

# 微卫星位点获取方法的研究进展\*

孙波 鲍毅新\*\* 赵庆洋 张龙龙 胡知渊

(浙江师范大学生态研究所, 浙江金华 321004)

**摘要** 微卫星标记(simple sequence repeat, SSR)是进行分子遗传学研究的一种有效手段, 并以其多态性高、信息含量大、保守性等特点成为最受人们欢迎的分子标记之一。但微卫星标记具有种族特异性, 必须采用特异引物进行 PCR 检测, 因而存在引物开发的问题。本文就筛选基因组文库法、微卫星富集法、数据库查找法、近缘物种筛选法、TOMMI 法和 FI-ASCO 法等具有代表性的微卫星标记开发策略进行了综述, 旨在为分子生态学研究过程中微卫星位点筛选方法的选择提供参考。

**关键词** 微卫星位点; 分离方法; 数据库查找; 近缘物种; 基因组 DNA

中图分类号 Q75 文献标识码 A 文章编号 1000-4890(2009)10-2130-08

**Methods for obtaining microsatellite loci: A review.** SUN Bo, BAO Yi-xin, ZHAO Qing-yang, ZHANG Long-long, HU Zhi-yuan (Institute of Ecology, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, Zhejiang, China). *Chinese Journal of Ecology* 2009 28(10) 2130-2137.

**Abstract:** Microsatellite marker or simple sequence repeat (SSR) is an effective means in molecular genetics research, and the most popular molecular marker, because of its high polymorphism, large information contents, and conservative characteristics. However, SSR is a kind of special primer marker, and it is necessary to know a species DNA sequence to design the primers for PCR testing, a problem limiting microsatellite primer development. This paper reviewed the development strategies of representative microsatellite markers, such as genomic library screening, SSR enrichment, database search, relative species selection, TOMMI, and FIASCO, aimed to provide references to the microsatellite loci screening in molecular ecology research.

**Key words:** microsatellite loci; isolation method; database searching; relative species; genomic DNA.

生物的基因组中, 特别是高等生物的基因组中含有大量的重复序列, 一般以 1~6 个碱基为核心序列, 首尾相串联而成, 被称为微卫星 DNA (microsatellite DNA) 或简单重复序列 (simple sequence repeats, SSR) (Litt & Luty, 1989)。微卫星 DNA 两端的序列一般是相对保守的单拷贝序列, 并且不同等位基因间的重复数存在丰富的差异, 因此, 可以通过设计特异引物, 对基因组总 DNA 进行 PCR 扩增 (张增翠和侯喜林, 2004), 用以揭示扩增片段的长度多态性, 这种多态性就是微卫星标记。微卫星标记具有多态性高、杂合子比例高、信息含量大、保守性和共显性等特点, 已广泛用于动植物遗传图谱的构建 (Gong *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2008; Woodhead *et*

*al.*, 2008)、目标基因的标定 (Borner *et al.*, 2000; Fukino *et al.*, 2008)、疾病检测 (Kim *et al.*, 2001)、品种鉴定 (Bessert & Orti, 2003) 以及遗传多样性分析 (刘臻等, 2007; Narasimhamoorthy *et al.*, 2008) 等方面的研究。由于微卫星标记具有种族特异性, 必须采用特异引物进行 PCR 检测, 因而存在引物开发的问题 (李明芳和郑学勤, 2004)。现在获取微卫星引物的方法主要有筛选基因组文库法、微卫星富集法、数据库查找法和近缘物种筛选法等 4 种, 同时随着生物学技术的进步, 还有 TOMMI 法和 FIASCO 法等新的筛选技术不断涌现, 各方法都具有优缺点, 一定程度上也给科技工作者的选取带来了一定困难。采用什么样的方法开发分离微卫星引物, 做到节约费用、省时高效是现在多数学者普遍关心的问题。针对这种情况, 本文就以上方法的技术流程和应用

\* 浙江省自然科学基金资助项目 (Y507080)。

\*\* 通讯作者 E-mail: sky90@zjnu.cn

收稿日期: 2009-01-13 接受日期: 2009-06-15

中的优缺点进行了综述,以方便研究者的选取,并为开展微卫星标记开发研究提供参考。

## 1 从数据库或有关文章中查询

从公共的 DNA 序列数据库 GenBank、Europe Molecular Biology Laboratory (EMBL)、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) 或已发表的有关文章中查找所要研究物种的微卫星序列或引物,这是最经济、最快捷的一种方法。通过数据库检索,高粱 (*Sorghum vulgare*)、大西洋鲑鱼 (*Salmo salar*)、水稻 (*Oryza sativa*) 等 (Brown *et al.*, 1996; Norris *et al.*, 1999; Cho *et al.*, 2000) 物种的大量的微卫星序列已被发现。随着基因组表达序列标签 (Expressed Sequence Tags, EST or ESTs) 计划的提出 (Adams *et al.*, 1991), 许多物种的 EST 库被迅速建立起来,这些数据库中也含有大量的微卫星序列,同样可以用来筛选微卫星位点,目前利用 DNA 数据库筛选的微卫星位点几乎都是源于 ESTs 数据库。梁炫强等 (2009) 利用自行开发的 20160 条花生栽培种荚果 EST, 通过序列拼接, 获得 8289 条无冗余 EST。经搜索,共检测出 740 个 SSR 位点,分布于 651 条 EST 中,发生频率为 7.8%, 均每 6.8 kb EST 序列含一个 SSR 位点;李斌等 (2004) 对蜜蜂 (*Apis*) ESTs 数据库分析,所分析的蜜蜂 EST 数据库包含 15869 条序列,总长为 7.9 Mb,表明可从现有的部分 ESTs 数据中方便地获取大量的微卫星序列;李华盛等 (2005) 从陆地棉 (*Gossypium hirsutum*)、海岛棉 (*G. barbadense*)、亚洲棉 (*G. arboreum*)、阿非利加棉 (*G. africanum*) 4 种棉花的 EST 序列数据库中筛选到了 4396 个微卫星序列,占整个 EST 数据库的 4.64%,并根据设计的微卫星序列合成了 25 对引物,其中 24 对可以进行扩增,充分说明了从 EST 数据库中筛选微卫星位点的高效性与可行性。

