

微卫星筛选及其在对虾遗传学研究中的应用

Isolation and application of microsatellite in genetics studies of shrimp

张留所^{1,2}, 相建海¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 实验海洋学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100039)

中图分类号: Q31 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2007)02-0072-05

Litt 等^[1] 1989 年在心肌肌动蛋白的基因内扩增了一种 2 核苷酸重复并创造了“微卫”(microsatellite)这个名词。后来, Edward 等^[2] 称微卫星为简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)。现在人们一般把微卫星定义为 1~6 bp 基元组成的重复序列。由于分布于整个基因组(包括编码区和非编码区), 具有高度变异性、共显性遗传和适于自动化操作等特点, 微卫星成为第二代分子标记的代表。

微卫星的主要缺陷在于当某一物种没有基因组信息而首次开发时需大量的时间和资金投入。传统方法发展微卫星标记一般首先建立所研究对象的部分基因组文库, 然后利用富含重复序列探针通过菌斑杂交筛选微卫星片段, 测序后进一步在微卫星旁侧保守区设计特异引物^[3]。传统方法操作相对简单, 但当所研究物种微卫星分布频率较低时, 这种途径就会变得极其费力且效率低下。所以在微卫星出现后的十几年里, 开发出了多种微卫星筛选策略以用于减少分离时间并提高产率。

海洋水产经济动物的分子遗传研究落后于陆生动植物, 大多还处于寻找合适分子标记为遗传结构分析、图谱构建及进一步研究打基础的初级阶段, 可以相信微卫星标记研究将成为这一领域的一个热点。对虾中微卫星标记的筛选已有报道, 但主要集中于斑节对虾、凡纳滨对虾, 微卫星数量有限^[4,5]。由于生态环境恶化, 疾病流行给水产养殖造成的巨大经济损失使对虾的遗传改良显得尤为迫切, 而筛选大量的高效、多态、共显性标记是进行连锁图谱构建、QTL 定位基因、分子标记辅助选择的基础。作者对微卫星筛选方法及其在对虾遗传学研究中的应用作一综述。

1 微卫星筛选方法

过去十几年出现了多种微卫星筛选方法, 筛选

策略大致可分为 7 类, 分别为传统方法^[3], 引物延伸法^[6,7], 选择性杂交^[8,9], 基于 RAPD 方法^[10,11], 基于 SAMPL 的方法^[12,13], 基于 SAGE 的方法^[14,15], 其它方法^[16,17]。Zane 等^[18] 已综述了前 4 类微卫星筛选策略, 作者将重点介绍后几类。

1.1 基于 SAMPL 的微卫星筛选方法

SAMPL^[19] (selective amplified microsatellite polymorphic loci) 是 AFLP 技术的延伸, 在不需克隆、设计特异引物情况下, 可用来扩增微卫星序列, Hayden^[12] 阐述了一种运用改进的 SAMPL 发展微卫星的方法, 对 SAMPL 进行了两点改进: (1) 双酶切连特异接头后采用抑制 PCR 扩增(suppression PCR technology); (2) 引入 5' 锚定 SSR 引物^[16]。选择性扩增后银染显带, 对扩增谱带测序后设计一条重复序列旁侧保守区引物就可进行特异微卫星位点的扩增。Yang 等^[13] 利用 MFLP (microsatellite-anchored fragment length polymorphisms) 发展了 8 对微卫星引物, 此处 MFLP 即为 SAMPL。

1.2 基于 SAGE 的微卫星筛选方法

Hayden^[14] 发展了一种快速产生微卫星标记的技术: 序列标签微卫星展示(sequence-tagged microsatellite profiling, STMP)。该技术基于 SAGE(serial analysis gene expression)^[20]。STMP 不需筛选文库以获取富含微卫星克隆, 效率比传统方法提高约 24 倍。此方法大致步骤如下: Pst、Mse 双酶切基因组 DNA, 接头连接后 PCR 扩增获取大量的双酶切

收稿日期: 2005-01-04; 修回时期: 2005-03-28

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(3023028)

