

# 基于转录组测序的波纹巴非蛤微卫星标记研究

孙 宏<sup>1,2</sup>, 李佳凯<sup>1,2</sup>, 武祥伟<sup>3,4</sup>, 刘 坦<sup>1,2</sup>, 刘贤德<sup>1,2</sup>

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 农业部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021;  
3. 福建省海洋渔业资源与生态环境重点实验室, 福建 厦门 361021;  
4. 云南农业大学动物科学技术学院, 云南 昆明 650201)

〔摘要〕应用 MISA 软件对波纹巴非蛤转录组测序数据进行分析, 共获得 7378 个微卫星标记, 从中选取 95 个位点设计引物, 并在一个野生波纹巴非蛤群体中进行分析验证, 结果显示: 95 个位点中能够扩增出清晰条带的位点有 30 个, 其中 15 个位点表现为单态, 15 个位点呈现多态. 使用 15 个多态位点进行波纹巴非蛤群体的遗传多样性分析, 结果表明: 这 15 个位点的等位基因数为 2~9, 平均等位基因数为 4.733, 平均有效等位基因数为 2.438, 平均观测杂合度和平均期望杂合度分别为 0.270、0.516, 平均多态信息含量为 0.457.

〔关键词〕波纹巴非蛤; 转录组; 微卫星标记; 遗传多样性

〔中图分类号〕Q 959.215; Q 789 〔文献标志码〕A

## Development of Microsatellite Markers from Transcriptome Data in *Paphia undulata*

SUN Hong<sup>1,2</sup>, LI Jia-kai<sup>1,2</sup>, WU Xiang-wei<sup>3,4</sup>, LIU Tan<sup>1,2</sup>, LIU Xian-de<sup>1,2</sup>

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture, Xiamen 361021, China;

3. Key Laboratory of Marine Fishery Resources and Ecoenvironment in Fujian Province, Jimei University, Xiamen 361021, China; 4. Animal Science and Technology College, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

**Abstract:** Using MISA software, 7378 microsatellite markers were identified from the transcriptome data of *Paphia undulata*, in which 95 loci were chosen to design the primers and the PCR products were verified in a wild group of *Paphia undulata*. The results showed that a total of 30 loci were successfully amplified, of which 15 loci were monomorphic and other 15 loci were polymorphic. The allelic number ( $N_a$ ) and the efficient allelic number ( $N_e$ ) in these 15 polymorphic loci were 4.733 and 2.438, respectively. The average observed heterozygosity ( $H_o$ ) and the expected heterozygosity ( $H_e$ ) were 0.270 and 0.516, respectively. The average of polymorphism information content (PIC) was 0.457.

**Key words:** *Paphia undulata*; transcriptome; microsatellite markers; genetic diversity

〔收稿日期〕2015-03-10

〔修回日期〕2015-04-15

〔基金项目〕国家自然科学基金 (31172397); 福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划 (JA14167); 福建省海洋渔业资源与生态环境重点实验室开放基金 (Z814041); 福建省大学生创新创业训练计划项目 (20141039046)

〔作者简介〕孙宏 (1988—), 男, 硕士生, 从事水产动物遗传育种研究. 通信作者: 刘贤德 (1974—), 男, 教授, 博士, 从事水产动物遗传育种研究.

## 0 引言

波纹巴非蛤 (*Paphia undulate*) 属软体动物门 (Mollusca)、双壳纲 (Bivalvia)、异齿亚纲 (Heterodonta)、帘蛤目 (Veneroida)、帘蛤科 (Veneridae)、巴非蛤属 (*Paphia*), 栖息在潮间带至潮下带 0.5 ~ 44 m 的泥沙底质或软泥底质, 在我国主要分布于浙江、福建、广西、海南等地区<sup>[1]</sup>。目前, 对波纹巴非蛤的人工育苗及营养分析已有较多报道, 但不同自然群体的遗传背景尚不清楚, 其中一个重要的限制性因素是缺少可用的遗传标记。

微卫星, 又称简单重复序列 (simple sequence repeats, SSRs), 具有多态性高、稳定性好、共显性遗传等优点, 广泛应用于水产动物遗传多样性分析、遗传图谱构建、亲子鉴定及种群结构分析等方面<sup>[2-5]</sup>。微卫星开发的方法主要有 4 种, 分别是: 公共数据库搜索法<sup>[6]</sup>、基因组文库构建法<sup>[7]</sup>、选择性杂交法<sup>[8-9]</sup>以及高通量测序法<sup>[10]</sup>。前三种一般称之为传统方法。对没有公开数据的物种无法使用公共数据库搜索法, 只能根据近缘物种数据设计引物, 其 PCR 扩增效率较低。基因组文库构建法、选择性杂交法工作量大。高通量测序法能够获得大量的序列信息, 较之经典的开发方法, 高通量测序法显得更加简单高效。目前, 仅采用传统方法开发了少量波纹巴非蛤微卫星标记<sup>[11]</sup>, 还未有利用高通量测序数据大规模开发波纹巴非蛤微卫星标记的报道。

