

文章编号: 1004 - 7271(2008)02 - 0158 - 06

## 鲢鱼微卫星标记的分离与鉴定

杨成<sup>1,2</sup>, 朱新平<sup>3</sup>, 郝君<sup>4</sup>, 孙效文<sup>2</sup>

- (1. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090;
2. 中国水产科学院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150076;
3. 中国水产科学院珠江水产研究所, 广东 广州 510380;
4. 大连水产学院生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023)

**摘要:**利用磁珠富集法构建了鲢鱼的(CA)<sub>n</sub>微卫星富集文库, 所建文库共包含 252 个阳性克隆, 从中随机选取 60 个进行测序, 得到 56 个(93.3%)含有微卫星序列的克隆。其中, 完美型微卫星 49 个(87.5%), 非完美型微卫星 2 个(3.6%), 复合完美型微卫星 5 个(8.9%)。从所得序列中分离和鉴定了 18 对微卫星标记。采用 20 个鲢鱼养殖个体分析其多态性, 发现其中 12 对为多态性标记, 等位基因数变动范围为 2~20, 期望杂合度变动范围为 0.2615~0.9500。本研究对以后鲢鱼基因组资源的开发利用起到一定的促进作用, 并为鲢鱼养殖品系的优化、遗传多样性的检测及遗传图谱的构建等打下基础。

**关键词:**鲢鱼; 微卫星; 富集法; 多态性  
**中图分类号:**S 917      **文献标识码:**A

## Isolation and characterization of novel microsatellite markers from an enriched mud carp (*Cirrhina molitorella*) genomic library

YANG Cheng<sup>1,2</sup>, ZHU Xin-ping<sup>3</sup>, HAO Jun<sup>4</sup>, SUN Xiao-wen<sup>2</sup>

- (1. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;
2. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150076, China;
3. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;
4. College of Life Science and Technology, Dalian Fisheries College, Dalian 116023, China)

**Abstract:** A (CA)<sub>n</sub> enriched microsatellite library was constructed for mud carp *Cirrhina molitorella* using a magnetic beads enrichment procedure. After sequence analysis on 60 randomly picked colonies from 252 positive clones, 56 (93.3%) of the colonies were found to contain microsatellite sequences. Among the 56 microsatellites, 49 were perfect (87.5%), 2 were imperfect (3.6%) and 5 turned out to be compound (8.9%). 18 pairs of PCR primers were designed through software package. Microsatellite variation was assessed using 20 mud carp individuals, and 12 microsatellite loci were turned out to be polymorphic. The number of alleles ranged from 2 to 20 and the expected heterozygosity (He) ranged from 0.2615 to 0.9500. The results of this work may contribute to future studies of parentage, population genetic structure and the construction of the genetic mapping for the mud carp.

收稿日期: 2007-05-18

基金项目: 国家公益性计划(2005DTB4J024)

作者简介: 杨成(1983-), 女, 硕士研究生, 专业方向为水产养殖。E-mail: yongcheng2@hotmail.com

通讯作者: 孙效文, E-mail: sunxw2002@163.com

**Key words:** *Cirrhina molitorella*; microsatellite; enrichment; polymorphism

鲮鱼(*Cirrhina molitorella*)俗称土鲮、鲮公、雪鲮,在分类学上属鲤科野鲮亚科鲮属,是我国南方重要的经济鱼类之一,其产量约占珠江流域淡水渔业产量的 1/3。微卫星(microsatellite)是一种以 2~6 bp 的核苷酸序列成串联重复散布于真核生物基因组中的高度重复序列,一般重复数为 10~60 次<sup>[1]</sup>。目前这一标记已广泛应用于遗传连锁图谱的制备、种质鉴定、种群多样性分析等方面<sup>[2-4]</sup>。有关鲮鱼的基础研究报道较多<sup>[5-8]</sup>,但遗传方面的研究偏少。郑光明等<sup>[9]</sup>对鲮鱼 DAF 和 RAPD 做了比较研究,但鲮鱼微卫星 DNA 的分离在国内尚无报道,本研究尝试用磁珠富集的方法筛选鲮鱼的微卫星分子标记,为其养殖品系的优化、遗传多样性的检测及遗传图谱构建等打下基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物

