

# 拟穴青蟹( $CA_n$ )微卫星 DNA 多态性引物筛选

宋忠魁<sup>1,2</sup>, 聂振平<sup>1</sup>, 王芳宇<sup>3</sup>

(1. 广西海洋研究所 广西海洋生物技术重点实验室, 广西 北海 536000; 2. 钦州学院 化学与生物系, 广西 钦州 535000; 3. 衡阳师范学院 生命科学系, 湖南 衡阳 421008)

**摘要:** 利用 FIASCO (Fast Isolation by AFLP Sequences Containing repeats) 技术建立拟穴青蟹 *Scylla paramamosain* 基因组文库, 并与生物素标记的( $CA$ )<sub>15</sub> 寡核苷酸探针杂交, 联合磁珠富集法构建拟穴青蟹微卫星富集文库。测序 194 个阳性菌落, 分析其中的 150 条序列, 结果表明: 两碱基重复类型占 90% 以上, 其中重复拷贝数在 30 以上的占 27.45%; 含微卫星座位 189 个, 其中完美型 146 个、非完美型 28 个和复合型 15 个。设计 125 对引物扩增一个拟穴青蟹野生群体(含 20 个个体), 其中的 19 对引物能稳定扩增且片段大小基本符合理论长度。遗传变异分析表明, 17 个位点表现出高度多态性, 16 个位点显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡( $P<0.05$ ), 4 组两两位点间存在连锁不平衡现象( $P<0.0026$ , 经 Bonferroni 法校正), 7 个微卫星位点可能存在无效等位基因。若排除混合微卫星位点的引物对以及扩增位点 PIC (polymorphism information content) 值在 0.5 以下的引物对, 则 13 对引物能用于拟穴青蟹群体遗传学研究。

**关键词:** FIASCO Fast Isolation by AFLP Sequences Containing repeats 技术; 磁珠富集法; 拟穴青蟹 *Scylla paramamosain*; 微卫星

中图分类号: Q953.5; S917.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2013)10-0098-06

鉴于微卫星标记在经济水产动物的广泛应用, 包括遗传多样性分析、世代遗传结构监测、遗传连锁图谱构建、亲权关系鉴定等诸多方面<sup>[1-6]</sup>, 使得经济水产动物的微卫星标记开发作为首要环节而成为热点。开发拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)微卫星标记是近几年的事情, Takano 等<sup>[7]</sup>最先在拟穴青蟹确认 5 个可变的微卫星位点; Xu 等<sup>[8]</sup>开发出 10 个多态性微卫星座位; Ma 等<sup>[9]</sup>报道了 12 个多态性微卫星座位; 周宇芳等<sup>[10]</sup>报道了 10 个多态性微卫星座位; 2011 年报道的拟穴青蟹多态性微卫星座位高达 108 个<sup>[11-13]</sup>, 最近, Yao 等<sup>[14]</sup>筛选出 13 个多态性微卫星座位。已开发的拟穴青蟹微卫星标记正逐渐在拟穴青蟹种质资源监控<sup>[1]</sup>和育种实践中发挥作用<sup>[15]</sup>。尽管如此, 拟穴青蟹微卫星标记仍需继续开发, 正如 Yao 等所言, 现有拟穴青蟹微卫星标记数量对于拟穴青蟹遗传连锁图谱构建和标记辅助育种来说仍然是有限的<sup>[14]</sup>。

FIASCO(Fast Isolation by AFLP Sequences Containing repeats)技术结合磁珠富集法构建微卫星富集文库的技术流程已日趋成熟, 在诸多经济水产动物得以成功应用, 像拟穴青蟹<sup>[8,10]</sup>、大珠母贝<sup>[16]</sup>、波纹唇鱼<sup>[17]</sup>等等。事实上, 拟穴青蟹不止一次地使用这类技术, 区别在于内切酶的变动和探针的使用。多数学者在开发经济水产动物微卫星标记时采用的是

