

# 坛紫菜微卫星 DNA 序列的筛选

胡则辉, 周志刚, 严兴洪

(上海水产大学 农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 生命科学与技术学院, 上海 200090)

**摘要:** 自坛紫菜 (*Porphyra haitanensis*) 丝状体中提取的 DNA, 经 *Sau3AI* 限制性内切酶消化后, 将 300~900 bp 之间的 DNA 片段回收, 并连接到经 *Bam*HI 酶切并去磷酸化的 pUC18 载体上, 最后转化至大肠杆菌 JM109 感受态细胞中, 构建坛紫菜小片段 DNA 质粒文库。选用 pUC18 质粒的通用引物进行 PCR 反应, 对文库进一步筛选并检测插入片段的大小, 在 384 个阳性克隆中, 有 278 个含有大小合适的插入片段。经测序及序列分析, 在 103 个克隆中获得 172 个微卫星序列, 其中完美型 107 个, 占 62.2%, 非完美型 53 个, 占 30.8%。(GC)<sub>n</sub> 与 (CG)<sub>n</sub> 在坛紫菜 DNA 中非常丰富, 分别占 25% 及 17%, 但重复频率相对较低。

**关键词:** 坛紫菜 (*Porphyra haitanensis*); 微卫星; 筛选; 序列

中图分类号: Q813 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2006)01-0017-06

微卫星 (microsatellite) DNA 是 20 世纪 80 年代迅速发展起来的一种新的 DNA 标记工具, 由 1~5 个碱基对组成的简单重复序列 (Simple Sequence Repeats), 所以也常简称为 SSR。以双核苷酸重复最为常见, 如 (CA)<sub>n</sub>、(AT)<sub>n</sub> 等。微卫星 DNA 以广泛分布在真核生物基因组中, 具多态性高、符合孟德尔遗传模式、共显性表达等特点, 在遗传多样性分析、遗传图谱构建、亲缘关系鉴定、DNA 指纹图谱的构建、品种鉴定及分子辅助育种中已经得到了广泛的应用<sup>[1-6]</sup>。

至今自微藻及大型海藻如绿藻<sup>[7-9]</sup>、褐藻<sup>[10-15]</sup>、红藻<sup>[16-19]</sup>、甲藻<sup>[20]</sup>和硅藻<sup>[21, 22]</sup>等少数物种中已筛选出微卫星标记, 并将其应用于种质鉴定、种群遗传结构等方面<sup>[8, 11, 13, 19, 21]</sup>的分析。在红藻门中, 对江蓠 (*Gracilaria gracilis*) 微卫星 DNA 的研究较深入<sup>[16-19]</sup>, 但对中国具有重要经济价值的海藻养殖特有种——坛紫菜 (*Porphyra haitanensis* T. J. Chang et B. F. Zhang) 来说, 其微卫星标记目前还未见报道。因此, 为了更好地进行坛紫菜的种群遗传学、分子标记辅助育种等研究, 作者构建了坛紫菜小片段 DNA 质粒文库, 对重组克隆通过 PCR 法进行筛选, 测序并分析以获得坛紫菜微卫星 DNA, 为坛紫菜微卫星标记的

应用研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

坛紫菜丝状体取自上海水产大学藻类研究室。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、大肠杆菌 JM109 和质粒 pUC18 购自宝生物工程 (大连) 有限公司。细菌碱性磷酸酶 (BAP) 购自晶美生物工程有限公司。dNTPs 购自美国 Promega 公司。*Taq* DNA 聚合酶、ddH<sub>2</sub>O、矿物油和通用引物购自上海生工生物工程技术服务有限公司。质粒抽提纯化试剂盒是华舜生物工程有限公司的产品。

### 1.2 坛紫菜 DNA 质粒文库的构建

取坛紫菜丝状体提取 DNA<sup>[23]</sup>, 经 RNase 处理、

收稿日期: 2005-05-10; 修回日期: 2005-09-20

基金项目: 国家高技术研究发展计划资助项目 (2002AA603032)

作者简介: 胡则辉 (1978-), 男, 湖北襄樊人, 硕士研究生, 从事藻类生物技术研究, E-mail: zhhu@stmail.shfu.edu.cn; 周志刚, 通讯作者, 电话: 021-65710533, E-mail: zgzhou@shfu.edu.cn

