

文章编号: 1674 - 5566(2010)06 - 0728 - 06

三疣梭子蟹微卫星文库的构建及序列分析

刘 汝^{1,2,3}, 许强华^{1,2,3}

- (1. 上海海洋大学大洋渔业资源可持续开发省部共建教育部重点实验室, 上海 201306;
2. 上海海洋大学大洋生物资源开发与利用上海市高校重点实验室, 上海 201306;
3. 上海海洋大学海洋科学学院, 上海 201306)

摘 要: 采用磁珠富集法筛选三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 的微卫星序列。经 *Sau3AI* 酶切后的 200 ~ 1 000 bp DNA 纯化片段, 与两端已知序列的人工接头连接, 用含有生物素标记的 (CA)₁₂ 和 (GA)₁₂ 探针杂交, 根据磁珠的链酶亲和素与生物素特异结合的特性, 捕获含微卫星序列的单链 DNA, 以此为模板用人工接头序列为引物进行 PCR 扩增, 随后将获得的片段连接到 PMD18-T 载体上, 转化至 DH5 α 感受态细胞中, 成功构建了微卫星富集文库。测序其中的 60 个阳性克隆, 得到 42 条微卫星序列 (基因登录号为: HQ283153-HQ283194), 除探针使用的 CA/GT、GA/CT 重复外, 还得到 GAGT 重复序列。42 条微卫星序列中, 完美型 31 个 (占 73.8%), 非完美型 9 个 (占 21.4%), 混合型 2 个 (占 4.8%)。完美型的比例显著高于非完美型, 这与其他真核生物微卫星序列的特征相一致。39 条微卫星序列的重复次数大于 10 (占 92.9%), 其中, 重复次数在 10 ~ 19 次之间的有 27 个, 20 次以上的有 12 个。筛选出的微卫星位点可为今后三疣梭子蟹遗传多样性评价、种群遗传结构鉴定及资源保护研究提供一套有用的分子标记。

关键词: 三疣梭子蟹; 磁珠富集法; 筛选; 微卫星; 多态性

中图分类号: S 917 文献标识码: A

Construction of microsatellite library and sequences analysis of the swimming crab (*Portunus trituberculatus*)

LIU Ru^{1,2,3}, XU Qiang-hua^{1,2,3}

- (1. The Key Laboratory of Shanghai Education Commission for Oceanic Fisheries Resources Exploitation, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. The Key Laboratory of Sustainable Exploitation of Oceanic Fisheries Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Microsatellite sequences were isolated from swimming crab (*Portunus trituberculatus*) by using the magnetic bead hybridization enrichment method. Total genomic DNA was extracted and digested with restriction enzyme *Sau3AI*. Fragments in range of 200 - 1 000 bp were agarose-gel purified and ligated with special adaptors, and the combinations was hybridized with biotin-labelled microsatellite probe (CA)₁₂ and (GA)₁₂. By using the high binding affinity of biotin to streptavidin-coated magnetic beads, single-stranded DNA containing the selected microsatellite sequences were captured. The targeted DNA was used as the

收稿日期: 2010-07-14

基金项目: 国家自然科学基金(30800840); 上海市科委青年科技启明星人才计划项目(09QA1402600)

作者简介: 刘 汝(1987-), 女, 硕士研究生, 专业方向为海洋生物遗传资源保护。E-mail: liberalru@126.com

通讯作者: 许强华, Tel: 021-61900328, E-mail: qhxu@shou.edu.cn

template to conduct PCR amplification using the adaptor as primers. The fragments were inserted into PMD18-T vector, and transformed into DH5 α competent cell. Of the 60 positive clones for sequencing, 42 microsatellite repeat were acquired (GenBank accession number: HQ283153-HQ283194). Except the CA/GT and GA/CT, the microsatellite sequences also had repeat motif of GAGT. The 42 microsatellite sequences could be categorized into 31 perfect type (73.8%), 9 imperfect type (21.4%), and 2 compound type (4.8%). The percentage of perfect type was much higher than the imperfect type in swimming crab, which was same as other eukaryote. 39 microsatellite sequences (92.9%) had at least 10 times of repeats numbers. 27 microsatellite containing sequences had 10 - 19 times of repeats numbers, and 12 microsatellite had more than 20 times of repeats numbers. The present study might provide a set of useful molecular markers for future studies on genetic diversity evaluation, population genetic structure identification and resources conservation of the swimming crab.

