

长牡蛎(*Crassostrea gigas*)微卫星多重 PCR 体系构建及其在家系鉴定中的应用*

纪仁平^{1,2} 李焕军² 冯艳微² 张荣良^{1,2} 王卫军² 杨建敏²

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;

2. 山东省海洋资源与环境研究院 海洋生态修复重点实验室 烟台 264006)

摘要 筛选多态性高、特异性好、片段大小适中的 10 个长牡蛎微卫星位点进行优化组合, 根据扩增片段大小及同一荧光不重叠原则构建了两组五重 PCR 体系。运用 CERVUS 3.0 软件对 0527 组 27 个长牡蛎全同胞家系的 643 个子代和 0612 组 27 个全同胞家系 382 个子代分别进行亲权鉴定。结果发现, 用两组微卫星五重 PCR 鉴别时, 在 0527 组和 0612 组的鉴定成功率均为 100%; 只用第一组微卫星五重 PCR, 可以将 0527 组 96% 的子代和 0612 组 96% 的子代鉴定到亲本; 只用第二组微卫星五重 PCR, 可以将 0527 组 97% 的子代和 0612 组 95% 的子代鉴定到亲本。本研究中筛选出的两组微卫星五重 PCR 体系在两组家系中的鉴定效率均较高, 可以快速有效地将子代个体鉴定至所属父母本, 在长牡蛎家系鉴定中具有很好的应用价值。

关键词 长牡蛎; 微卫星; 五重 PCR; 亲子鉴定

中图分类号 S917.4 doi: 10.11693/hyhz20150900231

长牡蛎(*Crassostrea gigas*), 地方名蚝、蛎黄、海蛎子、蚶等, 属于珍珠贝目、牡蛎科、巨蛎属。长牡蛎自然分布于西太平洋海域, 是一种广温、广盐性贝类。牡蛎因其肉质鲜美, 营养丰富, 环境适应性强, 生长快速, 而成为我国乃至全世界养殖产量最大的一种经济贝类。近几年长牡蛎的养殖规模越来越大, 产量也大幅度提高, 但其种质却出现明显的退化。因此, 良种选育是我国长牡蛎养殖产业健康可持续发展亟待解决的问题, 而微卫星分子标记技术可为长牡蛎群体遗传多样性分析和家系亲权鉴定等方面的研究提供技术支持。

在水产动物研究领域, 微卫星标记因其具有高多态性, 共显性遗传等特点, 已在分子标记辅助育种和家系分析等方面得到广泛的应用。20 世纪 80 年代, Chamberlain 等(1988)首次尝试了多重 PCR 反应模式, 即在同一 PCR 反应体系中加入多对微卫星引物, 同时进行多个目标序列的扩增分析。多重 PCR 技术具

有省时高效、高通量、低成本等优点, 且可有效减少靶基因片段的假阳性现象, 检验效率得到明显提高(罗伟等, 2013)。因此, 微卫星多重 PCR 为水生生物亲权关系分析(Lerceteau-Köhler *et al*, 2006)、种质鉴定(王婷等, 2013)、群体遗传分析(Li *et al*, 2007)、遗传分离模式分析(聂鸿涛等, 2013)等研究提供了有力的工具。目前关于长牡蛎微卫星多重 PCR 已有报道, 但一般都是三重或四重微卫星 PCR 反应体系(Li *et al*, 2010; Taris *et al*, 2005)。本研究从已报道的长牡蛎微卫星中开发出了两组微卫星五重 PCR 反应体系, 并在 2012 年构建的 0527 组和 0612 组的各 27 个全同胞家系的亲权鉴定中得以应用。

1 材料与amp;方法

1.1 家系样品的构建

本实验家系材料的构建于 2012 年 5 月 27 日(记

* 国家自然科学基金青年项目, 31402298 号; 山东省农业良种工程项目——大宗经济贝类新品种选育及应用; 黄河三角洲学者——海洋生物遗传育种岗位; 烟台市科技发展计划项目, 2015ZH073 号。纪仁平, 硕士研究生, E-mail: jrping19890723@163.com

