

基于 Roche 454 GS FLX 的钝吻黄盖鲈 (*Pleuronectes yokohamae*)微卫星标记的开发*

潘 婷^{1,2} 张 岩^{2①} 张 辉⁴ 高天翔³ 肖永双⁴ 姜云荣^{1,2}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 中国海洋大学水产学院 青岛 266003;
4. 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

摘要 利用 Roche 454 GS FLX 平台测序技术进行了钝吻黄盖鲈微卫星引物筛选, 并采用聚类分析的方法对得到的 5641 个微卫星位点进行类比分析, 得到 247 种多态性位点, 其中完美型占 52.22%, 非完美型占 20.24%, 复合型占 27.54%, (AC)_n、(AG)_n 两碱基重复类型的比例是 44%, 重复次数在 10 次以上的占总数的 87.5%。随机选取 11 个位点的微卫星引物, 采用 5 个野生个体, 利用荧光标记和毛细管电泳进行多样性评价, 4 个位点偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 不同位点得到的等位基因范围为 3–8, 平均等位基因数为 5.0。平均观望杂合度(H_o)、平均期望杂合度(H_e)及平均多态性信息含量(PIC)分别为 0.588、0.788 和 0.670。结果表明, 454 GS FLX 提供了一种直观、高效开发微卫星的方法。

关键词 Roche 454 GS FLX; 钝吻黄盖鲈; 开发; 微卫星标记

中图分类号 S917 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2015)01-0026-07

钝吻黄盖鲈(*Pleuronectes yokohamae*)隶属鲈科、黄盖鲈属, 分布于太平洋西部近海, 在我国黄海和渤海均产, 是重要的鱼类资源。国内外相关研究主要集中在钝吻黄盖鲈的形态学(张岩等, 2010)、同工酶(Fujio *et al*, 1979; 张岩等, 2007)、RAPD(张岩等, 2008)和 AFLP(Zhang *et al*, 2012), 目前未见关于开发钝吻黄盖鲈微卫星标记的报道。微卫星标记(SSRs, Simple Sequence Repeats)是一种广泛应用于科学领域的 DNA 分子标记(Sunnucks, 2000), 可用于生物的遗传多样性分析、遗传图谱的建立、亲子鉴定及遗传育种等(苗贵东等, 2011; 游翠红等, 2012; 樊佳佳等, 2012)。常见微卫星 DNA 筛选的方法有 4 种: 构建小插入片段基因组文库(徐鹏等, 2001); 构建微卫星 DNA 富集文库筛选微卫星标记; 利用近缘种之间引物通用性, 得到目的物种的微卫星标记(Morishima *et al*, 2009; 胡龙洋等, 2014); 从已经公布的序列中筛查微卫星

DNA (Akagi, 1996)。

最初采用构建和插入小片段基因组文库是 Tokuko 等(1998)在研究东南亚热带雨林树种龙脑香科植物 *Shorea curtisii* 时, 从 6000 个克隆中只获得 4 个阳性克隆, 最后只得到 1 个 SSR 引物对, 可见这种传统的方法阳性克隆得率很低, 成功获得引物的几率更低。为了提高 SSR 阳性克隆的得率, 人们利用 SSR 探针杂交技术对基因组 DNA 片段富集, 微卫星的富集方法有滤膜富集法和磁珠富集法, Karagyozov 等(1993)提出的滤膜富集法依然需要小插入片段基因组 DNA, 而 Kandpal 等(1994)提出的磁珠富集法利用亲和素能够与生物素偶联的因素, 高效富集微卫星位点, 然而此方法需要构建文库以及克隆测序等繁琐过程, 同时不能保证每个微卫星序列之侧翼序列的有效分离。利用近缘种的微卫星序列依赖于近缘种的微卫星研究结果以及引物通用性的质量, 大大限制了其应

* 国家科技基础条件平台项目(2006DKA30470-006)资助。潘 婷, E-mail: mdpanting@163.com

① 通讯作者: 张 岩, 研究员, E-mail: zhangyan@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-01-06, 收修改稿日期: 2014-03-17

