

文章编号: 1004 - 7271(2000)03 - 0254 - 05

·综述·

## 微卫星分子标记技术在鱼类遗传连锁图谱构建中的应用

### The application of microsatellite techniques in construction of fish genetic linkage-map

杜长斌<sup>1</sup>, 楼允东<sup>2</sup>, 沈俊宝<sup>3</sup>, 孙孝文<sup>3</sup>

(1. 华东理工大学生化研究所, 上海 200237; 2. 上海水产大学渔业学院, 上海 200090; 3. 黑龙江水产科学研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070)

DU Chang-bin<sup>1</sup>, LOU Yun-dong<sup>2</sup>, SHEN Jun-bao<sup>3</sup>, SUN Xiao-wen<sup>3</sup>

(1. Biochemical institute, ECUST, Shanghai 200237, China; 2. Fisheries College, SFU, Shanghai 200090, China; 3. Heilongjiang Fishery Research Institute, CAFS, Harbin 150070, China)

关键词: 微卫星; 遗传连锁图谱; 鱼类

Key words: microsatellite; genetic linkage-map; fish

中图分类号: S917 文献标识码: A

分子遗传标记是建立遗传连锁图谱的基础,也是探索动物遗传的分子机理及克隆未知基因的基础。未来将是基因组为基础的生命科学,而分子遗传标记是进行基因组研究的向导和路标。微卫星(Microsatellite)是指以少数几个核苷酸(一般为2~4bp)为单位多次串联重复的DNA序列。微卫星具有十分丰富的多态性<sup>[1]</sup>,杂合度最高可达100%,每代变异超过2%<sup>[2]</sup>。微卫星分析可以提供分辨率达一个碱基对差异的信息<sup>[3]</sup>,且等位基因的条带易于识别和解释,能够比当前所有的分子标记带来更多的信息量<sup>[4]</sup>和信息质量,非常适用于亲缘关系很近物种的遗传分析,并首先在人类和小鼠中构建了以微卫星为主的分子连锁图谱<sup>[5,6]</sup>。鉴于微卫星在遗传连锁图谱构建中的巨大潜力,本文就微卫星在几种鱼类遗传连锁图谱构建中的进展作一简要介绍,并分析了其在水产养殖上的应用前景。

### 1 微卫星分子标记的发展简史

早在20世纪70年代,人们已检测到了小鼠体内的重复序列。1980年Wyman和White<sup>[1]</sup>在进行人类基因文库研究时,偶然发现人类基因组中存在着某些高可变区(Hypervariable regions),此后,在人的胰岛素基因、 $\alpha$ -珠蛋白基因以及c-Ha-ras癌基因附近均发现了这种高可变区。Hamada<sup>[7,8]</sup>在1982年首次在人心肌肌动蛋白(Ha-25)的内含子中发现了一个重复25次的TG序列。同时指出,这一序列在真核生物的基因组中广泛存在。这一发现为Tautz和Renz<sup>[9]</sup>所证实。在真核生物中,大约每隔10~50kb就有1个微卫星<sup>[3]</sup>,且微卫星在基因组中的分布是随机的,在内含子、编码区以及染色体上的其他任一区域均有分布<sup>[8]</sup>。早在1985年,Jeffreys<sup>[10]</sup>等人应用人类卫星DNA核心区DNA序列为探针,与不同物种的

