微卫星位点 AciG-35 在中华鲟野生个体中不同等位基因的序列变异研究

邵 科,史 方,闫书祥,徐 念,朱 滨

(水利部中国科学院水工程生态研究所,水利部水工程生态效应与生态修复重点实验室,武汉 430079)

摘要:本研究利用 PCR 扩增和序列测定得到了 1 个特殊 4 碱基重复微卫星位点 AciG-35 在中华鲟野生个体中的 34 个等位基因序列。根据序列测定的结果,初步研究了该位点的核心重复区序列以及两端侧翼序列的变异情况。该位点不同等位基因的核心序列和侧翼序列都表现出一定程度的变异,其中核心重复序列主要表现为点突变,侧翼序列主要表现为各种碱基的替换、插入和缺失以及片段的插入缺失。此外,还发现了 AciG-35 引物在中华鲟中的多位点扩增现象。研究结果对于准确解释微卫星分子标记用于群体遗传分析时的数据结果具有重要意义,对在微卫星标记的应用过程中可能存在的一些问题一并进行了探讨。

关键词:中华鲟;微卫星位点;等位基因;变异

中图分类号:Q754,S965.215 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2014)01-0001-06

微卫星标记具有共显性、丰富的多态性、相对简单的遗传方式以及低廉的成本,已逐渐成为分子生态学的研究热点,在遗传多样性的维持与濒危物种的保护中得到了广泛的运用(杨钟等,2010;熊美华等,2013)。随着微卫星分子标记技术的成熟,已经逐渐应用到中华鲟(*Acipenser sinensis*)的保护遗传学研究中。如朱滨等(1999)首次将微卫星分子标记用于中华鲟的亲子关系分析。邵昭君等(2002)从铲鲟(*Scaphirhynchus platorynchus* Rafinesque)的 108 对微卫星引物中选择了 21 对引物对中华鲟基因组 DNA 进行 PCR 扩增和优化设计,获得了对中华鲟具有高度特异性的微卫星引物。Zhu 等(2002)利用湖鲟(*Acipenser fulvescens*)的 3 个多态性较高的微卫星位点以及铲鲟的 Spl-168 位点作为分子标记,对中华鲟人工放流个体占长江口幼鲟群体的比例进行了估算。另外,Zhu 等(2005)构建了中华鲟微卫星局部基因组文库,并从中筛选了 180 个位点,设计了 150 对引物。Zhao 等(2005)利用微卫星分子标记研究了 50 尾野生中华鲟个体的遗传变异情况,对微卫星标记在亲子和群体遗传研究中的分析能力进行了评估。

多倍体的微卫星数据统计依赖于其基因组倍性。作为一种功能性四倍体,绝大部分微卫星分子标记引物在单个中华鲟个体基因组中扩增条带都在 4 条或者 4 条以下,目前基于微卫星分子标记研究中华鲟种群遗传结构的数据统计方法(基因型和基因频率)均建立在此基础上(Zhao et al, 2006)。然而,作者在研究中发现了 1 个特殊的微卫星位点 AciG-35,它在多尾中华鲟个体中的扩增产物均在 4 条带以上。为了弄清并解释这一现象,我们通过 PCR 和 T-A 克隆等手段分离得到了这一位点的 34 个等位基因,进一步通过序列测定获得了这一位点 34 个等位基因序列并综合分析了这一位点的核心重复序列以及两端侧翼序列在中华鲟个体中的变异方式。研究结果对于补充微卫星突变模式以及准确解释其用于多倍体物种种群分析时的数据结果具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料与基因组 DNA 的提取

本研究所用的中华鲟样本均为中华鲟野生个体鳍条样品,于 2000-2008 年间分别采集于中华鲟研究所以及长江水产研究所。基因组总 DNA 的提取采用酚抽提法(Sambrook),利用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测 DNA 浓度。

1.2 引物合成与 AciG-35 位点的 PCR 扩增及检测

根据 Bork 等(2008)发表的引物序列合成 AciG-35 引物对,引物序列如下:AciG-35-F:CAACAACAGTGGCAGGGTTA 和 AciG-35-R:ACCCTTC-

