

红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)性别差异 微卫星标记的筛选*

岳亮^{1,2} 马爱军¹ 赵艳飞¹ 王新安¹ 何伟国¹
孟雪松³ 翟介明⁴ 刘圣聪³

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室 青岛 266071; 2. 上海海洋大学 上海 201306; 3. 大连天正实业有限公司 大连 116000; 4. 莱州明波水产有限公司 烟台 261418)

提要 采用以 BSA 为基础的微卫星标记技术对红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)雌、雄群体进行性别差异标记筛选的研究。用雌、雄各 30 个个体构建雌、雄基因池, 利用 66 对微卫星引物扫描雌、雄基因池。在雌、雄基因池中扩增出差异常带的引物有 8 对。用两个各包括 30 个雌、雄个体的群体对这 8 对引物进行两轮个体验证。结果表明, 引物 f383 在两个雌、雄群体中扩增出的差异条带与性别都呈极显著相关性(r 分别为 0.710 和 0.673)($P < 0.01$), f383 是与红鳍东方鲀雄性呈正相关的微卫星标记。红鳍东方鲀性别差异微卫星标记的获得, 为其性别相关基因的克隆和性别决定机制的研究提供理论基础。

关键词 红鳍东方鲀; 微卫星; 性别差异

中图分类号 Q953 **doi:** 10.11693/hyhz20120629001

鱼类在脊椎动物的系统进化中处于承前启后的关键地位, 与鱼类性别有关的研究是国际上的科研热点。鱼类进化历史长久, 演化分支繁多(尚晓莉等, 2010), 作为低等脊椎动物, 其性别决定和分化机制相当复杂, 鱼类的性别决定机制具有原始性、多样性和易变性, 并具有所有脊椎动物的性别决定方式(文爱韵等, 2008)。鱼类性别发育是以遗传基因为基础, 并受到自身内分泌调节和外界环境的影响, 是三者相互作用的结果(高建军等, 2010), 这在一定程度上给鱼类性别相关的研究增加难度。鱼类性别相关的研究既具有重要的理论价值, 又具有可观的实用价值, 一直吸引着国内外鱼类研究者的极大关注。分子生物学技术的快速发展为研究者们指明了方向。DNA 分子标记具有标记位点多、标记稳定可靠、特异性强、实验重复性强等特点(刘云国等, 2009), 为辨别鱼类

的性别开辟了出路。RFLP、RAPD、AFLP 和 SSR 等是常用的分子标记技术。微卫星 DNA 以其保守性好、易于检测、多态性高、共显性遗传、在基因组中均匀分布等特点被广泛应用于遗传图谱的构建、品系间的遗传结构特点及性状与位点的连锁分析等方面的研究(徐兴莉等, 2011)。微卫星标记技术也被用于寻找与鱼类性别相关的分子标记。在虹鳟微卫星遗传连锁图谱的研究中, Sakamoto 等(2000)在雄性图谱中发现两个与性别决定位点连锁的微卫星标记 OmyFGT19-TUF 和 OmyRGT28TUF。随后, 另外两个与虹鳟雄性性别决定位点连锁的微卫星标记 Ots517NWFSC 和 Ssa1NVH 被 Woram 等(2003)发现。Stein 等(2002)从红点鲑的 Y 染色体分离出与性别连锁的微卫星位点 Yp136。Waldbieser 等(2001)在构建沟鲈(*Ictalurus punctatus*)遗传连锁图谱的过程中, 发现 7 个与性别

* 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(20603022012005)资助。岳亮, 硕士研究生, E-mail: liang7650960@163.com

通讯作者: 马爱军, 博士, 研究员, 博士生导师, E-mail: maaj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2012-06-29, 收修改稿日期: 2012-10-23

决定位点紧密连锁的微卫星位点。Lee 等(2004)在奥利亚罗非鱼中发现 11 个与表型性别连锁的微卫星标记。目前,国内有关应用微卫星 DNA 标记技术已经筛选出的鱼类性别差异标记的报道罕见。

