

合浦珠母贝基因组微卫星富集文库的构建与分析

油九菊^{1,2}, 范嗣刚¹, 黄桂菊¹, 郝博飞^{1,2}, 陈飞飞^{1,2}, 喻达辉¹

(1. 农业部南海渔业资源开发与利用重点实验室, 南海生物资源与开发利用协同创新中心, 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300; 2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 采用生物素标记的(AC)₁₅探针和磁珠富集法构建合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)基因组 DNA 微卫星富集文库。随机挑选 2097 个克隆进行筛选, 得到 483 个候选克隆(23.03%), 对其中 135 个阳性克隆测序分析发现 122 个克隆含有微卫星重复单元(90.37%)。进一步通过序列比对, 最终得到 65 个具有特异微卫星序列的阳性克隆(53.28%), 其中包含 85 个微卫星 DNA 结构域, 其中完美型(perfect)70 个, 占 82.36%; 非完美型(imperfect)7 个, 占 8.24%; 混合型(compound)8 个, 占 9.41%, 重复次数主要分布在 5~20(95.74%), 平均重复次数为 7.83, (AC/GT)_n 重复所占比例最高(75.53%)。基于微卫星两端的侧翼序列, 利用 Primer Premier 5.0 设计引物, 获得 11 对具有多态性的微卫星引物。本研究为开展合浦珠母贝分子育种及资源评价分析提供了基础资料。

关键词: 合浦珠母贝(*Pinctada fucata*); 微卫星; 磁珠富集

中图分类号: S917.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2015)10-0008-07

doi: 10.11759/hyxx20120107001

合浦珠母贝(*Pinctada fucata*), 又名马氏珠母贝(*Pinctada martensii* Dunker), 隶属于软体动物门(Mollusca)、瓣鳃纲(Lamellibranchia)、珍珠贝目(Pterioidea)、珍珠贝科(Pteriidae)、珠母贝属(*Pinctada*)^[1], 主要分布在中国的广东、广西、海南和台湾沿海^[2], 是目前我国用于培育海水珍珠的主要贝种之一。合浦珠母贝所产珍珠即为历史上闻名遐迩的南珠, 是名贵装饰品, 在国际上久负盛名。同时, 合浦珠母贝肉鲜美可食, 贝壳可加工成珍珠粉, 入药治病。因此, 合浦珠母贝具有重要的经济价值。

中国海水珍珠养殖基地主要集中在广东、广西、海南三省区沿海地带, 并成为其经济发展的支柱性产业之一, 为这些地区的经济发展和国家的出口创汇作出了巨大贡献^[3]。然而, 由于在过去数十年的珍珠贝生产中, 大量使用近缘养殖贝作为父母本进行贝苗的培育, 导致了马氏珠母贝的种质急剧退化, 养殖性能下降, 养殖成活率低, 个体变小, 育珠质量下降等的问题^[3-4]。开展合浦珠母贝的良种选育工作, 培育优良的育珠贝品系, 是科研人员当前的重要任务。

微卫星(microsatellite)又称为简单重复序列(simple sequence repeats, SSR), 是以 1~6bp 的短核苷酸为基本单位, 如(AC)_n、(AT)_n、(CAG)_n、(AGCT)_n 等, 首尾相连组成的串联重复序列^[5]。微卫星标记具有数量多、分布广、共显性遗传、多态性丰富、结

果稳定等优点, 已被广泛用于动植物的种群鉴定、选择育种、遗传多样性分析及遗传连锁图谱的构建等方面^[6-8]。

迄今, 有关合浦珠母贝微卫星序列的报道并不多, 得到的微卫星标记也很有限^[9-12]。本研究拟采用磁珠富集法构建合浦珠母贝微卫星文库, 分离和筛选合浦珠母贝微卫星标记, 为合浦珠母贝的遗传选育、群体遗传学研究和遗传图谱的构建提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 样品采集与基因组 DNA 提取

