

文章编号: 1004-7271(2007)04-0389-05

· 研究简报 ·

## 草鱼基因组中微卫星分子标记的制备及筛选

马海涛<sup>1,2</sup>, 鲁翠云<sup>1</sup>, 于冬梅<sup>1,2</sup>, 孙效文<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070;  
2. 大连水产学院, 辽宁 大连 116023)

**摘要:**采用新型的生物素-磁珠吸附微卫星富集法与传统的放射性同位素杂交法相结合的方式,研究了草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)基因组中存在的微卫星资源。结果,从1 000个细菌中,挑出90个阳性克隆,把其中45个进行测序分析,在这些序列中共含有68个微卫星核心序列,有55个含有重复次数大于5次的微卫星核心序列。其中,单一型标记49个,占72%,包括CA重复单元共22个,GT重复单元共18个,其他重复单元为9个;在72%的单一型标记中,完美单一型微卫星标记为44个,占65%。另外,混合型标记共19个,13为完美混合型;在所有微卫星标记中,CA重复类型最普遍,依次为GT、GA等。在68个微卫星标记中,有15个依据引物设计原理设计了引物。

**关键词:**草鱼; 生物素; 磁珠; 微卫星

中图分类号: S 917 文献标识码: A

## Microsatellite enrichment by magnetic beads in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

MA Hai-tao<sup>1,2</sup>, LU Cui-yun<sup>1</sup>, YU Dong-mei<sup>1,2</sup>, SUN Xiao-wen<sup>1</sup>

(1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Harbin 150070, China;  
2. Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China)

**Abstract:** Enrichment by magnetic beads is a kind of method for isolation of microsatellite DNAs. Microsatellite DNAs were isolated from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) genome with the method. In this experiment, partial microsatellite genomic library containing 1 000 colonies was constructed. About 90 positive colonies were obtained. Sequencing of 45 positive colonies confirmed that it contained 68 microsatellite loci (number of repeats  $\geq 5$  times). From these sequences, 49 repeat motifs (about 72%) were unique, including 22 CA, 18 GT and 9 other kinds of repeat motifs, while 44 sequences (about 65%) were perfect repeat motifs. The remaining 19 sequences are compound repeat motifs containing 19% perfect repeat motifs. Among all the microsatellites, CA repeat motifs is the widest, and then GT, GA. 15 pairs of primers were designed with the software Primer 3.0.

**Key words:** grass carp (*Ctenopharyngodon idella*); biotin; magnetic beads; microsatellite

草鱼作为半洄游性的鱼类,是目前中国乃至世界上产量最大的淡水经济鱼类。草鱼在中国的主要

收稿日期: 2006-07-10

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 973(2004CB117405) 和国家公益性计划资助项目(2005DIB4J024)

作者简介: 马海涛(1982-), 男, 在读硕士, 专业方向为水产动物遗传育种, E-mail: mahaitao26@163.com

通讯作者: 孙效文, Tel: 0451-84842646, E-mail: sunxw2002@163.com

河流都有分布,但其中以长江草鱼资源最为丰富,产卵场散布于从四川到安徽 700 km 长的干流江段,以及汉江、湘江等主要支流中<sup>[1]</sup>。我国科技工作者已经在同工酶<sup>[2-3]</sup>、线粒体 DNA<sup>[1,4]</sup>、RAPD<sup>[5]</sup>水平上对草鱼遗传结构与遗传多样性进行了研究。微卫星分子标记(microsatellite)以其重复性好、共显性,孟德尔方式遗传等特点,加快了在群体遗传多样性分析、构建遗传连锁图谱、亲子鉴定等方面的应用。本研究采用新型的生物素-磁珠吸附微卫星富集法和传统的放射性同位素杂交法相结合的方法,构建了草鱼基因组微卫星文库,获得了一批草鱼的微卫星引物。

