

中国对虾微卫星 DNA 的筛选*

徐 鹏 周岭华 相建海¹⁾

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 于 2000 年 2 月以中国科学院海洋研究所水族楼暂养的中国对虾为材料, 采用常规方法从尾部肌肉中提取 DNA, 构建小片段部分基因组文库。采用人工设计合成的 (CT)₇、(AT)₇ 重复片段作引物, 利用 PCR 法对中国对虾小片段部分基因组文库进行筛选。本实验首次在中国对虾中获得 31 个微卫星序列, 分别分布于 18 个阳性重组克隆中, 其中 perfect 共 23 个, 占 74%, imperfect 2 个, 占 7%, compound perfect 1 个, 占 3%, compound imperfect 5 个, 占 16%。结果还表明, 在中国对虾基因组 DNA 中, (CT)_n、(AT)_n 形式的微卫星序列的含量非常丰富。

关键词 中国对虾, 微卫星, 筛选

中图分类号 Q75

微卫星 DNA 是近年来迅速发展起来的一种新的 DNA 标记系统, 是一类简单的短序列核苷酸串联重复, 以双核苷酸重复最为常见, 如 (CA)_n、(GT)_n 等, 又称为短序列串联重复序列 (Short Tandem Repeats, STR), 简单序列重复 (Simple Sequence Repeats, SSR)。微卫星 DNA 广泛分布于真核生物的基因组中, 多态性信息容量 (PIC) 高, 符合孟德尔遗传模式, 共显性表达。在种群遗传结构分析、种遗传多样性的鉴定、遗传图谱的构建及与生产性状位点的连锁分析与 QTL 分析中都已经得到了广泛的应用。

与陆生饲养动物相比, 海产动物的良种选育工作还处于起步阶段, 利用分子标记构建遗传图谱, 开展分子标记辅助选育将大大推动海产动物的良种化进程。中国对虾作为一个重要的经济海产种类, 目前其微卫星标记还未见报道, 尽管在对虾属中的一些种类, 如斑节对虾 (*Penaeus monodon*) (Xu *et al.*, 1999)、凡纳对虾 (*P. vannamei*) (Garcia *et al.*, 1996)、北美白对虾 (*P. setiferus*) (Ball *et al.*, 1998)、蓝对虾 (*P. stilyrostris*) (Vonau *et al.*, 1999)、美菲对虾 (*P. notialis*) (Robainas, unpublished) 中已经筛选开发出部分微卫星标记, 并且在种群遗传结构分析等方面进行了应用, 但是由于微卫星标记具有种类特异性, 同一属的不同种类之间的微卫星标记的通用性较差, 因此, 中国对虾的微卫星标记筛选就显得特别的重要和紧迫。为了获取中国对虾微卫星 DNA, 本文采用 PCR 法对中国对虾小片段部分基因组文库进行了筛选, 现将结果报道如下。

* 国家重点基础研究发展计划项目资助, G1999012007 号; 国家自然科学基金资助项目, 39970113 号。徐 鹏, 男, 出生于 1977 年 3 月, 硕士生, E-mail: biotech@ms. qdio. ac. cn

1) 通讯作者

收稿日期: 2000-08-28; 收修改稿日期: 2000-11-20

1 材料与方法

1.1 中国对虾小片段部分基因组文库的构建

2000年2月以中国科学院海洋研究所水族楼暂养的中国对虾(*Penaeus chinensis*)为材料,取中国对虾尾部肌肉提取基因组DNA,经RNase纯化、内切酶Sau3AI消化、1%琼脂糖凝胶电泳酶切产物,切下含有500—1000bpDNA片段的凝胶,采用电洗脱法回收纯化小片段DNA。质粒pGEM-3zf(+)用BamHI完全酶切后小牛碱性磷酸酶(CIAP)去磷酸化。将载体和小片段基因组DNA按1:3比例(摩尔比)在T₄DNA连接酶反应体系中进行连接,用连接液转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,涂布于添加X-gal的氨苄青霉素LB平板上,37℃培养过夜。用无菌的Tip挑取白色菌斑,接入无菌96孔板,37℃摇菌过夜,-70℃低温保藏备用。

1.2 PCR法快速筛选含微卫星序列的阳性克隆

选用pGEM-3zf(+)多克隆位点两侧的T₇/SP₆启动子引物和人工合成的重复7次的(AT)₇、(CT)₇双核苷酸引物分别进行PCR扩增,即:T₇/STR1、T₇/STR2、SP₆/STR1、SP₆/STR2。以细菌悬液直接加入反应体系作为模板。PCR体系15 μ l,含1 \times PCR Buffer、2.5 μ mol/L MgCl₂、0.2mmol/L dNTP、5'和3'端引物各15pmol/ μ l, Taq DNA聚合酶1U。95℃裂解菌液及变性5min,然后94℃1min、40℃1min、72℃1min,共进行30个循环,最后72℃延伸10min。1%的琼脂糖凝胶电泳分析结果,照相。

