

企鹅珍珠贝微卫星分子标记的筛选

许友卿¹, 肖群平¹, 陈秀荔², 彭 敏², 蒋伟明², 李咏梅², 丁兆坤¹

(1. 广西大学水产科学研究所, 广西 南宁 530004; 2. 广西壮族自治区水产研究所, 广西 南宁 530021)

摘要: 运用生物素与链霉亲和素的强亲和性原理, 用生物素-磁珠吸附微卫星富集法, 筛选企鹅珍珠贝 (*Pteria penguin*) 的微卫星分子标记序列, 进而对南海区企鹅珍珠贝的遗传多样性进行分析。对 136 个菌落中的 85 个阳性克隆进行微卫星测序, 获得 64 个序列, 达到 85.93%。所得到的 55 个重复 6 次以上的微卫星序列中, 除生物素探针中使用的 CA 重复外, 还得到 TG、TC、GA 的重复序列。重复序列中完美型 36 个, 占 65.5%; 不完美型 14 个, 占 25.5%; 混合型 5 个, 占 9.1%。利用 Primer Premier 5.0 设计引物 40 对, 合成其中的 20 对并进行 PCR 筛选, 15 对可扩增出特异性条带。研究表明, 筛选出的企鹅珍珠贝微卫星分子标记可用于进一步的遗传多样性分析。

关键词: 磁珠富集法; 微卫星; 企鹅珍珠贝

中图分类号: Q503 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-3075(2011)03-0088-06

企鹅珍珠贝 (*Pteria penguin*) 是我国培育大型海水附壳珍珠和正圆珍珠中最有潜力的珠母贝种之一, 因其个体大、生命力强、外套膜分泌珍珠机能旺盛, 壳内所产生的珍珠大而圆、色泽特殊、商品价值甚高; 加之企鹅珍珠贝的肉味鲜美、营养丰富, 珍珠层区厚大, 可做珍珠粉、珍珠化妆品、贝雕及工艺品的原材料, 也具有清热解毒的药用, 因此, 企鹅珍珠贝是一种重要的经济贝类 (黄桂菊等, 2008; 徐宗芹等, 2009)。在我国, 企鹅珍珠贝主要分布于海南、广东大亚湾、广西涠洲岛和台湾西南等地 (顾志峰等, 2009; 栗志民等, 2009)。

微卫星 (microsatellites) 是 20 世纪 80 年代发展起来的遗传标记 (genetic marker) 方法, 微卫星存在于大多数生物的基因组中, 而且单位的重复次数在个体间呈高度变异性, 数量丰富, 因此微卫星标记已广泛应用于遗传杂交育种、绘制染色体遗传图谱、鉴定亲缘关系、遗传多样性估计、标记辅助选择、种质资源保护、数量性状定性、微卫星 DNA 指纹库的建立以及遗传监测等领域 (Meehan et al, 2003; Roose-Amsaleg et al, 2006)。刘丽等 (2008) 用筛选出的微卫星 DNA 对青石斑鱼进行了群体遗传多样性分析,

所得的 26 个微卫星引物均可尝试性地用于其他石斑鱼微卫星多态性、遗传多样性和种群进化等研究, 为种质资源保护提供理论依据; Xian 等 (2009) 用微卫星 DNA 研究了 7 个地理种群的中国对虾遗传多样性; 郭昱嵩等 (2010) 对 9 种常见笛鲷微卫星位点进行筛选和遗传多样性分析, 发现目前笛鲷属鱼类存在较高水平的遗传多样性。相对鱼虾来说, 微卫星分子标记在企鹅珍珠贝的研究与应用远远滞后, 仅有虾夷扇贝和马氏珠母贝分离的微卫星标记, 远不能表明企鹅珍珠贝的遗传多样性 (赵莹莹等, 2006; 佟广香等, 2007)。因此, 筛选更多独立分离的、多态性丰富的企鹅珍珠贝微卫星分子标记, 对于研究其遗传多样性尤显重要。运用生物素与链亲和素的强亲和性原理, 把生物素标记重复序列的探针与酶切的 DNA 片段杂交, 用生物素-磁珠吸附重复序列, 富集重复序列目标片段的方法 (孙效文等, 2005; 全迎春等, 2006; Zane et al, 2002), 不仅获得的微卫星序列多, 而且降低微卫星分子标记分离的成本。本文报道了应用微卫星分子标记的生物素-磁珠富集法筛选企鹅珍珠贝, 提高了筛选效率, 并可能进一步获得到具有多态性的微卫星序列。

