

# 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)微卫星位点的 分离和序列分析\*

王建平<sup>1</sup> 余晓巍<sup>2</sup> 沈庞幼<sup>1</sup>

(1. 宁波市海洋与渔业研究院 宁波 315012; 2. 宁波大学生命科学与生物工程学院 宁波 315211)

**提要** 采用磁珠富集法, 利用生物素标记的(GT)<sub>15</sub>寡核苷酸探针从三疣梭子蟹基因组 DNA 的 Sau3A1 酶切的 500—1000bp 片段中筛选微卫星序列。洗脱的杂交片段克隆到 PMD18-T 载体上构建富集微卫星基因组文库后, 通过 PCR 筛选检测出阳性克隆进行测序。在 56 条测序序列中有 49 条非冗余序列包含有重复次数不少于 5 次的微卫星位点, 阳性序列比例达到 87.5%。其中 perfect 类型微卫星最大的重复次数为 47 次。在 47 条非冗余序列中, 共有 40 条(85.1%)微卫星重复序列两端有侧翼序列能够进行引物设计。本研究中筛选的微卫星位点将为下一步的三疣梭子蟹种群遗传结构分析、经济性状的 QTL 定位提供遗传标记。

**关键词** 微卫星, 磁珠富集法, 三疣梭子蟹  
**中图分类号** Q75

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)属海产经济蟹类, 其肉味鲜美, 经济价值高。由于其生长快, 适应性强, 适合于沿海池塘海水养殖, 近几年来已成为我国沿海池塘养殖的新亮点。但由于养殖的蟹苗还是依赖于野生资源, 很少或根本没有经过遗传选育。随着养殖面积和养殖密度的不断扩大, 蟹病陆续发生, 肌肉乳化病等多种疾病导致死亡率逐年增高, 给生产带来巨大的经济损失(许文军等, 2005), 因此, 迫切需要对三疣梭子蟹进行选育和遗传改良。随着分子标记在水产品种遗传育种上的应用, 未来的遗传改良要更多的依赖于各种分子生物学手段(李莉等, 2003)。作为一种有效的数量基因定位图谱, 数量性状基因座位(Quantitative Trait Loci, QTL)在水产养殖品种中已经得到应用(鲍宝龙等, 2005), 这些工作对三疣梭子蟹的遗传育种具有借鉴意义。

QTL 建立需要经过做图群体的构建和遗传标记的筛选过程, 在所采用的遗传标记中, 微卫星标记(Microsatellite)以其分布广、遗传信息含量高、共显性和 PCR 检测(Wright *et al*, 1994)等优势而得到了广泛的应用。在水产品种中, 微卫星标记已被用来建立

罗非鱼耐低温(Cnaani *et al*, 2003)和大西洋鲑鱼抗病 QTL 的研究(Thomas *et al*, 2004)。但是, 微卫星标记首先需要获得位点的序列信息, 然后在重复序列两端的侧翼序列设计引物。本研究中采用生物素-磁珠富集法(Kandpal *et al*, 1994)从三疣梭子蟹基因组 DNA 中筛选微卫星位点, 为三疣梭子蟹的种群遗传学研究和以后 QTL 筛选多态性的微卫星标记提供资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 DNA 提取

5 个三疣梭子蟹个体被用来提取基因组 DNA。称取 50mg 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  $\mu$ l 裂解液(10mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 20mmol/L EDTA pH 8.0, 10mmol/L NaCl, 1% SDS, 100  $\mu$ 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

\* 宁波市重大科研攻关项目, 2005B110004 号。王建平, 高级工程师, E-mail: wjping805@126.com

收稿日期: 2007-11-12, 收修改稿日期: 2008-01-18

醇, 12000r/min 离心 10min, 75%乙醇清洗沉淀两次, 室温下晾干, 溶于 50  $\mu$ l TE 中。取 5  $\mu$ l 在 0.8%琼脂糖凝胶上电泳, 检测提取的质量。

### 1.2 DNA 酶切、胶回收和接头连接

参照 Gardner 等(1999)方法, 样品 DNA(约 1  $\mu$ g) 用 Sau3A1 内切酶在 37  $^{\circ}$ C 消化 4h, 在 65  $^{\circ}$ C 10min 终止酶切反应。酶切产物在 1.2%琼脂糖凝胶上电泳后, 用胶 DNA 回收试剂盒(TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0 DV805A TaKaRa)回收 500—1000bp DNA 片段。将回收的片段与过量的 Sau3A1 接头(表 1)在 16  $^{\circ}$ C 连接过夜, 在 65  $^{\circ}$ C 10min 终止反应, 并再次切胶回收。