鲮鱼鳍条样采自广东省广州市珠江水系养殖群体,共 20 尾,由珠江水产研究所朱新平提供。

### 1.2 实验试剂及药品

生物素标记的微卫星寡核苷酸探针 biotin-(CA)<sub>12</sub>由上海生工生物工程技术有限公司合成;链亲和素磁珠和磁力架购自 Biolabs 公司;

实验用菌株 *E. coli* DH5 $\alpha$  由本实验室自行保存,载体 pMD18. T 载体购自 TaKaRa 公司。

Taq DNA 聚合酶购自 Promega 公司;T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司。

### 1.3 微卫星富集文库的构建

#### 1.3.1 基因组 DNA 的提取和酶切

用酚、氯仿法分离纯化鲮鱼基因组 DNA。参照分子克隆第六章(第三版)<sup>[10]</sup>。

将提取的基因组 DNA 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,粗估其含量为 100 ng/ $\mu$ L。取约 3  $\mu$ g 鲮鱼的基因组 DNA,在含有限制性内切酶 *Sau* 3A I (10 U/ $\mu$ L) 的酶切缓冲体系(50  $\mu$ L)中,于 37  $^{\circ}$ C 温育 3.5 h 后,利用蔗糖密度梯度(10%、20%、30% 和 40% 4 个梯度)离心(2 200 r/min,22 h),收集 400~900 bp 的目的片段。

#### 1.3.2 接头的制备及连接

本实验采用 Brown 等<sup>[11]</sup>接头。

Brown 接头的制备:等比例混合两组寡聚核苷酸链 A(5'GATCGTCGACGGTACCGAATTCT3') 和 B(5'GTCAAGAATTCGCTACCGTCGAC3'),95  $^{\circ}$ C 变性 10 min,然后经过 4 h 缓慢冷却至 10  $^{\circ}$ C,最终形成的双链接头为:

Linker A 5'GATCGTCGACGGTACCGAATTCT

Linker B 3'CAGCTGCCATGGCTTAAGAAGCTG

建立 20  $\mu$ L 的连接体系,其中包含 5  $\mu$ L 酶切片段,10  $\mu$ L Brown 接头,6  $\mu$ L T4 DNA 连接酶(Promega,USA),于 16  $^{\circ}$ C 水浴中过夜连接 12~14 h。用旋离柱(Centrifugal Concentrators, PALL FILTRON)去除多余的接头并浓缩至 10  $\mu$ L 左右,1% 琼脂糖凝胶电泳检测多余接头是否除净。

#### 1.3.3 双重 PCR 及亲和捕捉<sup>[12]</sup>

以 3  $\mu$ L 连接产物为模板,进行 25  $\mu$ L 体系的一次 PCR 扩增(PE 9700)。反应程序为:94  $^{\circ}$ C 变性 3 min,然后 94  $^{\circ}$ C 1 min,60  $^{\circ}$ C 1 min,72  $^{\circ}$ C 2 min,20 个循环,最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应完毕,过柱去除多余的引物、dNTP 等,同时将 PCR 产物浓缩至 10  $\mu$ L 左右。电泳检测其浓度及片段大小。

将连有接头、经一次 PCR 扩增的 DNA 片段于 95  $^{\circ}$ C 变性 5 min,然后迅速加入到杂交液(10  $\mu$ mol/L 生物素探针(CA)<sub>15</sub>,50  $\mu$ mol/L 引物,15  $\mu$ L 20  $\times$  SSC,0.5  $\mu$ L 10% SDS,加水补足到 50  $\mu$ L)中,于 68  $^{\circ}$ C 杂交炉中温育 1 h。杂交的同时准备磁珠的平衡:取 1 mg(10 mg/mL)磁珠放于一个 500  $\mu$ L 低粘性的硅

