

文章编号: 1674-5566(2009)02-0129-07

中华绒螯蟹部分基因组文库构建和 微卫星位点的筛选

毛瑞鑫^{1,2}, 鲁翠云¹, 刘福军³, 赵莹莹^{1,2},
谷晶晶³, 常玉梅¹, 梁利群¹, 孙效文¹

(1. 中国水产科学院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150076;
2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;
3. 大连水产学院生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023)

摘要:利用磁珠富集和放射性杂交相结合构建了中华绒螯蟹基因组微卫星文库。并利用生物素标记的 (GA)₁₂ 探针进行微卫星片段的富集。将得到的片段与 pGEM-T 载体连接后转入 DH5 α 大肠杆菌中, 然后利用 γ -³²P 同位素标记的 (GA)₁₂ 探针进行第二次筛选。结果共获得微卫星基因组文库 1 500 个菌, 杂交前菌落 PCR 检测阳性克隆率为 62.5%; 杂交后得到的阳性克隆为 447 个, 占 29.8%。经测序, 有 248 个克隆含有重复次数大于 5 次的微卫星序列。在得到的微卫星序列中, 重复单元除 GA/CT 外, 还观察到三碱基、四碱基重复单元。根据侧翼序列设计引物 164 对, 选择合成 50 对, 通过优化 PCR 反应条件, 结果有 21 对引物可扩增出清晰可重复的目的条带, 15 对具有多态性。本研究对中华绒螯蟹基因组资源的开发利用提供了相关资料。

关键词:中华绒螯蟹; 微卫星; 磁珠富集

中图分类号: S 917 **文献标识码:** A

Fractional genomic libraries constructing and microsatellites DNA screening of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)

MAO Rui-xin^{1,2}, LU Cui-yun¹, LIU Fu-jun³, ZHAO Ying-ying^{1,2},
GU Jing-jing³, CHANG Yu-mei¹, LIANG Li-qun¹, SUN Xiao-wen¹

(1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute Chinese Academy of Fishery Sciences Harbin 150076, China;
2. College of Fisheries and Life Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. College of Life Science and Technology Dalian Fisheries College Dalian 116023, China)

Abstract: In this experiment microsatellite DNAs were isolated from Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) genome by combining biotin capture method and radioactive labeling hybridization. The purified ligated DNA was hybridized with biotin-labeled simple sequence repeats (SSR) probes (GA)₁₂, and the mixture was incubated with streptavidin-coated magnetic beads. The selected single-strand microsatellite DNA was obtained by removing the SSR-uncombined fragments. After capture of target fragments by magnetic beads and PCR amplification, the PCR products were ligated to T vector and transformed to *E. coli* competent cells. A

收稿日期: 2008-04-01

基金项目: 国家科技基础条件平台建设 (2005DKA30470-005)

作者简介: 毛瑞鑫 (1983-), 男, 山西吕梁人, 硕士研究生, 专业方向为水产动物遗传育种, E-mail: maourixin132@163.com

通讯作者: 孙效文, E-mail: sunxw2002@163.com

microsatellite genomic library 1 500 colonies was constructed 447 positive colonies (29.8%) were obtained through twice screens by radioactive γ - 32 P labeling hybridization Sequencing of 447 positive colonies confirmed that 248 contained 266 microsatellite loci Besides the motif of GA/CT contained in the colonies there were also CCT, TCC and AAGG, TTCC repeat motifs 164 pairs of primers were designed with the software primer premier 3.0. In addition 50 pairs of primers were composed and screened 21 pairs were used successfully to amplify special fragments among which 15 pairs were polymorphism within species This research offers relevant data to explore genomes of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*

Key words: Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*); microsatellite enrichment by magnetic beads

