

# 暗纹东方鲀微卫星筛选 和群体遗传多样性分析

程长洪<sup>1,2</sup> 张敏莹<sup>2</sup> 刘 凯<sup>2</sup> 徐东坡<sup>2</sup> 段金荣<sup>2</sup> 周彦锋<sup>2</sup> 施炜纲<sup>2\*</sup>

(1. 南京农业大学 无锡渔业学院 江苏 无锡 214081; 2. 中国水产科学研究院 内陆渔业生态环境和资源重点开放实验室 淡水渔业研究中心 江苏 无锡 214081)

**摘要:** 为了解长江野生暗纹东方鲀群体遗传多样性现状,采用已发表的 16 对红鳍东方鲀微卫星引物对暗纹东方鲀基因组 DNA 进行 PCR 扩增,结果有 10 对微卫星引物(占总数 62.5%)能扩增出特异性条带。利用这 10 对微卫星引物对采自长江常熟江段 30 尾暗纹东方鲀群体进行扩增分析,共获得 51 个等位基因,每个位点等位基因数在 2 到 10 之间,平均为 5.1。10 个位点平均观察杂合度( $H_o$ )为 0.820 0,平均期望杂合度( $H_e$ )为 0.692 8,平均多态信息含量( $PIC$ )为 0.630 0。8 个位点表现为高度多态( $PIC > 0.5$ ) 2 个位点表现为中度多态( $0.25 < PIC < 0.5$ )。研究表明,长江野生暗纹东方鲀群体遗传多样性较丰富,种群结构比较合理。

**关键词:** 红鳍东方鲀; 暗纹东方鲀; 微卫星引物; 遗传多样性

中图分类号: Q959.489 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)05-0971-05

## Isolation of Polymorphic Microsatellite Loci and Genetic Diversity Analysis of *Takifugu obscurus*

CHENG Chang-hong<sup>1,2</sup> ZHANG Min-ying<sup>2</sup> LIU Kai<sup>2</sup>,  
XU Dong-po<sup>2</sup> DUAN Jing-rong<sup>2</sup> ZHOU Yan-feng<sup>2</sup> SHI Wei-gang<sup>2\*</sup>

(1. Wuxi Fisheriers College of Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China; 2. Key Laboratory of Ecological Environment and Resources of Inland Fisheries, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fisheries Science, Wuxi 214081, China)

**Abstract:** To investigate the genetic diversity of *Takifugu obscurus* in Yangtze River, 16 microsatellite loci of *Takifugu rubripes* were analyzed for *Takifugu obscurus*. It was found that 6 loci failed to be amplified and 10 loci (about 62.5%) were amplified with specific products successfully and a total of 51 alleles were detected in the 10 polymorphic microsatellite loci. The allele numbers for each primer ranged from 2 to 10 and a mean of 5.1 alleles were found for each locus. The average observed heterozygosity ( $H_o$ ), average expected heterozygosity ( $H_e$ ), polymorphism information content ( $PIC$ ) of 30 individuals were 0.820 0, 0.692 8 and 0.630 0 respectively. Eight of which were of high polymorphic ( $PIC > 0.5$ ) while two of which were of middle polymorphic ( $0.25 < PIC < 0.5$ ). These results indicates that the population of *Takifugu Obscurus* in Yangtze River is of high genetic diversity and reasonable population structure.

收稿日期: 2011-06-28 修回日期: 2011-07-26

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(200903048-03), 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目(2011JBFA05 2011JBFA06)

作者简介: 程长洪(1985—), 硕士生, 主要从事渔业种质资源保护研究, E-mail: Chengchanghong09@163.com; \* 通讯作者: 施炜纲 研究员。