生物素标记的( $CA$ )<sub>n</sub> 寡核苷酸探针是因为动物的 CA/GT 微卫星 DNA 含量尤其丰富。再次采用同一技术流程和探针开发拟穴青蟹微卫星标记是因为 Xu 等<sup>[8]</sup>采用两类探针[( $CA$ )<sub>15</sub> 和 ( $CT$ )<sub>15</sub>]构建微卫星文库时仅测序了为数不多的阳性克隆(63 个)。如果能测序更多的阳性克隆, 应该能再次发掘一批有价值的拟穴青蟹微卫星序列, 为拟穴青蟹种质资源和遗传育种研究提供多态性微卫星标记。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

用于构建微卫星文库的拟穴青蟹样品来自中国福建漳州、海南儋州、广西北海、广西钦州以及越南清化等地, 用于筛选微卫星多态性引物的拟穴青蟹一个野生群体来自广西防城港市珍珠湾海域。所有拟穴青蟹样品活体运回实验室, 取鳌足于-70 保

收稿日期: 2012-11-06; 修回日期: 2013-03-11

基金项目: 广西自然科学基金项目(0991275); 广西科学研究与技术开发计划项目(11107012-11); 广西海洋生物技术重点实验室主任基金项目(0801)

作者简介: 宋忠魁(1973-), 男, 湖南永州人, 副教授, 博士, 主要从事青蟹遗传育种研究, E-mail: songsir2003@yahoo.com.cn

存备用。

## 1.2 方法

### 1.2.1 微卫星基因组文库构建

利用 FIASCO 技术结合磁珠富集法构建拟穴青蟹微卫星基因组文库，简述如下：

取不同来源地拟穴青蟹样品的鳌足肌肉组织少许(约20 mg)混杂在一起，常规酚/氯仿法抽提基因组DNA。核酸蛋白测定仪(Eppendorf, Germeny)测定样品的总DNA浓度，1.0%琼脂糖凝胶电泳(0.5×TBE)检测其质量。用Mse I内切酶消化基因组DNA(1 μg左右)，回收200~800 bp DNA片段。等比例混合两组寡聚核苷酸链A(5'-TACTCAGGACTCAT-3')和B(5'-GACGATGAGTCCTGAG-3')制备接头，并与上述回收产物进行连接反应。

以连接产物为模板，以MseI-N(5'-GATGAGTCC TGAGTAAN-3')为引物进行PCR扩增建立“基因组PCR文库”，以1.5%琼脂糖凝胶检测其质量(以扩增产物均匀弥散分布且亮度适中为宜)。使用生物素标记的(CA)<sub>15</sub>探针与“基因组PCR文库”杂交，期间平衡磁珠，随后进行磁珠吸附富集和洗涤。再使用0.1×TE缓冲液悬浮磁珠，95℃变性10 min，快速移出洗脱液，此即含有微卫星序列的单链DNA。以3 mol/L NaAc(pH 5.2)和异丙醇浓缩洗脱液。再次以MseI-N为引物进行PCR扩增，凝胶纯化回收扩增产物。然后与PMD18-T载体连接，转化至大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$ 感受态细胞。至此，完成构建微卫星基因组文库。

### 1.2.2 菌落筛选与测序

挑选白色菌落进行PCR鉴定，所用引物序列为M13(±)引物序列和探针序列(CA)<sub>15</sub>，建立多重PCR反应体系，1.5%琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。检出2条或两个以上扩增带的菌落视为可能含有微卫星重复序列的阳性菌落，测序委托上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

### 1.2.3 序列整理、微卫星位点判断及特征分析

利用Chromas应用程序直观判断测序结果，执行DNAsstar软件中的Editseq程序查找接头序列并删除，协同使用两项应用程序获得可以分析和可供设计引物的序列。执行clustalx1.81程序比对序列，并利用seaview程序检查比对结果以判断冗余序列。

执行SSRHunter1.3程序(<http://en.bio-soft.net/dna/SSRHunter.html>)查找微卫星位点，并目测相邻微卫星位点之间的序列是否少于3个碱基。以重复序列的

4个统计术语即重复类型、重复数目、重复拷贝数、重复拷贝类别分析所有微卫星序列<sup>[18]</sup>。采用Weber<sup>[19]</sup>微卫星标准区分所有微卫星位点为三种类型，即完美型(perfect)、非完美型(imperfect)和复合型(compound)。