Key words: *Portunus trituberculatus*; enrichment by magnetic beads; screening; microsatellite; polymorphism

三疣梭子蟹是我国大型海洋经济蟹类,经济价值高,是我国重要的海洋渔业资源,广泛分布于中国、朝鲜、日本及马来西亚群岛等海域^[1-2]。近年来由于捕捞强度增大及环境影响,三疣梭子蟹的资源量在持续下降,我们需要寻找合适的分子遗传标记来分析三疣梭子蟹群体的遗传多样性和种质资源状况,以便于三疣梭子蟹种质资源的管理、保护和合理开发利用。

微卫星序列(microsatellites) 是指由 1 ~ 6 个核苷酸为重复单位组成的简单多次串联重复 DNA 序列。微卫星具有高多态性和共显性的特征,已成为目前最常用的分子标记,广泛应用于种群遗传结构分析^[3]、遗传多样性评价、遗传连锁图谱构建^[4]、亲缘关系鉴定^[5] 和 QTL 的研究。目前,三疣梭子蟹的微卫星位点分离和筛选测序少有报道,且位点的序列并未见公布。本文将用磁珠富集法构建三疣梭子蟹的微卫星文库,分离微卫星分子标记,为其种质资源评估和遗传多样性分析提供有效的研究手段。

1 材料与方 法

1.1 基因组总 DNA 的提取

三疣梭子蟹样品选自东海,取 1 g 少量肌肉组织,用无菌水清洗,加入 370 μ L TNE 缓冲液, 10 μ L 10% SDS, 10 μ L 10mg/mL 蛋白酶 K 和 20 μ L 1mol/ L DTT, 56 $^{\circ}$ C 消化至透明,然后依次用苯酚、抽提液 1(25: 24: 1 的酚: 氯仿: 异戊醇)、抽

提液 2(24: 1 的氯仿: 异戊醇) 抽提,无水乙醇沉淀,70% 乙醇清洗,自然干燥后加入 30 μ L TE 溶解(图 1)。用紫外分光光度计检测提取 DNA 的浓度和纯度。

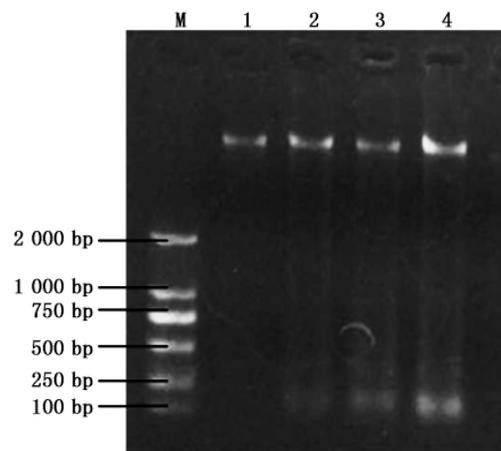


图 1 三疣梭子蟹基因组 DNA 电泳图谱

Fig. 1 Genomic DNA of swimming crab by 1.0% agarose gel electrophoresis

M. DL2000 DNA Marker; 1 - 4. 三疣梭子蟹基因组 DNA 样本。

1.2 总 DNA 的酶切及酶切片段的选择回收

取 5 ~ 10 μ gDNA,用 30U *Sau3AI* 限制性内切酶在 37 $^{\circ}$ C 酶切 3 ~ 4 h,酶切后的反应体系于 65 $^{\circ}$ C 10 min,灭活 *Sau3AI* 酶。利用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳,用割胶回收试剂盒(Takara) 回收 200 ~ 1 000 bp 的酶切产物。

