

# 细角螺微卫星 DNA 富集文库构建及特征分析

李清荟<sup>1,2</sup>, 陈晓姣<sup>1,2</sup>, 黎中宝<sup>1,2</sup>, 曹媛钰<sup>1,2</sup>, 陈丽娜<sup>1,2</sup>, 戴刚<sup>1,2</sup>

(1. 集美大学 水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 福建省海洋渔业资源与生态环境重点实验室, 福建 厦门 361021)

**摘要:** 采用生物素磁珠富集法, 用生物素标记的(GT)<sub>15</sub>和(CT)<sub>15</sub>两种探针与细角螺基因组 *MseI* 酶切的 300~1200bp 片段杂交, 杂交复合物与链霉亲和素磁珠结合, 捕获含有重复序列的微卫星片段。最后将磁珠捕获到的重复序列与 PMD19-T 载体连接后克隆到 DH5 $\alpha$  中构建微卫星基因组文库。通过 PCR 检测出 354 个阳性克隆, 从中随机选取 248 个片段大于 500bp 的阳性克隆进行测序, 结果显示, 在 220 个成功测序的阳性克隆中共获得 278 个微卫星序列, 其中完美型 171 个, 占 61.5%; 非完美型 81 个, 占 29.1%; 复合型 26 个, 占 9.4%。除探针使用的 GT 和 CT 的重复序列外, 还筛选到三碱基 GTT、TGG、GAA、CAA; 四碱基 TCTA、ACAG、TAGA、GTGA、GTCT、GATA 及五碱基 TTTTG 的重复序列。在 278 条序列中共有 82 条可以设计引物。

**关键词:** 细角螺(*Hemifusus ternatanus*); 磁珠富集; 微卫星; 构建; DNA 文库

中图分类号: S917 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2013)04-0001-05

细角螺(*Hemifusus ternatanus*)俗称响螺, 单壳类海产底栖动物, 属腹足纲(Gastropoda), 新腹足目(Neogastropoda), 盔螺科(Galeodidae), 角螺属(*Hemifusus*)。主要分布于中国东南沿海, 新加坡和日本海域。其肉肥, 美味, 具有滋补功能, 经济价值很高, 是高档海珍品。近年来, 海域生态环境的恶化以及人类过度捕捞, 细角螺资源日趋衰减。为了防止细角螺进一步衰减, 人们将焦点转向细角螺的人工育苗及繁殖生物学的研究上, 并且取得初步成功<sup>[1]</sup>, 但仍处在实验探索阶段<sup>[2-3]</sup>。由于目前对细角螺种质资源现状了解甚少, 因此对细角螺进行种质资源结构、遗传多样性等方面的研究, 这将对保护该物种的野生群体, 开展苗种繁育、良种培育等工作具有重要的意义。

微卫星(microsatellites)DNA, 又称简单序列重复(simple sequence repeats, SSR)或短串联重复序列(short tandem repeats, STR), 由中间的核心序列与其两端的保守侧翼序列组成, 核心序列为 1~6 个核苷酸为重复单元的串联重复 DNA 序列。由于微卫星分子标记具有多态性丰富, 稳定性好, 符合孟德尔遗传和具有共显性<sup>[4]</sup>等特点, 自 1984 年被 Tautz 等<sup>[5]</sup>首次提出可用于群体遗传学研究后, 该技术就被广泛应用于动植物的遗传多样性, 遗传变异, 遗传连锁分析和遗传图谱构建等方面。如斜带石斑鱼

(*Epinephelus coioides*)<sup>[6]</sup>, 大珠母贝(*Pinctada maxima*)<sup>[7]</sup>及许氏平鲷(*Sebastes schlegeli*)<sup>[8]</sup>等都得到很好的应用。细角螺作为重要的经济贝类之一, 目前有关细角螺微卫星分子标记的研究尚未见报道。本研究采用磁珠富集法构建细角螺微卫星富集文库, 并分析微卫星序列的特征, 为进一步筛选大量的微卫星引物奠定基础, 进而为研究细角螺遗传多样性, 遗传图谱构建, 人工育苗等提供一定的基础资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