化管中,将硅化管放在磁力架(MPC)上1~2 min,轻轻吸出盐溶液。加入200  $\mu\text{L}$  B&W(10 mmol/L Tris-Cl, 1 mmol/L EDTA, 2 mol/L NaCl)洗涤两遍,再用200  $\mu\text{L}$  洗液 I(6  $\times$  SSC, 0.1% SDS)洗涤两遍,最后加入200  $\mu\text{L}$  洗液 I,静置待杂交结束。

用包裹有链霉亲和素的磁珠于25  $^{\circ}\text{C}$ 捕获连有生物素探针的微卫星序列,缓慢摇20 min,以使链霉亲和素与生物素充分结合,然后将硅化管置于磁力架(MPC)上。洗涤磁珠去除非特异性DNA片段:6  $\times$  SSC, 0.1% SDS 室温洗涤两次,每次静置10 min;3  $\times$  SSC, 0.1% SDS 于68  $^{\circ}\text{C}$ 洗涤两次,每次静置15 min;6  $\times$  SSC 室温快速洗涤三次;0.1  $\times$  TE 室温快速洗涤三次;最后加入30  $\mu\text{L}$  0.1  $\times$  TE,于95  $^{\circ}\text{C}$ 变性10 min,以洗脱含有微卫星序列的单链DNA。以单链DNA为模板进行第二次PCR扩增,共20个循环,程序同一次PCR。过柱,并浓缩PCR产物至10  $\mu\text{L}$ 左右。

### 1.3.4 克隆测序

取3  $\mu\text{L}$  PCR产物与TA克隆载体pGEM-T(Promega, USA)于4  $^{\circ}\text{C}$ 水浴中过夜连接12~14 h,同时以T载体自连作为对照,将连接产物转化到用CaCl<sub>2</sub>制备的感受态*E. coli* (DH5 $\alpha$ 品系)中。含重组子的菌落转移至硝酸纤维素膜上(Promega, USA),并用 $\gamma$ -<sup>32</sup>P标记的放射性同位素探针(CA)<sub>15</sub>进行第二轮杂交,具体方法参照分子克隆第一章(第三版)<sup>[10]</sup>。挑取阳性克隆,送至北京诺塞基因组研究中心有限公司测序。

## 1.4 引物筛选及鉴定

返回序列根据其两端保守的侧翼序列,利用Primer Premier 5.0和Primer Premier 3.0软件进行引物设计,设计所得引物由上海生工合成。以20尾鲮鱼的基因组DNA为模板进行PCR扩增,扩增产物在8%聚丙烯酰胺凝胶上分析。

## 1.5 数据分析

用GELPRO32软件分析电泳图片,得到所有条带的基因型。然后用POPGENE32软件<sup>[13]</sup>处理基因型数据。

## 2 结果

### 2.1 适宜大小的基因组DNA片段的筛选

用限制性内切酶*Sau3AI*对高纯度基因组DNA进行不完全酶切(图1),再通过蔗糖密度梯度离心筛选所需的基因组片段。试验选用了10%、20%、30%和40% 4个梯度的蔗糖溶液进行密度梯度离心,离心后用针刺管底收集混合溶液,按每管400  $\mu\text{L}$ 共收集了39管含酶切DNA片段的溶液。琼脂糖电泳检测(图2),选取大小为400~900 bp的目的片段,即第30、31管进行下步试验。

### 2.2 菌落PCR检测重组率

将目的片段转化入利用CaCl<sub>2</sub>制备的感受态大肠杆菌DH5 $\alpha$ ,获得富集微卫星的基因组文库。文库共约2000个克隆,随机挑选15个克隆,以Linker B为引物,进行菌落PCR,检测重组率,结果11个克隆均为阳性,重组率73.3%。因此,本次试验所获得的基因组文库约有1467个属于重组克隆。

