

文章编号: 1000-0615(2008)02-0174-08

马氏珠母贝 EST 微卫星的筛选

石耀华^{1,2,3}, 洪 葵¹, 郭希明³,
王 嫣², 侯占辉², 顾志峰², 王爱民²

(1. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所,

热带作物生物技术国家重点实验室, 华南热带农业大学, 海南 海口 571101;

2. 海南省热带水生生物技术重点实验室, 海南大学海洋学院教育部热带生物资源重点实验室, 海南 海口 570228;

3. Haskin Shellfish Research Laboratory, Institute of Marine and Coastal Sciences,
Rutgers University, 6959 Miller Avenue, Port Norris, NJ 08349, USA)

摘要: 构建了马氏珠母贝的血液、足、鳃、胃、肝、心脏、外套膜、珍珠囊和感染多毛虫马氏珠母贝的血液(血感)等 9 个组织的 cDNA 文库, 测序获得了 6979 个 EST 序列, 从中查找到了 268 个重复序列, 隶属于 243 个 EST, 含微卫星的 EST 数占 EST 总数的 3.48%。珍珠囊 cDNA 文库含微卫星的序列所占比例最高, 为 6.16%, 血感的最低, 为 1.65%。双碱基重复序列 130 个, 占 48.5%, (AT/AT) n 类型最常见; 三碱基类型的 83 个, 占约 31%, 其中 (AAT/ATT) n 和 (AAG/CTT) n 较多; 四碱基重复的有 30 个, 占 11.2%, (AAAT/ATTT) n 占了该类型的约 50%。一共能够设计 151 对微卫星引物, 有 130 对可以扩增, 占合成引物总数的 86.09%, 其中, 多态性引物 45 对。多态性 EST-SSR 的筛选将为马氏珠母贝的分子遗传学研究、种质鉴定和野生资源保护等提供可靠的工具。

关键词: 马氏珠母贝; EST-SSR; 分子遗传学

中图分类号: Q 75; S 968.3 **文献标识码:** A

马氏珠母贝 (*Pinctada martensii* Dunker), 又称合浦珠母贝, 是培育海水珍珠的最主要贝类之一。我国自 1965 年成功地开展马氏珠母贝的人工育苗以来, 海水珍珠养殖业迅速发展, 目前已成为广东、广西和海南沿海部分地区的支柱产业^[1]。由于长期的人工养殖和繁育, 育珠贝变小, 死亡率增加, 马氏珠母贝种质已呈现明显退化现象, 因此马氏珠母贝新品种选育日益受到重视。优良品种的培育需要良好的种质资源, 但是移种养殖和人工育苗养殖贝被释放或逃逸到自然环境可能影响野生种群的遗传结构^[2]。因此, 需要对马氏珠母贝的野生种群的遗传多样性进行评价, 筛选稳定可

靠的分子标记, 了解人工养殖对野生群体的干扰程度, 保护种质资源。

马氏珠母贝野生种群遗传多样性研究主要采用同工酶和 RAPD 技术^[3-5], 简单序列重复间区 (inter-simple sequence repeat, ISSR) 也有过报道^[6], 但是这些遗传标记多态性较低或者不稳定, 逐渐很少应用。微卫星 (microsatellite, MS), 即简单序列重复 (simple sequence repeat, SSR), 是一类核苷酸短序列的简单串联重复, 广泛分布于真核生物的基因组中^[7]。微卫星标记具有高度的多态性和丰富的信息含量, 杂合度可达 100%, 每代变异超过 2%^[8-9]; 微卫星标记是共显性标记, 能够

收稿日期: 2007-05-27

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划 (2006AA10A409); 国家自然科学基金 (40676075; 30460105); 国际科技合作重点项目 (2004DFA07200); 博士后科学基金 (2005037627); 海南省自然科学基金 (80412)

作者简介: 石耀华 (1970-), 男, 湖北咸宁人, 博士, 从事水生动物养殖育种、遗传和发育研究。E-mail: stone70@126.com

通讯作者: 王爱民, E-mail: aimwang6@hotmail.com

用于研究等位基因,区分纯合体和杂合体,而且,微卫星是基于特定的已知序列设计引物进行扩增的,具有良好的重复性和保真性,便于实验室间交流,是一种很有价值的遗传标记^[10-11], AFLP、RAPD 等显性标记无法做到。目前,微卫星标记已被广泛应用于动植物遗传多样性研究^[12]、遗传图谱构建^[13]、品种鉴定、疾病检测以及亲本分析^[14]等。表达序列标签(expressed sequence tags, EST)是功能基因的一部分序列,从中筛选的微卫星序列(EST-SSR)不仅具有基因组微卫星的优点,而且能够为功能基因提供“绝对”的标记^[10],由于物种间基因共线性和保守性,从一种生物中开发的 EST-SSR 很有可能在亲缘关系较近的其它物种同样有效,从而为比较基因组学和同源基因克隆提供新的途径^[15]。

