

大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)微卫星 序列的开发与分析*

李 猛^{1,2} 马爱军¹ 岳 亮¹ 邹 杰¹ 王广宁¹
田岳强¹ 马本贺¹ 夏丹丹¹

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 采用 FIASCO (Fast Isolation by AFLP of Sequences Containing repeats)法和标记初步筛选法,进行了大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)微卫星标记开发的研究,分析了大菱鲂基因组中微卫星 DNA 序列的特征,并进行了拟作图标记的初步筛选。结果表明,FIASCO 法的富集效率为 78.56%,二次筛选出 655 个阳性克隆,测序后经分析有 469 条含有微卫星位点的单一序列,共得到 597 个微卫星位点。其中完美型占 51.76%,非完美型占 34.67%,复合型占 13.57%;核心序列的重复次数在 3—96 次之间,平均重复数为 13.39 次;重复单元类别最多的是(CA/GT)_n,占 77.6%。利用 Primer Premier 5.0 共设计 413 对引物,其中有 360 对能够得到稳定表达的产物;再经标记初筛试验得知,183 对引物(50.8%)的 PCR 产物有多态性,其中 110 个微卫星位点(30.6%)符合遗传连锁图谱作图标准。

关键词 大菱鲂;微卫星标记;标记开发;序列分析;标记初筛

中图分类号 Q953

大菱鲂(*Scophthalmus maximus* L.)为原产于欧洲沿海的一种低温底层肉食性鱼类(雷霖霖, 2003),目前已发展成为我国北方沿海工厂化养殖业的主导品种之一(雷霖霖, 2005)。大菱鲂生长速度快,宜驯化,容易接受配合饲料,病害较少和便于密养,是工厂化养殖的理想品种(马爱军等, 2001; 门强等, 2004; 朱建新等, 2004)。近年来由于管理不规范,近亲累代繁殖等原因,导致成活率降低、生长速度减慢、抗逆性变差等种质退化现象不断发生(雷霖霖, 2005; 孔维军等, 2010),亟待进行大菱鲂优良性状的遗传选育。

微卫星标记(microsatellite),是均匀分布于真核生物基因组中的简单重复序列,由 2—6 个核苷酸的串联重复片段构成(管峰等, 2004)。微卫星 DNA 是一种功能强大的遗传标记,已广泛应用于:鱼类群体遗传多样性(刘海金等, 2008; 王婷婷等, 2012; 张敏

莹等, 2012)、遗传结构分析(申雪艳等, 2004)、遗传图谱的构建(宋文涛等, 2011)及分子标记辅助育种(刘志毅等, 2001)等。筛选大量高效、多态、共显性的分子标记是进行群体遗传多样性分析、遗传连锁图谱构建的基础。大菱鲂微卫星标记的筛选工作虽然已有报道(Danzmann *et al*, 2007; 阮晓红, 2009¹⁾; 顾颖等, 2009; Hou *et al*, 2011),但标记的数量仍然有限。现实中需要大量的有效微卫星标记,应用于高密度的连锁图谱构建、群体遗传连锁分析等方面。

因此,本研究采用 FIASCO (Fast Isolation by AFLP of Sequences Containing repeats)法筛选微卫星 DNA 序列,同时设计了相应的微卫星引物,并对引物进行了初步筛选。为今后大量开发未知大菱鲂微卫星 DNA 标记搭建平台,同时为大菱鲂高密度遗传连锁图谱的构建提供更多的可选标记。

* 现代农业产业技术体系建设专项资金资助, CARS-50-G01 号。李猛, 硕士研究生, E-mail: limnbest@126.com

1) 阮晓红, 2009. 大菱鲂(Turbot)微卫星标记的筛选与应用: 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 35—48

通讯作者: 马爱军, 博士, 研究员, 博士生导师, E-mail: maaj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2012-10-06, 收修改稿日期: 2012-11-27

1 材料与amp;方法

1.1 材料

大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)材料均采自烟台天源水产有限公司。剪取尾鳍鳍条分装于液氮中,到达实验室后置于-80℃中保存。采用天根海洋动物基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA,1%琼脂糖凝胶电泳检测,分装于-20℃保存。