作者简介: 张留所(1975-), 男, 河北衡水人, 博士生, 研究方向: 海洋动物分子遗传学; 相建海, 通讯作者

片段;采用 PCT6^[11]引物和生物素标记的 Pst 引物扩增获取富含微卫星的片段并经琼脂糖电泳选取 400 bp 及以下部分,Bsg 酶切上述片段产生每一扩增产子的接头序列标签,标签包括 Pst 接头及另外 16 bp 特异序列;经磁珠洗脱,生物素标记的 Bsg 接头连接到暴露的 Bsg 酶切位点并在序列标签 3 端引入 EcoR 位点,PCR 扩增、磁珠洗脱,EcoR 酶切产生 22 bp 序列标签,多标签连接后克隆测序。因每一标签与扩增产子具一一对应关系,所以每一 22 bp 标签均可设计为特异引物(STM 引物)用以扩增微卫星。Hayden^[15]对 STMP 技术加以改进,引入选择性杂交经引物延伸富集 Pst - Mse 片段,以上述片段为模板用 22 bp 标签引物^[14]与 Mse 引物扩增微卫星序列,所得片段测序后可设计微卫星另一特异引物。

1.3 其他微卫星筛选方法

Fisher 等^[16]设计了 5 铆钉引物,经 PCR 扩增富集微卫星序列,此方法中的 5 铆钉引物被一些基于 SAMPL 的微卫星筛选方法所采纳。Lench^[17]等采用载体 PCR 发展微卫星,以一载体特异引物与富含微卫星序列引物进行 PCR 扩增,目标片段测序后可用以设计特异引物。通过生物信息学方法从 EST 中筛选微卫星也是标记来源之一,EST 计划的进一步发展将为微卫星发掘提供更多的素材。

2 微卫星标记在对虾中的开发和利用

对虾属(*Penaeus* Fabricius, 1798)对虾是对虾总科甚至是甲壳动物中最具经济价值的一个类群^[21],对虾中的研究工作大多在上述类群中展开,对虾属 29 种对虾的分类地位一直存在争议,Farfante 等^[22]将对虾属中的 6 个亚属均提升为属,本文将上述 6 属对虾中的微卫星标记开发和利用作一总结。

2.1 斑节对虾(*Penaeus monodon*)

Tassanakajon 等^[23]利用传统方法在斑节对虾中筛选出 97 个(GT)重复和 16 个(CT)重复。Xu 等^[24]未经探针筛选,对斑节对虾基因组文库直接测序开发微卫星标记获得较好效果,所研究的 10 对引物在凡纳对虾中通用,显示了某些微卫星的种间可扩增性。Brooker, Supungul 等^[25, 26]分别利用微卫星标记研究了澳大利亚西水域 5 个斑节对虾种群和泰国 5 个不同斑节对虾种群的遗传变异和分化。Lehnert 等^[27]在对斑节对虾不同组织 EST 分析中发现了一些微卫星序列,Whan^[28]从斑节对虾 EST 中筛选出 2 个新的多态微卫星标记。Xu 等^[28]利用 6 个微卫星标记研究了菲律宾 4 个野生斑节对虾地理种群的遗

传多样性(以两个养殖群体作对照),同时比较了红树林状况对对虾养殖系统与野生斑节对虾种群遗传多样性的影响。Wuthisuthimethavee 等^[4]利用选择性杂交法从斑节对虾 2 417 个克隆中筛选到 406 个阳性克隆(16.8%),设计的 129 对引物中 102 对可用来扩增微卫星位点,这组微卫星为斑节对虾育种提供了有利工具。Yu^[30]等利用 DIG 标记的探针筛选了斑节对虾基因组文库,获得了 23 个多态微卫星标记。

2.2 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)