用(孙波等, 2009)。虽然当前三大 DNA 数据库(GenBank、EMBL、DDBJ)有丰富的 DNA 原序列, 但并不能保证所有物种的有效基因信息含量。

454 GS-FLX Titanium platforms 作为第二代测序技术的一种, 已广泛应用于动植物全基因组测序(Star *et al.*, 2011)、基因组重测序(Xia *et al.*, 2009; Lam *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2009)、转录组测序(Graham *et al.*, 2010)、小 RNAs 测序(Li *et al.*, 2011)和表观基因组测序(Xiang *et al.*, 2010)等方面。通过建立大型 Shotgun 基因组文库与合成的生物素探针进行杂交, 利用 454 测序平台读长目前达到 400_{nt} 的优势, 不仅能够直接读出含有微卫星位点的多态 DNA 序列, 而且保证了开发的数量, 使微卫星标记的开发进入了一个新的时代(June *et al.*, 2012)。本研究利用 Roche 454 GS FLX 技术对钝吻黄盖鲈进行了微卫星标记开发, 可为进一步研究钝吻黄盖鲈群体遗传结构提供基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集

11 个钝吻黄盖鲈样品来自 2005 年 4 月的朝鲜近海, 3 个样品来自 2012 年 9 月的山东威海近海, 分别取肌肉放入 95% 的乙醇中低温冰箱保存, 其中 5 个朝鲜近海野生个体用于多态性检测。

1.2 DNA 的提取、片段化和连接

用 DNA 提取试剂盒(美国 Omega 公司提供)分别提取基因组 DNA 后, 将朝鲜近海的 6 个个体基因组 DNA 混合形成 1 个混合样, 另外 3 个威海个体单独测序。根据 454 测序平台读长的要求, 采用高压氮气的方法, 进行 DNA 的片段化, 高压条件是 0.35 MPa, 持续 50 s。片段化的 DNA 进行末端修复, 修复体系由 2.5 μ l 10 \times PNK Buffer、2.5 μ l ATP、1 μ l dNTP、1 μ l T4 polymerase、1 μ l PNK、1 μ l *Taq* 组成。修复后的 DNA 片段进行切胶回收。片段范围为 400–700 bp, 主峰在 500–600 bp 之间。回收后的片段与连接接头连接, 连接接头是 Roche Rapid Library Prep Kit (Roche 公司)中的标准接头序列。连接产物利用磁珠纯化后, 得到 DNA shotgun 文库, 通过 PCR 扩大 shotgun 文库产量。引物分别是 Primer A (5'-CCATCTCATCCCT-GCGTGTCTCCGACGACT-3')和 Primer B (5'-CCTAT-CCCCTGTGTGCCTTG-3')。PCR 反应体系为 94 $^{\circ}$ C 3 min、18 循环(94 $^{\circ}$ C 30 s、58 $^{\circ}$ C 45 s、72 $^{\circ}$ C 1 min)、72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.3 SSR 探针的合成、文库变性

SSR 探针依据 Zane 等(2002)和 Toth 等(2000)的方法合成, 探针序列分别为(AC)₁₂、(AG)₁₂、(AAT)₁₂、

(AGG)₈、(AGC)₈、(AGAT)₈和(ACAG)₆, 并在 5'端加入生物素, 将合成的 7 种生物素探针等量混合与 DNA shotgun 文库中的单链 DNA 片段进行杂交。杂交温度为 58 $^{\circ}$ C, 杂交的缓冲液为终浓度为 6 \times SSC+0.1% SDS。

1.4 SSR 文库磁珠富集、清洗及洗脱

将结合有生物素修饰探针的文库片段与链霉菌亲和素磁珠结合, 室温孵育 30 min。孵育后的杂交液在常温下用 6 \times SSC+0.1% SDS 清洗两次, 于 58 $^{\circ}$ C 下用 3 \times SSC+0.1% SDS 清洗两次, 58 $^{\circ}$ C 孵育 15 min。在室温下 6 \times SSC+0.1% SDS 清洗两次。加入超纯水悬浮磁珠, 室温放置 2 min, 吸除上清液。此时去除未结合的 DNA 文库片段以及非特异结合的片段。加入 Elution Buffer 充分混匀, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 立即放置磁力架上, 静置 2 min 澄清, 吸取上清液得到分离的 SSR 产物。

1.5 SSR 富集及纯化

洗脱产物通过 PCR 扩增产量。PCR 反应体系, 94 $^{\circ}$ C 3 min, 18 次循环包括 94 $^{\circ}$ C 30 s、58 $^{\circ}$ C 45 s、72 $^{\circ}$ C 1 min, 最后 72 $^{\circ}$ C 10 min。引物 A (5'-CCATCTC-ATCCCTGCGTGTCTCCGACGACT-3')以及引物 B (5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTG-3')。利用配制的新鲜乙醇进行 PCR 产物的清洗, 25 μ l Elution Buffer 进行 PCR 最终产物的溶解至澄清, 转移至 PCR 管, 准备上机。