本文拟用高通量测序方法获得波纹巴非蛤的转录组数据, 通过对转录组数据分析获得了大量微卫星序列, 从中筛选部分微卫星序列位点在一个野生群体中进行分析鉴定, 以期对波纹巴非蛤遗传图谱的构建、QTL 定位等研究提供批量的微卫星位点。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

30 个野生波纹巴非蛤于 2014 年 10 月 30 日采自福建省云霄县礁美村, 壳长 ( $5.5 \pm 0.4$ ) cm, 体重 ( $18.20 \pm 1.72$ ) g。剪取波纹巴非蛤斧足, 固定于 95% (体积分数) 乙醇中,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.2 波纹巴非蛤基因组 DNA 提取与检测

用常规的苯酚/氯仿/异戊醇法抽提 DNA, 用 1.0% (质量分数) 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的完整性, 用紫外分光光度计测定  $\text{OD}_{260}$  与  $\text{OD}_{280}$ , 选取提取效果好的 DNA 并将其质量浓度调至  $50\text{ ng}/\mu\text{L}$ ,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.3 微卫星序列的获得与引物设计

将提取的波纹巴非蛤斧足 DNA 样品送至北京百迈克生物科技有限公司进行测序。使用 Trinity 软件<sup>[12]</sup>对所得转录组数据进行组装, 利用 MISA (<http://pgarc.ipk-gatersleben.de/misa/>) 软件对筛选得到的 Unigenes 做微卫星分析, 主要挑选以三碱基为重复单元的微卫星序列, 使用 DNAMAN 软件<sup>[13]</sup>在所得微卫星序列保守区内设计引物, 共设计 95 对波纹巴非蛤微卫星引物, 由上海生工生物工程有限公司合成。

### 1.4 微卫星筛选

合成的 95 对微卫星引物的 PCR 反应体系 ( $10\text{ }\mu\text{L}$ ): 模板 DNA  $1\text{ }\mu\text{L}$  ( $50\text{ ng}$ )、 $10\times$  PCR buffer  $1.0\text{ }\mu\text{L}$ 、 $15\text{ mmol/L}$   $\text{MgCl}_2$   $1.0\text{ }\mu\text{L}$ 、 $10\text{ mmol/L}$  dNTPs  $0.2\text{ }\mu\text{L}$ 、 $10\text{ mmol/L}$  引物对各  $0.2\text{ }\mu\text{L}$ 、 $5\text{ U}/\mu\text{L}$  Taq 酶  $0.1\text{ }\mu\text{L}$ 、纯水  $7.3\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$   $5\text{ min}$ ;  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$   $30\text{ s}$ , 退火温度  $30\text{ s}$ ,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$   $30\text{ s}$ , 循环 30 次;  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$   $10\text{ min}$ ;  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。扩增产物用 6% (质量分数) 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 银染显色。等位基因大小以  $10\text{ bp}$  DNA Ladder (Invitrogen, USA) 为参照标准进行判读。

### 1.5 数据统计

每个微卫星位点扩增的等位基因按其迁移率的不同, 从小到大依次记录为: A、B、C... (无效等位基因由 0 表示)。通过 Popgene 1.31 软件<sup>[14]</sup>计算微卫星位点的等位基因数 ( $N_a$ )、有效等位基因数 ( $N_e$ )、多态信息含量 (PIC)、观测杂合度 ( $H_o$ )、期望杂合度 ( $H_e$ )。

## 2 结果

### 2.1 波纹巴非蛤转录组微卫星标记分析

本研究共获得 5.29 Gb 的转录组数据信息，通过从头组装得到 60201 条 Unigenes，其中 N50 的长度为 1478 bp，对 Unigenes 应用 MISA 软件进行微卫星分析，共得到 7378 个微卫星重复序列，以单碱基重复为主（见图 1）。