从数据库中查找微卫星位点,虽然省时省力,但是现在看来大多数只限于已经有序列数据发布的物种。而这些物种又多是模式生物或经济物种等,对于许多野生动物来说,研究相对较少,所以无法从已有序列中筛选大量的微卫星位点,这严重阻碍了利用微卫星对野生动物的研究。因此,目前利用此方法分离微卫星位点的报道还相对较少。

## 2 从近缘物种中筛选微卫星位点

随着在哺乳动物基因组中发现了微卫星侧翼保

守序列 (Moore *et al.*, 1991), 一些学者便发现微卫星位点序列在属内种间、甚至在科内属间是保守的、相似的,即可以从相近的物种数据库中查找微卫星位点,或使用已发表的遗传距离相近物种的微卫星标记。经过一系列的研究证实,同属、科、目的不同物种可以使用一种微卫星引物进行扩增,目前已经在许多物种上得到成功的应用。包文斌等 (2006) 筛选一定数量的鸡微卫星标记对蓝孔雀 (*Pavo cristatus*) 和绿孔雀 (*P. muticus*) 基因组 DNA 的多态性进行分析,评价它们的群体遗传结构,结果显示这两个孔雀群体的杂合度和遗传多样性水平都很低,且有相互混杂的趋势,为孔雀资源更有效的保护利用提供参考;蔡清秀等 (2008) 从非洲象 (*Loxodonta africana*) 31 个微卫星位点和 5 个已知亚洲象 (*Elephas maximus*) 微卫星位点中筛选适合勐养亚洲象的微卫星位点,发现所筛选的 36 个位点中有 14 个位点能在勐养亚洲象肌肉样品提出的 DNA 中成功扩增,且经测序证实为微卫星位点;Arevalo 等 (1994) 将山羊 (*Capra hircas*) 中发现的 10 个引物在牛科动物的 8 个其他属的 11 个种中扩增,发现所有位点中都有多态性;de Gontari 等 (1998) 从牛属 (*Bos*) 的 1036 个微卫星引物中筛选到 605 个可以在绵羊 (*Ovis aries*) 基因组中扩增的微卫星引物,同源率高达 58%;Primmer 等 (1996) 为一种燕子 (*Hirundo rustica*) 设计的微卫星引物在同一目的 39 种其他鸟类的 32 种中检测出多态,而在其他目的 19 种鸟的 6 种中检测出多态;Rico 等 (1996) 也报道,有 17 个微卫星位点能够在 4 亿年前就分离的鱼类之间转移扩增。这些研究成果都证实了对某一缺乏相应的微卫星标记的物种研究时,应用近缘物种微卫星标记不失为一种快速有效的方法。

需要引起注意的是,通过改变扩增条件用微卫星引物在物种间扩增到产物,并不一定意味着成功。一些学者研究也发现,测序后所得位点的序列和重复单元可能与原物种中的不一致,这可能是不同物种间的差异所引起的 (蔡清秀等, 2008)。因此,仅从产物片段大小和变化上不是总能很好地确定微卫星的存在,还需要通过杂交、电泳、测序等方法确定所扩增出的条带就是所期望的产物。

## 3 从基因组中筛选微卫星位点

对于大多数物种来说,从已有的基因文库中筛选微卫星或利用相近物种的微卫星,毕竟得到的位

点十分有限。尤其对于野生动植物来说,基因文库的资源十分匮乏,得不到足够的微卫星位点。因此要通过实验的方法,创建各种 DNA 文库,并用微卫星探针从文库中筛选分离得到。以下是几种具有代表性的微卫星标记的分离策略。

### 3.1 传统分离策略

传统的分离方法首先是构建基因组文库,再用探针杂交从基因组文库中筛选出微卫星位点(Rassmann *et al.*, 1991)。具体步骤一般为:1)提取所要研究物种的基因组 DNA;2)使用限制性内切酶,将基因组 DNA 切割成均匀的小片段;3)凝胶电泳回收大小约 300 ~ 500 bp 的片段;4)将回收片段克隆放大,使用标记探针进行杂交;5)筛选出含有重复序列的克隆;6)测序证实重复序列片段的存在;7)在重复序列片段两端区域设计引物对,进行 PCR 扩增,检验引物的有效性;8)对小量样本进行预试验,挑选出重复性好,具多态性的微卫星位点。

