

磁珠富集法与 5′锚定 PCR 法开发背瘤丽蚌微卫星标记的比较*

徐 波¹ 汪桂玲^{1**} 李家乐^{1,2}

(¹农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306; ²上海市高校水产养殖学 E-研究院, 上海 201306)

摘 要 利用磁珠富集法和 5′锚定 PCR 法开发背瘤丽蚌的微卫星标记, 将获得的多态性引物用于群体的遗传多态性分析, 以期在比较两种开发微卫星标记方法的基础上同时获得一批有用的微卫星引物。从磁珠富集法获得的微卫星序列阳性克隆率为 69.2%, 重复次数超过 10 的占总数的 70.2%, 从设计的 28 对引物中筛选得到多态性引物 11 对, 开发效率为 39.3%。这 11 对引物用于养殖群体的遗传多样性分析, 结果显示, 等位基因数范围为 4 ~ 13, 观测杂合度、期望杂合度范围分别为 0.205 ~ 0.738、0.566 ~ 0.839。而 5′锚定 PCR 法获得的微卫星序列阳性克隆率为 97.8%, 重复次数超过 10 的占总数的 24.7%, 从设计的 56 对引物中筛选得到多态性引物 19 对, 开发效率为 30.4%。这 19 对引物用于养殖群体的遗传多样性分析, 结果显示, 等位基因数范围为 3 ~ 10, 观测杂合度、期望杂合度范围分别为 0.208 ~ 0.894、0.431 ~ 0.896。实验结果表明, 磁珠富集法所获微卫星序列质量高, 开发微卫星标记效率较高; 而 5′锚定 PCR 法实验操作更简便, 所获得的引物遗传多样性指数更高。两种方法开发的引物均可用于背瘤丽蚌和近缘种的野生种质资源遗传多样性研究。

关键词 背瘤丽蚌; 磁珠富集法; 5′锚定 PCR 法; 微卫星; 遗传多样性

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 1000-4890(2012)4-0923-08

Development of microsatellite markers from *Lamprotula leai*: A comparison of magnetic beads hybridization and 5′ anchored PCR methods. XU Bo¹, WANG Gui-ling^{1**}, LI Jia-le^{1,2} (¹Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China; ²Aquaculture Division, E-Institute of Shanghai Universities, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China). *Chinese Journal of Ecology*, 2012, 31(4): 923–930.

Abstract: The microsatellite DNA markers from *Lamprotula leai* were developed by using magnetic beads hybridization and 5′ anchored PCR methods, and applied in genetic diversity analysis, on the purpose of obtaining a batch of microsatellite primers based on the comparison of the two microsatellite development methods. The colonies from library constructed by magnetic beads hybridization method were selected and screened, of which, 69.2% were positive. The number of the replications over 10 occupied 70.2% of the total, and 28 pairs of the primers were designed, according to the sequences obtained. Eleven of the primers could be applied in DNA polymorphism analysis, rating 39.3%. The analysis of the genetic diversity in cultured population of *L. leai* by using the 11 primers indicated that the number of the alleles per locus ranged from 4 to 13. The observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_e) ranged from 0.205–0.738 and 0.566–0.839, respectively. The colonies from library constructed by 5′ anchored PCR method were selected and screened, of which, 97.8% were positive. The number of the replications over 10 occupied 24.7% of the total, and 56 pairs of the primers were designed, according to the sequences obtained. Nineteen of the primers could be applied in DNA polymorphism analysis, rating 30.4%. The analysis of the genetic diversity in cultured population of *L.*

* 国家自然科学基金青年科学基金项目(31101939)资助。

** 通讯作者 E-mail: glwang@shou.edu.cn

收稿日期: 2011-10-28 接受日期: 2012-01-18

leai by using the 19 primers indicated that the number of the alleles per locus ranged from 3–10. The observed H_o and H_e ranged from 0.208–0.894 and 0.431–0.896, respectively. Our results indicated that the microsatellite sequences obtained by magnetic beads method had higher quality, and this method could be a higher efficient method, whereas the 5' anchored PCR method was more easily performed, and the genetic diversity index of the primers obtained was higher. All the microsatellite markers developed by the two methods could be useful in the genetic diversity analysis of *L. leai* and related species.

Key words: *Lamprotula leai*; magnetic beads method; 5' anchored PCR method; microsatellite; genetic diversity.

背瘤丽蚌(*Lamprotula leai*)贝壳珍珠层洁白坚厚,为制造珠核、钮扣及工艺品的主要原料,蚌肉亦可食用或作饲料,是中国特有的淡水育珠蚌。由于环境破坏和资源过度开发,背瘤丽蚌资源量已急剧下降,目前已被列为安徽省一级保护水生野生动物和湖北省二级保护动物(张忱和朱胜英,2000)。目前,国内外有关背瘤丽蚌的研究仅限于年龄与生长(凌高等,2005)、核型分析(闻海波等,2007)、胚胎发育(张根芳等,2009)等方面,对其遗传多样性方面的研究目前尚未开展。