### 1.2.4 引物设计

利用Primer Premier(version 5.0)软件设计引物。除设计引物的通用原则外，还定义以下原则：单条引物的长度不超过25 bp；正反向引物的Tm在45~60℃之间且相差不超过5℃；优先选择单个微卫星位两侧侧翼序列不少于18 bp的作为模板，若不能成功设计，则选择单一克隆序列中两个或两个以上的微卫星位的侧翼序列不少于18 bp的作为模板。对于能设计引物的序列，利用Blastn判断微卫星位点侧翼序列同源性。

### 1.2.5 引物的适用性检测

采用一个包含20个拟穴青蟹个体的野生群体检测每一对引物的适用性。PCR反应体积为12.5 μL，成份如下：10×PCR buffer 1.25 μL，DNA模板20~50 ng，Taq DNA聚合酶0.75U，Mg<sup>2+</sup>浓度1.50 mmol/L，dNTP浓度0.20 mmol/L，引物浓度0.40 μmol/L。扩增程序如下：94℃预变性4 min；94℃变性30 s，46~57℃退火50 s，72℃延伸50 s，30个循环；72℃延伸7 min。2.0%~2.5%琼脂糖凝胶(含0.5 mg/L EB)电泳初步检测是否有扩增条带以及扩增条带大小是否符合理论设计长度。再次以8%聚丙烯酰胺凝胶电泳协同银染检测初步判断的结果，区分等位基因、记录每一个个体基因型。利用Gel-Pro Analyzer (Version 4.0)软件读取等位基因分子量大小。

应用PopGen32软件计算每一个位点的观测等位基因数( $N_a$ , observed number of alleles)、有效等位基因数( $N_e$ , effective number of alleles)、观测杂合度( $H_o$ , observed heterozygosity)、期望杂合度( $H_e$ , expected heterozygosity)，开展Hardy-Weinberg平衡(以下简称HW平衡)的卡方检测，计算每一个位点的等位基因频率。利用中国水产科学研究院黄海水产研究所种质资源与工程育种室开发的PIC\_Calc 0.6 (<http://www.seekbio.com/soft/2045.html>)计算每一个位点的多态信息含量(PIC, polymorphism information content)值。

利用Arlequin3.5.1.2软件检测位点间的连锁不平衡，多重比较的显著性水平采用Bonferroni法校正。利用Micro-Checker (Version 2.2.3)软件检查微卫星位点是否存在无效等位基因(null alleles)和计分误差(scoring errors)。

## 2 结果

### 2.1 微卫星 DNA 特征分析

测序 194 个检出的阳性克隆, 其中的 14 条序列不包含微卫星重复单元信息, 12 条序列虽包含微卫星重复单元信息, 但因部分“关键”序列或全部序列测序峰杂乱, 或因一侧缺接头序列信息, 而首先被排除。再排除 18 条冗余序列, 留下来的 150 条序列用于分析。

所有碱基重复类型均有发现, 其中单碱基重复类型的重复数目是 3 个(重复拷贝数=14、18、19), 两碱基重复类型的重复数目是 204 个(重复拷贝数 7), 三碱基重复类型的重复数目是 7 个(重复拷贝数 5), 四碱基重复类型的重复数目是 6 个(重复拷贝数 4), 五碱基重复类型的重复数目是 4 个(重复拷贝数 3),



图 1 P44 位点的多态性引物 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification results of microsatellite locus P44 in the sampling population

### 2.3 群体微卫星位点的遗传学分析

19 个群体位点组合的遗传参数见表 1, 其中观测等位基因数在 2~8 之间, 有效等位基因数在 1.7241~5.9701 之间; 观测杂合度在 0.0000~1.0000 之间, 期望杂合度在 0.4308~0.8538 之间; 除 3 个位点(即 P151、P233、P54)外, 其余均显著偏离 HW 平衡( $P<0.05$ )。除位点 P225、P98 外, 其余位点的 PIC 值均大于 0.50。

基于 Bonferroni 法校正的显著性水平( $P<0.0026$ )检测位点间连锁不平衡现象, 结果显示 4 组两两位点之间存在连锁不平衡, 分别是 P167/P26、P98/P43、P43/P50 和 P44/P151。Micro-Checker 分析表明, 7 个位点可能存在无效等位基因, 分别是 P151、P225、P135、P62、P15、P44 和 P33; 所有位点不存在结巴带(stuttering)导致的计分误差, 也不存在等位基因扩增丢失(large allele dropout)现象。

