为 23.32%。我们可以看出,不同的筛选方法得到的微卫星主要重复次数基本是一致的,但是李绍戊所用方法得到的微卫星位点高于本研究,且高重复次数(n = 30)的微卫星数量要明显高于本研究。这可能是由于不同筛选方法造成结果的差异,而非鱼类自身微卫星特征差异。孙效文等^[13]对鲤鱼微卫星筛选的方法学比较中也得到了类似的结果。

3.2 PCR 法筛选的利弊

利用PCR法筛选微卫星位点的方法是由Lunt等^[7]在Ender(1996)提出RAPD分离微卫星位点方法的基础上进一步发展,提出较为完善的以PCR技术为基础的微卫星位点分离技术(PCR isolation of microsatellite arrays, PIMA)。利用RAPD引物随即扩增基因组获得DNA片段,选择带型集中大小适合克隆的扩增产物用于克隆。由PCR法筛选阳性克隆:将重组阳性克隆摇菌过夜,而后对菌液双重PCR扩增(3 条引物,“两侧载体序列引物”+“微卫星引物”),阳性克隆除了针对载体序列的正反向引物扩出的主带之外,这种方法较之传统同位素法分离微卫星经济快捷,使得普通的实验室开展研究成为可能,技术成熟情况下筛选

只需要一个星期, 花费 1 万元左右(主要费用为测序、引物合成、*Taq*酶, 由阳性克隆数量决定)。本研究与PIMA法不同之处在于利用双酶切反应直接将基因组DNA酶切到方便克隆与测序分析的片段大小后克隆构建基因组文库, 只需要一个酶切反应体系和短短几个小时, 大大缩小了PIMA筛选RAPD引物需要的工作量。

但是因为PCR法是从基因组文库中筛选重复序列, 因此, 获得的含有微卫星的阳性克隆也存在着序列重复的问题, 这包括着两种情况: 一是由于基因组DNA邻近酶切位点造成, 表现为重复序列和侧翼序列一致, 但与载体连接处有碱基数量的差异(几十到数百); 二是由于构建基因组DNA过程中造成的阳性克隆重复, 表现为序列完全一致。从PCR筛选这一步无法确定2个微卫星序列是否重复, 必须借助测序结果来予以确证。在得到含有微卫星位点的序列以后需要对所有序列进行序列比对, 同源度大于90%的序列挑出进行核心重复序列与侧翼序列的进一步比对, 如果一致则认为是同一序列来源。

3.3 引物对近缘种的应用前景

微卫星分子标记的发展主要受限于微卫星及其旁侧特异引物区的分离。虽然微卫星两侧的侧翼序列具有高度的保守性, 但在近缘种间也有可以通用的现象, 本研究获得的勒氏笛鲷的微卫星分子标记, 可为勒氏笛鲷及笛鲷属邻近种遗传多样性的研究, 遗传选育及遗传图谱构建等研究的进一步开展做好准备, 推动微卫星分子标记在水产渔业的研究和应用。

参考文献(References):

- [1] Nichols KM, Young WP, Danzmann RG, Robison BD, Rexroad C, Noakes M, Phillips RB, Bentzen P, Spies I, Knudsen K. A consolidated linkage map for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Anim Genet*, 2003, 34(2): 102–115. [\[DOI\]](#)
- [2] Lee BY, Hu Lata G, Kocher TD. Two unlinked loci controlling the sex of blue tilapia (*Oreochromis aureus*). *Heredity*, 2004, 92(6): 543–549. [\[DOI\]](#)
- [3] WEI Dong-Wang, LOU Yun-Dong, SUN Xiao-Wen. Isolation of microsatellite markers in the common carp (*Cyprinus carpio*). *Zoological Research*, 2001, 22(3): 238–241.
魏东旺, 楼允东, 孙效文. 鲤鱼微卫星分子标记的筛选. *动物学研究*, 2001, 22(3): 238–241.
- [4] Gold JR, Park E, Richardson LR. Microsatellite variation among red snapper (*Lutjanus campechanus*) from the Gulf of Mexico. *Mar Biotechnol*, 2001, 3(3): 293–304. [\[DOI\]](#)
- [5] LIU Sheng-Dong, Modern Molecular Biological Technology(Second version). Beijing: Peking Union Medical College Publication, 1999.
卢圣栋主编. 现代分子生物学实验技术(第二版). 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999.
- [6] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Clone: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995.
Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (金冬燕, 黎孟枫等译). 分子克隆实验指南(第二版). 北京: 科学出版社, 1996.
- [7] Lunt DH, Hutchinson WF, Carvalho GR. An efficient method for PCR based identification of microsatellite arrays (PIMA). *Mol Ecol*, 1999, 8(5): 893–894.
- [8] Sanguinetti CL, Dias Neto E, Simpson AJG. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 1994, 17(5): 915–919.
- [9] Ellengren H. Microsatellite mutation in the germline implications for evolutionary inference. *Trends Genet*, 2000, 16(12): 551–558. [\[DOI\]](#)
- [10] GAO Huan, LIU Ping, MENG Xian-Hong, WANG Wei-Ji, KONG Jie. Analysis of microsatellite sequences in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) Genome. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2004, 35(5): 424–431.
高焕, 刘萍, 孟宪红, 王伟继, 孔杰. 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)基因组微卫星特征分析. *海洋与湖沼*. 2004, 35(5): 424–431.
- [11] GAO Huan, KONG Jie. Distribution characteristics and biological function of tandem repeat sequence in the genomes of different organisms. *Zoological Research*, 2005, 26(5): 555–564.
高焕, 孔杰. 串联重复序列的物种差异及其生物功能. *动物学研究*, 2005, 26(5): 555–564.
- [12] LI Shao-Wu, CHANG Yu-Mei, LIANG Li-Qun, SUN Xiao-Wen. Rapid isolation of microsatellites from genome of Bluntnose black bream(*Megalobrama amblycephala*). *Journal of Fishery Science of China*, 2006, 13(2): 187–192.
李绍武, 常玉梅, 梁利群, 孙效文. 团头鲂微卫星标记的快速制备. *中国水产科学*, 2006, 13(2): 187–192.
- [13] SUN Xiao-Wen, JIA Zhi-Ying, WEI Dong-Wang, LU Cui-Yun, LIANG Li-Qun. Comparison between magnetic beads enriched and small inserted fragment library for microsatellite sequence of common carp. *Journal of Fishery Science of China*, 2005, 12(2): 126–132.
孙效文, 贾智英, 魏东旺, 鲁翠云, 梁利群. 磁珠富集法与小片段克隆法筛选鲤微卫星的比较研究. *中国水产科学*, 2005, 12(2): 126–132.