1.2 方法

1.2.1 微卫星序列筛选 利用 FIASCO(Fast Isolation by AFLP of Sequences Containing repeats)法筛选大菱鲆微卫星 DNA 序列。先用 *Mse* I 酶酶切大菱鲆的基因组 DNA,加接头 *Mse*I dapter,用 M00 通用引物(表 1)PCR 扩增,建立小片段基因组文库;再采用以生物素标记的(CA)₁₂、(AC)₁₇、(AG)₁₇、(AT)₁₇、(AAT)₁₀、(AAC)₁₀、(GACA)₁₀、(GATA)₁₀ 为寡核苷酸探针,与串联重复序列杂交,洗脱后 PCR 扩增,构建大菱鲆的微卫星 DNA 富集文库;切胶纯化后,与载体连接,转入感受态细胞中,经含氨苄的 LB 培养基培养,初筛阳性菌落。

表 1 本研究所用引物
Tab.1 Primers used in the study

引物名称	引物序列(5'—3')	用途
<i>Mse</i> I dapter	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' 3'-TACTCAGGACTCAT-5'	酶切产物的接头
M00	GATGAGTCCTGAGTAA	PCR 扩增引物
M13(-48)	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	二次筛选
M13(-48)	AGCGGATAACAATTCACACAGGA	二次筛选
SSRa	(CA) ₁₁ (A/G/T)(A/T/G/C)	二次筛选
SSRb	(AC) ₁₆ (C/G/T)(A/T/G/C)	二次筛选
SSRc	(AG) ₁₆ (C/G/T)(A/T/G/C)	二次筛选
SSRd	(AT) ₁₆ (C/G/T)(A/T/G/C)	二次筛选
SSRe	(AAT) ₉ A(C/G/T)(A/T/G/C)	二次筛选
SSRf	(AAC) ₉ A(C/G/T)(A/T/G/C)	二次筛选
SSRg	(GACA) ₉ (A/G/T)(A/T/G/C)	二次筛选
SSRh	(GATA) ₉ GA(A/C/G)(A/T/G/C)	二次筛选

用载体通用引物 M13(-47)、M13(-48)以及筛选菌落微卫星序列对应的引物(表 1)对每个菌落进行二次筛选。PCR 体系见表 2,PCR 反应条件为:94℃ 5min;94℃ 30s,55℃ 1min,72℃ 1min 共 30 个循环,之后 72 延伸 10min,4℃ 保存。所得产物经 1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测,挑选在反应 1 中有产物,反应 2 或 3 中也有产物,并且反应 1 中的产物与反应 2 或 3 中的产物存在明显差别的样品送去测序。

1.2.2 微卫星序列特征分析 测序所得结果用 Chromas V2.3 进行分析,去除载体与接头序列。用

SSR Hunter1.3 对插入序列进行分析,寻找微卫星核心区域,并分析。

表 2 二次筛选所用的反应体系
Tab.2 PCR reaction system used in detection for SSR repeat from the recombination

试剂名称	反应 1 (添加量)(μL)	反应 2 (添加量)(μL)	反应 3 (添加量)(μL)
ddH ₂ O	8.25	8.25	8.25
HS TM reaction Mix	12.5	12.5	12.5
M13(-47)	1	1	0
M13(-48)	1	0	1
SSR(a—h)	0	1	1
<i>Taq</i> 酶(5U/μL)	0.25	0.25	0.25
菌液	2	2	2

在一个基因组位点上,微卫星 DNA 核心序列的重复碱基对总数要 12 (Morgante *et al*, 2002; Tóth *et al*, 2000)微卫星 DNA 序列统计标准:核心序列重复数 12 的为单碱基型重复序列;核心序列重复数 5 的二碱基型;核心序列重复数 4 的三碱基型;核心序列重复数 3 的为四碱基或五碱基型串联重复序列;核心序列重复数 2 的为六碱基型微卫星序列。

Weber(1990)根据微卫星重复结构的不同将微卫星 DNA 分为:同一序列的重复单元间连续串联无中断的为完美型(perfect);同一序列的重复单元间有中断(中断区域的非重复碱基数 5)或颠倒的为非完美型(imperfect);同一序列具有不同重复基本单元,各串联单元间被 3 个以下的碱基断开,称为复合型(compound)。

1.2.3 微卫星引物开发 对测序得到的含微卫星位点的独立序列进行人工细分,并选取重复单元两侧序列完整的序列作为设计引物的原始序列。利用 Primer Premier 5.0 软件进行引物设计,设计主要参数为:引物长度一般在 18—24 碱基之间;引物 PCR 扩增产物跨度以 100—500bp 为宜,150—350bp 最佳。

引物碱基尽可能随机分布,避免出现嘌呤、嘧啶堆积现象;引物(G+C)%含量一般在 40%—60%左右,在 45%—55%最佳;引物 3'端最好不要选择 A。引物的 *T_m* 值最好在 55—60℃之间,尽量使上下游引物的 *T_m* 值趋于一致;控制欲扩增产物的 *T_m* 值在 72℃左右。