收稿日期:2013-05-17

基金项目:国家自然科学基金面上项目(51079089);国家自然科学基金青年基金项目(51209149)。

通讯作者:朱滨。E-mail:zhubin@mail.ihe.ac.cn

作者简介:邵科,男,1986 年生,研究实习员。E-mail:shaoke86@mail.ihe.ac.cn

CAAAGCAGGAAAT,其中正向引物采用6-FAM荧光进行标记,引物的合成和荧光标记由北京天一辉远生物科技有限公司完成。40 μL的PCR反应体系由如下组分构成:模板DNA 4 μL(20~50 ng/μL),正反向引物各2.0 μL(10 pmol/μL),0.4 μL Ex-Taq酶(5 U/μL),4 μL 10×PCR buffer(Mg^{2+} plus),3.2 μL dNTPs(2.5 μmol/μL),用灭菌双蒸水补足至40 μL。PCR反应在ABI 9700 PCR仪中进行,扩增程序如下:94 ℃预变性3 min;94 ℃变性30 s,退火温度58 ℃复性45 s,72 ℃延伸1 min,35个循环最终72 ℃延伸5 min。反应结束后,取5 μL PCR产物,加入1 μL 6×loading buffer,充分混匀后,取2 μL扩增产物上样于12%聚丙烯酰胺凝胶,于180 V电压下在0.5×TBE缓冲液中电泳4 h,电泳完毕后将凝胶取出,放在含3×GelRed(Biotium)染色液中染色10 min左右,用清水漂洗凝胶后,用BIORAD凝胶成像系统扫描扩增图谱。余下的35 μL产物避光保存后送北京天一辉远生物科技有限公司进行毛细管电泳和STR分析以初步确定AciG-35微卫星位点在不同中华鲟个体上的等位基因大小,STR分析使用ABI 3730XL测序仪完成。

1.3 PCR产物的纯化与T-A克隆

利用AXYGEN PCR产物纯化试剂盒进行PCR产物的纯化,利用TAKARA pMD18-T VECTOR试剂盒进行纯化后PCR产物的T-A克隆。将连接产物转化至大肠杆菌DH-5α感受态细胞中,涂布于含有氨苄抗生素的LB固体培养基中,37℃过夜生长。

1.4 含有不同大小片段的克隆筛选

挑选单克隆到含有氨苄抗生素的LB液体培养基中进行,放于摇床上以200 r/min在37 ℃下过夜培养。以菌液为模板,AciG-35引物对进行扩增,反应体系如下:模板DNA 1 μL(20~50 ng/μL),正反向引物各0.5 μL(10 pmol/μL),0.1 μL Taq酶(5 U/μL),1 μL 10×PCR buffer,0.6 μL Mg^{2+}(25 μmol/μL),0.8 μL dNTPs(2.5 μmol/μL),用灭菌双蒸水补足至10 μL。反应条件同AciG-35位点的PCR扩增条件。根据电泳结果挑选含有不同大小插入片段的单克隆并测序,测序反应由北京天一辉远生物科技有限公司完成。

1.5 数据分析

STR分析和序列测定用ABI 3730XL完成,使用软件GENEMAPPER v4.0记录和输出STR分型结果。用FINCHTV软件分析测序图谱,测序结果去除载体序列之后用LASGENE软件包进行序列比对分析。

2 结果与分析

2.1 AciG-35位点在中华鲟野生个体中扩增产物的STR分析结果

利用AciG-35引物对71尾中华鲟野生个体进行了扩增,利用3730 XL对PCR产物进行毛细管电泳及结果分析,根据STR分型结果,除了8尾无产物外,其它的63尾个体均得到了清晰的分型结果。STR分型结果显示,编号为SI035G-6、SIO35G-20、SI035G-72、SI035G-76、SI035G-82等5尾样品在AciG-35位点的等位基因数目分别为6、7、7、7、6个,总共包括19个大小不同的等位基因,涵盖了该位点在中华鲟野生个体中的所有等位基因长度(表1)。因此,我们选取这5尾样品进行进一步的单个的等位基因分离和序列测定分析。