本文通过构建马氏珠母贝多个组织的 cDNA 文库和进行较大规模的 EST 测序,筛选多态性微卫星标记,为马氏珠母贝种群遗传多态性、分子辅助选择育种和遗传图谱构建等提供新的途径,促进马氏珠母贝的种质保护和优良品种的选育。

1 材料与方法

1.1 RNA 提取和文库构建

马氏珠母贝取自海南陵水县黎安毅珠珍珠养殖场,解剖取健康马氏珠母贝的血液、足、鳃、胃、肝、心脏、外套膜、珍珠囊和感染多毛虫马氏珠母贝的血液(血感),加入 10 倍体积的 Trizol(购自 Invitrogen 公司),电动匀浆(Pro 200),按照说明书进行提取总 RNA, RNeasy Mini Kit(购自 QIAGEN 公司),琼脂糖电泳检测 RNA 质量,并用 Oligotex mRNA Kit(购自 QIAGEN 公司)进行 mRNA 纯化。

足、鳃、胃和血感的 mRNA 按照 SMART™ cDNA Library Construction Kit(Clontech 公司)进行逆转录和合成第二链 cDNA,与 pGEM-T 载体(pGEM-T Vector System I Kit,购自 Promega)连接,转化大肠杆菌,构建质粒文库;血液和肝脏的 mRNA 按照 SMART™ cDNA Library Construction Kit(Clontech 公司)的实验手册构建噬菌体文库,载体为 pTripIEx2;心脏、外套膜和珍珠囊的 mRNA 按照 ZAP-cDNA Synthesis Kit(购自 Stratagene 公司)的说明合成 cDNA 和进行噬菌体文库构建,载体为 pBluescript SK(-)(表 1)。

表 1 马氏珠母贝 cDNA 文库的类型

Tab.1 The cDNA libraries constructed from 9 tissues of *P. martensii*

组织名称 tissue name	文库类型 library character
血液 blood	SMART cDNA 噬菌体文库
血感 infected blood	SMART cDNA 质粒文库
足 gastropod	SMART cDNA 质粒文库
鳃 gill	SMART cDNA 质粒文库
胃 stomach	SMART cDNA 质粒文库
肝脏 liver	SMART cDNA 噬菌体文库
心脏 heart	ZAP-cDNA 噬菌体文库
外套膜 mantle	ZAP-cDNA 噬菌体文库
珍珠囊 pearl sac	ZAP-cDNA 噬菌体文库

1.2 EST 测序、微卫星的查找和引物设计

各个组织的文库铺平板后随机挑选克隆进行测序(国家人类基因组南方研究中心)。测序结果去掉载体序列,转换成 Fasta 格式文件,用 Misa 软件进行微卫星的查找,查找参数为:(2/5) (3/4) (4/4) (5/4) (6/3) (7/3) (8/3) (9/3),复合微卫星的两个微卫星间的最大距离为 100 bp。

微卫星序列去掉相同的克隆后进行引物设计,采用 Primer3 在网上进行在线设计(<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3-www.cgi>)。

1.3 样品来源及 DNA 提取

三亚种群和印度种群马氏珠母贝取自海南陵水毅珠珍珠养殖场,各 4 个个体,取闭壳肌保存于 95%乙醇中,取 0.1 g 闭壳肌,0.8%生理盐水漂洗,剪碎后置于 1.5 mL 离心管中,加入 0.5 mL STE[10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl、pH 8.0, 1 mmol·L⁻¹ EDTA (pH 8.0), 100 mmol·L⁻¹ NaCl], 65 μL 10%的 SDS 和 6 μL 蛋白酶 K (10 mg·mL⁻¹), 55 °C 消化,依次以等体积酚/氯仿(酚:氯仿:异戊醇 = 25:24:1)和氯仿/异戊醇(氯仿:异戊醇 = 24:1)各抽提 2 次,然后加入无水乙醇沉淀,70%乙醇洗涤,于室温干燥,0.1×TE 溶解备用。