## 3 讨论

研究发现拟穴青蟹大部分(约 72.55%)两碱基重复类型的重复拷贝数在 30 以下, 其完美型微卫星类型所占比例较高。Ellegren<sup>[20]</sup>早就认为, 在真核生物中大部分微卫星的核心序列的重复次数在 30 以下,

六碱基重复类型的重复数目是 1 个(重复拷贝数=3)。两碱基重复类型的重复拷贝类别可以兼并为  $(AG)_n$  和  $(AC)_n$  型, 其中  $(AG)_n$  型的重复数目是 23 个,  $(AC)_n$  型的重复数目是 181 个; 两碱基重复类型的最大重复拷贝数可高达 107, 重复拷贝数在 30 以上的是 56 个, 占总的重复数目的 27.45%。150 条序列包含 189 个微卫星位点, 其中完美型 146 个、非完美型 28 个和复合型 15 个。

### 2.2 引物设计与 PCR 扩增检测

共设计 125 对引物, Blastn 搜索未发现模板序列的一致序列, 其中 19 对引物可以扩增出“清晰、稳定、可重复”的多态性条带。图 1 表示 P44 位点的多态性引物扩增供试群体的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测结果。19 对引物的模板序列已存蓄到 GenBank, 登录号见表 1。

后来牙鲆、长牡蛎、大珠母贝的相关研究提供了更加殷实的数据支持<sup>[21-23]</sup>。不过, 背角无齿蚌基因组(GT)<sub>n</sub> 微卫星 DNA 特征并不符合这一规律<sup>[24]</sup>。再者, 完美型微卫星类型在已研究过的物种中所占比例普遍偏高, 譬如, 牙鲆<sup>[21]</sup>、中国对虾<sup>[25]</sup>、日本盘鲍<sup>[26]</sup>、长牡蛎<sup>[22]</sup>等。说明拟穴青蟹微卫星特征可能与大多数真核生物的微卫星特征保持一致。

分析同时指出, 绝大部分微卫星位点的 PIC 值超过 0.5, 表明这些微卫星位点是高度多态的<sup>[27]</sup>, 在今后的遗传学分析是有价值的遗传学标记。位点 P167、P101 和 P33 属高度多态位点, 但因包含混合微卫星信息, 所以并不适合群体遗传学研究<sup>[28]</sup>。

HW 平衡的卡方检测结果(表 1)表明, 绝大部分(84.21%)微卫星位点在供试群体中显著偏离 HW 平衡( $P<0.05$ ), 表现出杂合子过剩和杂合子缺失。若杂合子过剩并伴随 HW 平衡的偏离, 暗示群体近期经历过瓶颈效应, 种群数量曾经下降<sup>[29]</sup>。研究发现 5 个群体位点组合显著偏离 HW 平衡, 且表现出杂合子过剩, 说明供试群体曾发生了瓶颈效应。但是, 杂合子过剩并不一定就会导致群体位点组合偏离 HW 平衡, 如位点 P54。位点扩增产生无效等位基因有可能导致杂合子缺失, Micro-Checker 分析检测到 7 个位点存在无效等位基因, 且这些群体位点组合均表现出杂

表 1 微卫星位点的基本信息及其群体位点组合的遗传参数

Tab. 1 Basic information of 19 microsatellite loci and genetic parameters behaving in the sampling population