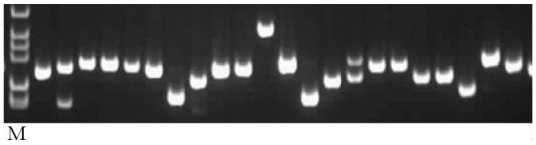
2.2 含有不同插入片段大小的克隆检测

为了确定AciG-35位点等位基因的序列,我们将上述SI035G-6等5尾中华鲟个体的PCR产物进行纯化并连接至T载体,转化感受态细胞并涂布平板,利用AciG-35引物对含有不同大小插入片段的单克隆进行筛选,最终挑选出55个单克隆进行插入片段的序列测定(图1)。

表1 中华鲟在AciG-35位点等位基因的大小及数目

Tab.1 Sizes and numbers of allele at locus AciG-35 in *Acipenser sinensis*

个体编号	等位基因数/个	等位基因大小/bp
SI035G-6	6	199/203/211/249/269/293
SI035G-20	7	187/203/207/219/257/265/285
SI035G-72	7	183/195/211/257/269/277/285
SI035G-76	7	187/215/261/265/285/289/293
SI035G-82	6	187/211/219/244/269/285
合计	19	183/187/195/199/203/207/211/215/219/245/249/257/261/265/269/277/285/289/293



M: pBR322/MSP 分子量标记

图 1　PCR 检测含有不同插入片段的阳性克隆

M:pBR322/MSP I DNA ladder

Fig. 1　PCR products of clones containing different insertions

2.3　AciG-35 位点的等位基因数目及大小

测序结果显示,在该位点共有 33 个不同的等位基因变异形式,等位基因大小表现出 23 种不同长度,大小在 185 ~293 bp,核心重复序列均表现为完美的微卫星序列。测序得到的等位基因大小同毛细管电泳分析得到的结果有所差别,如 STR 分析得到的等位基因大小为 183 和 187 bp,测序得到的对应结果为 185 和 189 bp;此外,STR 分析的结果显示该位点等位基因大小表现出 19 种长度,而测序的结果显示为 23 种,多出的 4 个等位基因分别为 AL-10、AL-20、AL-22 和 AL-32,这可能是由于毛细管电泳的分辨率要低于直接测序,无法区分长度差异只有 1 ~2 个碱基的等位基因。

2.4　AciG-35 位点的等位基因序列变异形式

AciG-35 位点不同等位基因的侧翼序列以及核心重复序列比较见表 2。

2.4.1　核心重复区 C　该位点的所有等位基因核心重复区都表现为完美型的微卫星序列,在侧翼序列长度基本相同的情况下,等位基因之间的大小差异主要来自于核心重复区的微卫星单元 TAGA 重复次数的变化。此外,点突变也发生在少数等位基因的核心重复区,主要有 G-C 突变和 A-G 突变。

2.4.2　左侧翼序列 L　不同长度的等位基因左侧翼序列 L 的变化主要包括点突变以及 1 个 4 碱基序列 TAAA 的插入/缺失,其中点突变包括 A-G、T-C 的转换和 A-T、G-T 的颠换 4 种突变类型。点突变是导致长度同形现象发生的最重要的原因之一,如等位基因 AL-2 和 AL-3 的大小均为 189 bp,但在其左侧翼序列发生了 A-G 突变,因此它们虽然具有同样的长度,但仍被认为是 2 个不同的等位基因。此外,如 AL-8 和 AL-9、AL-11 和 AL-12、AL-14 和 AL-15、AL-17 和 AL-18、AL-23 和 AL-24、AL-26 和 AL-27、AL-29 和 AL-30 等,均是由于侧翼序列的点突变导致的长度同形现象的产生。4 碱基 TAAA 的插入/缺失也发生在部分等位基因的左侧翼序列中,如 AL-13 和 AL-14 2 个等位基因之间 4 bp 的差异就是由 TAAA 的插入/缺失造成的。

