

# 中华倒刺鲃微卫星标记筛选及特征分析

熊美华, 史方, 徐念, 阙延福, 杨钟, 胡菊香, 朱滨

(水利部中国科学院水工程生态研究所, 湖北 武汉 430079)

**摘要:**以乌江流域中华倒刺鲃(*Spinibarbus sinensis*)为材料,构建了中华倒刺鲃微卫星富集文库。以乌江彭水电站所采集的32个个体的基因组DNA为模板,进行PCR扩增,结果筛选出8个多态性微卫星位点,其等位基因数4~10,多态信息含量0.6072~0.8515;观测杂合度0.5625~1.0000,期望杂合度0.6791~0.8795,Hardy 中华倒刺鲃微卫星标记筛选及特征分析 Weinberg 平衡偏离指数-0.2009~0.3805;卡方检验结果表明,3个位点不同程度地偏离了 Hardy 中华倒刺鲃微卫星标记筛选及特征分析 Weinberg 平衡( $P < 0.05$ );各位点两两之间不存在显著的连锁不平衡现象。

**关键词:**中华倒刺鲃;基因组富集文库;微卫星;多态性

**中图分类号:**Q503 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2011)01-0040-05

微卫星 DNA (Microsatellite DNA) 又称短串联重复序列 (short tandem repeats, STRs) 或简单重复序列 (simple sequence repeats, SSRs), 是以少数几个核苷酸 (多数为 2~4 个) 为单位多次串联重复的 DNA 序列。由于微卫星具有种类多、多态性高、进化速度快及呈简单的孟德尔共显性遗传等优点,使其在基因作图、种群遗传学、医学及亲缘关系鉴定等研究领域得到极为广泛的应用 (晏鹏等, 2003); 其中,微卫星在水产动物种质资源研究中的应用主要集中在群体的杂合度研究、家养群体与野生群体遗传差别、种群亲缘关系研究、家系分析、进化与发育研究、保护濒临灭亡群体等方面 (杜长斌等, 2000)。

中华倒刺鲃 [*Spinibarbus sinensis* (Bleeker)] 俗称乌鳞、青波,隶属鲤形目、鲤科、鲃亚科、倒刺鲃属,主要分布于长江上游及其支流,是重要的经济鱼类之一 (李萍和王宝森, 2008)。该鱼个体大、生长较快、杂食性、饲养饵料来源广,适合于池塘、湖泊、水库集约化养殖。近年来,由于过度捕捞和水体污染严重,野生资源日益减少,可作为亲鱼和后备亲鱼的资源极度匮乏;此外,因倒刺鲃属内有若干形态相近的种,有些繁殖场未经严格鉴定即误将其它种的倒刺鲃作为中华倒刺鲃进行繁殖。因此,苗种不纯或杂种苗的现象时有发生 (蔡焰值等, 2003)。本文筛

选了中华倒刺鲃的微卫星标记,并对这些标记的适用性特征进行了分析,以期鉴定中华倒刺鲃亲鱼及苗种种类,并为更好地管理繁殖群体打下基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

研究所用的中华倒刺鲃样本来自于乌江下游,采样断面包括白马、武隆、彭水、万足、鹿角、洪渡、黑獭和淇滩,将中华倒刺鲃鳍条样本于室温保存在无水乙醇中。实验所用磁珠为链霉亲和素包被的磁珠 (Roche 公司)。生物素标记探针: (AAAG)<sub>7</sub>-biotin、(GATA)<sub>8</sub>-biotin。Mse I 人工接头序列:

Oligo-Mse I A: HO5'-TACTCAGGACTCAT-3'OH

Oligo-Mse I B: HO5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'OH

Mse I N 混合组: 5'-GATGAGTCCTGAGTAA(N)-3'

