

# 多元 PCR 在黑鲍(*Haliotis rubra*) 微卫星遗传研究中的应用\*

黎中宝 Appleyard Sharon A<sup>1</sup> Elliott Nicholas G<sup>2</sup>

(集美大学水产学院 厦门 361021; CSIRO Marine Research,  
GPO Box 1538, Hobart, Tasmania 7001, Australia)

<sup>2</sup>(CSIRO Marine Research, GPO Box 1538, Hobart, Tasmania 7001, Australia)

**提要** 根据 D03 等 11 个微卫星引物单位点 PCR 扩增时优化的扩增条件(退火温度、MgCl<sub>2</sub> 等)和 11 个微卫星引物所带有的荧光颜色、等位基因大小变异范围及反应的灵敏度,可将 11 个微卫星引物分成 A 组(D03、G04、B04 和 H08)、B 组(A09、H11、A08 和 G01)和 C 组(CnrHr1.24、CnrHr2.30 和 GnrHr2.23)进行多元 PCR 扩增,结果显示各组内位点之间的分离清晰,这表明多元 PCR 可以大大提高微卫星检测仪器的使用效率和提高实验效果,在微卫星研究中是一种快速便捷的方法。

**关键词** 微卫星,黑鲍,多元 PCR,TouchDown PCR

**中图分类号** Q789

微卫星(Microsatellite)是由 1—6 个碱基对的核心序列串联重复组成的 DNA 序列(Tautz, 1989),亦称简单序列重复(Simple sequence repeats, SSRs)、简单序列长度多态性(Simple sequence length polymorphism, SLP)和短串联重复(Short tandem repeats, STRs)。由于微卫星具有高度的多态性和等显表达的特点,它被广泛应用于遗传学、生态学、进化生物学和保护生物学的研究中(O'Connell *et al.*, 1997; Jame *et al.*, 1996; 王伟等, 2004; 刘萍等, 2004; 高焕等, 2004)。

多元 PCR(Multiplex PCR)是一种在同一个反应中同时扩增两个或多个位点的聚合链式反应,不仅成功地应用于 DNA 分析的许多领域(Chamberlain *et al.*, 1988; Shuber *et al.*, 1993; Crisan, 1994),而且还成功地应用于病毒(Markoulatos *et al.*, 2000)、细菌(Hendolin *et al.*, 1997)和寄生虫的鉴定(Harris *et al.*, 1998)。由于微卫星检测仪器的限制和优化多元 PCR 条件的复杂性,许多实验室多元 PCR 的使用受到限制。多元 PCR 已用于一些鱼类(Neff

*et al.*, 2000; O'Reilly *et al.*, 1996)的微卫星遗传研究中,目前在鲍(Huang *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2004)、有些鱼类(周莉等, 2001; 杜长斌等, 2000)和虾类(徐鹏等, 2001)微卫星研究中多使用单位点 PCR(Single-locus PCR)。

本文中作者探讨了多元 PCR 在黑鲍微卫星遗传研究中的应用,以期水产生物微卫星的研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料和基因组 DNA 的提取

2003 年 1 月 13 日—2 月 16 日,在南澳大利亚采集黑鲍(*Haliotis rubra*)的四个自然群体,其中, Ringwood Reef 群体采集 47 个样品, Lipson Reef 群体一(位置一)采集 51 个样品, Gerloffs Bay 群体采集 16 个样品, Lipson Reef 群体二(位置二)采集 34 个样品。所有样品冰冻保存带回实验室,然后置于 -20℃ 保存。

分别取 0.5g 黑鲍的腹足肌,根据 Doyle 等(1987)的 CTAB 方法略加修改提取基因组 DNA。

\* 国家自然科学基金资助项目,30231013 号;福建省自然科学基金资助项目,B0110036 号。黎中宝,博士后,副教授, E-mail: lizhongbao@jmu.edu.cn