微卫星标记(microsatellite markers)以其共显性、易于检测等特征一直在水产动物种质资源开发(Divu *et al.*, 2008)、遗传结构分析(Liu *et al.*, 2009)、遗传图谱构建(Kazuharu *et al.*, 2011)等研究中广泛应用。在贝类种质资源方面,微卫星已用于三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)(Li *et al.*, 2009)、褶纹冠蚌(*Cristaria plicata*)(Jia *et al.*, 2010)、马氏珠母贝(*Pinctada martensi*)(曲妮妮等,2010)、背角无齿蚌(*Anodonta woodiana*)(汪桂玲等,2011)等研究中,在背瘤丽蚌中的研究还比较鲜见(Xu *et al.*, 2011)。微卫星分子标记的获得主要受限于微卫星及其旁侧特异引物区的分离。目前国内外微卫星开发技术主要有:直接文库筛选法、5'锚定 PCR 法、单引物延伸富集法、磁珠富集法、生物信息学法、转移扩增法等,目前应用最为广泛的 SSR 分离方法是磁珠富集法(Li *et al.*, 2007),5'锚定 PCR 法只需设计一条特异引物与锚定简并引物扩增相应的 SSR 位点(Fisher *et al.*, 1996),在植物微卫星的开发方面应用较多(Varghese *et al.*, 2001; Hayden *et al.*, 2004)。本研究利用磁珠富集法和 5'锚定 PCR 法开发背瘤丽蚌的微卫星分子标记,并对两种方法进行比较分析,并对筛选的多态性引物进行背瘤丽蚌群体遗传多样性检测,为该物种及近缘物种的野生种

质资源保护鉴定基础。

1 材料与方法

1.1 背瘤丽蚌总 DNA 的提取

背瘤丽蚌养殖群体 48 个个体采自浙江省金华市威养养殖新技术有限公司生产基地,采用酚氯仿抽提法分离外套膜基因组 DNA(Sambrook & Russell, 2001),提取的 DNA 用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测,后 -20 ℃ 保存备用。

1.2 磁珠富集法构建微卫星文库

采用 *Mse* I 接头, Oligo-*Mse* I A: HO-TA CTC AGG ACT CAT-OH, Oligo-*Mse* I B: HO-GAC GAT GAG TCC TGA G-OH, 建立 15 uL 的连接体系,所得的连接产物稀释 10 倍后进行预扩增,建立 20 uL 的反应体系,含 10×PCR Buffer 2 μL, MgCl₂ (25 mM) 1.2 μL, dNTP 混合物 (2.5 mM) 1.6 μL, *Mse* I -N 引物组 (20 μmol · L⁻¹) 2 μL, 10 倍稀释的连接反应液 5 μL, Taq 酶 (2.5 U · μL⁻¹) 0.4 μL, ddH₂O 7.8 uL。PCR 反应程序为 94 ℃ 预变性 3 min, 94 ℃ 1 min, 53 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 17 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测并回收纯化, -20 ℃ 保存。

建立 100 uL 反应体系, 6×SSC+0.1% SDS(杂交缓冲液) 70 μL, 生物素标记的 Biotin-(CT)₁₂ 探针 5 uL (100 μmol · L⁻¹), PCR 产物 25 μL; 反应条件为 95 ℃ 变性 15 min, 55 ℃ 温浴 30 min 缓慢冷却至室温至少 1 h, 加入 300 μL 的 TEN100 溶液, 混匀后 4 ℃ 保存备用。取 100 μL 磁珠用 TEN₁₀₀ 溶液反复平衡 3 次后, 用 100 μL TEN₁₀₀ 溶解, 然后将含生物素探针的杂交液加入平衡好的磁珠溶液中, 室温放置 30 min, 通过磁珠吸附微卫星序列。

以 *Mse* I -N 引物组扩增捕获的微卫星片段, PCR 产物与 pGEM-T Vector(购自上海盛兆生物有

限公司)连接并转化大肠杆菌 DH5a 感受态细胞(购自天根生化科技有限公司),铺板于含有 Amp 的 LB 固体培养基中,构建成为背瘤丽蚌微卫星文库。以蓝白斑筛选和菌落 PCR 检测阳性克隆,PCR 反应程序如前第 PCR 所述,循环次数为 30。用琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果,选择阳性克隆测序。

1.3 5'锚定 PCR 法构建微卫星文库

根据 Fisher(1996),采用一个简并引物(PCT4) KKVRVRV(CT)₆(K = G/T, V = G/C/A, R = G/A)直接扩增基因组 DNA,建立 25 μ L 的反应体系,该体系含 2 \times PCR MasterMix 12.5 μ L(购自天根生化科技有限公司,其中 0.1 U Taq Polymerase $\cdot \mu$ L⁻¹, 500 μ M dNTP each, 20 μ M Tris-HCl pH 8.3, 100 mM KCl, 3 mM MgCl₂), PCT4 引物(20 μ mol \cdot L⁻¹) 2 μ L, DNA 模板(10 ng \cdot L⁻¹) 2.5 μ L, ddH₂O 8 μ L。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 59 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 5 个循环,接下来 94 $^{\circ}$ C 30 s, 57 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测并回收纯化。PCR 产物与 pGEM-T Vector 连接并转化大肠杆菌 DH5a 感受态细胞,铺板于含有 Amp 的 LB 固体培养基中,构建成为背瘤丽蚌微卫星文库。以蓝白斑筛选和菌落 PCR 检测阳性克隆,PCR 反应程序同磁珠富集法,重组子扩增选用 M13 通用引物。用琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果,选择阳性克隆测序。

