

胭脂鱼微卫星富集文库的构建及其应用前景展望

杨 钟¹, 史 方^{1,2}, 阙延福¹, 熊美华¹, 徐 念^{1,2}, 朱 滨¹

(1. 水利部中国科学院水工程生态研究所, 湖北 武汉 430079; 2. 中国科学院水生生物研究所, 湖北 武汉 430072)

摘要: 以湖北武汉和四川宜宾人工增殖放流的胭脂鱼子一代酒精浸泡鳍条样本为材料, 提取完整基因组 DNA, 选用人工合成的生物素标记 (AAAG)₇ 探针, 采用 FIASCO (fast isolation by AFLP of sequences containing repeats) 磁珠富集法构建胭脂鱼 (*Myxocyprinus asiaticus*) 微卫星富集文库。以 MseI - N 引物组和设计合成的微卫星核心序列引物 (AAAG)₅, 用双引物 PCR 法筛选含有微卫星的阳性克隆, 从 54 个阳性克隆中共获得 22 个微卫星序列, 其中完美型 (perfect) 共 15 个 (占 68.2%), 非完美型 (imperfect) 6 个 (占 27.3%), 混合型 (compound) 1 个 (占 4.5%); (AAAG/TTTC)_n 序列在胭脂鱼的基因组 DNA 中含量非常丰富。根据微卫星侧翼序列最终设计并合成了 18 对胭脂鱼微卫星引物, 经其有效性检验后, 可应用于胭脂鱼遗传多样性、种群遗传结构等进一步研究及人工增殖放流效果评估。

关键词: 胭脂鱼; 微卫星; 富集文库

中图分类号: Q343 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 3075 (2009) 02 - 0107 - 06

微卫星 (microsatellite) DNA 标记又称 SSR (simple sequence repeats) 标记或 STR (simple tandem repeat) 标记, 是指以少数几个核苷酸 (1 ~ 6 个) 为单位多次重复的简单序列, 是近年来发展起来的新一代分子标记技术。微卫星广泛存在于真核生物及少数原核和真核细菌的基因组中, 真核生物基因组中每隔 10 ~ 50kb 就存在 1 个微卫星标记。微卫星具有多态信息含量高、等位基因数目多且重复性好、共显性遗传、选择中性、服从孟德尔遗传规律、分析简便等优点 (Tautz D, 1989; Weber J L & May P E, 1989; 薛辉等, 2005), 已经广泛应用于不同群体的划分、个体间亲缘关系鉴定、品种鉴定、种群遗传多样性分析、遗传疾病诊断、基因定位、遗传连锁图谱的构建等研究领域 (Brook et al, 1994; Bruford M W & Wyne R K, 1993; Chen X et al, 1997; O'Connell M & Wright J, 1997; 张云武和张亚平, 2001)。作为一种极具应用价值的分子遗传标记, 近年来在濒危物种种群及保护遗传学研究中得到越来越多的应用, 尤其在种群遗传结构分析、辅助种群调查、揭示物种进化史等方面表现出了强大的优势 (Houlden et al, 1996; Rooney et al, 1999; 黄磊和王义权, 2004)。

胭脂鱼 (*Myxocyprinus asiaticus*) 属鲤形目、胭脂

鱼科或称亚口鱼科、胭脂鱼属, 俗称火烧鳊、黄排、燕雀鱼等, 属江湖洄游性鱼类, 生活于我国长江的干支流和附属湖泊以及闽江水系。全世界现知该科鱼类共有 14 属, 80 种, 绝大多数种类分布于北美洲 (Nock K et al, 1996; Turner B J, 1984), 而胭脂鱼是在我国和亚洲大陆唯一分布的单型属、种 (汪松等, 1998)。

20 世纪 70 年代之前, 胭脂鱼曾经是长江上游大型重要经济鱼类之一, 在渔获物中占有较大的比例, 由于过度捕捞、水域污染、水利工程建设等人为因素的影响, 其资源量急剧下降, 一些原分布地的天然种群已经绝迹, 近年来的调查表明, 闽江水系已经很难发现胭脂鱼的踪迹, 长江胭脂鱼可能是现存的中国胭脂鱼唯一的野生种群。1998 年胭脂鱼被列入我国重点保护野生动物名录, 并被定为国家 II 类野生保护动物 (张春光等, 2000)。就目前胭脂鱼所处的环境和资源状况来看, 加强长江胭脂鱼人工放流的增殖方式将是避免其资源进一步减少, 并使其资源得以比较快地恢复与增殖的最有效途径。但人工放流工作如果在没有考虑其物种遗传背景的情况下进行, 则具有较大的盲目性和随意性, 由此带来的人工放流个体对天然群体的遗传多样性和种群结构的短期影响和长期效应, 则急需要用可靠手段如分子标记等加以评价。我国已有学者通过 RAPD、PCR - RFLP 和线粒体等标记技术对中国胭脂鱼的遗传结构进行了初步的探讨, 但得到的多态性引物较少 (孙玉华等, 2002; 孙玉华等, 2003; Sun Yuhua & Liu Siyang, 2004; 杨星等, 2006)。Tranah 等 (2001)