引物设计后均由金斯瑞生物科技有限公司合成;使用时稀释成 10μmol/L。对每对引物均进行 PCR 扩增条件的优化。DNA 模板采取 4 个个体的混合模板,模板浓度为 50ng/μL。通过温度梯度 PCR,1.2%琼脂糖凝胶电泳检测,来确定每对引物的最佳退火温度。

PCR 扩增体系为 15 μ L, 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 变性 5min; 94 $^{\circ}$ C 45s, 退火温度 50s, 72 $^{\circ}$ C 50s, 共 35 个循环; 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.4 微卫星标记初步筛选 随机选取以编号 5000047593 为母本、1000046133 为父本杂交获得的 F₁ 代中 6 个个体及其父母本的基因组 DNA 作为模板 DNA, 对上述选择的微卫星位点进行初步筛选。PCR 体系及反应程序同上。

所得扩增产物首先在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳检测, 确定每个模板的扩增产物量及其大体的条带范围; 然后通过 8% 聚丙烯酰胺电泳后银染的方法检测所开发微卫星标记的多态性, 及初步筛选符合遗传连锁图谱构建标准(子代个体中呈现多态性并且至少在双亲之一中也呈现多态性)的标记。

2 结果与分析

2.1 微卫星序列筛选

为确保微卫星 DNA 区域被成功转入, 降低测序成本, 作者对每个克隆进行多次 PCR 扩增并通过琼脂糖凝胶电泳检测。通过 M13(-47)和 M13(-48)引物配对, 检测载体是否成功转入片段, 以及该片段的大小; 通过 M13(-47)和 M13(-48)分别与 SSR(a—h)配对检测插入片段有无重复区域, 以及该区域距离插入片段两端的距离(图 1)。

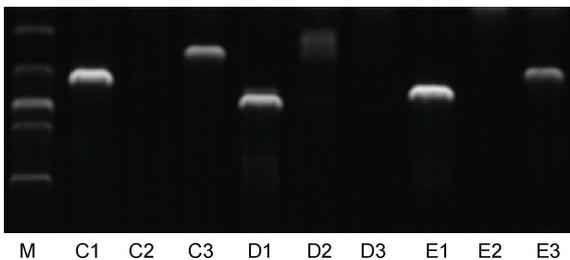


图 1 大菱鲂含微卫星序列的重组子的筛选

Fig.1 Detection for SSR repeats from the recombination
M: DL2000 Marker; C—E: 分别为单个克隆 PCR 筛选结果;
1: M13(-47)和 M13(-48)为引物的扩增产物; 2: M13(-47)和 SSR(a—h)为引物的扩增产物; 3: M13(-48)和 SSR(a—h)为引物的扩增产物

本研究共选择了 2027 个阳性菌落进行 PCR 二次筛选, 从中筛选出 655 个符合条件的克隆, 富集效率为 32.3%。将符合条件的克隆送去测序, 由于菌液活化失败等原因仅得到 597 条序列, 经过分析 76 个克隆(12.73%)缺乏明显的微卫星序列; 521 个克隆(87.27%)含有重复序列, 其中有 65 个克隆为雷同序列(10.89%), 所以本实验得到 469 条含有微卫星位点

的单一序列, 筛选效率为 78.56%。

2.2 微卫星序列特征分析

在 469 条单一序列中分析得到 597 个微卫星位点(表 3)。依据 Weber(1990)的分类方式, 597 个微卫星 DNA 序列中完美型为 309 个, 占 51.76%; 非完美型为 207 个, 占 34.67%; 复合型 81 个, 占 13.57%。

对所筛大菱鲂微卫星 DNA 重复数进行统计, 结果显示核心序列重复数 3—9 次的有 267 个, 占 39.38%; 重复数 10—19 次的有 262 个, 占 38.64%; 重复数 20—29 次的有 84 个, 占 12.39%; 重复数 30 次以上的有 65 个, 占 9.59% (图 2)。所获得的微卫星 DNA 最多重复数为 96 次, 平均重复数为 13.39 次, 重复数为 10—19 次与重复数为 3—9 次的频率相似。

统计所筛大菱鲂重复序列的基本单元类别的频率(图 3), (AC/GT)_n 重复单元类别占 71.83%, (AG/CT)_n 重复单元类别占 11.50%, 其余重复单元类别占的比重较小。这与崔建洲等(2006)研究红鳍东方鲀基因组微卫星 DNA 中 CA/GT 重复最为丰富, 其次是 GA/CT 的结果相似。