细角螺样品采自福建省泉州市惠安县。

### 1.2 基因组 DNA 提取与酶切

根据上海生工生物工程技术有限公司的基因组小量抽提试剂盒(SK1252)提供的步骤, 稍做修改提取细角螺基因组 DNA。所提 DNA 经 1%的琼脂糖凝胶电泳检测后于-20℃保存备用。用 *MseI* 酶切基因组 DNA, 选取长度为 300~1200bp 的酶切片段进行连接。

收稿日期: 2012-06-20; 修回日期: 2012-09-23

基金项目: 集美大学创新团队基金项目(2010A004)

作者简介: 李清荟(1988-), 女, 云南文山山人, 硕士, 主要从事水生生物遗传与育种研究, 电话: 18959298572, E-mail: liqinghuihappy@163.com; 黎中宝, 通信作者, E-mail: lizhongbao@jmu.edu.cn

### 1.3 接头制备与连接

等体积混合与 *MseI* 酶切部位相匹配的 Linker A(5'-GACGATGAGTCCTGAG-3')及 LinkerB (5'-TAC TCAGGACTCAT-3'), 95 °C 变性 10 min, 37 °C 10 min, 最后冰置 10 min, 形成终浓度为 10 μmol/L 的双链接头待用。

连接体系 30 μL: 酶切产物 20 μL, 接头 5 μL (10 μmol/L), T4 连接酶 (5 U/μL) 1 μL, 10×T4 buffer 4 μL 于 37 °C 连接 3.5 h 或 22 °C 连接过夜。

### 1.4 探针杂交

杂交反应前, 先将 2×Hyb buffer (杂交缓冲液) 预热至 55 °C 备用, 将接头连接产物 95 °C 变性 10 min。取变性后的连接产物与 bio-(CT)<sub>15</sub>、bio-(GT)<sub>15</sub> 混合探针进行杂交反应, 杂交反应体系为 50 μL, 其中包括 25 μL 2×Hyb buffer, 10 μL 接头连接产物, 5 μL Bio-(CT)<sub>15</sub> (10 μmol/L), 5 μL Bio-(GT)<sub>15</sub> (10 μmol/L) 以及 5 μL ddH<sub>2</sub>O。61 °C 反应 1 h 后, 放置 4 °C 备用。

### 1.5 磁珠的平衡

取 150 μL 磁珠原液于 1.5 mL 离心管中, 混匀后置于磁力架上捕获磁珠, 小心吸走上清液。用 150 μL (等比例) 0.5×SSC 洗涤磁珠两次, 然后将磁珠重悬于 150 μL 的 6×SSC, 0.1% SDS 中。

### 1.6 磁珠富集及精制

将 50 μL 杂交产物与重悬磁珠混匀, 室温下温育 30 min, 期间以每 1~2 min 翻转 1 次, 以使生物素和链霉亲和素结合, 30 min 后将离心管置于磁力架上, 吸去上清液。然后将离心管放置于磁力架上洗涤。室温下, 用 400 μL 洗液 I (2×SSC, 0.1% SDS) 洗脱 2 次, 400 μL 洗液 II (1×SSC, 0.1% SDS) 在室温下洗脱 2 次, 再用洗液 III 于 50 °C 洗脱两次, 将不含微卫星的序列除去, 然后用 200 μL 的 0.1×TE 于 95 °C 温育 10 min 后迅速吸取上清液至新管。加入 400 μL 经 -20 °C 预处理的无水乙醇, 并加入 20 μL NaAc/EDTA (pH 8.0) 螯合剂, 冰上静置 15 min 后冷冻离心, 弃乙醇, 加入 500 μL 经 -20 °C 预处理的 75% 乙醇, 冰上放置 15 min 后冷冻离心 10 min, 弃乙醇, 风干样品。最后加入 25 μL TE 溶液, 放置 4 °C 过夜, 使微卫星 DNA 充分溶解于 TE 溶液中。

### 1.7 PCR 扩增及纯化

以寡聚核苷酸链 *MseI* adapter A 为引物对上述精

制到的微卫星 DNA 片段进行 PCR 扩增, 25 μL 反应体系包括 10×Buffer (含 Mg<sup>2+</sup>) 4 μL, dNTP (10 mmol/L) 0.4 μL, Taq 聚合酶 (5 U/μL) 0.2 μL, *MseI*-A 引物 1.4 μL (10 μmol/L), 17 μL ddH<sub>2</sub>O, 精制产物 2 μL。PCR 反应条件为: 95 °C 预变性 2 min, 20×(95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 60 s), 最后 72 °C 保持 10 min 完成扩增片段的末端加尾 A。用 0.1% 琼脂糖检测 PCR 扩增产物的片段大小。产物用 GenClean PCR 回收试剂盒 (上海捷瑞) 纯化以除去多余的 dNTPs 及接头等杂质。