所用生物素标记探针、接头及引物均由大连宝生物工程有限公司合成。

### 1.2 微卫星基因组文库的构建与克隆筛选

1.2.1 基因组 DNA 的酶切与连接 剪取 2 cm<sup>2</sup> 左右的鳍条,采用蛋白酶 K 酚氯仿法提取基因组 DNA,测量 DNA 浓度 (Sambrook et al, 1989)。调整 DNA 浓度至 200 ng/μL,取基因组 DNA 1 μg, Mse I 酶切 2 h。建立 15 μL 的连接反应体系 [10 μL 酶切样品、接头连接缓冲液 1.5 μL、Mse I A 和 Mse I B 接头的等比例混合物 2.5 μL (20 pmol/μL)、1 μL T4DNA 连接酶]。15℃ 水浴连接 12 h, 4℃ 冰箱连接 6 h。

收稿日期: 2010-04-15

基金项目: 乌江彭水电站水生生物监测 (PS/HB011-2006); 乌江银盘水电站水生生物监测 (WL/HB005-2008)。

作者简介: 熊美华, 1982 年生, 女, 助理研究员, 主要从事分子生态方面的研究。E-mail: dreamer@mail.ihe.ac.cn

**1.2.2 PCR 预扩增** 利用 *Mse* I -N 引物 [*Mse* I -N 混合组: 5'-GATGAGTCCTGAGTAA (N) -3'] 对连接混合液进行 PCR 预扩增。建立 20  $\mu$ L 的反应体系 [10  $\times$  *Taq* buffer ( $Mg^{2+}$ )、2.5 mM dNTP、20 pmol/ $\mu$ L 引物、1U *Taq* DNA 聚合酶和 100 ng 模板 DNA]。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 变性 5min; 94 $^{\circ}$ C、1 min; 53 $^{\circ}$ C、1 min; 72 $^{\circ}$ C、1 min; 14 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

**1.2.3 生物素探针杂交** 建立 100  $\mu$ L 杂交体系: PCR 预扩增产物 25  $\mu$ L, 杂交缓冲液 (6  $\times$  SSC, 0.1% SDS) 70  $\mu$ L, 生物素标记探针 5  $\mu$ L [(AAAG)7-biotin、(GATA)8-biotin]。95 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 57 $^{\circ}$ C 保温 30 min; 取出后, 缓慢冷却至室温, 加入 300  $\mu$ L TEN100 溶液混匀, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

**1.2.4 磁珠富集** 取 1~2 mg 的链霉亲和素磁珠, 加入 300  $\mu$ L TEN100 buffer 仔细洗涤 3 次, 每次洗涤都用磁架固定磁珠。洗涤完毕后, 用 40  $\mu$ L TEN100 buffer 重悬磁珠, 接着加入到生物素探针杂交液中, 室温放置 30 min, 期间不时轻轻吹打, 待磁珠吸附完毕, 用磁架固定磁珠, 移去杂交混合液。沉淀用 400  $\mu$ L TEN1000 溶液室温下洗涤 4 次, 将与磁珠非特异性结合的 DNA 片段洗脱; 然后用 400  $\mu$ L 洗液 I (0.2  $\times$  SSC, 0.1% SDS) 室温下洗涤磁珠 3 次, 再于 52 $^{\circ}$ C 下洗涤 10 min, 最后用 400  $\mu$ L 洗液 II (0.2  $\times$  SSC) 室温下洗涤 10 min。

**1.2.5 洗脱和精制** 加入 100  $\mu$ L TE (pH 8.0), 然后于 95 $^{\circ}$ C 下水浴 15 min, 用磁架固定磁珠后, 迅速吸出上清液, 加入 2 倍体积的冰冻无水乙醇, -20 $^{\circ}$ C 下放置 2 h。取出, 0 $^{\circ}$ C 下, 13 800 r/min 离心 20 min; 弃上清后, 加入 70% 乙醇, 室温放置 15 min; 4 $^{\circ}$ C、138 000 r/min 离心 20 min; 小心移去乙醇, 放入超净台中风干残留的乙醇; 加入 100  $\mu$ L TE8.0 室温溶解, 4 $^{\circ}$ C 保存。