收稿日期:2004-08-06,收修改稿日期:2005-01-07

加50 $\mu$ l双蒸水,使 DNA 溶解,置于 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

## 1.2 单位点 PCR 扩增

在单位点 PCR 扩增时,除了使用一个单引物(包括正反引物)外,其他扩增条件完全同多元 PCR 扩增条件。

## 1.3 多元 PCR 扩增

所使用的 11 微卫星引物(每个微卫星引物包括正反引物)见表 1。PCR 扩增反应的总体积为 25 $\mu$ l。每个微卫星引物的扩增均使用多元 PCR 扩增,每个多元 PCR 反应包括: 2.5mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.4mmol/L dNTPs, 2.5 $\mu$ l 10 $\times$  PCR 缓冲液(包括 15mmol/L Tris-HCl, 50mmol/L KCl, pH 8.0), 0.25U 的 *Taq* 酶, 0.8 $\mu$ mol/L 四个微卫星的正向引物的混合液及 0.8 $\mu$ mol/L 反向引物的混合液(*H08*, *D03*, *G04* and *B04*), 或者 0.8 $\mu$ mol/L 另四个微卫星的正向引物的混合液及 0.8 $\mu$ mol/L 反向引物的混合液(*A08*, *A09*, *G01* and *H11*), 或者 0.6 $\mu$ mol/L 三个微卫星的正向引物的混合液及 0.6 $\mu$ mol/L 反向引物的混合液

(*CmrHr2.23*, *CmrHr1.24* and *CmrHr2.30*)。11 个微卫星引物在每个多元 PCR 反应比率见表 2。

PCR 扩增反应在 GeneAmp PCR system 9600 仪器上进行。对于 *CmrHr2.23*、*CmrHr1.24* 和 *CmrHr2.30* 三个引物, 扩增反应为 Touch Down PCR, 94 $^{\circ}$ C 变性 10min; 扩增反应包括 10 个循环: 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 60—55 $^{\circ}$ C 复性 30s, 每循环降 0.5 $^{\circ}$ C, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min; 然后 25 个循环: 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 55 $^{\circ}$ C 复性 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min; 最后在 72 $^{\circ}$ C 保温 10min。对于 *H08*、*D03*、*B04*、*G04*、*A08*、*A09*、*G01* 和 *H11* 八个引物, 扩增反应为: 93 $^{\circ}$ C 变性 10min; 扩增反应包括 35 个循环: 93 $^{\circ}$ C 变性 30s, 55 $^{\circ}$ C 复性 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min; 最后在 72 $^{\circ}$ C 保温 10min。

## 1.4 微卫星的检测和分析

2.5 $\mu$ l PCR 产物和 1 $\mu$ l 甲酰胺、0.6 $\mu$ l Genescan 500 标准分子量及 0.6 $\mu$ l loading dye 混合后, 94 $^{\circ}$ C 变性 2min。使用 4.8% 变性聚丙烯酰胺胶, 用 ABI PRISM<sup>TM</sup> 377 DNA 测序仪和 GenoScan<sup>TM</sup> 分析软件进行微卫星的检测和分析。

表 1 微卫星引物的序列、重复类型及 PCR 扩增条件

Tab. 1 Primer sequences, repeat types, and PCR conditions for microsatellite loci

引物	重复类型	引物的序列(5'—3')	退火温度 ( $^{\circ}$ C)	MgCl <sub>2</sub> (mmol/L)	来源
<i>H08</i>	四核苷酸	尚未发表其序列	55	2.5	MB*
<i>D03</i>	四核苷酸	尚未发表其序列	55	2.5	MB*
<i>B04</i>	四核苷酸	尚未发表其序列	55	2.5	MB*
<i>G04</i>	四核苷酸	尚未发表其序列	55	2.5	MB*
<i>A08</i>	四核苷酸	尚未发表其序列	55	2.5	MB*
<i>A09</i>	四核苷酸	尚未发表其序列	55	2.5	MB*
<i>G01</i>	四核苷酸	尚未发表其序列	55	2.5	MB*
<i>H11</i>	四核苷酸	尚未发表其序列	55	2.5	MB*
<i>CmrHr2.23</i>	(AC) <sub>16</sub>	F: TGGAAGCTTTTCAAACATTGG R: TACAATGGGGA TTAAGAAGC	55—60	2.5	AF302832**
<i>CmrHr1.24</i>	(AT) <sub>8</sub>	F: TTGGCAGIGATGGAAACTTG R: TTCCAAACTGACACAGACCG	55—60	2.5	AF194953**
<i>CmrHr2.30</i>	(GT) <sub>6</sub> ·(GT) <sub>13</sub> (TG) <sub>12</sub> (AG) <sub>5</sub> ·(TG) <sub>3</sub> ·(TG) <sub>16</sub>	F: TCTAGCATGTGCGAGGGAGG R: TGTGTCATTGTGCTCGAAAG	55—60	2.5	AF195959**