1.4 引物筛选

三亚种群和印度种群马氏珠母贝各取 3 个个体提取的 DNA 混合,以混合 DNA 为模板,在终浓度 1.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂ 的条件下进行如下 PCR:先 94 °C 预变性 4 min;94 °C 30 s,退火 30 s,72 °C 2 min,35 个循环;72 °C 延伸 5 min, T = 50, 53, 55, 58, 60, 63 °C, 确定最适退火温度;不能够扩增的

引物将 $MgCl_2$ 浓度提高至 $2.0 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 后在以上退火温度下进行 PCR; 1% 琼脂糖凝胶电泳, 确定最适的 PCR 条件。

用三亚种群和印度种群马氏珠母贝各 4 个的 DNA 为模板在确定的最适条件下进行 PCR 扩增, 12% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳, EB 染色。

2 结果

2.1 微卫星序列筛选

从 9 个马氏珠母贝组织的 cDNA 文库中挑选的克隆共获得 6979 个 EST 序列, 从中查找到了 243 个含微卫星的 EST, 含微卫星的 EST 数占 EST 总数的 3.48%, 其中有 7 个序列含有 2 个以上微卫星。243 个含微卫星的 EST 有 32 个是相同的,

还有 41 个序列的微卫星位于距离 EST 两端不到 16 bp 处, 不能够用于微卫星引物的设计, 可以用于微卫星引物设计的 cDNA 序列占 EST 总数的 2.44% (表 2)。

9 个文库中, 珍珠囊 cDNA 文库的含微卫星的序列所占比例最高 (6.16%), 心脏和外套膜的紧随其后, 而血液、血感和足中的比例较低, 只有珍珠囊的 26.8% ~ 29.9%; 心脏含微卫星 EST 可用于设计引物 41 个, 占其 EST 总数的 4.54%, 比例最高, 而珍珠囊由于相同 EST 数和微卫星处于两端的 EST 数较多, 只有 31 个 EST 可以用于设计引物, 占其 EST 总数的 3.74%; 血感中可用于微卫星引物设计的 EST 数仅占其总数的 0.76% (表 2)。

表 2 马氏珠母贝 9 个 cDNA 文库含微卫星的 EST 比例

Tab.2 The distribution of microsatellite sequences in 9 cDNA libraries of *P. martensii*

cDNA 文库 cDNA libraries	测序数量 sequencing amount	含微卫星 EST		ESTs containing repeat motif		含微卫星 EST 数占 文库 EST 比例 the ratio of MS containing EST	用于设计引物的 EST 数占文库 EST 比例 the ratio of EST for primer development
		总数 total	相同 EST 数 identical EST sequences	微卫星处于 末端序列数 sequences with motif at/near to the end	可用于设计 引物序列数 sequences for primer design		
血液 blood	760	14	4	2	8	1.84	1.05
血感 infected blood	788	13	3	4	6	1.65	0.76
足 gastropod	778	13	1	2	10	1.67	1.29
鳃 gill	449	13	0	1	12	2.90	2.67
胃 stomach	724	16	1	2	13	2.21	1.80
肝脏 liver	850	18	2	2	14	2.12	1.65
心脏 heart	903	54	6	7	41	5.98	4.54
外套膜 mantle	899	51	4	12	35	5.67	3.89
珍珠囊 pearl sac	828	51	11	9	31	6.16	3.74
总计 total	6979	243	32	41	170	3.48	2.44

268 个 EST-SSR 中有 25 个是复合的 (compound), 占 9.3%。双碱基重复序列 130 个, 占 48.5%, 其中 (AT/AT) n 类型最常见, 约占总位点数的 29.1%, 重复长度不小于 18 bp 的微卫星位点的序列数为 18 个; 三碱基类型的 83 个, 占约 31%, 其中 (AAT/ATT) n 和 (AAG/CTT) n 较多, 占了三碱基类型的一半, 重复长度不小于 18 bp 的微卫星位点的序列数仅有 5 个; 四碱基重复的有 30 个, 占 11.2%, (AAAT/ATTT) n 形式占了该类型的约 50%, 重复长度不小于 18 bp 的微卫星位点的序列数为 19 个; 其余重复类型均较少, 合起来 30 个, 约占 9.3%, 重复长度均不小于 18 bp