**1.2.6 回收单链 DNA 片段的 PCR 扩增** 以上述单链目的 DNA 片段为模板, 用 *Mse* I -N 引物组进行 PCR 扩增, 获得双链目的片段。20  $\mu$ L 反应体系: 10  $\times$  EX buffer ( $Mg^{2+}$ ) 2  $\mu$ L, dNTP (2.5 mmol/L) 1.6  $\mu$ L, 10  $\mu$ L *Mse* I -N 引物组, *Taq* Takara 聚合酶 (1U), 单链模板 DNA 5  $\mu$ L。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C、1 min; 53 $^{\circ}$ C、1 min; 72 $^{\circ}$ C、1 min; 30 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 放置 20 min。

**1.2.7 PCR 产物回收和 T 载体连接** 用 QIA quick purification kit 回收纯化 PCR 产物, 连接到 pGEM-

T 载体中, 转化到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  感受态细胞, 铺板于含有 Amp 的 LB 固体培养基中, 构建中华倒刺鲃微卫星富集文库。

**1.2.8 阳性克隆的培养和筛选** 将培养好的平板放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱中作蓝白筛选, 挑取白色克隆到含有 Amp 的 LB 液体培养基中, 放于 37 $^{\circ}$ C 摇床 (200 r/min) 中过夜培养。以菌液为模板, *Mse* I -N 为引物进行 PCR 扩增, 确定插入片段分布范围。挑取扩增片段在 80~600 bp 的阳性克隆测序。

**1.2.9 引物设计及 PCR 条件的优化** 用 TANDEM REPEATS FINDER 软件分析所获得的序列, 采用 Primer 5.0 软件设计引物 (张新宇和高燕宁, 2004; Benson, 1999)。用高盐法提取中华倒刺鲃 DNA 标本做模板优化 PCR 条件 (Aljanabi & Martinez, 1997)。PCR 反应在 GeneAmp (ABI 9700) 仪中进行。10  $\mu$ L PCR 反应体系包括: 模板 DNA 1  $\mu$ L (20 ng/ $\mu$ L)、正反向引物各 1  $\mu$ L (10 pmol/ $\mu$ L)、0.1  $\mu$ L *Taq* 酶 (5 U/ $\mu$ L, Takara)、1  $\mu$ L 10  $\times$  PCR buffer (Takara)、0.6  $\mu$ L  $MgCl_2$  (25  $\mu$ mol/ $\mu$ L, Takara)、0.8  $\mu$ L dNTPs (2.5  $\mu$ mol/ $\mu$ L, Takara), 用灭菌双蒸水补足至 10  $\mu$ L。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 35 个循环包括 94 $^{\circ}$ C、40 s, 引物特有的退火温度 40 s, 72 $^{\circ}$ C、1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min (表 1)。PCR 扩增产物检测: 在 1  $\times$  TBE 的电泳液中, 用 10% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶在 35W 下电泳 3 h, Ethidium bromide 染色, 再放入凝胶成像系统, 拍照并保存图片, 根据电泳结果显示条带位置的不同确定其基因型, 并用 pBR 322 DNA/*Msp* I marker (TIAN-GEN) 为对照。

### 1.3 数据统计分析

微卫星位点的有效等位基因数目及大小使用 QUANTITY ONE version 4.62 (Bio-Rad Lab) 进行分析。期望杂合度、观测杂合度、Hardy-Weinberg 平衡偏离程度 (P) 以及连锁不平衡 (LD) 等参数使用 POPGENE version 1.31 软件进行分析 (Yeh et al, 1999)。

Hardy-Weinberg 平衡偏离指数 (D) 按以下公式计算 (王长忠等, 2008):

$$D = (H_o - H_e) / H_e$$

多态信息含量按 Bostein 等 (1980) 的公式计算:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^m P_i^2 - \sum_{i=1}^{m-1} \sum_{j=i+1}^m 2P_i^2 \cdot P_j^2$$

其中:  $P_i$  和  $P_j$  分别为第  $i$  和第  $j$  个等位基因在群体中的频率,  $m$  为等位基因数。

## 2 结果

### 2.1 阳性克隆筛选

经蓝白初步筛选,挑取白色菌落,进行 LB 液体培养基培养。以菌液为模板,用 PCR 法快速鉴定微卫星序列的阳性克隆,挑选出片段大小在 80 ~ 600 bp 的克隆,送去测序,得到 69 个微卫星序列,其中有 17 个克隆序列重复或互补,故含有微卫星重复序列的不同克隆有 52 个。