### 1.8 微卫星 DNA 片段克隆、筛选和序列分析

将纯化的 PCR 产物用 pMD19-T 载体于 16 °C 连接 4 h。用感受态大肠杆菌 DH5α 进行转化克隆, 得到细角螺微卫星文库。挑取单克隆于 LB 液体培养基中, 37 °C 振荡培养过夜。用 M13F/R 通用引物对单克隆菌进行 PCR 检测, 挑取片段大于等于 500 bp 的阳性克隆的菌液送至华大基因测序。

## 2 结果

### 2.1 克隆及测序结果

经 PCR 筛选, 在 354 个阳性克隆中有 248 个含有大小合适的插入片段, 片段大小为 500~1000 bp, 从中随机挑选 220 个克隆送出测序。图 1 为部分筛选结果的电泳图。

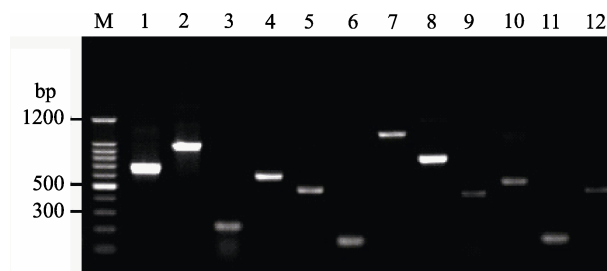


图 1 单克隆检测结果

Fig. 1 Result of the monoclonal detection

依据 Linda 等<sup>[9]</sup>对微卫星的划定标准: 单核苷酸重复大于 15 次, 二核苷酸重复大于 7 次, 三核苷酸大于 5 次, 四核苷酸及五核苷酸大于 4 次。序列比对后用 SSR hunter 软件进行微卫星序列的查找, 结果表明在成测序的 220 个阳性克隆中, 除 5 个不含有微卫星序列外, 在剩余的 215 个克隆中共得到 278 个重复次数在 5 以上的微卫星序列。依据 Weber 制定的标准<sup>[10]</sup>, 在本研究筛选到的 278 个细角螺微卫星

序列中, 完美型 171 个, 占 61.5 %, 非完美型 80 个, 占 29.1%, 复合型 26 个, 占 9.4%(表 1)。除探针使用的 GT 和 CT 的重复序列外, 还筛选到三碱基 GTT、

TGG、GAA、CAA; 四碱基 TCTA、ACAG、TAGA、GTGA、GTCT、GATA 及五碱基 TTTTG 的重复序列, 具体统计见表 2。

表 1 细角螺基因组微卫星序列的分类情况

Tab.1 Classification of microsatellites for *H. ternatanus*

类别	完美型	非完美型	混合型	合计
百分比(%)	61.5	29.1	9.4	100
序列数(个)	171	81	26	278
二碱基	140	75	20	235
三碱基	8	6	1	15
四碱基	22	0	5	27
五碱基	1	0	0	1

表 2 部分微卫星序列的重复单元、重复类型及序列号情况

Tab.2 The repeat motifs, category and genbank accession number of part of microsatellite sequences

微卫星克隆	重复类型	序列号	重复单元
XL30	imperfect	A392648	(GA) <sub>25</sub> GG(TG) <sub>8</sub>
XL39	perfect	A392654	(ACAG) <sub>5</sub>
XL42	perfect	A392661	(CT) <sub>22</sub>
XL49	perfect	A392663	(CT) <sub>35</sub>
XL58	perfect	A392648	(AAG) <sub>9</sub>
XL59	perfect	A392671	(AC) <sub>19</sub>
XL65	perfect	A392675	(GT) <sub>37</sub>
XL79	compound	A392687	(AG) <sub>24</sub> N(AG) <sub>8</sub> AT-(TG) <sub>8</sub> CG(TG) <sub>9</sub>
XL90	perfect	A392684	(CA) <sub>24</sub>
XL94	imperfect	A392684	(AC) <sub>5</sub> A(AC) <sub>11</sub>