**Key words:** *Takifugu rubripes*; *Takifugu obscurus*; microsatellite primer; genetic diversity

暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*) 俗称河鲀, 隶属于硬骨鱼纲(Osteichthyes) 鲀形目(Tetraodontiformes) 鲀科(Tetraodontidae) 东方鲀属(*Fugu*) ,是江海洄游性鱼类, 每年春末夏初性成熟的亲鱼由东海进入长江中下游产卵, 幼鱼在淡水中育肥, 第 2 年春天回归海中<sup>[1]</sup>。其肉味腴美, 营养价值高, 是享誉国内外的“长江三鲜”之一<sup>[2]</sup>。除此之外, 从暗纹东方鲀中提取的河豚毒素(TTX) 是致命的生物毒素, 同时也是一种强效麻醉药和戒毒良药<sup>[3]</sup>。暗纹东方鲀历来是我国长江中下游重要的渔业资源, 但是由于环境恶化、过度捕捞和沿江沿河大坝等水利工程的修建导致其自然资源量急剧下降, 在长江入海口及通江湖泊中很少能捕获野生暗纹东方鲀<sup>[4]</sup>。为了保护、修复长江暗纹东方鲀资源, 近年来, 在春季禁渔的同时长江下游每年都进行了暗纹东方鲀大规模人工增殖放流, 但是这是否会导致其野生种群遗传多样性下降, 引起种质混杂并造成种质退化, 这些问题尚未见到针对性的研究报道。因此, 有必要对了解长江野生暗纹东方鲀遗传结构背景, 为保护和利用这一自然资源提供可靠的理论依据。

微卫星作为第二代分子标记技术, 具有共显性遗传、多态性高、重复性强和操作简单等特点, 已广泛应用于水产动物遗传多样性研究、遗传图谱构建、种质资源鉴定和系统进化分析等方面<sup>[5-6]</sup>。但是迄今为止, 有关微卫星标记在暗纹东方鲀遗传研究方面的报道较少, 这制约了其在暗纹东方鲀遗传学中的应用。利用微卫星标记的关键是微卫星位点的分离和微卫星引物的设计<sup>[7]</sup>。微卫星引物的获得有多种方法, 而传统的微卫星分离方法必须构建基因组文库, 费用高, 时间长且效率低<sup>[8]</sup>。但是由于微卫星位点其侧翼序列不同物种间具有保守性, 利用近源物种微卫星引物进行跨种扩增成为可能<sup>[9]</sup>。

本研究利用已发表的红鳍东方鲀微卫星引物对暗纹东方鲀进行跨种 PCR 扩增, 从中筛选出合适的微卫星引物, 并对长江暗纹东方鲀群体进行了遗传多样性分析, 旨在暗纹东方鲀的资源保护及苗种选育提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

实验所分析的 30 尾暗纹东方鲀于 2010 年 7 月份采自长江常熟江段, 保存于无水乙醇(-20 °C) 备用。*Taq* 酶和 dNTPs 等试剂均购自上海生物工程技术服务有限公司; 微卫星引物参考郝君等<sup>[10]</sup>发表的文献设计 16 对, 由上海生物工程技术服务有限公司合成。

### 1.2 基因组 DNA 的提取与检验

基因组 DNA 提取参考 Sambrook 等<sup>[11]</sup>的方法(略作修改) 进行。取 100 mg 左右的肌肉组织置于 Eppendorf 离心管中剪碎, 加入 450  $\mu$ L 组织裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0, 100 mmol/L EDTA, 200 mmol/L NaCl), 在加入 40  $\mu$ L 10% SDS 和 10  $\mu$ L 20 mg/mL 蛋白酶 K, 56 °C 消化过夜。加入等体积饱和酚抽提, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液加入等体积酚/氯仿( $V_{\text{酚}}:V_{\text{氯仿}}:V_{\text{异戊醇}}=25:24:1$ ) 抽提 2 次, 加入 2 倍无水乙醇沉淀, 70% 乙醇洗涤 2 次。室温干燥后, 加 100  $\mu$ L 灭菌双蒸水溶解, 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测其质量, 核酸蛋白仪检测其浓度, 最后稀释到 50 ng/ $\mu$ L, 放入 4 °C 冰箱里储存备用。

### 1.3 微卫星 PCR 反应和电泳检测

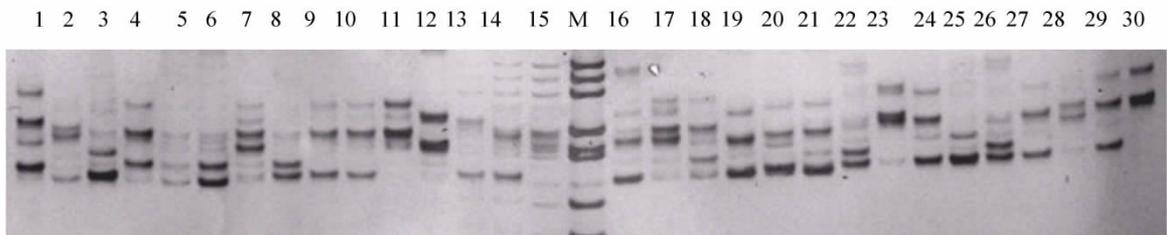
采用 20  $\mu$ L 反应体系包括: 10  $\times$  PCR buffer(含  $\text{Mg}^{2+}$ ) 2  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTPs 0.4  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L 引物各 0.5  $\mu$ L, 5 U *Taq* DNA 聚合酶 0.2  $\mu$ L, 50 ng/ $\mu$ L 的 DNA 模板 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足 20  $\mu$ L。PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 45 s, 退火 30 s(表 1), 72 °C 45 s, 30 个循环, 72 °C 延伸 8 min, 4 °C 保存。PCR 扩增产物采用质量分数为 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离, 电泳缓冲液为 1  $\times$  TBE, 200 V 电泳 2~2.5 h。电泳完毕后, 银染显色, 最后在白炽灯箱上拍照、保存。