通讯作者: 杨建敏, 研究员, E-mail: ladderup@126.com; 王卫军, 博士, E-mail: wwj2530616@163.com

收稿日期: 2015-09-06, 收修改稿日期: 2015-09-24

为 0527 组)和 6 月 12 日(记为 0612 组)在山东省烟台海益苗业有限公司莱州育苗场(LZ, 37°26'1"N, 120°02'15"E)进行。实验所用亲贝为经过四代选育的中日韩三个群体。每个群体分别选取 3 个父本和 3 个母本个体作为亲贝, 0527 组和 0612 组都采用表 1 所

示的部分因子实验设计的方式分别建立 27 个全同胞家系; 当各家系发育至 D 形幼虫期时, 计密度并将各家系幼虫等量混合, 然后进行混合培育。取 0527 组和 0612 组各 18 个亲本的闭壳肌保存于 70%乙醇中用于 DNA 的提取。

表 1 27 个长牡蛎全同胞家系的构建
Tab. 1 The construction for 27 full-sib families of the Pacific oyster

亲贝	中国 F4 选育群体			日本 F4 选育群体			韩国 F4 选育群体		
	♀1	♀2	♂♀	♀4	♀5	♀6	♀7	♀8	♀9
中国 F4 选育群体	♂1	F01			F13				F25
	♂2	F02	F04			F16			
	♂3		F05	F07			F19		
日本 F4 选育群体	♂4		F08	F10				F22	
	♂5			F11	F14				F26
	♂6	F03			F15	F17			
韩国 F4 选育群体	♂7		F06			F18	F20		
	♂8			F09			F21	F23	
	♂9				F12			F24	F27

1.2 样品采集及 DNA 提取

当养成至 560 日龄时, 对两个实验组进行取样。随机选取 0527 组 653 个子代和 0612 组 382 个子代个体的闭壳肌保存于 70%乙醇中用于提取 DNA。各实验组子代和亲本基因组 DNA 的提取按照 Li 等(2002)氯仿/异戊醇法, 通过分光光度计和 1%琼脂糖凝胶检测 DNA 样品的浓度和纯度, 并将 DNA 浓度调至 30ng/μL, -20°C 保存备用。

1.3 长牡蛎微卫星位点的筛选

从已开发的长牡蛎微卫星中, 根据微卫星位点的多态性、序列重复单位、连锁信息, 以及扩增效果等筛选出 43 个位点(Li *et al.*, 2003; Sauvage *et al.*, 2009)。微卫星引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。每个位点最佳 PCR 扩增条件用 10 个个体检测。以引物的多态性, 条带大小及清晰程度, 扩增效率等作为筛选条件, 挑选出扩增效果最好的 10 个微卫星位点用于多重 PCR 的开发, ucdCg149, ucdCg109, ucdCg140, ucdCg181, ucdCg170, ucdCg112, ucdCg129, ucdCg134, ucdCg162, ucdCg151 (Li *et al.*, 2003)和 CGSIL139 (Sauvage *et al.*, 2009) (表 2)。将 10 个位点分为两组, 每组中用四种颜色的荧光标记(HEX, FAM, ROX 和 TAMRA), 构成两组微卫星五重 PCR 反应体系 (Multiplex Set 1, MS 1; Multiplex Set 2, MS 2)。

1.4 PCR 产物检测

PCR 扩增产物与高度去离子甲酰胺(HIDI)和分

子量内标 GeneScan ROX500/LIZ500 (美国 ABI 公司)以产品说明中要求的比例进行混合, 变性 5min 后迅速冷却, 于 3730 XL 测序分析仪(美国 ABI 公司)上进行检测分析。用 Genemapper v.3.7 软件(美国 Applied Biosystems 公司)分析 DNA 片段大小。

1.5 微卫星标记优化组合

根据适于同时扩增的位点最大化且同一荧光标记的位点间等位基因不重叠的原则(Li *et al.*, 2010)将这些位点进行五重 PCR 组合。通过对退火温度、反应体系、循环参数(退火温度, 延伸时间)等条件进行优化, 确定五重 PCR 的最佳反应条件。