1.6 Roche 上机

SSR 文库利用 PicoGreen 和荧光分光光度计, 对文库进行定量。定量结果应在 PicoGreen 的标准曲线范围内, 且足够后续的 emPCR 使用。emPCR 是基于 Roche 454 的测序技术, 将一条 DNA 片段锚定到一个磁珠上, 磁珠被单个油水混合小滴包被后, 在这个小滴里进行独立的扩增, 而没有其他的竞争性或者污染性序列的影响, 从而实现了所有 DNA 片段进行平行扩增。emPCR 之后进行 Roche 上机, 上机条件是根据一定大小分区上对应的磁珠数目。对于本实验的 1/4 区而言, 上机 79 万磁珠。

1.7 数据分析

Agilent 2100 生物分析仪以及 High Sensitivity DNA kit 用于检测片段大小分布。使用 MISA 程序进行 SSR 位点的搜索, 使用 Primer 3 进行引物设计, 并限制扩增产物长度在 100–400 bp 之间, 退火温度接近 60 $^{\circ}$ C。利用 perl 程序屏蔽序列上的重复序列(用

字母 R 代替), 过滤掉侧翼序列短于 20 bp 的 SSR 位点(侧翼序列过短则无法进行相似性比对)。利用 Cluster 3.0 对过滤后的序列进行多序列聚类, 并在多重比对过程中限制: 扩增产物长度在 100–400 bp; 微卫星位点的侧翼序列长于 20 bp; 序列进行对齐, 其相似度要超过 95%; 退火温度接近 60℃。微卫星 DNA 序列若符合如上条件则认为是相同的 DNA 序列, 并最终获得 SSR 多态性位点种类。

1.8 多态性检测

随机选取 11 个 SSR 位点引物, 利用 FAM、HEX、TAMRA 进行标记, 对微卫星扩增产物进行毛细管电泳检测。PCR 反应程序为 94℃ 5 min 预变性, 接下来 94℃ 变性 30 s、引物特定退火温度(表 1) 30 s、72℃ 延伸 30 s 进行 35 个循环, 最后 72℃ 再延伸 7 min。扩增产物在 ABI3730xl 基因分析仪上检测。利用 Popgene 32 计算观望杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)以及多态信息含量(PIC):

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n P_i^2 \right) - \left(\sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2 \right)$$

式中, P_i 、 P_j 分别为第 i 和第 j 个等位基因频率, n 为等位基因数目。运用 Hardy-Weinberg 平衡检测法分析无效等位基因。

2 结果

2.1 高通量测序结果

Roche 454 GS FLX 测序结果共得到 18955 条微卫星序列。通过 Primer 3 设计引物, 排除位点是单碱基重复的类型, 共得到 5461 个 SSR 引物。利用 perl 和 UCLUST 对 SSR 引物进行界定, 运用 Mega 5.0 进行聚类相似性比较, 共得到 247 种相似的多态性位点, 完美型占 52.22%, 其中重复次数在 10 次以上的占总数的 87.5%, 最高次数可达到 31 次, 非完美型占 20.24%, 复合型占 27.54%。

表 1 钝吻黄盖鲈的 11 个微卫星位点的基本信息

Tab.1 Characterization information of 11 novel microsatellite markers from *P. yokohamae*

