

基于 SAMPL 的一种微卫星筛选方法在中国明对虾中的尝试

张留所^{1,2,3}, 孔晓瑜², 喻子牛², 孔杰⁴, 相建海¹

(1. 中国科学院海洋研究所, 实验海洋生物学重点实验室, 山东青岛 266071; 2. 中国海洋大学教育部海水养殖重点实验室, 山东青岛 266003; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100039; 4. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东青岛 266071)

摘要:微卫星的发展主要受限于微卫星及其旁侧特异引物区的分离, 在中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 中建立了选择性扩增多态微卫星位点 (SAMPL, selective amplified microsatellite polymorphic loci) 技术体系, 并初步尝试了基于 SAMPL 的一种微卫星筛选方法。通过 5 端锚定引物引入微卫星序列, 对传统 SAMPL 技术加以改进并以期富集简单重复序列。从测序胶上随机选择 5 条 SAMPL 条带 (分别命名为 S11, S13, S14, S22, S24) 克隆测序, 大小分别为 161, 157, 147, 152, 298。其中 S11, S13, S14, S22 四个片段两端引物分别为 AFLP 选择性引物和 SAMPL 引物, S13 和 S22 含微卫星序列重复, S24 两端引物均为传统的 AFLP 引物, 在此片段中有一 (AG)₃₉ 重复。

关键词:选择性扩增多态微卫星位点 (SAMPL); 中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*); 微卫星

中图分类号: Q31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096 (2006) 02-0001-04

微卫星 (microsatellite, MS) 又称简单序列重复 (simple sequence repeat, SSR), 是 1~6 个核苷酸重复序列。作为具有共显性、数量丰富、广泛分布于基因组并符合孟德尔遗传等特点的高信息度分子标记, 十几年来广泛应用于生命科学研究的多个领域。微卫星发展的主要环节受限于微卫星及其旁侧特异引物区的分离, 分离主要有两种途径: 一种是对基因组 DNA 进行限制性酶切, 适宜片段与载体连接, 建立部分 DNA 文库, 用 Southern 杂交或 PCR 方法筛选出含微卫星序列的阳性克隆, 一种是从已知的核酸序列中进行检索。前者筛选过程较复杂, 筛选效率较低, 需要大量的资金投入; 后者资源相对有限, 对大多研究目标没有足够信息可供参考。对虾分子遗传研究落后于陆生动植物, 大多还处于寻找合适分子标记为遗传结构分析、图谱构建等工作打基础的初级阶段。对虾中微卫星标记的筛选已有报道, 但主要集中于斑节对虾、凡纳滨对虾, 微卫星数量有限^[1,2]。中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 的微卫星筛选起步较晚, 所获微卫星标记较少^[3~8]。由于生态环境恶化, 疾病流行给水产养殖造成的巨大经济损失使一些水产经济动物的遗传改良显得尤为迫切, 筛选大量的高效、多态、共显性标记是进行连锁图谱构建、QTL 定位基因、分子标记辅助选择的基础。选择性扩增多态微卫星位点 (SAMPL, selective amplified microsatellite polymorphic loci) 技术^[9] 是

AFLP^[10] 技术的延伸, 在不需克隆、设计特异引物情况下, 可用来扩增微卫星序列, SAMPL 技术作为结合了 AFLP 和微卫星两者优点的分子标记已应用于植物遗传多样性分析、连锁图谱构建等领域^[11,12], 在动物中还未见应用。作者在中国明对虾中建立 SAMPL 技术以用于对虾遗传学研究, 同时基于 SAMPL 发展微卫星标记在中国明对虾中进行了初步尝试以期找到一种快速、简单的微卫星筛选方法。

1 材料和方法

1.1 材料

中国明对虾购于青岛南山市场, 放入充氧袋内, 迅速置于 -70℃ 冰箱内备用。

1.2 方法

1.2.1 模板 DNA 的制备

收稿日期: 2004-10-15; 修回日期: 2005-03-28

基金项目: 国家 863 计划 (2001AA620105); 国家自然科学基金重点课题 (30230280); 海水养殖教育部重点实验室基金
作者简介: 张留所 (1975-), 男, 河北衡水人, 博士生, 主要从事海洋动物分子遗传学研究, E-mail: liusuozhang@126.com; 喻子牛, 通讯作者, 男, 教授, 主要从事海洋动物分子遗传学研究, E-mail: carlzyu@ouc.edu.cn