表 1 实验的引物和接头序列

Tab.1 The sequence of primers and adaptors in the experiment

引物/接头	序列(5—3)
Sau3A1 adaptor	OligoA -GGC CAG AGA CCC CAA GCT TCG CCG GTC TCT GGG GTT CGA AGC CTA G-OligoB
Primer OligoA	GGC CAG AGA CCC CAA GCT TCG
Primer/prober GT	(GT) <sub>15</sub>

### 1.3 微卫星序列分离和 PCR 扩增

将接头连接的酶切基因组 DNA 片段和生物素标记的(GT)<sub>15</sub> 探针进行杂交。50  $\mu$ l 杂交液其中包括 15  $\mu$ l 回收的 DNA 片段(500ng), 3  $\mu$ l 10pmol/ $\mu$ l (GT)<sub>15</sub> 探针, 15  $\mu$ l 20 $\times$ SSC, 0.5  $\mu$ l 10% SDS 和 17.5  $\mu$ l 10pmol/ $\mu$ l DDW。混合均匀后, 杂交液在 95  $^{\circ}$ C 处理 10min 后, 在 65  $^{\circ}$ C 杂交 1h。期间将 100  $\mu$ l 磁珠(Dynal M-280)清洗后重悬浮于 50  $\mu$ l 杂交液中(6 $\times$ SSC, 0.1%SDS)。杂交结束后, 将杂交反应液同磁珠混合, 室温下振荡 30min。然后在室温下用 6 $\times$ SSC/0.1% SDS 清洗两次, 45  $^{\circ}$ C 下 6 $\times$ SSC/0.1% SDS 清洗两次, 60  $^{\circ}$ C 下 6 $\times$ SSC 清洗两次。用 50  $\mu$ l DDW 悬浮磁珠, 95  $^{\circ}$ C 处理 5min 后在磁柱上快速移出洗脱液, 作为分离 DNA 模板。

PCR 反应体系 25  $\mu$ l, 包含有 5  $\mu$ l 洗脱的 DNA 模板和 10pmol 的 primer OligoA, 反应程序是: 94  $^{\circ}$ C 变性 5min 后, 20 个循环 94  $^{\circ}$ C 变性 30s, 退火 60  $^{\circ}$ C 30s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1min, 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 7min。扩增产物出现在 500—1000bp 范围内, 割胶回收准备。

### 1.4 DNA 片段克隆、筛选和序列分析

割胶回收的目的 DNA 片段插入 PMD18-T 载体(D101A Takara)后转化感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$  (D9057, Takara)。转化的细菌 37  $^{\circ}$ C 摇床培养 1h 后涂布到添加 IPTG(0.024mg/ml)和 X-Gal(0.04mg/ml)的氨苄青霉素 AMP(0.1mg/ml)LB 平板上, 37  $^{\circ}$ C 培养过夜。挑选单个

菌落到盛有 500  $\mu$ l LB/AMP 培养基的 96 孔培养板中后, 200r/min, 37  $^{\circ}$ C 培养 7h 后, 4  $^{\circ}$ C 保存作为 PCR 筛选的模板。

两个引物 PrimerOligoA 和 primer GT 被用来进行阳性菌落筛选。PCR 反应体系 25  $\mu$ l, 含 2.5  $\mu$ l 10 $\times$  PCR buffer、2.0  $\mu$ l 25mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.5  $\mu$ l 10mmol/L dNTP、1U *Taq* DNA polymerase, 引物各 10pmol。94  $^{\circ}$ C 预变性 5min 后, 35 个循环, 每个循环包括 94  $^{\circ}$ C 变性 30s, 60  $^{\circ}$ C 退火 30s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1min。最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 7min。扩增产物在 1.4%琼脂糖胶上电泳, 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 M13 引物测序(Invitrogen)。测序结果在 chromas 软件上进行峰图分析, 去掉载体和接头序列后, 在软件 SSRhunter 上查找微卫星位点(李强等, 2005), 记录下序列的重复模式(motif)和重复次数。具有微卫星重复的序列通过 DNAMAN(version6.0)软件进行冗余序列的查找。

## 2 结果

### 2.1 阳性克隆的筛选和测序

转化的菌液涂布了 5 个平板, 过夜培养后共挑选了 665 个单菌落, 在 7 个 96 孔培养板中进行保存。通过 PCR 筛选后将 65 个阳性菌落进行测序。在成功获得测序结果的 56 个序列中, 共有 49 个序列中包含有重复序列碱基不少于 10bp 的微卫星位点, 阳性序列达到 87.5%。通过 DNAMAN 的 multiple sequence alignment 功能进行分析后发现了 2 个冗余序列(同一序列测序两次)。在 47 个非冗余序列(non-redundant sequence)中, 位点 CGT7D12 比 CGT3H6 相似性为 91%, Clustwal 分析表明 CGT7D12 比 CGT3H6 多出了 7 个 GT/AC 重复。CGT1G12 和 CGT1E1 相似 86%, Clustwal 分析表明两个序列间的 GT 重复次数不同。