对所有微卫星序列的重复类型进行统计, 其中二碱基型数目最多(以 AC/GT 为重复单元的占绝大多数)为 578 个, 占重复序列总数的 85.25%; 其次分别是四碱基 60 个, 占 8.85%; 三碱基 34 个, 占 5.01%; 五碱基(ATCTC; CTTCT; TCTGT)3 个, 占 0.44%; 而单碱基(C/G)2 个, 占 0.29%; 六碱基(CCCAAA)1 个, 占 0.15% (图 4)。

2.3 微卫星引物开发

分析得到的 469 个微卫星位点侧翼序列情况, 有 384 个位点(81.88%)两端有合适的侧翼序列进行引物开发; 利用 Primer Premier 5.0 软件结合实际情况, 共设计合成了 413 对引物。并分别对其进行引物扩增条件的优化, 最终开发出能扩增出与期望值大小相等或相近片段的 360 对引物。

2.4 微卫星标记初筛

360 个微卫星标记经过初步筛选, 其中 351 对引物可以得到清晰的目的条带。经检测有 168 对引物(46.7%)的扩增产物带型单一, 183 对引物(50.8%)的 PCR 产物有多态性, 其中 110 个微卫星位点(30.6%)符合遗传连锁图谱作图标准。

3 讨论

3.1 酶切片段与微卫星引物设计

测序所得结果用 Chromas V2.3 去除载体与接头序列后, 人工统计了其中 461 条测序所得到的 DNA

表 3 从大菱鲆中获得的部分微卫星 DNA 序列
Tab.3 Part microsatellite DNA sequences isolated from turbot

克隆位点	微卫星位点	重复单元	重复次数	位点类型	序列长度(bp)
a22	(GT) ₃₃	GT	33	完美型	181
a23	(CA) ₁₇ G(CA) ₁₄	CA	31	非完美型	143
a24	(GT) ₁₀ ; (GT) ₁₈ A(GT) ₆₉ GA(GT) ₉	GT; GT	10; 96	完美型; 非完美型	318
a25	(GT) ₁₂ CA(CT) ₇	CT	19	非完美型	248
a26	(CA) ₆	CA	6	完美型	265
a27	(CA) ₂₂ CG(CA) ₉	CA	31	非完美型	304
a28	(ATCTC) ₆	ATCTC	6	完美型	333
a29	(GC) ₄ (AC) ₁₈	GC; AC	4; 18	复合型	427
a30	(GT) ₇ (GTGC) ₆ AT(GT) ₃ GC(GT) ₆	GT; GTGC	16; 6	复合型	208
B3	(GA) ₃ AGACG(GA) ₃	GA	7	非完美型	238
B6	(AAC) ₄ ; (TG) ₇	AAC; TG	4; 7	完美型; 完美型	262
C1	(GT) ₁₄	GT	14	完美型	136
C2	(GT) ₁₅	GT	15	完美型	292
C3	(TC) ₁₅	TC	15	完美型	353
C5	(ATG) ₄ ; (AC) ₅ GC(AC) ₁₃	ATG; AC	4; 18	完美型; 非完美型	450
D21	(TCCA) ₃ ; GTGTGC(GT) ₅	TCCA; GT	3; 7	完美型; 非完美型	291
D22	(GT) ₁₅ (GCGT) ₃	GT; GCGT	15; 3	复合型	254
D23	(CA) ₁₆	CA	16	完美型	214
S22	(GT) ₁₇ ; (TG) ₁₁	GT; TG	17; 11	完美型; 完美型	229
S23	(AC) ₇ ; (GTT) ₄	AC; GTT	7; 4	完美型; 完美型	266
S24	(AC) ₅ ; (GATG) ₃	AC; GATG	5; 3	完美型; 完美型	303
S025	(TC) ₈ ATT(CA) ₁₅	TC; CA	8; 15	复合型	434
S26	(CA) ₉ ; (CA) ₂₂ AA(CA) ₉	CA; CA	9; 31	完美型; 非完美型	435
S27	(CAGA) ₁₀ (CAGG) ₄ (CAGA) ₃	CAGA; CAGG	13; 4	复合型	353
Q11	(CA) ₄ GA(CA) ₁₈	CA	22	非完美型	309
Q12	(GT) ₁₅	GT	15	完美型	272
Q13	CACGCA(CACG) ₄ (CA) ₁₁ CG(CA) ₄	CACG; CA	5; 16	复合型	263
Q14	(CA) ₄ AACACACG(CA) ₆	CA	12	非完美型	208
Q15	(GT) ₁₄	GT	14	完美型	276
W1	(AC) ₄ AT(AC) ₃ (AAC) ₃ ACAC	AC; AAC	9; 3	复合型	242
W3	(CA) ₁₀ CTCACA	CA	12	非完美型	216
W20	(GT) ₁₃ (GA) ₃	GT; GA	13; 3	复合型	242
W40	(GT) ₃ CTGC(GT) ₄ GC(GT) ₇	GT	14	非完美型	360