收稿日期:2000-01-17

作者简介:杜长斌(1975-),男,山东人,上海水产大学2000届硕士研究生,专业为水产动物遗传育种。

高度可变区(即重复 DNA)杂交,显示出较高的灵敏度,能区分除同卵孪生子以外的个体,在家系分析与个体鉴定方面得到广泛应用。这项技术在植物中已用于遗传作图和种质鉴定,如大豆<sup>[11]</sup>、玉米<sup>[12]</sup>、番茄<sup>[13]</sup>、葡萄<sup>[14]</sup>、苹果<sup>[15]</sup>和小麦<sup>[1]</sup>等。1990年以来,微卫星在尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、宽帆鱗(*Poecilia latipinna*)、棘胸鱼(*Hoplostehus atlanticus*)、大鳞大麻哈鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)、三棘刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)<sup>[9]</sup>和鲤鱼(*Cyprinus carpio*)<sup>[16]</sup>等多种鱼类得到应用,并对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[17]</sup>、斑马鱼(*Brachydanio rerio*)<sup>[18,19]</sup>和尼罗罗非鱼<sup>[20,21]</sup>、鲤鱼<sup>[16]</sup>构建了以微卫星为主的遗传连锁图谱。微卫星技术在水产动物种质资源研究和遗传育种方面将越来越发挥它的重要作用。

## 2 微卫星分子标记的原理和图谱构建方法

### 2.1 微卫星分子标记的原理

获得微卫星序列→设计引物→PCR扩增→对扩增产物进行分析。

#### 2.1.1 微卫星序列的获得

获得生物基因组中某个特定微卫星旁侧序列是微卫星位点分析的关键,微卫星序列获得的途径一般有两种:①用经典的分子生物学方法构建富含微卫星位点的基因组文库<sup>[22,23]</sup>;②通过检索 GenBank、EMBL 和 DDBJ 等 DNA 序列数据库获取微卫星引物。

#### 2.1.2 设计引物

由于微卫星两侧的序列在同一物种间是高度保守的,因此,据此设计的引物应具有高度的专一性。可用来扩增同一物种,甚至不同物种的微卫星片段。每条引物的长度一般为 17~25 bp。

#### 2.1.3 PCR 扩增

由于是序列特异性扩增,产物片段的重现性和稳定性都较好。但值得注意的是只要优化 PCR 扩增条件便可获得清晰的条带。

#### 2.1.4 对扩增产物进行分析

最初的微卫星扩增产物使用分辨率较高的聚丙烯酰胺凝胶电泳,通过放射性自显影显示结果,此方法虽然灵敏度高,但同位素的使用对人具有害的,随后使用银染法来检测扩增产物达到了同样效果,避免了同位素的使用。最近,高浓度琼脂糖凝胶(3%~5%)电泳已初步投入使用,且显示出多态性,使得微卫星的检测更加简便。

## 2.2 方法

### 2.2.1 构建过程

图谱构建基本过程是:①选择适当的作图群体和合适的分子标记,②确立分子标记连锁群;③基因排序和遗传距离的确定。一种生物最终构建的连锁群的数目应该等于该生物的单倍体染色体数。

### 2.2.2 构建方法

构建遗传图谱的方法主要有家系分析法和单配子 PCR 分型技术<sup>[24,25]</sup>。家系分析法是通过后代体细胞的基因型来推断亲本减数分裂(精子或卵子)基因型,该法主要有三方面的缺陷:世代间隔长,后代数目少,多态信息含量(PIC)低。统计分析表明,家系分析最高能使检测的遗传图距精确到 1cM,而要达到比这更小的遗传图距需要检测数目庞大的后代个体,这在实际中难以做到。

最近发展起来的单配子 PCR 分型技术在生物遗传图谱构建中显示了广阔的应用前景。此法可在短时间内将单个配子的 DNA 扩增到足够分析的量,来自双杂合子(如 ab//++)亲本的一个配子(ab/或++/)与该配子所产生的一个后代连锁信息是相等的,因此分析双杂合子亲本单个配子两位点的基因型就可计算出此两位点间重组率。该方法可以使遗传图距精确到 0.1cM,同时避免了构建高精度图谱需要检测数目庞大的个体。单配子 PCR 分型技术已经卓有成效地应用于人类、牛等微卫星 DNA 遗传图谱构建。