### 2.2 微卫星位点的分析

在 47 个非冗余的微卫星序列中, 除了与探针(GT)相同(互补)的以 GT/CA 为重复单位的微卫星位点外, 同时还到了 AG、CAC、TAC、TAG、GACT 等重复序列。通过(GT)<sub>15</sub> 探针筛选的泥蚶微卫星序列中最短的重复序列长度为 12bp(CGT2C8)。在这些重复序列中, 根据 Weber(1990)的分类方法, perfect 微卫星最大的重复次数为 47 次, 长度达 94bp (CGT5B10); imperfect 微卫星最大长度为 126bp (CGT5H11); compound 类型的重复序列, 最长的重复长度达到 102bp (CGT1F5)。

表 2 三疣梭子蟹微卫星位点序列信息

Tab.2 The sequence of microsatellite loci isolated from the genomic DNA of *P. trituberculatus*

编号	重复形式	序列长度	引物设计
CGT5E5	(GT) <sub>15</sub>	534	可设计
CGT5F7	(TC) <sub>31</sub> , (AC) <sub>20</sub> , (AGGA) <sub>3</sub> , (GTGGAG) <sub>3</sub>	669	不可设计
CGT5F6	(ACAG) <sub>3</sub> , (AC) <sub>36</sub> , (CT) <sub>22</sub>	346	不可设计
CGT5H11	(CA) <sub>12</sub> GA(CA) <sub>14</sub> TA(CA) <sub>35</sub>	617	可设计
CGT5G10	(GT) <sub>3</sub> (GAGT) <sub>7</sub>	435	可设计
CGT5G9	(AC) <sub>31</sub>	469	可设计
CGT5G5	(GT) <sub>11</sub> , (CGA) <sub>6</sub> , (TAG) <sub>28</sub>	615	可设计
CGT5F12	(TC) <sub>21</sub>	104	不可设计
CGT5F10	(CA) <sub>27</sub>	420	可设计
CGT5D6	(AC) <sub>32</sub>	701	可设计
CGT5B10	(AG) <sub>47</sub> , (CT) <sub>11</sub>	636	可设计
CGT5B9	(AG) <sub>16</sub> AA(AG) <sub>16</sub>	575	可设计
CGT5B6	(CA) <sub>6</sub> TA(CA) <sub>20</sub>	451	不可设计
CGT5B5	(GA) <sub>36</sub> , (GT) <sub>21</sub>	381	可设计
CGT5A6	(AC) <sub>8</sub> (AG) <sub>14</sub>	419	可设计
CGT4A3	(GT) <sub>7</sub>	194	可设计
CGT4G12	(CGCA) <sub>6</sub>	405	可设计
CGT4E9	(CA) <sub>7</sub> TA(CT) <sub>19</sub>	436	可设计
CGT4A9	(CA) <sub>16</sub>	302	可设计
CGT3H6	(AC) <sub>14</sub>	459	可设计
CGT3G9	(GT) <sub>12</sub>	329	可设计
CGT3E11	(TC) <sub>2</sub> (TA) <sub>4</sub> , ACAA(AC <sub>3</sub> TC) <sub>2</sub> (AC) <sub>3</sub>	609	可设计
CGT3E4	(CA) <sub>3</sub> AA(CA) <sub>2</sub>	604	可设计
CGT3C6	(TG) <sub>10</sub> CG(TG) <sub>10</sub>	176	不可设计
CGT3C1	(AC) <sub>18</sub>	377	可设计
CGT2F10	(AC) <sub>29</sub>	579	可设计
CGT2C8	(TAT) <sub>4</sub>	339	可设计
CGT1G12	(GT) <sub>16</sub>	308	可设计
CGT1F10	(GT) <sub>5</sub> GC(GT) <sub>5</sub> AT(GT) <sub>11</sub>	351	可设计
CGT1F5	(CT) <sub>26</sub> , (AC) <sub>27</sub> , (CAC) <sub>8</sub> (TAC) <sub>26</sub>	524	可设计
CGT1E1	(GT) <sub>25</sub>	506	可设计
CGT1D3	(TG) <sub>29</sub> , (CAC) <sub>8</sub>	519	可设计
CGT1A8	(AC) <sub>27</sub>	590	可设计
CGT7F6	(CA) <sub>29</sub> , (AC) <sub>13</sub>	516	可设计
CGT7E3	(GT) <sub>10</sub>	527	可设计
CGT7D2	(CCT) <sub>10</sub>	540	可设计
CGT7C7	(CA) <sub>27</sub>	396	可设计
CGT7B10	(AC) <sub>45</sub>	619	可设计
CGT7B6	(TG) <sub>33</sub>	457	可设计
CGT7A5	(CA) <sub>32</sub>	449	可设计
CGT6E3	(AC) <sub>3</sub> (CTC) <sub>5</sub> (CAC) <sub>3</sub>	408	不可设计
CGT6D7	(AC) <sub>11</sub>	393	可设计
CGT6A10	(TCC) <sub>3</sub> TTT(TCC) <sub>3</sub>	495	可设计
CGT6A8	(ACC) <sub>3</sub> AAC(ACC) <sub>2</sub> GCC(ACC) <sub>3</sub>	550	可设计
CGT6A2	(AG) <sub>44</sub>	520	不可设计
CGT7F8	(AC) <sub>27</sub>	519	可设计
CGT7D12	(GT) <sub>21</sub>	427	可设计