| 位点   | 重复基元  | 引物序列<br>(5'-3')                                       | 等位基因大小范围<br>(bp) | 退火温度<br>(°C) | 有效等位基因数  | 观测杂合度  | 期望杂合度  | 多态信息含量 | P 值    | 登录号      |
|------|---|---|------------------|--------------|----------|--------|--------|--------|--------|----------|
| P151 | (TG) <sub>30</sub>  | F: CCCCTTGTCCATTAC<br>R: ACTCCACATAGCCCTCT            | 112~150          | 52           | 8/5,6406 | 0.5263 | 0.8450 | 0.8005 | 0.1107 | JX941557 |
| P233 | (AC) <sub>17</sub>  | F: CTACGCCTTACTATGGCACACT<br>R: ACACGGAAAGACTATGCG    | 121~143          | 54           | 6/4,7815 | 0.7368 | 0.8122 | 0.7600 | 0.1957 | JX941569 |
| P225 | (GT) <sub>6</sub>   | F: TCAGCCTTACCAAGAAAACAC<br>R: CTCCACGTAGTCGTACTCACT  | 249~255          | 53           | 2/1,7241 | 0.0000 | 0.4308 | 0.3318 | 0.0000 | JX941568 |
| P12  | (CA) <sub>10</sub>  | F: GATAAGGAGCTGCCCTACTGCT<br>R: GGGCACAGCTTCTGTGTC    | 139~195          | 57           | 5/2,5478 | 0.9000 | 0.6231 | 0.5407 | 0.0000 | JX941571 |
| P135 | (GT) <sub>66</sub> GGGT) <sub>9</sub>                                     | F: ATTCCCTTGTCAACTTAGCAG<br>R: TGAAAGACAGCAGGTGATGG   | 181~225          | 53           | 5/2,9605 | 0.2000 | 0.6851 | 0.6044 | 0.0041 | JX941558 |
| P167 | (AC) <sub>19</sub> N <sub>2</sub> (CA) <sub>9</sub>                       | F: AATATGGTAATGGAGACAGGAC<br>R: TGACAGGAATGACTCAATGAC | 175~239          | 53           | 7/5,7528 | 0.6875 | 0.8528 | 0.8042 | 0.0233 | JX941567 |
| P62  | (CA) <sub>23</sub>  | F: CGGAACAGTTGAGGTGAAT<br>R: CATTTTATGTAAGAGGATACT    | 169~193          | 51           | 5/3,7891 | 0.5263 | 0.7553 | 0.6905 | 0.0183 | JX941562 |
| P21  | (GT) <sub>7</sub> GC(GT) <sub>9</sub> C(TG) <sub>29</sub>                 | F: CGCGAAAGTTGCTACGTACAT<br>R: GGGAGTCTGGCGATTGTTG    | 272~332          | 54           | 7/5,9701 | 0.8000 | 0.8538 | 0.8103 | 0.0069 | JX941559 |
| P98  | (AG) <sub>19</sub> N <sub>3</sub> (AG) <sub>5</sub>                       | F: CCACACGAGGAGGAAAG<br>R: GGCAACCTCAGTAGGCTT         | 433~467          | 54           | 2/2,0000 | 1.0000 | 0.5152 | 0.3750 | 0.0000 | JX941565 |
| P29  | (CA) <sub>12</sub>  | F: GTCCAGACTCAGCCGTAG<br>R: AAAAGGGATGAAGTTAGGG       | 207~247          | 50           | 5/3,3755 | 0.8000 | 0.7218 | 0.6613 | 0.0001 | JX941560 |
| P26  | (GT) <sub>30</sub>  | F: AAGGTGGAGGTGAAGGG<br>R: CATTTGGTGGGGATGTG          | 166~212          | 55           | 6/2,5806 | 0.5625 | 0.7339 | 0.6775 | 0.0028 | JX941561 |
| P43  | (GT) <sub>12</sub>  | F: CCGCCAACCATTACCTG<br>R: TCATAACGCACGGAGAAA         | 137~183          | 52           | 6/2,5806 | 1.0000 | 0.6282 | 0.5360 | 0.0000 | JX941563 |
| P54  | (CT) <sub>8</sub>   | F: CTCTTGTAGTAACTACGGTT<br>R: CTTCCTCTACACTAAATGCT    | 161~201          | 51           | 5/3,4335 | 0.8500 | 0.7269 | 0.6587 | 0.7925 | JX941564 |
| P101 | (AC) <sub>6</sub> N <sub>10</sub> (GA) <sub>20</sub> (CA) <sub>7</sub>    | F: CTCAAATGTCAGTAAACAC<br>R: TTGGTTCCTGTAATGAT        | 228~262          | 46           | 8/4,5455 | 0.8000 | 0.8000 | 0.7471 | 0.0014 | JX941566 |
| P15  | (TG) <sub>30</sub>  | F: GGTGACCAAAAGCCTGTT<br>R: CAGACTACGGCACAATATGGAG    | 382~414          | 55           | 5/4,1667 | 0.5500 | 0.7795 | 0.7204 | 0.0025 | JX941553 |
| P44  | (CA) <sub>22</sub>  | F: AAAGCCATACTCACTATCCAG<br>R: TGACACTGAGCCGAGGTG     | 207~239          | 55           | 6/4,2105 | 0.3500 | 0.7821 | 0.7226 | 0.0002 | JX941554 |
| P33  | (TG) <sub>25</sub> CGG(AG) <sub>45</sub> N <sub>5</sub> (GT) <sub>8</sub> | F: GCGCGCCTTAGGATACT<br>R: ACAATGGAGCTGGAAAGGAG       | 418~500          | 54           | 5/4,0755 | 0.5556 | 0.7762 | 0.7143 | 0.0202 | JX941555 |
| P50  | (GT) <sub>5</sub> A(TG) <sub>38</sub>                                     | F: AGAAGCACCAGGACGAA<br>R: GCAAAGTGAAGGGATGA          | 362~440          | 52           | 6/3,4934 | 1.0000 | 0.7321 | 0.6668 | 0.0000 | JX941556 |
| P247 | (CA) <sub>19</sub>  | F: ACTCCCTCATTCCTCACG<br>R: GACTAACGCAATGGAAAGCT      | 107~129          | 53           | 5/4,4390 | 0.6111 | 0.7921 | 0.7339 | 0.0000 | JX941570 |