用于基因组微卫星文库构建的合浦珠母贝闭壳肌组织于 2008 年 12 月份采自海南三亚, 2011 年 3 月份取合浦珠母贝三亚养殖群体闭壳肌组织, 用于多态性引物的筛选。样品均于 95%酒精保存。按照《分子克隆实验指南》^[13]中的方法提取基因组 DNA。提

收稿日期: 2014-12-20; 修回日期: 2015-02-21

基金项目: 国家贝类产业技术体系项目(CARS-48); 国家自然科学基金项目(31372525); 广东省海洋渔业科技推广专项项目(A201301A02)

作者简介: 油九菊(1985-), 女, 硕士研究生, 从事海洋生物技术研究, 电话: 020-89108317, E-mail: youjiuju_910_@126.com; 喻达辉(1963-), 通信作者, 研究员, 博士, 从事遗传育种与种质资源研究, E-mail: pearlydh@163.com

取的基因组 DNA 样品用 1%琼脂糖凝胶电泳、EB 染色检测,并测定 OD260 和 OD280,检测 DNA 的质量和计算浓度,配成 50 ng/ μ L 的 DNA 备用。

1.2 酶切获得目的片段

用限制性内切酶 *Mse* I 于 37 $^{\circ}$ C 烘箱酶切基因组 DNA 4 h,酶切体系 30 μ L,包括 3 μ L 10 \times NEB Buffer2, 0.3 μ L 100 \times BSA, 1 μ L *Mse* I (10U/ μ L), 4 μ L 50ng/ μ L 基因组 DNA, 灭菌双蒸水补足。用 1%琼脂糖凝胶电泳检测酶切结果。

1.3 接头连接与 PCR 扩增

用单链寡核苷酸合成双连接头,每种寡核苷酸的浓度为 100 μ mol/L。*Mse* I 接头序列为 Olig A: 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3', Olig B: 5'-TACTCAGGACTCAT-3'。95 $^{\circ}$ C 变性 10 min,经 4 h 缓慢冷却至 10 $^{\circ}$ C,最终形成双连接头。将酶切产物与双连接头于 16 $^{\circ}$ C 连接过夜,连接体系如下: 10 \times T4 DNA ligase Buffer (ATP⁺) 3 μ L, 100 μ mol/L 接头 3 μ L, 上述酶切片段 20 μ L, 400 U/ μ L 的 T4 DNA ligase 0.5 μ L, 灭菌双蒸水补足 30 μ L。连接产物用简并引物 *Mse* I -N [5'-GAT GAG TCC TGA GTA A(N)-3'] (N 代表碱基 A、G、C、T) 进行 25 μ L 体系的 PCR 预扩增,包括 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, 10 mmol/L dNTPs 0.5 μ L, 10 mmol/L *Mse* I -N 1 μ L, 1 U Taq 酶,酶切连接产物 2 μ L, 灭菌双蒸水补足体系。PCR 程序为: 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 20 个循环;之后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C。1%琼脂糖电泳检测预扩增效果并扩大体系。去除多余的引物、dNTPs 等,将 PCR 产物浓缩至 30 μ L。

1.4 杂交并磁珠富集微卫星序列

1.4.1 杂交

100 μ L 杂交体系包括 0.8 μ L SSR 探针 A(100 μ mol/L) [为生物素标记的(AC)₁₅ 寡核苷酸: 5'bio-(AC)₁₅ 3'], 21 μ L 20 \times SSC, 0.7 μ L 10% SDS, PCR 回收产物 3 μ L, 灭菌双蒸水补足。混匀后 95 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 迅速降至 58 $^{\circ}$ C, 温育 20 min, 然后取出自然冷却到室温。

1.4.2 杂交期间磁珠的准备

取 300 μ L 充分摇匀的 Streptavidin MagneSphere[®]链霉亲和素磁珠颗粒(Promega)溶液于 1.5 mL 离心管中, 1 mL TEN100(10 mmol/L Tris-Cl, 1 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl, pH 7.5)混匀清洗磁珠 3~5 min, 于架上 1 min, 弃上清, 重复 2 次, 40 μ L TEN100 悬浮磁珠。