### 2.2 微卫星标记筛选与多态性分析

采用 Primer 5.0 软件进行引物设计,共设计引物 19 对,利用 32 个中华倒刺鲃个体对这些引物的适用性进行了分析,其中 8 对引物扩增出了清晰并

且具有多态性的 PCR 产物(表 1),即获得了 8 个多态性位点。这 8 个位点共扩增出了 55 个等位基因,每个位点的等位基因数目为 4 ~ 10 个,平均等位基因数目是 6.8750;多态信息含量 0.6072 ~ 0.8515,平均为 0.7613。位点的观测杂合度 0.5625 ~ 1.0000,平均为 0.8983;期望杂合度 0.6791 ~ 0.8795,平均为 0.8049。Hardy-Weinberg 遗传偏离指数( $D$ )为 -0.2009 ~ 0.3805,位点 SSI-35 出现了杂合子缺失现象。卡方检验结果显示,有 3 个位点(SSI-01、SSI-16、SSI-24)在这个检测群体中不同程度地偏离了 Hardy-Weinberg 平衡( $P < 0.05$ )。8 个位点中无连锁不平衡现象。位点的引物序列、重复单元以及其它信息见表 1。

表 1 中华倒刺鲃 8 个微卫星位点及其特征

Tab. 1 Characterization of eight microsatellite loci in *S. sinensis*

| 位点     | 核心序列                                              | 引物序列                                                    | 观测等位基因 | 有效等位基因 | 产物大小/<br>bp | 多态信息含量 | 观测杂合度  | 期望杂合度  | 平衡偏离指数 $D$ | 平衡偏离程度 $P$ |
|--------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|--------|--------|-------------|--------|--------|--------|------------|------------|
|        |                                                   |                                                         | $N_a$  | $N_e$  |             | $PIC$  | $H_o$  | $H_e$  |            |            |
| SSI-01 | (AC) <sub>15</sub>                                | F: ACGGAGGCGTTTGTGTTGATA<br>R: CGCCAGCTAAAGCTGAAACA     | 4      | 3.0162 | 151 ~ 211   | 0.6072 | 0.9375 | 0.6791 | 0.3805     | 0.0163 *   |
| SSI-16 | (AC) <sub>14</sub>                                | F: CAGACACTGCTCTGTACAATGAAA<br>R: GAGAGTCCCGTAAACACACA  | 6      | 3.4653 | 102 ~ 158   | 0.6620 | 0.8438 | 0.7227 | 0.1676     | 0.0100 *   |
| SSI-18 | (GAAA) <sub>11</sub>                              | F: GCTTCGGATGTGTGTGCTAA<br>R: TTGACAGCCAAAAAGTTTACGA    | 8      | 7.0662 | 127 ~ 215   | 0.8421 | 1.0000 | 0.8726 | 0.1460     | 0.0815     |
| SSI-24 | (AAAG) <sub>11</sub><br>(CTTT) <sub>3</sub> (CTT) | F: TGTTCATCAAAAATCCTGAATGAA<br>R: AAAAAAGTGGCAACCTGCAAT | 10     | 7.4473 | 147 ~ 235   | 0.8515 | 1.0000 | 0.8795 | 0.1370     | 0.0419 *   |
| SSI-30 | (CTTT) <sub>3</sub><br>(CTTG)(CTTT) <sub>2</sub>  | F: TGGGCACAGAAAAGGAAAATC<br>R: TGGAAAATCAGTAAGCATCTCG   | 7      | 6.3854 | 173 ~ 251   | 0.8235 | 0.9677 | 0.8572 | 0.1289     | 0.1186     |
| SSI-31 | (GAAA) <sub>16</sub>                              | F: TTGCCCCACACACAACCTTTA<br>R: AAACAGGATGCACAACAGCA     | 9      | 6.9424 | 139 ~ 225   | 0.8412 | 0.9375 | 0.8695 | 0.0782     | 0.4923     |
| SSI-33 | (CTTT) <sub>8</sub>                               | F: CCAGGACCAGAATCGAAAAC<br>R: TAACCCCTTCAGTCCACACAC     | 7      | 6.3210 | 101 ~ 165   | 0.8216 | 0.9375 | 0.8552 | 0.0962     | 0.6178     |
| SSI-35 | (TACA) <sub>7</sub>                               | F: GTTCAGATGTTTGGGGCATC<br>R: CATTTGATCAACAATTCCAAGAA   | 4      | 3.2560 | 151 ~ 207   | 0.6409 | 0.5625 | 0.7039 | -0.2009    | 0.4737     |
| 平均     |                                                   |                                                         | 6.8750 | 5.4875 |             | 0.7613 | 0.8983 | 0.8049 | 0.1160     |            |

