

长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 微卫星克隆快速 分离及特性分析*

李 琪 木岛明博[†]

(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室 青岛 266003)

[†](日本东北大学农学部 仙台 981-8555)

提要 采用磁珠杂交选择和 PCR 筛选法,从长牡蛎 DNA 选择片段文库中,快速分离含有微卫星序列的阳性克隆。结果表明,在筛选的 200 个白色菌落中,56 个克隆含有重复次数 5 以上的微卫星序列,其中 41 个(20.5%)有随机侧翼区,可以进行引物设计,12 个缺乏足够的侧翼序列,3 个为中断的微卫星序列。此外,还获得两个小卫星克隆。在获得的微卫星序列中,完全的占 54.7%,不完全的占 20.8%,复合的占 24.5%。除探针中使用的 CA 重复单元外,还观察到 CT、ACT、CGCA、CACT、GACT、GCAC、CCTTA 和 CCTCA 的重复序列。微卫星重复次数主要集中在 5—30 次之间,占 71.7%,最高为 60 次。本研究中构建的长牡蛎(CA)_n 富集微卫星文库将为以后开发未知微卫星标记提供帮助。

关键词 长牡蛎,微卫星,快速分离,特性分析

中图分类号 Q75

微卫星标记,亦称为 STR(short tandem repeat, 短串联重复)标记,是原核生物和真核生物基因组中普遍存在的 2—6 个核苷酸的简单串联重复序列(Zane *et al*, 2002)。由于微卫星均匀分布于基因组中,并具有多态性丰富、遵循孟德尔分离定律、共显性遗传、易于 PCR 扩增等特点,目前已广泛应用于各种生物资源的家系分析、基因连锁分析、遗传图谱构建、遗传多样性分析等许多研究领域(Knapik *et al*, 1998; Hall *et al*, 1992; Holland, 2001; Li *et al*, 2003, 2004)。

长牡蛎(*Crassostrea gigas*),亦称太平洋牡蛎,是世界上养殖范围最广、产量最高的海洋贝类。为了进行分子标记辅助育种和种群多样性研究,近年来国外学者采用传统的直接杂交筛选方法对长牡蛎微卫星进行了分离(Magoulas *et al*, 1998; Huvet *et al*, 2000; McGoldrick *et al*, 2000)。这种方法主要是将内切酶处理后的 DNA 片段重组入

质粒载体中,建立小片段基因组文库,再用含不同重复序列的寡核苷酸探针进行筛选克隆。该方法存在效率低、成本高的缺点,对于那些基因组中含量不是很丰富的微卫星序列,用这种方法进行分离很困难。由于构建精密微卫星连锁图谱,开展基因连锁分析需要大量微卫星标记,因此迫切需要开发容易获得大量阳性克隆的微卫星高效分离方法。近年来,国外报道了引物伸长法(Ostrand *et al*, 1992; Takahashi *et al*, 1996)和杂交选择法(Kijas *et al*, 1994; Refseth *et al*, 1997)两种微卫星富集技术。为确立长牡蛎微卫星快速分离方法,作者采用磁珠杂交选择法分离长牡蛎 CA 重复微卫星序列,并对微卫星序列的特性进行了分析。

1 材料与方法

1.1 长牡蛎 DNA 的提取

DNA 从采自日本宫城县女川湾的 1 只长牡蛎

* 国家自然科学基金资助项目,30170735 号;教育部留学回国人员科研启动基金资助。李琪,教授,博士生导师, E-mail: qili66@mail.ouc.edu.cn

收稿日期:2003-07-15,收修改稿日期:2003-10-27

成贝提取。剪取 100mg 肌肉组织,研磨后置于 0.7ml 的抽提缓冲液(6mol/L urea, 10mmol/L Tris-HCl, 125mmol/L NaCl, 1% SDS, 10mmol/L EDTA, pH = 7.5)中,加入 35 μ l 的蛋白酶 K(20mg/ml), 37 $^{\circ}$ C 消化一夜。用苯酚:氯仿(1:1)抽提反应物,异丙醇进行沉淀,然后溶解于 TE(10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH = 8.0)中。用 RNase(20 μ g/ml) 37 $^{\circ}$ C 处理 DNA 样品 1h,然后用苯酚/氯仿提取液进行 DNA 纯化。