1.3 与接头的连接及连接产物的 PCR 检测

用单链的寡核苷酸 (50 $\mu\text{mol/L}$) 做接头, 等比例混合两寡核苷酸 A、B, 使其终浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min, 室温自然冷却 1 h 退火以形成带有限制性酶切位点 *Sau3AI* 的双链接头。其中, 寡核苷酸 A 的序列为: 5' -GGCCAGAGACCCCAAGCTTCG-3', 寡核苷酸 B 的序列为: 5' -pGATCCGAAGCTTGGGGTCTCTGGCC-3', 均由上海生工生物工程公司合成。

建立连接体系: 100 μL 体系中包括 3 μL T_4 DNA Ligase, 10 μL 10 \times T_4 Buffer, 4 μL Adaptor (25 $\mu\text{mol/L}$), 83 μL 酶切 DNA。混匀后于 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接 8 h 或过夜, 再置于 65 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 灭活 T_4 连接酶, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

为了检测连接是否成功, 并创建基因组 PCR 文库, 用连有接头的 DNA 片段作为模板, 寡核苷酸链 B 作为引物进行 PCR 扩增。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 然后进入如下循环: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 退火每循环依次降 0.5 $^{\circ}\text{C}$, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s, 循环 10 次, 然后在 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火循环 25 次, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

1.4 杂交及微卫星片段的磁珠富集

1.4.1 建立 50 μL 杂交体系

1.5 μL 生物素探针 (CA)₁₂ 或 (GA)₁₂ (10 $\mu\text{mol/L}$), 5 μL 引物寡核苷酸链 B (50 $\mu\text{mol/L}$), 15 μL 20 \times SSC, 0.5 μL 10% SDS, 16 μL ddH₂O, 68 $^{\circ}\text{C}$ 预热。将 12 μL 双链 DNA 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 使双链 DNA 变性为单链, 加入预热的杂交混合液, 70 $^{\circ}\text{C}$ 杂交 1 h。

1.4.2 磁珠平衡

将磁珠混匀, 取 125 μL 磁珠 (4 mg/mL) 于 1.5 mL 离心管中, 并取 300 μL W/B buffer 冲洗两次, 去掉游离的链酶亲和素, 每次冲洗完后, 用磁铁吸附磁珠, 再弃掉 W/B buffer, 再用 200 μL 洗液 I (6 \times SSC, 0.1% SDS) 洗涤平衡, 直到磁珠外观变得顺滑易洗脱, 最后加 200 μL 洗液 I 备用。

1.4.3 磁珠吸附富集

磁珠上包被的链霉亲和素与探针上的生物素能发生亲和作用, 可以通过磁力将磁珠连同所需的微卫星序列吸附分离出来。将杂交液加入平衡好的磁珠中, 保持磁珠悬浮状态 25 $^{\circ}\text{C}$ 20

min。然后进行洗涤, 去除不含微卫星的序列。洗涤方法是: (1) 先用磁铁吸附磁珠, 吸弃混合液; (2) 用洗液 I (6 \times SSC, 0.1% SDS) 室温下洗 2 次, 10 min/次; (3) 洗液 II (3 \times SSC, 0.1% SDS) 70 $^{\circ}\text{C}$ 洗 2 次, 15 min/次; (4) 洗液 III (6 \times SSC) 室温下快速洗 2 次。

1.4.4 捕获含有微卫星序列的单链 DNA

用 200 μL 0.1 \times TE 在室温下快速洗 2 次, 再加入 50 μL 0.1 \times TE 与磁珠混匀, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min, 释放出含有微卫星序列的单链 DNA, 吸出备用。

1.5 富集后的目的片段 PCR 扩增检测及纯化

PCR 法检测生物素标记的探针和磁珠是否捕获了含有微卫星的目的片段 (图 2), 50 μL 反应体系中含有洗脱的 DNA 模板 10 μL , 2.5 mmol/L dNTP 5 μL , 25 $\mu\text{mol/L}$ 引物 OligoB 1 μL , 10 \times PCR Buffer 2.5 μL , *Taq* 酶 0.5 U。PCR 反应程序同上。

