

# 基于 FIASCO 技术的合浦珠母贝微卫星标记分离与筛选研究

曲妮妮<sup>1,2</sup>, 龚世园<sup>2</sup>, 黄桂菊<sup>1</sup>, 童金苟<sup>3</sup>, 喻达辉<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300; 2. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070; 3. 中国科学院水生生物研究所, 湖北 武汉 430072)

**摘要:** 用 FIASCO(Fast Isolation by AFLP of Sequences Containing Repeats)技术开展了合浦珠母贝 *Pinctada fucata* 基因组微卫星标记的分离与筛选研究。合浦珠母贝基因组 DNA 经限制性内切酶 *MseI* 酶切后与接头连接, 用生物素标记的(CA)<sub>15</sub> 探针与其杂交, 然后用磁珠富集、洗脱获得单链目的片段, 经 PCR 扩增后形成双链, 最后进行克隆转化, 构建微卫星富集文库。挑选克隆用探针引物(CA)<sub>15</sub> 和载体引物进行第 2 次筛选, 获得阳性克隆 357 个, 测序结果表明, 297 个克隆(83.2%)含有微卫星序列, 包括 479 个微卫星 DNA 结构域。其中完美型微卫星有 370 个(77.3%), 非完美型 95 个(19.8%), 复合型 14 个(2.9%)。合成引物 49 对, 有 31 对(63%)扩增出目的产物, 其中 9 对在种群中( $n=32$ )具有扩增多态性, 其多态信息含量 PIC 值在 0.375—0.809 之间, 平均为 0.536; 等位基因数在 2—9 个之间, 平均为 4.889 个; 观测杂合度介于 0.200—0.600 之间, 平均为 0.415; 期望杂合度的变化范围为 0.454—0.844, 平均为 0.598。表明 FIASCO 技术适合于合浦珠母贝微卫星标记的分离与筛选。

**关键词:** FIASCO 法; 合浦珠母贝 *Pinctada fucata*; 微卫星标记; 分离与筛选

中图分类号: S91 文献标识码: A 文章编号: 1009-5470(2010)03-0047-08

## Isolation and screening of microsatellite markers from the Chinese pearl oyster *Pinctada fucata* based on FIASCO

QU Ni-ni<sup>1,2</sup>, GONG Shi-yuan<sup>2</sup>, HUANG Gui-ju<sup>1</sup>, TONG Jin-gou<sup>3</sup>, YU Da-hui<sup>1</sup>

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300; 2. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070; 3. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

**Abstract:** Isolation and screening of microsatellite markers from *Pinctada fucata* were performed using the method of Fast Isolation by AFLP of Sequences Containing Repeats (FIASCO). After restriction of genomic DNA with *MseI*, the digested fragments were ligated with adaptors and then hybridized with biotinylated (CA)<sub>15</sub> probes. The tentative microsatellite DNA was isolated by streptavidin-coated magnetic beads from the hybridized mixture. After purification, the isolated microsatellite DNA was amplified using degenerated primer *Mse* -N and then cloned into T-vector. After transforming, the microsatellite-enriched library was constructed. The second PCR screening was performed using the primer of (CA)<sub>15</sub> probe and T vector's primers, and 357 positive clones were obtained. Sequencing analysis showed that 297 clones (83.2%) contained microsatellite DNA, including 479 microsatellite domain. Among them, 370 microsatellites (77.3%) were perfect type, 95 (19.8%) imperfect type and 14 (2.9%) compound type. Forty nine pairs of primers were designed and 31 (63%) pairs were effective for PCR amplification. Nine loci showed polymorphism as tested by a population ( $n=32$ ). PIC values for the nine loci ranged from 0.375 to 0.809 with an average of 0.536. The number of alleles ranged from 2 to 9 with an average of 4.889. The observed heterozygosity ranged from 0.200 to 0.600 with an average of 0.415, and the expected heterozygosity ranged from 0.454 to 0.844 with an average of 0.598. This study demonstrated that FIASCO is a useful technique of microsatellite isolation for *Pinctada fucata*.