1.2 DNA 消化、片段分离和衔接头连接

用 *Hae* III 和 *Dra* I(各 150 U)消化 DNA 50 μ g。酶切产物在 2.5% NuSieve GTG 琼脂糖凝胶(美国 FMC Bioproducts 公司)中电泳,切下含 300—1000bp DNA 片段的凝胶,用 DNA 回收试剂盒(QIAquick Gel Extraction Kit, 德国 Qiagen 公司)回收。用 DNA 连接试剂盒(日本宝生物公司)将 DNA 片段(1 μ g)与 *Eco*R I -*Not* I -*Bam*H I 衔接头(日本宝生物公司)连接,然后用乙醇沉淀法收集 DNA 片段,并重新溶于 20 μ l 纯水中。

1.3 目标序列分离和衔接头 PCR

将 0.6ml MagneSphere[®] 链霉亲和素磁颗粒(Streptavidin Paramagnetic particles, 美国普洛麦格公司)重悬浮于 300 μ l 的 5 \times SSC(1 \times SSC = 150mmol/L NaCl, 158 mmol/L 柠檬酸钠)中,并加入 300pmol 生物素标记的寡核苷酸探针:5'-(CA)₁₂GCTTGA-biotin。磁珠和探针在室温下放置 5min 后,用 5 \times SSC 冲洗 3 次,并移入 56 $^{\circ}$ C 100 μ l 的杂交溶液(0.5mol/L NaCl, 4% 聚乙二醇 8000)。DNA 片段(20 μ l)与 80 μ l 的杂交溶液混合,于 95 $^{\circ}$ C 加热 5min 使其变性后,迅速添加至磁珠悬液,并于 56 $^{\circ}$ C 温育 20min,然后在室温用 200 μ l 2 \times SSC 冲洗磁珠 4 次,30 $^{\circ}$ C 200 μ l 1 \times SSC 冲洗 4 次。室温下加入 50 μ l 0.15mol/L NaOH,放置 20min,从磁珠上洗脱固定的 DNA 片段。除去磁珠,加入 5.5 μ l 10 \times TE、3.25 μ l 1.25mol/L 乙酸中和上清液。用 PCR 产物纯化试剂盒(QIAquick PCR purification kit, 德国 Qiagen 公司)纯化 DNA,并溶于 50 μ l TE 缓冲液中。

PCR 体系 50 μ l,含 5 μ l DNA, 1.25U AmpliTaq Gold, 5 μ l GeneAmp 10 \times PCR 缓冲液(美国 PE 公司), 0.2mmol/L dNTP, 1.5mmol/L MgCl₂, 0.6 μ mol/L 衔接头序列引物(5'-CGGCGGCCGCG-

GATCC-3')。95 $^{\circ}$ C 变性 11min,然后 94 $^{\circ}$ C 1min, 63 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min, 共进行 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。PCR 产物用 PCR 纯化试剂盒进行纯化。

1.4 PCR 扩增片段的克隆

已纯化的 PCR 产物经 *Not* I 消化后,插入到 pBluescript II SK(+)载体(美国 Stratagene 公司),然后重组入 XLI-Blue MRF' 超感受态细胞(美国 Stratagene 公司)。将已转化的感受态细胞涂布于添加 IPTG(100 μ l 10mmol/L 溶液)和 X-Gal(100 μ l 2%溶液)的氨苄青霉素(100(g/ml) LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。

1.5 含有微卫星序列阳性克隆的 PCR 筛选

用无菌牙签挑取白色菌落,转入 10 μ l 的 10mmol/L Tris-HCl(pH = 8.5)中,95 $^{\circ}$ C 加热 10min,然后于 4 $^{\circ}$ C 低温保存用作 PCR 反应中的模板。使用 1 μ l 模板,两个载体引物(T3 和 T7)和一个无生物素标记的(CA)₁₂引物进行 PCR 扩增。PCR 体系 10 μ l,含 0.25U AmpliTaq Gold, 1 \times PCR buffer, 0.2mmol/L dNTP, 1.5mmol/L MgCl₂, 引物各 0.2 μ mol/L。95 $^{\circ}$ C 变性 11min 后进行 35 个扩增循环,每一循环包括 94 $^{\circ}$ C 1min、57 $^{\circ}$ C 1min、72 $^{\circ}$ C 1min,最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳,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。阳性克隆 DNA 用 Qiaprep spin columns(德国 Qiagen 公司)纯化,然后用 ThermoSequenase cycle sequencing kit(英国安马西亚公司)在岛津 DSQ-2000L DNA 测序仪(日本岛津公司)上进行双向测序。