红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*), 隶属于鲀形目(Tetraodontiformes)、鲀科(Tetraodontidae)、东方鲀属(*Takifugu*), 是暖水性海洋底栖鱼类, 味道鲜美、规格较大、肉质比较紧、营养丰富、经济价值高, 为我国北方地区的优良海水养殖鱼类之一。由于红鳍东方鲀的卵巢有剧毒, 而精巢无毒, 口感嫩滑, 受到美食者青睐, 因而, 雄性红鳍东方鲀的市场价值更高。因此, 开展红鳍东方鲀性别差异分子标记筛选的研究, 在早期生长阶段筛选出雄性鱼种养殖, 对提高红鳍东方鲀的经济效益和市场价值有重要的现实意义, 也为其性别决定机制和性别相关基因的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用的两批红鳍东方鲀样品, 第一批来自烟台市莱州明波水产有限公司, 雌、雄各 30 尾, 体长为 33—39cm, 体重为 1.18—1.95kg; 第二批来自大连天正实业有限公司, 雌、雄各 30 尾, 体长为 36—43cm, 体重为 1.52—2.98kg。解剖后观察性腺, 辨别出雌、雄, 每尾鱼取少量尾鳍于离心管中, 编号后至于 -20°C 冰箱保存。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取和 BSA 基因池的建立 从 -20°C 冰箱中取出保存的样品, 快速剪取 30mg 尾鳍, 用海洋动物基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA。提取的 DNA 样品用核酸测序仪测定浓度和 A_{260}/A_{280} 值。每个 DNA 样品取出部分稀释到 $50\text{ng}/\mu\text{L}$, 其余 DNA 原液放在 -20°C 冰箱保存。

雌、雄个体各 30 个, 从稀释到 $50\text{ng}/\mu\text{L}$ 的 DNA 溶液中各取 $10\mu\text{L}$ 混合成相应的雌、雄基因池, -20°C 保存基因池样品。

1.2.2 引物合成及 PCR 扩增 从 Kai 等(2011)与红鳍东方鲀遗传连锁图谱有关的文章中挑选 66 对雌、雄图谱中特异的微卫星引物。PCR 反应体系为: $10\times$ Taq buffer $1.6\mu\text{L}$, dNTPs $1.3\mu\text{L}$ (2.5mmol/L), DNA $1.2\mu\text{L}$ ($50\text{ng}/\mu\text{L}$), Taq 酶 $0.2\mu\text{L}$ ($5\text{U}/\mu\text{L}$), 上下游引物各 $0.7\mu\text{L}$ ($10\mu\text{mol/L}$), 加无菌双蒸水补至 $20\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序: 94°C 预变性 5min; 94°C 变性 30s, 退火 30s, 退火温度依引物而异, 72°C 复性 30s, 30 个循环; 72°C

延伸 10min, 4°C 保存。取 PCR 扩增产物 $5\mu\text{L}$ 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 记录具有稳定扩增产物的引物。

1.2.3 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 PCR 扩增产物经 94°C 变性 5min, 冰浴 10min, 用 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。电泳条件: 电压 490V, 电流 60mA, 功率 28W。先预电泳 30min, 上样后电泳 2h 左右。

1.2.4 差异条带的筛选 记录并分析聚丙烯酰胺电泳条带, 通过雌、雄基因池的电泳结果, 初步筛选在两基因池间能扩增出差异等位基因片段的微卫星位点。用相应的引物, 按照上述的 PCR 反应条件对雌、雄各 30 个红鳍东方鲀个体进行 PCR 扩增。分析有差异的引物在个体上的具体扩增情况。如果差异等位基因片段在雌、雄群体中出现次数差异极显著, 则作为候选的性别特异微卫星标记, 其对应的引物作为下一轮验证的候选引物。

以第二批红鳍东方鲀雌、雄各 30 个个体基因组 DNA 为模板, 用候选的引物按照相同的条件进行 PCR 扩增和聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 验证候选标记的准确性。

1.2.5 差异等位基因片段的回收 利用无外源 DNA 污染的手术刀从 8% 的变性聚丙烯酰胺凝胶上切目的条带, 放入盛有 $20\mu\text{L}$ 去离子水的 1.5mL 离心管中, 用剪刀剪碎, 置于 4°C 过夜, 使胶中的 DNA 尽可能地溶解到液体中(刘昕, 2011)。然后, $12000\text{r}/\text{min}$ 离心约 2min, 仔细吸取上清作为再次 PCR 扩增的模板, 按照上述 PCR 体系和程序进行反应。1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 用琼脂糖凝胶回收试剂盒(TIAN gel Midi Purification Kit)回收目的条带。按照 pGM-T 克隆试剂盒的说明, 将目的 DNA 片段克隆到 pGM-T 载体上, 将阳性克隆送到上海生工生物工程公司测序。利用 Chromas 软件对测序结果剪切和拼接(只留下红鳍东方鲀本身的基因组序列), 用 DNASTAR 软件中的 SeqMan 对同一标记的多个序列进行比对来确定 DNA 序列, 通过数据库 BLAST 比对, 搜索该序列的同源序列。