1 材料与方法

1.1 微卫星基因组文库的构建和克隆测序

1.1.1 提取 DNA 企鹅珍珠贝样品采自广西涠洲岛, 去壳后称取闭壳肌 100 mg 于 2 mL 离心管中, 加入 500 μ L DNA 提取缓冲液 [100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0); 100 mmol/L EDTA (pH 8.0); 2% SDS], 剪碎后加入 10 μ L 的 20 mg/mL 蛋白酶 K (终浓度

收稿日期: 2010-12-31

基金项目: 国家科技支撑项目 (2007BAD29B03-5); NSFC-RSE 国际合作项目 (30711130272)。

通讯作者: 李咏梅, 女, 研究员, 主要从事水产动物遗传育种研究。E-mail: annia219@yahoo.com.cn

作者简介: 许友卿, 女, 1956 年生, 教授, 博士, 主要从事水产动物营养、生理生化和分子生物学研究。E-mail: youqing.xu@hotmail.com

400 $\mu\text{g/mL}$),充分混匀后放入 56℃ 水浴锅中温浴 5~6 h;再加入 100 μL 的饱和 KCl 溶液,充分颠倒混匀,于室温 12 000 g 离心 10 min,小心取上清液至另一个 1.5 mL 离心管中,加入等体积的酚、氯仿、异戊醇混合液(体积比 25: 24: 1)抽提 2 次,取上清液,再加入等体积的预冷异丙醇沉淀, - 80℃ 放置 15 min,于室温 12 000 g 离心 10 min,弃上清液,用 70% 的酒精洗涤沉淀 2 次,待其干燥后,加 100 μL 的 ddH₂O 溶解沉淀。

1.1.2 DNA 纯化 在 ddH₂O 溶解的沉淀中加入 200 μL DNA 纯化液 I [2% CTAB; 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0); 50 mmol/L EDTA (pH 8.0); 1.4 mol/L NaCl],置于 65℃ 水浴中充分溶解沉淀;加入 600 μL DNA 纯化液 II [(2% CTAB; 25 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0); 25 mmol/L EDTA (pH 8.0)],颠倒混匀后,放在染色摇床上低速摇 30~60 min。于室温 10 000 g 离心 5 min,弃上清液,沉淀溶于 100 μL 的 1.4 mol/L NaCl,加入 380 μL 无水乙醇,颠倒混匀后冰浴 15 min,于室温 12 000 g 离心 10 min,70% 乙醇洗涤沉淀 2~3 次。自然干燥后,加入 100 μL 灭菌 ddH₂O 和 1 μL 的 10 mg/mL 胰 RNA 酶,37℃ 水浴 30 min。

1.1.3 酶切与回收 取约 150 μg 总 DNA,用限制性内切酶 Sau 3AI 进行不完全酶切 5~6 h,酶切片段主要集中在 250~750 bp,利用凝胶回收试剂盒(北京天根生物科技有限公司)回收其 DNA 片段,并用 TE 溶解,凝胶成像系统观察,回收成功后备用。

1.1.4 制备接头及连接 本试验采用布朗接头,并由上海生工生物工程技术有限公司合成,浓度均为 50 $\mu\text{mol/L}$ 的寡核苷酸链 A (5'-GATCGTCGACGGTACCGAATTCT-3')和寡核苷酸链 B (5'-GTCAAGAATTCGGTACCGTCCGAC-3')。用 A 和 B 等比例混合 2 条链,每组的终浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ 。95℃ 变性 10 min,经 4 h 缓慢冷却至 10℃,该退火过程以期形成带有限制性酶切位点(Sau3AI,SalI,EcoRI)的双链接头:

5' GATCGTCGACGGTACCGAATTCT A

3' CAGCTGCCATGGCTTAAGAACTG B

建立 20 μL 的连接体系:10 μL 的 25 $\mu\text{mol/L}$ 接头,6U 的 T₄ DNA ligase,2 μL 的 10× Buffer,4 μL 的纯化酶切片段,用无菌水补足体积至 20 μL ;于 16℃ 连接过夜。连接完毕,100 kD 旋离柱(PALL FILTRON 公司)除去多余的接头,电泳检测,最终用

真空冷冻干燥机(德国 Christ)浓缩至 15 μL 。

1.1.5 构建基因组 PCR 文库 取 4 μL 连有接头的 DNA 片段作为模版,Primer B 为引物,建立 25 μL PCR 反应体系,建立基因组文库。反应程序为:94℃ 预变性 3 min,94℃、1 min,58℃、1 min,72℃、1.5 min,28 个循环;72℃、10 min。反应结束后,通过旋离柱除去多余的引物 and 没有参加反应的 dNTP,浓缩至 15 μL 。

1.1.6 构建微卫星文库

1.1.6.1 杂交 建立 50 μL 反应体系:1.5 μL (10 mol/L) 探针生物素标记的 (CA)₁₅, 5 μL (50 $\mu\text{mol/L}$) Primer B,15 μL 的 20× SSC,0.5 μL 的 10% SDS,18 μL 的 ddH₂O 混合,68℃ 预热。将 10 μL DNA (300 ng) 95℃ 变性 5 min,加入预热的杂交混合液,68℃ 杂交 1 h。杂交过程中平衡磁珠。

1.1.6.2 磁珠的平衡 将磁珠轻轻摇匀,吸出 100 μL 至 1.5 mL 的硅化离心管中,放在磁力架上 1~2 min,轻轻吸出盐溶液。用 200 μL 的 B & W 洗液(10 mmol/L Tris-HCl,1 mmol/L EDTA 和 2 mol/L NaCl)洗涤 2 次,再用 200 μL 洗液 I (6× SSC,0.1% SDS)反复洗涤平衡,直至磁珠变得容易从管壁上滑落到管底且容易洗脱为止。注意洗涤过程中,应小心吹打,防止产生过多的气泡而影响试验结果;最后加入 150 μL 洗液 I,室温放置至杂交完毕。

1.1.6.3 富集及捕获含有微卫星序列的单链 DNA

将磁珠于 25℃ 温育 20~30 min,轻轻摇动(防止磁珠沉淀)以使生物素和链霉亲和素结合,然后将离心管放置于磁力架上洗涤。于室温用洗液 I 洗 2 次,每次静置 10 min,洗液 II (3× SSC,0.1% SDS) 在 68℃ 洗 2 次,每次静置 15 min,洗液 III (6× SSC) 室温快速洗 2 次,基本可将不含微卫星的序列除去,然后用 200 μL 的 0.1× TE 室温快速洗 2 次。离心管中加入 50 μL 的 0.1× TE,95℃ 变性 10 min,然后放在磁力架上快速吸出上清液。

1.1.7 PCR 扩增 用前述反应体系,2 μL 单链 DNA 作为模版,进行第 2 次 PCR。反应完毕,通过旋离柱除去多余引物和底物,电泳检测。

1.1.8 连接与克隆 10 μL 连接体系:5 μL 的 2× 连接酶缓冲液,1 μL 的 PGEM-T vector,3 μL 插入 DNA 片段,1 μL 的 T₄ DNA 连接酶(5 U/ μL),同时 T 载体自身连接作为对照,16℃ 连接过夜。用 DH5 α 感受态大肠杆菌(购自北京天根生化科技有限公司)进行转化。

1.1.9 蓝白斑筛选 预先涂好 40 μL 的 X-gal 和

7 μ L 的 IPTG 的混合液,于每个 LB 固体培养皿上,37℃倒置培养 40 min,待其干燥后,涂上转化后的菌液,37℃过夜培养。挑取白色菌落加入 LB 液体培养基(含氨苄青霉素)中,37℃摇菌 10 h。

1.1.10 PCR 检测菌液 取 1 μ L 菌液作为模板,建立 10 μ L 体系,进行 PCR 扩增,进一步筛选阳性克隆,PCR 程序如下:94℃、5 min,94℃、1 min,58℃、1 min,72℃、1.5 min,35 个循环;72℃、10 min,4℃、15 min。凝胶成像系统观察,菌液送至深圳华大基因科技有限公司测序。