2 结果

2.1 微卫星序列富集原理

图 1 表示用磁珠杂交选择法分离长牡蛎微卫星序列的基本原理。基因组 DNA 经内切酶消化、片段分取后,连入衔接头。将含有微卫星重复序列的生物素标记寡核苷酸探针同链霉亲和素磁珠结合,然后再与热变性后的 DNA 片段混合,使探针与微卫星序列杂交。采用两级严格度洗脱非互补序列和多余探针,然后加入 NaOH 释放固定在磁珠上的目标片段。醋酸中和目标片段溶液,利用衔接头 PCR 使分离的 DNA 片段恢复双

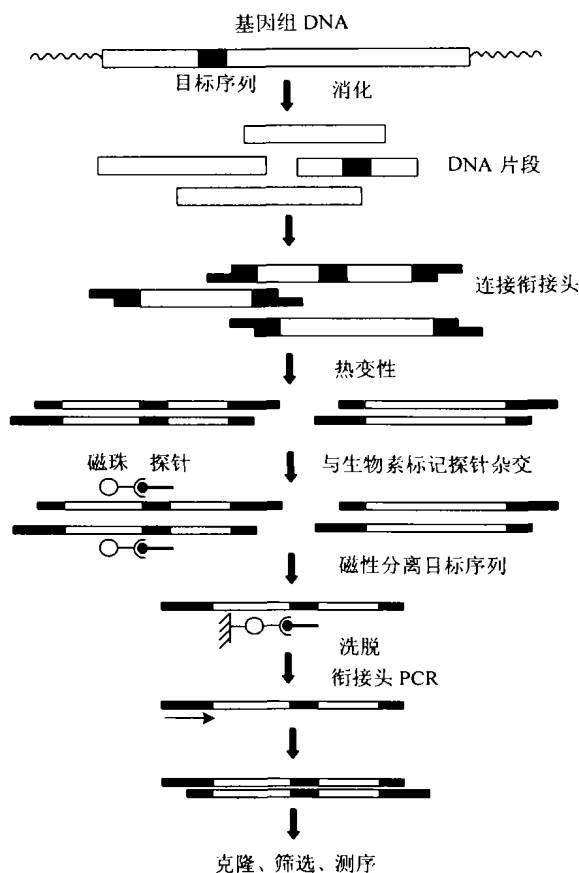


图 1 磁珠杂交选择法富集微卫星序列的基本原理

Fig.1 The basic principle of microsatellite sequence enrichment using magnetic bead hybridization selection

链,并将 PCR 产物插入载体。PCR 法筛选出现两条或两条以上扩增带的阳性克隆,然后提取阳性克隆 DNA 确定序列。

2.2 长牡蛎微卫星克隆的分离及特性

利用 PCR 法筛选了 $(CA)_n$ 富集文库中 200 个白色菌落,其中 67 个克隆(33.5%)产生了两条或两条以上扩增带,表明可能含有 CA 重复序列;对这 67 个克隆进行测序,结果表明 41 个克隆(占筛选白色菌落数的 20.5%)含有重复次数大于 5 的重复序列,且在重复序列两端有随机序列,可以进行引物开发(表 1);12 个克隆虽具有重复次数大于 5 的重复序列,但在重复序列的侧翼区缺乏足够的随机序列,无法进行引物设计;3 个克隆的微卫星序列出现中断;2 个克隆分别含有重复单元为 26 和 17 个核苷酸的串联重复序列,即小卫星序列(表 1);9 个克隆的重复次数都在 6 以下,缺乏明显的微卫星序列。

依据 Weber(1990)提出的微卫星序列分类标准,可以把微卫星序列划分为完全的(Perfect)、不完全的(Imperfect)和复合的(Compound)3 类。完全的微卫星是指没有中断的重复序列,不完全的微卫星指具有 1 个或多个中断的重复序列,复合的微卫星则指不同种重复序列被 3 个以下的非重复碱基间隔。在得到的 53 个微卫星完整序列中,完全的微卫星共 29 个,占 54.7%;不完全的 11 个,占 20.8%;复合的 13 个,占 24.5%(表 1)。在