1.4.3 亲和捕捉

杂交混合液与磁珠悬浮液混合, 加入 300 μ L TEN100 混匀。室温放置 30 min 得吸附混合液(其间轻柔混合磁珠)。将吸附混合液于磁架上静置 1 min, 弃上清, 400 μ L 松弛性洗涤液 TEN1000(10 mmol/L Tris-Cl, 1 mmol/L EDTA, 1000 mmol/L NaCl, pH 7.5)洗涤 5 min, 重复 2 次。400 μ L 严谨性洗涤液(0.2 \times SSC, 0.1% SDS)洗涤 5 min, 重复 2 次。洗涤后的磁珠悬浮于 50 μ L TE 缓冲液中, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min。磁架上迅速分离上清, 保存为洗脱液①。再向磁珠中加入 12 μ L NaOH(0.15 mol/L)混匀室温置 20 min, 分离的上清中加入 1.8 μ L HCl(1 mol/L), TE 缓冲液补足 50 μ L 体积, 保存为洗脱液②。核酸共沉剂沉淀回收两次的洗脱产物, 溶于 20 μ L 灭菌双蒸水中, 即得到富含微卫星序列的单链短基因组 DNA 片段。以此片段为模板, *Mse* I primer 为引物, PCR 体系及条件同 1.3 连接产物的扩增, 获得富含微卫星 DNA 的双链短基因组 DNA 片段, 检测富集效果。富集效果好的样品用 DNA Gel Extraction Kit(AXYGEN)切胶回收纯化 PCR 产物, 浓缩至 20 μ L。1%琼脂糖电泳检测回收效果并定量。

1.5 连接 T-载体、克隆

连接反应采用 TaKaRa 的 pMD18-T 试剂盒, 连接体系为 10 μ L: Ligation Solution I 5 μ L, PMD18-T Vector 0.5 μ L, DNA 1 μ L, DNA 片段 3 μ L, 灭菌双蒸水补足。16 $^{\circ}$ C 连接 4 h。用 *E.coli* Competent Cells *DH5 α* (TaKaRa)进行转化, 得到基因组微卫星文库。

1.6 文库筛选、测序、序列特征分析与引物设计

挑选单克隆, 接种到含有氨苄抗生素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 2 h, 菌液用载体 PMD18-T 的通用引物 M13-47[5'CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3']、M13-48[5'-AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA-3']和寡核苷酸序列 SSR_m[5'-CACACACACACACACACACACAD-3']进行 PCR 筛选鉴定阳性克隆, 并送到上海生工生物工程有限公司进行测序。

用 Chromas 软件分析测序结果, 去掉载体序列和接头序列。用 SSRHunter 软件进行微卫星 DNA 序列查找: 6 或 6 个拷贝以上的 2 碱基重复序列, 4 或 4 个拷贝以上的 3 碱基重复序列, 3 或 3 个拷贝以上的 4 碱基重复序列, 2 或 2 个拷贝以上的 6 碱基重复序列。获得的微卫星序列根据 Weber^[14]提出的测序标准, 对其核心序列进行类型划分。用 Primer Premier 5.0 软

件对所得的微卫星序列设计引物并进行 PCR 扩增。PCR 产物用 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

2 结果

2.1 合浦珠母贝微卫星文库的构建

Mse I 酶切片段主要集中在 200~1000 bp, 表明合浦珠母贝基因组 DNA 酶切结果理想, 经过 PCR 扩增、杂交、富集, 得到的洗脱液 PCR 扩增产物纯化结果见图 1, 利用此富集产物构建合浦珠母贝基因组微卫星文库。