\* 维多利亚动物科学研究所[M. Baranski pers. comm (Victorian Institute of Animal Science)]

\*\* Genbank 进入号码(Accession number NCBI nucleotide database)

表 2 11 个微卫星引物在多元 PCR 中的比率  
Tab. 2 The rates of eleven primers in multiplex PCR

组类	引物	颜色	比率
A	<i>B04</i>	黄色	0.26
	<i>D03</i>	绿色	0.23
	<i>H08</i>	蓝色	0.25
	<i>G04</i>	蓝色	0.26
B	<i>A09</i>	绿色	0.24
	<i>H11</i>	黄色	0.26
	<i>A08</i>	蓝色	0.24
	<i>G01</i>	黄色	0.26
C	<i>CmrHr1.24</i>	黄色	0.333
	<i>CmrHr2.30</i>	绿色	0.333
	<i>CmrHr2.23</i>	蓝色	0.333

## 2 结果

### 2.1 单位点 PCR 扩增结果

分别对 *D03* 等 11 个微卫星引物进行单位点 PCR 扩增, 优化扩增条件(退火温度、 $MgCl_2$  等)。扩增产物电泳结果如图 1。*H08* 等其他 10 个微卫星引物单位点 PCR 扩增产物电泳结果如图 1 一样, 一条带清晰可见。

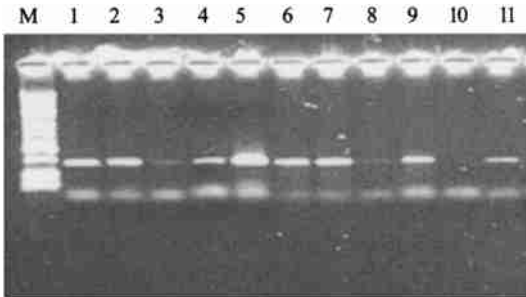


图 1 *D03* 微卫星引物在单位点 PCR 中的扩增产物电泳图

Fig. 1 The amplification product of *D03* primer in single-locus PCR

M 表示 100bp 标准分子量大小(图 2—图 4 同)

将 *D03* 等 11 个微卫星引物单位点 PCR 扩增产物用 ABI PRISM™ 377 DNA 测序仪进行微卫星的检测和 GenoScan™ 分析软件进行分析。根据微卫星的检测和分析结果, 得出 *D03* 等 11 个微卫星引物扩增出的相关位点等位基因大小变异范

围, 例如 *A09*、*H11*、*A08* 和 *G01* 位点等位基因大小变异范围分别在 184—232bp、214—290bp、262—298bp 和 143—175bp 之间。

### 2.2 多元 PCR 扩增结果

根据 *D03* 等 11 个微卫星引物单位点 PCR 扩增时优化的扩增条件(退火温度、 $MgCl_2$  等)、11 个微卫星引物所带有的荧光颜色、等位基因大小变异范围, 将 *D03* 等 11 个微卫星引物分成 A、B、C 三组进行多元 PCR 扩增(表 2)。例如, B 组: 在 *A09*、*H11*、*A08* 和 *G01* 位点, 扩增条件相同(退火温度、 $MgCl_2$  等)(表 1), 四个引物所带有的荧光颜色不同(*A09*、*H11*、*A08* 和 *G01* 分别为绿色、黄色、蓝色和黄色), 等位基因大小变异范围不同, 如上所述。

在第一次评估多元 PCR 实验时, 对于每个引物使用相同的浓度(0.2 $\mu$ mol/L)。由于反应灵敏度强弱不同, 必须调节各引物之间的比例。例如, 在 *A09*、*H11*、*A08* 和 *G01* 位点反应的灵敏度分别是强、弱、强和弱, 且 *A09* 和 *A08* 反应的灵敏度相当, *H11* 和 *G01* 反应的灵敏度相当。反应灵敏度强的, 在多元 PCR 中的比率低; 反应灵敏度弱的, 在多元 PCR 中的比率高, 因此 *A09*、*H11*、*A08* 和 *G01* 四个引物在多元 PCR 中的比率分别为 0.24、0.26、0.24 和 0.26(表 2)。同理可得 A 组和 C 组各引物之间的比率(表 2)。