1.6 数据统计分析

首先运行 CERVUS 3.0 (Kalinowski *et al.*, 2007)软件中的模拟功能估算两组长牡蛎家系鉴定所需要的位点数及其鉴定效率。软件操作具体参数设置如下: 模拟子代数设置为 10000 (循环重复数), 父母本数根据软件要求均为实际父母本数设为 9, 亲本检测率设置为 100%, 位点检测率为 100%, 分型误差率为 1%, 置信区间设置为 95%, 亲本性别已知。家系鉴定运用 CERVUS 3.0 中基于似然性的计算方法从非排除亲本中选择最可能的亲本。

同时也采用 CERVUS 3.0 对各微卫星位点的等位基因数 (Number of alleles, N_a), 多态信息含量 (Polymorphism Information Content, PIC)和位点的非排除能力(NE-1P, NE-2P, NE-PP)进行统计分析。亲本

对子代的贡献差异由 SPSS 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 进行非参数卡方检验。

表 2 用于多重 PCR 体系构建的微卫星位点的基本信息
Tab.2 Information of the SSR loci for establishment of multiplex PCR system

位点	重复序列	引物序列(5'—3')	片段大小(bp)	退火温度 T_a (°C)
ucdCg-149	(GA) _n (GACA) _N	F: TAMRA-TGATTAACGTGGGTGATTCG R: TTCTGACTGTCCGTCTGTGA	188—260	60
ucdCg-109	(CAT) _n	F: HEX-GCTATGTTGTCATCCTCGAA R: TGCCTTTATCGGTTTTGCTT	160—235	53
ucdCg-140	(CT) _N	F: ROX-TGCTCAATTCACAGCAATCAG R: TCTGACTGCTGAACAGCAAAAT	202—292	60
ucdCg-181	(GT) _n (GA) _n	F: FAM-CACCCCAAAGGACCACATAC R: TGTCAGCATGGGTAAGTCCA	207—283	60
CGSIL139	(AG) _n	F: FAM-GACCATACAGCTCTGTCCAT R: GCTACTGAATGAGAATGGCT	348—404	55
ucdCg-170	(GA) _n (GT) _n	F: FAM-TGGTGGTCAGTGAATGTGAGA R: CGGACAGTAGCCTTTTAACACA	98—138	60
ucdCg-112	(TCA) _n (TCG) _N	F: HEX-TCAGTCATCTGAATCCTCATCC R: CTGCCGAGATTTAGACAAA	160—262	53
ucdCg-134	(CT) _n (CGCT) _N	F: TAMRA-TTTGTATGTCCGTCATCGTCA R: CCCTGCAAAATGGTAAAAT	202—262	57
ucdCg-162	(TTCA) _N (ATCT) _n (GTCT) _N	F: ROX-CCAAATCACCGTTTTAGTTTGT R: AGCGACACAGAGACCACCTT	160—324	52
ucdCg-151	(GT) _N	F: FAM-AGGTAATCCGCAAAACCAGTG R: GCATTGCGTCAGGATTAGGT	239—313	60

n: 有间隔的微卫星序列(interrupted); *N*: 连续的微卫星序列(pure)

2 结果

2.1 五重 PCR 的优化

设计的引物组合经过筛选优化后获得了两组微卫星五重 PCR 体系。

两组五重 PCR 反应体系 25 μ L 包括: 模板 DNA 1.0 μ L (30ng), 10 \times PCR Buffer 2.5 μ L, 25mmol/L MgCl₂ 2.0 μ L, 10mmol/L dNTPs 0.5 μ L, 10mmol/L 引物每对各

0.2 μ L, 5U/ μ L Taq DNA 聚合酶 0.2 μ L, 纯水 17.8 μ L。

两组五重 PCR 反应程序均为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30s, 退火温度 60 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s, 循环 10 次; 95 $^{\circ}$ C 变性 30s, 退火温度 55 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s, 循环 20 次; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 6min; 4 $^{\circ}$ C 保存。