1.4 序列分析、引物设计及多态性引物的检测

从 2 轮筛选的阳性克隆中分别吸取 500 μ L 菌液于 1.5 mL 离心管当中,送至上海生工测序。返回序列用 BioEdit 生物软件去除载体(磁珠富集法分离的序列还需去接头),采用 Primer 5.0 软件进行引物设计。以背瘤丽蚌 1 个养殖群体的外套膜基因组 DNA 为模板,经 PCR 分别对两种方法开发合成的引物进行检测评估,扩增产物用 8% 的非变性聚丙烯酰胺胶电泳分离,银染(Creste *et al.*, 2001),筛选引物。

1.5 群体遗传多态性数据分析

利用 GelPro32 分析引物扩增结果的聚丙烯酰胺胶电泳图,利用 GENPOP 4.0 进行群体遗传分析,计算等位点数目(number of allele, A)、观测杂合度(observed heterozygosity, H_o)和期望杂合度(expected heterozygosity, H_e),利用 U 检验进行 Hardy-Weinberg 平衡,采用 Bonferroni 方法校正的显著性标准,根据

P 值判断杂合缺失或过剩。

2 结果与分析

2.1 磁珠富集法及 5'锚定 PCR 法获得克隆测序结果与序列分析

从磁珠富集法的 1000 余个克隆库中随机挑选 52 个菌落,测序得到其中 36 个克隆含有微卫星序列,阳性克隆率为 69.2%。在 36 个阳性克隆中含有微卫星重复基元 47 个,其中 CT/GA 重复基元 22 个(46.8%), CA/GT 重复基元 20 个(46.6%),其他为三碱基重复基元 2 个(4.2%)四碱基重复基元 3 个(6.4%)。另外根据 Weber(1990)提出的测序标准,完美型、非完美型及混合型分别为 27 个(75.0%)、7 个(19.4%)和 2 个(5.6%),10 次以上的重复占 70.2%,又以 10 ~ 19 次为最多,占 59.6%,重复次数最高为 35。微卫星基元重复次数统计见图 1,部分菌液 PCR 电泳图见图 2,克隆文库特征见表 1。

从 5'锚定 PCR 法的 2000 余个克隆库中随机挑选 92 个菌落,测序得到其中 90 个克隆含有微卫星序列,阳性克隆率为 97.8%。在 90 个阳性克隆中含有微卫星基元 223 个,其中 CT/GA 重复基元 187 个(83.8%), CA/GT 重复基元 28 个(12.6%),另外少部分其他 2 碱基重复基元 4 个(1.8%),剩下的为四碱基重复基元 4 个(1.8%)。另外根据 Weber(1990)提出的测序标准,完美型、非完美型及混合型分别为 188 个(87.9%)、6 个(2.8%)和 20 个(9.3%),10 次以上的重复占 24.2%,又以 5 ~ 9 次为最多,占 75.8%,重复次数最高为 31。微卫星基元重复次数统计见图 1,部分菌液 PCR 电泳图见图 2,克隆文库特征见表 1。

2.2 两种方法多态性引物筛选结果

选取合适序列利用引物设计软件 Primer Premier

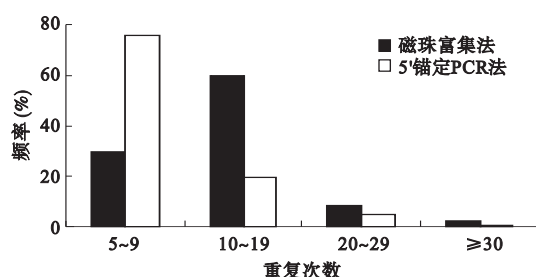


图 1 两种方法分离的背瘤丽蚌微卫星序列重复次数比较
Fig. 1 Comparative analysis of microsatellite repeat number from *Lamprotula leai* with two methods