### 2.3 微卫星引物设计筛选

实验中分离微卫星位点将用来设计引物进行种群遗传学研究,因此,分离的微卫星位点应具有足够的侧翼序列来设计引物。在分离的 47 个非冗余微卫星序列中,在重复序列两侧各 150bp 长度范围内设计引物对。经过 primer premier (version5.0)进行引物设计检测,在设计标准为:TM: 40.4—72.4, GC content: 27%—73%; primer length: 20 ± 2; PCR product size 120—300bp 条件下,40 个序列可以设计出引物对。

### 3 讨论

与 RAPD、AFLP 等通用性引物遗传标记不同,微卫星标记首先需要获得位点的序列信息,以便在重复序列两端的侧翼序列设计引物。传统的微卫星位点分离方法是建立小片段基因组 DNA 文库后用微卫星寡核苷酸探针进行杂交筛选。为了提高微卫星位点的得率,一些微卫星富集方法,例如磁珠法已得到了应用(Kandpal *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1996)。在本研究中,应用生物素标记的(GT)<sub>15</sub> 微卫星探针从三疣梭子蟹基因组 DNA 中筛选 AC/GT 微卫星位点,并对微卫星序列的特性进行了分析。

本实验中选用(GT)<sub>15</sub> 作为探针从三疣梭子蟹基因组 DNA 中富集微卫星位点,这是因为在已有的报道中,GT/CA 微卫星是最丰富的(Brenner *et al.*, 1993; Toth *et al.*, 2000)。实验中从 665 个菌落中共筛选出 47 个 non-redundant 微卫星序列。相对于传统的微卫星分离方法,磁珠筛选通过生物素标记的微卫星序列探针,可以在建库之前大大减少非目的片段,从而提高了筛选的效率(李琪, 2004)。

在微卫星筛选中,一个不可避免的问题就是假阳性和冗余序列(同一位点重复测序)。前者的出现与 PCR 筛选中微卫星引物的错配有关。为了避免这一现象,有时需要进行二次筛选。而冗余序列的出现则要求在微卫星分离时应该尽量提高起始研究对象基因组 DNA 的使用量,从而在进一步的研究中不使用或减少 PCR 扩增的次数(夏军红等, 2007)。另外,如果有设备的实验室,可以通过单链构象多态性胶(SSCP)来判断分离的微卫星是否存在冗余。

从基因组筛选微卫星位点的目的就是获得有用的多态性的微卫星引物。为达到这一目的,首先要求分离的微卫星位点具有一定的重复数目(或长度 bp)。根据滑动链错配机制(slipped-strand mispairing),长

的微卫星重复序列比短的微卫星序列更容易发生突变、产生多态性(Eisen, 1999)。因此,理论上认为微卫星序列有个最小重复次数限制,在这个重复次数下,微卫星序列不会产生突变等遗传变化。Shinde 等(2003)研究表明,在 PCR 扩增条件下,(CA/GT)的最小重复次数是 4 次,而单核苷酸重复(A/T)则为 8 次。在粘菌上,平均重复次数 5.1 次的微卫星序列会产生多态性变化(Dettman *et al.*, 2004)。因此,在本实验中将两碱基微卫星选用重复次数不少于 5 次(10bp)的重复序列作为微卫星位点加以统计。在筛选的两碱基重复微卫星序列中,最小重复次数为 7 次,在理论上满足了微卫星引物设计的要求。