(表 3)。

2.2 EST-SSR 引物设计及多态性引物的筛选

170 个含微卫星的 EST 序列可以用于引物设计, 通过 Primer 3 在线设计, 共有 151 个 EST 能够设计引物, 其余 19 个没有找到合适的引物。

151 对微卫星引物有 130 对可以扩增, 占合成引物总数的 86.09%, 部分位点的引物及其参数见表 4。其中, 在 8 个个体中扩增存在差异引物 45 对, 微卫星呈多态性的引物占 29.08%。图 1 为其中 HNUPM125 在马氏珠母贝三亚种群和印度种群 8 个个体的扩增结果。

表 3 马氏珠母贝 EST 中筛选的微卫星序列

Tab.3 The summary of microsatellite sequences exploited from EST of *P. martensii*

重复类型 motif model	位点总数 total locus amount	最大重复次数 maximum repeat times	大于 18 bp 位点数 locus amount with core sequence more than 18 bp	重复类型 motif model	位点总数 total locus amount	最大重复次数 maximum repeat times
2 碱基重复 2 bp repeat core	130		18	5 碱基重复 5 bp repeat core	4	
(AC/GT) n	20	9	1	(AAACG/CTTTG) n	1	5
(AG/CT) n	32	30	13	(AAAGC/CGTTT) n	1	5
(AT/AT) n	78	14	4	(AAGAT/ATICT) n	2	5
3 碱基重复 3 bp repeat core	83		5	6 碱基重复 6 bp repeat core	15	
(AAC/GTT) n	9	11	1	(AAAAAC/GTTTTT) n	4	5
(AAG/CTT) n	20	5	0	(AAAAAG/CTTTTT) n	2	4
(AAT/ATT) n	22	8	4	(AAACGC/CGTTTG) n	1	4
(ACC/GGT) n	4	5	0	(AACTGG/ACCTTG) n	1	4
(ACG/CTG) n	8	5	0	(AAGGTC/AGTTC) n	1	4
(ACT/ATG) n	7	5	0	(ACGATG/ACTGCT) n	1	4
(AGG/CCT) n	8	5	0	(ACGCAG/CGTCTG) n	2	4
(AGT/ATC) n	4	5	0	(ACGCCG/CGGCTG) n	1	5
(CCG/CGG) n	1	4	0	(ACTATG/ACTGAT) n	1	5
4 碱基重复 4 bp repeat core	30		19	(AGGCGC/CCGCGT) n	1	5
(AAAC/GTTT) n	2	5	0	7 碱基重复 7 bp repeat core	4	
(AAAT/ATTT) n	14	20	10	(ACGACGG/CCTGCTG) n	4	6
(AATG/ACTT) n	5	13	4	8 碱基重复 8 bp repeat core	2	
(ACAG/CTGT) n	3	14	2	(AAACAGAC/CTGTTTGT) n	1	6
(ACAT/ATGT) n	1	5	0	(ACAGACGG/CCTGTCTG) n	1	5
(ACGG/CCTG) n	2	7	1	总计 total	268	
(AGAT/ATCT) n	1	5	0			
(AGGC/CCGT) n	1	6	1			
(AGTC/AGTC) n	1	7	1			

从重复类型看,4 碱基的 93.33% 可扩增,多态引物比例最高,为 40.00%,核心序列为 5 个及 5 个以上的多态引物比例最低,仅有 14.29%。其余类型微卫星多态性比例介于二者之间(表 5)。

3 讨论

马氏珠母贝 9 个组织的 cDNA 文库中珍珠囊、外套膜和心脏含微卫星的 EST 数占 EST 总数比例均显著高于其余组织,这种组织间 EST-SSR 含量产生差异的原因可能是由于每个文库测序的 EST 只有不足 1000、样本容量不够大所致。珍珠囊、外套膜和心脏的 cDNA 文库是用 ZAP-cDNA 试剂盒逆转录 cDNA 进而构建的噬菌体文库,而其它的文库是由 SMART cDNA 试剂盒逆转录 cDNA 后构建的文库,逆转录合成 cDNA 方式的

差异也可能影响 EST 中微卫星的比例。

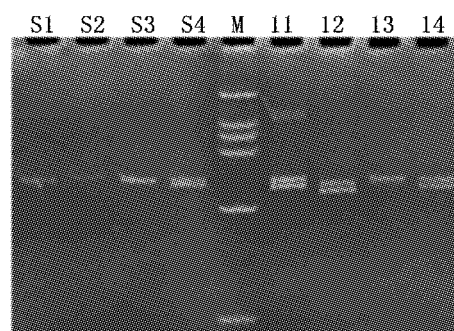


图 1 马氏珠母贝微卫星引物 HNUPM125 在 8 个个体中的扩增
Fig.1 The PCR results of EST-SSR primer HNUPM125 amplified in 8 individuals of *P. martensii*

