

微卫星 DNA 分子标记在海洋动物遗传分析中的应用*

APPLICATION OF THE MICROSATELLITE TECHNIQUE FOR GENETIC ANALYSIS IN MARINE ANIMALS

刘志毅 相建海

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

分子遗传标记的研究一直是遗传学研究中的一个热点。目前,各种分子遗传标记的研究在陆地生物学中已深入开展,在海洋生物学中分子遗传标记的研究也是方兴未艾。在各种分子遗传标记中,微卫星 DNA 标记的研究则受到许多学者的青睐。微卫星 DNA 标记以其特异性的 PCR 扩增、稳定性、重复性好、能较好地反映物种的遗传结构和遗传多样性变化等特点,日益受到研究者的重视。

1 微卫星 DNA 的概念和特征

微卫星 DNA 是指核心序列为 1~4 个的寡核苷酸经多次重复而形成的串联重复的 DNA 序列,如 (CA) n 、(TG) n 等,又被称为短串联重复序列、简单序列重复。有的学者也认为核心序列核苷酸数小于 10 的短串联重复序列即可认为是微卫星 DNA。微卫星 DNA 重复次数及重复程度的差异是造成每个基因座位的多态性的原因。微卫星 DNA 广泛分布在真核生物的基因组中。与限制性片段长度多态性、可变串联重复相比,微卫星 DNA 在基因组中的分布更为随机,所显示的多态性也更高^[4]。微卫星 DNA 呈孟德尔共显性遗传模式,可以区别纯合显性个体和杂合显性个体,这为遗传研究提供了更多的可供分析的信息。一般说来,微卫星 DNA

的重复序列两侧都有物种特异性的侧翼序列,根据这一特异性序列可以设计引物对基因组 DNA 进行 PCR 扩增,从而检测物种在 DNA 水平上的遗传多样性。

2 微卫星 DNA 标记的筛选和遗传信息的分析

微卫星的筛选是微卫星标记研究中关键的一步。通常获得微卫星 DNA 序列有两大途径:一是通过检索 DNA 序列数据库获得,二是通过具体的 DNA 序列分析实验获得。一般获得微卫星序列的实验方法有下述几种。

2.1 从基因组文库中获得含有微卫星 DNA 的阳性克隆

这是目前大多数研究者所用的方法,如张亚平等在 1995 年,徐磊等^[1]所报道。首先构建某一物种的小片段(几百个 bp 左右) DNA 文库,利用同位素标记的寡聚核苷酸探针去筛选文库中的阳性克隆。然后,对阳性克隆进行测序,确定微卫星序列。有的研究者则直接对小片段的重组克隆载体进行测序和分析。根据 Z. Xu 等人^[10]的报道,他们对斑节对虾(*Penaeus monodon*)的 83 个重组克隆中的 49 个做了直接测序,得到了 99 个微卫星序列。同时指出,如果杂交反应条件十分严格的话,用常规的杂交筛选的方法往往得不到较小的微卫星序列;

而如果杂交条件相对温和的话,则可以得到更多较小的微卫星序列。

2.2 从 RAPD 标记中获得微卫星 DNA

首先按 RAPD 方法对某一物种的基因组 DNA 进行 PCR 反应,扩增产物经电泳后转移到硝酸纤维素膜上,用某一重复序列作为探针与其进行杂交,确定产生信号的位置,然后从电泳胶上找出相应的片段进行分离、纯化、测序,即可获得这一物种的微卫星 DNA 序列。这种方法有时可能需要进行多个随机引物的 PCR 反应及 Southern 杂交的操作。

2.3 PCR 扩增测序法

这种方法避免了放射性同位素的操作。其主要原理是将基因组 DNA 用限制性内切酶消化后的小片段与质粒相连,用含有特定重复序列的寡聚核苷酸和质粒上的特异性序列(如外源 DNA 的插入位点)作为引物进行特异性 PCR 扩增,从中筛选出可以产生扩增产物的质粒,对扩增产物的片段大小等性质进行分析,结合质粒上特异性序列的位置,就可以确定微卫星