其次,要求分离的微卫星重复两侧具有足够的侧翼序列(80—100bp)进行引物设计。在 PCR 检测中,选择具有两条带、同时第二条带不小于 100bp 的菌落测序,从而尽可能保证有足够的侧翼序列。本实验中有 41 个序列足够的侧翼来进行引物设计。今后的工作应着重于检测这些引物的多态性。

#### 参 考 文 献

- 许文军, 徐汉祥, 施 惠, 2005. 梭子蟹假丝酵母菌病初步研究. 水产学报, 29(6): 831—836
- 李 莉, 郭希明, 2003. 遗传图谱及其在主要水产动物的研究进展. 海洋科学, 27(11): 14—20
- 李 琪, 2004. 皱纹盘鲍微卫星研究进展. 中国海洋大学学报, 34(3): 365—370
- 李 强, 万建民, 2005. SSR Hunter, 一个本地化的 SSR 位点搜索软件的开发. 遗传, 27(5): 808—810
- 夏军红, 朱彩艳, 2007. 黄鳍鲷基因组微卫星的分离. 中国水产科学, 14(2): 321—325
- 鲍宝龙, 李家乐, 2005. 主要水产养殖动物 QTL 定位的研究现状. 上海水产大学学报, 14(4): 444—450
- 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
- Brown S M, Hoplins M S, 1996. Multiple methods for the identification of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Theoretical and Applied Genetics*, 93: 190—198
- Cnaani A, Hallerman M, Tinman S *et al.*, 2003. Detection of a chromosomal region with two quantitative trait loci, affecting cold tolerance and fish size in an F<sub>2</sub> tilapia hybrid. *Aquaculture*, 223: 117—128
- Dettman J R, Taylor J W, 2004. Mutation and evolution of microsatellite loci in *Neurospora*. *Genetics*, 168: 1231—1248
- Eisen J A, 1999. Mechanistic basis for microsatellite instability. In: Goldstein D B, Schlötterer C ed. *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, Oxford: 34—48
- Gardner M G, Cooper S J B, Bull C M *et al.*, 1999. Isolation of microsatellite loci from asocial lizard, *Egernia stokesii*, using a modified enrichment procedure. *Journal of Heredity*, 90: 301—304
- Kandpal R P, Kandpal G, Weissman S M, 1994. Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping clones, and hybridization selection for region specific markers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 88—92
- Shinde D Y, Lai F Z, Arnheim N, 2003. *Taq* DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)<sub>n</sub> and (A/T)<sub>n</sub> microsatellites. *Nucleic Acids Res*, 31: 974—980
- Thomas M, Kjersti T, Munck H *et al.*, 2004. A multistage testing strategy for detection of quantitative trait loci affecting disease resistance in Atlantic salmon. *Genetic*, 167: 851—858
- Toth G, Gaspari Z, Jurka J, 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res*, 10: 967—981
- Weber J L, 1990. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub>-(dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. *Genomics*, 7: 524—530
- Wright J M, Bentzen P, 1994. Microsatellites: genetic markers for the future. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 4: 384—388

## MICROSATELLITE LOCI OF *PORTUNUS TRITUBERCULATUS*: ISOLATION AND CHARACTERIZATION

WANG Jian-Ping<sup>1</sup>, YU Xiao-Wei<sup>2</sup>, SHEN Pang-You<sup>1</sup>

(1. *Ningbo Academy of Ocean and Fishery, Ningbo, 315012*; 2. *Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo, 315211*)

**Abstract** A method of magnetic-bead hybridization enrichment was used to isolate the microsatellite loci of *Portunus trituberculatus*. Genomic DNA was digested with restriction enzyme *Sau3A1*, and DNA fragments in range of 500—1000bp was agarose-gel purified and ligated to the *Sau3A1* adaptor. The fragments were hybridized with biotin-labelled (GT)<sub>15</sub> probe and captured by Streptavidin-coated magnetic beads. The target fragments were eluted, PCR amplified, inserted to PMD18-T vector, and transformed into DH5 $\alpha$  component cell. Clones in enriched genomic DNA bank were screened through PCR method. Of the 56 sequenced clones, 49 sequences contained microsatellite having at least 5 times repeats numbers. Among 47 non-redundant microsatellite-contained sequences, about 87.5% of all the sequences, the largest repeat number of perfect type microsatellite was 47, of which 40 had enough flanking region (80—100bp) for designing primer pairs, and will be tested for polymorphism in the future.

**Key words** Microsatellite (SSR), Magnetic-bead enrichment method, *Portunus trituberculatus*