2 结果

2.1 基因组 DNA 的提取

通过试剂盒提取的红鳍东方鲀雌、雄群体基因组 DNA, 经过分光光度计检测, A_{260}/A_{280} 值在 1.8—2.0 之间。琼脂糖凝胶电泳图片显示 DNA 片段较完整, 没有大量蛋白和 RNA 存在, 说明 DNA 质量较高。图 1 为部分 DNA 电泳图。

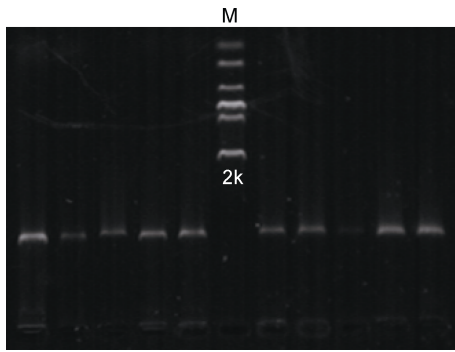


图 1 样品 DNA 电泳图
Fig.1 DNA electrophoretogram of samples
M: DL2000 DNA 标记

表 1 8 对微卫星标记引物序列

Tab. 1 Sequences of eight pairs of microsatellite markers primers

引物名称	上游引物(5'—3')	下游引物(5'—3')
f172	ccaccacctcagggttcta	cgcttgattgtctcaaac
f383	atagccggtgtccgtcatac	ccttgattgtccaacacg
f638	tctgcacaacatcccgagt	agcgcaggaggcagtttat
f1497	cacctccccaaagttaag	tgaagcccaagagaggaaa
f1050	acgtgtacgtgtgcttcagg	ccatgatgcctttgatgatg
f1372	gaggacatccgatcacatcc	cctgcaggaggaaataccg
f1637	cctgaagcacacactgcaag	cctgatgacacctgctctga
f152	gatcacctcctcaactggcaactc	tectcaagatcagatggcaaac

2.2 BSA 分池及 PCR 扩增结果分析

用 66 对引物对所构建的雌、雄基因池进行 PCR 扩增, 用 8% 的变性聚丙烯酰胺凝胶对 PCR 产物电泳检测, 检测结果显示: 在雌、雄基因池中扩增出差异条带的引物有 8 对, 分别为 f172、f383、f638、f1497、f1050、f1372、f1637、f152。引物序列见表 1。电泳结果如图 2 所示。

2.3 差异等位基因片段在个体中的验证

将 BSA 池中筛选到的 8 对引物在构建基因池的雌、雄各 30 个个体中进行 PCR 扩增, 通过 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 分析差异等位基因片段在不同雌、雄个体的扩增情况。结果发现: 引物 f1050

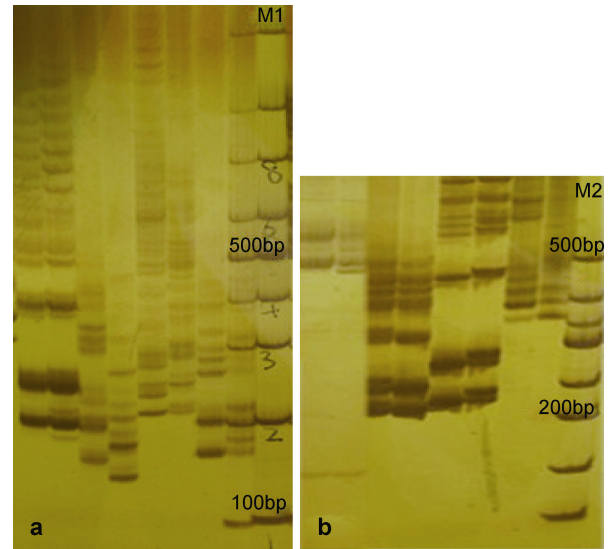


图 2 引物 f172、f383、f638、f1497、f1050、f1372、f1637、f152 在 BSA 中的扩增条带
Fig.2 The bands amplified by primers f172, f383, f638, f1497, f1050, f1372, f1637, f152 in BSA
a. 引物 f172、f383、f638、f1497 在 BSA 中的扩增条带; b. 引物 f1050、f1372、f1637、f152 在 BSA 中的扩增条带。M1. 100bp DNA 标记; M2. 50bp DNA 标记