收稿日期: 2008-03-27; 修订日期: 2008-07-21。刘学东编辑

基金项目: 国家高技术研究发展计划("863")项目(2006AA10A409), 国家科技支撑计划项目(2006BAD01A13)和广东省科技计划项目(2006B 20201063)联合资助。

作者简介: 曲妮妮(1982—), 女, 山东省青岛市人, 硕士研究生, 从事海洋生物遗传育种研究。E-mail: qunini0605@163.com

通讯作者: E-mail: pearlydh@163.com; pearlydh@pub.gz.gd.cn

**Key words:** FIASCO method; *Pinctada fucata*; microsatellite marker; isolation and screening

自 1989 年微卫星标记报道以来<sup>[1-3]</sup>, 由于其高度多态性和共显性特点, 得到广泛应用, 其分离技术也不断发展改进。早期的分离方法主要是小片段 DNA 克隆法<sup>[4]</sup>, 该方法是将基因组 DNA 进行部分酶切, 分离小片段 DNA 构建文库, 然后进行测序筛选。由于这种方法耗时费力且筛选效率很低<sup>[4]</sup>, 于是提出了构建微卫星富集文库的思路。Ostrander 等<sup>[5]</sup>报道了引物延伸富集法, Karagyozov 等<sup>[6]</sup>提出了滤膜富集法, Kijas 等<sup>[7]</sup>提出了磁珠富集法, 其核心环节是酶切产物经 PCR 扩增后通过与生物素标记的探针杂交, 然后用磁珠富集, 获得大量富含微卫星序列的片段并构建文库供后续筛选。Lunt 等<sup>[9]</sup>提出了基于 RAPD-PCR 的微卫星分离技术 (PCR isolation of microsatellite arrays, PIMA)。Zane 等<sup>[8]</sup>报道了基于 AFLP 技术的磁珠富集快速分离技术 (Fast Isolation by AFLP of Sequences Containing Repeats, FIASCO), 即按照 AFLP 的方法进行酶切、连接、扩增后再利用磁珠杂交富集含有微卫星的 DNA 片段。FIASCO 法因操作简单, 效率高, 是目前微卫星分离最快速的技术。匡刚桥等<sup>[10]</sup>用此法构建了鳊鱼的基因组微卫星富集文库, 得到 18 个多态标记; Liao 等<sup>[11]</sup>用 FIASCO 法分离了铜鱼的微卫星标记, 得到 9 个多态位点。但目前尚未见用 FIASCO 法开展双壳贝类微卫星分离的研究报道。

合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*), 又叫马氏珠母贝, 是我国生产海水珍珠的重要贝类。但经过 40 多年的人工繁殖-养殖循环生产后出现了养殖性状退化的现象, 一些学者利用 RAPD<sup>[12]</sup>、AFLP<sup>[13]</sup>等显性标记对其种质资源进行了研究, 然而利用共显性标记进行研究的报道很少, 其原因就是缺乏共显性标记。微卫星标记由于其多态性高, 是最好的共显性标记之一, 目前已广泛用于种质资源和遗传育种等研究<sup>[14-15]</sup>。但目前双壳贝类的微卫星研究报道不多, 国内只有虾夷扇贝 *Pecten yesoensis*<sup>[16]</sup>、栉孔扇贝 *Chlamys farrei*<sup>[17]</sup>、长牡蛎 *Ostrea gigas*<sup>[18]</sup>、翡翠贻贝 *Perna retzius*<sup>[19]</sup>等, 国外也只有大珠母贝 *Pinctada maxima*<sup>[20]</sup>、珠母贝 *P. margaritifera*<sup>[21]</sup>、太平洋牡蛎 *Crassostrea gigas*<sup>[22]</sup>、欧洲牡蛎 *Ostrea angulata*<sup>[23]</sup>、美洲牡蛎 *C. virginica*<sup>[24]</sup>等。最近, 佟广香等<sup>[25]</sup>用磁珠富集法进行了马氏珠母贝的微卫星分离研究, 得到 8 个多态位点。本研究采用 FIASCO 技术进行了合浦珠母贝微卫星分离与筛选研究, 以期合浦珠

母贝微卫星标记的分离筛选提供快速、有效的技术手段。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集与基因组 DNA 提取