合子缺失。若开展家系分析，将为这些潜在的无效等位基因提供直观的证据。同样，杂合子缺失也不一定就会导致群体位点组合偏离 HW 平衡，如位点 P151。

舒妙安等<sup>[1]</sup>在利用 17 对微卫星引物分析中国沿海 7 个拟穴青蟹群体遗传结构时发现，88.24% 的群体位点组合偏离 HW 平衡，并认为无效等位基因存在导致杂合子缺失是偏离 HW 平衡的主要原因。当前研究结果与之吻合，即大部分群体位点组合偏离 HW 平衡，但是群体位点组合偏离 HW 平衡并不是起因于杂合子缺失或过剩。事实是，群体内基因型频率发生较大改变，与群体大小和是否随机交配有关<sup>[30]</sup>。在此连锁不平衡分析检测到位点间发生了连锁不平衡现象，表明供试群体是一个非随机交配群体。这一可能性是存在的，毕竟拟穴青蟹有类似于其他水生动物的繁殖生物学特征，单一亲本可以产生大量的子代，为近亲交配提供了充盈机会；再者，拟穴青蟹超强的繁殖力可以确保其在历史扩散过程中，即便是较小的有效群体也能安全扩散。研究暗示拟穴青蟹群体曾遭遇瓶颈效应，与拟穴青蟹近期发生扩散相符<sup>[31]</sup>。

利用一个群体来评价微卫星位点多态性反映的是群体位点组合的遗传学特性，而非微卫星位点本身的遗传特征。利用基因分型技术来判断微卫星位点多态性不可避免会陷入一些风险，譬如，扩增带型的同源异型或异源同型<sup>[32]</sup>。所以考虑家系分析和辅以测序技术就显得尤为重要，因为家系分析能判断微卫星位点分离是否符合孟德尔定律<sup>[33]</sup>，而辅以测序技术能对扩增带型作出更加精确的判断。基于群体位点组合遗传特性判断有可能丢掉一些已开发的有价值的微卫星序列，因为群体与引物的不匹配。此外，引物设计不合理也可能造成有价值的微卫星序列的丢失。所以，凡是基本符合引物设计原则的微卫星序列均应递交 GenBank 数据库以供未来之需。