### 1.4 数据分析

采用 Gel-Pro Analyzer 4.5 对图片进行分析, 计算各个微卫星位点扩增产物的大小。利用 POP-GENE1.32 统计每个位点的等位基因数(*A*)、观测杂合度(*Ho*)、期望杂合度(*He*) 和多态信息含量(*PI*C)。

表 1 经筛选的 10 对暗纹东方鲀微卫星引物  
Tab.1 Ten SSR primers available to PCR amplification in *Takifugu obscurus*

位点 Locus	引物序列(5'-3')		退火温度/°C Annealing temperature	产物长度范围/bp Product size
F0001	ACCCAATCTCACCTCCTG	AACCCAAAAGTTTGACCCT	58	217 ~ 261
F0002	AAACACCAAAGAAAGCCACT	ATTACCGCACTCCCCTACC	56	130 ~ 181
F0003	CCTTGCCCTGTCCCTTAC	AGCCACCTACATCCTTCAC	56	201 ~ 260
F0005	TCTCCCTTACACCAAACG	TFCCCACTGCTGAAGACC	54	220 ~ 238
F0006	TTTCCATCGTGGCTTTGT	CGTTGCTCATTTCCTGCT	55	200 ~ 242
F0012	GAAGGGCTGGCAGAACAC	CCCCTTAGAATCCTGTT	58	123 ~ 180
F0013	CACTCGGCATAGCAGACC	TATCAGGCACCGCAAGAA	56	162 ~ 242
F0015	CCCGCCTGTGGTTTGTTC	TGTGGGTATGATGTGATGC	56	231 ~ 236
F0019	CCATCTAACTGCGGGTAA	TGAGACTCTGCCTTCGTG	52	115 ~ 150
F0020	ACAATGAGGCGTGGAAGT	GTGAATGGATGTGGAGCA	56	135 ~ 160

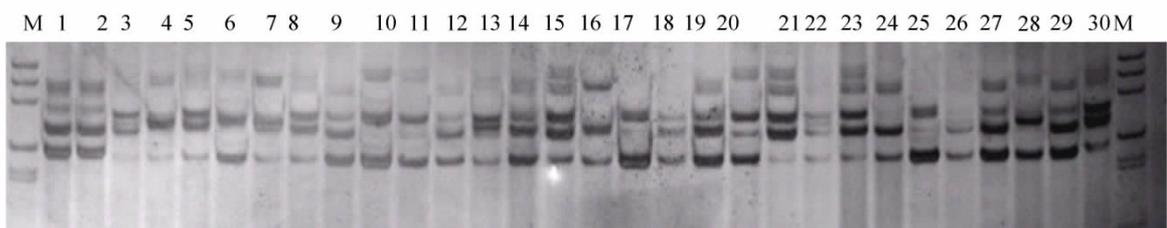


M: 标准分子量 pBR322 DNA/Msp1; 1 - 30: 30 个个体样本。

M: Marker pBR322 DNA/Msp1; 1 - 30: 30 individuals.

图 1 微卫星位点 F0002 在暗纹东方鲀中的扩增电泳图

Fig. 1 The electrophoresis pattern amplified by primer F0002



M: 标准分子量 pBR322 DNA/Msp1; 1 - 30: 30 个个体样本。

M: Marker pBR322 DNA/Msp1; 1 - 30: 30 individuals.