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*), 俗称河蟹, 分类学上隶属于节肢动物门、甲壳纲、十足目、方蟹科、弓腿蟹亚科、绒螯蟹属, 是我国特有的水生经济动物。二十世纪 70 年代人工育苗技术, 极大地推动了河蟹养殖业的发展。但是, 与此同时带来的负面影响, 如苗种混杂, 种质衰退, 已经成为河蟹养殖生产发展的瓶颈^[1]。李思发等^[2-4]曾从形态特征、生化遗传、分子遗传标记 3 个角度研究了中华绒螯蟹群体和日本绒螯蟹群体的亲缘关系。唐伯平^[5-6]等通过对绒螯蟹的核 DNA 和线粒体 DNA 进行对比, 并结合形态学和生态学的知识, 着重研究了我国中华绒螯蟹与广西合浦绒螯蟹的遗传关系。目前, 对中华绒螯蟹分子标记的研究, 主要集中在 mDNA 和无种属特异性的分子遗传标记 RAPD^[7-17]。微卫星 DNA 标记在中华绒螯蟹种内的遗传分析方面具有较 mDNA 和其它现有的核 DNA 标记更为优越的特性, 这些特点说明微卫星很适合于中华绒螯蟹种群遗传变异的研究。目前, 开发中华绒螯蟹微卫星标记的研究, 几乎没有得到实质性的开展。Haenfling 等^[18]只克隆了 10 多个中华绒螯蟹微卫星标记, Chang 等^[19]报道了中华绒螯蟹的 10 多个多态性微卫星引物, 研究主要是传统的随机克隆。本研究采用磁珠富集与放射性杂交相结合的方法构建中华绒螯蟹微卫星文库, 并设计和筛选相应 PCR 扩增引物, 为中华绒螯蟹种质鉴定、遗传连锁图谱的构建、QTL 定位及对其进行更深入地研究提供了基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料

实验用中华绒螯蟹样品于 2008 年 8 月购于哈尔滨市一水产门市部。

1.2 基因组 DNA 的提取和酶切

将中华绒螯蟹的肌肉取出, 放入研钵中, 液氮研磨, 取 0.1 g 肌肉粉末放入 1.5 mL 离心管中, 加入 0.5 mL 的裂解液 (200 μ g/mL 蛋白酶 K, 0.5% 十二烷基肌氨酸钠, 200 mmol/L EDTA pH 8.0), 50 $^{\circ}$ C 消化, 用酚、氯仿、异戊醇混合液 (体积比为 25:24:1) 抽提 3 次, 然后用 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 和 0.01 mol/L EDTA (pH 8.0) 透析 16 h 预冷的无水乙醇沉淀, 70% 预冷乙醇洗涤 1 次, 室温干燥, 0.1 \times TE 溶解, 置 4 $^{\circ}$ C 冰箱备用。参照分子克隆第六章^[20]。

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/ μ L。取约 1 μ g 中华绒螯蟹的基因组 DNA, 在含有限制性内切酶 *Sau*3A I (10 U/ μ L) 的酶切缓冲体系 (20 μ L) 中, 于 37 $^{\circ}$ C 温育 5 h 后, 利用蔗糖密度梯度 (10%、20%、30% 和 40% 四个梯度) 离心 (2200 r/min, 4 $^{\circ}$ C, 22 h), 收集 400~1 000 bp 的目的片段。

1.3 基因组 DNA 片段与接头的连接

本实验采用 Brown 接头。

Brown 接头的制备: 用单链寡核苷酸合成双链接头, 等比例混合两组寡聚核苷酸链 A (5' GATCGTCGACGGTACCGAATTCT3') 和 B (5' GTCAAGAATTCCGGTACCGTCGAC3'), 95 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 然后经过 4 h 缓慢冷却至 10 $^{\circ}$ C, 最终形成带有几个限制性酶切位点 (*Sau*3A I, *Sa*I, *Eco*RI) 的双接头:

Linker A 5' GATCGTTCGACGGTACCGAATTCT
 |||
 Linker B 3' CAGCTGCCATGGCTTAAGAACTG
 Sau 3AI—SalI—EcoRI