Garcia^[31]利用传统方法从 1 400 个凡纳滨对虾克隆中筛选到 134 个阳性克隆,研究了其中 3 个微卫星标记在凡纳滨对虾中的杂合度。Garcia^[32]在凡纳滨对虾一种群特异 RAPD 标记(B20)中发现了 2 个微卫星位点。Wolfus^[33]等利用 Garcia^[31]发展的微卫星作为一种遗传分析工具监测凡纳滨对虾育种,结果显示所有后代均为预测父母本的后裔,所有家系均遵循孟德尔遗传。Cruz 等^[34]采用两种策略发展凡纳滨对虾微卫星标记:(1)基因组文库随机克隆测序;(2)利用生物素标记的(GT)₁₀和(CT)₁₀探针筛选基因组文库。22 个随机选择克隆中,16 个含微卫星区域。杂交筛选的 68 个阳性克隆中,38 个克隆共含有 97 个重复序列区。Meehan 等^[5]利用传统方法从 1 479 个凡纳滨对虾克隆中筛选到 251 个阳性克隆,其中 173 个克隆含有 573 个简单重复序列具有 3, 5 和 10 个以上微卫星重复的基因组出现频率分别为 1/0.94 kb, 1/2.78 kb 和 1/5.94 kb。在所设计的 136 对引物中,93 对在养殖群体中表现为多态,这些标记正用于凡纳滨对虾连锁图谱构建中。

2.3 中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)

徐鹏等^[35, 36]运用载体 PCR 法在中国明对虾中进行了微卫星筛选。徐鹏等^[37]经过对中国明对虾头胸部 EST 分析,筛选到可供利用的微卫星标记。刘萍等^[38]构建了中国明对虾部分基因组文库,选取合适片段直接测序,其中 54 个克隆的 DNA 插入片段含有微卫星序列,共获得了 111 个微卫星序列,并利用其开发的部分标记用于中国明对虾种群遗传学分析^[39, 40]。

2.4 日本对虾(*Marsupenaeus japonicus*)

Moore 等^[41]利用传统方法和引物延伸法在日本对虾中发展微卫星标记,由于阳性克隆测序后显示含较长的重复序列,很难找到重复序列旁侧保守区,共找到 12 个可供利用的微卫星标记并用于谱系鉴定,上述微卫星表现出较强的种特异性,在斑节对虾,食用对虾(*Penaeus esculentus*)和白滨对虾(*Litopenaeus*

setiferus) 中均无扩增产物。Sugaya 等^[42] 利用 Moore^[41] 筛选的 5 个微卫星标记和线粒体 PCR-RFLP 研究了分布于日本的 4 个野生日本对虾群体的遗传结构和变异。Sugaya^[43] 等利用 Moore^[41] 筛选的微卫星标记鉴定了 7 个已交尾野生日本对虾及其子代中等位基因遗传模式并用于日本对虾的血系鉴定。

2.5 其他对虾

Ball 等^[44] 利用传统方法在白滨对虾中发展了 (GT)_n 微卫星标记, 并进行了群体遗传分析^[45], 所用标记多态性高并表现出杂合缺失。研究发现随时间变化等位基因频率保持恒定, 临近群体只显示较小分化, 墨西哥湾与大西洋群体间表现出较大分化。

Vonau^[46] 在细角滨对虾 (*Litopenaeus stylirostris*) 中利用传统方法筛选微卫星, 经 PCR 优化开发出 3 个微卫星标记。Bierne^[47] 利用上述标记和一个凡纳滨对虾微卫星标记研究了两个经 17 代遗传选择的细角滨对虾种群生长率与微卫星杂合度的相关性。

Meadows 等^[48] 建立了 4 个食用对虾基因组文库, 用选择性杂交法磁珠捕获富集微卫星序列, 共发展了 23 个 3 碱基和 4 碱基微卫星位点。

Maggioni 等^[49] 利用传统方法并引用地高辛标记探针从巴西美对虾 (*Farfantepenaeus brasiliensis*)、小褐美对虾 (*Farfantepenaeus subtilis*) 和圣保罗对虾 (*Farfantepenaeus paulensis*) 中发展微卫星标记, 所检测的 9 个多态位点中 7 个均可在 3 种对虾中扩增。Maggioni 等^[50] 建立了南方滨对虾 (*Litopenaeus schmitti*) (CA)_n 文库, 杂交和筛选步骤利用了地高辛标记探针, 作者同时使用已发表的白滨对虾微卫星引物^[44] 对巴西沿海 8 个位点南方滨对虾群体遗传结构进行了分析, AMOVA 分析显示明显的生物地理不连续性分布。