2.4.3　右侧翼序列 R　AciG-35 位点不同等位基因的右侧翼序列变异较大,包括点突变、单碱基的插入/缺失和不同长度片段的插入/缺失。根据右侧翼序列的长度不同,可以将其划分为 2 类(Ⅰ 类和 Ⅱ 类)。Ⅰ 类同 AL-1 的侧翼序列基本完全一样,除了 AL-10 有 1 个单碱基 G 的插入之外,AL-1 ~ AL-15 均为这一类型;Ⅱ 类是在 Ⅰ 类的基础上发生了较长的片段插入的现象,插入的片段长度有 2 种,大小分别为 65 和 71 bp,其中 71 bp 的插入片段是在 65 bp 片段的基础上多了 1 个 6 碱基 CTGTGCT(表中的斜体加粗部分),AL-16 ~ AL-33 属于这一类型。点突变的类型主要包括 T-G、C-G 和 A-T 突变等 3 种颠换方式以及 A-G 突变 1 种转换方式。

3　讨论

3.1　AciG-35 微卫星位点的多态性

在本研究中,由于两类右侧翼序列长度相差很大,我们将等位基因按其右侧翼序列长度分为 Ⅰ 类和 Ⅱ 类分别进行探讨。在各自的类别中,等位基因大小的差异大部分是以 4 bp 为倍数的,这表明,滑动复制的确是引起微卫星长度多态性的主要原因。微卫星核心重复区也发生了一些点突变事件,这同 Sibly 等(2001)的研究结论相一致。但滑动复制并不是导致微卫星长度多态性的唯一原因,碱基的插入和缺失也是造成微卫星长度多态性的原因之一,如左侧翼序列 L 中 4 个碱基 TAAA 的插入和缺失以及在 Ⅱ 类右侧翼序列中 5 碱基的插入/缺失均引起了等位基因长度的变化。除此长度多态性之外,单碱基的替换和插入缺失等突变事件也在影响着其多态性水平,这是导致长度同形或接近长度同形现象发生的最重要的原因,即相同长度或者长度的差值通过毛细管电泳无法区分开来,必须通过序列测定才能发现不同的变异形式。因此,常规的聚丙烯酰凝胶电泳或者精确度更高的毛细管电泳得到的微卫星结果是无法完全反应微卫星位点的真实变异情况的。随着分子生物学技术的不断发展,目前已有分辨率更高的如 DNA 芯片技术,可以直接测出重复片段的数目以及单碱基突变的情况。但由于微卫星标记通常是用于群体的遗传分析,对于常规的聚丙烯酰胺凝胶电泳或者毛细管电泳的结果,只要采用统一的数据统计方法,其结果还是具有重要意义的。

表2 AciG-35位点不同等位基因的侧翼序列以及核心重复序列比较

Tab. 2 The core and the flanking sequences of different alleles amplified by the primer for a microsatellite locus AciG-35