* 国家自然科学基金资助项目 3997-0113 号和国家 973 计划资助项目 G1999012009 号。
收稿日期:2000-04-29;
修回日期:2000-07-20

DNA在质粒上插入片段的大小及位置,对质粒上插入位置和片段大小合适的外源DNA序列进行测序,即可获得微卫星DNA序列。

根据微卫星DNA两端的保守序列可以设计特异性引物,扩增这个位点的微卫星DNA序列,经聚丙烯酰胺凝胶电泳即可显示不同基因型个体在这个微卫星位点上的多态性。由于扩增出的PCR产物片段都很小,基因型之间的差异也很小,所以通常使用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离扩增片段。但此操作需使用放射性同位素,因此又有人提出用银染法代替同位素操作,还有人用高浓度琼脂糖凝胶(3%~4%)电泳来代替聚丙烯酰胺凝胶电泳。

由于微卫星DNA扩增是特异性扩增,因而实验结果的重复性及稳定性都比较好。微卫星DNA标记是按孟德尔方式遗传的,这种由保守序列确定的位点可以检测出复等位的差异,表现为共显性。据此,我们可以计算某个基因型频率,进而计算种群的(平均)遗传杂和度以及其他遗传学指标,从而了解种群的遗传结构。我们也可以利用微卫星DNA标记分析物种的遗传多样性,同时微卫星DNA标记还可用于遗传连锁分析,构建遗传图谱等等。

3 微卫星DNA标记在海洋生物遗传分析中应用日益广泛

微卫星DNA标记在理论和实践上都具有重要意义。微卫星DNA作为一种分子遗传标记,其位点的多态性使其具有较高的信息量。此外,微卫星标记是一种较为合适的中性遗传标记,因为一个标记如具有高度选择性,则就不再具有广泛的标记作用。现在微卫星标记在种群遗传结构分析、物种遗传多样性

的鉴定、遗传图谱的构建中都有广泛的应用。在海洋生物,尤其是经济海产动物分子遗传学理论与应用结合的领域中,分子标记研究成为近年来研究的一个热点。

3.1 种群遗传结构分析

种群遗传结构的研究,从最初基于形态和生理生化的孟德尔性状的描述,进入到以分子生物学手段为主更加精确的定性定量研究,是一个巨大的飞跃。期间涌现了许多方法,如RFLP、RAPD、AFLP、mtDNA等,这些方法均以物种的DNA多态性为基础。微卫星DNA的发现和作为遗传标记在生物遗传分析中的应用,无疑为种群遗传结构的研究又提供了一个有力的工具。微卫星方法与RAPD手段相比,在不同实验条件下都具有很好的稳定性,且提供的多态性信息也十分丰富,是一种较为理想的分子标志信息。而且,在个体水平上的遗传结构的分析,微卫星标记要优于其他一些方法。但是也应看到,对物种进行遗传分析,仅仅依靠一两种手段是远远不够的,根据不同的研究目的将微卫星DNA标记与其他方法结合起来,才能更为有效地对遗传结构作出分析,进而为生产实践服务。

利用微卫星DNA的孟德尔遗传特性及共显性的特征,我们可以通过分析基因型特征来确定种群的遗传杂和度,同时可以进一步描述种群的遗传结构。Greg M. Wolfus等^[4]将微卫星标记应用于对虾的养殖选育计划,对高健康虾品系中的6个地理种群共16个家系312尾对虾进行了微卫星M的分析。阐明了每一家系的亲代与其后代之间的遗传关系。共获得了47个不同的等位基因位点,并且还比较了种群的预期及观察遗传杂和度,确定了23个种群特异性标记探针,其中有2个标记是来自墨西哥