#### 参考文献：

- [1] 舒妙安, 周宇芳, 朱晓宇, 等. 中国沿海拟穴青蟹群体遗传多样性的微卫星分析[J]. 水产学报, 2011, 35(7): 977-984.
- [2] 王文琪, 张毅, 刘梦侠, 等. 许氏平鲉 4 个野生群体遗传多样性微卫星分析[J]. 海洋科学, 2012, 36(1): 10-16.
- [3] 韩斐斐, 张继彪, 李莉, 等. 虾夷扇贝养殖群体及其子代的遗传多样性分析[J]. 海洋科学, 2012, 36(9): 1-8.
- [4] Sun X W, Liang L Q. A genetic linkage map of common carp (*Cyprinus carpio* L) and mapping of a locus associated with cold tolerance[J]. Aquaculture, 2004, 238(1~4): 165-172.
- [5] 程鹏, 杨爱国, 吴彪, 等. 微卫星标记在不同壳色虾夷扇贝家系亲权鉴定的适用性[J]. 水生生物学报, 2011, 35(5): 768-775.
- [6] 王鸿霞, 张晓军, 李富花, 等. 应用微卫星标记分析野生中国明对虾的亲权关系[J]. 水生生物学报, 2008, 32(1): 42-46.
- [7] Takano M, Barinova A, Sugaya T, et al. Isolation and characterization of microsatellite DNA markers from mangrove crab, *Scylla paramamosain*[J]. Mol Ecol Notes, 2005, 5: 794-795.
- [8] Xu X J, Wang G Z, Wang K J, et al. Isolation and characterization of ten new polymorphic microsatellite loci in the mud crab, *Scylla paramamosain*[J]. Conserv Genet, 2009, 10: 1877-1878.
- [9] Ma H Y, Ma C Y, Ma L B, et al. Novel polymorphic microsatellite markers in *Scylla paramamosain* and cross-species amplification in related crab species[J]. J Crust Biol, 2010, 30(3): 441-444.
- [10] 周宇芳, 舒妙安, 朱晓宇. 青蟹微卫星 DNA 的筛选及特征分析[J]. 水产科学, 2010, 29(10): 616-619.
- [11] Cui H Y, Ma H Y, Ma L B, et al. Development of eighteen polymorphic microsatellite markers in *Scylla paramamosain* by 5'anchored PCR technique[J]. Mol Biol Rep, 2011, 38(8): 4999-5002.
- [12] Ma C Y, Ma H Y, Ma L B, et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from cDNA library of *Scylla paramamosain*[J]. Afr J Biotechnol, 2011, 10(54): 11142-11148.
- [13] Ma H Y, Ma C Y, Ma L B, et al. Isolation and characterization of 54 polymorphic microsatellite markers in *Scylla paramamosain* by FIASCO approach[J]. J World Aquacult Soc, 2011, 42(4): 591-597.
- [14] Yao H F, Sun D Q, Wang R X, et al. Rapid isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the mud crab, *Scylla paramamosain* (Portunidae) [J]. Genet Mol Res, 2012, 11(2): 1503-1506.
- [15] 崔海玉, 马洪雨, 马春艳, 等. 利用微卫星标记比较分析拟穴青蟹不同家系的遗传多样性[J]. 海洋渔业, 2011, 33(3): 274-281.
- [16] 柳明, 喻达辉, 黄桂菊. 大珠母贝微卫星 DNA 标记的分离与筛选[J]. 海洋科学, 2010, 34(8): 1-5, 22.
- [17] 彭艳辉, 骆剑, 尹绍武, 等. 波纹唇鱼微卫星分子标记的筛选及适用性分析[J]. 海洋科学, 2012, 36(5): 109-116.
- [18] 高焕, 刘萍, 孟宪红, 等. 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)基因组微卫星特征分析[J]. 海洋与湖沼, 2004, 35(5): 424-431.
- [19] Weber J L. Informativeness of human (dC-dA)n-(dG-dT)n polymorphisms[J]. Genomics, 1990, 7: 524-530.