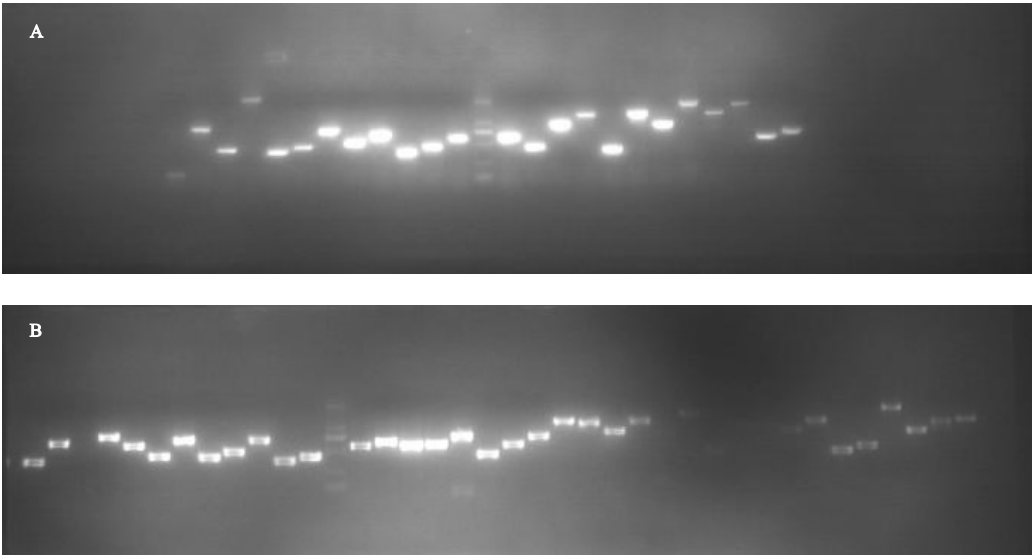


图 2 两种方法分离背瘤丽蚌微卫星序列的部分菌液 PCR 结果
Fig. 2 Partial colony PCR results of microsatellite repeat number from *Lamprotula lei* with two methods
A 磁珠富集法;B,5'锚定 PCR 法。

表 1 两种方法构建的背瘤丽蚌微卫星 DNA 文库特征及筛选引物比较

Table 1 Comparative analysis of *Lamprotula lei* DNA library feature and primer screening efficiency

文库对象	挑选 克隆数	阳性 克隆数	重复 克隆数	10 次以上 基元重复	设计 引物数	获得可扩 增引物数	获得多态 性引物数
磁珠富集法	52	36 (69.2%)	0 (0)	33 (70.2%)	28	17 (60.7%)	11 (39.3%)
5'锚定 PCR 法	92	90 (97.8%)	1 (1.1%)	54 (24.2%)	56	24 (42.9%)	19 (30.4%)

表 2 背瘤丽蚌微卫星引物特性及群体多样性指数 (磁珠富集法)

Table 2 Characterization of microsatellite primers form *Lamprotula lei* (magnetic beads hybridization method)

位点	引物序列 (5'-3')	重复序列	退火温度 $T_a(^{\circ}\text{C})$	片段大小 (bp)	等位基因 N_a	观测杂合度/ 期望杂合度 H_o/H_e	GenBank accession number
MP4	F: CAAATGCTCACATATACTCGTACCT R: AAGCATCTTCCAATATTTCTCTCACC	(GA) ₁₅	50	245-470	13	0.629/0.839 *	HQ444742
MP7	F: AGCTGGAGTAAAAATGAAACGTAATGT R: AGTATTTACACAATGTTTGTCTGTCC	(AG) ₁₅	51	160-190	4	0.600/0.575	HQ444743
MP15	F: TGATGAGGAGATGAAGTCGGTCAG R: GTAGACGGAAGGATGCCAAGAAGA	(CA) ₅	52	147-200	8	0.514/0.566	HQ444744
MP17	F: CCTAAATGAGGGTGTGCGAGTA R: CGGTTTCAATGGACCTAAACGAG	(CA) ₁₁	53	155-250	13	0.622/0.762	HQ444745
MP19	F: AACTGTGGTGTCCCAACGACCTCTT R: TTGTGGAATGTCATTGCCAGTGCTA	(GAT) ₁₀	53	220-285	11	0.618/0.830 *	HQ444746
MP42	F: TACAATCAATATCAAAACGGAACCTA R: TCGAGAAAAATCTGTTGTTATTATG	(CT) ₁₅	50	235-370	7	0.632/0.688	HQ444747
MP43	F: GTTTTGGCATAATCGGAAAGAGGGAC R: ACCTTATCACATTTACGCCGAAGCAC	(AG) ₁₈	53	215-262	6	0.738/0.604	HQ444748
MP44	F: GGTTTGGCATAATCGGAAAGAGGGAC R: CACCTTATCACATTTACGCCGAAGCAC	(ACAT) ₁₄	53	220-303	5	0.463/0.604 *	HQ444749
MP47	F: GCAGGAACTAGCATTTTCGGCA R: ACTCTGCCTCTGCACACACTGCA	(CT) ₁₀	53	125-147	4	0.674/0.672	HQ444750
MP51	F: AGTCACGAATCCCATTATGTCTCAT R: ATGTTCTTCTGATTCAAACCTGAG	(GT) ₅ (TG) ₁₂	51	160-182	4	0.205/0.687 *	HQ444751
MP55	F: GCAATGCCAATCCAGACATAACTAA R: TCTTCCAAAGTATCGAGATACGGGT	(TG) ₅ (GA) ₁₂	52	125-211	7	0.348/0.684 *	HQ444752

表 3 背瘤丽蚌微卫星引物特性及群体多样性指数 (5' 锚定 PCR 法)
Table 3 Characterization of microsatellite primers form *Lamprotula leai* (5' anchored PCR method)