用于微卫星分离的合浦珠母贝样品 2006 年 12 月采集于海南三亚, 取闭壳肌组织保存于 95% 酒精中。用于检测微卫星多态性的合浦珠母贝种群采集于广西北海。DNA 的提取: 取 50mg 闭壳肌, 用纯水漂洗后放入 1.5mL 离心管内, 加入 100 $\mu$ L TEN9 细胞裂解缓冲液 (Tris-Cl 50mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>, pH 9.0; EDTA 100mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>; NaCl 200mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>), 剪碎, 再加入 TEN9 400 $\mu$ L、10% 的 SDS 150 $\mu$ L 和蛋白酶 K (20mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup>) 5 $\mu$ L, 于 56 $^{\circ}$ C 消化至溶液澄清。加入 15 $\mu$ L RNase A, 37 $^{\circ}$ C 反应约 15min, 冷却后用常规的酚、氯仿、乙醇方法纯化、沉淀 DNA, 干燥后加入 200 $\mu$ L 去离子超纯水溶解 DNA, 4 $^{\circ}$ C 保存。提取的基因组 DNA 样品用 1% 琼脂糖凝胶电泳、EB 染色检测, 并测定 OD<sub>260</sub> 和 OD<sub>280</sub>, 检测 DNA 的质量和计算浓度, 配成 20ng $\cdot$  $\mu$ L<sup>-1</sup> 的 DNA 备用。

### 1.2 微卫星富集文库的构建

#### 1.2.1 基因组 DNA 酶切、接头连接与 PCR 扩增

基因组 DNA 用内切酶 *Mse* 酶切 3h, 20 $\mu$ L 反应体系包括: 10 $\times$ NEB Buffer2 2 $\mu$ L, 100 $\times$  BSA 0.2 $\mu$ L, *Mse* (10U $\cdot$  $\mu$ L<sup>-1</sup>) 0.5 $\mu$ L, 20ng $\cdot$  $\mu$ L<sup>-1</sup> DNA 模板 3 $\mu$ L, 灭菌双蒸水 14.3 $\mu$ L。然后将酶切产物与双链接头 (接头 A 序列为: 5'-TAC TCA GGA CTC AT-3', 接头 B 序列为: 5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3') 于 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 反应体系如下: 10 mM T4 DNA ligase 缓冲液 2 $\mu$ L, 50mM 接头 1.8 $\mu$ L, 上述酶切片段 11 $\mu$ L, 400U/ $\mu$ L 的 T4 DNA ligase 0.2 $\mu$ L。

连接产物用简并引物 *Mse* -N [5'-GAT GAG TCC TGA GTA A(N)-3'] (N 代表碱基 A, G, C, T) 进行 PCR 扩增, PCR 反应总体积 20 $\mu$ L, 包括 10 $\times$ PCR buffer 2.0 $\mu$ L, 10 mM dNTPs 0.4 $\mu$ L, 50 mM *Mse* -N 0.2 $\mu$ L, 1 U *Taq* 酶, 10 $\times$ 连接产物 2 $\mu$ L。反应程序如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 然后进行 PCR 循环。循环参数为: 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 53 $^{\circ}$ C 退火 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 共 14 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。PCR 产物应在 200-1000bp 之间。

#### 1.2.2 微卫星序列富集与文库构建

将杂交缓冲液 70 $\mu$ L, PCR 产物 25 $\mu$ L 和生物素

标记的(CA)<sub>15</sub>探针(10 μM)5μL混合,于65℃杂交1h,加入用TEN100平衡好的400μL磁珠中,室温温浴30min,移去杂交液(保存,记为1),然后用400μL的TEN1000于室温下洗涤磁珠3次,每次5min,保留第3次的洗脱液(记为2),再用400μL的0.2×SSC(含0.1%SDS)洗3次,每次5min,保留第3次的洗脱液(记为3),第4步用400μL TEN1000洗5min,保存洗脱液(记为4),之后加100μL TE重悬磁珠,100℃水浴10min,将DNA从磁珠-探针-DNA混合物中分离,水浴结束后将离心管置于磁架上,吸出含有DNA的片段(洗脱液记为5),然后立刻放冰上,最后用100μL TE再次重悬磁珠,保存洗脱液(记为6)。