中国明对虾基因组 DNA (100 ng) 在 40 μL 体系中用 *EcoR* 和 *Mse* 消化 1.5 h, 接着加入 10 μL 混合液 (含有 50 pmol *EcoR* 接头、50 pmol *Mse* 接头、1U *T₄* DNA 连接酶、10 mmol/L ATP 1 μL), 于 37 °C 温育 3 h, 65 °C 20 min, 贮于 -20 °C 备用。

1.2.2 改进的 SAMPL 分析

取上述酶液 5 μL 作为模板, 20 μL 反应体系进行预扩增, 引物序列见表 1, 反应程序 94 °C 2 min, 25 个循环包括 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 45 s。0.8% 琼脂糖胶电泳检测, 取 5 μL PCR 产物稀释于 95 μL TE 液中用作选择性扩增的模板。选择性扩增 PCR 反应体系与预扩增相同。引物采用 *EcoR* + ANN 和改进的 SAMPL 引物 (引物序列见表 1), 反应程序采用 Touch-down 方式, 94 °C 2 min, 接着 94 °C 30 s, 65 °C 30 s, 72 °C 45 s, 下面每个循环退火温度降低 0.7 °C, 12 个循环。之后退火温度 56 °C 23 个循环, 最后 72 °C 延伸 5 min。向选择性扩增 PCR 产物中加入等体积的点样液 (98% 甲酰胺, 10 mmol/L EDTA pH 8.0, 0.25% 溴酚蓝和 0.25% 二甲苯酚 FF), 6% PAGE 胶 (7 mol/L 尿素、每 100 mL 胶中加入 500 μL 10% APS 和 100 μL TEMED), 用 1 × TBE Buffer 在测序胶系统 (BioRad, 38 cm × 50 cm) 进行电泳, 恒功率 60 W, 4 h。后银染显示条带。

1.2.3 选择片段测序

S11

GACTGCGTACCAATTCAAGCAAATGTCAGTCTGGAGCTTATTCATGGAGGTCAGCTCTAA
TATCTGCTCACCACCGGGCTCCCAGGACTACCTTTCTCGTCTGTGTTGCTTTTGTTACGTGT
CATTTTAGCTTATTAGAGAGAGAGATCCCCC

S13

GACTGCGTACCAATTCAGTAAAGCAATTGACCAGAATAGGGGCTATTGTAACGAAATGAAGA
AATGTTTTCTTTAAGTGGAGTATATGTGTATGTGTGTATGCATGTGTGTACTACTATAGA
AATGAGAGGGATCGAGAGAGAGACGCTTAA

S14

GACTGCGTACCAATTCAAGGACGGTATAGTGCACCGCAGCAAGAGCTACCCGAGGCAAACAG
TTTTCCGTGAAGGATCTCTGGCTTACTGCTAGAAATACCCCTGCTTGAGGGTATTCTAGTGAATT
GCGAGAGAGAGACCTCCCC

S22

GTGGCGACTCTCTCTCTCTGCTCCCGCTCTGTCCCTGCTCTCATCGTTCTGCTCTTTCCCTT
ATTCTCTCGCATTTTTTCGGACGTTTTCTTTGTTCTCCAGGTCTCTCTCTGAATAAACTCCA
CTCCCTGAATTGGTACGCAGTC

S24

GACTGCGTACCAATTCAAGAGGACAAGGAGATAGATCGATAGATAAATAGATAGACAGACAG
AGCGAGAGAAAGATATATAGAGCGTGAGAGGAAAC**AGAT**
GAT
TACGTTGTCCCTTGGTATTGACCATCCAAAAGTTCAAGGTTAAACGGCTAGCTCAAGTCCGAG
CCACCGGATCTCGATCAGTAAGCTGCTTCGACCTTTGCTTGAATTGGTACGCAGTC

随机选择 5 条 SAMPL 条带 (分别命名为 S11, S13, S14, S22, S24, 相应引物对见表 2), 从银染后自然干燥的 PAGE 胶上切下相应条带, 置于盛有 100 μL 超纯水的离心管中, 4 °C 过夜, 100 °C 水浴 15 min, 取 5 μL 为模板, 以相应 SAMPL 的选择性 PCR 相同的体系和程序扩增, 用 UNIQ-5 柱式 PCR 产物回收试剂盒纯化 PCR 产物, 将产物与 PMD18-T 载体连接 (大连宝生物); 16 °C 连接 1 h 或 4 °C 过夜, 然后连接液转化感受态大肠杆菌 JM109, 涂平板, 蓝-白斑筛选阳性克隆, Pharmacia EasyPrep Kit 提纯质粒, 插入片段经 *EcoR* 和 *Hind* 酶切检测或 PCR 检测, 阳性克隆在 ABI PRISM 377XL DNA 测序仪上测序。