位点	引物序列 (5'-3')	重复序列	退火温度 <i>T</i> _a (℃)	片段大小 (bp)	等位基因 <i>N</i> _a	观测杂合度 期望杂合度 <i>H</i> _o / <i>H</i> _e	GenBank accession number
AP02	F:GTGTGTGCGTGTCTGGTTTTG R:CACCCTGCATTCACTGTATGGT	(TG) ₆ TT(TG) ₅	50	350-400	8	0.520/0.784 *	HQ129919
AP05	F:TTCCAAGTCACACAGGTCTTGACAC R:TGTACAGAAAACGAGTTGATGCACA	(TG) ₇ C(GT) ₈	50	150-204	10	0.792/0.715	HQ129920
AP09	F:TGAGTATCTTGCTCTGATTTCTTGAAC R:ACAGCTTGACTAACATAACCATCATTC	(AT) ₅ (GA) ₆	45	150-250	6	0.440/0.723 *	HQ129921
AP10	F:CTTTCTCCCAAGGGCAAAT R:TCGGTCTCCGTAGAAAGCCT	(CT) ₆ ... (AG) ₅ ... (GA) ₁₅	48	180-212	8	0.208/0.431 *	HQ129922
AP23	F:KKVRVRVCTCTCTCTCTCT R:ATATGAGACATATCTAGGCACG	(AG) ₁₁	57	202-216	6	0.565/0.758 *	HQ129923
AP24	F:GTTATGAAAAACATCCCGCACTAG R:ATATTCAGCACTCATCTGCCGATA	(AC) ₁₇	51	190-230	7	0.583/0.804 *	HQ129924
AP28	F:KKVRVRVCTCTCTCTCTCT R:AACAACACTCAACAGCATTTCC	(TG) ₁₆ (AG) ₆	57	162-190	10	0.889/0.878	HQ129925
AP38	F:KKVRVRVCTCTCTCTCTCT R:TGATCGGCAAAATAAAACCTTGG	(TG) ₂₁ (AG) ₆	57	460-502	8	0.375/ 0.722 *	HQ129926
AP42	F:KKVRVRVCTCTCTCTCTCT R:AGCTGCTAACGTCTATGAAATG	(TG) ₂₀ ... (TG) ₆ ... (AG) ₆	57	190-214	3	0.542/0.439	HQ129927
AP44	F:KKVRVRVCTCTCTCTCTCT R:AAATGGCGATAAACCCATACAAC	(TG) ₅ C(GT) ₅ (GA) ₆	57	188-212	7	0.696/0.798	HQ129928
APSF2	F:KKVRVRVCTCTCTCTCTCT R:GACGATGCTATTTGTGATACTT	(GA) ₉ GC(GA) ₈ GG(GA) ₆	57	364-410	9	0.800/0.848	HQ412613
APSR12	F:KKVRVRVCTCTCTCTCTCT R:TGGTCGGTTTGACTTAACTTTT	(CT) ₁₂ CC (CGAT) ₇	57	120-140	6	0.800/0.824	HQ412614
APSF12	F:KKVRVRVCTCTCTCTCTCT R:GATCTCGACAATCATAGCAAAA	(TG) ₁₅ (AG) ₆	57	171-205	4	0.720/0.754	HQ412614
APS28	F:ATGGGCTAAACTCGATGAA R:GGTCGGTTCGACTTTGAAA	(AG) ₁₉	54	132-166	6	0.767/0.776	HQ412615
APS31	F:TCTGGACTIONATGAATGATGGTACA R:ACTTTAAACTCTCTGTCGGTTT	(AG) ₆ (GA) ₁₁	54	100-112	4	0.750/0.707	HQ412616
APS45	F:AGAAGGATGAGGAGGATAAAAGCC R:AACCGACCAACGAAAAGGGTAAAA	(CATA) ₈	54	234-276	9	0.893/0.875	HQ412617
APSF29	F:KKVRVRVCTCTCTCTCTCT R:CTGGACTIONATGAATGATGGTAA	(AG) ₁₇	57	214-278	10	0.894/0.896	HQ412618
APSF36	F:KKVRVRVCTCTCTCTCTCT R:ACATGCAATATGCAAAGTTCCA	(TG) ₇ (AG) ₆	57	242-272	8	0.862/0.860	HQ412619
APSR52	F:KKVRVRVCTCTCTCTCTCT R:ATTTCCGAGTTACCAGTAATCT	(CT) ₇ (CA) ₁₀	57	394-426	8	0.833/0.822	HQ412620

5 设计引物:根据磁珠富集法分离微卫星位点,选取合适序列设计引物 28 对,其中能得到清晰条带引物 17 对,最终筛选得到能够用于多态性分析的引物 11 对,GenBank 登陆号 (HQ444742 - HQ444752) (表 2),开发效率为 39.3%(表 1);根据 5'锚定 PCR 法分离微卫星位点,选取合适序列设计引物 56 对,扩增结果表明,具有清晰条带的引物为 24 对,多态性引物 19 对, GenBank 登 陆 号 (HQ129919 - HQ129928、HQ412613 - HQ412620)(表 3),开发效率为 30.4%(表 1)。