1.2 序列分析与引物设计和筛选

经筛选的阳性克隆部分被送测序,测得的序列在除去载体序列后,分析微卫星序列,重复次数均约 10 次,说明不需要再进行第 2 次原位杂交筛选,则将剩下所有的菌液送去测序,把获得的微卫星序列在其侧翼序列采用 Premier Primer 5.0 软件设计引物。以 6 只企鹅珍珠贝的基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,筛选出能扩出目的片段的引物。

2 结果

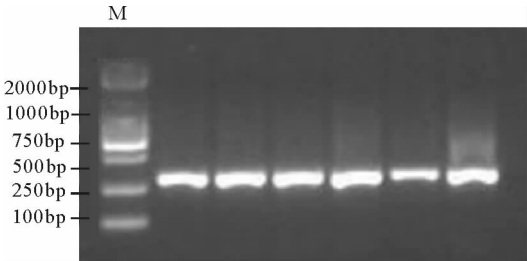
2.1 克隆与测序

对 85 个阳性克隆进行测序,获得 64 个序列,达到 85.93%。共得到 55 个重复次数在 6 次以上的微卫星序列,除生物素探针中使用的 CA 重复外,还得到 TG、TC、GA 的重复序列。企鹅珍珠贝微卫星的重复次数集中在 10 ~ 50 次,最高重复为 83 次。根据 Weber(1990)提出的标准,将企鹅珍珠贝的微卫星序列分为完美型(perfect)、非完美型(imperfect)和混合型(compound);其中,完美型 36 个,占

65.5%;非完美型 14 个,占 25.5%;混合型 5 个,占 9.1%。

2.2 引物设计与扩增

采用 Premier Primer 5.0 软件进行引物设计,共设计引物 40 对,采用常规 PCR 对合成的 20 对引物进行筛选,有 15 对引物扩增出目的片段,可以用于企鹅珍珠贝的遗传学分析,图 1 是 QEB-D15 引物对企鹅珍珠贝基因组 DNA PCR 扩增电泳结果,此引物扩增出的片段大小为 263 bp,序列合成及筛选结果见表 1。图 2 为企鹅珍珠贝 C54 序列(GT)₂₈及侧翼序列的测序峰图。



(M:Maker DL2000)

图 1 利用微卫星引物 QEB-D15 PCR 扩增 6 个企鹅珍珠贝基因组 DNA 的电泳结果

(M:Maker DL2000)

Fig.1 Electrophoretogram of six *Pteria penguin* genomic DNA amplified by PCR and QEB-D15