位点 Loci	重复单位 Repeats	引物序列 Sequence (5'-3')	产物 Product(bp)	退火温度 (°C)	观望杂合 度 H_o	期望杂合 度 H_e	PIC
PTH1	(GA) ₁₁ gc(GA) ₆	CAGAGCTTGCAATCAAAC CA AAAGGACTGCTACTTTTGGGA	137–151	61.5	0.8	0.844	0.730
PTH2	(GT) ₈ g(GT) ₇	TGACAGACCATTGTGAAAGAAG GATGGTACAGCCCTTGTGGT	186–208	61.5	1.0	0.689	0.548
PTH3	(TG) ₁₁	GTAAGGCAGGGGGCTAAAAT CAGGCCAATTAGCCCAGATA	358–364	61.0	0.6	0.711	0.581
PTH4	(GT) ₇ ggatg(GT) ₇	TGACAGACCATTGTGAAAGAAG GTACAGCCCTTGTGGTTGCT	175–204	61.0	0.8	0.778	0.645
PTH5	(AC) ₁₀	TTGACAACAGCACGTCACAA TCAGCAGTCGTCCAATTCAG	217–224	61.0	0	0.622	0.499
PTH6	(AC) ₁₁	CAGCTCGTGCTCAATCAGC TGAGGTGGTGTCTGGGTGTA	257–324	61.0	0.6	0.844	0.730
PTH7	(AC) ₁₃	CTTGATTAGCCTGCACACGA ATCTGCAAGATGCTTACGGG	205–219	61.0	0.2	0.644	0.535
PTH8	(GT) ₁₈	ACAATGTGCTTCGGTCACTG CCTCCCTTCACTCTTTCCC	320–339	61.5	1.0	0.822	0.701
PTH9	(GT) ₁₃	TAAAGCGTGTGAGCTGGTTG TTGACCCGAGTGGAGTTACC	133–153	56.0	1.0	0.933	0.820
PTH10	(AC) ₁₀	GAACATGTGCACACCGAATC TGGTCATGTGCTGAGAGGAG	121–153	56.0	0	0.622	0.499
PTH11	(GT) ₁₀	ATCTGCAGTGTGAATGTGC CTGCCTGCCATGACTCAGTA	305–335	58.0	0.8	0.933	0.820

2.2 微卫星位点片段分布大小的总体情况

通过 Agilent 2100 和 High Sensitivity DNA kit, 检测微卫星位点片段大小范围 10–19 bp 之间(图 1)。A+C 碱基比例占 50%。

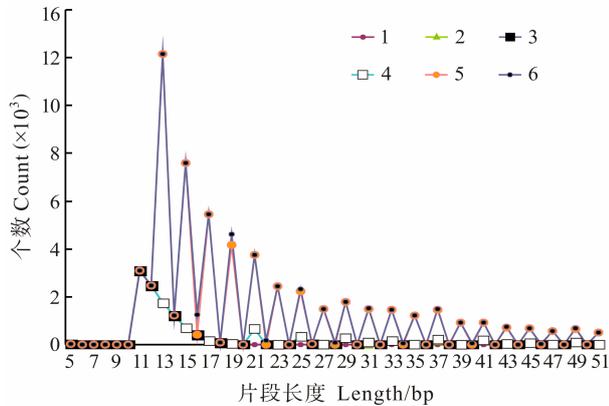


图 1 SSR 位点片段大小分布

Fig.1 Fragment size distribution of microsatellite locus

2.3 毛细管电泳荧光标记检测

5 个样品的 11 个微卫星 DNA 位点均采用毛细管电泳检测。图 2 是位点 PTH8 的 5 个样品 PCR 产物在 ABI3730xl 仪器上经毛细管电泳检测后用 Genemapper 分析的结果(荧光标记是 TAMRA)。其基因型(等位基因的片段大小)分别是 324/332、320/324、320/332、320/339、320/330。

2.4 位点多态性检测

利用 Popgene 32 计算观望杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、多态信息含量(PIC)(表 1), 其中 4 个位点偏离 Hardy-Weinberg 平衡($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 探针的选择

微卫星又称简单重复序列, 广泛存在真核生物基因组中的简单重复 DNA 片段, 在动物体中以双核苷酸(CA/GT)_n 最为常见(Maguire, 2000)。本研究选用(CA)₁₂、(AG)₁₂、(AAT)₁₂、(AGG)₈、(AGC)₈、(AGAT)₈和(ACAG)₆ 7 种生物素探针分离微卫星座位, 结果获得(CA)/(GT)、(AG)/(TA)_n 二碱基微卫星重复类型的比例是 44%, (AAT)₁₂、(AGG)₈、(AGC)₈、(AGAT)₈和(ACAG)₆ 碱基重复类型的比例是 5%。在得到的微卫星重复类型中还观察到 5.8%的(GA)/(TC), 说明 Roche 454 不仅能够获得所需要的微卫星数目, 而且能够得到难以分离的微卫星序列。

3.2 聚类分析

由于高通量测序获得的数据大多为一致性序列数据, 即重复序列较多, 从而增加了后期筛选的工作量。从目前发表的文献看, 通过高通量测序得到的一致性序列数据中, SSR 位点的概率非常低。如 Hou 等(2011)利用 454 高通量测序技术分析了虾夷扇贝不同发育阶段和成体不同组织的转录组特征, 从获得的 80.5 万条序列中仅鉴别了(0.03%) 2700 个 SSR 标记, 仅占序列总数的 0.03%。吴琼等(2012)利用 454 GS FLX 对东北红豆杉的 20557 条一致性序列数据挖掘, 获得了 753 个微卫星标记(占总序列数的 3.7%)。