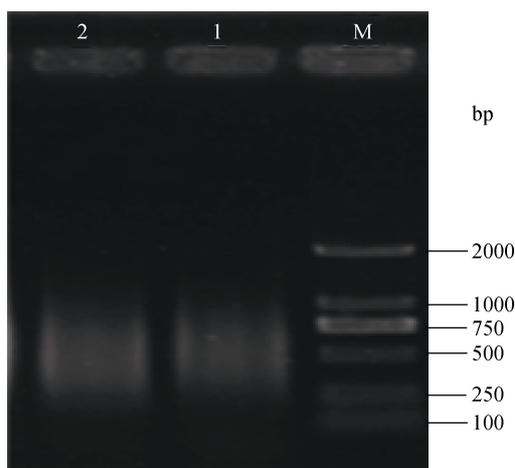


图 1 PCR 产物纯化结果
Fig.1 The purified PCR products

2.2 克隆与测序结果

本研究共获得微卫星文库约 2100 个菌落。产生两条或两条以上扩增带的插入片段可以推测为含有微卫星序列的阳性克隆。通过 PCR 筛选, 得到候选克隆 483 个(图 2)。对其中 135 个克隆进行测序, 测序结果分析发现有 122 个克隆含有重复次数大于或等于 3 的微卫星序列(90.37%)。图 3 为测序得到的合浦珠母贝基因组中一段微卫星特征的(AC)_n 重复序列。

2.3 微卫星序列分析

根据 Weber^[14]提出的测序标准, 合浦珠母贝微卫星序列中完美型 70 个, 占 82.36%; 非完美型 6 个, 占 7.59%; 复合型 8 个, 占 9.41%。

合浦珠母贝微卫星序列最大重复次数为 73 次, 平均重复次数为 7.83 次, 其中, 重复 6~10 次的最多, 占 57.75%, 其次为重复 2~5 次(11.26%), 11~15 次(15.49%), 16~20 次(9.86%), 详见图 4。

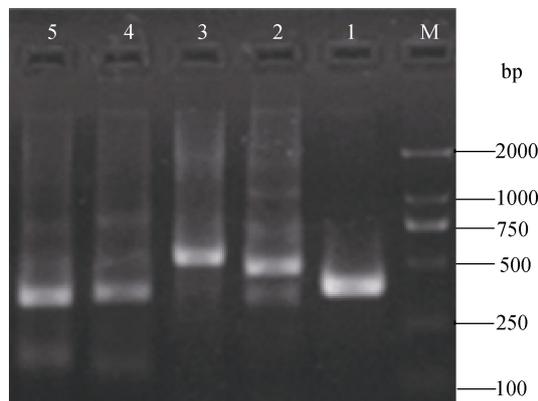


图 2 阳性克隆筛选
Fig.2 Screening of positive clones

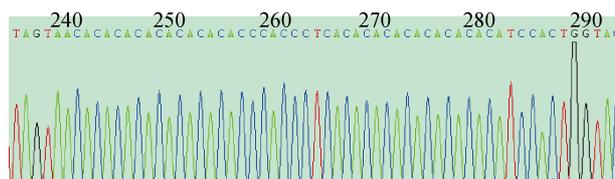


图 3 合浦珠母贝基因组中微卫星特征的(AC)_n 重复序列
Fig.3 Typical (AC)_n repeat sequence in *Pinctada fucata* genomic microsatellite

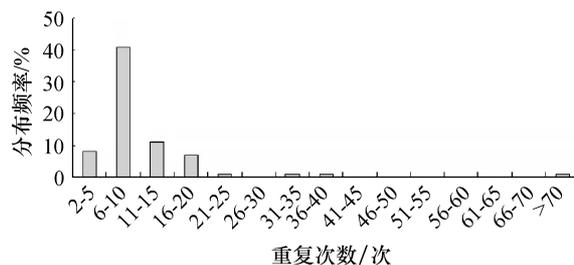


图 4 合浦珠母贝微卫星核心序列重复次数分布频率
Fig.4 The distribution frequency of the microsatellite core repetition sequence in *Pinctada fucata*