表 1 长牡蛎 $(CA)_n$ 富集文库中微卫星克隆特性Tab.1 Characterization of microsatellite clones from the $(CA)_n$ -enriched library in the Pacific oyster

克隆	核心重复序列(5'—3')	分类(Weber, 1990)	GenBank 注册号
Cg127	$(CA)_{17}AA(CA)_3AA(CA)_5$	Imperfect	AB114042
Cg136	$(CA)_{20}$	Perfect	AB114043
Cg152	$(GC)_5(CA)_{28}TA(CA)_4$	Compound	AB114044
Cg211	$(CA)_{44}$	Perfect	AB114045
Cg229	$(CA)_{12}C(CA)_{12}(GA)_{28}$	Compound	AB114046
Cg236	$(CA)_{26}CGCA)_3(GA)_2(CGCA)_2(CA)_8$	Perfect	AB114047
Cg248	$(CA)_{44}CG(CA)_8$	Imperfect	AB114048
Cg411	$(CACT)_{39}(GACT)_8$	Compound	AB114049
Cg429	$(CT)_{20}(CA)_{12}$	Compound	AB114050
Cg431	$(CA)_8(CT)_{10}(CA)_6CC(CT)_8$	Compound	AB114051
Cg436	$(CA)_{54}$	Perfect	AB114051
Cg459	$(CA)_{42}$	Perfect	AB114052
Cg52	$(CA)_9AA(CA)_{60}$	Imperfect	AB114153
Cg87	$(CA)_{28}$	Perfect	AB114154

续表

克隆	核心重复序列(5'—3')	分类(Weber, 1990)	GenBank 注册号
Cg829	(CA) ₁₈	Perfect	AB114155
Cg958	(CT) ₁₉	Perfect	AB114156
Cg160	(CA) ₆ (CGCA) ₅ TA(CGCA) ₇	Compound	AB114157
Cg172	(CA) ₃₇	Perfect	AB114158
0Cg173	(CCTTA) ₁₅ (CCACA) ₃ TC(TCGCC) ₄	Compound	AB114159
Cg337	(CA) ₂₈	Perfect	AB114160
Cg47	(CA) ₁₁	Perfect	AB114161
Cg419	(CA) ₇	Perfect	AB114162
Cg511	(CA) ₁₅	Perfect	AB114163
Cg614	(CA) ₂₀	Perfect	AB114164
Cg659	(CA) ₁₀	Perfect	AB114165
Cg79	(CG) ₃ (CA) ₁₉ TA(CA) ₂₇	Compound	AB114166
Cg710	(CA) ₃₀	Perfect	AB114167
Cg751	(GCAC) ₁₀ A(CA) ₅ CG(CA) ₄	Compound	AB114168
Cg92	(GT) ₂₉ G(GCT) ₃	Compound	AB114169
Cg935	(CA) ₅₃	Perfect	AB114170
Cg945	(CA) ₇ CG(CA) ₃ TA(CA) ₃₅	Imperfect	AB114171
Cg344	(CA) ₅₀	Perfect	AB114172
Cg612	(CA) ₅ CG(CA) ₉ C(CA) ₆ C(CA) ₂₃ TAT(CA) ₅	Imperfect	AB114735
Cg625	(CA) ₂₀	Perfect	AB114174
Cg247	(CA) ₆	Perfect	AB114175
Cg647	(CA) ₁₁	Perfect	AB114176
Cg247	(CA) ₆	Perfect	AB114177
Cg521	(CA) ₁₈ (CGCA) ₈	Compound	AB084072
Cg326	(CA) ₃₆	Perfect	AB084073
Cg428	(CA) ₂₇ TA(CA) ₂₂ CG(CA) ₄ CG(CA) ₉	Imperfect	AB084074
Cg433	(CA) ₃₂ CG(CA) ₁₁ GC(CA) ₄ GC(CA) ₃	Imperfect	AB084075
Cg552	(CA) ₆	Perfect	
Cg623	(CA) ₁₆ CT(CA) ₆ GA(CA) ₂₂	Imperfect	
Cg538	(CA) ₃₅ TAT(CA) ₇	Imperfect	
Cg319	(CA) ₃₆	Perfect	
Cg919	(CA) ₂₆ TA(CACG) ₃	Compound	
Cg632	(CA) ₃₈	Perfect	
Cg337	(CA) ₂₈	Perfect	
Cg338	(CA) ₆	Perfect	
Cg126	(CA) ₂₈ TA(CA) ₂₃ CG(CA) ₆	Imperfect	
Cg168	(CA) ₉	Perfect	
Cg414	(CA) ₂₁ AA(CA) ₅ AA(CA) ₁₄ AA(CA) ₉	Imperfect	
Cg817	(CA) ₂₂ (CGCA) ₄ (CG) ₃	Compound	
Cg628	(CA) _n	Interrupted	
Cg196	(CA) _n	Interrupted	
Cg421	(CA) _n	Interrupted	
Cg818	(CCCCAGCGTATATGTCTGTGTGACAG) ₆		
Cg556	(ACACAACACACAACT) ₆		