分别以上述6管洗脱液为模板,用引物Mse-N进行PCR扩增,检测富集效果。PCR反应体系和程序同1.2.1。富集效果好的样品用DNA Gel Extraction Kit(AXYGEN)回收纯化PCR产物,纯化产物按常规方法与pMD20-T载体连接过夜,然后转化到大肠杆菌(实验室保存的菌种Top10)感受态细胞中,构建微卫星富集文库。

### 1.3 文库筛选、测序、序列特征分析与引物设计

挑选单克隆,接种到含有氨苄抗生素的LB培养基中,37℃振荡培养2h,菌液用载体通用引物和探针序列引物进行PCR筛选鉴定,阳性克隆送到上海英骏生物技术有限公司进行DNA测序。

利用Clustal X<sup>[26]</sup>对序列特征进行分析,用引物设计软件Primer Premier 3.0<sup>[27]</sup>对所得的微卫星序列设计引物,并进行PCR扩增,5%的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳检测,将扩增稳定且条带清晰的引物用于多态性筛选。

### 1.4 引物多态性筛选

用广西野生合浦珠母贝种群进行多态性标记筛选。PCR反应总体积20μL,包括10×PCR缓冲液2.0μL,10 mM dNTPs 0.4μL,25 mM MgCl<sub>2</sub> 1.2μL,10μM双向引物(共31对)各0.5μL,1 U Taq酶,40ng模板DNA。程序为94℃变性5 min,然后30个循环,每个循环包括:94℃变性30s,47—52℃(不同引物的退火温度不同,见表3)退火30s,72℃延伸1min,最后72℃延伸10min。电泳,然后统计每个位点的等位基因数量(A),用Popgene 1.32软件计算群体的有效等位基因数(A<sub>e</sub>)、观察杂合度(H<sub>o</sub>)、期望杂合度(H<sub>e</sub>)和Hardy-Weinberg平衡检测,根据Botstein等<sup>[28]</sup>计算每个微卫星位点的多态信息含量(polymorphism information Content, PIC),计算公式

如下:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^m p_i^2 - \sum_{i=1}^{m-1} \sum_{j=i+1}^m 2p_i^2 p_j^2$$

式中, $p_i$ 和 $p_j$ 分别表示第*i*和第*j*个等位基因在群体中的频率, $m$ 为等位基因数。

## 2 结果与分析

### 2.1 合浦珠母贝基因组微卫星文库的构建

Mse酶切的主要片段集中在200—1000bp之间(图1),符合构建基因组文库的要求。通过PCR扩增、杂交、富集,6管洗脱液的PCR扩增结果见图2,其中第5、6管的富集片段浓度较大,且第5管富集产物的量要大于第6管,因此用第5管富集产物构建文库,共获得约2000个克隆,随机选取1289个克隆进行PCR筛选(图3),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,获得候选克隆357个进行测序,其中297个含有重复次数大于或等于3的微卫星序列(83.2%)。