## 2.2 克隆测序峰图

在测序的 220 个阳性克隆中, 有 156 个单向测序不能测通, 占有所有克隆的 70%, 需再用载体的反向引物来测序, 才能测序成功。并且这部分的测序结果显示, 在单个克隆中有多处微卫星重复序列, 有的甚至高达 6 处, 并且出现复杂的碱基重复。这可能是导致测序过程出现信号衰减, 测序峰图紊乱的原因。图 2 为单向测序测通的某克隆部分峰图。

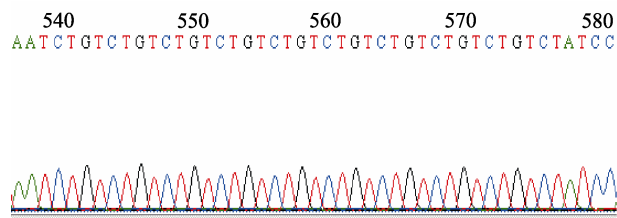


图 2 XL46 位点部分微卫星测序峰图

Fig. 2 Part of the microsatellite sequencing peak figure in XL46 loci

## 3 讨论

被用于微卫星分子标记的生物素探针有多种, 可根据研究对象的特点来选择相应的探针。在所有动物基因组中(CA)<sub>n</sub> 微卫星的含量最为丰富, 其次是 (CT)<sub>n</sub> 微卫星<sup>[11]</sup>, 故本实验在用(GT)<sub>15</sub> 探针的基础上又采用了(CT)<sub>15</sub> 探针, 以期获得更多的标记位点。在真核生物基因组中, 双核苷酸重复的微卫星 DNA 最为丰富, 三核苷酸重复的微卫星 DNA 比双核苷酸重复微卫星 DNA 的含量低 10 倍, 四核苷酸重复的微卫星 DNA 与之相比, 含量更少<sup>[12]</sup>。本研究的结果显示细角螺基因组 DNA 中二碱基重复的微卫星序列 (84.53%)含量最高, 这与研究报告的结论相一致, 而四碱基重复的微卫星序列(9.71%)比三碱基重复的微卫星序列(5.4%)所占的比例更高, 与报告过的研究结果相反。原因可能是杂交时采用(GT)<sub>15</sub>、(CT)<sub>15</sub> 混合探针, 导致在总的 278 个微卫星片段中出现多达

21 个 GTCT 以及与之相互补的 CAGA 重复序列。本研究获得的细角螺微卫星中, 完美型所占比例为 61.7%, 与 虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 50.18%<sup>[13]</sup>, 企鹅珍珠贝 (*Pteria penguin*) 65.5%<sup>[14]</sup>, 合浦珠母贝 (*Pinctada martensii*) 77.3%<sup>[15]</sup>, 大珠母贝 (*Pinctada maxima*) 63%<sup>[7]</sup> 及西施舌 (*Coelomactra antiquate*) 68.4%<sup>[16]</sup> 等贝类基本相似, 都是完美型所占的比例更高, 而混合型所占的比例 (9.4%) 与李琪等<sup>[17]</sup> 研究的长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 的混合型比例 (24.2%) 相差很大。这些不同的结果与研究方法和筛选富集得到的不同微卫星区域有关, 同时也在一定程度上反映了贝类基因组微卫星的特性。

微卫星核心序列突变率相对较高, 造成了微卫星核心序列重复次数的变化, 这是微卫星多态性的基础<sup>[18]</sup>。Valdes<sup>[19]</sup> 认为重复次数低于 5 的微卫星几乎检测不出多态性, 一般微卫星重复次数程度与多态性程度成正相关<sup>[20]</sup>。本实验所得序列重复次数多集中在 7~30, 占 62%, 最高达到 64 次。理论上讲, 本研究所得的细角螺微卫星序列中, 应该有约 60% 的序列可以设计的引物。但是由于一条克隆中出现多处微卫星序列, 最高高达 6 处, 并且出现复杂的碱基重复, 导致测序峰图紊乱以及引物设计困难, 在 278 条序列中仅有 82 条可以设计引物, 并且质量较高的仅有 50 条。原因可能是在富集过程中多次洗涤磁珠, 使得一个克隆里有多个重复序列片段, 保守序列碱基数少, 导致引物设计和筛选困难。另一个原因可能是细角螺基因组中的微卫星本来就比较复杂, 与多数贝类遗传背景一样, 在进化过程中发生染色体重排<sup>[21]</sup>, 导致基因组结构复杂和存在多个位点, 从而对引物的设计及筛选产生影响。