内切酶 *Sau3AI* 消化后,利用 1.5%低熔点琼脂糖凝胶电泳分离,并采用冻融法回收与纯化 300~900 bp 之间的酶切片段<sup>[24]</sup>。同时将质粒 pUC18 用 *Bam*HI 完全酶切后经细菌碱性磷酸酶 (BAP) 去磷酸化 (按公司操作说明进行处理)。将去磷酸化处理的载体和小片段基因组 DNA 按摩尔比 1:3 的比例在 T4 DNA 连接酶反应体系中进行连接,然后转化至大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109 感受态细胞。将转化后的大肠杆菌涂布于添加 X-gal 的氨苄青霉素 LB 平板上,37 °C 培养过夜。用灭菌的牙签挑取白色菌落,接入无菌 96 孔细胞培养板,37 °C 震动培养过夜,加入 50% 甘油使其终浓度为 15%, -70 °C 低温保存备用<sup>[25]</sup>。

### 1.3 重组克隆的进一步筛选

从 96 孔细胞培养板中的每个克隆吸取 5~10  $\mu$ L 菌液,接种到 0.5~1 mL 的含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 °C,150 r/min 震动培养过夜,取 100  $\mu$ L 菌液于 12 000 r/min 离心 2 min,弃去上清,向沉淀中加入 40  $\mu$ L 5% Triton-X100 的水溶液,煮沸 5 min,冰上放置 5 min,离心(12 000 r/min,5 min),取 2  $\mu$ L 上清液作为模板 DNA,采用 pUC18 质粒的通用引物 (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3', 5'-CAGGAA-ACAGCTATGAC-3'),进行 PCR 反应以检测重组质粒是否含有插入片段以及插入片段的大小。12.5  $\mu$ L 的 PCR 反应体系含有:1.25  $\mu$ L 10 $\times$ PCR 缓冲液[100 mmol/L KCl, 80 mmol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0, NP-40], 1.5 mmol/L Mg<sup>2+</sup>, 120  $\mu$ mol/L dNTPs, 引物 480 nmol/L, 1U *Taq* DNA 聚合酶。PCR 反应程序为 95 °C 预变性 5 min 后进入循环体系,94 °C 变性 1 min,50 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,30 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min,4 °C 保存。PCR 反应结束后,利用 1.5%的琼脂糖凝胶对产物进行电泳分析。

### 1.4 阳性克隆的序列测定及结果分析

将经 PCR 检测具有 300~900 bp 大小插入片段的克隆送上海联合基因科技研究院进行 DNA 序列测定。利用网络在线软件 (<http://www.gramene.org/db/searches/ssrtool>) 对测序结果进行分析,找出序列中的微卫星 DNA,确定微卫星核心序列和两侧保守序列。

## 2 结果与讨论

### 2.1 微卫星 DNA 筛选方法

目前来看,多数微卫星的筛选是采用同位素标记的简单重复核苷酸探针筛选小片段基因组文库<sup>[7-10,12,14,15,18,20,22,28]</sup>,或者是根据载体上多克隆位点两侧的通用引物和人工合成的短串联重复序列 (STR) 引物组合,对部分 DNA 文库进行筛选<sup>[29,30]</sup>,利用质粒载体多克隆位点两侧的引物,对插入片段进行确认即可测序,这样不会由于漏筛而丢掉其他类型的微卫星序列<sup>[31]</sup>。作者借鉴第 3 种方法,利用 pUC18 质粒的通用引物,对插入片段进行检测,先确认后测序。

自坛紫菜丝状体提取的 DNA,经限制性内切酶处理后,将 300~900 bp 之间的酶切片段连接至 pUC18 质粒并转化至大肠杆菌 JM109 感受态细胞,从而构建了坛紫菜小片段部分 DNA 质粒文库。使用 pUC18 质粒的通用引物,对部分质粒文库进行 PCR 检测。在 384 个阳性克隆中,278 个含有大小在 300~900 bp 之间的坛紫菜 DNA 插入片段。

将筛选后的 278 个含有目的片段的阳性克隆进行序列测定,并通过网络在线软件分析其序列,其中具有微卫星序列的克隆有 199 个,占含目的片段阳性克隆的 71.6%,说明利用质粒载体多克隆位点两侧的引物对插入片段先进行确认以筛选生物物种微卫星的效率还是很高的。因 96 个克隆含有相同的微卫星序列,所以在合并后得到 103 个克隆含有不同的微卫星序列,占含目的片段阳性克隆的 37%。其中 57 个克隆含有 1 个微卫星序列,30 个克隆、13 个克隆、2 个克隆和 1 个克隆分别含有 2 个、3 个、8 个和 4 个微卫星序列,这样一共获得 172 个微卫星序列。部分克隆的微卫星核心序列及两侧序列参见表 1。