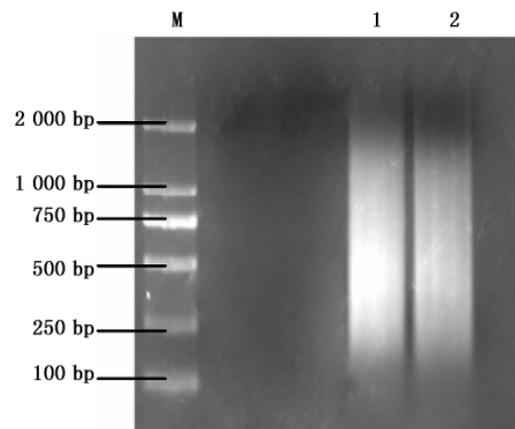


图 2 磁珠富集 SSR 片段的电泳图谱

Fig. 2 Richness SSR segments using magnetic beads
M. DL2000 DNA Marker; 1-2. 磁珠富集 SSR 片段。

1.6 载体连接和转化

将上述 PCR 产物直接与 PMD18-T 载体 (Takara) 进行连接, 同时用 T 载体自身连接作为对照。16 $^{\circ}\text{C}$ 连接 3 h 左右, 可延长至 8 h, 时间越长可相应提高连接效率。连接后的产物转化到感受态大肠杆菌 DH5 α (天根生化科技有限公司), 细菌 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 1 h 后涂布到添加 IPTG、X-Gal、Amp (0.1 mg/mL) 的 LB 平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。

1.7 阳性克隆的筛选和鉴定

挑取阳性克隆在 LB 液体培养基中振荡培养过夜,取菌液 2.0 μL 做模板,以 oligoA 和无生物素标记的探针 (CA)₁₂ 和 (GA)₁₂ 作为引物进行插入片段 PCR,琼脂糖电泳检测,产生两条或两条以上扩增带的可推测为含微卫星序列的阳性克隆(图 3)。反应体系 20 μL ,含 2.0 μL 10 \times PCR buffer、1.2 μL 25 mmol/L MgCl₂、1.6 μL 2.5 mmol/L dNTP、0.6 μL 25 mmol/L oligoA、1.2 μL 10 mmol/L (CA)₁₂、0.2 U Taq,PCR 反应程序如上。

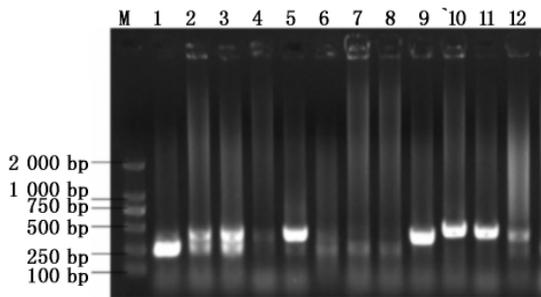


图 3 阳性克隆 PCR 检测电泳图谱

Fig.3 Positive clone detection by PCR method

M. DL2000 DNA Marker; 1 - 12. 菌落 PCR 产物

1.8 序列分析及引物设计

挑选含微卫星插入片段的阳性克隆进行测序,由上海申速测序公司完成。测序结果在 chroma 软件上进行峰图分析,去掉载体和接头序列,用 SSR Hunter 软件结合人工搜寻查找微卫星位点,采用 Premier Primer 5.0 软件包进行引物设计。

2 结果与分析

2.1 克隆及测序结果

分别用探针 (CA)₁₂ 和 (GA)₁₂ 对 600 个菌落进行 PCR 筛选,获得所需的阳性克隆 160 个,挑选其中的 60 个去测序,在成功获得测序结果的 51 个序列中,根据单碱基重复次数 > 10,两碱基重复次数 > 6,三碱基重复次数 > 4,四、五、六碱基重复次数 > 3 的微卫星长度标准^[6-7],得到 42 条微卫星序列(基因登录号为: HQ283153-HQ283194)。除探针使用的 CA/GT、GA/CT 重复外,还得到 GAGT 重复序列。