目前国内对细角螺的研究主要集中在幼苗繁育<sup>[1-2]</sup> 及生理生化上<sup>[22]</sup>, 国外主要集中在幼螺生长的生态习性<sup>[23]</sup>、神经鞘脂类的组成和结构<sup>[24-27]</sup>、体内的砷分布<sup>[28]</sup>, 对其遗传多样性的研究较少, 仅在核型特征<sup>[29]</sup> 方面有所报道。本研究构建细角螺进行微卫星富集文库及分析其序列组成, 为进一步筛选大量的微卫星引物奠定基础, 以期为保护细角螺野生群体、开展苗种繁育、种苗放流及良种培育等工作提供理论参考的目的。

#### 参考文献:

[1] 洪国莲. 细角螺人工育苗技术[J]. 福建水产, 2010, 2: 30-32.

- [2] 许章程, 金亮, 宋普庆, 等. 温度和盐度与细角螺幼体生存、生长及发育的关系[J]. 台湾海峡, 2009, 28(2): 266-271.
- [3] 许章程, 王初升, 张玉生. 细角螺的繁殖生态条件及繁殖习性[J]. 水产学报, 2006, 30(6): 848-851.
- [4] Wang Z, Weber J L, Zhong G, et al. Survey of plant short tandem DNA repeats[J]. Theor Appl enet, 1994, 88(1): 1-6.
- [5] Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers [J]. Nucleic Acids Research, 1989, 17(16): 6463-6467.
- [6] 王家祺, 郭丰, 丁少雄, 等. 斜带石斑鱼不同地理群体遗传变异的微卫星分[J]. 海洋科学, 2009, 33(11): 60-64.
- [7] 谷龙春, 黄桂菊, 何毛贤, 等. 大珠母贝两个野生群体遗传多样性的微卫星分析[J]. 渔业科学进展, 2009, 33(4): 96-101.
- [8] 王文琪, 张毅, 刘梦侠, 等. 许氏平鲉 4 个野生群体遗传多样性微卫星分[J]. 海洋科学, 2012, 36(1): 10-16.
- [9] Linda C, Luke R, Dan M, et al. Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants [J]. Genetics, 2000, 156(2): 847-854.
- [10] Weber J L. Informativeness of human (dC-dA)n (dG-Dt)n polymorphisms[J]. Genomics, 1990, 7(3): 524-530.
- [11] Brenner S, Elgar G, Sandford T, et al. Characterization of the pufferfish (Fugu) genome as a compact model vertebrate genome[J]. Nature, 1993, 366: 265-268.
- [12] Ma Z Q, Rder M, Sorrells M E. Frequencies and sequence characteristics of di-, tri-, and tetra-nucleotide microsatellites in wheat [J]. Genome, 1996, 39(1): 123-130.
- [13] 赵莹莹, 朱晓琛, 孙效文, 等. 磁珠富集法筛选虾夷扇贝微卫星序列[J]. 中国水产科学, 2006, 13(5): 749-755.
- [14] 许友卿, 肖群平, 李咏梅, 等. 企鹅珍珠贝微卫星分子标记的筛选[J]. 水生态学杂志, 2011, 32(3): 88-93.
- [15] 曲妮妮, 龚世园, 黄桂菊, 等. 基于 FIASCO 技术的合浦珠母贝微卫星标记分离与筛选研究[J]. 热带海洋学报, 2010, 29(3): 47-54.
- [16] 朱立静, 孙中响, 沈颂东, 等. 磁珠富集法筛选西施舌微卫星序列[J]. 南方水产科学, 2011, 7(4): 10-15.
- [17] 李琪, 木岛明博. 长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 微卫星克隆快速分离及特性分析[J]. 海洋与湖沼, 2004, 35(4): 364-370.
- [18] 刘志毅, 相建海. 微卫星 DNA 分子标记在海洋动物遗传分子中的应用[J]. 海洋科学, 2001, 25(6): 11-13.
- [19] Valdes A M. Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited[J]. Genetics, 1993,

