

泥蚶(*Tegillarca granosa*)6 个微卫星引物的 分离和鉴定*

顾晓英¹ 曾庆国² 尤仲杰^{1,2} 林志华³

(1. “应用海洋生物技术”教育部重点实验室(宁波大学) 宁波 315211; 2. 宁波市海洋与渔业研究院 宁波 315012;
3. 浙江省海洋水产养殖研究所 温州 325005)

提要 应用 6 个微卫星标记在奉化泥蚶种群上进行扩增, 以检测其遗传信息。扩增结果表明, 引物所扩增出的等位基因数目变化从 3 个到 7 个, 平均等位基因数目为 5.4。引物的多态性信息含量范围为 0.111—0.814。最大的观察杂合度 H_o 为 0.690, 最小为 0.121。期望杂合度 H_e 范围为 0.117—0.848。位点 TMP22 显著偏离了哈代-温伯格平衡。6 个引物在 18 个马来西亚泥蚶上进行扩增, 结果只有 TMP18 和 TMP36 在马来西亚模板上有扩增产物。

关键词 泥蚶, 微卫星, 等位基因

中图分类号 Q789

微卫星(Microsatellite), 又称作简单序列重复(Simple sequence repeats, SSRs), 是一种广泛存在于真核生物的基因组中, 并可通过 PCR 方法进行检测的遗传标记(Powell *et al*, 1996)。与其它遗传分子标记相比, 微卫星 DNA 标记不仅具有高的遗传多态性, 可重复性, 而且能够区分基因座位杂合度和纯合度等遗传信息(Scott *et al*, 2000)。因此, 微卫星标记已被广泛应用于各种遗传学研究领域。在贝类遗传研究领域, 微卫星标记已被应用到遗传多样性检测、种群遗传结构分析和遗传连锁图谱的构建上。Juergen 等(2005)用 9 个微卫星标记研究了欧洲中部 5 大水系中的 24 个淡水珍珠蚌群体的遗传多样性, 研究结果表明在水系内部的群体和水系间的群体都存在着等位基因的差异。Hubert 等(2004)用 102 个微卫星标记构建了太平洋牡蛎 *Crassostrea gigas* 雄性和雌性连锁图谱。但是, 与一些通过引物的遗传标记, 例如扩增片段长度多态性(AFLP)相比, 微卫星标记首先需要获得位点的序列信息, 从而在微卫星重复序列的侧翼设计引物。随着微卫星分离富集方法的发展, 越来越

多的贝类微卫星序列被分离出来, 截至 2008 年 6 月, 在 Genbank 中已登记了瓣鳃纲贝类 2000 多条微卫星序列, 涵盖了 50 多个物种。

泥蚶(*Tegillarca granosa*)隶属于软体动物门(Mollusca)、瓣鳃纲(Lamellibranchia)、蚶目(Arcoida)、蚶科(Arcidae), 俗称血蚶、花蚶、粒蚶, 广泛分布于印度洋和西太平洋沿岸。泥蚶在东亚和东南亚一些国家是重要的经济贝类。在中国, 从北部的山东省到南部的广西壮族自治区都有人工养殖。作者在前期研究中, 通过磁珠富集方法从泥蚶中筛选微卫星位点(曾庆国等, 2008), 作为后续, 作者从分离的微卫星位点中设计引物, 并检测引物的多态性, 以及在马来西亚泥蚶种群中的通用性。

1 材料与方法

1.1 模板收集和 DNA 提取

33 个从奉化(浙江)采集的野生泥蚶和 18 个取自马来西亚霹雳省的泥蚶个体被用来进行微卫星引物的扩增。提取方法参照徐义平等(2006), 具体步骤如

* 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目资助, 2006AA10A410 号; 国家科技支撑计划项目资助, 2007BAD43B09 号; 浙江省重大科技攻关计划项目, 2006C12013 号。顾晓英, 副教授, E-mail: guxiaoying@nbu.edu.cn