各体系的引物组合、引物浓度详见表 3、表 4。部分微卫星五重 PCR 的毛细管电泳结果如图 1。

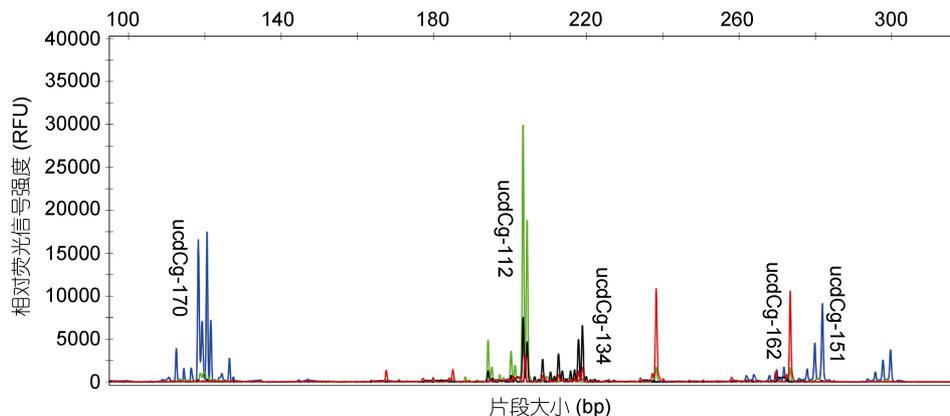


图 1 微卫星五重 PCR 的毛细管电泳图谱

Fig.1 The capillary electrophoresis amplified by SSR 5-multiplex PCR
图示为随机选取的 0612-R291 号个体用 MS 2 扩增后的毛细管电泳图谱

2.2 遗传多样性分析

2.2.1 0527 实验组 10 个微卫星位点的等位基因数(N_a)范围从 19 到 36, 平均值为 28.8, 位点平均多态信息含量为 0.8924, 反映了这两组五重 PCR 在家系鉴定中具有较高的排除能力。两组五重 PCR 的观测

杂合度(Observed heterozygosity, H_o)范围为 0.426—0.811, 平均观测杂合度为 0.6519, 期望杂合度(Expected heterozygosity, H_e)范围为 0.870—0.931, 平均期望杂合度为 0.9011, 无效等位基因频率为 5.9%—36.3% (表 3)。

表 3 0527 组长牡蛎中两组微卫星五重 PCR 的特征
Tab.3 Characteristics of two SSR 5-multiplex PCR in the Pacific oyster of group 0527

多重 PCR 组合	位点	引物浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	等位基因数(N_a)	观测杂合度(H_o)	期望杂合度(H_e)	多态信息含量(PIC)	无效等位基因频率	NE 1P ^a	NE 2P ^b	NE PP ^c
Multiplex Set 1	ucdCg-149	0.2	35	0.590	0.931	0.926	0.225	0.247	0.141	0.033
	ucdCg-109		25	0.698	0.890	0.881	0.119	0.358	0.218	0.072
	ucdCg-140		33	0.426	0.908	0.901	0.363	0.312	0.185	0.054
	ucdCg-181		33	0.687	0.880	0.868	0.122	0.387	0.240	0.087
	CGSILI39		19	0.649	0.870	0.856	0.144	0.416	0.261	0.102
Multiplex Set 2	ucdCg-170	0.2	19	0.756	0.906	0.898	0.088	0.319	0.190	0.057
	ucdCg-112		30	0.802	0.902	0.894	0.059	0.329	0.197	0.061
	ucdCg-134		27	0.645	0.891	0.880	0.159	0.361	0.220	0.075
	ucdCg-162		36	0.455	0.922	0.916	0.339	0.273	0.158	0.041
	ucdCg-151		31	0.811	0.912	0.905	0.059	0.300	0.177	0.050

a: 单亲本的平均非排除率; b: 已知单亲本基因型的平均非排除率; c: 两亲本的平均非排除率

2.2.2 0612 实验组 经筛选后得到 10 个微卫星位点(表 4)。每个位点的等位基因数(N_a)为 15—31, 平均值为 23.7; 观测杂合度(H_o)为 0.376—0.845, 平均观