运用该方法构建基因文库筛选微卫星位点,已得到了许多学者的认同(张亚平等,1995;魏东旺等,2001;徐鹏等,2001)。但是,采用传统方法构建基因组文库时分筛选大插入片段基因组文库和筛选小插入片段基因组文库两类,尤其是筛选大插入片段过程中往往经多次杂交筛选后,仍需经过酶切(或超声波处理)转化成小插入片段,不但过程相对繁琐且难于测序(Ostrander *et al.*, 1992)。虽然经过改进将基因组 DNA 用限制性内切酶消化成 200 ~ 1500 bp 的小片段,再用 DNA 聚合酶 I 的 Klenow (Klenow fragment)大片段将它补平,构建和筛选小插入片段基因组文库(Luchezar *et al.*, 1993)能够较好的开发 SSR 引物(Bell & Ecke, 1994;Waldbieser *et al.*, 2001),但由于其阳性克隆得率低,能用于引物设计的有用序列很少(Ujino *et al.*, 1998),效果也不是很理想。总体而言,虽然已获得的 SSR 标记中,3/4 以上是利用传统开发方法获得的,并且在许多经济作物的 SSR 标记开发中仍然被应用,但费时、费力、效率低、操作过程烦琐等缺点已经严重阻碍了其发展。

### 3.2 富集法分离策略

近年来随着研究的不断深入,微卫星的分离方法已经有了较大的改进,在应用传统 SSR 标记开发方法的同时,人们也在不断探索简化其技术环节,提高效率,降低开发成本。自 1993 年起研究者陆续提出微卫星探针杂交的办法达到对微卫星片段富集的

目的,然后再构建其富集文库。通过这样的富集步骤尽量去除不含有微卫星位点的 DNA 片段,以提高含有微卫星位点 DNA 片段的得率。下面介绍几种比较流行的富集分离微卫星位点的方法。

#### 3.2.1 利用选择杂交进行微卫星位点的分离

1)尼龙膜富集法。Karagyzov 等(1993)首次将微卫星探针固定在尼龙膜上与基因组文库进行杂交,富集 SSR。其主要步骤包括:用超声波处理基因组 DNA 获得 0.2 ~ 1 kb 大小的片段,通过限制性内切酶 EcoR I 酶切基因组 DNA 构建初始小片段基因组文库;Mbo I 消化基因组 DNA,然后连接 Mbo I 接头,用接头序列单引物进行 PCR 扩增;PCR 扩增片段在沸水中热变性解链,变性 DNA 与通过吸附在尼龙膜上的许多微卫星探针来富集基因组中的微卫星片段,选择性杂交筛选含 SSR 片段;被筛选的 DNA 片段经洗涤后用于 PCR 扩增,扩增产物连接噬菌体载体转染大肠杆菌(*Escherichia coli*),最后构建 SSR 富集文库,阳性克隆测序。该方法较为通用,且花费较低,筛选不同核心序列的微卫星,无需多次构建文库,应用十分广泛(Armour *et al.*, 1994;Edwards *et al.*, 1996;Rowe *et al.*, 1997)。

2)磁珠富集法。磁珠富集法是利用生物素标记的 SSR 探针与基因组文库杂交,杂交反应产物与抗生物素蛋白混合富集 SSR(Kandpal *et al.*, 1994)。操作步骤通常是:首先将生物素标记的探针与基因组 DNA 片段杂交,然后与包被一层亲合素或链亲合素的磁珠混合温育(亲合素或链亲合素与生物素均能耦连),杂交上生物素标记探针的 DNA 片段(即含有微卫星位点的片段);接着使用洗液将未杂交上的片段洗去,通常洗涤 2 ~ 4 遍(洗涤时,尺度把握较为重要,太过严格便有可能将附着在磁珠上的含微卫星位点的 DNA 片段洗去,而过松则又会剩下较多的非目的片段);最后经高温变性将附着在磁珠上的 DNA 片段洗脱下来,PCR 再次扩增恢复片段浓度,用于克隆测序(Kandpal *et al.*, 1994)。该方法在 1994 年首次被提出后,由于其具有高效富集微卫星 DNA 的作用,便被迅速广泛的应用于微卫星位点的筛选(Reed & Beanie, 2001;Carleton *et al.*, 2002)。比如:Jiang 等(2007)以苧麻(*Boehmeria nivea*)栽培品种芦竹青为材料,通过磁珠富集法构建了苧麻富含(GA)<sub>n</sub>微卫星的部分基因组文库,对随机挑取 36 个克隆进行测序,发现 22 个为阳性克隆且都含有微卫星 DNA,阳性克隆率为 61.1%,达到较好筛选分

离微卫星位点的目的,王洪哲等(2008)采用磁珠富集与放射性杂交相结合的方法开发黑斑狗鱼(*Esox reicherti*)基因组微卫星资源,共获得微卫星基因组文库1600个菌,杂交前菌落PCR检测阳性克隆率为90.91%,杂交后得到的阳性克隆为1300个,占87.25%。对196个阳性克隆进行测序,发现192个含有微卫星序列,含微卫星序列克隆达到97.96%。

此方法由于探针处于液体介质中,杂交反应较之固定在尼龙膜上的探针更加充分,因而效率相对较高,对于需要分离大量的微卫星位点或微卫星位点稀少的生物体,磁珠富集的方法比其他方法更为有效,是目前用于大规模筛选微卫星位点的最为常用的一种方法。