名称	大小/bp	左侧翼序列 L	核心重复区	右侧翼序列 R
AL-1	185	TTTATTTACATCATCCAGTGTGAAGT TTACAACACTTTATTATTCAGTAATA	$(TAGA)_{13}$	AAACTCCTTAAACATCTTAAAAACAACTTCCTATCTCTGCA
AL-2	189	TTTATTTACATCATCCAGTGTGAAGT TTACAACACTTTATTATTCAGTAATA	$(TAGA)_{14}$	AAACTCCTTAAACATCTTAAAAACAACTTCCTATCTCTGCA
AL-3	189	TTTATTTACATCATCCAGTGTGAAGT TTACAGCACTTTATTATTCAGTAATA	$(TAGA)_{14}$	AAACTCCTTAAACATCTTAAAAACAACTTCCTATCTCTGCA
AL-4	201	TTTATTTACATCATCCAGTGTGAAGT TTACAACACTTTATTATTCAGTAATA	$(TAGA)_{17}$	AAACTCCTTAAACATCTTAAAAACAACTTCCTATCTCTGCA
AL-5	201	TTTATTTACATCATCCAGTGCGAAGT TTACAACACTTTATTATTCAGTAGTA TAAA	$(TAGA)_{16}$	AAACTCCTTAAACATCTTAAAAACAACTTCCTATCTCTGCA
AL-6	205	TTTATTTACATCATCCAGTGCGAAGT TTACAACACTTTATTATTCAGTAGTA TAAA	$(TAGA)_{17}$	AAACTCCTTAAACATCTTAAAAACAACTTCCTATCTCTGCA
AL-7	209	TTTATTTACATCATCCAGTGTGAAGT TTACAACACTTTATTATTCAGAAAAG A	$(TAGA)_{19}$	AAACTCCTTAAACATCTTAAAAACAACTTCCTATCTCTGCA
AL-8	209	TTTATTTACATCATCCAGTGCGAAGT TTACAACACTTTATTATTCAGTAGTA TAAA	$(TAGA)_{18}$	AAACTCCTTAAACATCTTAAAAACAACTTCCTATCTCTGCA
AL-9	209	TTTATTTACATCATCCAGTGCGAAGT TTACAACACTTTATTATTCAGTAGTA TAAA	$(TAGA)_{18}$	AAACTCCTTAAACATCTTAAAAACAACTTCCTATCTCTGCA
AL-10	210	TTTATTTACATCATCCAGTGCGAAGT TTACAACACTTTATTATTCAGTAGTA TAAA	$(TAGA)_{18}$	AAACTCCTTAAACATCTTAAAAACAACTTCCTATGCTCTGCA
AL-11	213	TTTATTTACATCATCCAGTGTGAAGT TTACAACACTTTATTATTCAGTAATA	$(TAGA)_{20}$	AAACTCCTTAAACATCTTAAAAACAACTTCCTATCTCTGCA
AL-12	213	TTTATTTACATCATCCAGTGTGAAGT TTACAACACTCTATTATTCAGTAATT	$(TAGA)_{20}$	AAACTCCTTAAACATCTTAAAAACAACTTCCTATCTCTGCA
AL-13	217	TTTATTTACATCATCCAGTGTGAAGT TTACAACACTTTATTATTCAGTAATA	$(TAGA)_{21}$	AAACTCCTTAAACATCTTAAAAACAACTTCCTATCTCTGCA
AL-14	221	TTTATTTACATCATCCAGTGTGAAGT TTACAACACTTTATTATTCAGTAGTA TAAA	$(TAGA)_{21}$	AAACTCCTTAAACATCTTAAAAACAACTTCCTATCTCTGCA
AL-15	221	TTTATTTACATCATCCAGTGCGAAGT TTACAACACTTTATTATTCAGTAGTA TAAA	$(TAGA)_{21}$	AAACTCCTTAAACATCTTAAAAACAACTTCCTATCTCTGCA
AL-16	245	TTTATTTACATCATCCAGTGCGAAGT TTACAACACTTTATTATTCAGTAGTA TAAA	$(TAGA)_{9}$	AAACTCCTTAAACATCTTAAAAAGATAGATGGAAATGTTTAAATCTGAT CTTAC***CTGTGCT***CTGTCTTTTGGAATTTTTGTGGGCGCTTTTTTGACAAC TTCCTATCTCTGCA
AL-17	250	TTTATTTACATCATCCAGTGTGAAGT TTACAACACTTTATTATTCAGAAAAG A	$(TAGA)_{13}$	AAACTCCGTAAACATCTTAAAAAGATAGATGGAAATGTTTAAATCTGAT CAAACCTGTCTTTTGGAATTTTTGTGGGCGCTTTTTTGACAACTTCCTG TCTCTGCA
AL-18	250	TTTATTTACATCATCCAGTGTGAAGT TTACAACACTTTATTATTCAGAAAAG A	$(TAGA)_{13}$	AAACTCCGTAAACATCTTAAAAAGATAGATGGAAATGTTTAAATCTGAT CAAACCTGTCTTTTGGAATTTTTGTGGGCGCTTTTTTGACGACTTCCTG TCTCTGCA
AL-19	257	TTTATTTACATCATCCAGTGTGAAGT TTACAACACTTTATTATTCAGAAAAG A	$(TAGA)_{15}$	AAACTCCGTAAACATCTTAAAAAGATAGATGGAAATGTTTAAATTTGAT CAAACCTGTCTTTTGGAATTTTTGTGGGCGTTTTTTTGACAACTTCCTG TCTCTGCA
AL-20	258	TTTATTTACATCATCCAGTGTGAAGT TTACAACACTTTATTATTCAGAAAAG A	$(TAGA)_{15}$	AAACTCCGTAAACATCTTAAAAAGATAGATGGAAATGTTTAAATCTGAT CAAACCTGTCTTTTGGAATTTTTGTGGGCGCTTTTTTGACAACTTCCTG TCTCTGCA