1.3 阳性克隆的序列测定及结果分析

根据筛选结果,确定含有微卫星序列的阳性克隆,提取纯化质粒DNA,在ABI310型自动测序仪(美国PE公司)上进行测序。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端的保守序列。

2 结果

2.1 PCR法筛选含微卫星的阳性克隆

经过使用(AT)₇、(CT)₇两个寡核苷酸引物分别对92个重组阳性克隆进行PCR筛选,初步得到了22个可能含有(AT)_n、(CT)_n微卫星序列DNA序列的重组阳性克隆。

2.2 阳性克隆的测序结果

对经过PCR初步筛选得到的22个可能含有微卫星的重组阳性克隆进行DNA测序,证实在22个重组克隆中有18个克隆含有微卫星序列,共含有31个微卫星序列,结果见表1。

Weber(1990)提出的测序标准为:perfect指没有中断的或附近无其它重复序列的重复序列;imperfect指两个或两个以上的同种重复序列,被三个碱基以下的非重复序列所间隔;compound指一种重复序列与其它种类的重复序列被三个碱基以下的非重复序列所间隔,根据重复序列的情况又可以分为compound perfect和compound imperfect。根据此标准,对31个微卫星进行划分,其中perfect共23个,占74%,imperfect 2个,占7%,compound perfect 1个,占3%,compound imperfect 5个,占16%(表1)。其中perfect的微卫星占大多数,此结果与凡纳对虾(*P. vannamei*)(Garcia et al, 1996)、斑节对虾(*P. monodon*)(Xu et al, 1999)以及鱼类和其它脊椎动物(Brooker et al, 1994; Crooijmans et al, 1997)微卫星的情况大体相符,而与Tassanakajon等(1998)在斑节对虾中做出的结果相

反, 他们认为在微卫星中占大多数的应该是 imperfect 的微卫星。

表 1 中国对虾微卫星核心序列及其 5'-与 3'-保守序列

Tab. 1 Classification of *Penaeus chinensis* including their repeat motifs and 5'-and 3'-flanking sequences

编号	5' 旁侧序列	核心序列	3' 旁侧序列	评价 (Weber, 1990)	GenBank 序列号
Clone 5	GCGTGGTGGG	(AG) ₄₃ (AC) ₄	GTATAGAGAA	2 perfect	AF295787
Clone 11	GCACACGCAC	(GT) ₄₂	CTGTCTATAC	1 perfect	AF295786
Clone 24	AATAAAGCCTG	(AAG) ₆ (TA) ₂ (GA)(TA) ₃ (CATA) ₂ TAC(AT) ₁₉ (TG) (TA) ₄ (TG)(TACA)(TA) ₄ (TG)(TA) ₂ T(ACAT) ₂ (GCAT) ₂ AC(AT) ₄ (AC) ₄ A (TG) ₃ (TA) ₆ (TG)(TAT)T (TAT)C(TA) ₁₅ (TG)(TA) ₂ (CA)(TA) ₃ (AT) ₂ (CATA) (AT)G(TA) ₂ (GA)(TA) ₂ (TACA) ₂ (TA) ₃ (CA)(TA) ₄ T (TG)(TA) ₄ (TG)(TACA) (TA) ₂₀ (TG)(TA) ₂ (TGT A) ₂ (TACA)(TA) ₂ CG(CA) ₄ (TG) (TA) ₁₀ T(TAT)G(TA) ₆ C (AT)C(TA) ₅ TC(TA) ₃ (AT) ₄ GA(AT) ₂ AC(AT) ₆ (TA) ₄	Incomplete	1 compound imperfect	AF295788
Clone 25	AAGT AAGTAA	(CA) ₅ TGA(AT) ₂ (GT) ₃ (ATA)GGA(AT) ₁₅ (GT) (AT) ₅ (GT) ₅ (AT) ₂ AC(AT) ₄ G (CA)(TG)(AT) ₂ (GT) ₂ (AT) _{4.5} (AG)(TA)(AGAG) (TA)(AG)(TA) ₄ (AG) ₄ (TA) ₃ (GA) ₃ (AT)(GA) ₇ (CA)(GA) ₈ (AT)(GA) ₄ (TA)A ₅ (AT) (GA) ₃ A ₃ (ATA)A(AG) _{8.5} (AT)(GA) ₈ (TA)(AT)GAA (AG) _{6.5} (AT)(GA) ₅ (AG) ₂ (AT)(AG) _{5.5} TTG(GA) ₂ A (AG) _{10.5} AAT(GAG)(GA) ₂ TT (AG) ₃	AAAAGAGATG	1 compound imperfect	AF295789
Clone 26	TTATAAGGCC	(TA) ₃	TTGCAACAGA	1 perfect	AF295790
Clone 27	GGTTCTCGAA TATCTCAAAA	(GCG) ₃ (AG) ₃	GAGGCGGGAG TGAAATGGCA	1 perfect 1 perfect	AF295791
Clone 31	TGCTTAATGG	(TA) ₄	GCCCTGATTA	1 perfect	AF295792
Clone 32	TTGTTTTC A	(TC) ₅ (TATC) ₂ TG(TCT)A (ACTA) ₂ GC(TGT)(CTAT) ₅ (CT)GT(CT)GA(CT) ₁₆	GTCTGCGGCT	1 compound imperfect	AF295793
Clone 37	AATTTTATCT AAAAAGTCCCA AAGA ACAAAT	(AT) ₃ (AG) ₃ (C) ₁₃ (AT) ₁₂ (GA) ₃ (GT) _n	TTCAAGTAAAT GAGGGGAA Incomplete	1 perfect 1 perfect 1 compound perfect 2 perfect	AF295794
Clone 49	GTGTTCATGG	(AC) ₆	AAATACCGTA	1 perfect	AF295795