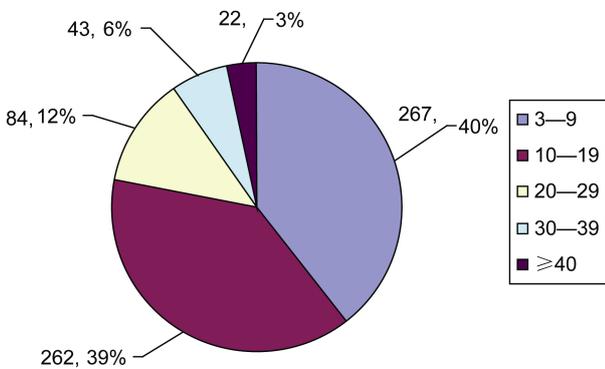


图 2 大菱鲆微卫星 DNA 重复次数的分布频率

Fig.2 Numbers of repeats distribution of microsatellite DNA in turbot

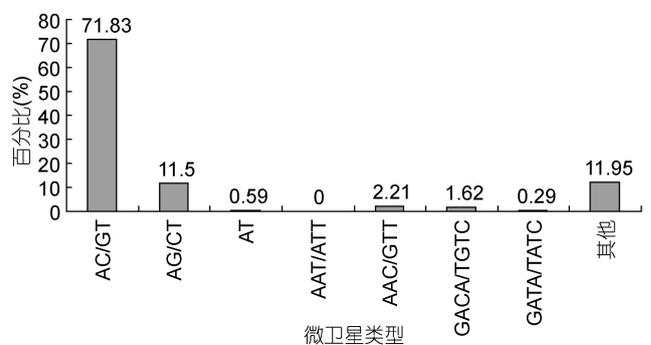


图 3 大菱鲆微卫星重复类型所占比例

Fig.3 Percentage of microsatellite types in turbot

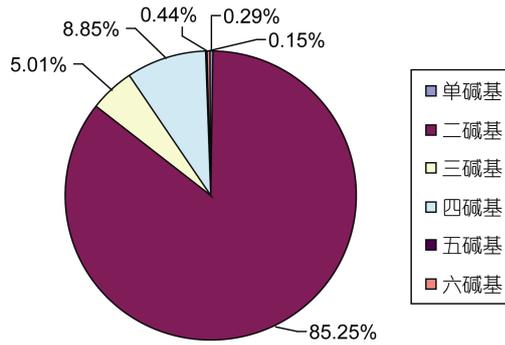


图 4 不同微卫星重复类型所占的百分比
Fig.4 Numbers and percentages of repeat types in turbot

片段, *Mse* I 酶切基因组 DNA 最大值为 707bp, 最小值 95bp, 平均酶切片段长度为 272.3bp。如图 5 所示, 酶切片段长度集中在 150—349bp 之间(81.3%), 高度集中在 200—299bp 之间(59.2%), 酶切片段长度 149bp 仅有 18 个微卫星序列(3.9%)。

本实验共筛选出含微卫星位点的 469 个独立克隆, 分析位点两侧序列设计引物, 85 个微卫星位点(占总位点数的百分比为 18.1%)由于两侧序列不合理不能成功设计引物, 其中 74 个位点(占总位点数的百分比为 15.8%, 占不能设计引物的位点数的百分比为