### 2.2 微卫星序列特征分析

根据 Webber 提出的分类标准<sup>[26]</sup>,在坛紫菜的这些微卫星核心序列中,完美型 107 个,占 62.2%;非完美型 53 个,占 30.8%;混合完美型及混合非完美型相对较少,分别只占 2.9%和 4.1% (表 2)。

在对这些微卫星序列分析过程中发现,(GC)<sub>n</sub> 与(CG)<sub>n</sub> 在坛紫菜 DNA 中含量非常丰富,分别占 25% 及 17% (表 3),但与水产动物<sup>[28-31]</sup>相比,其在核心序列中重复的次数相对较少,多数只有 3 次重复 (表 1)。Mizukami 等<sup>[27]</sup>发现条斑紫菜基因组中存在多次重复出现 G+C。在江蓠<sup>[18]</sup>的研究中也发现其微卫星

表 1 坛紫菜部分 DNA 微卫星的核心及两侧序列

Tab. 1 Repeat motifs and 5' - and 3' -flanking sequences of several microsatellites from *Porphyra haitanensis*

克隆	5' 旁侧序列	核 心 序 列	3' 旁侧序列	类 别
Clone 22	GTATACGATT	(AG) <sub>3</sub>	ACCAAATTAT	完美型
Clone 27	TTCAIGCTGC	(CG) <sub>3</sub>	AGCCGGTTCT	完美型
	CCGCTCTTCG	(GC) <sub>3</sub>	TTGTTTTCT	完美型
Clone 44	CTCAAATTGT	(TAAAA) <sub>2</sub>	CTGTTAACAA	完美型
	ACTGTTAACA	(AT) <sub>3</sub>	TTGTGAAACT	完美型
	ATGTCCGTTA	(AC) <sub>3</sub>	AGCGGTTTCG	完美型
Clone 97	ACGATGCAGC	(CG)T(CG) <sub>4</sub>	ATGTTGCCGT	非完美型
	TGATGTCCCA	(GC) <sub>3</sub> GA(GC) <sub>2</sub>	ATCGGCCATG	非完美型
Clone 99	ATGCCAGGAG	(TGA) <sub>3</sub>	AATGTTTACT	完美型
Clone 104	GCAGCTGGCA	(AC) <sub>3</sub>	GCTGGGTTCA	完美型
Clone 105	CTGAGCGGGA	(AG) <sub>3</sub> GAA(AG)G(T) <sub>4</sub> CC(T) <sub>4</sub>	CGGTAACGAC	混合非完美型
Clone 107	GATGTTCTAA	(CG) <sub>3</sub> CT(CG)	AGAATCCGAA	非完美型
Clone 113	CACGGGCTTA	(CG) <sub>3</sub> CTC(CG)(A) <sub>4</sub>	CATATGCGGT	混合非完美型
Clone 119	Incomplete	(CG) <sub>3</sub>	CACCCATTTT	完美型
	ACCTGTTTCAG	(GC) <sub>3</sub>	CCCACAGGCT	完美型
	ACCATAACCA	(GT) <sub>3</sub>	TTAGCAGCGT	完美型
	TGGTACTCCG	(GC) <sub>3</sub> GTC(GC)	CTCCATGGCG	非完美型
	TCGCGATGGT	(CA)TG(CA) <sub>3</sub>	GTGTCGAATG	非完美型
	GCTTTCTTCG	(GA) <sub>3</sub>	GCATGTTCTC	完美型
	AGCATGTTCT	(CG) <sub>3</sub>	CCAGCGATGC	完美型
	CGCACGGTTA	(CGG) <sub>3</sub>	TATGGGCTGC	完美型
	Clone 130	GTCGCATGGC	(CG)C(CG)AGA(CG) <sub>3</sub>	GTATGGGTCC
CGCCCCACTA		(CG) <sub>3</sub>	CTTTCATGTC	完美型
Clone 149	GGCCGCCCTC	(CG) <sub>4</sub>	AGGCCATCGT	完美型
	TTACCAGGAA	(AC) <sub>3</sub> T(AC)	CCAAGACTTG	非完美型
Clone 150	GATGCGGTCA	(GC)A(GC) <sub>3</sub>	GGACGCGGGC	非完美型
	CGAACTCTGT	(CG)GCA(CG) <sub>3</sub>	GATACGCGTT	非完美型
	CAGAACTCTC	(AG) <sub>3</sub>	AAATACTCAG	完美型
Clone 182	TTCCAAAGAT	(AC) <sub>3</sub> G(T) <sub>4</sub> GA(AC)	CTGATTCAG	非完美型
	TTCTACGTGG	(GGC) <sub>3</sub>	GAAAGTGATT	完美型
Clone 199	CCCTGCTCGA	(GC) <sub>3</sub>	CTCCCGGAAA	完美型
	CTTACTTTTC	(TGA) <sub>3</sub>	AAGTCTGCCG	完美型
	GCTAGGCTAA	(AC) <sub>3</sub>	TATTTACGCG	完美型
Clone 207	GCAATCAACC	(CG)C(CG) <sub>3</sub>	CACTGAGCCA	非完美型
	GGGCATGCCT	(CG) <sub>3</sub>	CTGCTCATCG	完美型