2.4 引物设计

利用引物设计软件 Primer Premier 5.0 对所得的 85 个微卫星序列进行引物设计, 除去一些侧翼序列较短不能设计引物外, 共设计 64 对引物(75.29%)。通过优化 PCR 反应条件(如退火温度, Mg²⁺浓度), 本实验最终获得 11 对能稳定有效扩增的合浦珠母贝微卫星多态性引物, 见表 1。图 5 为合浦珠母贝三亚群体在位点 PY008(产物片段长度 160 bp)的扩增谱带。

3 讨论

由于通过经典的小片段 DNA 克隆法构建和筛选部分基因组文库分离获得的微卫星序列比例很低^[15],

表 1 合浦珠母贝微卫星分子标记及其引物

Tab. 1 *Microsatellite loci and their primers in Pinctada fucata*

位点	引物序列(5'-3')	核心序列	退火温度(°C)	片段大小(bp)	GenBank 序列号
PY002	F: AATGCCAAAGTCTGAACG R: ATCCCTGACAAAATGATAAGC	(AC) ₁₀ C(A) ₁₄	62	251	KJ669655
PY004	F: AGCGAAAACAGCGAAGCG R: AACCTATTGCTGGGGATG	(AC) ₅	54	220	KJ669656
PY005	F: TGACAACACTGGAACGCACAA R: AAAGTCGGCAATGGGAGC	(AC) ₆	62	230	KJ669657
PY007	F: TGAGTCCTGAGTAAGCACA R: ACCAGACGAGGGGAAAAG	(AC) ₇ (C) ₁₃	50	200	KJ669658
PY008	F: ACTGCCTTTCACCCTTAC R: CCAGCAAATAGCGAGATG	(AC) ₈	54	160	KJ669659
PY009	F: GGGTAACATTTGTGGAAG R: GTAAACATACAAAGAAATAAGAAAGT	(AC) ₈	60	245	KJ669660
PY010	F: GAATGGTTTGGCTTGGAG R: GAGGCTGTTCTTTGTTGTGG	(AC) ₉ ...(AC) ₁₃	60	141	KJ669661
PY011	F: TTTGCTCGCCAGTCATCT R: GAGTAAAGTTCCGTTTCATAGACAT	(AC) ₁₀	60	182	KJ669662
PY012	F: ATACAGTTTATTGCTACAAC R: CTGAGTAAATGTGACCCT	(AC) ₆ ...(AC) ₇ ...(AC) ₅	60	148	KJ669663
PY013	F: ATAACAGTGCAGCGAAAA R: GGTGGCGTGTATTATTG	(AC) ₅	60	114	KJ669664
PY014	F: ATCAAAACCTGACGCAAAA R: GCATCATCAAGAACCGA	(AAAC) ₄ ...(AC) ₉ ... (CA) ₉	53	179	KJ669665

注: F 表示正向引物; R 表示反向引物

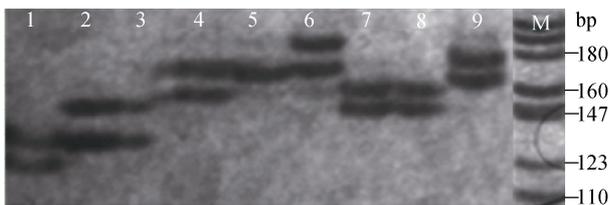


图 5 合浦珠母贝群体在 PY008 位点的扩增谱带

Fig.5 PCR products amplified from *Pinctada fucata* population at locus PY008

因此对于大多数研究而言, 寻找一种高效简单的分离方法就成了研究的目标。磁珠富集法是一种快速、高效的分离微卫星分子标记的方法, 自提出后被迅速广泛地应用于动植物的微卫星位点筛选^[16-17]。该方法所需时间较短, 获得的微卫星重复序列的比例高^[15]。姬长虹等^[18]使用磁珠富集法筛选银鲫的微卫星, 阳性克隆为 95.3%, 李小宁等^[9]用磁珠富集法筛选合浦珠母贝的微卫星, 阳性克隆为 88.5%, 柳明等^[19]利用磁珠富集法进行了大珠母贝微卫星的筛选, 报