### 2.2 序列特征分析

对297个微卫星序列进行比对分析,发现有280个(94.3%)序列为唯一序列,其他17个(5.7%)是其重复序列。这280条序列中共含有479个微卫星

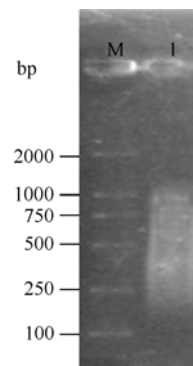


图1 DNA酶切结果

Fig. 1 Result of enzymic Digestion

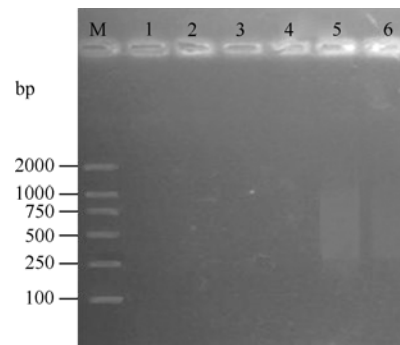


图2 富集产物的PCR扩增结果

Fig. 2 Enriched microsatellite DNA amplified by PCR



表 3 部分有效扩增的微卫星引物

Tab. 3 Some microsatellite primers effective for PCR amplification

位点	引物序列(5'-3')	片段长度/(bp)	退火温度/
M2*	F: TCTTCCGACAAACTAAACA R: CTGAATTTTGAAATCCACA	168	47
M3*	F: CCAAGAAAGTCGATCTACCA R: ACAATCCTGACAAGCATAAA	147	50
M5	F: TGGCGTATTGTGATTTTG R: GCATCTTCTCCACCTTAA	294	48
M7*	F: GGACCAGACGTGTTGTCATT R: TGATTCTTCTCCCTTTCTC	169	52
M12*	F: TAATAAGTACTGTGGATAGGC R: CTCCATTGTTATGTCTTTATC	140	50
M13	F: CATTGTGATAACATGATAAAGAC R: AACCAGACGATGAACAACAC	260	50
M14	F: TGATGATAACATTGGCTTCT R: CTCGCAACTCTGTACCTC	110	50
M16	F: TGGAAACATCTATGAAAGG R: CGATAAACACGACTAACT	186	50
M113*	F: TGCAGTCAITTTGTTCGTG R: TTGCTTTGTCTCCTATGCTATT	241	52
M114*	F: GATGCTCAAATTCTGCTTTA R: TCTTGGGTTGTTCCTCTT	224	50
M160	F: CCCCTCCTTTCATTTAC R: GCCCGATGTATTGTCTTT	202	52
M171	F: GATGGAATAGGCATTTTATA R: AAAGCCAAAGTAAAACCTGT	190	48
M189	F: AAGTTTGAGTCTGGAGGAA R: CCGTACTTTGACCTTGATT	109	52
M213*	F: AGTTGACATAACCAGGGTG R: CCATAAACAGACAGCAT	242	52
M247*	F: ATGCTCCCGCAACAAA R: CAGCGTCTGGACAAGAAGTGA	106	52
M255	F: TATAAACCATGCCTGATTC R: TGCTTACAAGTAACTACGG	145	50
M265	F: CATTGCTACTGGGGTGT R: CGATAAAAGAAAGGAGGG	258	52
M287*	F: TTAGACCCAATGAAAATCTG R: TTGAAGTTGAACATAGCCAC	226	50

注: F, 正向引物; R, 反向引物。

0.844, 平均为 0.598; 多态信息含量  $PIC$  值在 0.375—0.809 之间, 平均为 0.536, Hardy-Weinberg 平衡的卡方检验发现, 北海野生合浦珠母贝群体发生了一

定程度的偏离, 其中在 M12, M247 两个位点发生显著偏离, 在 M3, M7, M114, M287 四个位点发生极显著偏离(表 4)。

表 4 广西野生合浦珠母贝种群的遗传参数统计

Tab. 4 Statistics of genetic parameters in Guangxi wild population of *Pinctada fucata*

位点	参数					
	$A$	$A_e$	$H_o$	$H_e$	$PIC$	$P_{HW}$
M2	3	1.839	0.600	0.464	0.403	0.161
M3	7	2.041	0.300	0.519	0.488	0.006
M7	5	3.136	0.433	0.693	0.633	0.009
M12	3	1.873	0.367	0.474	0.403	0.016
M113	2	2.000	0.333	0.509	0.375	0.055
M114	9	3.888	0.467	0.755	0.714	0.001
M213	4	2.975	0.467	0.675	0.598	0.089
M247	8	5.863	0.567	0.844	0.809	0.042
M287	3	1.805	0.200	0.454	0.404	0.000
平均值 average	4.889	2.824	0.412	0.598	0.536	0.042

注:  $A$ , 等位基因数;  $A_e$ , 有效等位基因数;  $H_o$ , 观测杂合度;  $H_e$ , 期望杂合度;  $PIC$ , 多态信息含量;  $P_{HW}$ , 哈代-温伯格平衡显著性检验 0.05 水平的  $P$  值。