2 结果

测序后的 SAMPL 的片段 (S11, S13, S14, S22, S24) 大小分别为 161, 157, 147, 152, 298 bp。其中 S11, S13, S14, S22 四个片段 (Genebank 登录号分别为 CC325081, CC326084, CC326085, CC326086, 序列见图 1) 两端引物分别为 AFLP 选择性引物和 SAMPL 引物, S13 和 S22 含微卫星重复序列; S24 (Genebank 登录号为 AY389512, 序列见图 1) 两端引物均为传统的 AFLP 引物, 在此测序片断中有一 (AG)₃₉ 重复。作者正进一步设计微卫星引物并在中国明对虾群体中检测。

图 1 SAMPL 片段序列

Fig. 1 Sequences of SAMPL bands

黑体部分为微卫星序列

bold-faces are microsatellite sequences

表 1 SAMPL 引物序列

Tab. 1 SAMPL primer sequences

引物	序列
E-A	5 - GAC TGC GTA CCA ATT CA-3
M-C	5 - GAT GAG TCC TGA GTA AC-3
E-AAAG	5 - GAC TGC GTA CCA ATT CAA G-3
SAM01	5 - (G' T) (G' T) (A/ G' C) (A/ G) (A/ G' C) (A/ G) (A/ G' C) (CT) ₆₋₃
SAM02	5 - (G' T) (G' T) (A/ G) (A/ G' C) (A/ G) (A/ G' C) (A/ G) (TC) ₆₋₃

表 2 测序条带及其来源

Tab. 2 Sequencing bands and corresponding primers

条带	引物对
S11	E AAG, SAM02
S13	E AAG, SAM02
S14	E AAG, SAM02
S22	E AAG, SAM01
S24	E AAG, SAM01

3 讨论

SAMPL 的基本原理同 AFLP 相似,区别在于选择性扩增时,SAMPL 采用与 AFLP 相同的一个引物,另一个引物则为富含重复序列的片段(SAMPL 引物),最初 SAMPL 引物的设计主要基于许多谷物、大豆中的微卫星以不同重复相邻出现,因此所设计引物与复杂重复的连接部互补^[11]。上述复杂重复是否广泛分布于其他物种基因组,还未见报道。鉴于此,本实验采用了 Fisher^[13]发展的 5 锚定微卫星引物代替普通的 SAMPL 引物,如作者所用 Fisher 引物 PCT₆ 序列为 KKVRVRV(CT)₆,其中 K = G/T, V = G/C/A, R = G/A, 5 端的 7 个核苷酸形成了一个锚(anchor),由于 G 通常可与 C 或 T 配对, T 通常可与 A 或 G 配对,从设计上 5 两个核苷酸可与任何核苷酸配对,紧接着的 5 个核苷酸从设计上不与 AG 重复配对,同时又尽量简并,可以看出 V(G, A 或 C)将与除 A 外所有核苷酸配对, R(G 或 A)将不与 G 配对。Fisher 引物克服了 PCR 过程中普通引物很难锚定在基因组微卫星序列的 5 端,而很容易向微卫星序列的 3 端滑动的缺点。对文中所用 SAMPL 引物,理论上讲若 5 锚发挥了作用,则可扩出基因组相应区域

微卫星的完整序列,这正是我们所期望的;否则就不能扩出完整的微卫星序列并造成长度多态的降低或丢失。理论上讲,通过改进的 SAMPL 所得到的扩增片段中将富含微卫星序列,回收扩增片段测序后可得到微卫星 3 旁侧序列,这样以 3 旁侧序列为一引物,5 锚定引物为一引物就可特异扩增微卫星序列,作者就是基于这一思路而尝试在中国明对虾中发展微卫星标记的。

在随机克隆的 SAMPL 片段中, S11, S13, S14, S22 四个片段两端分别为 AFLP 选择性引物和 SAMPL 引物,而 S24 两端均为传统的 AFLP 引物。SAMPL 技术大多用放射性同位素标记^[11,12],且仅对 SAMPL 引物进行标记,至今还未有 SAMPL 反应中出现仅含传统 AFLP 引物的报道。理论上讲 SAMPL 反应中应出现 3 种片段(SAMPL-AFLP, SAMPL-SAMPL, AFLP-AFLP),哪些类型片段在 PCR 扩增中占优势主要与相应引物的退火温度及二级结构相关。通过测序结果来看,大多扩增片段为 SAMPL-AFLP 型。实验所得微卫星均分布于基因片段中间,并未如期紧接 SAMPL 引物后出现,所选 Fisher 引物未能发挥应有的锚定作用,原因可能与所测片段数量较少及 PCR 扩增滑动有关。所测 5 个片段中有 3 个含微卫星序列,暗示中国明对虾中微卫星含量相当高,刘萍等^[6]直接对部分中国明对虾基因组文库测序获取了较高比例微卫星序列,斑节对虾也有基因组 DNA 直接测序成功获取微卫星的报道^[14]。作者选取微卫星方法作为一种尝试,虽然找到了微卫星序列,但并未达到预期目的,方法是否适于中国明对虾大规模微卫星筛选还需进一步探讨:(1) 增加测序片段数量;(2) 尝试其他的重复序列。