道的为 70.81%, 曲妮妮等^[10]用 FIASCO 法筛选合浦珠母贝的微卫星, 阳性克隆为 83.2%, 匡刚桥等^[20] FIASCO 法筛选鳊鱼微卫星标记, 阳性克隆为 60%。本研究采用磁珠富集法筛选合浦珠母贝的微卫星序列, 在所测 135 个克隆中有 122 个含有微卫星序列, 阳性克隆率高达 90.37%, 说明磁珠富集法在贝类中也是一种高效快速的微卫星标记分离方法, 可以应用到其他双壳贝类微卫星的分离研究。

与其他水产动物相比, 贝类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^[9-10, 21-23]。本研究合成的 65 对合浦珠母贝微卫星引物中有 20 对可以有效扩增, 仅 11 对具有多态性, 多态性微卫星比例仅有 16.92%。曲妮妮等^[10]在筛选合浦珠母贝微卫星标记的研究中, 合成了 49 对引物只有 9 对具有多态性, 多态性微卫星比例仅有 18.36%。柳明等^[19]对大珠母贝微卫星的研究中, 合成的 30 对引物中仅有 10 对扩增出具有多态性的目的条带, 多态性微卫星比例仅有 33.33%。所得

到有多态性微卫星的比例都很低,原因可能与贝类个体之间的遗传变异程度较大有关^[10, 19]。Arias 等^[24]对扇贝的 SNPs 检测,发现大约 100 个碱基就出现 1 次 SNP。Sauvage 等^[25]对太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)的研究,发现在编码区平均每 60 bp 出现 1 次 SNPs,在非编码区每 40 bp 就出现 1 次 SNPs。这些高频率的点突变为微卫星引物的扩增筛选带来了很大困难。

研究表明,微卫星广泛散在于真核生物基因组中,特别是二核苷酸微卫星重复(AC/TG)_n(n 大约为 10~60)^[26]在基因组中的含量十分丰富。本研究采用(AC)_n探针,获得了 85 个微卫星序列,其中(AC/GT)_n微卫星引物有 64 对,占 75.29%。除了大量的双碱基序列(AC、AT、AG)外,还有其它单碱基(A、C)、三碱基(ACA、ACG、AGG、AAC)、四碱基(AAAC、CTCT)和四碱基以上(ATTTG、AAAAC、ATTGGG、CGTCCG)的微卫星序列,因此可以考虑采用其他类型的探针,如(AG)₁₂、(ACA)₁₅、(GATA)₈、(GATT)₇^[9]研究开发合浦珠母贝基因组微卫星,以便获得更多的微卫星分子标记。

多数学者认为微卫星重复次数与多态性之间存在正相关。Valdes^[27]认为重复次数低于 5 的微卫星几乎检测不出多态性。一般微卫星的核心序列重复次数越高,其等位基因数也就越多,即多态性也就越高^[28]。Ellegren^[29]认为真核生物中微卫星重复碱基重复序列长度大多在 30 次重复以下。本研究所得序列重复次数在 5~20 次的占 95.74%,因此理论上讲,本研究所得引物可用于合浦珠母贝遗传多样性分析。

另外,与哲罗鱼^[12]、中国对虾^[30]、剑尾鱼^[31]、长牡蛎^[17]、鲤^[15]相比,合浦珠母贝微卫星序列中完美型比例最高,为 82.36%,而合浦珠母贝微卫星非完美型比例仅为 7.59%,仅比中国对虾的(7.00%)高(表 2)。目前为止,关于微卫星优势类型的种间差异现象报道较少,孙效文等认为可能与生物的进化及环境的变迁有关^[12]。笔者分析,可能原因是合浦珠母贝是长期以足丝管附着生活的贝类,生态环境相比迁徙或浮游生活的水生动物较稳定,较少有基因组复制过程中的变异。而李琪等^[17]报道的固着生活的长牡蛎完美型所占比例并无明显优势,与本实验所得结论不同。