续表

编号	5' 旁侧序列	核心序列	3' 旁侧序列	评价 (Weber, 1990)	GenBank 序列号
Clone 57	ATACCGTAAG	(TA) ₂₂ (TG) _n	Incomplete	2 perfect	AF295796
	CACCTTATCA	(TC) ₃	TTCTCGTTTG	1 perfect	
	TGACCTCAAT	(TC) ₃	CTCTTCTCCC	1 perfect	
	GAGAAA GAAG	(AGAT) ₆ GTT(GA) ₄ T(AGA) (GATG) ₃ (GA) _n	Incomplete	1 compound imperfect 1 perfect	
Clone 61	CTGGCTATCT	(CA) ₃	GCCAGGGTGT	1 perfect	AF295797
Clone 62	AGAATTCCTT	(CA) ₃	GCGACATCAT	1 perfect	AF295798
Clone 66	CTGAAGACTG	(A) ₆ (AT) ₂ G(TA) ₉ (AT)G (TA) ₂ T	CATGGTCACA	1 imperfect	AF295799
	GGGAATACAT	(AC) ₅ A	TTTGAGTGTG	1 perfect	
Clone 67	TTTGA	(GT) ₃	ATCTT	1 perfect	AF295800
	TCTTACGATG	(AT) ₃	TTTGCGTTC	1 perfect	
Clone 74	CTCACAAATC	(CA) ₃	ACATACGAGC	1 perfect	AF295801
Clone 77	ATGGATAGAC	(AGGC) ₁₀ A(GACA)(AG)(TA) (GACA)(GGCA)(GACA) ₄ (GGTA)(GGCA)(GGTA) ₄ GG (CAGA) ₃ CGG(GCAG) ₃ GC	CTTAGCCAGC	1 compound imperfect	AF295802
	TCCTGCCTGC	(CT) ₉ (TC)C(CT) ₇ G(TC) _n	Incomplete	1 imperfect	
Clone 85	TCCTGCCTGC	(CT) ₉ (TC)C(CT) ₇ G(TC) _n	Incomplete	1 imperfect	AF295803

3 讨论

据 Bachmann 等 (1973)、Tassanakajon 等 (1998)、Xu 等 (1999) 等报道, 在甲壳动物 DNA 中, (CT)_n、(AT)_n 的数量比其它的双核苷酸重复序列要多, 因此, 本实验设计合成了 (CT)₇、(AT)₇ 两种重复 7 次的双核苷酸序列作 PCR 法筛选中国对虾微卫星序列的引物。虽然在本实验中并没有对含有其它双核苷酸重复序列的微卫星进行筛选, 因此不能比较计算 (CT)_n、(AT)_n 在总的微卫星中的比例, 但是, 最后的结果至少表明, 在中国对虾的基因组 DNA 中, (CT)_n、(AT)_n 式的微卫星序列的含量是非常丰富的。