单配子 PCR 分型技术应用于鱼类具有独到的优点,因为鱼类的家系分析较为困难,但鱼类的单配子易于获得,单个卵子分型技术尤其适合于鱼类的基因图谱构建<sup>[16,26]</sup>。Amheim 证明微卫星 DNA 在应用单配子 PCR 分型技术构建高精度遗传图谱方面具有广泛的潜力<sup>[27]</sup>。由于微卫星是共显性遗传,对亲本的扩增结果易于找到杂合位点,可应用此杂合微卫星标记去构建基因连锁图谱。

### 3 遗传连锁图谱构建的发展简史

最初的遗传图谱几乎都是根据诸如形态、细胞、生理和生化常规标记来构建的。这些能够用来作图的遗传标记的数量极为有限,因此,发展极为缓慢,且仅限少数种类,图谱分辨率极低,表现标记少,图距大,饱和度低,应用价值不大。随着 DNA 双螺旋结构的提出和蛋白质空间结构的解析,特别是重组 DNA 技术的问世,在分子水平上构建基因连锁图谱成为可能。

在遗传领域,利用分子水平上的变异,作为遗传标记进行连锁图谱构建取得重大进展。构建基因图谱是基因精确定位和分析基因间距离所必不可少的环节。认识到生物个体之间的 DNA 序列的差异可以作为标记并用于作图的研究始于 Bostein<sup>[28]</sup>,1980 年,他首次提出了利用 RFLPs 标记构建遗传图谱的设想。Postlethwait J H. 等<sup>[18]</sup>用 401 个 RAPDs 标记和 13 个 SSR 标记构建了斑马鱼的遗传连锁图谱,平均间隔 5.8cM。饱和度远远超过以前的常规标记图谱。虽然 AFLPs 是显性标记且用于部分遗传图谱(主要是植物)的构建,但在大多数杂交组合中会降低标记的信息量,在各实验室间和各物种之间不易比较。这样由不同的杂交组合产生的 AFLPs 标记定位尤为困难。在植物上 DNA 分子连锁图构建工作的发展速度超过了动物的同类研究,这主要是因为,在植物上可以很方便的建立和维持较大的分离群体。随着 DNA 分子标记技术的发展,越来越多生物的遗传连锁图谱得以构建,图谱上标记密度也越来越高,特别是最近发展的微卫星标记,因其丰富的多态性和信息量,而被广泛应用,并首先在人类和小鼠中构建了以微卫星为主的分子连锁图谱<sup>[5,6]</sup>。

### 4 微卫星 DNA 分子标记在鱼类遗传图谱构建中的应用

微卫星是在 20 世纪 90 年代后期才被用于染色体作图。对于构建一个有用的遗传图谱,应该包含有丰富的遗传标记,且均匀分布于整个基因组和具有高度多态性,在不同的实验室间易于识别。而微卫星恰恰具有这些特点。微卫星引物的高通用性<sup>[29]</sup>,使在不同种或科的动植物中进行比较遗传图谱构建成为可能,微卫星标记的共显性,不仅简化了分析过程,且利于不同作图群体间的标记转换<sup>[14]</sup>和从遗传图谱向物理图谱的过渡<sup>[30]</sup>。到目前为止,已建成的鱼类微卫星图谱已有虹鳟、斑马鱼、尼罗罗非鱼和鲤鱼。

#### 4.1 斑马鱼微卫星遗传图谱

Postlethwait 等<sup>[18]</sup>于 1994 年构建了斑马鱼的遗传重组图谱,平均间隔 5.8cM,并对致死突变和形态突变进行了图谱定位。这对于基因的定位克隆和脊椎动物的基因组的进化研究有重要意义。Knapik 等<sup>[19]</sup>用 705 个 SSLPs 标记构建了斑马鱼的相对完全的遗传连锁图谱。该图谱以平均为 3.3cM 的精度覆盖了斑马鱼 2350cM 基因组,对于每一个染色体均有一个标记连锁群。该遗传图谱已经由体细胞杂交和半四分子分析着丝粒作图所证实。提供了一种实验室之间比较不断发展的遗传标记的可靠依据。为定位和克隆与脊椎动物发育至关重要的 600 多个斑马鱼基因提供了向导和路标,也为斑马鱼物理图谱的构建奠定了基础。