### 2.3 测序结果

从以上基因组文库中随机选取900个,通过同位素杂交进行二次筛选,得到阳性克隆252个(阳性克隆率约为28%),送出测序60个,得到56个(93.3%)含有微卫星序列的克隆。其中,完美型微卫星

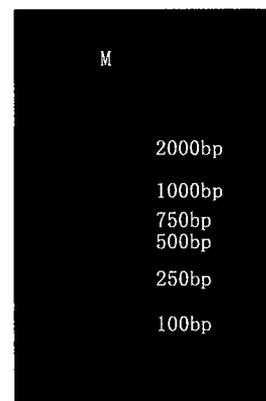


图1 *Sau3AI*酶切基因组DNA

Fig. 1 Genomic DNA fragments cut by *Sau3AI*

49 个(87.5%),非完美型微卫星 2 个(3.6%),复合完美型微卫星 5 个(8.9%)。95.56% 的微卫星序列与探针序列 CA(GT) 重复单元相符,还观察到 CT(AG) 的重复序列。53.6% 的微卫星 DNA 其核心序列的重复长度为 10~60 bp,微卫星长度分布频率见图 3。

## 2.4 引物设计与筛选

在 56 个微卫星序列中,45 个含有合适片断长度的侧翼序列,适合设计引物。利用引物设计软件 Primer Premier 5.0 和 Primer Premier 3.0 设计引物,共设计引物 39 对。通过 PCR 扩增进行筛选,结果有 18 对能扩增出清晰的条带,其中 12 对具有多态性。

## 2.5 多态性位点的鉴定

以 20 尾鲢鱼的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增产物在 8% 聚丙烯酰胺凝胶上分析,对这 12 对多态性标记进行鉴定(引物信息见表 1,微卫星序列等信息请查询网站 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。图 4 为引物 HLJLY-23 扩增鲢鱼养殖群体的电泳图片。12 个位点等位基因数变动范围为 2(HLJLY-27)~20(HLJLY-7),平均等位基因数为 7;期望杂合度变动范围为 0.268 5(HLJLY-27)~0.950 0(HLJLY-7),平均期望杂合度为 0.638 5。该群体的遗传结构经 POPGENE32 软件预测分析,结果显示部分微卫星位点(HLJLY-5, HLJLY-6, HLJLY-9, HLJLY-12, HLJLY-18, HLJLY-37 和 HLJLY-44)存在无效等位基因,基因频率偏离 Hardy-Weinberg 平衡( $P < 0.01$ ),但并未发现两两位点之间存在连锁不平衡现象( $P < 0.05$ )。



图 4 HLJLY-23 在鲢鱼群体扩增图谱

Fig. 4 Electrophoretograms of locus HLJLY-23 in the mud carp population

## 3 讨论

### 3.1 磁珠富集法结合同位素杂交筛选构建鲢鱼微卫星富集文库的优势

微卫星 DNA 的克隆主要有两种方法<sup>[14]</sup>:一种是构建目标生物基因组小片断 DNA 文库,通过杂交筛选出含有微卫星序列的阳性克隆,但是筛选过程较复杂,筛选效率低,人力资源和资金的投入量都很大;另一种方法是用生物素结合磁珠的富集技术,也就是本实验所采用的方法。此方法有三大优势:1. 构建微卫星富集文库周期短,本实验构建鲢鱼微卫星富集文库的周期为 1 个月。2. 本实验磁珠富集法筛选出的微卫星质量和效率都比较高,测序所得序列含有微卫星的阳性率为 100%。因为此法对微卫星进行了两次筛选,第一次是用生物素联结的 CA 重复序列做探针,在杂交洗脱时将大部分低重复序列除去,同时较标准的磁珠富集法又增加了用同位素标记的 CA 探针进行二次筛选,进一步删除了低重