表 4 筛选出的马氏珠母贝部分微卫星引物序列及其参数

Tab.4 Characters and sequences of some screened microsatellite primers in *P. martensii*

位点 locus	重复序列 repeat motif	引物序列 primer sequences(5' - 3')	退火温度 (°C) anneal tem.	Mg ²⁺ (mmol·L ⁻¹)	预期片段大小 (bp) size range	基因登录号 GenBank accession no.
HNUPM003	(AC)5	For: TTCGGAACCTCTTTTGGTTGG Rev: TTTTGC GTGTATAATCAGATTGC	60	1.5	289	EU075148
HNUPM004	(AG)5	For: CGGAAAGAGAAGCGAAAGAG Rev: CGCTTAGCAATGACAGGTTG	60	1.5	138	EU075149
HNUPM008	(AT)5	For: AACAAAACACCAGCCTGTCC Rev: CAAAAATGACGAAGTCTAGGTTG	60	1.5	243	EU075150
HNUPM010	(AT)5	For: ATTACGGGAGGACTCGACTG Rev: TGAGATTACATTCCACACTGCAC	61	1.5	265	EU075151
HNUPM011	(AT)5	For: TGTCCCATTATATGTATTGTTGGTG Rev: CAAATAAGGGTATTACACGATGG	55	1.5	193	EU075152
HNUPM019	(GA)5	For: TTAATCGGCGCAGTCAAAAC Rev: CTGAAATTTTGGCCCTGTG	60	1.5	152	EU07515
HNUPM022	(TA)5	For: TGAGTTC CATGATAGCATAACC Rev: ATAGCTTGGGCGTACCTGTG	60	1.5	480	EU075154
HNUPM030	(TC)5	For: TCTCAACAACCTTCACCCCTG Rev: TTCTCCATCATTACTGTAGGC	55	1.5	213	EF426103
HNUPM031	(TC)5	For: TTATGATGTGGCGCTATTGG Rev: GAGTGT TTTGGGAAAAATGCAG	55	1.5	343	EU075155
HNUPM038	(AT)8	For: GCACGAGGTAATTCGTAGG Rev: TGTTTGTGGCAGCCTGATAG	60	1.5	299	EU075156
HNUPM040	(AT)7	For: CACGAGGTTTAAATTCGTAGG Rev: AACCACTCTCCACCTTGACG	60	1.5	235	EU075157
HNUPM047	(TA)8	For: AGAATTCAGAGCAGGACAAG Rev: CGAAATGGCGAAATTC AATC	60	1.5	146	EU075158
HNUPM049	(TA)6	For: CGTTTCTGTAAACCTTTGTGAGG Rev: CCTTTGAGATTGCGGTTTTG	60	1.5	263	EU075159
HNUPM050	(TA)6	For: TCAGATACAATTCACAGGTACCAAG Rev: GAAAGAAGGATGGTGTATGAGG	60	1.5	195	EU075160
HNUPM054	(TA)7	For: TCCTATTGTTAGGGTTACCTTTC Rev: GTTCACGAAGCCACTTTTCC	60	1.5	313	EU075161
HNUPM064	(GA)13	For: GAGGATTTTGGCAGCCTATG Rev: TGTCAGTTTGTAAAGTACCCGATG	60	1.5	328	EU075162
HNUPM072	(AGA)4	For: GGGACTGCTCCAAAACCTATG Rev: TCCTTCCCATGACAAAAGTCC	60	1.5	282	EU075163
HNUPM073	(AGA)4	For: CGAGGAGAAGATTTGATCGTG Rev: ACAGAGATGAGGCGGACATC	60	1.5	302	EU075164
HNUPM075	(ATA)4	For: GAATTAACCTTTTGC ACTTACTCCAC Rev: TCCAGCTCTTAAAGGCATCC	55	1.5	185	EU075165
HNUPM083	(CCA)4	For: ACCAGAACCCTCATTTCAC Rev: CCAACC GCCATTATAACCAG	55	1.5	157	EU075166
HNUPM093	(TCA)4	For: AAAAGCATATCCCCCTCTCC Rev: AGTCAGCGTCTCCTGATTGC	63	1.5	190	EU075167
HNUPM099	(TTG)4	For: TGGGTG CAGTGTGTGATAAG Rev: AGTCCATAAAGCCCAAAGAGG	55	2.0	157	EU075168
HNUPM103	(ACC)5	For: GAGTACGCGGCATAGAAAAG Rev: GCGCGTATGTACCTCATTGC	55	2.0	254	EU075169
HNUPM123	(TATC)4	For: CGCCATGAGGGGATACTTAC Rev: ACCCTGAGAGCTTCAGATTCC	60	1.5	318	EU075170
HNUPM125	(AAACG)4	For: CCGAAATGCACTGTAACCTGG Rev: GGTTCTGTTTCGTTTCGATTTG	60	1.5	240	EF426116
HNUPM138	(TGTC)4	For: TGCAAAGGTCCTGTGCATTC Rev: AGCAAAGAGCACAGGACAAC	60	1.5	349	EU075171
HNUPM145	(AGG)4... (AGG)4... (AGG)4	For: CACGAGGCTGCATTAAGTG Rev: CGTCAGAACCATCAACATCATC	60	1.5	540	EU075172
HNUPM146	(ATGA)12c (TGAA)5	For: GCAGCGTCGTTGTGTTGAG Rev: GTTTTCATTGTTTTCATAAAATTTGTC	61	1.5	194	EF426117
HNUPM147	(AAAACA)3	For: GAGAATGTCCGAGCAGTGG Rev: ATGAAAGCATCCGATGTGAAC	60	1.5	583	EU075173