2.2 微卫星的分类

依据 Weber^[8] 提出的微卫星核心序列分类标准,我们可以把三疣梭子蟹的微卫星序列分为完美型(perfect, P)、非完美型(imperfect, I)和混合型(compound, C)3 种类型。在 42 个微卫星序列中,完美型的 31 个,占 73.8%;非完美型的 9 个,占 21.4%;混合型的 2 个,占 4.8%(表 1)。39 条微卫星序列的重复次数大于 10(占 92.9%),其中,重复次数在 10~19 次之间的有 27 个,20 次以上的有 12 个。

表 1 三疣梭子蟹富集文库中微卫星克隆特性

Tab.1 Characterization of microsatellite clones from enriched library in *Portunus trituberculatus*

编号(基因登录号)	序列重复结构	类型
PT_A01(HQ283153) (GA) ₈		P
PT_A02(HQ283154) (CT) ₉ T(CT) ₅		I
PT_B03(HQ283155) (CT) ₁₂ T(CT) ₆		I
PT_B04(HQ283156) (CT) ₁₀		P
PT_B05(HQ283157) (CT) ₁₅		P
PT_B07(HQ283158) (GT) ₁₆		P
PT_B09(HQ283159) (CT) ₅ TT(CT) ₁₁		I
PT_B12(HQ283160) (CA) ₂₄		P
PT_C01(HQ283161) (CT) ₁₃		P
PT_C02(HQ283162) (TC) ₁₃		P
PT_C03(HQ283163) (AG) ₃ G(AG) ₈		I
PT_C06(HQ283164) (GA) ₁₁		P
PT_C08(HQ283165) (CT) ₇ AT(CT) ₇		I
PT_C10(HQ283166) (GT) ₃ CT(GT) ₃ (CT) ₃		C
PT_C12(HQ283167) (CA) ₂₈		P
PT_D05(HQ283168) (CT) ₁₂		P
PT_D06(HQ283169) (CT) ₁₂		P
PT_D07(HQ283170) (CT) ₁₀		P
PT_D08(HQ283171) (GA) ₁₀ (GAGT) GA(GAGT) ₄		C
PT_D12(HQ283172) (CT) ₂₉		P
PT_E01(HQ283173) (CT) ₅ GT(CT) ₄ GT(CT) ₄ GT(CT) ₄ T(CT) ₈		I
PT_E02(HQ283174) (GA) ₁₂		P
PT_E03(HQ283175) (CT) ₁₂		P
PT_E04(HQ283176) (CT) ₁₄		P
PT_E05(HQ283177) (CT) ₁₆		P
PT_E06(HQ283178) (GT) ₂₇		P
PT_E07(HQ283179) (CA) ₁₃		P
PT_E10(HQ283180) (CT) ₈ TT(CT) ₉		I
PT_E11(HQ283181) (GA) ₂ A(GA) ₁₁		I
PT_F05(HQ283182) (CA) ₂₀		P
PT_F07(HQ283183) (CT) ₂₂		P
PT_F08(HQ283184) (CA) ₂₄ TA(CA) ₈ CT(CA) ₄		I
PT_F10(HQ283185) (GA) ₈		P
PT_G01(HQ283186) (CT) ₁₂		P
PT_G02(HQ283187) (GT) ₂₂		P
PT_G04(HQ283188) (TG) ₃₁		P
PT_G06(HQ283189) (GT) ₃₈		P
PT_G10(HQ283190) (TG) ₂₇		P
PT_H05(HQ283191) (CT) ₂₂		P
PT_H07(HQ283192) (CT) ₁₀		P
PT_H08(HQ283193) (TG) ₁₃		P
PT_H12(HQ283194) (CT) ₁₅		P