聚类分析的目标就是在相似的基础上收集数据来分类。目前微卫星聚类分析已经应用在系谱亲缘关系分析(刘建建等, 2004)和品种鉴定(王伟等, 2010)等方面。为了减少后期筛选 SSR 位点的工作量, 本研

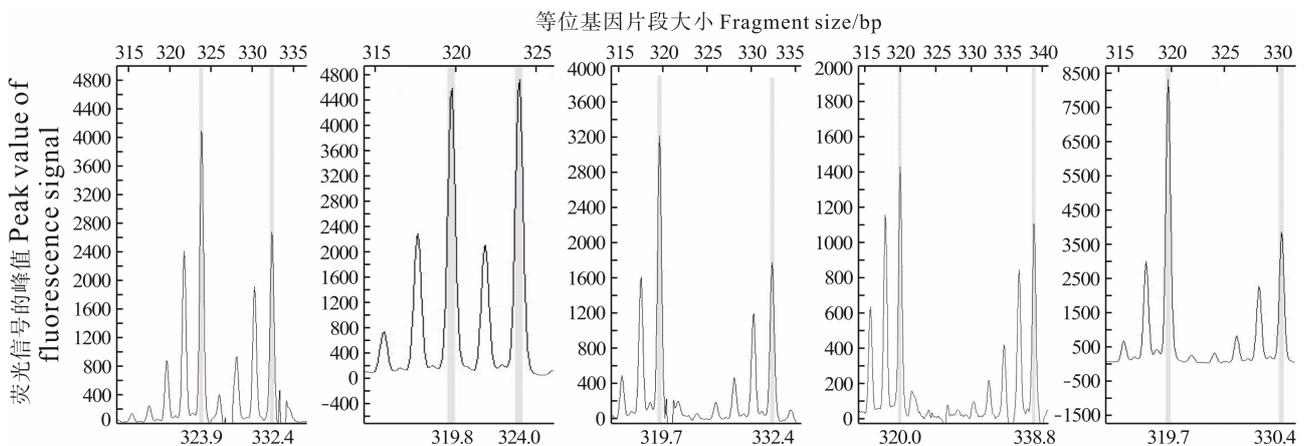


图 2 钝吻黄盖鲈位点 PTH8 的 5 个个体毛细管电泳

Fig.2 Capillary electrophoresis patterns of five individual locus PTH8 of *P. yokohamae*

究首次将聚类相似对比分析应用到微卫星标记的开发中,对获得的 5641 个微卫星位点进行了聚类相似对比分析。

如果 SSR 标记的侧翼序列过短则无法进行相似性比对,Weber(1990)认为,只有在双碱基重复序列次数大于 12 次时,微卫星标记才有可能表现出较高的 PIC 值,才可以进行相应的多态性分析;孙效文等(2005)也认为,重复数在 10 次以上的微卫星序列对于筛选多态性信息含量高的分子标记是有利的。因此在聚类分析时决定用 Perl 程序过滤掉侧翼序列短于 20 bp 的 SSR 位点。在用 UCLUST 对过滤后的序列进行聚类多序列对齐时,主要考虑了以下因素:

(1) 由于小于 100 bp 的序列在琼脂糖电泳时很难与二聚体分开,且 454 高通量测序的读长可达到 400_{nt},因此在聚类分析时选择了扩增产物长度在 100–400 bp;

(2) 在进行多重对比时还要求微卫星核心序列重复次数应当达到较高的水平,以避免重复基因座位导致微卫星标记的多态比例过低而造成浪费。本研究规定其相似度要超过 95%,至于低于 95%的相似度能否保证较低的重复率还需要进一步的分析验证。

基于以上的参数设定,获得的 5641 个微卫星位点通过聚类分析分为了 247 种类型,可以认为是 247 个不同的 SSR 位点。为了验证分析结果,从中随机选取了 11 个在两个地点样品共有的 SSR 位点进行了多态性分析,结果表明选取的 11 个位点均为多态性位点,取得了良好的效果。