表 5 马氏珠母贝 151 对 EST-SSR 引物多态性筛选结果

Tab.5 The screened results of polymorphic EST-SSR from 151 pairs of primers of *P. martensii*

重复类型 motif model	不扩增 unamplification	单态 monomorphic loci	多态 polymorphic loci	合计 total loci	扩增引物比例(%) ratio of amplified primers	多态位点比例(%) ratio of polymorphic loci
2 碱基 2 bp repeat core	7	36	21	64	89.06	32.81
3 碱基 3 bp repeat core	9	20	11	40	77.50	27.50
4 碱基 4 bp repeat core	1	8	6	15	93.33	40.00
≥5 碱基 core more than 5 bp	1	11	2	14	92.86	14.29
复合型 complex motif	3	10	5	18	83.33	27.78
合计 total	21	85	45	151	86.09	29.80

重复长度不小于 18 bp 的微卫星位点序列为 67 个,占 EST 总数的 0.96%,其中核心序列为 2 碱基和 3 碱基的仅有 42 个,只占 0.60%,与李红蕾等^[16]报道的栉孔扇贝 6935 条 ESTs 中的结果相同,但是低于条斑紫菜 1.01%^[11]。Kantety 等^[17]从禾本科五种植物的 EST 数据库中的查找结果表明,含有重复长度最小为 18 bp 的 di-、tri-微卫星位点的序列所占的比例,玉米最小仅 1.3%,水稻最大达 4.4%。刘必谦等^[11]认为基因组相对较小是高重复 EST-SSR 的比例较低的可能原因之一,但是马氏珠母贝的染色体数目为 $2n = 28$,而玉米的 $2n = 20$,水稻的 $2n = 24$,因而,马氏珠母贝中高重复 EST-SSR 的比例较低,可能是因为其 EST 序列相对较少。

在重复形式上,在马氏珠母贝双碱基重复卫星最多的类型是 (AT/AT) n ,约占总位点数的 29.1%,高焕等^[18]有关对虾的研究也表明双碱基重复中 AT 类型占了 42.44%,这与许多有胚植物和真菌类生物相同^[19]。但是,人类^[20]和其他脊椎动物及秀丽隐杆线虫 (*C. elegans*) 并非如此^[19],条斑紫菜、水稻和玉米等生物中双碱基的 AG/CT 和三碱基 GGC/ GCC 形式的微卫星序列在各自类重复型中占了绝大多数^[17]。马氏珠母贝三碱基类型微卫星中 (AAT/ATT) n 和 (AAG/CTT) n 较多,占了三碱基类型的一半,四碱基重复的 (AAAT/ATTT) n 形式占了 50%,中国对虾三碱基重复基因组微卫星中 AAT 类型占了 50.34%,人类中的 21 和 22 号染色体 AAT 和 AAC 类型较多,果蝇中 AGC 重复最多,拟南芥和