测杂合度为 0.5588; 期望杂合度(H_e)为 0.712—0.933, 平均期望杂合度为 0.8652; 位点平均多态信息含量为 0.8516; 无效等位基因频率为 7.7%—41.4%。

表 4 0612 组长牡蛎中两组微卫星五重 PCR 的特征
Tab.4 Characteristics of two SSR 5-multiplex PCR in the Pacific oyster

多重 PCR 组合	位点	引物浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	基因丰富度(N_a)	观测杂合度(H_o)	期望杂合度(H_e)	多态信息含量(PIC)	无效等位基因频率	NE 1P ^a	NE 2P ^b	NE PP ^c
Multiplex Set 1	ucdCg-149	0.2	31	0.533	0.880	0.869	0.248	0.381	0.236	0.082
	ucdCg-109		23	0.795	0.933	0.927	0.077	0.244	0.139	0.033
	ucdCg-140		27	0.391	0.845	0.830	0.338	0.457	0.294	0.118
	ucdCg-181		23	0.669	0.893	0.884	0.140	0.348	0.211	0.066
	CGSILI39		16	0.845	0.870	0.825	0.276	0.480	0.313	0.143
Multiplex Set 2	ucdCg-170	0.2	15	0.624	0.851	0.833	0.154	0.461	0.297	0.128
	ucdCg-112		23	0.736	0.906	0.899	0.108	0.315	0.187	0.054
	ucdCg-134		21	0.380	0.712	0.681	0.340	0.678	0.494	0.292
	ucdCg-162		28	0.376	0.903	0.894	0.414	0.327	0.196	0.060
	ucdCg-151		30	0.607	0.884	0.874	0.191	0.371	0.228	0.078

a: 单亲本的平均非排除率; b: 已知单亲本基因型的平均非排除率; c: 两亲本的平均非排除率

2.3 微卫星五重 PCR 在家系鉴定中的应用

2.3.1 0527 实验组 使用两组微卫星五重 PCR 对 27 个家系的 653 个个体进行了亲子鉴定, 经用 CERVUS 3.0 软件进行分析, 使用这两组微卫星五重 PCR 的亲子鉴定成功率为 100%; 只用 MS 1, 可以将

96%的子代鉴定到亲本; 只用第二组 MS 2, 可以将 97%的子代鉴定到亲本。

对 653 个长牡蛎子代个体进行基因分型, 将其全部成功分配至唯一亲本对, 子代在 27 个全同胞家系中的分布情况见表 5。家系间子代数差异非常大,

家系 F23 (♀8×♂8)有 72 个子代, 占子代总数的 11.0%; 而家系 F04 (♀2×♂2)仅有 1 个子代, 占子代总数的 0.2%。通过卡方检验可知, 父本($\chi^2=148.02, P=0.00$)和母本($\chi^2=208.55, P=0.00$)对子代的贡献率有显著性

差异: 母本产生的子代数最多为 137 个(♀8), 贡献率为 21.0%; 最少的为 7 个(♀2), 贡献率为 1.1%。父本产生的子代数最多的为 117 个(♂9), 贡献率为 17.9%; 最少为 27 个(♂2), 贡献率为 4.1%(表 5)。

表 5 0527 组中 27 个长牡蛎全同胞家系的 653 个个体的亲权分析
Tab.5 Parentage assignment of 653 offspring from 27 full-sib families of group 0527 in the Pacific oyster