表 4 部分微卫星引物的初筛结果
Tab.4 Primary screening results of part microsatellite primers

引物	微卫星位点	引物序列	退火温度()	初筛情况
L12001	(GT) ₁₆	F: CTGGCACTTGGATTCTGACC R: GGTGCGGCAAGATGGAGT	60	符合构图标准
L12002	(TG) ₁₉	F: CAAAGGCAGATGACAAATCAAAC R: ACTCGTAGCCGCTTTTCGTC	60	不稳定
L12003	(GT) ₃₆ ; (GTGC) ₄	F: ACACGGACGAAAGTGA AAAAG R: CCCGGACATTACAACCAAGA	59	单一条带
L12004	(CAA) ₁₄	F: TTGCGTTCTCAAATCCAGTAG R: GTATGGAGCGAATGAATGTTG	56	仅子代多态性
L12005	(CA) ₅ ; (GATG) ₃	F: GCGAATACTGAAACAAGCG R: CCCTACAGCAATCTCCCTC	55	单一条带
L12006	(TG) ₂₆	F: GAAGAGTGGGGTGTATTGGTG R: CGCTCTTGAGTTTGGCTTTTAG	57	单一条带
L12007	(CA) ₉	F: CATACTGCTTTCAGGGGTGC R: CGTGGTGATGACTGGTGGA	56	单一条带
L12008	(AC) ₁₇ ; (GCC) ₃	F: GACTGGCGATTTGATAAGGC R: GAGTAATCACTTTTCGCTCTGC	56	产物不稳定
L12009	(TG) ₁₈	F: GAGGTGAGGGACACTTGCG R: CCAGTTGGCATCATGTATGG	56	仅子代多态性
L12010	(AC) ₁₇	F: GCTTACCGATTGTATTTGGC R: CATCGTTTTATCATTTTGAAGGT		无产物
L12011	(TG) ₁₇ ; (TG) ₁₁ ; (GT) ₅	F: GGGCCAAAGGAGGTCAAG R: AGTCGTGCGGGAGGATG	60	仅子代多态性
L12012	(CA) ₂₄	F: GGGGATGAACAGGGAGATG R: GGAGAACAGAGGTGAGGAGGC	61	符合构图标准
L12013	(CA) ₁₆	F: ACACGTGTATGCACATTGTCC R: GGAATGCGAAACTAACCTC	53	符合构图标准
L12014	(GT) ₄₀ ; (GT) ₇	F: GGTCACATGATCTTTATCAGCAG R: TGATGAGTCTGAGTAAACAAC	53	单一条带
L12015	(GT) ₃₃	F: CTATTTATAGAGGCATTTTACCAAC R: CAGGCGTCACACTCTCTCCCTCTCA	57	仅子代多态性
L12016	(CT) ₁₂ CA(CT) ₇	F: AGCCCCGTGGAAAAATAAT R: GGCGGCAGAACTCAAGAT	55	仅子代多态性
L12017	(CA) ₂₂ CG(CA) ₉	F: GATACAGCAACCTCACGGAA R: CCACCTTGATGAGCGTTTG	59	仅子代多态性
L12018	(ATCTC) ₆	F: CCTGTGCCCTCCCGTGAT R: CATCTACTGGACAAATGTGG	56	单一条带
L12019	(GC) ₄ (AC) ₁₈	F: TGGGATTACTTGGGAGGTT R: CAGGCTTTACACTTTATGCTTCC	57	仅子代多态性
L12020	(GT) ₇ (GTGC) ₆ AT-(GT) ₃ GC(GT) ₆	F: CTGCGAGCATAGTAATGTTTTTC R: CTCCCAAGTAATAATCCCACC	57	符合构图标准

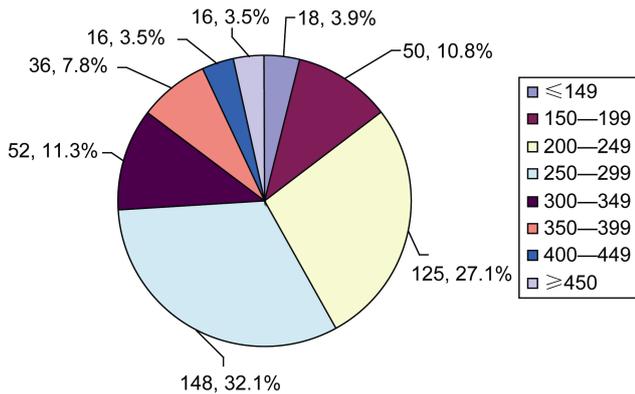


图5 *Mse* I 酶酶切基因组 DNA 的片段长度分布

Fig.5 Fragment length distribution of digested genomic DNA in *Mse* I

87.06%)是由于微卫星位点一侧或两侧序列过短的原因不能设计引物。

酶切片段的长度、位点与微卫星标记的开发、微卫星引物设计密切相关。*Mse* I 酶切基因组 DNA 的片段长度主要集中在 150—349bp 之间(81.3%), 此长度适合微卫星引物的设计。*Mse* I 酶切基因组 DNA 的酶切位点与大菱鲂微卫星的核心序列的距离基本上在一个合适范围, 仅有 15.8%的微卫星位点由于其侧翼序列过短而不能设计引物。综上, 利用 *Mse* I 单酶切基因组 DNA 对微卫星标记开发还是比较合理。