建立 20 μ L 的连接体系,其中包含 5 μ L 酶切片段,10 μ L Brown 接头,1 μ L T₄ DNA 连接酶 (Promega USA),10 \times buffer 2 μ L 无菌水补足体积至 20 μ L。于 16 $^{\circ}$ C 水浴中过夜连接 12~14 h。用离心柱 (Centrifugal Concentrators PALL FILTRON) 去除多余的接头并浓缩至 10 μ L 左右,1% 琼脂糖凝胶电泳检测多余接头是否除净。

1.4 创建中华绒螯蟹基因组 PCR 文库

以 5 μ L 连接产物为模板,进行 25 μ L 体系的一次 PCR 扩增 (PE9700 型 PCR 仪),程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 m in,94 $^{\circ}$ C 变性 1 m in,58 $^{\circ}$ C 退火 1 m in,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 m in,20 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 m in。反应完毕后,如上过柱,去除多余的引物和未参加反应 dNTP 等,同时将 PCR 产物浓缩至 15 μ L 左右。电泳检测其浓度及片段大小。

1.5 用生物素标记的微卫星探针和 Dyna 磁珠与微卫星文库杂交

1.5.1 杂交

建立 50 μ L 反应体系:

1.5 μ L (10 μ mol/L)	Probe 为生物素标记的 (GA) ₁₂
5 μ L (50 μ mol/L)	Primer B
15 μ L	20 \times SSC
0.5 μ L	10% SDS
16 μ L	ddH ₂ O

以上混合液 68 $^{\circ}$ C 预热

12 μ L (276 ng)	DNA
---------------------	-----

将连有接头、经一次 PCR 扩增的 DNA 片段 95 $^{\circ}$ C 变性 5 m in 加入预热的杂交混合液,68 $^{\circ}$ C 杂交 1 h。杂交过程中平衡磁珠。

1.5.2 磁珠的平衡与富集

将磁珠轻轻摇匀,取 100 μ L (10 mg/mL) 磁珠置于一个 500 μ L 低黏性的硅化管中,将硅化管置于磁力架 (MPC, Promega USA) 上静置 1~2 m in 轻轻吸出盐溶液,加入 200 μ L B & W (10 mmol/L Tris-Cl 1 mmol/L EDTA, 2 mol/L NaCl) 洗涤两次,再用 200 洗液 I (6 \times SSC, 0.1% SDS) 洗涤 3~5 次,直到磁珠变得光滑易洗脱,最后加入 150 μ L 洗液 I 静置待杂交结束。

磁珠吸附富集的原理 (见图 1): 含有微卫星重复序列的生物素标记寡核苷酸探针同链霉素亲和素磁珠结合,然后再与热变性后的 DNA 片断混合,使探针与微卫星序列杂交。通过磁力将与探针结合的微卫星和不与探针结合的 DNA 片段分开,充分洗涤

后,通过热变性使微卫星与磁珠分离。方法是将杂交完毕的杂交液加入已平衡好的磁珠中,25 $^{\circ}$ C 温育 20 m in 并轻轻摇动,使生物素和链霉素亲和素结合。温育结束后,将离心管放置到磁力架上,去除溶液。

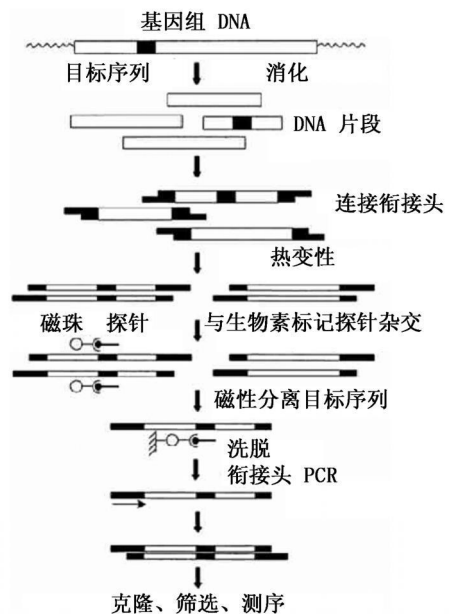


图 1 磁珠杂交选择法富集微卫星序列的基本原理

Fig 1 The basic principle of microsatellite sequence enrichment using magnetic bead hybridization selection