秀丽隐杆线虫含有较多的 AAG 重复^[19]。因而,不同的物种各种占优势的重复拷贝类别并不完全相同。马氏珠母贝 (AT/AT) n 、(AAT/ATT) n 和 (AAAT/ATTT) n 所占比例较高,可能是由于甲基化的胞苷酸 C 很容易经过脱氨基作用转变成胸腺嘧啶 T^[21-22],也有可能是 GC 重复的测序较为困难所致^[18]。内在的原因需要更多的深入研究。

文库构建采用了质粒和噬菌体两类载体,尽管珍珠囊、外套膜和心脏三种组织噬菌体文库中的微卫星序列比例较高,均在 5.67% 以上,但是,血液和肝脏噬菌体文库的微卫星序列比例分别为 1.84% 和 2.12%,与质粒文库相比并无明显差异;如果从 cDNA 合成的方法上进行比较,合成的 SMART cDNA 构建的质粒文库和噬菌体文库中微卫星序列所占比例变化较小,在 1.65% 至 2.90%,而采用 Stratagene ZAP-cDNA Synthesis 试剂盒合成的 cDNA 构建的文库微卫星序列的比例均大于 5%,明显高于 SMART cDNA 构建的文库。因此,采用何种载体构建 cDNA 文库对微卫星序列的比例影响不大,而不同的 cDNA 合成方式可能对微卫星比例有较大影响。

151 对 EST 微卫星引物中,多态引物比例最高的是 4 碱基核心序列的微卫星,为 40.00%,多态引物比例最低的是核心序列为 5 个以及 5 个以上的,仅仅有 14.29%,微卫星多态性比例与其核心序列的碱基数没有明显的联系。

马氏珠母贝是重要的海洋双壳贝类,我国养殖的海水珍珠 95% 以上都是以其为母贝培育的^[1],但是,海洋生物的分子生物学研究起步较

晚, GenBank 中马氏珠母贝 EST 很少, 微卫星研究尚未见报道, 本文通过构建 cDNA 文库, 进行较大规模测序获得 EST 进而筛选得到了 45 个呈现多态性的 EST-SSR, 将为马氏珠母贝野生种群遗传结构研究, 分析种群的遗传多样性, 探讨人工养殖繁育对自然种群的影响提供稳定可靠的有力工具, 为马氏珠母贝群体鉴别以及良种选育和鉴定上提供有效的分子标记。

参考文献:

- [1] 王爱民, 阎冰, 叶力, 等. 马氏珠母贝不同地理种群内自繁和种群间杂交子一代主要性状的比较[J]. 动物学杂志, 2003, 38(1): 2-7.
- [2] Guo X, Ford S E, Zhang F. Molluscan aquaculture in China[J]. Journal of Shellfish Research, 1999, 18(1): 19-31.
- [3] 王爱民, 邓凤蛟, 张锡元, 等. 马氏珠母贝遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 武汉大学学报, 2000, 46(4): 467-470.
- [4] 王爱民, 阎冰, 叶力, 等. 三个野生种群马氏珠母贝遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(2): 163-168.
- [5] Tautz D. Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA marker[J]. Nucleic Acids Research, 1989, 17(16): 6463-6447.
- [6] 吕林兰, 杜晓东, 王嫣, 等. 马氏珠母贝 ISSR-PCR 反应条件优化[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(22): 5806-5807, 5855.
- [7] Powell W, Gordon C M, Jim P. Polymorphism revealed by simple sequence repeats[J]. Trends in Plant Science Reviews, 1996, 1(7): 215-222.
- [8] Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellites isolation: a review [J]. Mol Ecol, 2002, 11: 1-16.
- [9] Jeffreys A J, Royle N J, Wilson V, et al. Spontaneous mutation rate to new length alleles at tandem repetitive hypervariable loci in human DNA [J]. Nature, 1988, 332: 278-287.
- [10] 朱振东, 贾继增. 小麦 SSR 标记的发展及应用[J]. 遗传, 2003, 25(3): 355-360.
- [11] 刘必谦, 曾庆国, 骆其君, 等. 条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis*) dbEST 中筛选微卫星位点及引物种间转移扩增[J]. 海洋与湖沼, 2005, 36(3): 248-254.
- [12] Huang B X, Peakall R, Hanna P J. Analysis of genetic structure of blacklip abalone (*Haliotis rubra*) populations using RAPD, minisatellite and microsatellite markers [J]. Mar Biol, 2000, 136: 207-216.
- [13] Hubert S, Hedgecock D. Linkage maps of microsatellite DNA markers for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. Genetics, 2004, 168: 351-362.
- [14] 朱滨, 常剑波. 微卫星 DNA 及其在鱼类中的应用[J]. 水生生物学报, 1999, 23(6): 721-728.
- [15] 李永强, 李宏伟, 高丽锋, 等. 基于表达序列标签的微卫星标记 (EST-SSRs) 研究进展[J]. 植物遗传资源学报, 2004, 5(1): 91-95.
- [16] 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.
- [17] Kantety R V, La Rota M, Matthews D E, et al. Data mining for simple sequence repeats in expressed tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat [J]. Plant Molecular Biology, 2002, 48: 501-510.
- [18] 高焕, 刘萍, 孟宪红, 等. 中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 基因组微卫星特征分析[J]. 海洋与湖沼, 2004, 35(5): 424-431.
- [19] Tóth G, Gaspari Z, Jurka J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis [J]. Genome Research, 2000, 10(7): 967-981.
- [20] Weber J L. Informativeness of human (dC-dA) n . (dG-dT) n polymorphisms [J]. Genomics, 1990, 7(4): 524-530.
- [21] Schorderet D F, Gattler S M. Analysis of CpG suppression in methylated and nonmethylated species [J]. Proc Natl Acad Sci (USA), 1992, 89: 957-961.
- [22] Lund G, Lauria M, Gulberg P, et al. Duplication-dependent CG suppression of the seed storage protein genes of maize [J]. Genetics, 2003, 165: 835-848.