分别对 A、B、C 三组进行多元 PCR 扩增。扩增产物电泳结果见图 2、图 3 和图 4, 条带间分离清晰可见。将多元 PCR 扩增产物用 ABI PRISM™ 377 DNA 测序仪进行微卫星的检测, 各位点的分离清晰可见。A 组: *D03*、*G04*、*B04* 和 *H08* 四个位点(从上到下依次为 *H08* 蓝色、*B04* 黄色、*D03* 绿色、*G04* 蓝色); B 组:

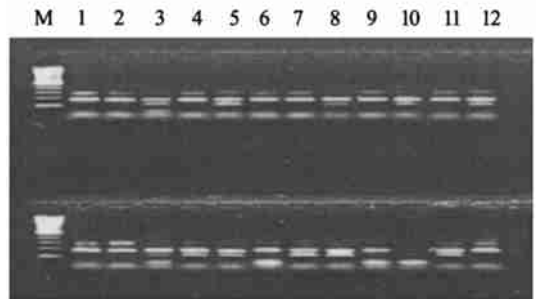


图 2 *D03*、*G04*、*B04* 和 *H08* 四个微卫星引物在多元 PCR 中的扩增产物电泳图

Fig. 2 The amplification product of four primers (*D03*, *G04*, *B04* and *H08*) in multiplex PCR

*A09*、*H11*、*A08* 和 *G01* 四个位点(从上到下依次为 *A08* 蓝色、*A09* 绿色、*H11* 黄色、*G01* 黄色); C 组: *CmrHr1.24*、*CmrHr2.30* 和 *CmrHr2.23* 三个位点(从上到下依次为 *CmrHr2.30* 绿色、*CmrHr2.23* 蓝色、*CmrHr1.24* 黄色)。然后用 GenoScan™ 分析软件进行分析,进行黑鮑的微卫星遗传研究。

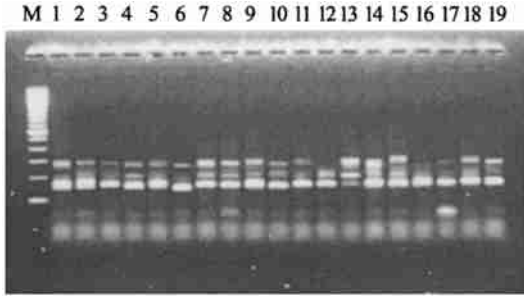


图3 *A09*、*H11*、*A08* 和 *G01* 四个微卫星引物在多元 PCR 中的扩增产物电泳图

Fig. 3 The amplification product of four primers (*A09*, *H11*, *A08* and *G01*) in multiplex PCR



图4 *CmrHr1.24*、*CmrHr2.30* 和 *CmrHr2.23* 三个微卫星引物在多元 PCR 中的扩增产物电泳图

Fig. 4 The amplification product of three primers (*CmrHr1.24*, *CmrHr2.30* and *CmrHr2.23*) in multiplex PCR

### 3 讨论

多元 PCR 是一种在同一个反应中同时扩增两个或多个位点的聚合链式反应。优化单位点 PCR 扩增条件,使单位点 PCR 扩增条件趋于一致,是进行多元 PCR 的基础。一个多元 PCR 成功的扩增,优化退火温度、 $MgCl_2$  的浓度、引物的相对浓度、dNTPs 的浓度、PCR 缓冲液的浓度、*Taq*DNA 聚合酶和模板 DNA 的量是非常必须的。但一般认为退火温度、 $MgCl_2$  的浓度和引物的相对浓度是最重要的三个因素(Henegariu *et al.*, 1997; Markoulatos *et al.*, 2002)。*Taq*DNA 聚合酶发生作用需要有镁离子的参与,因此  $MgCl_2$  浓度