### 3 讨论

目前国内外分离微卫星的报道多采用磁珠富集法以及在此基础上改进的 FIASCO 法。与传统的磁珠富集法相比, FIASCO 法有其自身的优点。首先它省略了酶切片段的切胶回收、多余接头和引物的过柱去除等一系列的步骤, 因而整个过程更加简单, 本研究利用 FIASCO 方法在短短一周内完成了合浦珠母贝基因组微卫星富集文库的构建; 其次, FIASCO 法所用的内切酶 *MseI* 的酶切位点(TTAA)与传统的磁珠富集法最常用的内切酶 *Sau3A* 的酶切位点(GATC)一样, 也是一个四碱基序列, 在基因组中的酶切位点相对较多, 可以把基因组 DNA 切成比较均匀的小片段, 有利于克隆建库; 再次很多实验室都在开展 AFLP 分析, 所用的内切酶之一为 *MseI*, 因此, 用 FIASCO 进行微卫星分离既可提高 *MseI* 的利用率, 还可利用 AFLP 实验中的有关试剂等, 方便实用, 有利于降低实验室成本。此外最重要的一点就是 FIASCO 的富集效率比较高, 匡刚桥等<sup>[10]</sup>的报道为 60%, 在本研究中, 357 个候选克隆中有 297 个含有微卫星序列, 富集效率达到 83.2%, 说明 FIASCO 法是一种极为快速, 高效而廉价的微卫星标记分离方法, 可以应用到其他双壳贝类微卫星的分离研究。

在动物基因组中微卫星大约 6-10kb 就出现一次<sup>[30]</sup>, 其中二碱基重复类型(CA/GT, AG/TC, AT/TA)的微卫星最为常见<sup>[31-32]</sup>。因此, 本研究初期仅采用 (CA)<sub>n</sub> 这一种探针, 在所得的 479 个微卫星中, CA/GT 微卫星有 364 个, 约占总微卫星数的 76.0%, 其次是 AT/TA 和 AG/TC, 各有 60 和 25 个, 分别约占总微卫星数的 12.5%和 5.9%, 与以上研究结果相符。除这三种微卫星外, 还发现了多种类型的微卫星重复序列, 因此可以采用其他类型的探针研究开发合浦珠母贝基因组微卫星, 以便获得更多的微卫星分子标记。

与其他水产动物相比, 贝类微卫星分离的报道很少, 而且多态位点的筛选效率相对较低, 需要设计大量的引物才能获得为数不多的多态标记<sup>[16,20,21]</sup>, 与其他实验室交流时也反映同样情况。出现这种情况的原因可能与贝类个体之间的遗传变异

程度较大有关。在合浦珠母贝的 AFLP 分析中, 每对引物扩增的共有条带只有 1-2 条, 多态位点比例特别高<sup>[33-34]</sup>, 个体之间变异特别大, 说明 *MseI* 酶切位点突变率很高, 同时也表明, 其他位点也可能存在较高的突变率, 导致无效等位基因的频率比较高, 因此根据 1 个个体的微卫星序列设计的引物在其他个体可能无法扩增。无效等位基因在哺乳类、鱼类、甲壳类等许多生物中都有报道<sup>[35-37]</sup>, 而在贝类中, 无效等位基因出现的频率更高, 皱纹盘鲍微卫星遗传特性的研究表明, 等位基因中无效等位基因的比例为 10.7%<sup>[38]</sup>; 美洲牡蛎的微卫星研究中也发现, 18 个微卫星位点中有 3 个位点存在无效等位基因<sup>[24]</sup>。在本研究中, 49 个微卫星位点只有 31 个位点(63.3%)能够扩增出预期的目的条带, 无效等位基因的比例达到了 26.7%, 高于上述研究结果<sup>[24, 38]</sup>, 可能因为在合浦珠母贝中, 引物结合部位的点突变、插入或缺失频率较高造成的。除此之外, 造成贝类多态位点筛选效率较低的另一原因可能是贝类在进化过程中发生染色体重排<sup>[39]</sup>, 导致基因组结构复杂和存在多个位点, 对引物的筛选产生影响。从本实验来看, 合浦珠母贝基因组的重复序列较多, 如 1 个克隆测序出来往往含有多个重复序列片段, 保守区域少, 可能也是导致引物筛选困难的一个因素。

Panaud 等<sup>[40]</sup>认为, 微卫星重复次数的多少与多态性之间不存在相关性; 但多数学者认为微卫星重复次数与多态性之间存在正相关性, 一般微卫星的核心序列重复数越高, 其等位基因数也就越多, 即多态性也就越高<sup>[41]</sup>。重复次数多的微卫星既能在种间又能在种内产生多态性, 但重复次数少的微卫星, 仅能在种间产生多态性<sup>[42]</sup>(Smuldersm, 1997)。本文合成的 49 对引物中有 31 对引物(63.3%)能扩增出预期的目的条带, 但其中仅有 9 对引物是多态的。因此, 在设计引物时, 除了遵循一般的设计原则以外, 还要尽量选择重复次数多、核心序列长的微卫星, 以获得较高的多态性。