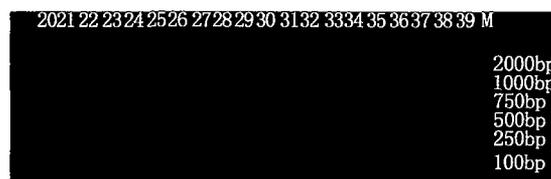


图 2 蔗糖密度梯度离心收集产物的电泳图

Fig. 2 Electrophoretogram of sucrose density gradients centrifugation products

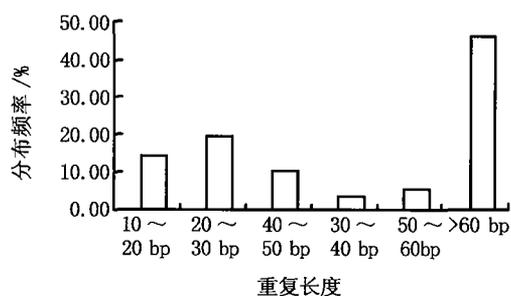


图 3 鲢鱼微卫星长度的频率分布

Fig. 3 Length distribution of microsatellite in the genome of mud carp

复序列。3. 适合大规模的克隆, 本实验从 2 000 个克隆中随机挑取 900 个克隆进行同位素杂交筛选, 共获得 252 个阳性克隆, 如果实验要求克隆数大, 比如用作遗传图谱的构建和 QTL 定位, 则可挑取更多的克隆进行筛选。

表 1 鲢鱼 12 个多态性微卫星位点的各项指标

Tab. 1 Characteristics of twelve polymorphic microsatellite loci from *Cirrhina molitorella*

位点	序列号	引物序列	等位基因数目	等位基因大小(bp)	微卫星重复	退火温度(°C)	$H_o$	$H_e$	H-W (P值)
HLJLY-5	EF112406	F: TGATGCTCGGTTAATGAAG R: AGGGTAAGGGTTTGGGTGAG	3	201 ~ 209	CA <sub>(13)</sub>	65	0.550 0	0.537 2	0.000 0
HLJLY-6	EF112407	F: AGAAATGGAGCCAAGACT R: ACCCAGGTGAGTCAGTATGT	13	328 ~ 356	CA <sub>(17)</sub>	56	0.850 0	0.891 0	0.000 0
HLJLY-7	EF112408	F: ATTACAGCGTGGTTAGGG R: AACCTTTCTCCAAACCGT	20	96 ~ 127	CA <sub>(15)</sub>	55	0.850 0	0.950 0	0.208 7
HLJLY-9	EF112409	F: TGAAAGACATAAGCAAAATC R: ATCTAAAGTGGCAGCATT	5	107 ~ 124	CA <sub>(17)</sub>	52	1.000 0	0.751 3	0.000 0
HLJLY-12	EF112410	F: AGGCTGGTTTCGTGGTCC R: ACTTCCGTCGGGGCAAG	9	151 ~ 181	GT <sub>(7)</sub>	49	1.000 0	0.689 7	0.000 0
HLJLY-18	EF112411	F: CACTTGACACACGCCTCATT R: CGATTCTCTGCCACCTTTT	7	130 ~ 168	TG <sub>(24)</sub> AG <sub>(4)</sub>	61	0.900 0	0.759 0	0.001 3
HLJLY-23	EF112412	F: TGGGTTGGACTATTGCTC R: GGATTTGATGCTTGGGAG	9	196 ~ 218	CA <sub>(14)</sub>	49	0.500 0	0.698 7	0.413 6
HLJLY-27	EF112413	F: CATGTGCCTAGCCCTCTCTC R: GGTACCGTCGACGATCAAGT	2	194 ~ 215	CT <sub>(12)</sub> CA <sub>(86)</sub>	57	0.300 0	0.261 5	0.476 0
HLJLY-34	EF112416	F: CATGGAGCTTCACTGCTCTG R: AAAGGAAAGCGGAAAAAATC	5	110 ~ 129	TG <sub>(34)</sub>	46	1.000 0	0.779 5	0.021 4
HLJLY-37	EF112417	F: ACAACAAAGTATGAAGAA R: ATCAGGAGTCATTAGGCA	4	195 ~ 208	TG <sub>(25)</sub>	48	0.100 0	0.344 9	0.000 6
HLJLY-38	EF112418	F: AAAGAGCATAGAGGTA R: AAAAGTCCAAATATCACA	4	283 ~ 316	CA <sub>(14)</sub> CA <sub>(7)</sub> CA <sub>(22)</sub>	46	0.650 0	0.583 3	0.015 6
HLJLY-44	EF112419	F: CTCGTTTTTCTTGCGAATGG R: CACAAATTTTCAATTGGCACTG	3	317 ~ 323	CA <sub>(39)</sub>	48	0.000 0	0.415 4	0.000 0