**3.2.2 基于RAPD的分离方法** 为避免基因组文库构建和筛选阳性克隆,许多研究者提出结合随机扩增多态性DNA(Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)的开发思路。将RAPD扩增产物条带用微卫星重复区的探针进行Southern杂交,可以有效富集重复序列,这一发现缩短了新物种微卫星的筛选时间(Wu *et al.*, 1994; Cifarelli *et al.*, 1995)。其主要程序是:先进行RAPD扩增,琼脂糖凝胶电泳分离扩增条带,再按照Southern杂交程序,将RAPD扩增产物转到硝酸纤维膜上,用放射同位素标记的微卫星探针与其杂交,确定杂交信号所处的位置,然后从琼脂糖凝胶上找到相应位置的条带,回收、连接、测序(Ender *et al.*, 1996)。这种方法在糖用甜菜(*Beta vulgaris*)、橄榄(*Canarium album*)、向日葵(*Helianthus annuus*)的微卫星位点的筛选上获得成功,其扩增条带中阳性条带的比例分别达到0.9%、7.0%和10.7%(Cifarelli *et al.*, 1995)。

随着对这一方法研究的不断深入,部分学者在此基础上进行了改进,提出了更为完善的微卫星位点分离技术。Lunt等(1999)提出了PIMA(PCR Isolation of Microsatellite Arrays)法分离微卫星,即先使用RAPD引物随机扩增基因组获得DNA片断,选出带型集中且大小适合的扩增片段经TA载体进行克隆,用特异SSR及载体引物对克隆阵列进行PCR检测筛选含SSR克隆,最后对阳性克隆测序,设计SSR引物。这一方法与建库筛选比起来,更加省时省力,筛选步骤易于掌握,但该方法是以RAPD的产物与微卫星位点相关联为前提的,所以这一方法存在较大的局限性。

**3.2.3 引物延伸法分离SSR位点** 1992年引物延

伸法分离微卫星被首次报道(Ostrander *et al.*, 1992),该方法具体步骤如下:首先用限制性内切酶消化基因组DNA,将酶切产物进行末端修饰后转入大肠杆菌,构建基因组文库,然后将单链重组噬菌体M13转化于大肠杆菌突变体,合成富含尿嘧啶的单链DNA。随后以富含尿嘧啶的单链DNA为模板,5'磷酸化的微卫星引物与插入片段中含有微卫星的单链分子结合,进行延伸反应,合成异源双链杂交分子,将这些合成的异源双链分子转化到野生型大肠杆菌内,构建微卫星的富集文库,最后将富集文库进行菌落杂交,筛选阳性克隆测序。

Paetkau(1999)报道了同样基于引物延伸的SSR分离策略,通过利用生物素标记SSR引物,延伸反应产物与抗生物素蛋白包被的小球结合而分离出来,再经洗脱变性,重新进行延伸反应获得双链分子,转化双链载体获得富集文库,具有较高的阳性比率。

这2种方法都依赖基因组文库的建立,并且用一个引物延伸反应创建富含特殊微卫星重复基因文库,步骤相对繁琐,虽然阳性克隆比率很高,但其位点的重复率也是相当高的,一定程度影响了在其他研究中的应用。

**3.2.4 ISSR-PCR法分离SSR位点** ISSR-PCR法与基于RAPD的分离方法相比,避免了基因组文库构建和筛选的麻烦,消除了微卫星位点富集的随机性,大大缩短了时间,降低了研究费用,具有更明确的目的性和更强的富集能力,且引物设计思路新颖,巧妙地利用SSR作为引物或引物的一部分,扩增出其一侧或两侧的保守序列。目前较为通用主要有以下2种:

1)简并引物富集微卫星位点的方法。Fisher等(1996)描述了一个用简并性引物富集微卫星位点的方法,其原理是利用一个简并引物对基因组DNA进行PCR扩增,然后将扩增产物克隆测序得到微卫星位点一侧的特异序列(图1)。应用此方法已经成功的筛选出部分微卫星位点,且筛选出来的位点重复率极低(Fisher *et al.*, 1996)。以5'-KKVRVRV(CT)<sub>6</sub>-3'为例,就是一个5'锚定简并SSR引物。在二核苷酸重复(CT)<sub>6</sub>的5'端有7个简并核苷酸,形成一个“锚”。在PCR退火过程中,K可以跟任何核苷酸配对,V不能与A配对,R不能与G配对,其他核苷酸均可与它们配对,因此,VRVRV 5个碱基一起构成了一个封闭碱基群。在PCR过程中,由于

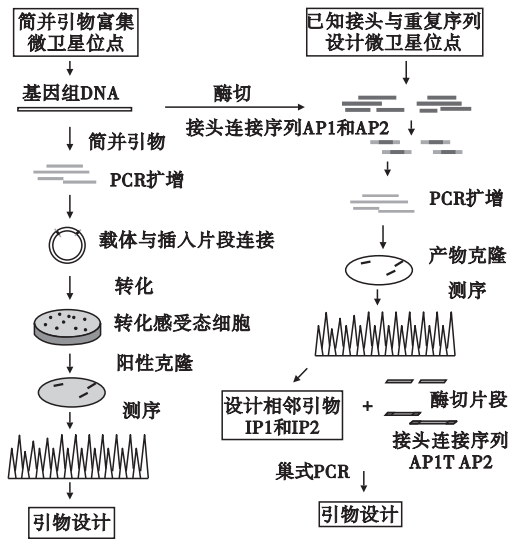


图 1 ISSR-PCR 法分离 SSR 位点图

Fig. 1 Schematic representation of SSR loci isolation by ISSR-PCR approach

VRVRV 不能与 GA 配对,该引物与模板 DNA 结合的时候,就不会在  $(GA)_n$  重复区滑动,只会结合在特定的位置上,以保证 SSR 位点的长度多态性不会丢失。