## 1 材料和方法

### 1.1 微卫星标记的制备

采草鱼的血液,每 0.10 mL 血浆加 0.90 mL 裂解液(0.5% 十二肌胺酸钠,200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  蛋白酶 K,0.50 mol/L EDTA),37  $^{\circ}\text{C}$  消化过夜,用等体积的酚、氯仿、异戊醇(25:24:1)抽提三次。然后用 0.05 mol/L Tris-Cl(pH 8.0),0.01 mol/L EDTA(pH 8.0)透析过夜。无水乙醇沉淀,溶于 0.1  $\times$  TE。用限制性内切酶 *Sau3AI* 对大约 5  $\mu\text{g}$  基因组 DNA 进行酶切,1% 琼脂糖凝胶电泳检测,切下 400~1 000 bp 左右的片段,用试剂盒进行回收。等摩尔比混合两组寡聚核苷酸 A(5'-GATCGTCCGCGTACCGAATTCT3')和 B(5'-GTCAAGAATTCGGTACCGTCCGAC3'),95  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 min,然后缓慢降温至 10  $^{\circ}\text{C}$ ,此过程大约需要 4 h,最终形成双链接头 A/B。将回收的 DNA 片段与接头在 T4 连接酶的作用下于 16  $^{\circ}\text{C}$  过夜连接。

使用 100 KD 旋离柱去除多余的接头(Pall,USA),并浓缩反应液至 10  $\mu\text{L}$  左右,取 2  $\mu\text{L}$  接头连接产物作为模板,进行 25  $\mu\text{L}$  体系,20 个循环的 PCR 反应。程序为 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min,94  $^{\circ}\text{C}$  1 min,58  $^{\circ}\text{C}$  1 min,72  $^{\circ}\text{C}$  1 min,20 个循环,最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。每次 PCR 反应产物都需过柱去除多余的引物、dNTP 等,同时浓缩样品至最佳浓度。大约 276 ng 的第一次 PCR 产物与生物素标记的微卫星探针进行杂交,富集和捕获微卫星标记。其主要步骤为:(1)95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 PCR 扩增的基因组片断 5 min;(2)基因组片断与生物素标记探针 5'-Biotin-ATAGAATAT(CA)<sub>16</sub> 于 68  $^{\circ}\text{C}$  预杂交 1 h;(3)预先用 6  $\times$  SSC 平衡好的包裹有链霉亲和素的磁珠在 25  $^{\circ}\text{C}$  捕获探针-目标片断 20 min,静置磁力架(Promega,USA)上去除液体;(4)洗涤磁珠以减少非特异性杂交,洗涤过程包括:6  $\times$  SSC,0.1% SDS 室温洗涤 2 次,每次 10 min;预热的 3  $\times$  SSC,0.1% SDS 于 68  $^{\circ}\text{C}$  洗涤 2 次,每次 15 min;6  $\times$  SSC 于室温快速洗涤 2 次或 2 次以上;0.1  $\times$  TE 于室温洗涤 2 次;(5)最后通过 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 min,用 0.1  $\times$  TE(30~50  $\mu\text{L}$ )洗脱单链微卫星序列。

用 6  $\mu\text{L}$  单链微卫星序列作为模板,进行第二次 PCR 扩增,反应程序和循环数同第一次 PCR 扩增。然后过柱浓缩到大约 10  $\mu\text{L}$ 。约 100 ng PCR 产物与 TA 克隆载体 pGEM-T(Promega,USA)连接,并转化到自制的感受态 *E. coli* (DH5 $\alpha$  品系)。重组菌转至硝酸纤维素膜(Promega,USA),<sup>32</sup>P 标记的放射性同位素探针 5'-[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP(CA)<sub>15</sub>、(GA)<sub>15</sub> 进行原位杂交,压 X 光片,-70  $^{\circ}\text{C}$  放射自显影 7 d,显影。挑取阳性克隆进行测序分析