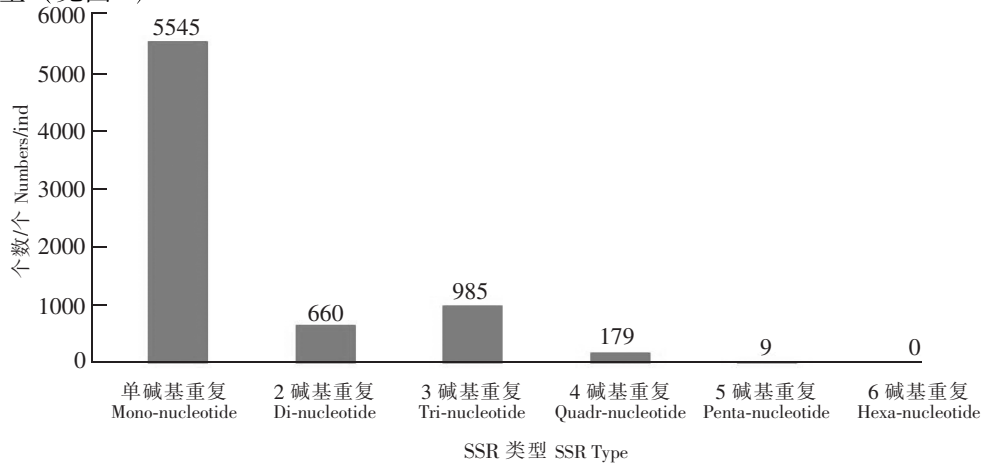


图 1 波纹巴非蛤转录组数据的微卫星标记分析结果

Fig.1 Statistics of the microsatellite identified from transcriptome of *Paphia undulata*

### 2.2 波纹巴非蛤微卫星引物筛选结果

从微卫星分析结果中筛选 95 个位点进行 PCR 扩增验证，结果有 30 个位点可扩增出清晰条带，其中 15 个位点呈现单态（见图 2），另外 15 个位点呈现多态（见图 3）。

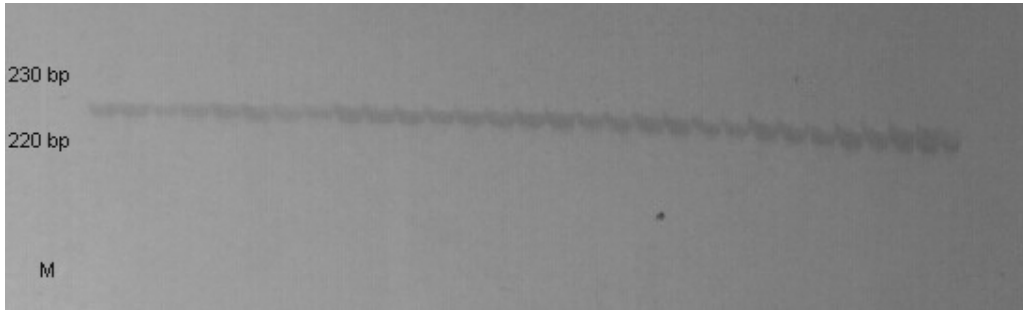


图 2 波纹巴非蛤微卫星 PU56 位点扩增结果

Fig.2 The PCR product of microsatellite PU56 in *Paphia undulata*

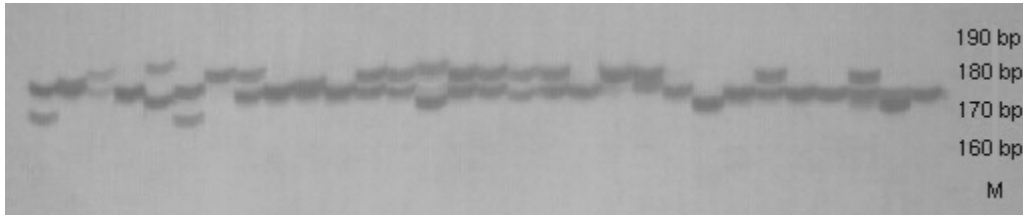


图 3 波纹巴非蛤微卫星 PU29 位点扩增结果

Fig.3 The PCR product of microsatellite PU29 in *Paphia undulata*

### 2.3 波纹巴非蛤群体遗传多样性分析

用 15 个多态微卫星位点对 30 个波纹巴非蛤野生个体进行分析，结果如表 1 所示。15 个多态位点共检测到 81 个等位基因，观察到等位基因数为 2~9，平均等位基因数为 4.733，平均有效等位基因数为 2.438，平均观测杂合度为 0.270，平均期望杂合度为 0.516，平均多态信息含量为 0.457。其

中有 3 个位点（PU32、PU49、PU63）偏离哈迪-温伯格平衡. 有 4 个位点（PU29、PU32、PU49、PU70）属于高度多态性（ $0.500 < PIC < 1.000$ ）.