依次用洗液 I($6\times\text{SSC}$, 0.1% SDS), 洗液 II($3\times\text{SSC}$, 0.1% SDS), 洗液 III($6\times\text{SSC}$)洗涤磁珠, 去除不含微卫星的序列。洗涤方法是: 洗液 I在室温洗两次, 每次静置 10 min; 洗液 II在 68°C 洗两次, 每次静置 15 min; 洗液 III在室温快速洗两次, 即可基本将不含微卫星的序列去除干净。

1.5.3 捕获含有微卫星序列的单链 DNA

用 $200\ \mu\text{L}$ $0.1\times\text{TE}$ 在室温快速洗两次, 加入 $50\ \mu\text{L}$ $0.1\times\text{TE}$ 95°C 变性 10 min, 释放出含有微卫星序列的单链 DNA, 放在磁力架上吸出备用。

1.6 PCR扩增含有微卫星序列的 DNA片段

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。反应完毕后, 过旋离柱以去除多余的引物和没有参加反应 dNTP, 并浓缩到 $10\ \mu\text{L}$ 左右。电泳检测其浓度及片段大小。

1.7 连接 T载体

建立 $10\ \mu\text{L}$ 连接反应体系: $2\ \mu\text{L}$ 纯化的 PCR II产物, $1\ \mu\text{L}$ pMD18-Tvector(大连宝生物)和 $5\ \mu\text{L}$ ligation solution 无菌水补足体积至 $10\ \mu\text{L}$ 。于 4°C 连接过夜。用 CaCl_2 制备的感受态大肠杆菌 DH5 α 进行转化^[20], 得到微卫星基因组文库。

1.8 原位杂交及同位素探针进行二次筛选

通过原位杂交对微卫星文库进行二次筛选。将转化所得的克隆转化到硝酸纤维素膜 (Promega USA)上, 同时保留完全相同大小的菌板, 以待杂交结果出来后挑取阳性克隆。用同位素标记的 (GA)¹⁵进行杂交, 压 X光片, -70°C 放射自显影 7 d后, 显影。

1.9 阳性克隆的序列测定及结果分析

挑取阳性克隆由上海生工进行测序分析。测序完成, 剪切载体序列以后, 利用 SSR Finder软件进行微卫星重组序列的寻找, 确定重复次数以及两端侧翼序列。根据重复序列两端的保守序列利用 Primer Premier 3.0进行引物设计, 设计所得引物由上海生工合成。并对群体进行 PCR扩增, 琼脂糖凝胶电泳检测, 分析引物的适用性。

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 $\text{Sau}3\text{A}$ I对高纯度基因组 DNA进行不完全酶切, 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 31管含酶切 DNA片段的溶液。琼脂糖电泳检测, 选取大小为 $400\sim 1\ 000\ \text{bp}$ 的目的片段, 即第 23、24管进行下步试验。

2.2 中华绒螯蟹微卫星克隆及序列分析

本次实验共获得微卫星基因组文库 1 500个菌, 在杂交前, 随机挑选 8个克隆, 以 Linker B为引物, 进行菌落 PCR, 检测重组率, 结果克隆均为阳性, 重组率 37.5%, 即 T-载体自连的比例为 37.5%。因此, 本次试验所获得的基因组文库约有 938个属于重组克隆。通过同位素杂交进行二次筛选, 得到阳性克隆 447个 (阳性克隆率约为 29.8%), 送出测序 447个, 得到 248个 (55.4%)含有微卫星序列的克隆。在 248个序列中含有微卫星座位 266个, 其中, 以 GA/CT单位的重复序列为主, 还观察到三碱基 (CCT、TCC)、四碱基 (AAGG、TTCC)重复单元。根据 Weber^[21]提出的分类标准, 微卫星可分为 3类, 即完美型 (Perfect)、非完美型 (Imperfect)和复合型 (Compound), 完美型指没有中断的或附近无其他重复序列的重复序列; 非完美型指 2个或 2个以上的同种重复序列, 被 3个碱基以下的非重复序列所间隔; 复合型指一种重复序列与其他种类的重复序列被 3个碱基以下的非重复序列所间隔。其中, 完美型微卫星 197个 (74.06%), 非完美型 49个 (18.42%), 复合型 20个 (7.52%)。