使用这种方法的一个难点就是简并引物设计,该引物是一段简并的序列与目的微卫星的重复区序列的结合,设计时连续几个简并碱基要避免出现与微卫星重复区互补的情况,同时还要兼顾多样性,使扩增时可以对多个基因座位扩增。该方法的优点不仅在于可方便快捷建立微卫星位点的富集文库,而且只须设计合成 SSR 一侧引物序列,就可与原简并引物配合使用,省去了设计合成 SSR 另一侧引物的费用。

2) 利用已知接头序列与重复区序列设计引物的方法。这种方法首先是由 Lian 等(2001)建立的,并在红松(*Pinus koraiensis*)植物分离微卫星位点时获得成功。该方法主要分 2 个部分,第一步是利用内切酶对基因组 DNA 进行酶切,然后在酶切片段两端连接已知序列的人工接头,以此为模板用微卫星重复区和人工接头的部分序列(AP1, AP2)为引物进行第一次 PCR。产物经克隆测序,在所得到的序列设计相邻的 2 个引物 IP1 和 IP2。第二步利用 PCR 进行染色体步移,仍是以连有接头序列的 DNA 酶切片段为模板,以已设计的引物 IP1、IP2 与接头序列引物 AP1、AP2 进行巢式 PCR,扩增出微卫星 DNA 另一侧保守序列,并设计引物 IP3。IP2 和 IP3

即为该微卫星位点的标记引物(图 1)。

该方法分离微卫星效率极高,阳性克隆含微卫星序列的可达 90% 以上,总的分离效率(排除相同克隆的情况)也可达 10% 以上,但是需经多次 PCR 扩增、设计引物、测序,又使得步骤显得烦琐。

## 4 近年出现的新方法

### 4.1 TOMMI 法

Chen 等(2005)首次提出 TOMMI 法(Targeted Oligonucleotide-Mediated Microsatellite Identification),该方法与以往不同的是无需使用内切酶,也不用富集建立 DNA 文库,只需要从已经构建好的大片的基因组 DNA 文库如 BAC 库(Bacterial Artificial Chromosome)、PAC 库(P1-derived Artificial Chromosome)中筛选微卫星标记。具体要点如下:首先以  $(CA/AC)_n$  ( $N$  为锚定碱基)为测序引物直接对来自 PAC 库的克隆 DNA 进行测序,根据所得到的序列设计另外 1 条反向测序引物,并进行反向测序。如果两轮测序得到的序列是一致的且含有短串连重复序列,则根据此序列设计微卫星引物。PCR 扩增后,可以进一步测序 PCR 产物以验证是否是特异性扩增。虽然此方法需要多次测序,步骤较繁琐,但此方法避免了酶切、富集和建库等步骤,因此使用这种方法可以捕获许多常规方法无法捕获的位点,大大增加了微卫星的捕获的数量。

### 4.2 FIASCO 法

FIASCO 法(Fast Isolation by AFLP of Sequences Containing Repeats)是分离微卫星 DNA 标记的一种非常有效且无需克隆与筛选的快捷方法(Zane *et al.* 2002)。操作要点是:基因组 DNA 被限制性内切酶随机酶切并被连接上 AFLP 接头,连接产物适当稀释后用作 PCR 扩增模板,并用含有 1 个选择性碱基的接头特异性引物进行 PCR 预选扩增(pre-selective amplification),即通过引物 3' 端选择性碱基与限制性位点第一个碱基匹配而有选择性的扩增,接下来是选择性扩增(selective amplification),用选择性碱基组合成几对引物分别对预选扩增产物进行扩增(Bleas *et al.* 1998),通过这一步扩增可以获得几百纳克的 DNA 扩增片段。AFLP 选择性扩增产物用磁珠富集,富集后的产物扩增恢复,扩增使用的引物仍为原引物,但反应体系中使用的碱基 A 被  $^{32}P$  放射性标记。经电泳分离,回收并纯化显影条带,纯化产物再次扩增,使用相应的含 3 个选择性碱基的



引物扩增产物用琼脂糖凝胶电泳分离,回收适合长度的片段并纯化,其目的是将单链 DNA 变成双链 DNA,以及将有限的特异性 DNA 片段放大数倍以增加克隆效率。最后将 PCR 扩增产物纯化后转化到大肠杆菌感受态细胞,建成基因组微卫星富集文库(图 2)。这种方法一经公布便得到了学者的认同。高国庆等(2003)比较了 2 种从 AFLP 扩增片段中分离花生(*Arachis hypogaea*)微卫星 DNA 的方法,结果显示,从预扩增的 AFLP 片段中富集微卫星的方法简便,获得较多的含简单重复序列的片段,而从选择性扩增的 AFLP 片段中分离微卫星后直接从电泳胶上切取差异片段进行测序的方法效率较低,不适用于分离花生的微卫星 DNA;Gao 等(2003)用 AFLP 引物(Hind III-A/Mse I-N)和含(GA)<sub>15</sub>、(GGC)<sub>10</sub>的微卫星序列作探针,共获得 34 个克隆,其中 9 对含有微卫星序列;He 等(2003)应用 AFLP 引物 Hind III-A/Mse I-T 和(AT)<sub>15</sub>、(GT)<sub>15</sub>、(GA)<sub>15</sub>作微卫星探针设计出 56 对花生微卫星引物,19 对标记在 24 个花生栽培种上表现多态性;Moretzsohn 等(2004)也利用同样的方法开发出 67 对花生微卫星标记,但只有 3 个标记在 60 个花生栽培种中产生多态性。