表 1 波纹巴非蛤的 15 个多态性微卫星标记的相关信息  
Tab.1 The information of 15 polymorphic microsatellite markers for *Paphia undulata*

微卫星 位点 Locus	核心重 复序列 Repeat motif	引物序列 Primer sequence(5′-3′)	退火温度 Annealing temperature /℃	片段大小 范围 Size range /bp	$N_a$	$N_e$	PIC	$H_o$	$H_e$
PU28	(AGTA) <sub>6</sub>	F:TAGACTAACTGGGCATTGG R:ACATATAGGTCCATTGAGC	54.5	183 ~ 235	6	1.785	0.423	0.095	0.451
PU29	(TA) <sub>6</sub>	F:GGTGGAAGGTTTAAGGTCT R:CATGAACAACCTFGGACAC	59	169 ~ 183	6	3.956	0.705	0.533	0.760
PU32	(T) <sub>12</sub> … (AT) <sub>6</sub>	F:CCTGATGGATGAGCGTAG R:ACCCGATGGAAAGAGAAT	54	186 ~ 218	7	3.333	0.648	0.167	0.712
PU33	(GA) <sub>7</sub>	F:GAAGCCACAACAACACC R:ACCCGATGGAAAGAGAAT	56	260 ~ 280	3	1.995	0.390	0.035	0.508
PU39	(TTG) <sub>6</sub>	F:GTCATGGTAGATCTAGATC R:GCTATATATACATCACGTGG	56.5	108 ~ 132	6	2.052	0.468	0.250	0.522
PU46	(CAT) <sub>6</sub>	F:CTACTCAATCAACATGGATGG R:CCAATAGATCTCGGACTAGG	56.5	252 ~ 260	3	1.106	0.064	0.100	0.098
PU49	(CAAA) <sub>5</sub>	F:CCAGTTGTCTAATGTCTCTC R:CCAATAAGCTGAACTAGTAAGGCC	57	162 ~ 185	6	3.645	0.691	0.111	0.740
PU50	(AGC) <sub>6</sub>	F:GATGTGCTGTGAGAATGACT R:GATGGCCTTGAAGATGACC	57	300 ~ 312	3	2.104	0.423	0.000	0.536
PU52	(TGA) <sub>5</sub> … (ATGA) <sub>5</sub>	F:CACCGAATTCTCCTGCTCTAC R:GTTATGTCCTCGTTCATCC	55	182 ~ 206	6	1.711	0.391	0.233	0.423
PU55	(AAT) <sub>7</sub>	F:CGACCTCCATTCACTCAAGCCAGTC R:CCATGCCTACCAATCTAG	56	137 ~ 158	3	1.946	0.424	0.233	0.494
PU60	(TGGT) <sub>5</sub>	F:CTGTCCTGAACTAGATGAGG R:GTCTCAACCTAGCAGTATTAC	57	171 ~ 194	4	1.689	0.374	0.400	0.415
PU63	(ACG) <sub>6</sub>	F:CAGCAAGTCTACCACCTGG R:CCATAGTGATCAGGATGCGGAAGGAG	66	171 ~ 177	2	1.998	0.375	0.967	0.508
PU68	(TCT) <sub>5</sub>	F:CTCCTCTTCACCTTCCTCACC R:CACACACAATCTTCAGCATGTCAGG	64	270 ~ 288	4	1.274	0.208	0.167	0.219
PU70	(TTA) <sub>6</sub>	F:CCATCAGCAGTACAACAGTCTTCC R:GGCTCTATCTGTCTTCTAGGC	64	160 ~ 190	9	6.017	0.831	0.105	0.856
PU81	(TCA) <sub>5</sub>	F:TCCTCTCCAGTCTCATGCAGG R:GCTTGCTATTGGCAGCTGTG	57	284 ~ 303	3	1.963	0.437	0.655	0.499

### 3 讨论

随着转录组测序技术的日臻完善，基于转录组批量开发微卫星标记已逐渐成为主流技术，较之磁珠富集法和文库构建法，基于转录组测序数据可以在短时间内批量开发出微卫星标记<sup>[15]</sup>. 传统的磁珠富集法其发掘微卫星流程要经过基因组 DNA 限制性内切酶酶切、连接，用生物素标记的探针杂交、然后用磁珠富集，最后进行克隆、测序、引物设计，整个过程非常繁琐，至少需要 3 周以上的时间才能将微卫星标记筛选出来，而且每次只能开发固定重复序列的微卫星，效率很低. 本实验在转录组测序基础上开发了 7378 个微卫星标记，对其中 95 个标记设计引物验证，结果有 30 个位点可以扩增出清晰条带，说明应用转录组测序的方法进行微卫星标记开发是可行的，整个实验从测序分析到实验初步验证，其过程在 1~2 周就可以完成，且开发的微卫星标记很全面，不受探针类型的影响，因而基于转录组测序数据开发微卫星标记前景广阔.