AL-21	261	TTTATTTACATCATCCAGTGTGAAGT TTACAACACTTTATTATTCAGTAATA	$(TAGA)_{14}$	AAACTCCTTAAACATCTTAAAAAGATAGATGGAAATGTTTAAATGTGAT CTTAAC***CTGTGCT***CTGTCTTTTGGAATTTTTGTGGGCGCTTTTTTGACAA CTTCCTGTCTCTGCA
AL-22	262	TTTATTTACATCATCCAGTGTGAAGT TTACAACACTTTATTATTCAGAAAAG A	$(TAGA)_{16}$	AAACCCCGGTAAACATCTTAAAAAGATAGATGGAAATGTTTAAATCTGA TCAAACCTGTCTTTTGGAATTTTTGTGGGCGCTTTTTTGACAACTTCCT GTCTCTGCA
AL-23	266	TTTATTTACATCATCCAGTGTGAAGT TTACAACACTTTATTATTCAGAAAAG A	$(TAGA)_{17}$	AAACCCCGGTAAACATCTTAAAAAGATAGATGGAAATGTTTAAATCTGA TCAAACCTGTCTTTTGGAATTTTTGTGGGCGCTTTTTTGACAACTTCCT GTCTCTGCA
AL-24	266	TTTATTTACATCATCCAGTGTGAAGT TTACAACACTTTATTATTCAGAAAAG A	$(TAGA)_{17}$	AAACCCCGGTAAACATCTTAAAAAGGGTAGATGGAAATGTTTAAATCTGA TCAAACCTGTCTTTTGGAATTTTTGTGGGCGCTTTTTTGACAACTTCCT GTCTCTGCA
AL-25	270	TTTATTTACATCATCCAGTGTGAAGT TTACAACACTTTATTATTCAGAAAAG A	$(TAGA)_{18}$	AAACTCCGTAAACATCTTAAAAAGATAGATGGAAATGTTTAAATCTGAT CAAACCTGTCTTTTGGAATTTTTGTGGGCGCTTTTTTGACAACTTCCTG TCTCTGCA
AL-26	277	TTTATTTACATCATCCAGTGTGAAGT TTACAACACTTTATTATTCAGTAATA	$(TAGA)_2CAGA(TAGA)_{15}$	AAACTCCTTAAACATCTTAAAAAGATAGATGGAAATGTTTAAATGTGAT CTTAAC***CTGTGCT***CTGTCTTTTGGAATTTTTGTGGGCGCTTTTTTGACAA CTTCCTGTCTCTGCA
AL-27	277	TTTATTTACATCATCCAGTGTTAAGT ATACAACACTTTATTATTCAGTAATA	$(TAGA)_2CAGA(TAGA)_{15}$	AAACTCCTTAAACATCTTAAAAAGATAGATGGAAATGTTTAAATGTGAT CTTAAC***CTGTGCT***CTGTCTTTTGGAATTTTTGTGGGCGCTTTTTTGACAA CTTCCTGTCTCTGCA
AL-28	281	TTTATTTACATCATCCAGTGCAAAGT TTCCAACACTTTATTATTCAGTAGTA TAAA	$(TAGA)_2CAGA(TAGA)_2CAGA(TAGA)_7TCGA(TAGA)_3$	AAACTCCTTAAACATCTTAAAAAGATAGATGGAAATGTTTAAATGTGAT CTTAAC***CTGTGCT***CTGTCTTTTGGAATTTTTGTGGGCGCTTTTTTGACAA CTTCCTATCTCTGCA
AL-29	285	TTTATTTACATCATCCAGTGTTAAGT ATACAACACTTTATTATTCAGTCATA	$(TAGA)_2CAGA(TAGA)_{17}$	AAACTCCTTAAACATCTTAAAAAGATAGATGGAAATGTTTAAATGTGAT GTTAAC***CTGTGCT***CTGTCTTTTGGAATTTTTGTGGGCGCTTTTTTGACAA CTTCCTGTCTCTGCA
AL-30	285	TTTATTTACATCATCCAGTGCAAAGT TTACAACACTTTATTATTCAGTAGTA TAAA	$(TAGA)_{19}$	AAACTCCTTAAACATCTTAAAAAGATAGATGGAAATGTTTAAATGTGAT CTTAAC***CTGTGCT***CTGTCTTTTGGAATTTTTGTGGGCGCTTTTTTGACAA CTTCCTATCTCTGCA
AL-31	289	TTTATTTACATCATCCAGTGTTAAGT ATACAACACTTTATTATTCAGTAATA	$(TAGA)_2CAGA(TAGA)_{18}$	AAACTCCTTAAACATCTTAAAAAGATAGATGGAAATGTTTAAATGTGAT CTTAAC***CTGTGCT***CTGTCTTTTGGAATTTTTGTGGGCGCTTTTTTGACAA CTTCCTGTCTCTGCA
AL-32	292	TTTATTTACATCATCCAGTGTGAAGT TTACAACACTTTATTATTCAGTAATA	$(TAGA)_2TGGA(TAGA)_{19}$	AAACTCCTTAAACATCTTAAAAAGATAGATGGAAATGTTTAAATGTGAT CTTAAC***CTGTGCT***CTGTCTTTTGGAATTTTTGTGGGCGCTTTTTTGACAA CTTCCTGTCTATGCA
AL-33	293	TTTATTTACATCATCCAGTGCGAAGT TTACAACACTTTATTATTCAGTAGTA TAAA	$(TAGA)_{21}$	AAACTCCTTAAACATCTTAAAAAGATAGATGGAAATGTTTAAATGTGAT CTTAAC***CTGTGCT***CTGTCTTTTGGAATTTTTGTGGGCGCTTTTTTGACAA CTTCCTATCTCTGCA