#### 4.2 尼罗罗非鱼微卫星遗传图谱

Kocher 等<sup>[31]</sup>从一个雌性个体衍生的 41 个单倍体胚胎中分离了 62 个微卫星位点和 112 个 AFLP 标记,并通过在单倍体后代中研究多态性标记的分离而构建了尼罗罗非鱼的遗传图谱,95% 的微卫星标记是连锁的,该图谱以 30 个连锁群覆盖了 22 个染色体,平均 23.5cM。整个基因组达 704 Kosambi cM。每个连锁群的标记数从 2-28 不等,其中 24 个连锁群至少含有一个微卫星标记。Kocher 根据遗传距离 ≤

15cM 的标记的数目,估计该图谱的总长为 1000–1200cM。这对单位点图谱构建和数量性状定位是一个起点。Husstain 等<sup>[20]</sup>应用雌核发育(通过抑制第二次减数分裂产生的二倍体后代)为尼罗罗非鱼 6 个同工酶位点、性别决定位点和两个体色位点绘制了基因–着丝粒距离图谱,引人注意的是一些基因和着丝粒重组达 100%,说明存在高度干涉。Komen<sup>[32]</sup>在鲤鱼和 Allendorf 等在虹鳟<sup>[33]</sup>也发现了同样现象。双重组子和在斑马鱼中大于 100cM 的连锁群<sup>[34]</sup>的发现,证明了在真骨鱼类双重组是可能的。由此可见,基因和着丝粒高度干涉在鱼类是普遍存在的现象。这样,如果要确定全部图谱的长度,对于干涉值的准确估计尤为重要。

#### 4.3 虹鳟遗传连锁图谱

Young 等<sup>[21]</sup>在 1998 年首次报道了由两个雄核发育纯系“OSU”和“Arlee”杂交产生的杂种再经雌核发育获得的 76 个加倍的单倍体虹鳟的详尽的遗传连锁图谱。31 个主要连锁群和 11 个小的(标记数 < 5 个)连锁群由 476 个标记覆盖。最小基因组大小估计是 2627.5cM。性别决定位点定位在一个连锁群的远侧端,加倍的单倍体虹鳟系和连锁图谱构建为进一步的基因组研究打下了基础。

#### 4.4 鲤鱼遗传连锁图谱

2000 年,孙效文和梁利群<sup>[16]</sup>首次构建了鲤鱼的遗传连锁图谱,图谱含有 RAPD 分子标记 56 个,SSIP 分子标记 115 个,鲤鱼的基因标记 91 个,该图谱由 50 个连锁组构成,连锁图给出的鲤鱼的基因组大小在 5 789 cM 左右,其中最大的连锁组为 347 cM,最小的连锁组为 17 cM。该图谱最有特色的是一些与鲤鱼经济性状相关的基因得以定位,为进一步的数量性状定位和单基因克隆打下基础<sup>[16]</sup>。

### 5 展望

目前,大部分微卫星遗传图谱都采用单倍体作图,但单倍体作图能够检测的表型少,对于 PCR 扩增出的多态性标记提供的功能信息量有限,因此,对于编码同工酶、性别决定、体色等基因位点的信息知之甚少。通过抑制第二次减数分裂而使单倍体加倍成为二倍体并发育至较大的阶段或许有用。另外大部分微卫星遗传图谱是处于分子标记的初步连锁群构建阶段,目前我国的养殖鱼类中仅有鲤鱼进行这方面的研究,且仅对少数有用的基因位点进行了定位。对于大多数鱼类有重要经济价值的基因位点(抗寒、抗病等)的定位尚有一定的距离,微卫星分子标记辅助育种,虽然前景广阔,但就目前而言,主要的养殖鱼类还没有进行这方面的研究,我们应该在微卫星发展的方兴未艾之时,抓住机遇,迎头赶上。