3 讨论

3.1 生物素-磁珠富集法与微卫星制备

本试验采用了生物素-磁珠富集法进行微卫星筛选,应用了人工接头及相应的引物,增加了捕获微卫星的特异性,从 136 个菌落中挑选出 85 个阳性克

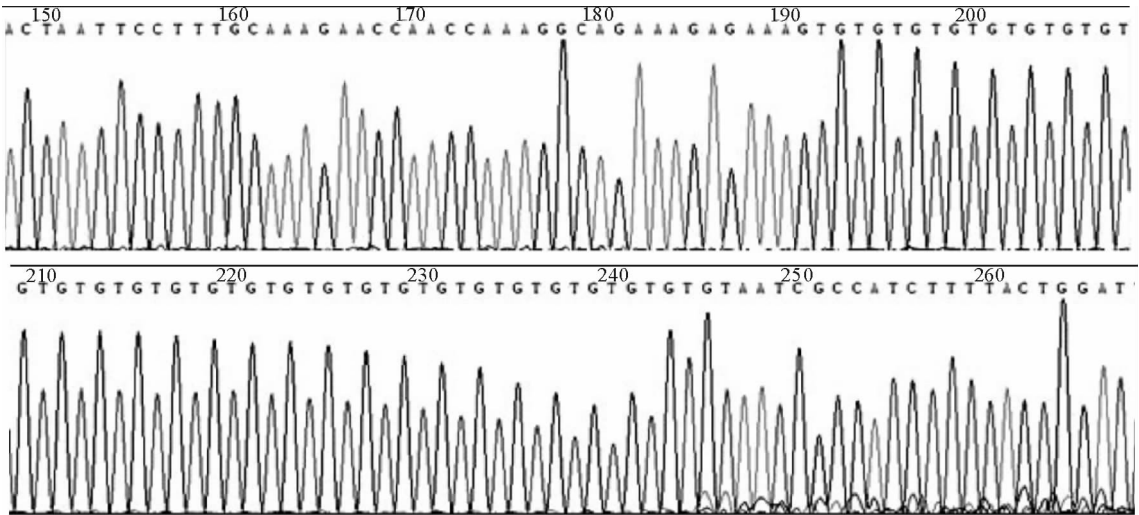


图 2 企鹅珍珠贝 C54 序列(GT)₂₈及侧翼序列

Fig.2 (GT)₂₈ repeating sequence and flank sequence of C54 in *Pteria penguin*

表 1 企鵝珍珠贝微卫星分子标记及其引物
Tab.1 Microsatellite markers and their primers in *Pteria penguin*

微卫星标记	引物序列 5'-3'	序列大小/bp	重复序列	退火温度/℃	GenBank 号
QEB-C52	F: AGGGCATTTCTTTGGTATT R: TTTTATGTTCACTGCGAGGT	284	(AC) ₈	60	JF799839
QEB-D50	F: ATGTGTTATCCAGTCTGTCACT R: ATACAAAGCATTCTCAAGGC	384	(TG) ₁₈	60	JF799840
QEB-C38	F: AATACTTAAC TTGCTGGCAGCC R: TAATACTAAGTCGCCCTACCG	147	(TG) ₂₉	60	JF799841
QEB-C65	F: AAAAATCAATAGG GTACATCC R: CGTTACAAC TTCCGGCATT	196	(AG) ₁₂ (TG) ₁₇	54	JF799842
QEB-D15	F: CTGGCAGCCTGAAAGACA R: ATGGCATCAAGCCTCGTC	263	(GT) ₂₉	58	JF799843
QEB-C67	F: TCTTGACAGGTGCCGTTAG R: CAAGAGGGATGGTAAATGCT	167	(TG) ₃₅	58	JF799844
QEB-D18	F: GTTATCCAGTCTGTC ACTGTGT R: TTA CTGCCATTTTCTCCC	191	(TG) ₁₃	58	JF799845
QEB-A13	F: ATGATGATTCGTGGGTGT R: ATCGCTATGATGACTCGTGT	353	(TG) ₂₀ (AC) ₈₃	54	JF799846
QEB-A33	F: CCACGGAACCATAGATTGC R: TGGCTAGGTTTGGGCAGA	498	(TG) ₃₀	52	JF799847
QEB-B68	F: GCGTTTGT TTTGATGTATGTG R: GACGATCTTTAACGTGCC	303	(TG) ₂₂	58	JF799848
QEB-C53	F: CGTGT TATGGTGAATGTGT R: TCCGTTGTAAGAAATGAAT	121	(TG) ₂₅	54	JF799849
QEB-C12	F: GTGTTCCCTGTTTATCATTAT R: CACGACTAATGGGCAGTT	202	(TG) ₂₉	56	JF799850
QEB-C13	F: GTTGGCAGCCCGAAAGAC R: GCCGTGCTAAGAAGAGTGG	228	(GT) ₁₆ (GT) ₇	56	JF799851
QEB-D69	F: TGCTTTTGTGTGAGTGGT R: TTAAGGCTGTTTTCGATGTA	292	(GT) ₁₁	54	JF799852
QEB-C54	F: AACCAAAGGCAGAAAGAG R: CTAATACGGCAAATTCACAT	209	(GT) ₂₈	52	JF799853

注: F - 正向引物; R - 反向引物。
Notes: F - forward primer; R - reverse primer.