3.2 探针选择与微卫星重复单元

选择合适的探针对筛选微卫星位点至关重要。作为微卫星 DNA 探针, $(CA)_n$ 、 $(AT)_n$ 、 $(CT)_n$ 较常用。初步了解该物种的基因组 DNA 序列对探针设计很重要, 或参考相近物种的探针使用情况进行设计。本文采用的探针是在鱼类中比较常用的 $(CA)_{12}$ 以及 Pardo 等(2005)开发微卫星标记时设计的 $(AC)_{17}$ 、 $(AG)_{17}$ 、 $(AT)_{17}$ 、 $(AAT)_{10}$ 、 $(AAC)_{10}$ 、 $(GACA)_{10}$ 、 $(GATA)_{10}$; 以生物素标记, 合成寡核苷酸探针, 筛选大菱鲂基因组的微卫星序列。此探针包括二、三、四核苷酸类型, 不仅可以筛选到常见的二核苷酸微卫星序列, 而且更利于富集到重复单元为多核苷酸的微卫星序列。因此, 本实验不仅筛选到常见的 $(CA/GT)_n$ 、 $(CT/GA)_n$ 重复类型, 还成功筛选到了多个 $(AAC)_n$ 、 $(GACA)_n$ 、 $(GATA)_n$ 的重复类型。虽然 $(AT)_n$ 重复类型在 $(AC)_{14}(AT)_3$; $(AT)_3(GT)_{14}$; $(AT)_4(AC)_{10}$ 微卫星位点中出现了三次, 但都是与 $(AC/GT)_n$ 连锁才被筛选到的, 且 AT 重复次数很少, 仅有 3 或 4 次。故本实验并未利用探针 $(AT)_{17}$ 、 $(AAT)_{10}$ 筛选出合格的微卫星序列。

分析测序得到的 DNA 序列, 还发现了单碱基

$(C/G)_n$; 双碱基 $(CG)_n$; 三碱基 $(GGA)_n$ 、 $(CTC)_n$ 、 $(CAG)_n$; 四碱基 $(GCGT)_n$ 、 $(GATG)_n$ 、 $(CGCA)_n$; 五碱基 $(ATCTC)_n$ 、 $(CTTCT)_n$ 、 $(CTGT)_n$; 六碱基 $(CCAAA)_n$ 等重复类型的微卫星位点。这些非探针串联重复类型大部分在所设计探针重复类型的周围。此外, 还有 1 个克隆含有重复单元为八核苷酸 $(AGACGGAC)_n$ 的串联重复序列, 即小卫星序列, 另两个克隆分别含有 $(AC)_6(GC(AC)_3)_6$ 和 $(TG)_{14}(AGCGCA(TG)_5)_4$ 重复序列。

3.3 关于引物设计的讨论

筛选得到的 496 条微卫星 DNA 序列, 其中有 295 个微卫星核心序列两侧有足够长的序列可进行引物设计, 但由于侧翼序列的 GC 含量偏低, 或设计时出现发卡结构、引物二聚体等原因, 共设计了 384 对引物。

微卫星位点的核心序列很不稳定, 可能由于原位点的碱基突变或插入, 形成了类似微卫星的间接串联重复序列。测序得到的 6 条 DNA 序列, 的重复序列虽然不符合微卫星的划分标准, 但也设计了相应的引物。

相对于微卫星 DNA 的核心重复区域, 侧翼序列比较保守, 但它们之间也仍然存在碱基的插入、缺失或者颠换等引起的突变, 倘若设计的引物刚好处于突变区域, 则无法扩增出理想的产物。其余的 23 对引物是分别依据已设计过, 但未扩增出理想产物的微卫星位点重新设计而成, 希望避开突变区, 扩增出合适产物。