微卫星标记已在多种对虾中开发并应用于遗传多样性分析, 亲子代鉴定和遗传育种评估。对虾微卫星筛选仍以传统方法为主, 探针多由生物素或地高辛标记代替最初同位素标记, 对部分基因组文库直接测序及选择性杂交法也得到了一定的应用, 相信随着对虾功能基因组研究的开展, EST 计划规模的扩大, 编码区微卫星将得到较大规模的发掘。但由于数量有限, 至今未有对虾微卫星标记连锁图谱问世。随着微卫星标记数量的增加, 对虾功能相关 QTL 或主效基因定位, 分子标记辅助选择, 比较基因组进化等工作将得以全面开展。

参考文献:

- [1] Litt M, Luty J A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene [J]. **Am Jour of Hum Genet**, 1989, 44:397-401.
- [2] Edward A, Civitello A, Hammond H A, et al. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats [J]. **Am Hum Genet**, 1991, 49:746-756.
- [3] Rassmann K, Schlotterer C, Tautz D. Isolation of simple sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting [J]. **Electrophoresis**, 1991, 12:113-118.
- [4] Wuthisuthimethavee S, Lumubol P, Vanavichit A, et al. Development of microsatellite markers in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) [J]. **Aquaculture**, 2003, 224:39-50.
- [5] Meehan D, Xu Z, Zuniga G, et al. High frequency and large number of polymorphic microsatellites in cultured shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* [Crustacea: Decapoda] [J]. **Mar Biotech**, 2003, 5: 311-330.
- [6] Ostrander E A, Jong P M, Rine J, et al. Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences [J]. **PANS**, 1992, 89:3 419-3 423.
- [7] Paetkau D. Microsatellites obtained using strand extension: An enrichment protocol [J]. **Biotechniques**, 1999, 26:690-697.
- [8] Fischer D, Bachmann K. Microsatellite enrichment in organisms with large genomes (*Allium cepa* L.) [J]. **Biotechniques**, 1998, 24:796-802.
- [9] Hamilton M B, Pincus E L, Di-Fiore A, et al. Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites [J]. **Biotechniques**, 1999, 27: 500-507.
- [10] Wu K, Jones R, Danneberger L, et al. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning [J]. **Nucl Aci Res**, 1994, 22:3 257-3 258.
- [11] Lunt D H, Hutchinson W F, Carvalho G R. An efficient method for PCR-based identification of microsatellite arrays (PIMA) [J]. **Mol Ecol**, 1999, 8: 893-894.
- [12] Hayden M J, Sharp P J. Targeted development of informative microsatellite (SSR) markers [J]. **Nucl Aci Res**, 2001, 29:e44.
- [13] Yang H, Sweetingham M W, Cowling W A, et al. DNA fingerprinting based on microsatellite-anchored