## 3 讨论

### 3.1 微卫星标记的获得途径

目前主要有 3 种途径获得微卫星标记。一是利用亲缘关系较近的物种筛选微卫星标记,此法省时、省力,已成为物种遗传分析的有力工具(马洪雨等,2006;鲁双庆等,2005a);二是从网上公开发表的基因组序列数据库资源中筛选微卫星,此法既简便迅速又能节省大量的时间和经费(匡刚桥等,2007)。前 2 种方法简便、快速且省时、省力、省经费,但对于大部分物种而言,其数量有限。因此,最根本、有效的途径是第 3 种途径,即通过基因组文库开发微卫

星标记,主要有经典方法、富集法和省略筛库法 3 种。经典方法操作简单,容易掌握,但开发标记的效率很低,花费的时间和经费也较多。鉴于经典法效率低的缺点,遂发展了富集法;富集法通过建立和筛选微卫星富集文库,显著提高了微卫星克隆的得率。(魏东旺等,2001;郝君等,2006;史方等,2009;熊美华等,2009;徐念等,2009;杨钟等,2009)。省略筛库法包括几种多位点微卫星标记分离法,可以提高有用微卫星序列的得率(孟清照等,2007)。

### 3.2 磁珠富集法

本研究采用的是第 3 种途径,基因组文库筛选微卫星标记方法中流行的磁珠富集法,其基本原理

是首先用生物素标记探针与基因组 DNA 酶切片段杂交, 再利用生物素与链亲和素亲和性强的特性, 用包被链亲和素的磁珠进行磁力吸附完成重复序列目标片段的富集。本研究通过磁珠富集法构建了中华倒刺鲃微卫星 DNA 文库, 筛选了多态性位点, 并对其特征进行了分析。实验共获得了 8 个具有多态性的微卫星位点, 分析了各位点的等位基因数、观测杂合度、期望杂合度、Hardy-Weinberg 平衡偏离指数、连锁不平衡等, 为进行中华倒刺鲃群体的遗传多样性分析提供了一定的基础。

### 3.3 位点的多态性程度

遗传标记的多态性程度及其应用价值一般可用杂合度 ( $H$ )、多态信息含量 ( $PIC$ ) 来衡量。根据 Bostein 等 (1980) 提出的衡量基因变异程度高低的多态信息含量指标, 当  $PIC > 0.5$  时, 该基因位点为高度多态位点; 当  $0.25 < PIC < 0.5$  时, 为中度多态位点; 当  $PIC < 0.25$  时, 则为低度多态位点。本实验结果显示, 所筛选的 8 个微卫星位点的多态信息含量 ( $PIC$ ) 均  $> 0.5$ , 为高度多态性, 在中华倒刺鲃群体遗传学研究领域中能提供确切的遗传信息。

### 3.4 位点的基因杂合度

基因杂合度表示群体在某位点杂合子的比例。Nei (1978) 将其视为度量群体遗传变异的一个最合适参数, 位点平均杂合度近似反映遗传结构变异程度高低; 杂合度越大, 表明群体的遗传变异越多, 群体遗传多样性越高, 对环境适应能力越强。本研究中, 中华倒刺鲃群体平均杂合度即平均期望杂合度 ( $H_e$ ) 为 0.8049, 平均观测杂合度 ( $H_o$ ) 为 0.8983, 说明该群体遗传多样性较高。位点 SSI-16、SSI-18、SSI-24、SSI-30、SSI-31、SSI-33 的杂合度  $\geq 0.7$ , 依据 Gill (1996) 提出的杂合度  $\geq 0.7$  的基因座具有高鉴别力的标准, 表明这 6 个位点的杂合度已经达到高度多态性遗传标记位点指标。