2.3 背瘤丽蚌养殖群体遗传多样性的微卫星分析

为了检验 2 种方法所筛选引物的实效性,选用

1 个养殖群体进行微卫星扩增,部分引物扩增结果见图 3。结果表明:磁珠富集法开发 11 对多态性引物扩增的等位基因数范围为 4 ~ 13,观测杂合度、期望杂合度范围分别为 0.205 ~ 0.738、0.566 ~ 0.839;5'锚定 PCR 法开发 19 对多态性引物扩增的等位基因数范围为 3 ~ 10,观测杂合度、期望杂合度范围分别为 0.208 ~ 0.894、0.431 ~ 0.896。结果表明,所筛选引物具有较高的多态性,可用于背瘤丽蚌的遗传多态性分析。另外,选用两种方法所开发的 18 对微卫星引物用于我国非常重要的淡水育种蚌-三角帆蚌的遗传多样性研究。其中 10 对在三角帆蚌群体中具有较高的多态性,说明所开发的微卫星

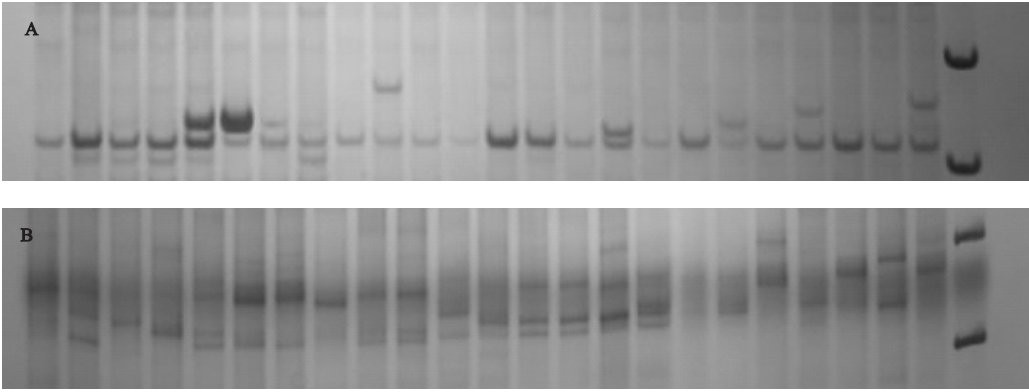


图 3 两种方法筛选背瘤丽蚌微卫星部分引物扩增结果
Fig.3 Amplification results of partial primers from *Lamprotula leai* with two methods
A,磁珠富集法;B,5'锚定 PCR 法。

引物质量较好,可用于淡水蚌的遗传多样性研究。

3 讨 论

3.1 两种方法开发微卫星 (SSR) 标记的一些关键性问题

磁珠富集法是基于选择性杂交富集的一种经典方法,已广泛应用于动物 (Yang *et al.*, 2008)、植物 (Hamilton & Fleischer, 1999)、微生物 (Cyril *et al.*, 2007) 微卫星位点分离研究当中。该方法的重点在于高质量微卫星文库的构建,高质量的文库是高效筛选多态性引物的一个重要前提。磁珠富集法通过富集建立微卫星文库以后还可以与放射性同位素标记的探针杂交,理论上可以使阳性克隆率达到 100%,形成高质量的文库 (赵莹莹等, 2006)。另外,操作过程中一些因素会影响筛选微卫星效率,最主要的影响因素是磁珠的平衡、洗液和洗涤温度的严格控制。磁珠用前需要用盐溶液反复平衡,根据经验,一般新鲜磁珠较容易平衡。而在 4℃ 存放时间较长的磁珠不易平衡。需要反复多次,直到磁珠顺滑;另一方面,洗液的配置及洗涤温度要严格控制,以达到清除不含微卫星序列片段的目的,同时,保护吸附的含有微卫星序列的片段不被洗脱,整个操作过程要轻,以达到最高的分离效率 (鲁翠云等, 2005)。本实验严格遵从磁珠富集法实验操作,杂交吸附完毕后,经过一次非特异性洗脱和三次特异性洗脱,保证富集微卫星目的片段最大化。

5'锚定 PCR 技术是一种基于 ISSR-PCR 的 SSR 分离策略,之前主要应用于植物微卫星开发的研究当中 (Charters *et al.*, 1996; 盛良明等, 2007; 贾小平

等, 2009), 在动物中的研究比较鲜见。用该方法分离出来的微卫星序列具有一定的特点: 它们理论上都是由两段相距较近, 且呈反向重复的微卫星与其中间部分的保守序列构成, 偶尔在中间部分的保守区也会出现各种类型的微卫星重复序列, 这种情况下 PCR 扩增的引物就是根据这段序列两段的保守区设计 (Fisher *et al.*, 1996)。但对于两端的重复序列, 目前的研究大致有两种处理方法: 1) 根据 Fisher 等 (1996) 和盛良明等 (2007) 的研究, 克隆得到的微卫星序列只需要根据中间保守区额外一个引物, 这个引物和之前的简并引物配合使用, 就可以用于多态性分析。由于 5' 端的旁侧序列缺乏特异性, 简并引物与模板结合时很可能在重复区发生滑动; 这种方法的优点在于可以节省一个引物的成本, 但是缺点是会出现单引物扩增的现象。Fisher 等 (1996) 采用降低 4 种脱氧核苷酸中 dCTP 浓度和增加放射性同位素标记的 [a-³²P] dCTP 以避免出现简并引物的单引物扩增, 但这无疑会增加优化 PCR 反应时的工作量因而减少引物筛选的效率。2) 同样是采用此法分离出微卫星位点, 部分学者 (Brachet *et al.*, 1998; Palma *et al.*, 2007) 在设计引物的时候将测序后得到的与简并引物互补配对的那 7 个碱基明确化, 并加上后面的部分微卫星重复序列成为一个引物, 再与根据保守区设计的引物一起用于多态性分析。这种方法得到的引物与磁珠富集法分离微卫星序列设计的引物一样, 通常能够较快捷并较好的扩增, 但是没有能够节约引物成本。本实验将特异引物和简并引物配合使用, 为避免优化 PCR 反应的工作量, 需设计大量的特异引物与简并引物相匹配。