3.2　中华鲟的基因组倍性与微卫星引物的多位点扩增

大多数鲟鱼为多倍体物种,因此,在统计鲟鱼类的分子标记数据时,必须考虑其基因组倍性,单个微卫星引物扩增的条带数应该小于或等于其染色体组数。尽管对中华鲟的染色体组和基因组倍性已经有所研究,但关于中华鲟的基因组倍性仍然不是很清楚。核 DNA 含量表明中华鲟可能为八倍体(张四明等,1999),但微卫星的数据更支持中华鲟为四倍体的研究结论(赵娜等,2006;Ludwig et al, 2001)。本文在利用微卫星分子标记进行中华鲟的群体遗传学研究时,除了本研究中用到的 AciG-35 微卫星引物之外,其他所有的标记引物在中华鲟单个个体中均不超过 4 条带,因此从微卫星数据这个角度出发,我们也认为中华鲟是四倍体物种,AciG-35 微卫星引物在单个个体中多条带扩增结果可能来自于引物的多位点扩增。由于 AciG-35 这一位点是从高首鲟(*Acipenser transmontanus*)中分离所得到并跨种扩增应用于中华鲟,其引物序列可能在不同鲟鱼的基因组间相对保守,推测其在中华鲟基因组中可能存在 2 个不同的结合位点,Ⅰ类和Ⅱ类不同的等位基因分别来自于 2 个不同的位点,在单个中华鲟个体中可能出现的条带是来自于 2 个位点的扩增,且 2 个位点的同源性非常高。邵昭君等(2005)曾报道过微卫星引物在鲟形目鱼类中的多位点扩增现象,但与本研究中不同的是,2 个位点的等位基因序列不论是侧翼序列还是核心重复区的同源性均很低,因此,本研究中的多位点扩增现象对于现有的研究作了补充。

3.3　多倍体物种微卫星数据的统计

由于具有高通量、高分辨率和高灵敏度等特点,目前毛细管凝胶电泳已经广泛应用于微卫星引物的 PCR 产物的检测和分析。但在实际应用中,毛细管电泳很难区分大小差异在 1 ~ 2 bp 的片段,因此,在微卫星分子标记的开发中要尽量分离核心重复区为 4 碱基及以上的微卫星序列以提高毛细管电泳结果分析的准确性。此外,对于会产生多位点扩增现象的标记,应确定其在 2 个位点的等位基因分布范围后再进行统计。

参考文献

邵昭君. 2005. 鲟形目鱼类中微卫星 Spl-106 位点的复杂变异模式[D]. 武汉:中国科学院水生生物研究所.