这些微卫星克隆中,重复单元除 CA 外,还观察到 CT、ACT、CGCA、CACT、GACT、GCAC、CCTTA 和 CCTCA 的重复序列。

图 2 为长牡蛎微卫星长度的频率分布。从图 2 可以看出,微卫星序列重复次数平均为 24.9 次,最大为 60 次,其频率分布主要集中在 5—30 次之间,占 71.7%;最高在 25—30 次之间,为 22.6%;50 次以上的频率为 5.7%。

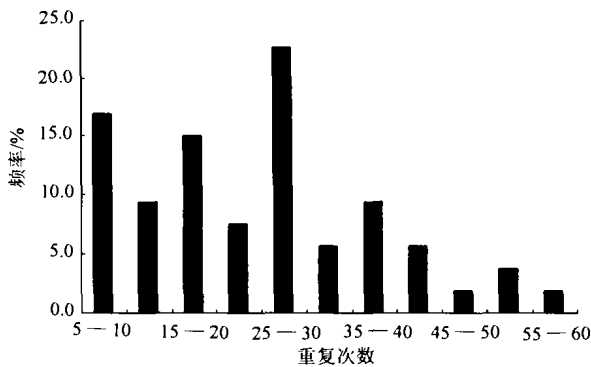


图 2 长牡蛎微卫星长度的频率分布

Fig.2 Length distribution of microsatellites in the genome of the Pacific oyster

3 讨论与结语

实验结果表明,在筛选的全部白色菌落中,20.5%可以进行引物设计。这个富集效率略低于 Refseth 等 (1997) 的报道 (33%),与 Gardner 等 (1999) 报道的 16.7% 和作者在皱纹盘鲍的研究结果 (13.1%) (Li *et al.*, 2002) 大致相符。在欧洲牡蛎,含有双核苷酸重复序列的阳性克隆的比例在 pBKS 基因组文库中仅为 0.52%,在 pUC 基因组文库中为 0.66% (Naciri *et al.*, 1995)。由此可见,与传统的菌落直接杂交法相比,以磁珠杂交选择为基础的富集法效率很高。

本研究中寡核苷酸探针首先采用了 $(CA)_n$ 重复序列,这是因为在所有动物种类中, $(CA)_n$ 微卫星是最丰富的;其次是 $(CT)_n$ 微卫星 (Brenner *et al.*, 1993)。获得的长牡蛎微卫星序列划分为完全的 (54.7%)、不完全的 (20.8%)、复合的 (24.5%) 3 类,其中完全的微卫星比例最高。此结果与日本盘鲍 (Sekino *et al.*, 2000)、中国对虾 (徐鹏等, 2001)、鳕鱼、红鲷以及大西洋鲑 (Brooker *et al.*, 1994) 的微卫星序列特点基本相符。

长牡蛎微卫星平均长度为 24.9 次重复,最长为 60 次重复。50 次重复以上的微卫星在滨螺

(Sokolov *et al.*, 2001)、鲱鱼 (Nugroho *et al.*, 1999)、鳕鱼以及大西洋鲑 (Brooker *et al.*, 1994) 也有报道。在人类,基因组中微卫星多态性程度与微卫星长度显示出正比关系 (Rico *et al.*, 1997),因此一个位点的微卫星长度是预测该位点多态性水平的重要参数。本研究中微卫星重复单元除探针中使用的 CA 外,还观察到 CT、ACT、CGCA、CACT、GACT、GCAC、CCTTA 和 CCTCA 的重复。实验中得到的这些有关微卫星组成和长度分布的数据可以为分离其他牡蛎种类微卫星选择适宜重复单元提供帮助。