### 1.2 序列分析与 PCR 引物设计

经两轮筛选的阳性克隆菌挑到 96 孔培养板中,送至北京诺塞基因组研究中心有限公司测序,返回序列采用 Premier Primer 3.0 软件包进行在线引物设计。微卫星标记引物遵循以下原则进行设计:(1)扩增产物在 100~400 bp 之间,以提高多态等位基因的分辨率;(2)理想的引物,其碱基组成中(G+C)%至少大于 40%;(3)引物中不应包含重复 DNA 碱基。在此基础上挑选的引物,还需考虑软件中提供的其它参考因子,比如解链温度( $T_m$  值),引物内部结构问题等。

## 2 结果

实验获得了草鱼微卫星基因组文库 1 000 个菌,在杂交前通过菌落 PCR 检测阳性克隆率为 50% (图 1),二次杂交后得到的阳性克隆为 90 个,占大约 9.5%。挑出其中的 50 个进行测序分析,得到 45 个序列,其中 37 个克隆中含有微卫星核心序列。在 37 个序列中含有微卫星座位 68 个,其中 CA/GT 重



表1 草鱼微卫星分子标记及其引物

Tab.1 Microsatellite markers and their primers in grass carp

微卫星序列号	引物序列 5' - 3'	大小/bp	重复序列	最适退火温度/°C
HLJC-9	F: TTGAAGAGGGCCAATGGTTA R: TGCACGACACAACATGAAAA	283	(CT) <sub>24</sub>	60
HLJC-10	F: GAACGCACCCCTCTCCATCTA R: ACACGTCCTTGGGCAAATAG	154	(CA) <sub>25</sub>	60
HLJC-11	F: GGACGTTTGTGGGTGAAAAC R: GTCCAAGATCACCACACAC	159	(GA) <sub>5</sub> (GT) <sub>6</sub>	60
HLJC-14	F: GGCTTCTCCATCACCATCTC R: TCAGTTGTTCTGGCTGTCCA	240	(GA) <sub>26</sub>	60
HLJC-15	F: AGCTAAGCAGGAAACAAA R: TCTCAACCGTCTCCAAAAC	168	(GT) <sub>9</sub>	60
HLJC-16	F: GATCGCAATCAGACCATA R: TTCACTTACTCACCCCTCGT	121	(CA) <sub>24</sub>	60
HLJC-18	F: TCTGGAGATGACGGAGGG R: GCAGCAAGAAACTGGAAC	246	(GA) <sub>4</sub> (GA) <sub>6</sub>	60
HLJC-20	F: TCACTTGCAGTCCCTCACAC R: AGAGACATGCCCTCTTTTGG	224	(GT) <sub>19</sub> (GA) <sub>12</sub>	60
HLJC-25	F: CACCTCCAATTTAACTTCTC R: ATTCACTTACTCACCCCTCTG	263	(GT) <sub>14</sub>	50
HLJC-26	F: GCTGAACGCAAAAACATGAGA R: GTTAAAGCCCATGCTGCAAT	183	(GT) <sub>17</sub>	60