注: F, 正向引物; R, 反向引物;  $H_o$ , 观测杂合度;  $H_e$ , 期望杂合度; H-W, Hardy-Weinberg 平衡

### 3.2 鲢鱼基因组微卫星的特征与分布

研究表明, 不同生物基因组微卫星分布各有其特点: 哺乳动物(如: 小鼠和人)的基因组中, (CA)<sub>n</sub>、(A)<sub>n</sub>、(AAAT)<sub>n</sub>、(AG)<sub>n</sub> 重复类型的微卫星分布较广; 而植物基因组中, (CA)<sub>n</sub> 分布较少, (AA)<sub>n</sub> 和(AT)<sub>n</sub> 分布广泛; 鸟类基因组中, 单碱基和四碱基微卫星重复比二碱基和三碱基微卫星重复分布广泛; 鱼类基因组中, 二碱基微卫星重复占绝对优势, 其中又以(AC)<sub>n</sub>、(AG)<sub>n</sub> 分布最为广泛<sup>[15-18]</sup>。本研究所用生物素探针为(CA)<sub>12</sub>, 结果 95.56% 的微卫星序列与探针序列相符, 只是重复长度有所差别。同时, 4.44% 的微卫星序列与探针序列不符, 而这些随机获得的微卫星序列大部分为 CT(AG) 重复, 说明 CT(AG) 重复在鲢鱼基因组中分布较广泛, 而三碱基重复和四碱基重复的微卫星没有观察到。由图 3 可知, 53.6% 的微卫星 DNA 其核心序列的重复长度为 10 ~ 60 bp。46.4% 的微卫星 DNA 长度大于 60 bp, 说明鲢鱼基因组中存在不少较长的微卫星片断。由于本实验采用的探针类型仅为(CA)<sub>15</sub> 这一种探针, 而且经测序的克隆数也较少, 因此对鲢鱼微卫星的分布特征和规律的认识有一定局限性, 要想对鲢鱼微卫星的分布特征和规律有一个全面充分的认识, 需要同时采用更多类型的探针, 并且需要挑取大量的克隆进行测序。

### 3.3 微卫星标记对鲢鱼群体的遗传多样性分析

用筛选所得 12 个多态性标记对 20 个鲢鱼养殖个体进行遗传多样性分析, 发现在 HLJLY-6、HLJLY-7、HLJLY-12、HLJLY-18、HLJLY-23 这 5 个位点, 等位基因数目以及杂合度较大。另外, 在部分

位点发现到等位基因的缺失,可能是遗传漂变所造成的,这种现象在所有群体中都有可能存在,但在小群体中更容易出现。用 POPGEN32 软件预测和检验,在 HLJLY-5, HLJLY-6, HLJLY-9, HLJLY-12, HLJLY-18, HLJLY-37 和 HLJLY-44 这 7 个位点检测到极显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡( $P < 0.01$ ),可能是本实验所采用的样本容量太小( $n = 20$ )或采样过于集中所致,另一个可能的原因是本实验群体为鲢鱼养殖群体,长期高强度的人工选择和高密度养殖都可能使部分位点杂合子缺失,从而造成某些基因型极端偏离 Hardy-Weinberg 平衡。