是重要的影响因素之一。而  $MgCl_2$  浓度的优化主要依据 dNTPs 的浓度、PCR 缓冲液的浓度、*Taq*DNA 聚合酶和模板 DNA 的量。过量的镁离子可导致多余带的生成,镁离子的不足能减少 PCR 产物的量(Markoulatos *et al.*, 2002)。退火温度是另一个重要的影响因素,选择具备一致退火温度的单个位点,虽然这些单个位点能被同时扩增,但有效扩增的位点能影响非有效扩增位点 PCR 产物的量(Henegariu *et al.*, 1997; Markoulatos *et al.*, 2002)。具备不同退火温度的单个位点,在进行多元 PCR 时可使用 Touchdown PCR。Touchdown PCR 的温度开始于一个较高的退火温度,然后每一循环系统地降低  $0.5^\circ C$ ,直到一个期望的较低的退火温度(Rithidech *et al.*, 1997)。Touchdown PCR 能使具备不同退火温度的单个位点进行多元 PCR 扩增而没有人为带的产生(Fishback *et al.*, 1999)。*CmrHr1.24*、*CmrHr2.30* 和 *CmrHr2.23* 三个位点在进行多元 PCR 扩增使用了 Touchdown PCR。第三个重要的影响因素是引物的相对浓度。如果引物的相对浓度过高,就会形成引物二聚体;如果引物的相对浓度过低,就会减少 PCR 产物的量或者阻止 PCR 产物的形成(Markoulatos *et al.*, 2002),因此必须调节引物的相对浓度以避免引物二聚体的形成和 PCR 产物的量的减少。在第一次评估多元 PCR 实验时,对于每个引物使用相同的浓度( $0.2\mu mol/L$ )。根据反应灵敏度强弱的不同来调节各引物之间的比例,反应灵敏度强的,在多元 PCR 中的比率低;反应灵敏度弱的,在多元 PCR 中的比率高。因此,*A09*、*H11*、*A08* 和 *G01* 四个引物在多元 PCR 中的比率分别为 0.24、0.26、0.24 和 0.26(表 2)。同理可得 A 组和 C 组各引物之间的比率(表 2)。

虽然 B 组中,*A09*、*H11* 两位点的等位基因大小变异范围(*A09*: 184—232bp, *H11*: 214—290bp)有部分重叠,根据二者带有的荧光颜色不同(*A09* 绿色、*H11* 黄色),在用 ABI PRISM™ 377 DNA 测序仪进行微卫星的检测时,各位点的分离清晰可见。另外,贮存的 dNTPs 对反复的解冻/冷冻很敏感,使用经过 3—5 次解冻/冷冻循环后的 dNTPs,多元 PCR 通常不能很好地工作。但在进行单位点 PCR 扩增时,这种现象不明显,这与 Henegariu 等(1997)和 Markoulatos 等(2002)的研究结果一致。为了避免这种问题,少量分装 dNTPs 并贮存在  $-20^\circ C$  是非常必要的。

总之,在进行多元PCR扩增时,进行微卫星研究的位点应具备以下条件:(1)一致的PCR扩增条件(退火温度、 $MgCl_2$ 相对浓度等);(2)不重叠的等位基因大小变异范围;(3)其扩增引物带有不同的荧光颜色;(4)相似的反应灵敏度;(5)具高度的多态性。

多元PCR是一种快速和方便的研究方法,不仅能有效地节省大量的时间和实验室的经费支出,而且还大大地提高了微卫星检测仪器的使用效率。例如,在A09、H11、A08和G01四个位点的多元PCR中,多元PCR可节省四倍的时间和四倍的PCR实验药品及其消费品(*Taq* DNA聚合酶、微卫星引物、PCR缓冲液等)的支出。另外,每种微卫星检测仪器都有它的使用总时间的限制,使用多元PCR可以有效地提高仪器的使用效率。多元PCR还可以提高实验效果,在同一个多元PCR反应中,每一个PCR引物末端的寡核苷酸延伸能有效地提高联合扩增位点的数量和质量(Shuber *et al.*, 1995)。但多元PCR的一个现象是常优先扩增一个目标片段(相对另外的目标片段)(Mutter *et al.*, 1995),这是由PCR漂变(PCR drift)和PCR选择(PCR selection)导致的(Wagner *et al.*, 1994)。

微卫星具有等显表达和高度多态性的特点,已广泛应用于渔业资源的研究和管理之中。由于多元PCR具有上述优点,它必将在渔业资源的微卫星研究中发挥重要作用。

### 参 考 文 献

王伟, 尤 锋, 高天翔等, 2004. 山东近海牙鲆(*Pardalichthys divaceus*)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 [Wang W, You F, Gao T X *et al.*, 2004. Genetic variations at Ten microsatellite loci in natural and cultured stocks of left-eyed flounder *Pardalichthys divaceus* in Shandong Coastal Waters. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 35(6): 530—537]

刘 萍, 孟宪红, 何玉英等, 2004. 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)黄、渤海3个野生地理群遗传多样性的微卫星DNA分析. 海洋与湖沼, 35(3): 252—257 [Liu P, Meng XH, He Y Y *et al.*, 2004. Genetic diversity in three wild populations of shrimp *Fenneropenaeus chinensis* in Yellow and Bohai Seas as revealed by microsatellite DNA. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 35(3): 252—257]