通讯作者: 尤仲杰, 研究员, E-mail: zuiyou@163.com

收稿日期: 2008-07-19, 收修改稿日期: 2008-09-21

下：分别称取 100mg 斧足肌肉，用无菌水清洗两次后，在灭菌的载玻片上剪碎，加入 600 μ l 裂解液 (10mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 20mmol/L EDTA pH 8.0, 10mmol/L NaCl, 1% SDS, 100 μ g/ml proteinase K)，在 55 $^{\circ}$ C 肌肉完全消化后 (约 30min)，12000r/min 离心 10min，取上清到新的 1.5ml 离心管中，加入等量的酚：氯仿：异戊醇 (25：24：1) 抽提两次，氯仿：异戊醇 (24：1) 抽提一次后，水相转移到新管中加入 -20 $^{\circ}$ C 的无水乙醇，12000r/min 离心 10min，75%乙醇清洗沉淀两次，室温下晾干，溶于 100 μ l TE 中。取 5 μ l 在 0.8%琼脂糖凝胶上电泳，检测提取的质量。

1.2 微卫星引物的设计和 PCR 扩增

通过引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计了 11 个微卫星引物。引物的主要设计标准为引物长度 18—22bp，期望产物长度小于 300bp。设计的引物由 invitrogen 公司合成后，稀释为 10pmol/ μ l。所有的引物在 2 个奉化泥蚶上进行温度梯度 PCR 扩增，产物在 1.5%琼脂糖凝胶上进行电泳，从而确定能扩增出目的条带的引物和合适的退火温度。然后，筛选出的引物进行奉化种群 33 个个体的扩增，并检测了引物在马来西亚泥蚶上的扩增效果。反应体系为 25 μ l，包括 10 \times PCR buffer 2.5 μ l、25mmol/L MgCl₂ 2.0 μ l、10mmol/L dNTPs 0.5 μ l、10pmol/ μ l 上下游引物各 1 μ l、5U/ μ l Taq DNA 聚合酶 0.2 μ l，基因组 DNA 1 μ l (10—20ng)。PCR 反应程序为：94 $^{\circ}$ C 变性 5min，接下来 94 $^{\circ}$ C 变性 30s，引物特定的退火温度 30s，72 $^{\circ}$ C 延伸 45s，进行 30 个循环反应，最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。扩增产物在 8%聚丙烯酰胺凝胶上 800V 电泳 5h，电泳结束后银染显色。用 PUC19 DNA/MSP (Hpa^I) marker 作为分子量标记。

1.3 微卫星数据分析

应用 CERVUS 2.0 软件计算了微卫星引物的遗传信息含量 (Polymorphic information content, PIC) 和无效等位基因 (null allele) 的频率 (Marshall *et al.*, 1998)、引物是否偏离哈代-温伯格平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE); 引物的期望杂合度 (Expected heterozygosity, H_e) 和观察杂合度 (H_o) 利用软件 GENEPOP 4.0.7 进行计算 (Raymond *et al.*, 1995)。

2 实验结果

2.1 微卫星引物在奉化泥蚶上的扩增结果

在本实验中，引物 TMP3、TMP12、TMP18、TMP22、TMP26 和 TMP36 可在奉化种群中扩增出目的片段 (表 1)。引物的等位基因数目变化从 3 个 (TMP36) 到 7 个 (TMP12、TMP26)，位点扩增出的平均等位基因数目为 5.4。多态性信息含量的范围是 0.111—0.814。最大的观察杂合度 H_o 为 0.690，最小为 0.121。期望杂合度 H_e 范围是 0.117—0.848。在这 6 个位点中，TMP22 具有最大的无效等位基因频率 0.5289，而 TMP36 无效等位基因频率最小，为 -0.0219。

奉化种群的扩增数据分析表明，位点 TMP3 和 TMP12 偏离哈代-温伯格平衡 ($P < 0.05$)，而位点 TMP22 显著偏离哈代-温伯格平衡 ($P < 0.01$)。位点 TMP22 表现出显著的杂合子缺失。

2.2 引物的种群转移扩增

将这 6 个引物在 18 个马来西亚泥蚶上进行扩增，结果，只有 TMP18 和 TMP36 在马来西亚模板上有扩增产物。TMP18 在 18 个马来西亚个体中扩增出了 6 个等位基因，而 TMP36 在马来西亚种群只有一个等

表 1 泥蚶 6 个微卫星引物的遗传信息
Tab.1 Basic genetic information of microsatellite primers used in this study