本研究所获得的微卫星标记多态性较高,可用于鲢鱼其他群体的遗传多样性和群体遗传结构的研究,并为与鲢鱼经济性状的连锁定位及其品种优化打下基础。

### 参考文献:

- [1] Weitzmann M N, Woodford K J, Usdin K. The mouse Ms6-hm hypervariable microsatellite forms a hairpin and two unusual tetraplexes[J]. J Biol Chem, 1998, 273(46): 30 742 - 30 749.
- [2] Dib C, Faure S, Fizames C, et al. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5 624 microsatellites[J]. Nature, 1996, 380(6570): 152 - 154.
- [3] 鲁双庆, 刘 臻, 刘红玉, 等. 鲫鱼 4 群体基因组 DNA 遗传多样性及亲缘关系的微卫星分析[J]. 中国水产科学, 2005, 12(4): 371 - 376.
- [4] 刘志毅, 相建海. 微卫星 DNA 分子标记在海洋动物遗传分析中的应用[J]. 海洋科学, 2001, 25(6): 11 - 13.
- [5] 吴力钊, 王祖熊. 鲢鱼和二代混精鲢鱼低温时耐受能力的差异[J]. 水生生物学报, 1993, 17(3): 206 - 210.
- [6] 朱新平, 刘家照, 夏仕玲, 等. 外源 DNA 对鲢鱼脑乙酰酯酶的影响[J]. 淡水渔业, 1996, 26(6): 7 - 8.
- [7] 朱新平, 夏仕玲, 张 跃, 等. 转抗冻蛋白基因鲢鱼的初步研究[J]. 中国水产科学, 1997, 4(2): 79 - 80.
- [8] 朱新平, 夏仕玲, 刘家照, 等. 鲤鱼总 DNA 对鲢鱼抗寒性能的影响[J]. 淡水渔业, 1996, 26(3): 14 - 16.
- [9] 郑光明, 朱新平, 刘毅辉, 等. 鲢鱼 DAF 和 RAPD 的比较研究[J]. 水生生物学报, 2005, 29(3): 344 - 348.
- [10] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆试验指南(第 3 版)[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [11] Brown J, Hardwick L J, Wright A F. A simple method for rapid isolation of microsatellites from yeast artificial chromosomes[J]. Molecular and Cellular Probes, 1995, 9(1): 53 - 57.
- [12] Lee W J, Kocher T D. Microsatellite DNA markers for genetic mapping in the tilapia(*Oreochromis niloticus*)[J]. Fish Biol, 1996, 49(1): 169 - 171.
- [13] Yeh F C, Yang R C, Boyle T. POPGENE(ver1.31)[CP/OL]. Http://www.ualberta.ca/~fyeh, 1999.
- [14] 孙效文, 贾智英, 魏东旺, 等. 磁珠富集法与小片段克隆法筛选鲤微卫星的比较研究[J]. 中国水产科学, 2005, 12(2): 126 - 131.
- [15] Lagercrantz U, Ellegren H, Andersson L. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates[J]. Nucleic Acids Res, 1993, 21(5): 1111 - 1115.
- [16] Beckman J S, Weber J L. Survey of human and rat microsatellites[J]. Genomics, 1992, 12(4): 627 - 631.
- [17] Primmer C R, Chowdhary B P, Chowdhary B P, et al. Low frequency of microsatellites in the avian genome[J]. Genome Res, 1997, 7(5): 471 - 482.
- [18] Cui J Z, Shen X Y, Yang G P, et al. Characterization of microsatellite DNAs in *Takifugu rubripes* genome and their utilization in the genetic diversity analysis of *T. rubripes* and *T. pseudommus*[J]. Aquaculture, 2005, 250(1 - 2): 129 - 137.