27 个全同胞家系	母本									总计	
	中国 F4 选育群体			日本 F4 选育群体			韩国 F4 选育群体				
	♀1	♀2	♀3	♀4	♀5	♀6	♀7	♀8	♀9		
父本	中国 F4 选育群体 ♂1	22(3.4%)			49(7.5%)			19(2.9%)			90
	♂2	14(2.1%)	1(0.2%)	12(1.8%)						27	
	♂3	4(0.6%)		12(1.8%)	18(2.8%)					34	
	日本 F4 选育群体 ♂4	27(4.1%)			15(2.3%)	43(6.6%)				85	
	♂5	51(7.8%)			31(4.7%)	26(4.0%)			108		
	♂6	14(2.1%)	17(2.6%)			10(1.5%)				41	
	韩国 F4 选育群体 ♂7	2(0.3%)		18(2.8%)			20(3.1%)			40	
	♂8	15(2.3%)			24(3.7%)			72(11.0)	111		
	♂9	68(10.4%)			22(3.4%)			27(4.1%)	117		
总计	50	7	54	134	97	40	62	137	72	653	

2.3.2 0612 实验组 使用两组微卫星五重 PCR 对 0612 组 27 个全同胞家系 382 个个体进行亲子鉴定的准确率为 100%; 只用 MS 1, 亲子鉴定准确率为 96%; 只用 MS 2, 可以将 95%的子代鉴定到亲本。

表 6 为 0612 组 382 个长牡蛎子代个体在 27 个全同胞家系中的分布情况。子代在建立的 27 个家系中呈现不均等分布。不同家系间的子代数有较大差异, 从 1 (F27, ♀9×♂9)到 68 (F25, ♀9×♂1)不等。卡方检验结果显示, 母本($\chi^2=119.86, P=0.00$)和父本($\chi^2=142.88,$

$P=0.00$)对子代的贡献率有显著性差异: 母本产生的子代数最多和最少分别为 80 (♀9)和 9 (♀3), 贡献率分别为 20.9%和 2.4%; 父本产生的子代数最多和最少分别为 93 (♂1)和 14 (♂9), 贡献率分别为 24.3%和 3.7%。

3 讨论

3.1 微卫星多重 PCR 无效等位基因

微卫星中位点的突变、插入或缺失是无效等位基

表 6 0612 组中 27 个长牡蛎全同胞家系的 382 个个体的亲权分析
Tab.6 The parentage assignment of 382 offspring from 27 full-sib families of group 0612 in Pacific oyster

27 个全同胞家系	母本									总计	
	中国 F4 选育群体			日本 F4 选育群体			韩国 F4 选育群体				
	♀1	♀2	♀3	♀4	♀5	♀6	♀7	♀8	♀9		
父本	中国 F4 选育群体 ♂1	7(1.8%)			18(4.7%)			68(17.8%)			93
	♂2	32(8.4%)	3(0.8%)	20(5.2%)						55	
	♂3	9(2.4%)		2(0.5%)	7(1.8%)					18	
	日本 F4 选育群体 ♂4	4(1.0%)			40(10.5%)	4(1.0%)				48	
	♂5	13(3.4%)			13(3.4%)	11(2.9%)			37		
	♂6	16(4.2%)	40(10.5%)			18(4.7%)				74	
	韩国 F4 选育群体 ♂7	2(0.5%)		3(0.8%)			15(4.7%)			20	
	♂8	3(0.8%)			10(2.6%)			10(2.6%)	23		
	♂9	5(1.3%)			8(2.1%)			1(0.3%)	14		
总计	55	14	9	58	71	41	32	22	80	382	

因产生的主要原因(Callen *et al*, 1993; Pemberton *et al*, 1995)。无效等位基因的出现是降低家系分析准确率的主要来源之一(Marshall *et al*, 1998), 但并不影响其在家系分析研究中的应用(Li *et al*, 2005)。通过增加微卫星位点数和避免使用无效等位基因频率过高的微卫星位点可提高微卫星位点的家系鉴定能力(Carlsson, 2008; Wang *et al*, 2010)。McGoldrick 等(2000)曾报道太平洋牡蛎中无效等位基因频率为 20%。Li 等(2003)发现长牡蛎中 51.9%的微卫星位点含有无效等位基因。Hubert 等(2004)也报道了在长牡蛎中无效等位基因较高, 达 51.0%。本实验的 10 个微卫星位点在 0527 组的 27 个全同胞家系鉴定中的无效等位基因频率为 5.9%—36.3%, 而在 0612 组的 27 个全同胞家系鉴定中无效等位基因频率为 7.7%—41.4%。