### 3.5 Hardy-Weinberg 遗传偏离指数

Hardy-Weinberg 遗传偏离指数 ( $D$ ) 反映了  $H_o$  和  $H_e$  之间的平衡关系,  $D$  值越接近 0, 基因型的分布越接近于平衡状态,  $D$  值为正时反映杂合子过剩,  $D$  值为负时则处于杂合子缺失状态 (李鹏飞等, 2006)。本研究中,  $D$  值变化范围为  $-0.2009 \sim 0.3805$ , 位点 SSI-35 出现了杂合子缺失, 其它位点均出现杂合子过剩现象。杂合子过剩现象一般出现在研究对象为相对小的群体或者封闭群体, 如一个养殖群体里面的子代群体是由有限的亲本所产生, 创造者效应 (Founder effect) 和瓶颈效应 (Bottleneck

effect) 会导致连锁不平衡现象 (刘云国等, 2005), 从而导致杂合子过剩。杂合子缺失除了与无效基因和研究样本范围大小有关外, 还可能由种群退化、性别比例不平衡、亲缘近交和人为干扰程度大等导致稀有碱基的丢失所致 (Antoro et al, 2006)。

### 3.6 Hardy-Weinberg 平衡程度检验

用卡方检验 Hardy-Weinberg 平衡程度 ( $P$ ) 的结果表明, 检测群体中有 3 个位点 (SSI-01、SSI-16、SSI-24) 不同程度地偏离了平衡。由于检测样本数有限, 因此不能明确地判断出偏离平衡的原因, 对于这 3 个位点的适用性需要更进一步的检测。

从以上遗传指标的分析可以看出, 本文所获得的 8 个微卫星位点均具有较高的多态性水平, 其中 6 对达到了高鉴别力的标准, 这为中华倒刺鲃种群的遗传分析等提供了良好的分子标记, 且 SSI-18、SSI-30、SSI-31、SSI-33、SSI-35 符合 Hardy-Weinberg 平衡的位点为优先选择应用的位点。

志谢: 非常感谢张轶超、杨志、朱迪、陶江平、冯瑞萍、王翔、万力、郑海涛、蔡玉鹏等同志为本实验提供的帮助。

### 参考文献

- 蔡焰值, 何长仁, 蔡烨强, 等. 2003. 中华倒刺鲃生物学初步研究[J]. 淡水渔业, 33(3): 16-18.
- 杜长斌, 孙孝文, 楼允东, 等. 2000. 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, 13(1): 68-73.
- 郝君, 孙效文, 梁利群, 等. 2006. 大黄鱼微卫星标记的富集与筛选[J]. 中国水产科学, 13(5): 762-766.
- 匡刚桥, 刘臻, 鲁双庆, 等. 2007. 鳊鱼基因组 (AC)。微卫星富集文库的构建与鉴定[J]. 长沙大学学报, 21(2): 20-22.
- 李鹏飞, 刘萍, 柳学周, 等. 2006. 漠斑牙鲆引进种群同工酶的遗传多态性分析[J]. 中国水产科学, 13(1): 13-19.
- 李萍, 王宝森. 2008. 中华倒刺鲃[J]. 生物学通报, 43(8): 17-18.
- 刘云国, 陈松林, 李八方. 2005. 牙鲆养殖群体遗传变异的微卫星标记研究[J]. 海洋水产研究, 26(5): 28-32.
- 鲁双庆, 刘少军, 刘臻, 等. 2005. 黄颡鱼微卫星引物筛选及其在保护遗传学上的应用[J]. 水产学报, 29(5): 612-618.
- 马洪雨, 姜运良, 郭金峰, 等. 2006. 利用微卫星标记分析东平湖黄颡鱼的遗传多样性[J]. 激光生物学报, 15(2): 136-139.
- 孟清照, 李仕金, 董转年, 等. 2007. SSR 引物开发方法概述