隆进行测序,成功测序 64 个,微卫星含量达到 85.93%;与其他学者利用同样方法获得的微卫星序列的比例相似。全迎春等(2006)利用磁珠富集法制备大口鲶微卫星分子标记,从 593 个阳性克隆中选取 178 个测序,微卫星含量达 97.19%;孙效文等(2005a)用同样的方法制备草鱼微卫星分子标记时获得阳性克隆 132 个,86.36% 含有微卫星序列;郝君等(2006)在建立大黄鱼微卫星文库时,71.9% 含有微卫星序列;孙效文等(2005b)将经典的小片段克隆法和磁珠富集法进行了对比,利用 2 种方法筛选鲤的微卫星,结果前一种方法得到的克隆库中筛选出 2 000 个菌落,获得的阳性克隆 45 个,有 22 个含有微卫星序列;后一种方法得到的克隆库中筛选出 2 600 个菌落,获得阳性克隆 1 300 个,选取其中 390 个测序,314 个含有微卫星序列。证明生物素-磁珠富集法克隆微卫星效率较高,是一种比较好的微卫星制备方法。

3.2 微卫星的重复次数分析

微卫星序列重复次数的增加或者减少受其核心序列突变率的影响,核心序列的突变率一般为 10⁻⁵~10⁻³。Weber(1990)认为,只有双碱基重复序列的重复次数大于 12 时,微卫星的多态信息含量(PIC)才较高,如果 PIC 值提高到 0.5 以上,那么微卫星的重复次数将大于或等于 16,这样才能进行相应的多态性分析;Smulders 等(1997)认为重复次数多的微卫星,既能在种间又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。本次研究发现,企鵝珍珠贝微卫星的重复次数多集中在 10~50 次,最高重复为 83 次;这可能由于在富集过程中多次洗涤磁珠,不可避免的将一些重复次数低的微卫星序列洗掉,获得微卫星重复次数较多,序列较长,给引物设计造成了一定的困难。所以利用生物素-磁珠法富集微卫星序列需要设计出高质量的引物才能在基因组中调取出微卫星序列。

3.3 企鹅珍珠贝种质资源的保护

企鹅珍珠贝为我国沿海省份培育的大型海水附壳珍珠和正圆珍珠最有潜力珠母贝种的主要育珠品种(顾志峰等,2009;栗志民等,2009),但是国内对其遗传多样性的研究较少。直到21世纪,余祥勇等(2004)采用垂直板状聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳分离技术,对企鹅珍珠贝不同组织的6种同工酶酶谱特征及其遗传控制进行了研究,共检测到16个位点具有多态性;王小玉(2006)用随机扩增多态性DNA标记(random amplified polymorphic DNA, RAPD)方法研究了企鹅珍珠贝的遗传多样性。而利用微卫星等重复性高和共显性比例高的分子标记方法研究企鹅珍珠贝的遗传多样性更能准确和精细。大多数微卫星位于基因间隔区,并且少数能改变基因信息。微卫星对基因调控、转录和蛋白质功能性的影响通常取决于重复的次数;同时,增加或减少重复单位的变化是频繁和可逆的。因此,微卫星DNA提供了一个丰富的定量和定性变化的资源。在过去的10年中,研究人员发现这种自发的突变已经被自然和人工选择,并利用其来调节基因功能。Kashi & King (2006)认为,微卫星DNA由于具有特殊突变和功能性质的优点,在产生遗传变异基本适应性进化中扮演重要角色。研究得到的微卫星标记可用来进行企鹅珍珠贝不同地理种群的遗传学分析和多样性分析,进而利用分子标记的方法对其养殖群体种质资源的性状、亲缘关系及种质衰退情况进行有效的鉴定,同时也为遗传育种和种苗放流等提供试验依据,实现企鹅珍珠贝的种质资源信息化管理与可持续利用。

参考文献

顾志峰,王清印,方建光,等.2009.企鹅珍珠贝(*Pteria pen-guin*)在海南黎安港的生长特征[J].海洋与湖沼,40(4):423-429.

郭昱嵩,王中铎,刘楚吾,等.2010.9种常见笛鲷微卫星位点筛选与遗传多样性分析[J].热带海洋学报,29(3):82-86.

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.

黄桂菊,喻达辉,曲妮妮,等.2008.企鹅珍珠贝热休克蛋白70基因的克隆与序列比较分析[J].热带海洋学报,27(1):46-51.

栗志民,刘志刚,谢丽企,等.2009.鹅珍珠贝耗氧率和排氨率的研究[J].海洋学报,31(6):130-135.