- 133(3): 737-749.
- [20] Rico C, Ibrahim K M, Rico I, et al. Stock composition North Atlantic populations of *whiting* using microsatellite markers [J]. *Journal of Fish Biology*, 1997, 51: 462-475.
- [21] Wang Y, Guo X. Chromosomal rearrangement in Pectinidae revealed by rRNA loci and implications for bivalve evolution[J]. *Biological Bulletin*, 2004, 207(3): 247-256.
- [22] 梁海鹰, 曹伏君, 张亮珠, 等. 细角螺几种组织的同工酶分析[J]. *吉首大学学报(自然科学版)*, 2007, 28(5): 87-91.
- [23] Kishineh, Hayashi A, Morita M. Sphingolipids of *Hemifusus ternatanus* [J]. *Nihon Yuka Gakkai NenkaiKoen Yoshishu*, 2001, 40(1): 69.
- [24] Mishima Y, Kishima H, Hayashi A. Sphingolipids of *Hemifusus ternatanus* Ceramide Monohexosides and Ceramide Aminoethylphosphonate of the Viscera in Japanese [J]. *Yukagaku*, 1997, 46(1): 39-49.
- [25] Hamada S. Growth and feeding of *Hemifusus ternatanus* in early crawling stage[J]. *Japanese Journal of Malacology*, 1974, 33(2): 75-79.
- [26] Hayashia D, Kishine H. Comparative biochemical studies on lipids of gastropods(mollusca): Structures and compositions of long-chain bases of sphingolipids[J]. *The Japanese Journal of Malacology*, 1997, 56(2): 157-167.
- [27] Kishine H, Mishima Y, Hayashi A. Structural determination of long-chain bases of ceramide aminoethylphosphonate, *Hemifusus ternatanus*[J]. *Yukagaku*, 1995, 44(11): 977-984.
- [28] Phillips D J, Epledgem H D. Distribution of inorganic and total arsenic in tissues of the marine gastropod *Hemifusus ternatanus*[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 1986, 34: 261-266.
- [29] 曹伏君, 李长玲, 罗杰, 等. 管角螺、细角螺的核型研究[J]. *广东海洋大学学报*, 2008, 28(1): 15-18.

## Construction and Characterization of DNA Libraries enriched for Microsatellites repeat sequences in *Hemifusus ternatanus*

LI Qing-hui<sup>1,2</sup>, CHEN Xiao-jiao<sup>1,2</sup>, LI Zhong-bao<sup>1,2</sup>, CAO Yuan-yu<sup>1,2</sup>, CHEN Li-na<sup>1,2</sup>, DAI Gang<sup>1,2</sup>

(1. Fisheries College, JiMei University, Xiamen 361021, China; 2. Fujian Provincial Key Laboratory of Marine Fishery Resources and Eco-environment, Xiamen 361021, China)

Received: Jun., 20, 2012

**Key words:** *Hemifusus ternatanus*; enrichment by magnetic beads; microsatellite DNA; construction; DNA library

**Abstract:** Microsatellites enriched genome library for *H. ternatanus* was constructed by bio-(GT)15 and bio-(CT)15 using FIASCO. Genomic DNA was digested with restriction enzyme *MseI*. Fragments ranging from 300 to 1200 bp were selected to ligate with short linkers. Fragments containing microsatellite repeats were captured with Streptavidin-coated Magnetic Sphere Particles. The target fragments were eluted, PCR amplified, purified and then ligated to pMD-19T vector and transformed into *Escherichia coli*. A total of 248 clones with DNA fragments above 500 bp were selected for sequencing. As the result, 278 microsatellite sequences were isolated. Among the microsatellites, 171 repeating motifs were perfect, occupying 61.5 %; 81 repeating motifs were imperfect, occupying 29.1%; 26 repeating motifs were compound, occupying 9.4%. Besides the GT and CT repeats, several other types of repeats were also detected, such as GTT, TGG, GAA, CAA, TCTA, ACAG, TAGA, GTGA, GTCT, GATA and TTTTG. There are 82 sequences among the 278 microsatellites can be designed with primers and these primers could be used to test polymorphism in further research.

(本文编辑: 梁德海)