3.2 两种方法分离微卫星位点、开发多态性标记的效率分析

实验中采用的两种方法,从分离的阳性克隆来看5'锚定PCR技术获得的阳性克隆比率高,操作更为简便。Panaud等(1996)认为,微卫星重复次数的多少与多态性之间不存在相关性;但另有学者(Weber & May, 1989; Johansson, 1992)认为微卫星重复次数与多态性之间存在正相关性,一般微卫星的核心序列重复数越高,其等位基因数也就越多,即多态性也就越高。如果以核心序列重复次数10次以上的设计引物,这对于筛选多态性信息含量高的分子标记是有利的(孙效文等, 2005),本实验用磁珠富集获得的占70.2%远高于5'锚定PCR法的24.2%,因此磁珠富集法富集的微卫星文库质量更高。与其他水产动物相比,贝类微卫星分离的报道较少,并且多态位点的筛选效率相对较低,需要设计大量的引物才能获得为数不多的多态标记(赵莹莹等, 2006; Evens *et al.*, 2006; Herbinger *et al.*, 2006);本次实验用磁珠富集法开发的微卫星效率为39.3%高于5'锚定PCR法的30.4%。除开物种的关系而导致的筛选效率低这一原因外,5'锚定PCR法开发微卫星标记效率较低的问题已有报道,马丽华等(2008)通过该方法开发谷子的微卫星标记开发效率为25.2%,低于Hirata等(2006)用富集文库法开发意大利黑麦微卫星标记效率65.8%。

就两种方法开发标记的相比较而言,本实验用磁珠富集法与5'锚定PCR法开发的多态性引物的成本相当,虽然5'锚定PCR法在建立文库步骤比磁珠富集法简便,但是这类方法由于只有一条特异引物,必然会影响到扩增的特异性,在成本相当的情况下,磁珠富集法筛选引物的效率较高,而且文库的质量也较高。所以在保证开发效率相当的前提下使用5'锚定PCR法就必须更多的挑选克隆测序、合成引物等,这无疑会增加开发成本。另外,从两种方法多态性引物在养殖群体中的遗传多样性分析来看,5'锚定PCR法所获得的引物遗传多样性指数略高。因此,相比于5'锚定PCR法而言,磁珠富集法所获得文库序列质量更高,开发效率高,而5'锚定PCR法操作更方便,所得引物遗传多样性指数更高。本实验用两种方法共开发30对背瘤丽蚌微卫星引物,可以为该物种以及近缘物种的遗传多样性分析、遗传图谱的构建等提高有价值的参考。

参考文献

- 贾小平, 王天宇, 黎裕, 等. 2009. 用锚定PCR技术筛选谷子微卫星文库的研究. 吉林农业大学学报, **31**(4): 364-367, 372.
- 凌高, 吴小平, 欧阳珊, 等. 2005. 背瘤丽蚌(*Lamprotula leai* Gray, 1835)的年龄与生长. 南昌大学学报(自然科学版), **29**(5): 497-499, 507.
- 鲁翠云, 孙效文, 曹洁, 等. 2005. 磁珠富集法筛选白鲢的微卫星分子标记. 农业生物技术学报, **13**(6): 772-776.
- 马丽华, 刁现民, 尚忠林. 2008. 应用5'锚定PCR开发谷子微卫星标记(硕士学位论文). 河北: 河北师范大学.
- 曲妮妮, 龚世园, 黄桂菊, 等. 2010. 基于FIASCO技术的合浦珠母贝微卫星标记分离与筛选研究. 热带海洋学报, **29**(1): 47-54.
- 盛良明, 薛华柏, 王化坤, 等. 2007. 利用5'锚定PCR技术分离枇杷微卫星标记. 江苏农业学报, **23**(1): 50-53.
- 孙效文, 鲁翠云, 梁利群. 2005. 磁珠富集法分离草鱼微卫星分子标记. 水产学报, **29**(4): 482-486.
- 汪桂玲, 苏翔, 李家乐, 等. 2011. 背角无齿蚌基因组(GT)_n微卫星DNA特征. 生态学杂志, **30**(1): 1-6.
- 闻海波, 顾若波, 徐钢春, 等. 2007. 两种淡水贝类的核型分析. 大连水产学院学报, **22**(1): 42-45.
- 张根芳, 许式见, 方爱萍. 2009. 背瘤丽蚌胚胎发育的初步研究. 动物学杂志, **44**(4): 96-101.
- 赵莹莹, 朱晓琛, 孙效文, 等. 2006. 磁珠富集法筛选虾夷扇贝微卫星序列. 中国水产科学, **13**(5): 749-755.
- 朱胜英, 张忱. 2000. 黄泥湖丽蚌资源调查初报. 安徽农业科学, **28**(1): 101-103.
- Brachet S, Jubier MF, Richard M, *et al.* 1998. Rapid identification of microsatellite loci using 5' anchored PCR in the common ash *Fraxinus excelsior*. *Molecular Ecology*, **8**: 160-163.
- Charters YM, Robertson A, Wilkinson MJ, *et al.* 1996. PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*) using 5' anchored simple sequence repeat (SSR) primers. *Theoretical and Applied Genetics*, **92**: 442-447.
- Creste S, Tulmann A, Figueira A. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, **19**: 299-306.
- Cyril D, Jerome E, Elisabeth F, *et al.* 2007. Challenges of microsatellite isolation in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, **44**: 933-949.
- Divu D, Khushiramani R, Malathi S, *et al.* 2008. Isolation, characterization and evaluation of microsatellite DNA markers in giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*, from South India. *Aquaculture*, **284**: 281-284.
- Evens BS, Knauer J, Taylor JU, *et al.* 2006. Development and characterization of six new microsatellite markers for the silver- or gold-lipped pear oyster, *Pinctada maxima* (Pteridae). *Molecular Ecology Notes*, **6**: 835-837.