自 90 年代初期以来, 微卫星标记已经广泛应用于人类和一些重要种类动植物连锁群的构建和物理图谱的绘制, 在一些海洋生物, 如大西洋鲑鱼 (Ashie *et al.*, 2000)、雪蟹 (Urban *et al.*, 1998)、真鲷 (Ricardo *et al.*, 1999) 以及斑节对虾 (Wolfus *et al.*, 1997) 等中也已经利用微卫星标记进行了许多工作, 但是, 在中国对虾中筛选分离微卫星至今还未见报道。在本实验中所得到的这些微卫星序列中选取适当的微卫星序列, 利用这些微卫星核心序列两端的序列进行引物设计, 在中国对虾中扩增出多态性的等位片段, 即得到中国对虾的微卫星标记。可以利用这些微卫星标记进行中国对虾种群遗传学分析和多样性鉴定, 为遗传育种、种质鉴定、种苗放流等提供理论依据和指导。另外, 微卫星标记也是用于基因作图的一种重要的分子标记, 如果开发出更多的中国对虾微卫星标记的话, 则可以用来构建中国对虾连锁群和遗传图谱, 这对于品种选育、种系评估都具有重要意义。

参 考 文 献

Ashie T N, Daniel G B, Edward P C *et al.*, 2000. Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers. *Aquaculture*, 182: 73-83.

- Bachmann K, Rheinsmith E L, 1973. Nuclear DNA amounts in Pacific Crustacea. *Chromosoma*, 43: 225—236
- Ball A O, Leonard S, Chapman R W, 1998. Characterization of $(GT)_n$ microsatellite from native white shrimp (*Penaeus setiferus*). *Molecular Ecology*, 7: 1251—1253
- Brooker A L, Cook D, 1994. Organization of microsatellites differs between mammals and coldwater teleost fishes. *Canadian J Fish Aquat Sci*, 51: 1959—1966
- Crooijmans R P M A, Bierbooms V A F, *et al*, 1997. Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio*). *Anim Genet*, 28: 129—134
- Garica D K, Alcivar-Warren A, 1996. Identification and organization of microsatellites in *Penaeus vannamei* shrimp. *Proceedings of 25th International Conference on Animal Genetics*, 21—25 July, 1996, Tours, France
- Ricardo P E, Motohiro T, Nobuhiko Taniguchi *et al*, 1999. Genetic variability and pedigree tracing of a hatchery-reared stock of red sea bream (*Pagrus major*) used for stock enhancement, based on microsatellite DNA markers. *Aquaculture*, 173: 411—421
- Tassanakajon A, Tiptawonnukul A, Rimphanitchayakit V *et al*, 1998. Isolation and characterization of microsatellite markers in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 7: 55—61
- Urbani N, Sevigny J M, Sainte-Marie B *et al*, 1998. Identification of microsatellite markers in the snow crab *Chionoecetes opilio*. *Molecular Ecology*, 7: 7357—7358
- Vonau V, Ohresser M, Biene N *et al*, 1999. Three polymorphic microsatellites in the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Anim Genet*, 30: 234—235
- Weber J L, 1990. Informativeness of human $(dG-dA)_n$ $(dG-dT)_n$ polymorphisms. *Genomics*, 7: 524—530
- Wolfos G M, Garcia D K, Alcivar-Warren A, 1997. Application of the microsatellite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs. *Aquaculture*, 152: 35—47
- Xu Z, Dhar A K, Wyrzykowski J *et al*, 1999. Identification of abundant and informative microsatellites from shrimp (*Penaeus monodon*) genome. *Anim Genet*, 30(2): 150—156

ISOLATING MICROSATELLITE DNA OF CHINESE SHRIMP *PENAEUS CHINENSIS*

XU Peng, ZHOU Ling-Hua, XIANG Jian-Hai

(*Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071*)

Abstract Thirty-one microsatellites of the Chinese shrimp *Penaeus chinensis* were obtained through PCR screening small size fractionated libraries of *P. chinensis* with simple tandem repeats primers $(AT)_n$ and $(CT)_n$. The bacterial suspensions were used in PCR. A high temperature of 95 °C was used for breaking the bacteria. After screening, recombinant positive clones containing microsatellites were sequenced. Among the 31 microsatellites in 18 positive recombinant positive clones are 23 perfect ones (74%), 2 imperfect (7%), 1 compound perfect (3%), and 5 compound imperfect (16%). The experiment shows that microsatellite sequences characterized by $(AT)_n$ and $(CT)_n$ abundant in genomic DNA of Chinese shrimp. Primers can be designed according to these microsatellite flanking sequences and used in genetic analysis.

Key words *Penaeus chinensis*, Microsatellite, Screening