FIASCO 方法与以往许多方法相似,都是利用生物素探针杂交、包被链亲和素的磁珠捕获特异 DNA 片段构建富集微卫星文库的方法,只是使用的内切酶及相应的接头不一致(Zane *et al.* 2002)。但 FIASCO 方法具有更为简单、快速提高阳性克隆率等优点,特别是结合了 AFLP 的一些步骤,能与 AFLP

标记共用一些试剂,使得一般的分子生态实验室都能开展此项工作,并且省去了大量人力和物力的投入,在微卫星标记分离领域发展前景较大。缺点是操作过程中仍然没有摆脱酶切、建库、富集以及 Southern 杂交等步骤,没有实现操作过程的一步化,同时高阳性克隆下伴随着较高的重复率。

最近提出的其他分离微卫星新方法,如 M-AFLP 法(Microsatellite-Amplified Fragment Length Polymorphism)(Acquadro *et al.* 2005a)、MAL 法(Microsatellite Amplified Library)(Acquadro *et al.* 2005b)以及 STM 法(Sequence Tagged Microsatellites)(Keiper *et al.* 2006)等,这些方法或多或少受到 AFLP 技术的影响,借鉴或修改了 AFLP 的一些步骤,不用构建基因组文库,采用直接测序的方式来筛选微卫星标记,因此本文不再详述。

## 5 小 结

在文中叙述的方法中,最方便、最经济的方法就是从发表的文献中获得微卫星引物,或是从公共数据库中筛选微卫星位点,牛属家畜、西班牙山羊(*Capra pyrenaica*)、原鸡(*Gallus gallus*)等采用 SSR 标记早已有人做过研究(de Gontari *et al.* 1998; Arranz *et al.* 2001; Romanov & Weigend 2001),引物序列也已公开发表,可以直接使用或被其同属的动物转移使用。而对于那些至今还没有关于 SSR 标记研究报道,近缘物种又相对少的动植物来说必须自己开发引物。在选择以何种方法获得微卫星位点时,有 2 个因素决定了筛选方法的选择:1)研究的目的;2)所需要的微卫星数目。如果是为了遗传作图,那么就需要获得更多的微卫星位点;相反,如果只是用来进行种群遗传研究,少量的微卫星位点就可以满足需要。除以上 2 个因素外,对于多数研究者来说,实验室的技术设备以及分离微卫星的费用也是不得不考虑的因素。

综合以上因素,分析文中的从 DNA 基因组中筛选微卫星位点的方法,认为对于基因组中 SSR 含量丰富的物种,可采用传统的开发方法,虽然耗时相对较长,但是对技术的要求低,费用也不高,多数实验室都可以接受,而对于 SSR 含量较少的物种最好采用富集策略提高分离效率,节约时间和资金。比较富集法中各种微卫星位点开发策略,基于 ISSR-PCR 扩增的富集方法和磁珠富集法所需设备简单,技术要求较低,周期相对较短,适合于多数实验室开展工

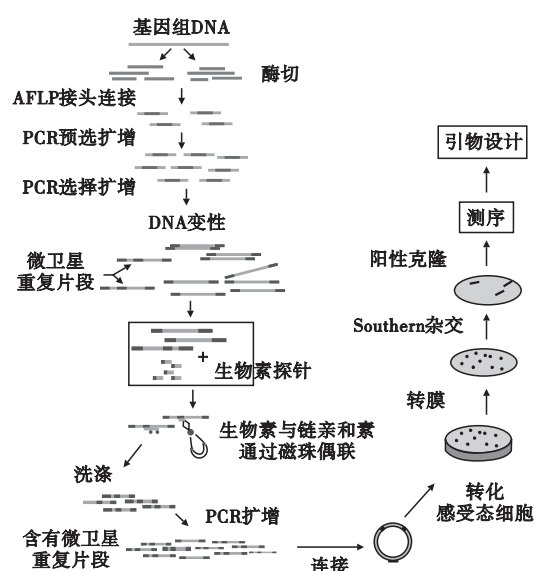


图 2 FIASCO 法操作流程

Fig. 2 Schematic representation of FIASCO protocols

作,最近新发现的方法中 FIASCO 法由于省去了构建文库与筛选文库的过程,并且结合了 AFLP 的一些步骤,能与 AFLP 标记共用一些试剂,使得一般的分子生态实验室都能开展此项工作,筛选微卫星位点的周期也更短(Zane *et al.* 2002),推荐使用。随着开发 SSR 引物的许多新方法的问世(M-AFLP 法、MAL 法、STM 法),微卫星位点获得困难、成本较高的问题也正在逐步被解决,日益显示出其广泛的应用前景。