杜长斌, 孙孝文, 楼允东等, 2000. 应用微卫星技术对野鲤和两种鲤选育品系的遗传多样性分析. 上海水产大

学学报, 9(4): 285—289 [Du C B, Sun X W, Lou Y D *et al.*, 2000. The genetic heterozygosity analysis to wild carp and two cultivated strains of common carp using microsatellite technique. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 9(4): 285—289]

周 莉, 刘静霞, 桂建芳, 2001. 应用微卫星标记对雌核发育银鲫的遗传多样性初探. 动物学研究, 22(4): 257—264 [Zhou L, Liu J X, Gui J F, 2001. Preliminary investigation on genetic diversity of gynogenetic silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Block) detected by microsatellite DNA. *Zoological Research*, 22(4): 257—264]

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(3): 255—259 [Xu P, Zhou L H, Xiang J H, 2001. Isolating microsatellite DNA of Chinese shrimp *Penaeus chinensis*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 32(3): 255—259]

高 焕, 刘 萍, 孟宪红等, 2004. 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)基因组微卫星特征分析. 海洋与湖沼, 35(5): 424—431 [GAO Huan, LIU Ping, MENG Xian-Hong, *et al.*, 2004. Analysis of microsatellite sequences in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* genome. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 35(5): 424—431]

Chamberlain J S, Gibbs R A, Ranier J E *et al.*, 1988. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res*, 16: 11141—11156

Crisan D, 1994. Molecular diagnostic testing for determination of myeloid lineage in acute leukemias. *Ann Clin Lab Sci*, 24: 355—363

Doyle J J, Doyle J L, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin*, 19: 11—15

Fishback A G, Danzmann R G, Sakamoto T *et al.*, 1999. Optimization of semi-automated microsatellite multiplex polymerase chain reaction systems for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 172: 247—254

Harris E, Kropp G, Belli A *et al.*, 1998. Single step multiplex PCR assay for characterization of New World Leishmania complexes. *J Clin Microbiol*, 36: 1989—1995

Hendolin P H, Markkanen A, Ylikoski J *et al.*, 1997. Use of multiplex PCR for simultaneous detection of four bacterial species in middle ear effusions. *J Clin Microbiol*, 35: 2854—2858

Henegariu O, Heerema N A, Dlouhy S R *et al.*, 1997. Multiplex PCR: Critical Parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*, 23: 504—511

Huang B X, Peakall R, Hanna P J, 2000. Analysis of genetic structure of blacklip abalone (*Haliotis rubra*) populations

- using RAPD, minisatellites and microsatellites markers. *Marine Biology*, 136: 207—216
- Jame P, Lagoda J L, 1996. Microsatellite, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*, 8: 285—288
- 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
- Markoulatos P, Georgopoulou A, Kotssovassilis C *et al*, 2000. Detection and typing of HSV-1, HSV-2 and VZV by a multiplex polymerase chain reaction. *J Clin Lab Anal*, 14: 214—219
- Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M, 2002. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 16: 47—51
- Mutter G L, Boyton K A, 1995. PCR bias in amplification of androgen receptor alleles, a trinucleotide repeat marker used in clonality studies. *Nucleic Acids Res*, 23: 1411—1418
- Neff B D, Fu P, Gross M R, 2000. Microsatellite multiplexing in fish. *Transactions of the American Fisheries Society*, 129: 584—593
- Nielsen J L, Gan C A, Wright J M *et al*, 1994. Biogeographic distribution of mitochondrial and nuclear markers for southern steelhead. *Mol Mar Biol Biotech*, 3: 281—293
- O'Connell M O, Wright J M, 1997. Microsatellite DNA in fishes. *Review of Fish Biology and Fisheries*, 7: 331—363
- O'Reilly P T, Hamilton L C, McConnell S K *et al*, 1996. Rapid analysis of genetic variation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) by PCR multiplexing of dinucleotide and tetranucleotide microsatellites. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53: 2292—2298
- Rithidech K N, Dunn J J, Gordon C R, 1997. Combining multiplex and touchdown PCR to screen murine microsatellite polymorphisms. *BioTechniques*, 23: 36—44
- Shuber A P, Skoletsky J, Stem R *et al*, 1993. Efficient 12-mutation testing in the CFTR gene: a general model for complex mutation analysis. *Hum Mol Genet*, 2: 153—158
- Shuber A, Grondin V J, Klinger K W, 1995. A simplified procedure for developing multiplex PCRs. *Genome Research*, 3: 488—493
- Tautz D, 1989. Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res*, 17: 6463—6471
- Wagner A, Blackstone N, Cartwright P *et al*, 1994. Surveys of gene families using polymerase chain reaction: PCR selection and PCR drift. *SystBiology*, 43: 250—261