F: 正向引物; R: 反向引物

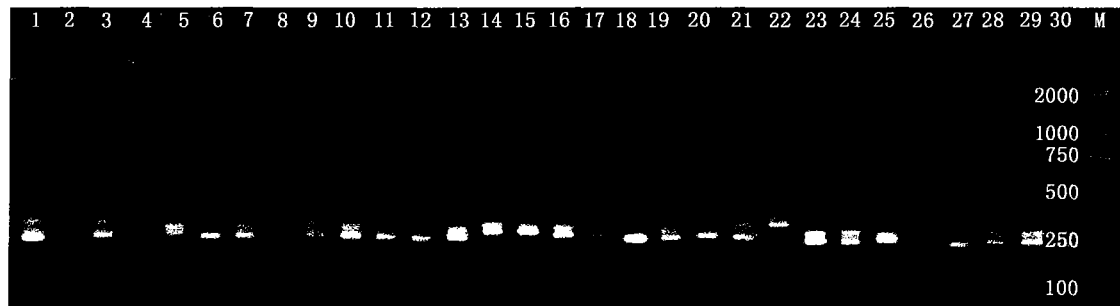


图3 HLJC20的扩增结果

Fig. 3 Amplification result of locus HLJC20

M: DNA 分子量标准 DL2000 1-30; 30 个草鱼个体

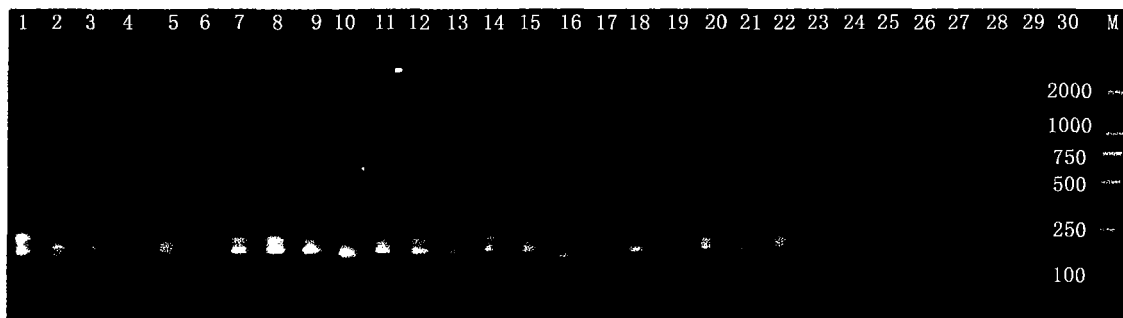
M: DNA Marker DL2000; 1-30: 30 individuals of *Ctenopharyngodon idella* population

图4 HLJC26的扩增结果

Fig. 4 Amplification result of locus HLJC26

M: DNA 分子量标准 DL2000 1-30; 30 个草鱼个体

M: DNA Marker DL2000; 1-30: 30 individuals of *Ctenopharyngodon idella* population

微卫星序列在群体中通常具有很高的多态性,微卫星的突变速率在不同物种以及同一物种的不同位点甚至在同一位点的不同等位基因间都存在着很大的差异<sup>[12-13]</sup>。在哺乳动物中,大多数的微卫星的突变率估计每世代  $10^{-5} \sim 10^{-2}$ ,人类家系的微卫星平均突变速率为  $10^{-4}$ <sup>[14]</sup>;黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)受控雌性系中的突变率为每个位点  $10^{-6}$ 左右<sup>[15]</sup>。当微卫星被表达在缺乏有效错配修复系统的寄主中时,其不稳定性要比正常时高  $(5 \sim 10) \times 10^3$ <sup>[16]</sup>。Johnson<sup>[17]</sup>和 Pupko<sup>[18]</sup>等认为,两条染色体间的 DNA 重组过程中发生的不等交换以及基因转换可能是引起微卫星多态性产生的主要原因。而 Levinaon 等认为在 DNA 复制合成的过程中,发生了局部解链,有微卫星存在的区域新生链和模板链相对滑动,产生错配,使得一个或者几个重复单位形成环状未能参与配对,从而导致了微卫星多态性的产生<sup>[12,20-21]</sup>。本次微卫星克隆共对 27 个微卫星座位进行了引物设计和合成,通过对合成的引物进行最适退火温度筛选发现,一般核心序列重复数在十几个到几十个时所得微卫星最容易确定退火温度且多态性较高。但也不是重复数越多就越好,比如 HLJC17、HLJC19 这两个微卫星引物,核心序列重复数分别为(CA)156、(CA)115,但在确定退火温度时却扩增不出带,分析原因可能是在本次微卫星克隆试验中,DNA 片段要经过两次 PCR 扩增,最后所得到这种微卫星核心序列并不是草鱼基因组本身含有的,而是由于 PCR 扩增中由于新生链和模板链发生相对滑动而造成的假微卫星。