#### 参考文献

- 包文斌,陈国宏,束婧婷,等. 2006. 孔雀微卫星引物筛选及其遗传多样性分析. *遗传*, **28**(10): 1242-1246.
- 蔡清秀,林柳,潘文婧,等. 2008. 勐养保护区亚洲象微卫星位点筛选及种群遗传多样性分析. *兽类学报*, **28**(2): 126-134.
- 高国庆, He Guo-bao, 李杨瑞. 2003. 花生微卫星 DNA 分离方法的研究. *中国油料作物学报*, **25**(3): 30-33.
- 李斌,夏庆友,鲁成,等. 2004. 蜜蜂 EST 中的微卫星分析. *遗传学报*, **31**(10): 1089-1094.
- 李华盛,范术丽,沈法富. 2005. 从棉花 ESTs 数据库中筛选微卫星标记的初步研究. *棉花学报*, **17**(4): 211-216.
- 李明芳,郑学勤. 2004. 开发 SSR 引物方法之研究动态. *遗传*, **26**(5): 769-776.
- 梁炫强,洪彦彬,陈小平,等. 2009. 花生栽培种 EST-SSRs 分布特征及应用研究. *作物学报*, **35**(2): 246-254.
- 刘臻,鲁双庆,匡刚桥,等. 2007. 湘江野鲤养殖群体和自然群体遗传多样性的微卫星分析. *生态学杂志*, **26**(7): 1074-1079.
- 王洪哲,殷倩茜,冯志纲,等. 2008. 黑斑狗鱼部分基因组文库构建和微卫星位点的筛选(英文). *动物学研究*, **29**(3): 245-252.
- 魏东旺,楼允东,孙效文,等. 2001. 鲤鱼微卫星分子标记的筛选. *动物学研究*, **22**(3): 238-241.
- 徐鹏,周岭华,相建海. 2001. 用 PCR 法快速筛选中国对虾含微卫星的重组阳性克隆. *水产学报*, **25**(2): 127-130.
- 张亚平,王文,宿兵,等. 1995. 大熊猫微卫星 DNA 的筛选及其应用. *动物学研究*, **16**(4): 301-306.
- 张增翠,侯喜林. 2004. SSR 分子标记开发策略及评价. *遗传*, **26**(5): 763-768.
- Acquadro A, Portis E, Albertini E, *et al.* 2005a. M-AFLP-based protocol for microsatellite loci isolation in *Cynara cardunculus* L. (Asteraceae). *Molecular Ecology Notes*, **5**: 272-274.
- Acquadro A, Portis E, Lee D, *et al.* 2005b. Development and characterization of microsatellite markers in *Cynara cardunculus* L. *Genome*, **48**: 217-25.
- Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, *et al.* 1991. Complementary DNA sequencing: Expressed sequence tags and human genome project. *Science*, **252**: 1651-1656.
- Arevalo E, Holder DA, Derr JN, *et al.* 1994. Caprine microsatellite dinucleotide repeat polymorphisms at the SR-CRSP-1, SR-CRSP-2, SR-CRSP-3, SR-CRSP-4 and SR-CRSP-5 loci. *Animal Genetics*, **25**: 202-205.
- Armour JA, Neumann R, Gobert S, *et al.* 1994. Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. *Human Molecular Genetics*, **3**: 599-565.
- Arranz JJ, Bayon Y, San PF. 2001. Genetic variation at microsatellite loci in Spanish sheep. *Small Ruminant Research*, **39**: 3-10.
- Bell CJ, Ecker JR. 1994. Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics*, **19**: 137-144.
- Bessert M, Orti G. 2003. Microsatellite loci for paternity analysis in the fathead minnow, *Pimephales promelas* (Teleostei: Cyprinidae). *Molecular Ecology Notes*, **3**: 532-534.
- Bleas M, de Grandis S, Lee H, *et al.* 1998. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): A review of the procedure and its applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **21**: 99-114.
- Borner A, Roder MS, Unger O, *et al.* 2000. The detection and molecular mapping of a major gene for non-specific adult-plant disease resistance against stripe rust (*Puccinia striiformis*) in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, **100**: 1217-1224.
- Brown SM, Hopkins MS, Mitchell SE. 1996. Multiple methods for the identification of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Theoretical and Applied Genetics*, **93**: 190-198.
- Carleton KL, Streelman JT, Lee BY. 2002. Rapid isolation of CA microsatellites from the tilapia genome. *Animal Genetics*, **33**: 140-144.
- Chen KF, Knorr C, Bornemann-Kolatzki K, *et al.* 2005. Targeted oligonucleotide-mediated microsatellite identification (TOMMI) from large-insert library clones. *BMC Genetics*, **6**: 54.
- Cho YG, Jahii T, Temnykh S, *et al.* 2000. Diversity of microsatellite derived from genomic libraries and genbank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, **100**: 713-722.
- Cifarelli RA, Gallitelli M, Cellini F. 1995. Random amplified hybridization microsatellites (RAHM): Isolation of a new class of microsatellite-containing DNA clones. *Nucleic Acids Research*, **23**: 3802-3803.
- de Gortari MJ, Freking BA, Cuthbertson RP, *et al.* 1998. A second generation linkage map of the sheep genome. *Mammalian Genome*, **9**: 204-209.
- Edwards KJ, Barker JH, Daly A, *et al.* 1996. Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. *Biotechniques*, **20**: 759-760.
- Ender A, Schwenk K, Städler T, *et al.* 1996. RAPD identification of microsatellites in *Daphnia*. *Molecular Ecology*, **5**: 437-441.
- Fisher PJ, Gardner RC, Richardson TE. 1996. Single locus microsatellites isolated using 5'-anchored PCR. *Nucleic Acids Research*, **24**: 4369-4371.
- Fukino N, Takayoshi Ohara T, Monforte AJ, *et al.* 2008. Identification of QTLs for resistance to powdery mildew and SSR markers diagnostic for powdery mildew resistance genes in melon (*Cucumis melo* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, **118**: 165-175.
- Gao GQ, He GH, Li YR. 2003. Microsatellite enrichment from AFLP fragments by magnetic beads. *Acta Botanica Sinica*, **45**: 1266-1269.
- Gong L, Stift G, Kofer R, *et al.* 2008. Microsatellites for the genus *Cucurbita* and an SSR-based genetic linkage map of