Microsatellite markers screening from EST sequences of *Pinctada martensii* Dunker

SHI Yao-hua^{1,2,3}, HONG Kui¹, GUO Xi-ming³,

WANG Yan², HOU Zhan-hui², GU Zhi-feng², WANG Ai-min²

(1. South China University of Tropical Agriculture, Institute of Tropical Biotechnology, CATAS,

National Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Haikou 571101, China;

2. Ocean College, Hainan University, Key Laboratory of Tropic Biological Resources, MOE,

Hainan Key Laboratory of Tropical Hydrobiological Technology, Haikou 570228, China;

3. Haskin Shellfish Research Laboratory, Institute of Marine and Coastal Sciences,

Rutgers University, 6959 Miller Avenue, Port Norris, NJ 08349, USA)

Abstract: *Pinctada martensii* is an important cultured marine mollusc in the southern China. In order to draw up tissue-specific gene expression map, nine cDNA libraries of *P. martensii*, including blood, foot, gill, stomach, liver, heart, mantle, pearl sac and *Polydora ciliata* infected blood, were constructed. Totally 6979 ESTs were obtained by sequencing clones from these cDNA libraries. Thoroughly screened with the software of Misa, at a criterion of at least 5, 4, 4, 4, 3 to the copy level of di-, tri-, tetra-, penta-, hex- motif respectively, a total number of 268 simple repeat sequences were found. 243 ESTs (3.48%) have at least one microsatellite repeat. Among these 9 cDNA libraries, 6.16% pearl sac ESTs, the highest, contain microsatellite, while the lowest, 1.65% *P. ciliata* infected blood ESTs have at least one microsatellite. In the 268 repeat sequences, the number of the di-nucleotide repeats is 130, about 48.5%, and the most among all of the repeat sequences. (AT/AT)_n, the most, account for 29.1% of total repeat sequences. The second is the tri-nucleotide repeats, 83, almost 31%. More than 50% are the two most abundant tri-nucleotide repeats types of (AAT/ATT)_n and (AAG/CTT)_n. The third is the tetra-nucleotide repeats, 30(11.2%), and (AAAT/ATTT)_n nearly reaches 50% of tetra-nucleotide repeats. Primers can be designed in 151 microsatellite containing ESTs. 130 pairs of primers, about 86.09%, could be amplified in *P. martensii* DNA. There was no difference of microsatellite containing EST ratio among plasmid libraries and phage libraries. However, libraries constructed with ZAP-cDNA synthesis method have much higher ratio of microsatellite containing EST than those with SMART cDNA. 45 EST-SSRs were confirmed to be polymorphic by PCR and PAGE electrophoresis in 8 individuals, 4 each from Sanya population and Indian population respectively. These polymorphic EST-SSRs will be useful for molecular genetics study, identification and wild resource conservation.

Key words: *Pinctada martensii*; EST-SSR; molecular genetics