- fragment length polymorphisms, and isolation of sequence-specific PCR markers in lupin (*Lupinus angustifolius* L.) [J]. **Mol Breeding**, 2001, 7: 203-209.
- [14] Hayden M J, Sharp P J. Sequence tagged microsatellite profiling (STMP): a rapid technique for developing SSR markers [J]. **Nucl Ac Res**, 2002, 30:e43.
- [15] Hayden M J, Good G, Sharp P J. Sequence tagged microsatellite profiling (STMP): improved isolation of DNA sequence flanking target SSRs [J]. **Nucl Ac Res**, 2002, 30:e129.
- [16] Fisher P J, Gardner R C, Richardson T E. Single locus microsatellites isolated using 5 anchored PCR [J]. **Nucl Ac Res**, 1996, 24: 4 369-4 371.
- [17] Lench N J, Norris A, Bailey A, et al. Vectorette PCR isolation of microsatellite repeat sequences using anchored dinucleotide repeat primers [J]. **Nucl Ac Res**, 1996, 24:2 190-2 191.
- [18] Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation: a review [J]. **Mol Eco**, 2002, 11:1-16.
- [19] Witsenboer H, Vogel J, Micheltore R W. Identification, genetic localization, and allelic diversity of selectively amplified microsatellite polymorphic loci in lettuce and wild relatives (*Lactuca* spp.) [J]. **Genome**, 1997, 40: 923-936.
- [20] Velculescu V E, Zhang L, Vogelstein B, et al. Serial analysis of gene expression [J]. **Science**, 1995, 270:484-487.
- [21] Lavery S, Chan T Y, Tam Y K, et al. Phylogenetic relationships and evolutionary history of the shrimp genus *Penaeus* s.l. derived from mitochondrial DNA [J]. **Mol Phylo and Evol**, 2004, 31: 39-49.
- [22] Farfante P, Kensley I. Penaeoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World[M]. Paris: Editions du Museum National Histoire Naturelle, 1997.
- [23] Tassanakajon A, Tiptawonnuikul A, Supungul P, et al. Isolation and characterization of microsatellite markers in the black tiger prawn *Penaeus monodon* [J]. **Mol Mar Bio and Biotech**, 1998, 7:55-61.
- [24] Xu Z, Dhar A K, Wyrzykowski J, et al. Identification of abundant and informative microsatellites from shrimp (*Penaeus monodon*) genome[J]. **Anim Genet**, 1999, 30: 150-156.
- [25] Brooker A L, Benzie J A H, Blair D, et al. Population structure of the giant tiger prawn *Penaeus monodon* in Australian waters, determined using microsatellite markers [J]. **Mar Bio**, 2000, 136: 149-157.
- [26] Supungul P, Sootanan P, Klinbunga S, et al. Microsatellite polymorphism and the population structure of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand [J]. **Mar Biotech**, 2000, 2: 339-347.
- [27] Lehnert S A, Wilson K J, Byrne K, et al. Tissue-specific expressed sequence tags from the black tiger shrimp *Penaeus monodon* [J] **Mar Biotech**, 1999, 1: 465-476.
- [28] Whan V A, Wilson K J, Moore S S. Two polymorphic microsatellite markers from novel *Penaeus monodon* ESTs[J]. **Anim Genet**, 2000, 31: 143-144.
- [29] Xu Z, Primavera J, Pettit P, et al. Genetic diversity of wild and cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites[J]. **Aquaculture**, 2001, 199: 13-40.
- [30] Yu W P, Chou H H, You E M, et al. Isolation and characterization of 23 polymorphic microsatellite markers for diversity and stock analysis in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. **Mol Eco Notes**, 2004, 4:345-347.
- [31] Garcia D K, Alcivar-Warren A. Identification and organization of microsatellite in *Penaeus vannamei* shrimp[J]. **Anim Genet**, 1996, supplement:71.
- [32] Garcia D K, Dhar A K, Alcivar-Warren A. A molecular analysis of a RAPD marker (B20) reveals two microsatellites and differential mRNA expression in *Penaeus vannamei* [J]. **Mol Mar Bio and Biotech**, 1996, 5: 71-83.
- [33] Wolfus G M, Garcia D K, Alcivar-Warren A. Application of the microsatellite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs [J]. **Aquaculture**, 1997, 152:35-47.
- [34] Cruz P, Mejia-Ruiz C H, Perez-Enriquez R, et al. Isolation and characterization of microsatellites in Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* [J]. **Mol Eco Notes**, 2002, 2: 239.
- [35] 徐鹏, 周岭华, 相建海. 用 PCR 法快速筛选中国对虾含微卫星的重组阳性克隆[J]. 水产学报, 2001, 25:127-130.
- [36] 徐鹏, 周岭华, 相建海. 中国对虾微卫星 DNA 的筛选[J]. 海洋与湖沼, 2001, 32:255-259.
- [37] 徐鹏, 周岭华, 田丽萍, 等. 从中国对虾 ESTs 中筛选微卫星标记的研究[J]. 水产学报, 2003, 27: 213-218.
- [38] 刘萍, 孟宪红, 孔杰, 等. 中国对虾部分基因组文库构建和微卫星 DNA 序列的筛选[J]. 高技术通讯, 2004, 14:87-90.
- [39] 刘萍, 孟宪红, 孔杰, 等. 中国对虾微卫星 DNA 多态性分析[J]. 自然科学进展, 2004, 14:333-338.
- [40] 刘萍, 孟宪红, 何玉英, 等. 中国对虾 (*Fenneropenaeus*