Sinaloa种群的一个家系所特有的。这一研究为高健康虾品系的选育及监测种系内的遗传变异程度提供了理论依据和指导。在水产动物选育研究中分子标记手段的运用还不普遍,利用分子标记可以更加精确地描述被选育对象的种群遗传结构,是迅速有效地实施品种筛选工作的有力工具。Greg M. Wolfus等人在这方面的工作无疑提供了微卫星分子标记在分析种群遗传结构,进而应用于生产实践的一个很好的例子。此外F.J. Garcia de Leon等人^[3]也将微卫星标记应用于鲈鱼的遗传育种计划。另外,研究者们对龙虾(*Homarus spp.*)^[9]、真鲷(*Pagrus major*)^[6]、大西洋鲑鱼(*Salmo salar*)^[2]的不同种群(或种类)都进行了遗传结构方面的比较研究,为遗传育种、种质鉴定、种苗放流等提供了一定的理论依据。

3.2 物种遗传多样性的鉴定

生物多样性问题现在已成为人们关注的焦点之一。生物多样性可以定义为所有活的生物体中的变异性,包括陆地、海洋和其他水生生态系统及其所构成的生态综合体;它包括物种内多样性、物种间多样性、生态系统的多样性3个层次。生物多样性的保护和可持续利用是维持全球经济稳定和发展的重要因素,也是保持我们赖以生存环境的重要内容。精确地评价生物多样性水平,能为生态资源的保护提供理论依据。如前所述,从形态、细胞、生化、分子等不同层次上可以揭示物种的变异性。近年来各种分子标记的发展和应用,以及比较基因组学的兴起为这一工作的深入开展提供了有力的工具。其中,微卫星DNA标记技术已成为检测物种遗传多样性的一个重要手段。目前,在国外这一技术已应用于牛、羊、马、小麦、水稻等重要的



动植物研究中;在鲈、鳟、牡蛎等水产动物中也有报道^[4]。这对种质资源的评估、分子标记辅助育种、品种的选育都具有重要意义。Maureen P. Small 等人^[5]用 3 种微卫星位点对加拿大不列颠哥伦比亚省的一种鲑鱼 *Coho salmon* 的 34 个地理群体的遗传杂和度做了比较分析。他们的结果显示了这 3 个微卫星位点具有很高的多态性,分别在 Qs101, Qs3 和 Qs103 位点上确定了 31, 20 和 38 个等位基因。通过对遗传距离的分析,指出有 3 个地理群体已具有一定的同源性。他们同时对这些群体做了系统树分析,认为这个系统树反映了不列颠哥伦比亚省 *C. salmon* 群体的地理分布特征。Small 等人指出,对种群结构进行精确分析有助于在同物种的种群水平上对 *C. salmon* 资源进行评估和管理。严格来说,对物种多样性水平的检测同物种遗传结构分析是紧密相连的,对物种多样性水平的评估可以说是遗传结构研究的继续深入。目前,微卫星标记应用于海产物种的遗传多样性分析和种质资源评估这些方面的研究还不是很多,Small 等人的工作提示了分子标记作为研究物种多样性主要手段的重要性。

3.3 遗传图谱的构建

利用微卫星 DNA 标记,可以进行遗传连锁分析,构建遗传图谱。在陆地许多生物中,包括人、大鼠、牛、羊等动物的基于微卫星 DNA 的连锁图谱已逐渐发展起来;在植物中,科学家们已将微卫星 DNA 标记添加到大豆、大麦、水稻、玉米等物种的以 RFLP 为主的连锁图上。与陆生饲养动物相比,水产动物驯养育种还处于起步阶段,编制出与重要经济性状相适应的遗传图谱对于品种选育、种系评估都具有重要意义,同时也将使水产动物养殖驯化工作变得更加容易、快捷,从而为优良种系的构建提供可