图 2 微卫星位点 F0005 在暗纹东方鲀中的扩增电泳图

Fig. 2 The electrophoresis pattern amplified by primer F0005

## 2 结果与分析

### 2.1 微卫星引物筛选

在所选的 16 对红鳍东方鲀微卫星引物中,通过体系优化,调整退火时间,最终有 10 对引物(表 1)在暗纹东方鲀群体中能扩增出多态性产物,占引物总数的 62.5%。图 1 和图 2 分别为微卫星位点 F0002 和 F0005 在暗纹东方鲀群体中的扩增电泳图。

### 2.2 10 个微卫星位点遗传多样性分析

将筛选的 10 对微卫星位点对长江常熟江段暗纹东方鲀群体(共 30 尾)进行扩增分析,其等位基因数、有效等位基因数、观测杂合度、期望杂合度和多态信息含量如表 2。在 10 个微卫星位点中,共检测

到 51 个等位基因,每个位点平均等位基因数为 5.1,平均有效等位基因数为 3.6。位点 F0012 的等位基因最多(10 个),而位点 F0015 和 F0020 的等位基因最少(2 个)。

10 个微卫星位点观测杂合度为 0.566 7~1.000 0,期望杂合度为 0.413 0~0.841 8,多态信息含量为 0.323 6~0.805 2,平均观测杂合度为 0.820 0,平均期望杂合度为 0.692 8,平均多态信息含量为 0.627 6。在这 10 个位点中有 8 个位点表现为高度多态( $PIC > 0.5$ ) 2 个位点表现为中度多态( $0.25 < PIC < 0.5$ )。

表 2 暗纹东方鲀群体微卫星分析结果

Tab.2 Summary of statistics for *Takifugu obscurus* population with microsatellite analysis

位点 Locus	等位基因数 A	有效等位基因数 Ne	观测杂合度 Ho	期望杂合度 He	多态信息含量 PIC
F0001	6	4.699 7	0.866 7	0.800 6	0.757 2
F0002	6	4.205 6	0.966 7	0.775 1	0.726 6
F0003	4	3.290 7	0.800 0	0.707 9	0.648 3
F0005	4	2.627 7	0.633 3	0.629 9	0.547 4
F0006	4	3.015 1	0.866 7	0.679 7	0.617 5
F0012	10	4.931 5	0.800 0	0.810 7	0.769 3
F0013	8	5.806 5	0.800 0	0.841 8	0.805 2
F0015	2	2.000 0	1.000 0	0.508 5	0.375 0
F0019	5	3.973 5	0.900 0	0.761 0	0.705 7
F0020	2	1.683 8	0.566 7	0.413 0	0.323 6
平均值 Means	5.1	3.623 4	0.820 0	0.692 8	0.627 6

### 3 讨 论

#### 3.1 红鳍东方鲀微卫星引物对暗纹东方鲀的适用性

暗纹东方鲀的近缘物种红鳍东方鲀是研究动物的模式生物,目前 GenBank 数据库中存在着大量红鳍东方鲀微卫星位点,而有关发表的暗纹东方鲀微卫星位点很少,不足以进行其种群遗传结构分析。微卫星位点在种间具有的保守性是其得以广泛应用的原因之一,因此,从 GeneBank 数据库和已发表的文章中筛选微卫星引物是一条简捷有效的途径<sup>[12]</sup>。在鱼类种群遗传研究中,常见报道利用近源物种微卫星引物进行遗传多样性研究。夏军红等<sup>[13]</sup>利用 23 对鲸种微卫星引物对一个长江江豚群体进行了微卫星扩增,结果表明其中有 7 对引物扩增产物是稳定且多态的。牟希东等<sup>[14]</sup>采用 50 个尼罗罗非鱼特异性的微卫星分子标记对 48 个布氏罗非鱼个体进行遗传分析,结果表明有 27 对引物能获得稳定的特异性条带。本研究从 16 对红鳍东方鲀微卫星引物中筛选到 10 对(占总数 62.5%)能稳定扩增出特异性条带。这一研究结果与崔建洲等<sup>[15]</sup>将红鳍东方鲀微卫星引物应用于假睛东方鲀进行遗传多样性分析结果相近,说明红鳍东方鲀和暗纹东方鲀微卫星标记具有较好的通用性。

#### 3.2 暗纹东方鲀群体遗传多样性分析

多态信息含量(PIC)是衡量片段多态性的较好指标,其反映出基因变异程度的大小。Botstein 等<sup>[16]</sup>认为,当  $PIC > 0.5$  时,该位点为高度多态性位点; $0.25 < PIC < 0.5$  时为中度多态性位点; $PIC < 0.25$  是为低度多态性位的。本研究所筛选的 10 个微卫星位点中,8 个位点表现为高度多态( $PIC > 0.5$ ) 2 个位点表现为中度多态( $0.25 < PIC < 0.5$ ),平均 PIC 为 0.6,可见 10 个位点在暗纹东方鲀群体中 PIC 整体水平较高,表现出丰富的遗传多样性水平。