表 2 不同类型的微卫星在水产动物中的分布

Tab.2 Distribution of different types of microsatellites in aquatic animals

项目	合浦珠母贝 (<i>Pinctada fucata</i>)	哲罗鱼 ^[12] (<i>Hucho taimen chinensis</i>)	中国对虾 ^[30] (<i>Fenner openaeus helleri</i>)	剑尾鱼 ^[31] (<i>Xiphophorus gigas</i>)	长牡蛎 ^[17] (<i>Crassostrea carpio</i>)	鲤 ^[15] (<i>Cyprinus</i>)
完美型(%)	82.36	39.22	74.00	54.20	54.70	53.15
非完美型(%)	7.59	58.17	7.00	12.50	20.80	37.84
复合型(%)	9.41	2.61	19.00	33.30	24.50	9.01
统计的微卫星数(个)	85	153	31	24	53	314

参考文献:

[1] 王桢瑞. 中国动物志无脊椎动物[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 68-98.

[2] Hwang J J, Yamakawa T, Al E. Growth of wild pearl oysters *Pinctada fucata*, *Pinctada margaritifera* and *Pinctada sugillata* (Bivalvia: Pteriidae) in Taiwan[J]. Fisheries science, 2007, 3(1): 132-141.

[3] 何毛贤. 珍珠贝良种培育及产业化的几点思考[J]. 水产科技, 2004, 6: 1-3.

[4] 喻达辉, 黄桂菊. 关于振兴南珠的思考[J]. 中国宝石, 2011, 4: 240-241.

[5] Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers[J]. Nucleic Acids Research, 1989, 17(16): 6463-6471.

[6] Ning Y, Liu X D, Wang Z Y, et al. A genetic map of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*[J]. Aquaculture, 2007, 264(1): 16-26.

[7] 罗明坤, 郭金涛, 赵金良, 等. 尼罗罗非鱼(♀) × 萨罗罗非鱼(♂)F₁ 家系亲权关系微卫星分析[J]. 南方水产科学, 2014, 1: 9-15.

[8] 孙立元, 郭华阳, 朱彩燕, 等. 卵形鲳鲹育种群体遗传多样性分析[J]. 南方水产科学, 2014, 2: 67-71.

[9] 李小宁, 张殿昌, 朱彩艳, 等. 合浦珠母贝微卫星 DNA 标记分离与分析[J]. 福建水产, 2009, 1: 48-54.