邵昭君,赵娜,朱滨,等. 2002. 铲鲟微卫星引物对中华鲟的适用性研究[J]. 水生生物学报, 26(6):577 – 584.

张四明,晏勇,邓怀,等. 1999. 几种鲟鱼基因组大小、倍体的特性及鲟形目细胞进化的探讨[J]. 动物学报, 45(2): 200 – 206.

赵娜. 2006. 基于微卫星标记的中华鲟繁殖群体遗传学分析与人工繁殖对自然幼鲟群体的贡献评估[D]. 武汉:中国科学院水生生物研究所.

杨钟,史方,阙延福,等. 2010. 长江胭脂鱼人工放流子一代遗传多样性初步研究[J]. 水生态学杂志, 3(5):17 – 20.

熊美华,邵科,徐念,等. 2013. 乌江彭水水电站截流前后白甲鱼群体遗传结构初步研究[J]. 水生态学杂志, 34(1): 69 – 75.

朱滨,常剑波,谭细畅,等. 1999. 湖鲟微卫星 DNA 引物应用于中华鲟亲子关系分析的初步研究[J]. 水生生物学报, 23(6):547 – 553.

Bork K, Drauch A, Israel J, et al. 2008. Development of new microsatellite primers for green and white sturgeon [J]. Conservation Genetics, 9:973 – 979.

Dudgeon C, Blower D, Broderick D, et al. 2012. A review of the application of molecular genetics for fisheries management and conservation of sharks and rays [J]. Journal of Fish Biology, 80: 1789 – 1843.

Kameyama Y, Isagi Y, Nakagoship N, 2001. Patterns and levels of gene flow in *Rhododendron metternichii* var. *hondoense* revealed by microsatellite analysis [J]. Molecular Ecology, 10: 205 – 216.

Sambrook J, Russell D. 2001. Molecular cloning: a laboratory-manual:3rd edn [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Zhao N, Ai W, Shao Z, et al. 2005. Microsatellites assessment of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis* Gray) genetic variability [J]. Journal of Applied Ichthyology, 21(1): 7 – 13.

Zhao N, Chang J. 2006. Microsatellite loci inheritance in the Chinese sturgeon *Acipenser sinensis* with an analysis of expected gametes ratios in polyploidy organisms [J]. Journal of Applied Ichthyology, 22: 89 – 96.

Zhu B, Liao X, Shao Z, et al. 2005. Isolation and characterization of microsatellites in Chinese sturgeon, Acipenser sinensis [J]. Molecular Ecology Notes, 4: 888 – 892.

Zhu B, Zhou F, Cao H, et al. 2002. Analysis of genetic variation in the Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*: estimating the contribution of artificially produced larvae in a wild population [J]. Journal of Applied Ichthyology, 18: 301 – 306.

(责任编辑　张俊友)

Allele Variation of a Microsatellite Locus AciG-35 in Individuals of Wild Chinese Sturgeon

SHAO Ke, SHI Fang, YAN Shu-xiang, XU Nian, ZHU Bin

(Key Laboratory of Ecological Impacts of Hydraulic-Projects and Restoration of Aquatic Ecosystem of Ministry of Water Resources, Institute of Hydroecology, Ministry of Water Resources and Chinese Academy of Sciences, Wuhan, Hubei 430079, P. R. China)

Abstract: In this study, 34 allele sequences at a special tetranucleotide repeat microsatellite locus AciG-35 were obtained in the individuals of wild Chinese sturgeon. From the sequencing results, a preliminary study was performed on the variation of the repeat region of the core sequences and the flanking sequences at both ends. There was a certain degree of variability in the core and the flanking sequences of different alleles, which reflected as point mutations in the core region, and a variety of nucleotide substitutions, insertions and deletions as well as fragment indels in the flanking sequences. In addition, we also found multi-locus amplification of the primer for AciG-35 locus in Chinese sturgeon. The results would be important for the accurate interpretation of microsatellite DNA markers for population genetic analysis data. At the same time, some of the problems that may exist in the application process of microsatellite markers were discussed here.

Key words: *Acipenser sinensis*; microsatellite locus; allele; variation