- [J]. 大众科技, (12): 106, 116 – 117.
- 史方, 徐念, 熊美华, 等. 2009. 利用微卫星标记评估乌江彭水水电站对泉水鱼的遗传多样性影响[J]. 水生态学杂志, 2(2): 117 – 121.
- 王长忠, 梁宏伟, 邹桂伟, 等. 2008. 长江中上游两个鲢群体遗传变异的微卫星分析[J]. 遗传, 30(10): 1341 – 1348.
- 魏东旺, 楼允东, 孙效文, 等. 2001. 鲤鱼微卫星分子标记的筛选[J]. 动物学研究, 22(3): 238 – 241.
- 熊美华, 史方, 徐念, 等. 2009. 微卫星标记分析乌江流域白甲鱼群体的遗传多样性[J]. 水生态学杂志, 2(2): 122 – 125.
- 徐念, 史方, 熊美华, 等. 2009. 三峡库区长鳍吻鮡种群遗传多样性的初步研究[J]. 水生态学杂志, 2(2): 113 – 116.
- 晏鹏, 吴孝兵, 史燕, 等. 2003. 微卫星多态性检测技术及其在保护遗传学中的应用[J]. 应用生态学报, 14(3): 461 – 464.
- 杨钟, 史方, 阙延福, 等. 2009. 胭脂鱼微卫星富集文库的构建及其应用前景展望[J]. 水生态学杂志, 2(2): 107 – 111.
- 张新宇, 高燕宁. 2004. PCR引物设计及软件使用技巧[J]. 生物信息学, (4): 15 – 18.
- Aljanabi S M, Martinez I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques [J]. Nucleic Acids Research, 25 (22): 4692 – 4693.
- Antoro S, Na-Nakorn U, Koedprang W. 2006. Study of genetic diversity of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, from Thailand and Indonesia using microsatellite markers [J]. Mar Biotechnol (NY), 8(1): 17 – 26.
- Benson G. 1999. Tandem Repeats Finder: a program to analyze DNA sequences [J]. Nucleic Acid Research, 27: 573 – 580.
- Bostein D, White R L, Skolnick M, et al. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. American Journal of Human Genetics, 32(3): 314 – 331.
- Gill P. 1996. A new method of STR interpretation using inferential logic development of a criminal intelligence database [J]. Int Leg Med, 109(1): 14 – 22.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individual [J]. Genetics, 89: 583 – 590.
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Yeh F C, Yang R C, Boyle T. 1999. Popgene Version 1.31, Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis [CP]. Edmonton: University of Alberta and Centre for International Forestry Research.

(责任编辑 万月华)

## Isolation and Characterization of Microsatellite Loci in *Spinibarbus sinensis* (Bleeker)

XIONG Mei-hua, SHI Fang, XU Nian, QUE Yan-fu, YANG Zhong, HU Ju-xiang, ZHU Bin

(Institute of Hydroecology, Ministry of Water Resources and Chinese Academy of Sciences, Wuhan Hubei 430079, China)

**Abstract:** The microsatellite markers of *Spinibarbus sinensis* were isolated in this study. A library of partial small size fractionated genomic DNA was constructed with the *S. sinensis* in Wujiang river. Eight microsatellite loci were isolated and characterized. These loci showed high levels of genetic polymorphism testing on 32 individuals sampled from Wujiang river. The number of alleles per locus ranged from 4 to 10. PIC changed from 0.6072 to 0.8515. The observed ( $H_o$ ) and expected ( $H_e$ ) heterozygosities were 0.5625 to 1.0000 and 0.6791 to 0.8795, respectively. Hardy-Weinberg departure value ( $D$ ) ranged from -0.2009 to 0.3805. The Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) analysis showed that 3 loci deviated from genetic equilibrium significantly ( $P < 0.05$ ). No linkage disequilibrium was found.

**Key words:** *Spinibarbus sinensis*; enriched genomic library; microsatellite; polymorphism