本研究筛选出来的微卫星标记, 有 50% 是单态标记, 可能是由于这些微卫星是基于转录组数据开发出来的, 外显子区域变异性较小, 因而多态性偏低. 在对群体进行分析时, 出现了观察杂合度 (0.270) 在数值上小于期望杂合度 (0.516) 的情况, 可能与本研究中的某些位点 (PU32、PU49、PU63) 存在无效等位基因, 导致杂合子缺失<sup>[16-17]</sup>有关.

本研究基于转录组数据开发获得的微卫星标记有助于从分子水平上对中国波纹巴非蛤不同地区的遗传背景情况进行有效分析, 为下一步波纹巴非蛤遗传图谱构建、QTL 定位等研究奠定基础.

## [ 参 考 文 献 ]

- [1] 蔡明夷, 郭洋, 柯才焕, 等. 波纹巴非蛤染色体核型分析 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2012, 51(5): 935-938.
- [2] 杜博, 龚世园, 童馨, 等. 皱纹盘鲍和盘鲍南方养殖群体遗传变异的微卫星分析 [J]. 南方水产, 2007, 3(6): 22-29.
- [3] HUBERT S, HEDGECK D. Linkage maps of microsatellite DNA markers for the pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. Genetics, 2004, 168(1): 351-362.
- [4] WANG Y, WANG X X, WANG A M, et al. A 16-microsatellite multiplex assay for parentage assignment in the eastern oyster (*Crassostrea virginica* Gmelin) [J]. Aquaculture, 2010, 308(1): 118-124.
- [5] 赵莹莹, 朱晓琛, 孙效文, 等. 虾夷扇贝的多态性微卫星标记 [J]. 动物学报, 2006, 52(1): 229-233.
- [6] ZHAN A B, BAO Z M, WANG X L, et al. Microsatellite markers derived from bay scallop (*Argopecten irradians*) expressed sequence tags [J]. Fisheries Science, 2005, 71(6): 1341-1346.
- [7] KARAGYOZOV L, KALCHEVA I D, CHAPMAN V M. Construction of random small-insert genomic libraries highly enriched for simple sequence repeats [J]. Nucleic Acids Research, 1993, 21(16): 3911-3912.
- [8] KANDPAL R P, KANDPAL G, WEISSMAN S M. Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping clones and hybridization selection for region-specific markers [J]. Proc Natl Acad Sci, 1994, 91(1): 88-92.
- [9] ZANE L, BARGELLONI L, PATARNELLO T. Strategies for microsatellite isolation: a review [J]. Molecular Ecology, 2002, 11(1): 1-16.
- [10] 李小白, 向林, 罗洁, 等. 转录组测序 (RNA-seq) 策略及其数据在分子标记开发上的应用 [J]. 中国细胞生物学学报, 2013, 35(5): 1-8.
- [11] 郭昱嵩, 谢子强, 邓岳文, 等. 利用 FIASCO 技术进行波纹巴非蛤微卫星 DNA 标记分离与筛选的研究 [J]. 中国农学通报, 2012, 28(17): 160-164.
- [12] MANFRED G GRABHERR, BRIAN J HAAS, MORAN YASSOUR, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome [J]. Nature Biotechnology, 2011, 7(29): 644-652.
- [13] WOFFELMAN C. DNAMAN for windows [M]. The Netherland: Leiden University, 1994.
- [14] YEH F, YANG R C, BOYLE T. POPGENE: A user friendly share are for population genetic analysis [R]. Edmonton: Molecular and Biotechnology Center, University of Alberta, 1997.
- [15] ZHANG H, WEI L, MIAO H, et al. Development and validation of genic-SSR markers in sesame by RNA-seq [J]. BMC Genomics, 2012, 13(1): 316-316.
- [16] 战爱斌. 栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 微卫星标记的筛选及应用 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2007.
- [17] HEDGECK D, LI G, HUBERT S, et al. Widespread null alleles and poor cross-species amplification of microsatellite DNA loci cloned from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* [J]. Journal of Shellfisheries Research, 2004, 23: 379-385.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 张子平)