2.3 引物设计与筛选

根据重复序列两端的保守序列利用 Primer Premier 3.0 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,248个微卫星序列共设计引物 164对,部分引物见表 1。选择合成 50对,通过优化 PCR 反应条件,结果有 28对引物可扩增出清晰可重复的目的条带。图 2为微卫星标记 HLJE_{sin15}的扩增结果。

表 1 中华绒螯蟹部分微卫星引物

Tab. 1 Some microsatellite primer pairs for *Eriocheir sinensis*

微卫星标记	引物 5'-3'	片段 (bp)	核心序列	退火温度 (°C)	扩增片段 Fragment (bp)
HLJE _{sin1}	F: GCAAAGGAGAAGAGGAGCAG R: TGTCGTGTCGTGTCGTGCT	195	(GA) ₅₈	56°C	163~224
HLJE _{sin4}	F: TTCCTTTCTCTTTTCGCTCTTC R: TCCGTCTTCCATCACACTCTC	207	(AG) ₁₄ (AG) ₅₂	56°C	184~237
HLJE _{sin6}	F: GGTGAAGCAGAAGCAAGA R: GACCCAGACCAGAAGCAAGA	248	(AG) ₅₆	60°C	227~268
HLJE _{sin10}	F: GGACAAGACCTCGGCATAGA R: GATCCACCGTAAGGGAAAAC	190	(GA) ₃₈	60°C	174~221
HLJE _{sin12}	F: ACTGGGTTTATGTCGCCTGA R: CGCATGAGAACCATCTTTCC	181	(GA) ₅₅	56°C	
HLJE _{sin14}	F: AGAGGAAAAAGCCACGTCTG R: CGTCTTCCTTTCCCTTTCCCT	150	(GA) ₄₄	60°C	124~184
HLJE _{sin15}	F: AGGGGAGCAAGGGATTAGTG R: GTGCATGTCTGGGTGTCGT	183	(GA) ₃₇	64°C	163~218
HLJE _{sin16}	F: GGTGAGCGGAATAAAGCAG R: CGGGTCACATCTCTGTTTCC	208	(GA) ₃₀	60°C	187~229
HLJE _{sin17}	F: GGGGGAGAGGGAGAGAGA R: CAACGAGAGGAGGAGTGTTGG	230	(GA) ₅₄ (AG) ₁₂	60°C	
HLJE _{sin21}	F: CAGAGAGGGAACAAGCAAGG R: AACTCTTTCTGCGCTTCAT	244	(GA) ₃₆	60°C	221~273
HLJE _{sin23}	F: AGGCACTCCACCTCTTGAAA R: CCCCTCTCATCTCATCTTCCCT	165	(GA) ₂₂	60°C	143~189
HLJE _{sin24}	F: GTTGCTCTGGATGGATGGTT R: TTAAGCCCACGCCTAAACAC	199	(GA) ₆₉	60°C	
HLJE _{sin25}	F: CTAATTCCTTGGCTCTCC R: GCGGAGAGAGGAAAAGAGTT	162	(CT) ₇	64°C	141~189
HLJE _{sin30}	F: CCGGTGAAGGTCAGAGAGAG R: AGGGGTGTTTTACCTCCAG	157	(GA) ₃₇	64°C	124~184
HLJE _{sin31}	F: GATCGTTGACCTTTGGGAGA R: AAACACCATCACGCTCACAC	186	(GA) ₆₃	64°C	163~209
HLJE _{sin33}	F: GGGAAAGGTATGGAGGGAGA R: CTCGGAAATGCTCGAAACC	172	(AC) ₁₅	64°C	146~201
HLJE _{sin34}	F: CCGTCTCTGTCATGTAAGT R: CCGCTATCTCCTCCATTTC	244	(GA) ₄₀	64°C	220~264
HLJE _{sin37}	F: GCGGTTGATGAGAGAGAGA R: CGACGATCACCTAGTCAGGA	191	(GA) ₆₃	60°C	
HLJE _{sin38}	F: AGGCAGAGAGAGGCAGAGA R: ACTTCGTTGCATCACACACC	187	(GA) ₅₇	60°C	
HLJE _{sin41}	F: GCAACCGGGCAAGTATTTAAA R: CCTTCCTTTTCTCCGTTTC	172	(AAGG) ₅	64°C	
HLJE _{sin50}	F: ATCACGGTTACGGGTTTGTGTC R: GATGTCACCTTTCTCCCATC	154	(GA) ₇₁	64°C	126~183