- [20] Ellegren H. Microsatellite evolution: a battle between replication slippage and point mutation[J]. Trends Genet, 2002, 18:70.
- [21] 王蕾, 刘继红, 张立冬, 等. 牙鲆基因组(CAG)<sub>n</sub>微卫星 DNA 特征分析[J]. 中国水产科学, 2009, 16(6): 807-815.
- [22] 李琪, 木岛明博. 长牡蛎(*Crassostrea gigas*)微卫星克隆快速分离及特性分析[J]. 海洋与湖沼, 2004, 35(4): 364-370.
- [23] 柳明, 喻达辉, 黄桂菊. 大珠母贝微卫星 DNA 标记的分离与筛选[J]. 海洋科学, 2010, 34(8): 1-5, 22.
- [24] 汪桂玲, 苏翔, 李家乐, 等. 背角无齿蚌基因组(GT)<sub>n</sub>微卫星 DNA 特征[J]. 生态学杂志, 2011, 30(1): 1-6.
- [25] 徐鹏, 周岭华, 相建海. 中国对虾微卫星 DNA 的筛选[J]. 海洋与湖沼, 2001, 32(3): 255-259.
- [26] Sekino M, Hara M. Microsatellite DNA loci in Pacific abalone *Haliotis discus discus* (Mollusca, Gastropoda, Haliotidae) [J]. Mol Ecol Notes, 2001, 1: 8-10.
- [27] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. Am J Hum Genet, 1980, 32(3): 314-331.
- [28] 赵燕, 季相山, 曾勇庆, 等. 花鲈微卫星标记分离及其多态性分析[J]. 动物学研究, 2011, 32(5): 515-520.
- [29] 徐金会, 王琳琳, 薛慧, 等. 喜马拉雅旱獭种群微卫星变异及遗传多样性[J]. 动物学杂志, 2009, 44(2): 34-40.
- [30] 李春艳, 丁君, 常亚青, 等. 虾夷扇贝微卫星标记的分离及其养殖群体的遗传结构分析[J]. 中国水产科学, 2009, 16(1): 39-46.
- [31] 宋忠魁, 李梦芸, 聂振平, 等. 北部湾拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 群体遗传结构及其扩张分析[J]. 海洋与湖沼, 2012, 43(4): 828-836.
- [32] 张云武, 张亚平. 微卫星及其应用[J]. 动物学研究, 2001, 22(4): 315-320.
- [33] 李宏俊, 刘晓, 杜雪地, 等. 海湾扇贝微卫星标记开发及其分离方式分析[J]. 海洋科学, 2009, 33(12): 4-8.

## Screening for polymorphic primer pairs of (CA)<sub>n</sub> microsatellite from *Scylla paramamosain* (mud crab) genome

SONG Zhong-kui<sup>1,2</sup>, NIE Zhen-ping<sup>1</sup>, WANG Fang-yu<sup>3</sup>

(1. Guangxi Key Laboratory for Marine Biotechnology, Guangxi Institute of Oceanology, Beihai 536000, China; 2. Department of Chemistry and Biology, Qinzhou University, Qinzhou 535000, China; 3. Department of Life Science, Hengyang Normal University, Hengyang 421008, China)

Received: Nov., 6, 2012

**Key words:** FIASCO Fast Isolation by AFLP Sequences Containing repeats technique; magnetic enrichment; *Scylla paramamosain*; microsatellite

**Abstract:** Genomic library of *Scylla paramamosain* (mud crab) was first constructed by FIASCO (Fast Isolation by AFLP Sequences Containing repeats) technique and then was hybridized to (CA)<sub>15</sub> biotin-labeled probe. The magnetic bead enrichment method was employed to capture the target fragments for microsatellite DNA enrichment library. A total of 194 positive bacterial colonies were sequenced, among of which 150 sequences were investigated. As a result, dinucleotide repeat preponderated over 90%, whose repeat copy more than 30 times accounted for 27.54%. 189 microsatellite sites were found, containing 146 perfect type, 28 imperfect type, and 15 compound type. The polymorphisms of 125 primer pairs were estimated through amplifying a solo wild population of *Scylla paramamosain* (containing 20 individuals). 19 loci showed stable amplification, whose products conformed to theory size basically. Genetic variability analysis suggested 17 highly polymorphic loci. 16 loci were deviated from Hardy-Weinberg equilibrium significantly ( $P < 0.05$ ). Significant linkage disequilibrium was found in four pairwise loci ( $P < 0.0026$ , corrected by Bonferroni method) while null alleles were detected at seven loci. Regardless of the loci of microsatellite mixture (containing two microsatellite sites or over) plus some loci with PIC value lower than 0.5, 13 primer pairs proved to be useful for the population genetic analysis.

(本文编辑: 张培新)