2.3 引物设计筛选

分离出的微卫星位点用软件 Primer Premier 5.0 设计引物,部分序列由于侧翼序列不完全而无法设计,且在设计标准为 TM: 55 ~ 68 °C; GC 含量: 30% ~ 60%; 引物长度: 18 ~ 25 bp; 扩增产物大小: 100 ~ 400 bp 条件下,可以设计出引物 30 对。

3 讨论

微卫星位点的获得通常有两种途径:一是通过检索 DNA 序列数据库(如 GENBANK, GDB, EMBL),或者根据近缘物种的已知微卫星侧翼序列设计引物。这种方法较为简单、方便,但相对工作量很大,且不能筛选出该物种特有的微卫星序列;第二种途径是用经典分子生物学方法克隆所需要的微卫星标记位点,构建含微卫星位点的基因组文库^[9-10]。后者主要又有两种方法,一是小片段克隆法,二是富集法。目前富集法应用较多,该方法相对简单、快速且工作量小,获取的微卫星数目较多,但所需费用较高,且保真性低,不适宜于重复序列较长生物微卫星 DNA 的筛选^[11]。

本研究采用生物素-磁珠吸附微卫星富集法,CA 和 GA 插入文库中的阳性克隆率高达 26.7%,远远高于常规小片段克隆法^[12]。若插入片段的平均大小为 400 bp,那么理论上微卫星的阳性克隆率可以达到 3.5% ~ 17%^[13],所以本研究的方法是可行的。在真核生物基因组中,一般认为完美型的比例要显著高于非完美型,如虾夷扇贝(*P. yessoensis*)的微卫星序列中,完美型、非完美型、混合型比例分别为 50.8%, 43.0%, 6.1%^[14],草鱼中的比例是 69.23%、17.69%、11.54%^[15]。

微卫星核心序列突变率相对较高($10^{-5} \sim 10^{-3}$),造成微卫星核心序列重复次数的增加或减少,即微卫星长度的变化,这是微卫星多态性的基础^[16]。Weber^[8]认为,只有在双碱基重复序列重复次数大于 12 次时,微卫星标记才有可能表现出较高多态性信息含量(polymorphic information content, PIC)值,当 $n \geq 16$ 时,可提供的多态性信息含量在 0.5 以上^[17],才可以进行相应的多态性分析。根据滑动链错配机制(slipped-strand mispairing),长的微卫星重复序列比短的微

卫星序列更容易发生突变、产生多态性^[18]。所以,研究所用的微卫星序列其重复次数应比较高,有利于筛选设计出多态性引物。本实验中获得的微卫星重复次数在 10 次以上的占 92.9%,这对筛选多态信息高的分子标记,进行种群遗传多样性研究是非常有利的。

利用微卫星分子标记技术对十足目甲壳动物的遗传分析,仅在虾类和小部分蟹类中有少量报道^[19-20]。我国渔业资源丰富,利用微卫星标记的共显性遗传和高多态性,可以对三疣梭子蟹进行种群遗传分析和多样性鉴定,从分子水平为遗传育种、种质鉴定、资源的有效管理和持续利用提供理论依据。

参考文献:

- [1] Hamasaki K, Fukunaga K, Kitada S. Batch fecundity of the swimming crab *Portunus trituberculatus* (Brachyura: Portunidae) [J]. *Aquaculture*, 2006, 253: 359-365.
- [2] 戴爱云,杨思凉,宋玉枝,等.中国海洋蟹类[M].北京:海洋出版社,1986: 213-214.
- [3] Kelly M W, Rhymer J M. Population genetic structure of a rare unionid (*Lampsilis cariosa*) in a recently glaciated landscape [J]. *Conservation Genetics*, 2005, 6(5): 789-802.
- [4] Hubert S, Hedgecock D. Linkage Maps of Microsatellite DNA Markers for the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* [J]. *Genetics*, 2004, 168(1): 351-362.
- [5] Li Q, Park C, Kijima A. Allelic transmission of microsatellites and application to kinship analysis in newly hatched Pacific abalone larvae [J]. *Fish Sci*, 2003, 69(5): 883-889.
- [6] Stalling R L, Ford A F, Nelson D, et al. Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes [J]. *Genomics*, 1991, 10(3): 807-815.
- [7] Estroup A, Solignac M, Harry M, et al. Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* [J]. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21(6): 1427-1431.
- [8] Weber J L. Informativeness of human (dC-dA)_n-(dG-dT)_n polymorphisms [J]. *Genomics*, 1990, 7(4): 524-530.
- [9] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [10] 董世瑞. 形态标记与微卫星标记在中国对虾遗传选育中的应用研究[D]. 青岛: 中国海洋大学学位论文, 2006.
- [11] Liu S Y, Dai C F, Fan T Y, et al. Cloning and characterization of microsatellite loci in a gorgonian coral, *Juncella juncea* (Anthozoa: Octocorallia: Ellisellidae) and its application in clonal genotyping [J]. *Mar Biotechnol*, 2005, 7(1): 26-32.

- [12] 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[J]. 中国水产科学, 2005, 12(2): 126-132.
- [13] Toth G, Gaspari Z, Jurka J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. [J]. Genome Research, 2000, 10(7): 967-981.
- [14] 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.
- [15] 孙效文,鲁翠云,梁利群. 磁珠富集法分离草鱼微卫星分子标记[J]. 水产学报, 2005, 29(4): 482-486.
- [16] 刘志毅,相建海. 微卫星 DNA 分子标记在海洋动物遗传分析中的应用[J]. 海洋科学, 2001, 25(6): 11-13.
- [17] Orit G, Pearse D E, Avise J. Phylogenetic assessment of length variation at a microsatellite locus. Proceedings of the National Academy of Sciences [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997, 94(10): 745-749.
- [18] Eisen J. Mechanistic basis for microsatellite instability [M] // Goldstein D B. Microsatellites: Evolution and applications, New York: Oxford University Press, 1999: 34-48.
- [19] Takano M, Barinova A, Sugaya T, et al. Isolation and characterization of microsatellite DNA markers from mangrove crab, *Scylla paramamosain* [J]. Mol Ecol Notes, 2005, 5(4): 794-795.
- [20] Yap E S, Sezmis E, Chaplin J A. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Portunus pelagicus* (Crustacea: Portunidae) [J]. Mol Ecol Notes, 2002, 2(1): 30-32.

欢迎订阅 2011 年《水产学报》

《水产学报》是由中国科协主管、中国水产学会主办、上海海洋大学承办、科学出版社出版的以反映我国水产科学技术成果为主的学术类核心期刊(中国科学引文数据库 CSCD 核心库和中信所核心库),1964 年创刊,是中国水产界历史最为悠久的刊物之一。2002-2009 年连续荣获“百种中国杰出科技期刊”称号,2006-2008 年获得中国科协“精品期刊工程项目(C类)”资助,2009-2010 年获得中国科协“精品科技期刊示范项目(B类)”资助。

本刊主要刊载水产基础研究、水产养殖和增殖、水产品病害防治、渔业水域环境保护、渔业资源与管理、水产品保鲜加工与综合利用等方面的研究论文、研究简报和综述。

本刊为月刊,每期 160 页,国内每期订价 49.00 元,全年订价 588.00 元(含邮费)。国内统一刊号:CN 31-1283/S,国际标准刊号:ISSN 1000-0615,国内邮发代号:4-297,国外发行代号:Q-387。读者可在当地邮局办理订阅,破季、漏订或补订均可直接与编辑部联系。个人订户可享受 6 折优惠。

编辑部地址:上海市临港新城沪城环路 999 号 201 信箱

邮政编码: 201306

联系人: 张美琼

联系电话与传真: 021-61900227

E-mail: mqzhang@shou.edu.cn; jfc@shou.edu.cn

Website: www.sexuebao.cn