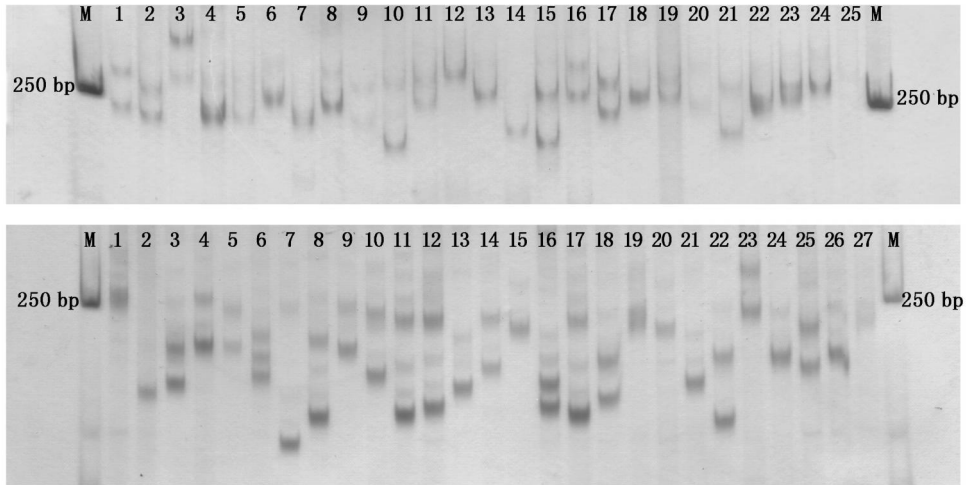


图 2 HLJEsin⁶(A)和 HLJEsin¹⁵(B)在江苏群体 (27尾)和天津群体 (25尾)的扩增图谱

Fig 2 Electrophoresis gams of HLJEsin⁶ and HLJEsin¹⁵ in Jiangsu and Tianjin population
1—27. 样本; M: 分子量标准 (DL200)

3 讨论

构建富含微卫星位点的基因组文库是获得微卫星侧翼序列的主要途径,微卫星侧翼序列是微卫星位点分析的关键。目前,微卫星位点的基因组文库的构建主要有以下几种方法:用传统方法构建目标生物基因组小片断 DNA 文库,通过人工合成带放射性同位素探针进行 Southern 杂交,筛选阳性克隆、测序。方法简单,但是筛选效率极其低下,阳性克隆率为 2%~3%,且需要大量的人力和资金的投入。Cifarelli 等^[22] 1995 年提出 RAHM (Random Amplified Hybridization Microsatellites), Lunt 等^[23] 1999 年提出 PMA (PCR Isolation of Microsatellite Arrays),这两种方法基于 RAPD 产物富集制备微卫星,虽能避免构建基因组文库,但效率不高,富集的微卫星带有一定的随机性。Lian 等^[24]在 DNA 酶切片段两端连接人工接头,以人工接头序列代替载体的序列。该方法每次测序仅获得微卫星一侧序列,需要花费较多的时间与费用。李永强等^[25] 2004 年提出 EST-SSR 法。该方法从 NCBI 数据库下载的表达序列标签 (express sequence tag EST) 中筛选出微卫星分子标记,是现有标记的有效补充。本实验是用生物素包被的磁珠富集法分离微卫星分子标记,它是在 Carleton^[26]等 2002 年报道的方案基础上稍加修改;磁珠富集与放射性同位素相结合。此种方法是基于磁珠表面的链霉亲和素与标记于微卫星探针上的生物素之间的共价结合原理而建立起来的,该方法能在短时间内对潜在的数百个微卫星位点进行分离,对于微卫星序列含量低的生物尤其适用。本实验初次筛选的效率为 29.8%,高于常规方法筛选微卫星的效率,但是,远低于本方法所能够达到的效率,作者认为可能在二次杂交过程中有误差,致使一些微卫星序列单链没有暴露出来,被同位素探针很好的杂交。获得高质量的基因组 DNA 是进行实验的基础;蔗糖密度梯度离心后目的片断的收集也是很重要的,避免由于插入片段太短而不能设计引物^[27]的麻烦;磁珠富集是整个实验的最关键的步骤,它直接影响到克隆微卫星的质量^[28]。必须保证磁珠的质量,严格控制磁珠的平衡、洗液的洗涤温度和洗涤时间,磁珠在用前必须用盐溶液反复平衡,直到磁珠顺滑,以达到洗掉不含有微卫星的多余片断,磁珠表面只保留富含微卫星序列的目的片断。因此,磁珠富集法是一种简单高效的方法^[29],因而被广泛应用于微卫星位点的筛选。