杂合度是度量种群遗传变异程度的一个最适参数,平均杂合度越高,遗传多样性就越丰富。王长忠等<sup>[17]</sup>采用 39 对微卫星标记对长江中上游 2 个鲢群体进行遗传多样性分析,结果表明 2 个群体的平均观测杂合度在 0.775~0.834。崔建洲等<sup>[15]</sup>采用 9 对红鳍东方鲀微卫星引物对野生红鳍东方鲀和野生假睛东方鲀两个地理种群进行遗传结构分析,结果显示这两个群体的平均观测杂合度分别为 0.866 1、0.827 2。本研究中,10 个微卫星位点的平均观测杂合度为 0.820 0,与前人的研究结果相一致,而高于 DeWoody 等<sup>[18]</sup>基于 13 种淡水鱼微卫星标记统计得到的平均观测杂合度约为 0.46 的结论。以上研究

结果表明, 长江野生暗纹东方鲀群体遗传多样性较丰富, 种群结构比较合理。这对于长江中下游暗纹东方鲀资源量的恢复起着关键的作用, 因此要加大保护暗纹东方鲀丰富的遗传多样性, 避免遗传瓶颈的出现。

#### 参考文献:

- [1] 成庆泰, 王存信, 田明诚, 等. 中国东方纯属鱼类分类研究[J]. 动物学报, 1975, 21(4): 359-377.
- [2] 莫根永, 胡庚东, 周彦锋. 暗纹东方鲀胚胎发育的观察[J]. 淡水渔业, 2009, 36(6): 22-27.
- [3] 谷江稳, 徐善良, 颜付云, 等. 河豚毒素及其发酵生产的研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(11): 298-302.
- [4] 李佳佳. 暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*) 早期发育阶段渗透压调节能[D]. 南京: 南京师范大学, 2008: 17.
- [5] 杜长斌, 孙孝文, 楼允东, 等. 微卫星在水产动物种质资源研究方面的应用[J]. 水产学杂志, 2000, 13(1): 68-73.
- [6] 陈万光, 贾晓慧. 微卫星标记在水产动物遗传研究方面的应用[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(12): 5659-5660.
- [7] 匡刚桥, 刘臻, 鲁双庆, 等. GenBank 数据库中鳊鱼微卫星位点的筛选及特征分析[J]. 动物学报, 2007, 53(1): 184-189.
- [8] 马洪雨, 岳永生, 洪雨, 等. 三个黄颡鱼群体遗传多样性及亲缘关系的微卫星标记分析[J]. 氨基酸和生物资源, 2006, 28(3): 5-8.
- [9] 郭金峰, 王玉, 马孟雪松. 红鳍东方微卫星 DNA 多态性初步分析[J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(1): 21-24.
- [10] 郝君, 孙效文, 于艳, 等. 鲤微卫星引物对麦穗鱼的适用性初步研究[J]. 水生生物学报, 2007, 31(2): 278-281.
- [11] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A Laboratory Manual [M]. New York: Cold Spring Harbour Press, 1989: 463-468.
- [12] 邵昭君, 赵娜, 朱滨, 等. 铲鲟微卫星引物对中华鲟的适用性研究[J]. 水生生物学报, 2002, 26(6): 577-584.
- [13] 夏军红, 郑劲松, 王丁. 鲸类微卫星引物对长江江豚的适用性研究[J]. 水生生物学报, 2004, 28(6): 640-646.
- [14] 牟希东, 李小慧, 胡隐昌, 等. 布氏罗非鱼微卫星位点筛选和群体遗传多样性分析[J]. 生物技术通报, 2009(增刊), 237-241.
- [15] 崔建洲, 申雪艳, 杨官品, 等. 红鳍东方鲀与假睛东方鲀的微卫星 DNA 多态性分析[J]. 高技术通讯, 2005, 12(15): 90-96.
- [16] 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): 31-34.
- [17] 王长忠, 梁宏伟, 邵桂伟, 等. 长江中上游两个鲢群体遗传变异的微卫星分析[J]. 遗传, 2008, 30(10): 1341-1348.
- [18] DeWoody J A, Avise J C. Microsatellite variation in marine freshwater and anadromous fishes compared with other animals [J]. Journal of Fish Biology, 2000, 56(3): 461-473.