在 30 个雌性个体中均未扩增出条带, 在 30 个雄性个体中有 8 个个体扩增出条带; 引物 f383 在几乎所有 (28/30) 雄性个体中扩增出条带, 在个别 (7/30) 雌性个体中出现条带。这与 BSA 扩增结果一致。结果见图 3。

用第二批红鳍东方鲀群体雌、雄各 30 个个体对 f1050 和 f383 这两对引物进行第二轮的个体验证显示: 引物 f1050 在雌、雄群体间的扩增条带数无显著差异, 而引物 f383 在雌性群体中只有极个别 (3/30) 个体中扩增出条带, 在雄性群体 30 个个体中有 23 个个体扩增出条带。具体结果如图 4 所示。

结合图 3 和图 4 分析, 引物 f383 经过 2 个红鳍东方鲀群体共 120 个个体的验证, 在雌、雄个体中扩增出的条带都出现差异极显著的结果, 差异等位基因片段在 60 个雌性个体中出现 10 次, 频率很低, 为

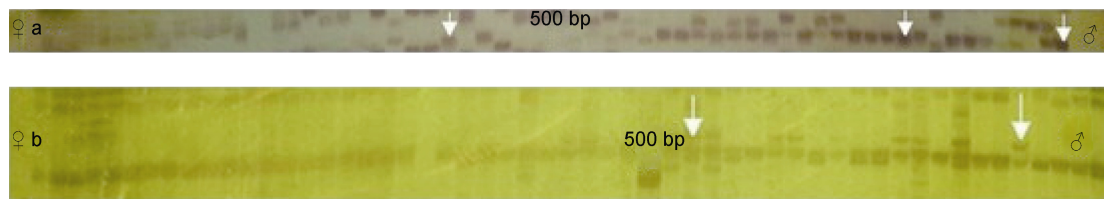


图 3 引物 f383(a)和 f1050(b)在雌、雄群体中扩增的显著差异条带
Fig.3 Significantly different bands amplified by primers f383 (a) and f1050 (b) in the female and male population

的出现率为 50.83%。

与红鳍东方鲀雄性呈正相关的微卫星标记在雌性个体中出现的频率是 16.7%，在雄性个体中出现的频率是 85.0%。说明该微卫星标记不是红鳍东方鲀雄性特异的分子标记，而是与雄性紧密连锁的标记，得到此结论可能有如下原因：(1) 实验所用材料不是来自同一家系，环境条件不相同，可能对红鳍东方鲀的表型性别有影响，导致少数个体的基因型和表型相悖；(2) 红鳍东方鲀不存在性染色体或性染色体的分化程度较低。舒琥等(2010)在鲀形目染色体组型分析的研究中未发现红鳍东方鲀具有异型性染色体，为该推测提供了理论基础；(3) 在减数分裂过程中发生染色体交换重组(杨东, 2006)。

Kai 等(2011)发现，以目前红鳍东方鲀完整的 Tru19(总长度为 16Mb)图谱为基础，性别决定基因可能位于跨度为 5Mb 的区域，该区域位于大的常染色体一样的区域侧翼。这对本实验引物的选择有重要的指示性作用，在此基础上选择第 19 号染色体上的所有引物进行实验。Kikuchi 等(2007)通过基因组范围的关联分析表明，第 19 号连锁群的单一染色体区域决定红鳍东方鲀的性别，而本实验筛选的性别差异引物 f383 来自 Kai 等(2011)构建的红鳍东方鲀遗传连锁图谱第 19 号染色体，这与 Kikuchi 等(2007)的研究结果相符合。

红鳍东方鲀性别差异微卫星标记的获得，为其性别相关基因的克隆和性别决定机制的研究提供理论基础。以该标记为基础的红鳍东方鲀性别鉴定技术可以在早期生长阶段对红鳍东方鲀进行性别选择，实现分子标记辅助育种，这对生产实践具有重要的指导作用和现实意义，为红鳍东方鲀产业的发展提供更大的发展空间。