3.2 微卫星多重 PCR 在家系鉴定中的应用

微卫星多重 PCR 技术已应用于多种水生动物的家系鉴定分析。聂鸿涛等(2013)用 12 个微卫星位点对 12 个皱纹盘鲍全同胞家系的 372 个子代进行家系鉴定, 两组多态信息含量最高的多重 PCR 的鉴定成功率分别为 90%和 86%, 在此基础上增加任意一个多重 PCR 组合, 即可达到 100%的鉴定成功率。李佳凯等(2014)建立了大黄鱼微卫星多重 PCR 体系, 使用 3 组微卫星多重 PCR 体系进行亲子鉴定准确率为 100%。苗贵东等(2011)对大菱鲆 7 个人工选育家系进行了亲子鉴定, 已知 1 个亲本时两组多重 PCR 的鉴定成功率为 96.42%, 在双亲未知的情况下亲子鉴定准确率为 96.58%。Li 等(2010)使用两组多态信息含量最高的微卫星多重 PCR 对 12 个单对交配长牡蛎家系进行基因分析, 达到 100%的鉴定成功率。

在本试验中, 用两组微卫星五重 PCR 鉴别时, 在 0527 组和 0612 组的鉴定成功率均为 100%; 只用 MS 1, 可以将 0527 组 96%的子代和 0612 组 96%的子代鉴定到亲本; 只用 MS 2, 可以将 0527 组 97%的子代和 0612 组 95%的子代鉴定到亲本。本研究中较高的家系鉴定成功率可能与所使用的微卫星位点较好及其多态性水平较高有关, 这与 Gheyas 等(2009)所提到的选择更多信息量大、多态性高的位点是达到高鉴定率的必要保障的观点相一致。

作者仅用两组微卫星五重 PCR 反应体系就完成了 10 个微卫星位点的分型, 在短时间内实现长牡蛎群体的遗传多样性分析, 充分体现了多重 PCR 快速、高效、高通量、节约、简便的特点。本研究中筛选出

的微卫星多重 PCR 体系不仅可以应用于长牡蛎群体的亲子鉴定分析以及分子标记辅助育种, 还可为家系群体遗传多样性分析和遗传关系研究等方面的研究提供技术基础。

参 考 文 献

- 王 婷, 徐 燕, 陈昌生等, 2013. 基于 SCAR 标记的坛紫菜“闽丰 1 号”多重 PCR 鉴定技术的建立. 水产学报, 37(5): 688—695
- 李佳凯, 王志勇, 韦信键等, 2014. 大黄鱼微卫星多重 PCR 体系的建立及其应用. 水产学报, 38(4): 470—475
- 罗 伟, 高泽霞, 曾 聪等, 2013. 团头鲂微卫星多重 PCR 体系的建立及应用. 大连海洋大学学报, 28(5): 418—423
- 苗贵东, 杜 民, 杨景峰等, 2011. 大菱鲆亲子鉴定的微卫星多重 PCR 技术建立及应用. 中国海洋大学学报, 41(1—2): 97—106
- 聂鸿涛, 李 琪, 孔令锋, 2013. 皱纹盘鲍微卫星多重 PCR 体系构建及其在家系鉴定中的应用. 水产学报, 37(2): 207—215
- Callen D F, Thompson A D, Shen Y *et al*, 1993. Incidence and origin of “null” alleles in the (AC)_n microsatellite markers. *Am J Human Genet*, 52(5): 922—927
- Carlsson J, 2008. Effects of microsatellite null alleles on assignment testing. *J Hered*, 99(6): 616—623
- Chamberlain J S, Gibbs R A, Rainer J E *et al*, 1988. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucl Acids Res*, 16(23): 11141—11156
- Gheyas A A, Woolliams J A, Taggart J B *et al*, 2009. Heritability estimation of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) harvest traits using microsatellite based parentage assignment. *Aquaculture*, 294(3—4): 187—193
- Hubert S, Hedgecock D, 2004. Linkage maps of microsatellite DNA markers for the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics*, 168(1): 351—362
- Kalinowski S T, Taper M L, Marshall T C, 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecol*, 16(5): 1099—1106
- Lerceteau-Köhler E, Weiss S, 2006. Development of a multiplex PCR microsatellite assay in brown trout *Salmo trutta*, and its potential application for the genus. *Aquaculture*, 258(1—4): 641—645
- Li G, Hubert S, Bucklin K *et al*, 2003. Characterization of 79 microsatellite DNA markers in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mol Ecol Notes*, 3(2): 228—232
- Li Q, Kijima A, 2005. Segregation of microsatellite alleles in gynogenetic diploid Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*). *Mar Biotechnol*, 7(6): 669—676
- 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, Kobayashi T *et al*, 2003. Inheritance of