3.3 Roche 454 开发微卫星位点的优势

根据 Weber(1990)的分类方法,微卫星可以分为三类:完美型、非完美型和混合型。在本研究所获得的 247 个微卫星序列中,完美型占 52.22%,非完美型占 20.24%,复合型占 27.54%。Smulders 等(1997)认为,重复次数多的微卫星既能在种间也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。Xu 等(1990)曾在斑节对虾进行微卫星引物设计,最后的结果表明,凡是核心序列重复次数较少的微卫星标记,其结果或单态或等位基因数目非常少, PIC 值也偏低。本研究基于 Roche 454 测序技术获得的微卫星序列重复数在 10 次以上的占总数的 87.5%,表明本方法与传统方法相比,能获得更多多态性信息含量高的分子标记,这可能是由于目前 Roche 454 读长较长导致获得微卫星序列比较长,重复次数较多的缘故。

运用传统的筛选小插入片段基因组文库的方法

分离微卫星 DNA(Zane *et al.*, 2002)开发耗时费力,多态性也不尽如人意,如战爱斌等(2008)菌落原位杂交共得到 532 个阳性克隆,开发的位点只有 56.92%表现为多态性;袁慧等(2008)磁珠富集法构建岩原鲤(*Procypris rabaudi*)微卫星文库只得到 61 个微卫星序列,60%的引物对能产生特异性的目的片段;而本研究利用 Roche GS FLX 得到 18955 条微卫星序列,同时随机筛选的被检测的引物多态性表现为 100%,远远高于其他方法。郝卓然等(2012)采用磁珠富集法筛选新疆扁吻鱼(*Aspiorhynchus laticeps*)的微卫星标记,并进行扁吻鱼群体遗传多样性分析,得到 1000 个 SSR 位点,平均多态信息含量(PIC)为 0.535。龚小玲等(2009)采用小片段克隆法对澳洲鳗鲡(*Anguilla australis*)微卫星筛选,得到 76 位点,澳洲鳗鲡的 1 个群体平均多态性信息含量的分别为 0.737。本研究通过 454 测序平台得到 5641 个微卫星位点,平均多态信息含量(PIC)为 0.67(>0.5)。因此,454 高通量测序不仅能够得到大量的微卫星位点,而且筛选的微卫星位点均为高度多态位点。

综上所述,与其他微卫星开发方法相比,高通量测序可以筛选到更多的微卫星位点,聚类分析可以有效减少后期筛选 SSR 位点的工作量,且筛选的微卫星位点多态信息含量较高。随机选取的 11 个微卫星位点均为多态性位点,适合用于钝吻黄盖鲈遗传多样性、种群遗传结构等研究的重要分子标记,可为钝吻黄盖鲈资源的管理和合理开发利用、种质资源的保护等提供理论依据,并为钝吻黄盖鲈遗传育种等研究提供参考资料。

参 考 文 献

- 王伟,杨文鹏,冯浪,等.利用聚类分析筛选玉米杂交种 SSR 指纹库中鉴别能力强的标记.种子,2010,29(10):35–40
- 刘世建,荣廷昭,杨俊品,等.四川地方玉米种质的 SSR 聚类分析.作物学报,2004,30(3):221–226
- 孙效文,贾智英,魏东旺,等.磁珠富集法与小片段克隆法筛选鲤微卫星的比较研究.中国水产科学,2005,12(2):126–131
- 孙波,鲍毅新,张龙龙,等.大鼠及小鼠微卫星引物在社鼠中的跨种扩增.动物学杂志,2009,44(6):145–150
- 吴琼,段小群,陈旭,等.基于高通量测序的红豆杉 EST-SSRs 标记研究.中国中药杂志,2012,37(24):3728–3733
- 张岩,肖永双,高天翔,等.钝吻黄盖鲈不同群体形态学比较研究.渔业科学进展,2010,31(5):15–21
- 张岩,肖永双,高天翔.钝吻黄盖鲈野生群体遗传多样性分析.水产学报.2008,32(3):492–496
- 张岩,高天翔,刘曼红,等.钝吻黄盖鲈同工酶组织特异性及群体遗传结构的初步研究.中国海洋大学学报(自然科学