在本实验所检测的 9 个多态位点中, 其中 4 个为高度多态位点, 5 个为中度多态位点, 平均 PIC 值为 0.536, 表明这些标记适合遗传多样性分析和遗传图谱构建等。

### 参考文献

[1] LITT M, LUTY J A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the

cardiac muscle actin gene[J]. American Journal of Human Genetics, 1989, 44(3): 397-401.

- [2] TAUTZ D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers[J]. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17(16): 6463–6471.
- [3] WEBER J L, MAY P E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction[J]. *American Journal of Human Genetics*, 1989, 44(3): 388–396.
- [4] RASSMANN K, SCHLOTTERER C, Tautz D. Isolation of simple sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting[J]. *Electrophoresis*, 1991, 12(2/3): 113–118.
- [5] OSTRANDER E A, JONG P M, RINE J, et al. Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequence[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1992, 89(8): 3419–3423.
- [6] KARAGYZOV L, KALCHIEVA I D, CHAPMAN V M. Construction of random small-insert genomic libraries highly enriched for simple sequence repeats[J]. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21(16): 3911–3912.
- [7] KIJAS J M, FOWLER J C, GARBETT C A, et al. Enrichment of microsatellite from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequence bound to streptavidin-coated magnetic particles[J]. *Biotechniques*, 1994, 16(4): 656–662.
- [8] ZANE L, BARGELLON L, PATARNELLO T. Strategies for microsatellite isolation: a review[J]. *Molecular Ecology*, 2002, 11(1): 1–16.
- [9] LUNT D H, HUTCHINSON W F, CARVALHO G R, et al. An efficient method for PCR-based identification of microsatellite arrays (PIMA)[J]. *Molecular Ecology*, 1999, 8(5): 893–894.
- [10] 匡刚桥, 刘臻, 鲁双庆, 等. FIASCO 法筛选鳊鱼微卫星标记[J]. *中国水产科学*, 2007, 14(4): 608–614.
- [11] LIAO X L, ZHU B, YU X M, et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in a Yangtze River fish, brass gudgeon (*Coreius heterodon* Bleeker)[J]. *Molecular Ecology Notes*, 2006, 6(2): 393–395.
- [12] 王小玉, 喻达辉, 郭奕惠, 等. 七种珍珠贝 RAPD 鉴别标记的初步研究[J]. *南方水产*, 2006, 2(1): 18–22.
- [13] 喻达辉, 王小玉, 黄桂菊, 等. 合浦珠母贝遗传连锁图谱的构建[J]. *中国水产科学*, 2007, 14(3): 361–368.
- [14] HOLLAND B S. Invasion without a bottleneck: Microsatellite variation in natural and invasive populations of the brown mussel *Perna perna* (L)[J]. *Marine Biotechnology*, 2001, 3(5): 407–415.
- [15] LI Q, PARK C, KIJIMA A. Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery strains of the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*)[J]. *Aquaculture*, 2004, 235(1–4): 207–222.
- [16] 赵莹莹, 朱晓琛, 孙效文, 等. 磁珠富集法筛选虾夷扇贝微卫星序列[J]. *中国水产科学*, 2006, 13(5): 749–755.
- [17] 李红蕾, 宋林生, 王玲玲, 等. 栉孔扇贝 EST 中微卫星标记的筛选[J]. *高技术通讯*, 2003, 13(12): 72–75.
- [18] 李琪, 木岛明博. 长牡蛎微卫星克隆快速分离及特征分析[J]. *海洋与湖沼*, 2004, 35(5): 364–370.
- [19] LIN G, FENG F, YUE G H. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites from Asian green mussel (*Perna viridis*)[J]. *Molecular Ecology Notes*, 2007, 7(6): 1036–1038.
- [20] EVENS B S, KNAUER J, TAYLOR J U, et al. Development and characterization of six new microsatellite markers for the silver-or gold-lipped pear oyster, *Pinctada maxima*(Pteriidae) [J]. *Molecular Ecology Notes*. 2006, 6(3): 835–837.
- [21] HERBINGER C M, SMITH C A, LANGY S. Development and characterization of novel tetra-and dinucleotide microsatellite markers for the French Polynesia black-lipped pearl oyster, *Pinctada margaritifera*[J]. *Molecular Ecology Notes* 2006, 6(1): 107–109.
- [22] LI G, HUBERT S, BUCKLIN K, et al. Characterization of 79 microsatellite DNA markers in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Molecular Ecology Notes*, 2003, 3(2): 228–232.
- [23] MORGAN T S, ROGERS A D, IYENGAR A. Novel microsatellite markers for the European oyster *Ostrea edulis* [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2000, 9(4): 495–497.
- [24] REECE K S, RIBEIRO W L, GAFFNEY P M, et al. Microsatellite marker development and analysis in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*): Confirmation of null alleles and non-Mendelian segregation ratios[J]. *Journal of Heredity*, 2004, 95(4): 346–352.
- [25] 佟广香, 闫学春, 匡友谊, 等. 马氏珠母贝微卫星快速分离及遗传多样性分析[J]. *海洋学报*, 2007, 29(4): 170–176.
- [26] JEFFS P. Multiple sequence alignment with Clustal X[J]. *Computer Corner*, 1998, 23(1): 78–80.
- [27] ROZEN S, SKALETSKY H J. Primer 3. Code available at [http://www-genome.wi.mit.edu/genome\\_software/other/primer3.html](http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html), 1998.
- [28] BOTSTEIN D, WHITE R. L, SKOLNICK M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314–331.
- [29] WEBER J L. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub>(dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms[J]. *Genomics*, 1990, 7(3): 524–530.
- [30] WANG Z, WEBER J L, ZHANG G, et al. Survey of plant short tandem DNA repeat[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1994, 88: 1–6.