参 考 文 献

- 门 强, 雷霖霖, 王印庚, 2004. 大菱鲂的生物学特性和苗种生产关键技术. 海洋科学, 28(3): 1—5
- 马爱军, 陈四清, 雷霖霖等, 2001. 饲料中主要能量物质对大菱鲂幼鱼生长的影响. 海洋与湖沼, 32(5): 527—534
- 王婷婷, 宋学宏, 许爱国等, 2012. 应用微卫星标记分析 4 个黄颡鱼群体的遗传多样性. 江苏农业科学, 40(4): 41—45
- 孔维军, 田由甲, 2010. 大菱鲂生长缓慢原因浅析. 河北渔业, (009): 51—52
- 申雪艳, 官庆礼, 雷霖霖等, 2004. 进口大菱鲂 *Scophthalmus maximus* L. 苗种的遗传结构分析. 海洋与湖沼, 35(4): 332—341
- 朱建新, 王印庚, 刘 慧等, 2004. 我国大菱鲂苗种生产现状及存在的主要问题. 中国水产, (z1): 7—10
- 刘志毅, 相建海, 2001. 微卫星 DNA 分子标记在海洋动物遗传分析中的应用. 海洋科学, 25(6): 11—13
- 刘海金, 朱晓琛, 孙效文等, 2008. 牙鲆 5 个养殖群体的遗传多样性分析. 中国水产科学, 15(1): 30—37
- 宋文涛, 张潇珺, 廖小林等, 2011. 牙鲆微卫星标记遗传连锁图谱的构建. 农业生物技术学报, 19(6): 981—987

- 张敏莹, 徐东坡, 刘 凯等, 2012. 长江下游放流鲢群体遗传多样性的微卫星标记分析. 江西农业大学学报, 34(01): 141—146
- 顾 颖, 郭忠宝, 谷晶晶等, 2009. 大菱鲆微卫星标记的分离及其多态性位点检测. 大连水产学报, 24(4): 366—370
- 崔建洲, 申雪艳, 杨官品等, 2006. 红鳍东方纯基因组微卫星特征分析. 中国海洋大学学报, 36(02): 36—39
- 雷霖霖, 2003. 大菱鲆养殖技术. 上海: 上海科技出版社, 8
- 雷霖霖, 2005. 海水鱼类养殖理论与技术. 北京: 中国农业出版社, 524—541
- 管 峰, 杨利国, 贾名威等, 2004. 微卫星的构成及其检测技术. 生物学杂志, 21(2): 1—4
- Danzmann R, Pardo B, Fernández C *et al*, 2007. Development and characterization of 248 novel microsatellite markers in turbot (*Scophthalmus maximus*). Genome, 50(3): 329—332
- Hou Shiyong, Ma Aijun, Wang Xinan *et al*, 2011. Isolation and characterization of 45 polymorphic microsatellite loci of turbot (*Scophthalmus maximus*) and cross-species amplification. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 29(2): 311—316
- Morgante M, Hanafey M, Powell W, 2002. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. Nature Genetics, 30(2): 194—200
- Pardo G, Casas L, Fortes G *et al*, 2005. New microsatellite markers in turbot (*Scophthalmus maximus*) derived from an enriched genomic library and sequence databases. Molecular Ecology Notes, 5(1): 62—64
- Tóth G, Gáspári Z, Jurka J, 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. Genome Research, 10(7): 967—981
- Weber J L, 1990. Informativeness of human (dC—dA)_n · (dG—dT)_n polymorphisms. Genomics, 7(4): 524—530

ISOLATION AND ANALYSIS OF MICROSATALLITE MARKERS IN THE GENOME OF TURBOT *SCOPHTHALMUS MAXIMUS*

LI Meng^{1,2}, MA Ai-Jun¹, YUE Liang¹, ZOU Jie¹, WANG Guang-Ning¹,
TIAN Yue-Qiang¹, MA Ben-He¹, XIA Dan-Dan¹

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071;

2. Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306)

Abstract We constructed microsatellite markers of turbot *Scophthalmus maximus* by FIASCO (Fast Isolation by AFLP of Sequences Containing repeats) method to analyze the microsatellite DNA sequences of the turbot genome, applying the FIASCO method for initial screening of the markers plotted. The results indicate that enrichment efficiency by the method FIASCO method is 78.56%. Among 655 positive clones secondly screened, 597 were microsatellite loci and 469 were unique sequences. Of the 597 microsatellite loci, 51.76% were perfect, 34.67% imperfect, and 13.57% compound. The core sequence repetitions ranged 3—96 times; the average number of duplicates was 13.39; the most repeat unit type was the (CA/GT)_n, 77.6%. With Primer Premier 5.0, 413 pairs of primers were designed, of which 360 could be stably expressed. In addition, using marker screening again, 183 pairs of primers (50.8%) was found polymorphism in PCR product, from which 110 microsatellite loci (30.6%) were identified in compliance to the standards of genetic linkage mapping.

Key words turbot *Scophthalmus maximus*; microsatellite markers; marker isolation; sequence analysis; preliminary screening