- Cucurbita pepo* L. *Theoretical and Applied Genetics* , **117** : 37–48.
- He GH , Meng RH , Newman M , *et al.* 2003. Microsatellites as DNA markers in cultivated peanut ( *Arachis hypogaea* L. ). *BMC Plant Biology* , **3** : 1–6.
- Jiang YB , Jie YC , Zhou JL , *et al.* 2007. Isolation and characterization of microsatellites from ramie [ *Boehmeria nivea* ( L. ) Gaud. ]. *Acta Agronomica Sinica* , **33** : 158–162.
- Kandpal RP , Kandpal G , Weissman SM. 1994. Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping clones , and hybridization selection for region-specific markers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , **91** : 88–92.
- Karagoyozov L , Kalcheva ID , Chapman VM. 1993. Construction of random small-insert genomic libraries highly enriched for simple sequence repeats. *Nucleic Acids Research* , **21** : 3911–3912.
- Keiper FJ , Hayden MJ , Wallwork H. 2006. Development of sequence tagged microsatellites ( STMs ) for the barley scald pathogen *Rhynchosporium secalis*. *Molecular Ecology Notes* , **6** : 543–546.
- Kim HS , Lee BL , Woo DK. 2001. Assessment of markers for the identification of microsatellite instability phenotype in gastric neoplasms. *Cancer Letters* , **164** : 61–68.
- Lian CL , Zhou ZH , Hogetsu T. 2001. A simple method for developing microsatellite markers using amplified fragments of inter-simple sequence repeat. *Journal of Plant Research* , **114** : 381–385.
- Litt M , Luty JA. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *The American Journal of Human Genetics* , **44** : 397–401.
- Lucheza K , Iveta DK , Verne MC. 1993. Construction of random small-insert genomic libraries highly enriched for simple sequence repeats. *Nucleic Acids Research* , **21** : 3911–3912.
- Lunt DH , Hutchinson WF , Carvalho GR. 1999. An efficient method for PCR-based identification of microsatellite arrays ( PIMA ). *Molecular Ecology* , **8** : 893–894.
- Moore SS , Sergeant LL , King TJ , *et al.* 1991. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics* , **10** : 654–660.
- Moretzsohn MC , Hopkins MS , Mitchell SE , *et al.* 2004. Genetic diversity of peanut ( *Arachis hypogaea* L. ) and its wild relatives based on the analysis of hypervariable regions of the genome. *BMC Plant Biology* , **4** : 11.
- Narasimhamoorthy B , Saha MC , Swaller T , *et al.* 2008. Genetic diversity in Switchgrass collections assessed by EST-SSR markers. *Bioenergy Research* , **1** : 136–146.
- Norris AT , Bradley DG , Cunningham EP. 1999. Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon ( *Salmo salar* ) population. *Aquaculture* , **180** : 247–264.
- Ostrander EA , Jong PM , Rine J , *et al.* 1992. Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , **89** : 3419–3423.
- Paetkau D. 1999. Microsatellites obtained using strand extension : An enrichment protocol. *Biotechniques* , **26** : 690–697.
- Primmer CR , Moller AP , Ellegren H. 1996. A wide range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology* , **5** : 365–378.
- Rassmann K , Schlotterer C , Tautz D. 1991. Isolation of simple-sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *Electrophoresis* , **12** : 113–118.
- Reed KM , Beanie CW. 2001. Isolation of 105 microsatellite loci from an ovine genomic library enriched for microsatellites. *Animal Biotechnology* , **12** : 77–86.
- Rico C , Rico I , Hewitt G. 1996. 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. *Biological Sciences* , **263** : 549–557.
- Romanov MN , Weigend S. 2001. Analysis of genetic relationships between various populations of domestic and jungle fowl using microsatellite markers. *Poultry Science* , **80** : 1057–1063.
- Rowe DJ , Rinderer TE , Stelzer JA , *et al.* 1997. Seven polymorphic microsatellite loci in honeybees ( *Apis mellifera* ). *Insects Society* , **44** : 85–93.
- Sun ZN , Liu P , Li J , *et al.* 2008. Construction of a genetic linkage map in *Fenneropenaeus chinensis* ( Osbeck ) using RAPD and SSR markers. *Hydrobiologia* , **596** : 133–141.
- Ujino T , Kawahara T , Tsumura Y , *et al.* 1998. Development and polymorphism of simple sequence repeat DNA markers for *Shorea curtisii* and other Dipterocarpaceae species. *Heredity* , **81** : 422–428.
- Waldbieser GC , Bosworth BG , Nonneman DJ , *et al.* 2001. A microsatellite-based genetic linkage map for channel catfish , *Ictalurus punctatus*. *Genetics* , **158** : 727–734.
- Woodhead M , McCallum S , Smith K , *et al.* 2008. Identification , characterisation and mapping of simple sequence repeat ( SSR ) markers from raspberry root and bud ESTs. *Molecular Breeding* , **22** : 555–563.
- Wu KS , Jones R , Danneberger L , *et al.* 1994. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acids Research* , **22** : 3257–3258.
- Zane L , Bargelloni L , Patarnello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation : A review. *Molecular Ecology* , **11** : 1–16.

作者简介 孙 波,男,1984 年生,硕士研究生。主要从事分子生态学方面研究。E-mail : sunbo84@gmail.com

责任编辑 刘丽娟