虽然鱼类的基因组大小约是  $1 \times 10^9$  bp,但基因遗传距离和物理距离并不相关。生物染色体上基因之间交换和重组除与遗传距离有关外,还受许多其它因素的影响,因此,遗传图谱中基于重组率所确定的遗传图距具有相对性,即它并不直接反映 DNA 的核苷酸对数,在不同的生物的遗传图谱上,或者在同一遗传图谱的不同区域,每一图谱单位所代表的实际核苷酸对数往往存在很大的差异。

为了更加精确的基因定位,有必要发展鱼类的物理图谱。物理图谱是反映生物基因组中基因位点或标记间的实际距离的图谱,图谱单位为 Kb 或者 Mb。随着越来越多分子标记的投入使用,特别是微卫星在图谱构建中的巨大优势,鱼类的物理图谱的构建逐渐有了可能。事实上,Beckmann 等<sup>[17]</sup>在 1990 年就提出在真核生物中广泛构建以微卫星 DNA 位点为基础的序列标志 DNA 位点(Sequence-tagged microsatellite sites, STMS)物理图谱的设想。

我国是水产养殖大国,高密度集约化养殖带来的鱼、虾病害是阻碍水产业发展的重大问题之一,不少学者已在抗性育种方面做了很多工作,如沈俊宝等<sup>[35]</sup>用抗寒的黑龙江野鲤和荷包红鲤选育出了能够稳定遗传的荷包红鲤抗寒新品系,楼允东<sup>[36]</sup>选育出了高邮杂交鲫并对其及其亲本的遗传形状进行了比较,为用分子标记辅助育种提供了依据。但传统育种技术在抗性育种研究上收效甚微,以表型性状为选择手段的育种技术选择强度低,对低遗传力性状如数量性状的选择是无效或低效的。微卫星分子遗传连锁图谱的构建使数量性状定位进而分子标记辅助育种的操作更加可行,构建以微卫星为主的鱼类分子标记图谱必将会对水产养殖抗性育种研究起着重要促进作用。