- [31] BRENNER S, ELGAR G, SANDFORD R, et al. Characterization of the pufferfish (*Fugu*) genome as a compact model vertebrate genome[J]. *Nature*, 1993, 366: 265–268.
- [32] CHISTIAGO D A, HELLEMAN B, VOLCKAERT F A M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics[J]. *Aquaculture*, 2006, 255(1–4): 1–29.
- [33] YU D H, CHU K H Genetic variation in wild and cultured populations of the pearl oyster *Pinctada fucata* in southern China[J]. *Aquaculture*, 2006, 258(1–4): 220–227.
- [34] YU D H, CHU K H Low genetic differentiation among widely separated populations of the pearl oyster *Pinctada fucata* as revealed by AFLP[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2006, 333(1): 140–146.
- [35] PEMBERTON J M, SLATE J, BANCROFT D R, et al. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies[J]. *Molecular Ecology*, 1995, 4: 249–252.
- [36] JONES A G, STOCKWELL C A, WALKER D, et al. The molecular basis of a microsatellite null allele from the white sands pupfish[J]. *Journal of Heredity*, 1998, 89(4): 339–342.
- [37] SUGAYA T, IKEDA M, MORI H, et al. Inheritance mode of microsatellite DNA markers and their use for kinship estimation in kuruma prawn *Penaeus japonicus*[J]. *Fisheries Science*, 2002, 68(2): 299–305.
- [38] LI Q, PARK C, KOBAYASHI T, et al. Inheritance of microsatellite DNA markers in the Pacific abalone *Haliotis discus hannai*[J]. *Marine Biotechnology*, 2003, 5(4): 331–338.
- [39] WANG Y, GUO X. Chromosomal rearrangement in Pectinidae revealed by rRNA loci and implications for bivalve evolution[J]. *Biological Bulletin*, 2004, 207(3): 247–256.
- [40] PAUAUD O, BIAIR M W. Development of a microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L)[J]. *Molecular and General Genetics*, 1996, 252(5): 597–607.
- [41] MA Z Q, RODER M, SORRELLS. Frequencies and sequence characteristics of di, tri-, and tetra-nucleotide microsatellite in wheat[J]. *Genome*, 1996, 39(1): 123–130.
- [42] Smulders J M. Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivates and accessions of other *Lycopersicon* species[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, 94(2): 264–272.