参 考 文 献

- 马洪雨, 2009. 三种重要海水养殖鱼类性别特异标记和微卫星标记开发及遗传连锁图谱构建. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 13
- 文爱韵, 尤 锋, 徐永立等, 2008. 鱼类性别决定与分化相关基因研究进展. 海洋科学, 32(1): 74—80
- 刘 昕, 2011. 孔雀鱼遗传连锁图谱的构建及性别特异标记的筛选. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 39
- 刘云国, 刘贤德, 高 焕等, 2009. 水产生物 DNA 分子标记技术. 北京: 科学出版社, 1—2
- 刘改艳, 2011. 乌鳢、斑鳢性别差异 SSR 标记的初步筛选及其遗传多样性分析. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 13
- 李 静, 陈松林, 邓思平等, 2007. 半滑舌鳎雌性特异扩增片段长度多态性标记的筛选与应用. 水产学报, 31(5): 591—597
- 陆丽君, 2012. 红鳍东方鲀国内主要养殖区养殖群体性别相关微卫星标记筛选. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 1
- 尚晓莉, 曲宪成, 2010. 鱼类性别决定和性别分化机制研究进展. 江苏农业科学, 4: 245—248
- 姚延丹, 2009. 鱼类性别决定及其研究方法进展. 上海海洋大学学报, 18(1): 95
- 徐兴莉, 杨 虎, 2011. 微卫星 DNA 标记技术的特点及其在动物研究中的应用. 遗传育种, 272: 34—35
- 高建军, 高泽霞, 王卫民, 2010. 鱼类性别决定及性别特异分子标记的研究进展. 水产科学, 29(7): 432—437
- 舒 琥, 蔡晓阅, 刘 锋等, 2010. 鲀形目 3 种鱼的染色体组型分析. 动物学杂志, 45(2): 101—106
- Devlin R H, Nagahama Y, 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture, 208 : 191—364
- Hammerman I S, Avtalion R R, 1979. Sex determination in *Sarotherodon* (Tilapia). Theoretical and Applied Genetics, 55: 177—187
- Kai W, Kikuchi K, Tohari S *et al*, 2011. Integration of the genetic map and genome assembly of *Fugu* facilitates insights into distinct features of genome evolution in teleosts and mammals. Genome Biol Evol, 3: 424—442
- Kikuchi K, Kai W, Hosokawa A *et al*, 2007. The sex-determining locus in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes*. Genetics, 175: 2039—2042
- Lee B-Y, Hulata G, Kocher T D *et al*, 2004. Two unlinked loci controlling the sex of blue tilapia (*Oreochromis aureus*). Heredity, 92: 543—549
- Sakamoto T, Danzmann R G, Gharbi K *et al*, 2000. A microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) characterized by large sex-specific differences in recombination rates. Genetics, 155: 1331—1345
- Stein J, Reed K M, Wilson C C *et al*, 2002. A sex-linked microsatellite locus isolated from the Y chromosome of lake charr, *Salvelinus namaycush*. Environmental Biology of Fishes, 64: 211—216
- Waldbieser G C, Bosworth B G, Nonneman D J *et al*, 2001. A microsatellite-based genetic linkage map for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Genetics, 158: 727—734
- Woram R A, Gharbi K, Sakamoto T *et al*, 2003. Comparative genome analysis of the primary sex-determining locus in salmonid fishes. Genome Res, 13: 272—280

SCREENING OF MICROSATELLITES GENDER-INDICATIVE MARKERS OF *TAKIFUGU RUBRIPES*

YUE Liang^{1,2}, MA Ai-Jun¹, ZHAO Yan-Fei¹, WANG Xin-An¹, HE Wei-Guo¹,
MENG Xue-Song³, ZHAI Jie-Ming⁴, LIU Sheng-Cong³

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Qingdao 266071, China; 2. Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Dalian Tianzheng Industrial Co. Ltd., Dalian 116000, China; 4. Laizhou Mingbo Aquatic Products Co. Ltd., Yantai 261418, China)

Abstract To determine the gender differences of male and female populations of *Takifugu rubripes*, we screened the microsatellites based on bulked segregation analysis (BSA). Two gene pools were constructed with 60 individuals each containing 30 males and females, and scanned by 66 pairs of microsatellite primers, from which eight pairs of microsatellite primers of different bands were amplified and verified for the first round in the 60 individuals. The results show that the bands amplified by primers f1050 and f383 in male and female individuals differed significantly. And in the second round verification, bands amplified by primers f1050 in male and female individuals did not differ significantly, while bands amplified by primers f383 in male and female individuals differed significantly. In other words, primer f383 occurred in male individuals in two rounds of verification in coefficient 0.710 and 0.673, respectively, it is paternity-indicative for *T. rubripes*. The discovery shall provide a theoretical basis for gender-related gene cloning and sex determination.

Key words *Takifugu rubripes*; microsatellite; gender differences