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)_n、(A)_n、(AAAT)_n、(AG)_n重复类型的微卫星分布较广;而植物基因组中,(CA)_n分布较少,(AA)_n和(AT)_n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^[12-14]。本研究所用生物素探针为(GA)₁₂,结果 90%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,10%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,此外,还有三碱基 (CCT、TCC)、四碱基 (AAGG、TTCC)重复单元,说明 CT(AG)重复、三碱基 (CCT、TCC)、四碱基 (AAGG、TTCC)重复在中华绒螯蟹基因组中分布较广泛。

本研究构建了中华绒螯蟹的部分基因组文库,并设计和筛选了能够在中华绒螯蟹基因组稳定扩增的多个微卫星标记,为揭示中华绒螯蟹类的种群多样性和种群进化历史以及遗传连锁图谱的构建、QTL定位及对其进行更深入地研究提供了基础资料。

感谢实验室贾智英师姐、侯 宁师兄和姬长虹师姐以及王文青同学等对我实验上的帮助。

参考文献:

- [1] 王成辉,李思发. 中华绒螯蟹种质研究进展 [J]. 中国水产科学, 2002, 9(1): 82—86.
- [2] 李思发,邹曙明. 中国大陆沿海六水系统绒螯蟹 (中华绒螯蟹和日本绒螯蟹)群体亲缘关系: RAPD 指纹标记 [J]. 水产学报, 1999, 23(4): 325—330.
- [3] 赵金良,李思发. 中国大陆沿海六水系统绒螯蟹 (中华绒螯蟹和日本绒螯蟹)群体亲缘关系: 生化遗传差异分析 [J]. 水产学报, 1999, 23(4): 331—336.
- [4] 李晨虹,李思发. 中国大陆沿海六水系统绒螯蟹 (中华绒螯蟹和日本绒螯蟹)群体亲缘关系: 形态判别分析 [J]. 水产学报, 1999, 23(4): 337—342.
- [5] Tang B P, Zhou K Y, Song D X, et al. Study on size variation of α DNA internal transcribed spacer 1 in *Eriocheir japonica sinensis* (Decapoda: Grapsidae) [J]. Journal of East China Normal University (Natural Science), 2003, 3: 61—68.
- [6] 张代臻,孙红英,张华彬,等. 绒螯蟹的分类与中华绒螯蟹种质资源研究进展 [J]. 广西科学院学报, 2007, 23(2): 129—132.
- [7] 许加武,李思发. 长江口中华绒螯蟹与其它几种同科蟹的同工酶比较 [J]. 水产科技情报, 1996, 23(4): 159—162.
- [8] 王 丹,于伟君. 辽河长江两水系统酯酶和乳酸脱氢酶同工酶比较研究 [J]. 辽宁大学学报 (自然科学版), 1995, 22(4): 79—81.
- [9] 周开亚,高志千. RAPD 标记鉴别中华绒螯蟹种群的初步研究 [J]. 应用与环境生物学报, 1999, 5(2): 176—180.
- [10] 李思发,邹曙明. 欧、美中华绒螯蟹源于中国长江水系中华绒螯蟹的遗传证据 [J]. 水产学报, 2002, 26(6): 493—497.
- [11] 马春艳,陈亚瞿,张凤英. 中国太湖和荷兰的中华绒螯蟹随机扩增多态性 DNA 分析 [J]. 海洋渔业, 2005, 27(4): 276—280.
- [12] 高天翔,张秀梅,吉崎悟朗,等. 日本绒螯蟹线粒体 DNA 序列研究 [J]. 青岛海洋大学学报, 2000, 30(1): 43—47.
- [13] 高天翔,任一平,张秀梅,等. 日本绒螯蟹线粒体 DNA 序列研究 [J]. 青岛海洋大学学报, 2000, 30(3): 482—486.
- [14] 高天翔,张秀梅,楼 东,等. 日本绒螯蟹太平洋群体和日本海群体 12S rRNA 序列比较研究 [J]. 浙江海洋学院学报, 1999, 18(4): 275—278.