(表 1 续)

克隆	5 旁侧序列	核 心 序 列	3 旁侧序列	类 别
Clone 224	GCGTAGGAC	(CG) <sub>3</sub>	AGGGACGGCC	完美型
	GTCTGCTGGG	(CA) <sub>3</sub>	CTGCGGTCGT	完美型
	CCCGTTTTCA	(AG) <sub>3</sub>	TCTACATCAC	完美型
Clone 227	TCCATTGTGA	(AT) <sub>3</sub>	ACAGCTATGG	完美型
Clone 228	TGAGGATGGC	(CG)C(CG) <sub>3</sub>	CAAGGCGAGT	非完美型
	GAGGCCTGTC	(CG) <sub>3</sub>	CTGTCAGCAA	完美型
	ATTGCCTTCG	(GC) <sub>3</sub> AAA(GC)	TTTGAGCAGG	非完美型
	AAACAGCTTT	(CG) <sub>3</sub>	GCACCGGCGT	完美型
Clone 247	GCCGCTGTTC	(CG) <sub>3</sub> CC(CG)	ACCTTGGAAC	非完美型
Clone 327	TGAAAGAGCA	(CG)ATG(CG)GTG(CG) <sub>2</sub> A(CG) <sub>2</sub> C(TCG) <sub>3</sub>	GCATTCCGGA	混合非完美型
Clone 361	TGGAAGAGAT	(GC) <sub>3</sub>	CAGCAATGCC	完美型
	CTCTCGCAAT	(CG) <sub>3</sub>	ATGAAATCAA	完美型
Clone 367	TTGGCACCTT	(GA) <sub>3</sub>	GGCCACTTCG	完美型
	GATGCCGTCG	(AC) <sub>3</sub>	TGGCCGTAAT	完美型
Clone 370	GCCGACGATA	(GC)CG(GC) <sub>3</sub> C(GC)CGG(GC) <sub>3</sub> C(GC)	TGTCGTCAAT	非完美型
	ACGTCTAAGT	(AC) <sub>3</sub>	TGGCGTCGAA	完美型
Clone 377	AAGGTTTATT	(AC) <sub>3</sub>	ATCATTGTTT	完美型

序列含有多次重复的(GC)<sub>n</sub>。由此可以推测(GC)<sub>n</sub>可能是红藻门普遍存在的微卫星序列,而与其他藻类的微卫星序列<sup>[7-10, 12, 14, 15, 18, 20, 22]</sup>相比, (CG)<sub>n</sub>可能是紫菜属普遍存在的微卫星序列,当然这种推测还需要进一步通过积累不同物种的大量微卫星数据来证实。

获得了坛紫菜的微卫星,就可以利用这些微卫星的两侧序列设计引物,来分析坛紫菜种群遗传结构和遗传多样性,为进一步开展坛紫菜优良种质鉴定、分子标记辅助育种的研究,提供新的快速选择途径。

表 2 坛紫菜不同类型的微卫星所占百分比

Tab. 2 Percentage of different types of microsatellites from

<i>Porphyra haitanensis</i>		
微卫星类型	数目	百分比
完美型	107	62.2
非完美形	53	30.8
混合完美型	5	2.9
混合非完美型	7	4.1

表 3 坛紫菜微卫星重复序列的出现频率与百分比

Tab. 3 Occurrence frequency and percentage of repeat sequence of microsatellites from *Porphyra haitanensis*

重复序列	频 率	百分比	重复序列	频 率	百分比	重复序列	频 率	百分比
AC	8	4.55	ACG	1	0.57	TCT	1	0.57
AG	4	2.27	CAT	2	1.14	TGA	1	0.57
AT	6	3.41	CCT	1	0.57	TAA	1	0.57
CT	4	2.27	CGC	3	1.70	TTG	1	0.57
GA	9	5.11	CGG	3	1.70	TCG	1	0.57