长牡蛎 71.7% 的微卫星长度低于 30 次重复。研究表明,真核生物的微卫星长度大部分都在 30 次重复以下 (Ellegren, 2002)。微卫星是存在于基因本身或基因外的 DNA 序列,其点突变频率 (10^{-2} — 10^{-5}) (Weber *et al.*, 1993; Vigouroux *et al.*, 2002) 和复制滑移 (replication slippage) 频率 (10^{-3} — 10^{-4}) (Schlotterer *et al.*, 1992) 都很高。复制滑移导致微卫星重复次数增加、长度变长,点突变则使微卫星重复序列中断,阻碍长度增加 (Santibanez-Koref *et al.*, 2001)。微卫星长度的均衡分布可能是点突变与复制滑移相互间平衡作用的结果 (Ellegren, 2002)。

本研究中构建了长牡蛎 $(CA)_n$ 富集微卫星文库,这对以后进一步开发大数量的未知微卫星标记具有重要的应用价值。

参 考 文 献

- 徐 鹏, 周岭华, 相建海, 2001. 中国对虾微卫星 DNA 的筛选. 海洋与湖沼, 32: 255—259
- Brenner S, Elgar G, Sandford R *et al.*, 1993. Characterization of the pufferfish (*Fugu*) genome as a compact model vertebrate genome. *Nature*, 366: 265—268
- Brooker A L, Cook D, Bentzen P *et al.*, 1994. Organization of microsatellites differs between mammals and cold-water teleost fishes. *Canad J Fish Aquatic Sci*, 51: 1959—1966
- Ellegren H, 2002. Microsatellite evolution: a battle between replication slippage and point mutation. *Trends Genet*, 18: 70
- Gardner M G, Cooper S J B, Bull C M *et al.*, 1999. Isolation of microsatellite loci from a social lizard, *Egernia stokesii*, using a modified enrichment procedure. *J Hered*, 90: 301—304
- Hall J M, Friedman L, Guenther C *et al.*, 1992. Closing in on a breast cancer gene on chromosome 17q. *Am J Hum Gene*, 50: 1235—1242

- Holland B S, 2001. Invasion without a bottleneck: Microsatellite variation in natural and invasive populations of the brown mussel *Perna perna* (L). *Mar Biotechnol*, 3: 407—415
- Huvet A, Boudry P, Ohresser M *et al*, 2000. Variable microsatellites in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and other cupped oyster species. *Anim Genet*, 31: 71—72
- Kijas J M H, Fowler J C S, Garbett C A *et al*, 1994. Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. *Biotechniques*, 16: 657—662
- Knapik E W, Goodman A, Ekker M *et al*, 1998. A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*). *Nature Genetics*, 18: 338—343
- Li Q, Park C, Kijima A, 2003. Allelic transmission of microsatellites and application to kinship analysis in newly hatched Pacific abalone larvae. *Fisheries Sci*, 69: 881—887
- Li Q, Park C, Kijima A, 2002. Isolation and characterization of microsatellite loci in the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*). *J Shellfish Res*, 21: 811—815
- Li Q, Park C, Endo T *et al*, 2004. Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery strains of the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*). *Aquaculture*, 235: 207—222
- Magoulas A, Ghjetvaj B, Terzoglou V *et al*, 1998. Three polymorphic microsatellites in the Japanese oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Anim Genet*, 29: 69—70
- McGoldrick D, Hedgecock D, English L J *et al*, 2000. The transmission of microsatellite alleles in Australian and North American stocks of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): selection and null alleles. *J Shellfish Res*, 19: 779—788
- Naciri Y, Vigouroux Y, Dallas J *et al*, 1995. Identification and inheritance of (GA/TC)_n and (AC/GT)_n repeats in the European flat oyster *Ostrea edulis* (L.). *Mol Mar Biol Biotechnol*, 4: 83—89
- Nugroho E, Taniguchi N, 1999. Isolation of greater amberjack microsatellite DNA and their application as genetic marker to species of genus *Seriola* from Japan. *Fish Sci*, 65: 353—357
- Ostrand E A, Jong P M, Rine J *et al*, 1992. Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 3419—3423
- Refseth U H, Fangan B M, Jakobsen K S, 1997. Hybridization capture of microsatellites directly from genomic DNA. *Electrophoresis*, 18: 1519—1523
- Rico C, Ibrahim K M, Rico I *et al*, 1997. Stock composition in North Atlantic populations of whiting using microsatellite markers. *J Fish Biol*, 51: 462—475
- Santibanez-Koref M F, Gangeswaran R, Hancock J M, 2001. A relationship between lengths of microsatellites and nearby substitution rates in mammalian genomes. *Mol Biol Evol*, 18: 2119—2123
- Schlotterer C, Tautz D, 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res*, 20: 211—215
- Sekino M, Hara M, 2001. Microsatellite DNA loci in Pacific abalone *Haliotis discus discus* (Mollusca, Gastropoda, Haliotidae). *Molecular Ecology Notes*, 1: 8—10
- Sokolov E P, Sokolova I M, Portner H O, 2001. Composition and relative abundance of microsatellite repeats in genome of *Littorina saxatilis* (Olivi) (Gastropoda: Littorinidae). *J Moll Stud*, 67: 499—501
- Takabashi H, Nirasawa K, Furukawa T, 1996. An efficient method to clone chicken microsatellite repeat sequences. *Japanese Poult Sci*, 33: 292—299
- Vigouroux Y, Jaqueth J S, Matsuoka Y *et al*, 2002. Rate and pattern of mutation at microsatellite loci in maize. *Mol Biol Evol*, 19: 1251—1260
- Weber J L, 1990. Informativeness of human (dC-dA)_n(dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics*, 7: 524—530
- Weber J L, Wong C, 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Hum Mol Genet*, 2: 1123—1128
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T, 2002. Strategies for microsatellites isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11: 1—16