- [15] 高天翔,张秀梅,渡边精一. 中华绒螯蟹与日本绒螯蟹线粒体 DNA 12S rRNA 序列的比较 [J]. 水产学报, 2000, 24(5): 412—416.
- [16] 孙红英,周开亚,陆健健,等. 中国大陆绒螯蟹线粒体 16S rDNA 序列变异与分子鉴定标记 [J]. 自然科学进展, 2002, 12(5): 485—490.
- [17] 孙红英,周开亚,杨小军,等. 从线粒体 16S rDNA 序列探讨绒螯蟹类的系统发生关系 [J]. 动物学报, 2003, 49(5): 592—599.
- [18] Haefling B, Weeman D. Characterization of microsatellite loci for the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* [J]. MolEcolNotes, 2003, 3(1): 15—17.
- [19] Chang Y M, Liang L Q, Li S W, et al. A set of new microsatellite loci isolated from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* [J]. MolEcolNotes, 2006, 6: 1237—1239.
- [20] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A laboratory Manual, 3rd ed [M]. 黄培堂等译. 分子克隆实验指南, 第三版. 北京: 科学出版社, 2006, 416—515.
- [21] Weber J L. Informativeness of human (dC/dA) n (dG/dT) n polymorphisms [J]. Genomics, 1990, 7: 524—530.
- [22] Cifarelli R A, Gallitelli M, Cellini F. Fandom amplified hybridization microsatellites (RAHM): isolation of a new class of microsatellite-containing DNA clones [J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23: 3802—3803.
- [23] Lunt D H, Hutchings W F, Carvalho G R. An efficient method for PCR-based identification of microsatellite arrays (PMA) [J]. Molecular Ecology, 1999, 8: 893—894.
- [24] Lian C L, Zhou Z H, Hogetsu T. A simple method for developing microsatellite markers using amplified fragments of inter-simple sequence repeat [J]. J Plant Research, 2001, 114: 381—385.
- [25] 李永强,李宏伟,高丽锋,等. 基于表达序列标签的微卫星标记 (EST-SSR) 研究进展 [J]. 植物遗传资源学报, 2004, 5(1): 91—95.
- [26] Carleton K L, Streehan J T, Lee B Y, et al. Rapid isolation of CA microsatellites from the tilapia genome [J]. Animal Genetics, 2002, 33: 140—144.
- [27] 李明芳,郑学勤. 开发 SSR 引物方法之研究动态 [J]. 遗传, 2004, 26(5): 769—776.
- [28] 全迎春,孙效文,刘 伟,等. 磁珠富集法制备大口鲶的微卫星分子标记 [J]. 水产学报, 2006, 30(2): 185—191.
- [29] 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): 192—196.