位点	重复模式	引物序列(5—3)	退火温度 ($^{\circ}$ C)	片段大小 (bp)	N	PIC	H_o/H_e	Null Freq.	Genbank 编号
TMP3*	(GAA) ₁₃	D: GACAAGACGAAGTTAGCAAG R: GAAACGGATAGAATAATCAAAGA	59	137—197	5	0.727	0.630/ 0.781	0.1008	EU881987
TMP12*	(TTC) ₁₆	D: TTTGTCCGCTAAATCTATGTCT R: TGACCAACCAAGTTTGTGAATC	60	158—179	7	0.814	0.688/ 0.848	0.0981	EU881988
TMP26	(AAG) ₅ , (AAG) ₈	D: GAAGAAGTTTGAGAATGTGG R: TTTCTTTGTCTTCAGAGTCCTT	55	141—201	7	0.530	0.438/ 0.614	0.1614	EU881989
TMP18	(TTTC) ₆ (ATC) ₄ GTC(TTC) ₁₁	D: AGTTACAGTTGGTGTCTTTTCA R: GACAGCCTCGATGTAAGTTAAA	59	168—213	6	0.724	0.690/ 0.777	0.0519	EU881990
TMP22**	(GAA) ₅ AAA(GAA) ₃	D: AAAGAATCTGACAAGCCATC R: CCAAAGCAAITTAACATAAC	51	175—187	4	0.368	0.121/ 0.405	0.5289	EU881991
TMP36	(CAG) ₅ N17(ACA) ₄	D: ACAGGGGTCTACAAGATTCC R: TGCTCACTGTCGCTGTAAC	61	161—167	3	0.111	0.121/ 0.117	-0.0219	EU881992

注： N 为等位基因数目，Null Freq. 为无效等位基因频率。*表示偏离哈代-温伯格平衡 ($P < 0.05$)，**表示显著偏离哈代-温伯格平衡 ($P < 0.01$)

位基因, 表现出单态性。

3 讨论

微卫星标记是一种具有高度多态性的遗传标记, 微卫星标记的多态性是由于在 DNA 复制、损伤修复和遗传重组中导致的重复数目变化导致的(Levinson *et al*, 1987)。已有的研究证实, 微卫星重复的序列越长, 所设计的微卫星引物的多态性就越高(Schlötterer *et al*, 1992; Wierdl *et al*, 1997)。在本实验中, 引物 TMP22 和 TMP36 的微卫星重复序列长度最短, 在奉化种群扩增中获得的等位基因数目最少, TMP22 扩增出了 4 条等位基因, 而 TMP36 只获得了 3 条等位基因。相对应的 *PIC* 值, TMP22 和 TMP36 也是最低的。*PIC* 能反映出某一个遗传标记所包含的遗传信息, 当 $PIC > 0.15$ 时, 表明该遗传标记具有高度的可提供遗传信息性; 当 $0.125 < PIC < 0.15$ 时, 表明该遗传标记能够较为合理的提供遗传信息, 而当 $PIC < 0.125$ 时, 表明该遗传标记可提供的遗传信息较差(王伟等, 2004)。依据此标准, 本实验中的引物 TMP22 和 TMP36 可提供的遗传信息较差, 而其它 4 个引物具有高度的遗传信息。

在奉化种群的扩增中, 引物 TMP22 显著的偏离了哈代-温伯格平衡, 通过比较理论纯合体数目和实际检测的纯合体数目, 作者发现此引物在实验的种群上表现出明显的杂合子缺失, 从而在理论计算时显著的偏离了哈代-温伯格平衡。对于杂合子缺失, 除了小样本量造成的误差, 作者认为无效等位基因是造成杂合子缺失的主要原因。TMP22 在奉化群体扩增时无效等位基因的频率高达 0.5289, 而 TMP18 无效等位基因频率为 0.0519。

种群转移扩增实验中, 只有引物 TMP18 和 TMP36 在马来西亚模板上有扩增产物, 并且 TMP36 表现为单态。由于没有足够的引物可以同时检测马来西亚种群和中国种群, 因此还不能确定马来西亚种群与中国种群之间的遗传差异。在形态上, 马来西亚种群和奉化种群存在着一定的不同, 但还需要进行分子水平上的研究(如母系遗传的线粒体基因比较研究)来确定种群间的遗传分化。

已见报道的泥蚶遗传研究主要是 RAPD 和同工酶对泥蚶种群遗传结构的研究(李太武等, 2003; 李成华等, 2003; 喻子牛等, 1997; 王日昕等, 2005)。在泥蚶的种群形态研究上, 张永普等(2004)研究了 5 个不同地理种群泥蚶壳型上的差异。在本实验中, 筛选的