- Fisher PJ, Gardner RC, Richardson TE. 1996. Single locus microsatellites isolated using 5' anchored PCR. *Nucleic Acids Research*, **24**: 4369–4371.
- Hamilton MB, Fleischer RC. 1999. Cloned microsatellite repeats differ between 4-base restriction endonucleases. *Journal of Heredity*, **90**: 561–563.
- Hayden MJ, Stephenson P, Logojan AM, *et al.* 2004. A new approach to extending the wheat marker pool by anchored PCR amplification of compound SSRs. *Theoretical and Applied Genetics*, **108**: 733–742.
- Herbinger CM, Smith CA, Langy S. 2006. Development and characterization of novel tetra- and dinucleotide microsatellite markers for the French Polynesia black-lipped pearl oyster, *Pinctada margaritifera*. *Molecular Ecology Notes*, **6**: 107–109.
- Hirata M, Cai HW, Inoue M, *et al.* 2006. Development of simple sequence repeat (SSR) markers and construction of an SSR-based linkage map in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). *Theoretical and Applied Genetics*, **113**: 270–279.
- Jia MJ, Li JL, Wang SL. 2010. Isolation and characterization of 18 polymorphic microsatellite loci from freshwater pearl mussel (*Cristaria plicata*). *Conservation Genetics*, **11**: 1131–1133.
- Johansson M, Ellegren H, Andersson L. 1992. Cloning and characterization of highly polymorphic porcine microsatellites. *Journal of Heredity*, **83**: 196–198.
- Kazuharu N, Akiyuki O, Kagayaki M, *et al.* 2011. A genetic linkage map of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) based on AFLP and microsatellite markers. *Aquaculture*, **310**: 329–342.
- Li JL, Wang GL, Bai ZY. 2009. Genetic variability in four wild and two farmed freshwater pearl mussel *Hyriopsis cumingii* from Poyang Lake in China estimated by microsatellites. *Aquaculture*, **287**: 286–291.
- Li JL, Wang GL, Bai ZY, *et al.* 2007. Ten polymorphic microsatellites from freshwater pearl mussel, *Hyriopsis cumingii*. *Molecular Ecology Notes*, **6**: 1357–1359.
- Liu F, Xia JH, Bai ZY, *et al.* 2009. High genetic diversity and substantial population differentiation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) revealed by microsatellite analysis. *Aquaculture*, **297**: 51–56.
- Palma C, Cavallari MM, Barbara T, *et al.* 2007. A set of polymorphic microsatellite loci for *Vriesea gigantea* and *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) and cross-amplification in other bromeliad species. *Molecular Ecology Notes*, **7**: 654–657.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd edition. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Press.
- Varghese JP, Rudolph B, Uzunova MI, *et al.* 2001. Use of 5' anchored primers for the enhanced recovery of specific microsatellite markers in *Brassica napus* L. *Theoretical and Applied Genetics*, **101**: 115–119.
- Weber JL, May PE. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, **44**: 388–396.
- Weber JL. 1990. Informativeness of human (dC-dA)_n · (dG-dT)_n polymorphism. *Genomics*, **44**: 388–396.
- Xu B, Li JL, Wang GL. 2011. Development and characterization of microsatellite loci in *Lamprotula leai*, with cross-amplification in *Hyriopsis cumingii*. *Conservation Genetics Resources*, **3**: 545–547.
- Yang C, Zhu XP, Sun XW. 2008. Development of microsatellite markers and their utilization in genetic diversity analysis of cultivated and wild populations of the mud carp (*Cirrhina molitorella*). *Journal of Genetics and Genomics*, **35**: 201–206.

作者简介 徐波,男,1985年生,硕士研究生,主要从事水产动物遗传育种等方面的研究。E-mail: lolo47@163.com
责任编辑 李凤芹