自 20 世纪 90 年代初期以来,微卫星标记已经广泛应用于人类和一些重要模式生物连锁群的构建和物理图谱的绘制,但应用微卫星分子标记对草鱼基因组的遗传结构和遗传多样性进行研究的还极少,本研究应用了新型的磁珠富集法构建了草鱼部分基因组微卫星文库,获得了一些可使用的微卫星引物,可以为草鱼种群遗传学分析和多样性鉴定等提供理论依据和指导。

本研究得到常玉梅、贾智英等的帮助,在此表示感谢。

#### 参考文献:

- [1] 李思发,吕国庆,贝纳切兹.长江中下游鲢鳙青草四大家鱼线粒体 DNA 多样性分析[J].动物学报,1998,44(1):82-93.
- [2] 吴力钊,熊全洙.长江中游草鱼天然种群的生化遗传结构及变异[J].遗传学报,1992,19(3):221-227.
- [3] 赵金良,李思发.长江中下游鲢、鳙、青鱼、草鱼种群分化的同工酶分析[J].水产学报,1996,20:104-109.
- [4] 张四明,邓怀,汪登强,等.长江水系鲢和草鱼遗传结构及变异性的 RAPD 研究[J].水产生物学报,2001,25(4):324-330.
- [5] 张四明,汪登强,邓怀,等.长江中下游水系鲢和草鱼群体 mtDNA 遗传变异的研究[J].水生生物学报,2002,26(2):142-147.
- [6] 魏东旺,楼允东,孙效文,等.鲤鱼微卫星分子标记的筛选[J].动物学研究,2001,22(3):238-241.
- [7] Lunt D H, Hutchinson W F, Carvalho G R. An efficient method for PCR-based isolation of microsatellite arrays (PIMA) [J]. Molecular Ecology, 1999, 8:891-894.
- [8] Fisher P J, Gardner, Richardson T E. Single locus microsatellites isolated using 5' anchored-PCR [J]. Nucleic Acids Research, 1996, 24(21):4369-4371.
- [9] Carleton K L, Strelman J T, Lee B Y, et al. Rapid isolation of CA microsatellites from the tilapia genome [J]. Animal Genetics, 2002, 33: 140-144.
- [10] Lavric M. Isolation of microsatellite markers by FIASCO method [J]. Kmet Zooted, 2002, 80(2):203-211.
- [11] 李永强,李宏伟,高丽峰,等.基于表达序列标签的微卫星标记(EST-SSRs)研究进展[J].植物遗传资源学报,2004,5(1):91-95.
- [12] Xin X, Mei P, Zhan F, et al. The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length [J]. Nature Genetics, 2000, 24:396.
- [13] Zhang D X, Hewitt G M. Nuclear DNA analysis in genetic studies of population: practice, problems and prospects [J]. Mol Ecol, 2003, 12: 563.
- [14] Weber J L, Wong C. Mutation of human short tandem repeats [J]. Hum Mol Genet, 1993, 2:1123.
- [15] Schug M D, Mackay TFC, Aquadro C F. Low mutation rates of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster* [J]. Nat Genet, 1997, 15:99.
- [16] Chambers G K, MacAvoy E S. Microsatellites: consensus and controversy [J]. Comp Biochem Physiol Part B, 2000, 126:455.
- [17] Johnson R E, Henderson S T, Petes T D, et al. *Saccharomyces cerevisiae* RAD5-encoded DNA repair contains DNA helicase and Zinc-binding sequence motifs and affects the stability of simple repetitive sequences in the genome [J]. Mol Cell Biol, 1992, 12:3807.
- [18] Pupko T, Graur D. Evolution of microsatellites in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: role of length and number of repeated units [J]. J Mol Evol, 1999, 48:313.
- [19] Levinson G, Gutman G A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution [J]. Mol Biol Evolution, 1987, 4:203.
- [20] Strand M, Prolla T A, Leskay R M, et al. Destabilisation of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair [J]. Nature, 1993, 365:274.
- [21] Schlotterer C, Tautz D. Slippage synthesis of simple sequence DNA [J]. Genetics, 1996, 144:747.