刘丽,刘楚吾,郭昱嵩,等.2008.青石斑鱼微卫星DNA标记的筛选及群体遗传多样性分析[J].中国水产科学,15(1):22-28.

全迎春,孙效文,刘伟,等.2006.磁珠富集法制备大口鲶的微卫星分子标记[J].水产学报,30(2):185-191.

孙效文,鲁翠云,梁利群.2005a.磁珠富集法分离草鱼微卫星分子标记[J].水产学报,29(4):482-486.

孙效文,贾智英,魏东旺,等.2005b.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,12(2):126-132.

佟广香,闫学春,匡友谊.2007.马氏珠母贝微卫星快速分离及遗传多样性分析[J].海洋学报,29(4):171-176.

王小玉.2006.海水珍珠贝分子标记分析及遗传图谱构建[D].武汉:华中农业大学.

徐宗芹,王梅芳,梁飞龙,等.2009.企鹅珍珠贝生殖细胞的发生[J].广东海洋大学学报,29(6):32-35.

余祥勇,王梅芳,刘永,等.2004.企鹅珍珠贝同工酶酶谱特征及其遗传分析[J].水产学报,28(4):375-383.

赵莹莹,朱晓琛,孙效文,等.2006.磁珠富集法筛选虾夷扇贝微卫星序列[J].中国水产科学,13(5):749-754.

Kashi Y, King D G. 2006. Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution[J]. Trends in Genetics, 22(5): 253-259.

Meehan D, Xu Z K, Zuniga G, et al. 2003. High Frequency and Large Number of Polymorphic Microsatellites in Cultured Shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* [Crustacea: Decapoda][J]. Marine Biotechnology, 5(4): 311-330.

Orit G, Pearse D E, Avise J. 1997. Phylogenetic assessment of length variation at a microsatellite locus[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 94: 10745-10749.

Roose-Amsaleg C, Cariou-Pham E, Vautrin D, et al. 2006. Polymorphic microsatellite loci in *Linum usitatissimum*[J]. Mol Ecol Notes, 6: 796-799.

Smulders M J M, Bredenaaijer G, Rus-Kortekaas W, et al. 1997. Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum*/L cL-tivars and accessions of other *Lycopersicon* species[J]. Theor Appl Genet, 97: 264-272.

Weber J L. 1990. Informativeness of human (dC-dA)n-(dG-dT)n polymorphisms[J]. Genomics, 7: 524-530.

Meng X H, Wang Q Y, Jang I K, et al. 2009. Genetic differentiation in seven geographic populations of the fleshy shrimp *Penaeus (Fenneropenaeus) chinensis* based on microsatellite DNA[J]. Aquaculture, 287: 46-51.

Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: A review[J]. Mol Ecol, 11: 1-16.

(责任编辑 万月华)

Screening Microsatellite Primer Sequences *Pteria penguin*

XU You-qing¹, XIAO Qun-ping¹, CHEN Xiu-li², PENG Min²,
JIANG Wei-ming², LI Yong-mei², DING Zhao-kun¹

(1. Institute for Fishery Sciences, Guangxi University, Nanning 530004, China;

2. Guangxi Institute of Fisheries, Nanning 530021, China)

Abstract: Using the principle of the strong affinity between biotin and streptomycin, an experiment was conducted to screen microsatellite primer sequences and then to analyze the genetic diversity of *Pteria penguin* in Nanhai District. Through assaying the microsatellite sequence of the 85 positive clones among the 136 bacterial colonies, there were 65 succeeded, the percentage was 85.93%. Fifty-five microsatellite sequences that the repetition were more 6 times, the repeat sequence included not only CA, but also TG, TC and GA. Among the microsatellites, 36 repeating motifs were perfect, occupying 65.5%; 14 repeating motifs were imperfect, occupying 25.5%; 5 repeating motifs were compound, occupying 9.1%. Forty pairs of primers were designed using the software Primer Premier 5.0, then 20 pairs of primers were successfully composed and screened by PCR, 15 pairs of primers could be successfully amplified the special band. The conclusion was that the screened microsatellite molecular marker could be used to analyze the genetic diversity in *Pteria penguin*.

Key words: enrichment by magnetic beads; microsatellite; *Pteria penguin*