## MULTIPLEX PCR APPLICATION IN MICROSATELLITE OF *HALIOTIS RUBRA*

LI Zhong-Bao, Appleyard Sharon A, Elliott Nicholas G

(Fisheries College, Jimei University, Xiamen, 361021; CSIRO Marine Research, GPO Box 1538, Hobart, Tasmania 7001, Australia)

(CSIRO Marine Research, GPO Box 1538, Hobart, Tasmania 7001, Australia)

**Abstract** Multiplex polymerase chain reaction (multiplex PCR) is a variant of PCR in which two or more loci are simultaneously amplified in a same reaction. The application of it would enhance largely the genetic research on fishery resource and management.

An efficient multiplex PCR requires generally a strategy to optimize reaction conditions. For a successful multiplex PCR assay, it is important that the cycling temperatures, concentration of MgCl<sub>2</sub>, relative concentration of the primers, concentration of dNTPs, concentration of PCR buffer, and the amount of template DNA and *Taq* DNA polymerase.

Eleven microsatellite loci screened (*H08*, *G04*, *D03*, *B04*, *A08*, *A09*, *G01*, *H11*, *CmrHr2.23*, *CmrHr1.24* and *CmrHr2.30*) were used. Single-locus PCR protocol is the same as multiplex PCR protocol described below, except that it uses only a single primer pair. Loci for multiplexing have consistent amplification conditions (annealing temperature and MgCl<sub>2</sub> concentration), allele length distributions that do not overlap, similar product intensity, and different fluorescent colour of their primers. We divided eleven screened microsatellite loci into three groups for multiplex PCR. The first group contained four loci (*H08*, *G04*, *D03* and *B04*); the second group had four loci (*A08*, *A09*, *G01* and *H11*) and the third one, three loci (*CmrHr2.23*, *CmrHr1.24* and *CmrHr2.30*).

Multiplex PCR amplifications were performed in a total volume of 25 μl. All loci were amplified in a multiplex PCR reaction containing 2.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mmol/L dNTPs, 2.5 μl 10 × PCR gold buffer (which contains 15 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, pH 8.0), 0.25 units *Taq* DNA polymerase, 0.8 μmol/L primer mixed forward and backward for the first and second, or 0.6 μmol/L primer mixed forward and backward for group three, and 2 μl 1/10 dilution of template DNA.

All PCRs were conducted in GeneAmp PCR System 9600 thermal cycler. For group three, the multiplex PCR conditions began with an initial denaturation step of 10 min at 94 °C. Amplification included 10 cycles of denaturation at 94 °C for 30s; annealing at 60–55 °C for 30s, dropping 0.5 °C per cycle; and extending at 72 °C for 1min, followed by 25 more cycles of denaturation at 94 °C for 30s; annealing at 55 °C for 30s, and extending at 72 °C for 1min. The PCR conditions ended with a final extension step of 10min at 72 °C. For the first and second groups, the multiplex PCR conditions began with an initial denaturation step of 10min at 93 °C. Amplification included 35 cycles of denaturation at 93 °C for 30s, annealing at 55 °C for 30s, and extending at 72 °C for 1min. The PCR conditions ended with a final extension step of 10min at 72 °C.

Samples were run on an ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer, and genotypes were determined using Software GenoScan™. The results showed that loci were separated well in three groups: from top to bottom, for Group one: *H08*: blue; *B04*: yellow; *D03*: green; *G04*: blue; as well as for Group two members Group two: *A08*: blue; *A09*: green; *H11*: yellow; *G01*: yellow, and Group three 2.30: green; 2.23: blue; 1.24: yellow.

Multiplex PCR is a rapid and convenient method for wide application in genetic studies. In general, multiplex PCR is an advanced technique that can significantly reduce the time and cost associated with microsatellites analyses in abalone in our case, and also increase the efficiency of apparatus associated with microsatellites analyses and improve the quality and quantity of loci coamplified.

**Key words** Microsatellites, *Haliotis rubra*, Multiplex PCR, TouchDown PCR