MICROSATELLITE CLONES IN PACIFIC OYSTER *CRASSOSTREA GIGAS*: RAPID ISOLATION AND CHARACTERISTIC ANALYSIS

LI Qi, KIJIMA Akihiro[†]

(The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao, 266003)

[†](Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai 981-8555, Japan)

Abstract Traditional approach to obtain microsatellites is to create a size-selected genomic library in a plasmid or phage vector and then screen clones by oligoprobes containing different repeat motifs. For microsatellite repeats which are less abundant in the genome, it is difficult to isolate using the method. As numerous microsatellite markers are needed for the studies such as linkage analysis and genomic mapping in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, it is necessary to establish an efficient method to clone oyster microsatellite sequences. In the present study, we isolated CA repeat DNA clones in the Pacific oyster using magnetic bead hybridization selection, and analyzed the characteristics of the clones. DNA was extracted from a live Pacific oyster, and digested with *Hae* III and *Dra* I. The restricted DNA was electrophoresed on a 2.5% agarose gel, and fragments of 300—1000 bp were excised, purified, and ligated with the *Eco*R I - *Not* I - *Bam*H I adapter. After magnetic isolation of target sequences and adapter PCR, the PCR-amplified DNA fragments were inserted into the pBluescript II SK(+) vector, and the recombinant plasmid vector was transformed into XL1-Blue MRF' supercompetent cells. The positive clones containing microsatellite sequences were screened by the PCR technique. In the 200 white colonies screened, 56 clones contained microsatellite repeat sequences with more than 5 repetitions. Of the 56 clones, 41 clones (20.5%) with unique regions flanking the microsatellite array appeared promising for primer design, 12 clones did not have sufficient quality sequences on both sides of the repeat, and 3 clones contained interrupted repeat. In addition, 2 minisatellite clones were obtained. Compared with the traditional colony hybridization method, the enrichment procedure is very efficient. According to Weber (1990), the microsatellite sequences could be categorized structurally as follows: perfect (54.7%), imperfect (20.8%), and compound (4.9%). Besides the motif of CA contained in the oligoprobe, we also found CT, ACT, CGCA, CACT, GACT, GCAC, CCTTA, and CCTCA repeats. Among the microsatellite repeats, relatively short arrays (5—30 repeats) were most abundant (71.7%), and the largest array contained 60 repeats. The (CA)_n-enriched library created in this study will be useful resource for developing additional anonymous microsatellite markers for Pacific oyster in the future.

Key words Pacific oyster *Crassostrea gigas*, Microsatellite, Rapid isolation, Characteristic analysis