靠的理论依据。然而,水产动物基因图谱的研究工作尚处于萌芽期,直至近几年才启动了重要经济水产动物的基因组图谱的国际合作研究。1997 年 5 月在美国召开了水产养殖生物基因组图谱研讨会,确定了罗非鱼、鲶鱼、鲑鳟鱼、牡蛎及对虾 5 大养殖种类为基因组图谱的研究对象。在鲑鳟鱼类, Takashi Sakamoto 等人^[8]用 54 个微卫星标记研究了与虹鳟产卵时间连锁的数量性状位点,在 7 个连锁群中确定了 13 个数量性状位点。他们用产卵实验对 5 个连锁群中的 8 个数量性状位点进行验证,均得到了可重复的结果。在对虾基因组研究中,斑节对虾 (*Penaeus monodon*)、凡纳对虾 (*P. vannamei*) 被列为目标种加以研究。中国对虾 (*P. chinensis*) 由于在我国水产业中的重要地位,将是我国重点研究对象之一。在对虾基因组的研究中,研究者主要依据扩增片段长度多态性、微卫星 DNA 和表达序列标志这几种方法构建图谱。对虾基因组计划将能构建对虾基因的连锁图谱,在此基础上可以更容易对重要经济性状基因进行识别和筛选。这实际也是未来对虾功能基因研究的一个重要内容。在微卫星标记的工作上,美国的 Alcivar Warren 等人已进行了许多研究,他们从斑节对虾中分离出 99 个微卫星,并且发现 10 个斑节对虾的微卫星引物有 3 个可在凡纳对虾中扩增出等位基因,显示了微卫星引物在近缘种内通用的潜在可能性^[10]。有的学者认为,由于在对虾中获得“有用”的微卫星难度较大,微卫星标记不适合用于对虾的基因作图^[7]。作者认为,一旦找到大量的可用的微卫星引物,用微卫星进行基因作图将变得十分快捷和迅速。Alcivar Warren 等人的工作显示了近缘种内微卫星的潜在通用性,对于迅速、大量地确定微卫星引物和微卫星位点有重

要意义。这为图谱构建工作提供一个较为快捷的方法。Alcivar Warren 等人卓有成效的工作将进一步推动对虾的微卫星图谱的构建。关于中国对虾微卫星标记的基因组作图尚未见报道,这为我们在这方面的工作提供了机遇和挑战。

目前,将分子生物学的理论和手段引入海洋生物研究领域是海洋生物学发展的一个方向。由于海洋生物(尤其是较低等的海洋生物)与陆生生物相比,在繁殖生物学和发育生物学上有很大差异,因此分子海洋生物学研究的深入开展必然提出新的问题。

参考文献

- 1 徐磊,夏家辉,潘乾等.遗传学报,1997,24(1):1~6
- 2 Anne Reilly, Nicholas G. Elliott, Peter M. Greve et al.. *Aquaculture*, 1999, 173: 454~469
- 3 F.J. Garcia de Leon, M. Canonne, E. Quillet et al.. *Aquaculture*, 1998, 159:303~316
- 4 Greg M. Wolfus, Denise K. Garcia, Acacia Alcivar Warren. *Aquaculture*, 1997, 152:35~47
- 5 Maureen P. Small, Ruth E. Withler, Terry D. Beacham. *Fish. Bull.*, 1998, 96:843~858
- 6 Ricardo Perez-Enriquez, Motohiro Takagi, Nobuhiko Taniguchi. *Aquaculture*, 1999, 173:413~423
- 7 Stephen S. Moore, Vicki Whan, Gerard P. Davis et al.. *Aquaculture*, 1999, 173:19~32
- 8 Takashi Sakamoto, Roy G. Danzmann, Nobuaki Okamoto et al.. *Aquaculture*, 1999, 173:33~43
- 9 Yan Kit Tam and Irv Kornfield. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 1996, 5(3): 230~238
- 10 Z. Xu, A. K. Dhar, J. Wyrzykowski et al.. *Anim. Genet.*, 1998, 30: 1~7

(本文编辑:刘珊珊)