- 版), 2007, 37(2): 235–242
- 苗贵东, 杜民, 杨景峰, 等. 大菱鲆亲子鉴定微卫星多重 PCR 技术建立及应用. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2011, 44(Z1/2): 97–106
- 胡龙洋, 栾生, 毛勇, 等. 日本对虾养殖群体两个世代遗传结构的微卫星分析. 渔业科学进展, 2014, 35(2): 74–82
- 郝卓然, 梁利群, 常玉梅, 等. 扁吻鱼微卫星的筛选及群体遗传多样性分析. 水产学杂志, 2012, 25(3): 20–25
- 战爱斌, 胡景杰, 胡晓丽. 富集文库-菌落原位杂交法筛选栉孔扇贝的微卫星标记. 水产科学, 2008, 32(3): 353–361
- 袁慧, 张修月, 宋昭彬, 等. 岩原鲤微卫星富集文库的构建及微卫星分子标记的筛选. 四川动物, 2008, 27(2): 210–215
- 贾志英, 全迎春, 梁利群. 凡纳滨对虾微卫星 DNA 的筛选及其特征的研究. 上海水产大学学报, 2007, 16(1): 11–15
- 徐鹏, 加建斌, 相建海. 中国对虾微卫星的筛选. 海洋与湖沼, 2001, 32(3): 255–259
- 龚小玲, 李思发, 蔡完其, 等. 澳洲鳎微卫星分子标记的筛选与检测. 中国水产科学, 2009, 16(1): 133–138
- 游翠红, 童金苟, 俞小牧. 大鳞副泥鳅 7 个群体遗传变异的微卫星分析. 水生态学杂志, 2012, 33(1): 84–91
- 樊佳佳, 白俊杰, 李胜杰, 等. 大口黑鲈微卫星 DNA 指纹图谱的构建和遗传结构分析. 水生生物学报, 2012, 36(4): 600–609
- Akagi H. Microsatellite DNA marker for rice chromosome. Theor Appl Genet, 1996, 93: 1071–1077
- Arden WR, Borer S, Thrower F, et al. Inheritance of 12 microsatellite loci in *Oncorhynchus mykiss*. J Hered, 1990, 90: 529–536
- Callen DF, Thompson AD, Shen Y, et al. Incidence and origin of null alleles in the (AC)_n microsatellite markers. Am J Hum Genet, 1993, 52(5): 922–927
- Fujio Y, Koto Y. Genetic in fish population. Soc Scient Fish, 1979, 45(9): 1169–1178
- Graham IA, Besser K, Blumer S, et al. The genetic map of *Artemisia annua* L. identifies loci affecting yield of the antimalarial drug artemisinin. Science, 2010(15), 327: 328–331
- Hou R, Bao ZM, Wang S, et al. Transcriptome sequencing and de novo analysis for Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*) using 454 GS FLX. PloS one, 2011, 6(6): e21560–21561
- Huang XH, Feng Q, Qian Q, et al. High-throughput genotyping by whole-genome resequencing. Genome Res, 2009, 19(6): 1068–1076
- June EZ, Hugo C, Huayu Z, et al. Using next-generation sequenced application to isolate Simple Sequence Repeat (SSR) loci in the plant sciences. Botany, 2012, 99(2): 193–208
- Kandpal RP, Kandpal G, Weissman SM. Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping clones and hybridization selection for region specific markers. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(1): 88–92
- Karagyozov L. Construction of random small-inster genomic libraries highly enriched for simple sequence repeats. Nucleic Acid Res, 1993, 21(16): 3911–3912
- Lam HM, Xu X, Liu X, et al. Resequencing of 31 wild and cultivated soybean genomes identifies patterns of genetic diversity and selection. Nature Genetics, 2010, 42(12): 1053–1059
- Li T, Li H, Zhang YX, et al. Identification and analysis of seven H₂O₂-responsive miRNAs and 32 new miRNAs in the seedlings of rice (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). Nucleic Acids Res, 2011, 39(7): 2821–2833
- Morishima K, Arai K. Cross-species amplification of microsatellite markers for the brown sole in the family Pleuronectidae. Fish Sci, 2009, 75: 1103–1107
- Maguire TL, Edwards KJ, Saenger P. Characterization and analysis of microsatellite loci in mangrove species, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae). Theor Appl Genet, 2000, 101(1): 279–285
- Sang-Gyu K, Kagayaki M, Katsutoshi A. Cross-species amplification of microsatellite markers for the brown sole in the family Pleuronectidae. Fisheries Sci, 2009, 75(5): 1103–1107
- Shaw PW, Pierce GJ, Boyle PR. Subtle population structuring within a highly vagile marine invertebrate, the veined squid *Loligo forbesi*, demonstrated with microsatellite DNA markers. Mol Ecol, 1999, 8(3): 407–417
- Smulders MJ, Bredemeijer G, Rus-kortekaas W, et al. Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische und angewandte Genetik, 1997, 94(2): 264–272
- Star B, Nederbragt AJ, Jentoft S, et al. The genome sequence of Atlantic cod reveals a unique immune system. Nature, 2011, 477(7363): 207–210
- Sunnucks P. Efficient genetic markers for population biology. Trends Ecol Evol, 2000, 15(5): 199–203
- Tokuko U, Kawahara T, Tsumura Y, et al. Development and polymorphism of simple sequence repeat DNA markers for *Shorea curtisii* and other Dipterocarpaceae species. Heredity, 1998, 81(4): 422–428
- Toth G, Gaspari Z, Jurka J. Microsatellite in different eukaryotic genome: survey and analysis. Genome Res, 2000, 10(7): 967–981
- Weber JL. Informativeness of human (dC-dA)_n(dG-dT)_n polymorphisms. Genomics, 1990, 7(4): 524–530
- Xia Q, Guo Y, Zhang Z, et al. Complete resequencing of 40 genomes reveals domestication events and genes in silkworm (*Bombyx*). Newslett Sericultural Sci, 2009, 29(3): 1–6
- Xiang H, Zhu J, Chen Q, et al. Single base-resolution methylome of the silkworm reveals a sparse epigenomic map. Natl Biotechnol, 2010, 28(5): 516–520