[10] 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.
- [11] 石耀华, 洪葵, 郭希明, 等. 马氏珠母贝 EST 微卫星的筛选[J]. 水产学报, 2008, 32(2): 174-181.
- [12] 佟广香, 鲁翠云, 匡友谊, 等. 哲罗鱼基因组微卫星富集文库的构建与分析[J]. 中国水产科学, 2006, 13(2): 181-186.
- [13] 萨姆布鲁克, 拉塞尔. 分子克隆试验指南(第3版)[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 8.
- [14] Weber J L. Informativeness of human (dC/dA) n(dG/dT) n polymorphisms[J]. Genomics, 1990, 7: 524-530.
- [15] 孙效文, 贾智英, 魏东旺, 等. 磁珠富集法与小片段克隆法筛选鲤微卫星的比较研究[J]. 中国水产科学, 2005, 12(2): 126-132.
- [16] Edwards K J, Barker J H, Daly A, et al. Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants[J]. Biotechniques, 1996, 20: 758-760.
- [17] Li Q, Kijima A. Identification of novel microsatellite loci in the Pacific oyster (*Crassastrea gigas*) by magnetic bead hybridization selection[J]. Tohoku Journal of Agricultural Research, 2002, 53(1-2): 25-32.
- [18] 姬长虹, 孙效文. 用磁珠富集法快速制备银鲫微卫星标记[J]. 大连水产学院学报, 2007, 22(6): 460-464.
- [19] 柳明, 喻达辉, 黄桂菊. 大珠母贝微卫星 DNA 标记的分离与筛选研究[J]. 海洋科学, 2010, 34(8): 1-5.
- [20] 匡刚桥, 刘臻, 鲁双庆, 等. FIASCO 法筛选鳊鱼微卫星标记[J]. 中国水产科学, 2007, 14(4): 608-614.
- [21] Evens B S, Knauer J, Taylor J U, et al. Development and characterization of six new microsatellite markers for the silver-or gold-lipped pear oyster, *Pinctada maxima* (Pteriidae)[J]. Molecular Ecology Notes, 2006, 6(3): 835-837.
- [22] Herbinger C M, Smit H C A, Langy S. Development and characterization of novel tetra- and dinucleotide microsatellite markers for the French Polynesia black-lipped pearl oyster, *Pinctada margaritifera*[J]. Molecular Ecology Notes, 2006, 6(1): 107-109.
- [23] 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.
- [24] Arias A, Freire R, Boudry P, et al. Single nucleotide polymorphism for population studies in the scallops *Aequipecten opercularis* and *Mimachlamys varia*[J]. Conserv Genet, 2008, 56: 1000-1007.
- [25] Sauvage C, Bieme N, Lapegue S. Single Nucleotide polymorphisms and their relationship to codon usage bias in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. Gene, 2007, 406(1-2): 13-22.
- [26] 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(2): 87-90.
- [27] Valdes A M. Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited[J]. Genetics, 1993, 133(3): 737-749.
- [28] Ma Z Q, Roder M, Sorrells. Frequencies and sequence characteristics of di-, tri-, and tetra-nucleotide microsatellite in wheat[J]. Genome, 1996, 39(1): 123-130.
- [29] Ellegren H. Microsatellite evolution: a battle between replication slippage and point mutation[J]. Trends in Genetics, 2002, 18: 70.
- [30] 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(3): 255-259.
- [31] 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(3): 196-201.

Construction and identification of enriched microsatellite library from *Pinctada fucata* genome

YOU Jiu-ju^{1, 2}, FAN Si-gang¹, HUANG Gui-ju¹, HAO Bo-fei^{1, 2}, CHEN Fei-fei^{1, 2}
YU Da-hui¹

(1. key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture, South China Sea Resource Exploitation and Protection Collaborative Innovation Center (SCS-REPIC), South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 2. College of Fisheries and Life science Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Received: Dec., 20, 2014

Key words: *Pinctada fucata*; microsatellite; enrichment with magnetic beads

Abstract: Microsatellite-enhanced genomic library of the *Pinctada fucata* was constructed using a repeat-enrichment method with biotin-labeled oligos (AC)₁₅ and streptavidin magnetic beads. From randomly selected 2097 clones, 483 clones (23.03%) containing microsatellite motifs were obtained by PCR screening. 135 positive clones were sequenced and 122 microsatellite loci (90.37%) were identified. By alignment, 65 microsatellite clones were unique. Sequence analyses of repeat motifs indicate that the microsatellites can be divided into three types: 70 perfect types (82.36%), 7 imperfect types (8.24%) and 8 compounds (9.41%). In addition, most microsatellite sequences contained 5-20 repeat units (95.74%) and the average was 7.83. The proportion of (AC/GT)_n repeat was the highest (75.53%). Based on the flanking sequences at both ends of the microsatellite, 11 pairs of microsatellite polymorphic primers were obtained at last, which were effective for PCR amplification in *P. fucata* genome. This study provides a base for molecular assistant selective breeding and assessment of germplasm resources of *P. fucata*.

(本文编辑: 梁德海)