参考文献:

- [1] Wuthisuthimethavee S, Lumubol P, Vanavichit A, et al. Development of microsatellite markers in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) [J]. *Aquaculture*, 2003, 224:39-50.
- [2] Meehan D, Xu Z, Zuniga G, et al. High frequency and large number of polymorphic microsatellites in cultured shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* [Crustacea: Decapoda] [J]. *Mar Biotech*, 2003, 5: 311-330.
- [3] 徐鹏,周岭华,相建海.用 PCR 法快速筛选中国对虾含微卫星的重组阳性克隆[J]. *水产学报*, 2001, 25: 127-130.
- [4] 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.

- [5] 徐 鹏,周岭华,田丽萍,等.从中国对虾 ESTs 中筛选微卫星标记的研究[J].水产学报,2003,27:213-218.
- [6] 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 DNA 序列的筛选[J].高技术通讯,2004,14:87-90.
- [7] 刘 萍,孟宪红,孔 杰,等.中国对虾微卫星 DNA 多态性分析[J].自然科学进展,2004,14:333-338.
- [8] 刘 萍,孟宪红,何玉英,等.中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)黄、渤海 3 个野生地理群遗传多样性的微卫星 DNA 分析[J].海洋与湖沼,2004,35:252-257.
- [9] Morgante M, Vogel J. Compound microsatellite primers for detection of genetic polymorphism[P]. USA: 08/326456,1994.
- [10] Vos P, Hongers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. *Nucl Aci Res*, 1995,23:4 407-4 414.
- [11] Witsenboer H, Vogel J, Michelmore R W. Identification, genetic localization, and allelic diversity of selectively amplified microsatellite polymorphic loci in lettuce and wild relatives (*Lactuca* spp.) [J]. *Genome*, 1997,40:923-936.
- [12] Roy J K, Balyan H S, Prasad M, et al. Use of SAMPL for a study of DNA polymorphism, genetic diversity and possible gene tagging in bread wheat [J]. *Theor Appl Genet*, 2002, 104:465-472.
- [13] Fisher P J, Gardner R C, Richardson T E. Single locus microsatellites isolated using 5 anchored PCR[J]. *Nuc Aci Res*, 1996,24:4 369-4 371.
- [14] Xu Z, Dhar A K, Wyrzykowski J, et al. Identification of abundant and informative microsatellites from shrimp (*Penaeus monodon*) genome[J]. *Anim Genet*, 1999,30:150-156.

Preliminary isolation of microsatellite based on SAMPL technique in shrimp *Fenneropenaeus chinensis*

ZHANG Liu-suo^{1,2,3}, KONG Xiao-yu², YU Zi-niu², KONG Jie⁴, XIANG Jian-hai¹

(1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 3. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; 4. Yellow Sea Institute of Fisheries, Chinese Academy of Fisherise Sciences, Qingdao 266071, China)

Received :Oct. , 15 , 2004

Key words :selective amplified microsatellite polymorphic loci (SAMPL); *Fenneropenaeus chinensis*; microsatellite

Abstract : The main difficulty in developing microsatellite is to isolate the short tandem repeat -flanking sequences. A method to screen microsatellite based on SAMPL (selective amplified microsatellite polymorphic loci) was tested in shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. 5 anchored primer was introduced into traditional SAMPL analysis, and short tandem repeat sequences were expected to be enriched. Five randomly selective bands (nominated as S11, S13, S14, S22, S24 respectively) were cut from the silver staining polyacrylamide gel, cloned and sequenced, and 161, 157, 147, 152, 298 bp sequences were obtained respectively. Microsatellites were found in S13, S22. A single sequence repeat of (GA)₃₉ was also found in S24, which comprises AFLP primers only and is different from the other ones that comprise both primers. No microsatellite was found immediately adjoining to the 5 anchored primer, so it seems that 5 anchored primer, in this study, did not work as expected. More work is needed for further microsatellite isolation.

(本文编辑:刘珊珊)