- Xu Z, Dhar AK, Wyrzykowski J, *et al.* Identification of abundant and information microsatellites from shrimp genome. *Anim Genet*, 1990, 30(2): 1–7
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol Ecol*, 2002, 11(1): 1–16
- Zhan AB, Bao ZM, Wang XL, *et al.* Microsatellite markers derived from bay scallop *Argopecten irradians* expressed sequence tags. *Fisheries Sci*, 2005, 71(6): 1341–1346
- Zhang H, Yu H, Gao TX, *et al.* Analysis of genetic diversity and population structure of *Pleuronectes yokohamae* indicated by AFLP markers. *Biochem Syst Ecol*, 2012, 44(8): 102–108

(编辑 冯小花)

Microsatellite Loci Isolated by Roche 454 GS FLX in *Pleuronectes yokohamae*

PAN Ting^{1,2}, ZHANG Yan^{2①}, ZHANG Hui⁴, GAO Tianxiang³, XIAO Yongshuang⁴, JIANG Yunrong^{1,2}

(1. Shanghai Ocean University, College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai 201306;

2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003; 4. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

Abstract Roche 454 GS FLX, the second-generation sequencing technique, can read longer fragments accurately and isolate SSR markers, and thus has been widely used in many fields of research. In this study, we applied Roche 454 GS FLX to isolate the microsatellite loci and developed the identification of microsatellites markers in *Pleuronectes yokohamae*. (AC)₁₂, (AG)₁₂, (AAT)₁₂, (AGG)₈, (AGC)₈, (AGAT)₈ and (ACAG)₆ were hybridized with shotgun library of DNA samples. This SSR library was constructed through magnetic beads enrichment, cleaning, elution and purification. The SSR library was then sequenced with Roche 454 GS FLX. MISA was used to search for microsatellite motifs and primer 3 was used to design the primers for *P. yokohamae*. FAM, HEX, and TAMRA were used to label the microsatellite primers (5'), which were used in the triplex PCR or the nested PCR to identify the genotype of the microsatellite loci. The cluster similarity comparison method was first used to analyze 5641 loci that we obtained, and 247 types of loci with high polymorphism were screened. Among these loci, 52.22% were perfect, 20.24% were imperfect and the rest 27.54% were compound. The percentage of (AC)_n and (AG)_n was 44% in these loci, and 87.5% of them were more than 10-time repeats. Eleven pairs of fluorescent primers were designed according to the selected loci (more than 10-time repeats) and were applied in 5 individuals. The number of alleles per locus ranged from 3 to 8 with an average value of 5. The average values of H_o , H_e and PIC were 0.588, 0.788 and 0.670 respectively. Four loci among 11 deviated from Hardy-Weinberg. The results of this research indicated that 454 GS FLX was an intuitive and efficient technique for microsatellite isolating. Our study provides essential information about the population genetic diversity of *P. yokohamae*, and helps improve the artificial breeding.

Key words Roche 454 GS FLX; *Pleuronectes yokohamae*; Isolating; Microsatellite markers

① Corresponding author: ZHANG Yan, E-mail: zhangyan@ysfri.ac.cn