## 参考文献:

- [1] 何平. 真核生物中的微卫星及其应用[J]. 遗传, 1998, 20(4): 42-47.
- [2] O'Reilly P, Wright J M. The evolving technology of DNA finger printing and its application to fisheries and aquaculture[J]. J Fish Biol, 1995, 47 (Supp A): 29-35.
- [3] Tautz D. Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers[J]. Nucleic Acid Res, 1987, 17: 6463-6471.
- [4] Goldstein D B, Roemer C W, Smith D A, et al. The use of Microsatellite Variation to Infer Population Structure and Demographic History in a Natural Model System. Genetics[J]. 1999, 151: 791-801.
- [5] Dih C, Fizaros S, Sarwan D, et al. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5264 microsatellites[J]. Nature, 1996, 380: 152-154.
- [6] Dierich W F, Fried W. A comprehensive genetic map of the mouse genome[J]. Nature, 1996, 380: 149-152.
- [7] Hamada H, Kakuwaga T. Potential Z-DNA forming sequences are highly dispersed in the genome human[J]. Nature, 1982, 298: 396-398.
- [8] Hamada H, Pirino M, Kakuwaga T. A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes[A]. Proc Natl Acad Sci. USA[C]. 1982, 79: 6465-6469.
- [9] Tautz D, Renz M. Simple sequence are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genome[J]. Nucleic Acids Res, 1984, 17: 6463-6471.
- [10] Jeffreys A J. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA[J]. Nature, 1985, 316: 67-73.
- [11] Akkaya M S, Elmaghrabi A A, Cegan P B et al. Length polymorphisms of simple repeat DNA in soybean[J]. Genetics, 1992, 132: 1131-1139.
- [12] Taranimo G, Turgut S. Simple sequence repeats for genetical analysis and mapping in maize[J]. Genome, 1996, 39: 277-287.
- [13] Brown P, Tankale S D. Characterization and genetic mapping of simple repeat sequence in the tomato genome[J]. Mol Gen Genet, 1996, 250: 39-49.
- [14] Thomas M R, Scott N S. Microsatellites repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites(STS)[J]. Theor Appl Genet, 1993, 86: 985-990.
- [15] Guilford P, Mhaur S. Microsatellite in *Malus X domestica* (apple); abundance, polymorphism and cultivar identification[J]. Theor Appl Genet, 1997, 94: 249-254.
- [16] 孙效文, 梁利群. 鲤鱼的遗传连锁图谱(初报)[J]. 中国水产科学, 2000, 7(1): 1-5.
- [17] Beckmann J S. Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence-tagged microsatellite sites[J]. Bio-technology, 1990, 8(10): 930-932.
- [18] Postlethwait J H, Johnson S, Midson C N, et al. A Genetic Linkage Map for the Zebrafish[J]. Science, 1994, 264(29): 699-703.
- [19] Knapp E W, Cochran A, Elker M, et al. A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*)[J]. Genes Dev, 1998, 18: 338-342.
- [20] Huestain M C. Estimating gene-centromere recombination frequencies in gynogametic diploids of *Oreochromis niloticus*, using allozymes, skin colour and a putative sex-determining locus (SDL-2)[A]. Beaumont A R, Genetics and Evolution of Aquatic Organisms[C]. New York: Raven press, 502-509.
- [21] Young W P, Wheeler P A, Coryell V H, et al. A detailed linkage map of rainbow trout produced using doubled haploids[J]. Genetics, 1998, 148: 839-850.
- [22] *Karyogonadistruction of caudoro small - invertebrates highly sequenced for simple sequence repeats*[J]. Acid Res, 1993, 21: 3911-3912.
- [23] Alish R S, Takagi M, Dang S, et al. Isolation and inheritance of Microsatellite Markers in the common carp *Cyprinus carpio*[J]. Fisheries Science, 1999, 65(2): 235-239.
- [24] Li H, Gjyllenstam U B, Gu X, et al. Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm[J]. Nature, 1988, 335: 414-417.
- [25] Amheim N, Boehnke M, Honghua L, et al. PCR analysis of DNA sequences in a single cell: single sperm gene mapping and genetic disease diagnosis[J]. Genetics, 1990, 8: 415-419.
- [26] Lie, Rouer W F. Haplotype genotyping: A powerful strategy for linkage analysis in fish[J]. Animal Biotech, 1994, 5(1): 33-45.
- [27] Amheim N. Genetic analysis by single cell typing[J]. Animal Biotech, 1994, 5(2): 83-88.
- [28] Bostein D, White R L, Schrick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. Am J Hum Genet, 1980, 32: 314-331.
- [29] Schletterer, C, Amos W, Tautz D. Conservation of polymorphic simple sequence loci in octocoran species[J]. Nature, 1991, 354: 63-65.
- [30] Olson M. A common language for physical mapping of the human genome[J]. Science, 1989, 245: 1434-1435.
- [31] Kacher T D, Lee W J, et al. Subtelomeric Linkage Map of Cichlid Fish, the Tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Genetics, 1998, 148: 1225-1232.
- [32] Karzen J. Clones of common carp: New perspectives in fish research[D]. Ph D thesis. The Netherlands: Agricultural University of Wageningen, 1990.
- [33] Allendorf F W, Sob J E, Knudsen K L, et al. Gene-centromere mapping of 25 loci in rainbow trout[J]. J Hered, 1986, 77: 307-312.
- [34] Johnson S L, Africa D, Home S, et al. Half-tetrad analysis in zebrafish: mapping the ros mutation and the centromere of linkage group I[J]. Genetics, 1995, 139: 1727-1735.
- [35] 沈德宝, 刘明华. 荷包红鲤抗寒品系的筛选[J]. 淡水渔业, 1988, 3: 314-317.
- [36] 楼允东. 高雌杂交鲫及其亲本遗传性状的比较研究[J]. 遗传, 1992, 14(4): 18-20.