6 个微卫星位点可用来进行育种品系的鉴定等遗传研究。

参 考 文 献

- 王伟, 尤 锋, 2004. 山东近海牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) 自然和养殖群体 10 个微卫星基因座位的遗传多态性分析. 海洋与湖沼, 35(6): 530—537
- 王日昕, 李太武, 2005. 泥蚶(*Tegillarca granosa*)不同地理居群同工酶变异及遗传分化的研究. 海洋与湖沼, 36(3): 227—234
- 李太武, 李成华, 2003. 5 个泥蚶群体遗传多样性的 RAPD 分析. 遗传多样性, 11(2): 118—124
- 李成华, 李太武, 2003. 福建南北泥蚶种内分化的 RAPD 分析. 动物学研究, 24(5): 362—366
- 张永普, 林志华, 2004. 不同地理种群泥蚶的形态差异与判别分析. 水产学报, 28(3): 339—342
- 徐义平, 孙开练, 杨桂梅, 2006. 温州乐清湾三个泥蚶群体遗传多样性的初步研究. 上海水产大学学报, 15(2): 234—238
- 喻子牛, 孔晓瑜, 1997. 泥蚶等位基因酶遗传变异研究. 中国水产科学, 4(5): 15—21
- 曾庆国, 林志华, 尤仲杰, 2008. 泥蚶(*Tegillarca granosa*)GT 微卫星位点的筛选和性质鉴定. 海洋与湖沼, 39(2): 174—177
- Hubert S, Hedgecock D, 2004. Linkage maps of microsatellite DNA markers for the pacific oyster *Crassostrea gigas*. Genetics, 168: 351—362
- Juergen G, Ralph K, 2005. Genetic diversity and differentiation of central European freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.) populations: implications for conservation and management. Mol Ecol, 14(2): 425—439
- Levinson G, Gutman G A, 1987. High frequencies of short frame shifts in poly CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli* K-12. Nucl Acids Res, 15: 5323—5338
- Marshall T C, Slate J, 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. Mol Ecol, 7: 639—655
- Powell W, Gordon C M, 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trends Plant Sci, 1(7): 215—222
- Raymond M, Rousset F, 1995. Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. Journal of Heredity, 86: 248—249
- Schlötterer C, Tautz D, 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. Nucl Acids Res, 20: 211—215
- Scott K D, Eggler P, 2000. Analysis of SSRs derived from grape ESTs. Theor Appl Genet, 100: 723—726
- Wierdl M, Dominska M, 1997. Microsatellite instability in yeast: dependence on the length of the microsatellite. Genetics, 146: 769—779

ISOLATION AND CHARACTERISTICS OF SIX MICROSATELLITE PRIMERS OF *TEGILLARCA GRANOSA*

GU Xiao-Ying¹, ZENG Qing-Guo², YOU Zhong-Jie^{1,2}, LIN Zhi-Hua³

(1. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology (Ningbo University), Ministry of Education, Ningbo, 315211; 2. The Ocean and Fishery Institute of Ningbo, Ningbo, 315012; 3. Zhejiang Mariculture Research Institute, Wenzhou, 325005)

Abstract Six microsatellite loci were isolated and then used to investigate the genetic diversity of blood clam (*Tegillarca granosa*) collected from Fenghua, Zhejiang Province. The microsatellite primers were first screened in a polymerase chain reaction through a temperature gradient to determine best annealing temperature. The functional primers were then selected for population amplification. PCR was performed in a 25 μ l reaction system as follows: 1 \times PCR buffer, 2.0mm MgCl₂, 0.2mm dNTPs, 10pmol per primer, 0.65U *Taq* polymerase, and 10ng genomic DNA. Reaction took place in a PCR amplifier (Mastercycler Eppendorf) in program of: 5min at 94 $^{\circ}$ C for denaturation, 30 cycles of 94 $^{\circ}$ C 1min, 30 s at annealing temperature, 72 $^{\circ}$ C extension for 45s, and a final extension for 7min at 72 $^{\circ}$ C. The PCR products were afterwards electrophoresed on 8% polyacrylamide gel and detected in silver staining method. Polymorphic information content (*PIC*) was calculated with CERVUS 2.0 software. The expected heterozygosity (H_e) and observed heterozygosity (H_o) was estimated with GENEPOP 4.0.7. The allele number per loci varied from 3 to 7, *PIC* value was 0.111 to 0.814. The mean H_o and H_e varied from 0.121 to 0.690 and 0.117 to 0.848, respectively. Primer amplification showed that some microsatellite loci isolated from the samples of continental China were absent in those of Malaysia.

Key words Blood clam *Tegillarca granosa*, Microsatellite, Allele