- us chinensis*) 黄、渤海 3 个野生地理群遗传多样性的微卫星 DNA 分析[J]. 海洋与湖沼, 2004, 35: 252-257.
- [41] Moore S S, Whan V, Davis G P, *et al.* The development and application of genetic markers for the kuruma prawn *Penaeus japonicus* [J]. *Aquaculture*, 1999, 173: 19-32.
- [42] Sugaya T, Taniguchi N. Relatedness structure estimated by microsatellites DNA and mitochondrial DNA polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms analyses in the wild population of kuruma prawn *Penaeus japonicus* [J]. *Fis Sci*, 2002, 68: 793-802.
- [43] 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]. *Fis Sci*, 2002, 68: 299.
- [44] Ball A O, Leonard S, Chapman R W. Characterization of (GT)_n microsatellites from native white shrimp (*Penaeus setiferus*) [J]. *Mol Ecol*, 1998, 7: 1 251-1 253.
- [45] Ball A O, Chapman R W. Population genetic analysis of white shrimp, *Litopenaeus setiferus*, using microsatellite genetic markers [J]. *Mol Ecol*, 2003, 12: 2 319.
- [46] Vonau V, Ohresser M, Bierre N, *et al.* Three polymorphic microsatellites in the shrimp *Penaeus stylirostris* [J]. *Anim Genet*, 1998, 30(3): 234-235.
- [47] Bierre N, Bezuart I, Vonau V, *et al.* Microsatellite-associated heterosis in hatchery-propagated stocks of the shrimp *Penaeus stylirostris* [J]. *Aquaculture*, 2000, 184: 203-219.
- [48] meadows J R S, Ward, R D, Grewe P M, *et al.* Characterization of 23 Tri- and tetranucleotide microsatellite loci in the brown tiger prawn, *Penaeus esculentus* [J]. *Mol Ecol Notes*, 2003, 3: 454-456.
- [49] Maggioni R, Rogers A D. Microsatellite primers for three Western Atlantic *Farfantepenaeus* prawn species [J]. *Mol Ecol Notes*, 2002, 2: 51.
- [50] Maggioni R, Rogers A D, Maclean N. Population structure of *Litopenaeus schmitti* (Decapoda: Penaeidae) from the Brazilian coast identified using six polymorphic microsatellite loci [J]. *Mol Ecol*, 2003, 12: 3 213-3 217.

(本文编辑:刘珊珊)

(上接第 54 页)

Study on the distribution of hepatitis A virus in seawater and shellfish in the coastal area of Liaodong Bay

FAN Jing-feng, SONG Li-chao, ZHANG Xi-chang, LIANG Yu-bo, GUAN Dao-ming
(National Marine Environmental Monitoring Center, Dalian 116023, China)

Received: Jun. 13, 2004

Key words: Liaodong Bay; seacoast seawater; economic shellfish; hepatitis A virus

Abstract: The results of hepatitis A virus (HAV) detected by RT-PCR in the surface layer seawater and economic shellfish samples collected from several emphasis seacoast areas in Liaodong Bay were reported. The research showed that there exists HAV in all the seawater samples and four economic shellfish samples. It is obvious that life sewage seriously affects the main seacoast area of Liaodong bay, so related departments must reinforce sanitation manage in order to avoid prevalence of HVA caused by seawater and edible marine product.

(本文编辑:张培新)