(表 3 续)

重复序列	频 率	百分比	重复序列	频 率	百分比	重复序列	频 率	百分比
GC	44	25.00	AAT	2	1.14	TGC	1	0.57
GT	6	3.41	GAA	1	0.57	CAA	1	0.57
TC	8	4.55	GAC	2	1.14	TGGA	1	0.57
CA	7	3.98	GAG	1	0.57	CGGG	1	0.57
TA	7	3.98	GGC	3	1.70	ATACG	1	0.57
TG	5	2.84	GGT	1	0.57	GATTG	1	0.57
CG	30	17.05	GTT	1	0.57	GTCTG	1	0.57
CGT	1	0.57	TCA	1	0.57	TAAAA	1	0.57
AAG	1	0.57	TCC	1	0.57	总计	176	

参考文献:

- [1] Litt M, Luty J A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene [J]. **Am J Human Genet**, 1989, 44: 397-401 .
- [2] Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers [J]. **Nucl Acids Res**, 1989, 17: 6 463-6 471 .
- [3] Weber J L, May P E. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction [J]. **Am J Human Genet**, 1989, 44: 388-396 .
- [4] Schuler G D, Boguski M S, Stewart E A, *et al.* A gene map of the human genome [J]. **Science**, 1996, 274: 540-546 .
- [5] Knapik E W, Goodman A, Ekker M, *et al.* A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*) [J]. **Nat Genet**, 1998, 18: 338-343 .
- [6] Jarne P, Lagoda P J L. Microsatellites, from molecules to populations and back [J]. **Trends Ecol Evol**, 1996, 11: 424-429 .
- [7] Van der Strate H J, Olsen J L, Van de Zande L, *et al.* Isolation and characterization of microsatellite loci in the benthic seaweed, *Cladophoropsis membranacea* (Cladophorales, Chlorophyta) [J]. **Mol Ecol**, 2000, 9: 1 442-1 443 .
- [8] van der Strate H J, van de Zande L, Stam W T, *et al.* Within-island differentiation and between-island homogeneity: non-equilibrium population structure in the seaweed *Cladophoropsis membranacea* (Chlorophyta) in the Canary Islands [J]. **Eur J Phycol**, 2003, 38: 15-23 .
- [9] Alstrom-Rapaport C, Leskinen E. Development of microsatellite markers in the green algae *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) [J]. **Mol Ecol Notes**, 2002, 2: 581-583 .
- [10] Olsen J L, Sadowski G, Stam W T, *et al.* Characterization of microsatellite loci in the marine seaweed *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae; Fucales) [J]. **Mol Ecol Notes**, 2002, 2: 33-34 .
- [11] Kusumo H T, Pfister C A, Wootton J T. Dominant (AFLP) and co-dominant (microsatellite) markers for the kelp *Postelsia palmaeformis* (Laminariales) [J]. **Mol Ecol Notes**, 2004, 4: 372-375 .
- [12] Billot C, Rousvoal S, Estoup A, *et al.* Isolation and characterization of microsatellite markers in the nuclear genome of the brown alga *Laminaria digitata* (Phaeophyceae) [J]. **Mol Ecol**, 1998, 7: 1 778-1 780 .
- [13] Billot C, Engel C R, Rousvoal S, *et al.* Current patterns, habitat discontinuities and population genetic structure: the case of the kelp *Laminaria digitata* in the English Channel [J]. **Mar Ecol Prog Ser**, 2003, 253: 111-121 .
- [14] Engel C R, Brawley S H, Edwards K J, *et al.* Isolation and cross-species amplification of microsatellite loci from the fucoid seaweeds *Fucus vesiculosus*, *F. serratus* and *Ascophyllum nodosum* (Heterokontophyta, Fucaceae) [J]. **Mol Ecol Notes**, 2003, 3: 180-182 .
- [15] Coyer J A, Veldsink J H, Jones K, *et al.* Characterization of microsatellite loci in the marine seaweeds, *Fucus serratus* and *F. evanescens* (Heterokontophyta; Fucaceae) [J]. **Mol Ecol Notes**, 2002, 2: 35-37 .
- [16] Engel C R, Valero M, Lagadeuc Y, *et al.* Non-random mating in controlled multiple-donor crosses in *Gracilaria gracilis* (Gracilariaceae, Rhodophyta) [J]. **Eur J Phycol**, 2002, 37: 179-190 .
- [17] Engel C R, Wattier R, Destombe C, *et al.* Performance of non-motile male gametes in the sea: Analysis of paternity and fertilization success in a natural population of a red seaweed, *Gracilaria gracilis* [J]. **Proc R Soc Biol Sci Ser B**, 1999, 266: 1 879-1 886 .
- [18] Luo H, Moerchen M, Engel C R, *et al.* Characterization of microsatellite markers in the red alga *Gracilaria gracilis* [J].