- microsatellite DNA markers in the Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. *Mar Biotechnol*, 5(4): 331—338
- Li R H, Li Q, Cornette F *et al*, 2010. Development of four EST-SSR multiplex PCRs in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and their validation in parentage assignment. *Aquaculture*, 310(1—2): 234—239
- Li Y T, Wongprasert K, Shekhar M *et al*, 2007. Development of two microsatellite multiplex systems for black tiger shrimp *Penaeus monodon* and its application in genetic diversity study for two populations. *Aquaculture*, 266(1—4): 279—288
- Marshall T C, Slate J, Kruuk L E B *et al*, 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol Ecol*, 7(5): 639—655
- 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
- Pemberton J M, Slate J, Bancroft D R *et al*, 1995. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Mol Ecol*, 4(2): 249—252
- Sauvage C, Boudry P, Lapègue S, 2009. Identification and characterization of 18 novel polymorphic microsatellite markers derived from expressed sequence tags in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mol Ecol Res*, 9(3): 853—855
- Taris N, Baron S, Sharbel T F *et al*, 2005. A combined microsatellite multiplexing and boiling DNA extraction method for high-throughput parentage analyses in the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquac Res*, 36(5): 516—518
- Wang Y, Wang X X, Wan A M *et al*, 2010. A 16-microsatellite multiplex assay for parentage assignment in the eastern oyster (*Crassostrea virginica* Gmelin). *Aquaculture*, 308(1): S28—S33

DEVELOPMENT OF MULTIPLEX PCR OF MICROSATELLITES AND ITS APPLICATION TO KINSHIP ANALYSIS IN *CRASSOSTREA GIGAS*

Ji Ren-Ping^{1,2}, LI Huan-Jun², FENG Yan-Wei², ZHANG Rong-Liang^{1,2},
WANG Wei-Jun², YANG Jian-Min²

(1. College of Fishes and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Shandong Provincial Key Laboratory of Restoration for Marine Ecological Restoration, Yantai 264006, China)

Abstract We tested two sets of high-level 5-multiplex PCRs for efficient genotyping in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Ten loci were selected based on polymorphism, reliability, and allele size range. They were divided into two groups according to allele size and labeled with four different fluorescence dyes, so that loci in the same color were not be overlap in size. In addition, we performed a paternity test for 27 full-sib families and 643 offspring of Group 0527 and 27 full-sib families and 382 offspring of Group 0612 with software CERVUS 3.0. Parentage analysis demonstrated that 100% of all offspring were allocated unambiguously to the unique pair of parents when two sets of 5-multiplex PCRs were used for Groups 0527 and 0612. The assignment success for the two groups was 96% based on MS 1 (the first 5-multiplex PCR). However, the assignment success was 97% and 95% based on MS 2 (the second 5-multiplex PCR) for Groups 0527 and 0612 respectively. Therefore, the two sets of 5-multiplex PCRs can be used for rapid and efficient parentage assignment in the Pacific oyster.

Key words *Crassostrea gigas*; microsatellite; multiplex PCR; parentage analysis