- Mol Ecol*, 1999, 8: 700-702 .
- [19] Wattier R, Dallas J F, Destombe C, *et al.* Single locus microsatellites in Gracilariales (Rhodophyta): high level of genetic variability within *Gracilaria gracilis* and conservation in related species [J]. *J Phycol*, 1997, 33: 868-880 .
- [20] Nagai S, Lian C, Hamaguchi M, *et al.* Development of microsatellite markers in the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) [J]. *Mol Ecol Notes*, 2004, 4: 83-85 .
- [21] Rynearson T A, Armbrust E V. DNA fingerprinting reveals extensive genetic diversity in a field population of the centric diatom *Ditylum brightwellii* [J]. *Limnol Oceanogr*, 2000, 45: 1 329-1 340 .
- [22] Evans K M, Bates S S, Medlin L K, *et al.* Microsatellite markers development and genetic variation in the toxic marine diatom *Pseudo-nitzschia multiseries* (Bacillariophyceae) [J]. *J Phycol*, 2004, 40: 911-920 .
- [23] 石金锋, 贾建航, 王 萍, 等. 紫菜无性系特异分子标记的获得 [J]. 高技术通讯, 2000, 10(10): 1-3 .
- [24] 盛小禹. 基因工程实验技术教程 [M]. 上海: 复旦大学出版社, 1999.69-70 .
- [25] Clark M S. 植物分子生物学——实验手册 [M]. 顾红雅, 瞿礼嘉. 北京: 高等教育出版社, 1998.63-72 .
- [26] Webber J L. Informativeness of human (dC-dT)<sub>n</sub> polymerphism [J]. *Genomics*, 1990, 7: 524-530 .
- [27] Mizukami Y, Kito H, Kunimoto M, *et al.* Cloning and characterization of G+C-rich, highly repeated DNA sequences from *Porphyra yezoensis* (laver), Rhodophyta [J]. *J Appl Phycol*, 2000, 12: 131-138 .
- [28] 魏东旺, 楼允东, 孙效文, 等. 鲤鱼微卫星分子标记的筛选 [J]. 动物学研究, 2001, 22: 238-241 .
- [29] 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: 255-259 .
- [30] 李 霞, 白俊杰, 吴淑勤, 等. 剑尾鱼微卫星 DNA 的筛选 [J]. 中国水产科学, 2004, 11: 196-201 .
- [31] 刘 萍, 孟宪红, 孔杰, 等. 中国对虾部分基因组文库构建和微卫星序列的筛选 [J]. 高技术通讯, 2004, 14(2): 87-90 .

## Isolation of microsatellite DNA in *Porphyra haitanensis*

HU Ze-hui, ZHOU Zhi-gang, YAN Xing-hong

(Key Laboratory of Genetic Resources and Ecology in Aquaculture, the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University; College of Aqua-Life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Received: May, 10, 2005

**Key words:** *Porphyra haitanensis*; microsatellite; screening; sequence

**Abstract:** DNA fragments isolated from *Porphyra haitanensis* between 300 bp and 900 bp were recovered after treatment with restriction endonuclease of *Sau3AI*, and then were recombined to vector of pUC18 previously digested by *BamHI* and dephosphorylated. The partial DNA libraries were constructed after transmitting these recombinant vectors into *Escherichia coli* JM109 competent cells. Polymerase chain reactions with the general primers of pUC18 vector were used to examine whether there was target DNA inserted in the libraries or not and to detect the size of inserted DNA fragments. There were 278 clones containing suitable size of target DNA in 384 tested clones. One hundred and seventy-two microsatellites were screened from 103 clones after the analysis of sequence of the 278 clones. The perfect and imperfect microsatellites were 107 and 53, respectively, which accounted for 62.2% and 30.8%. The microsatellites of *P. haitanensis* were characterized as the higher abundance of (GC)<sub>n</sub> and (CG)<sub>n</sub>, which accounted for 25% and 17%, respectively, but the relatively lower repeat frequency.

( 本文编辑: 张培新 )