收稿日期: 2009 - 03 - 02

基金项目: 国家自然科学基金重大项目 (30490234); 武汉市青年科技晨光计划项目 (200850731366)。

通讯作者: 朱滨。E-mail: zhubin@mail. ihe. ac. cn

作者简介: 杨钟, 1982 年生, 男, 湖南津市人, 研究实习员, 研究方向为鱼类生态与保护遗传学。

首次在亚口鱼类 *Deltistes luxatus* 上获得了4属、5个种的82对多态微卫星引物,但孙玉华(2004)挑选其中16对引物用于中国胭脂鱼群体的多样性分析,仅3对具多态性,可见美国 *Deltistes luxatus* 上开发的微卫星引物仅少数可以与中国胭脂鱼共享。因此,建立胭脂鱼高度多态性微卫星 DNA 富集文库,全面系统地开发中国胭脂鱼特有的微卫星引物是十分必要的,其研究成果将不仅有助于科学地指导现行胭脂鱼人工繁殖放流工作,还可以为水利工程造成的阻隔和生境缩小等环境胁迫对胭脂鱼的长期生态学效应及其物种适应机制的研究提供基础数据,同时也对我国其它濒危水生野生动物保护的科学规划具有借鉴意义。

1 材料和方法

1.1 实验材料和基因组 DNA 的提取

本研究所用的胭脂鱼样本于2008年4月采自湖北省良种场和四川水产研究所人工增殖放流的子一代,均为室温保存的无水乙醇浸泡鳍条样本。取胭脂鱼样品的鳍条约2 cm²(为了满足文库的多样性,2个地方的样本混合在一起处理),在EP管中将样本尽量剪碎,向管中加入1 mL细胞裂解液,再加入50 μL的10% SDS(终浓度为0.5%),加入6 μL的蛋白酶K(终浓度为100 μg/mL),混匀后于55℃水浴中消化至完全。用平衡酚抽提至界面无蛋白残余,再用氯仿异戊醇抽提2次以去除残留的酚。吸出最后一次抽提的上清液,加入2倍体积的100%冰冻乙醇,反复摇动以沉淀DNA后,再分别用70%乙醇和100%乙醇洗涤2次,最终将其溶于TE8.0中,-20℃保存。

1.2 胭脂鱼微卫星富集文库的构建

富集文库的构建按Zane等(2002)描述的FI-ASCO(fast isolation by AFLP of sequences containing repeats)方法进行,在一定量的胭脂鱼基因组DNA中加入限制性内切酶 *MseI* 于37℃水浴进行酶切消化,选200~800 bp的酶切片段,在T4连接酶的作用下,加上Oligo-*MseI*人工接头(OligoA:5'-TACTCAGGACTCAT-3'和OligoB:5'-GACGAT-GAGTCCTGAG-3'的复性产物);10倍稀释的连接反应液在11个循环扩增后,其产物再与杂交缓冲液及生物素探(AAAG)₇混匀后,于95℃变性15 min,再于水浴60℃杂交2 h、58℃杂交1 h和56℃下杂交30 min,取出室温冷却后,加入磁珠进行杂交,经过非特异性和特异性洗脱后,得到溶解于TE8.0的

目的洗脱片段;通过精制和扩增后,得到的微卫星富集片段连接到Promega公司提供的pGEM-T Vector System I载体,最后转化到大肠杆菌感受态细胞中,涂布于已添加X-gal的氨苄青霉素LB平板上,37℃培养过夜;用无菌的牙签挑取白色单菌落,接入1.5 mL离心管,以200 r/min于37℃恒温振荡器中振荡培养过夜后,-70℃超低温保藏备用,最终建立AAAG/TTTC重复的微卫星富集文库。

1.3 PCR法筛选含微卫星序列的阳性克隆及测序

用 *MseI*-N引物序列[5'-GATGAGTCCTGAG-TAAN-3'(N=A, T, C, G)]及探针(AAAG)₅作引物,以文库中菌液作模板,进行PCR扩增,出现2条或2条以上扩增带的克隆,则有可能含有重复序列的微卫星。含有微卫星的阳性克隆用ABI 3730DNA Sequencer(Applied Biosystems)测序仪测序,测序中使用的引物和反应试剂分别是M13+通用引物和BigDye termination(Version 3.0, Perkin-Elmer Applied Biosystems)。对于含有较好重复片断的序列,用M13-引物从另外一段进行测序,并将正反测序结果进行拼接,以确保序列的准确性。

1.4 微卫星引物的设计和合成

使用软件TRF(tandem repeat finder, version 3.21;Benson,1999)和SSRHunter1.3,从得到的测序结果中查找出含有重复单元的微卫星序列,分析微卫星特征并将序列提交至GenBank做Blast,判断本研究分离出来的微卫星座位是否与从其它鱼类分离的结果属同一座位;然后根据微卫星序列两端足够长的侧翼序列,用在线引物设计软件Primer3(v.0.4.0)、Premier primer 5.0和Oligo 6设计引物。经过软件设计得到的微卫星引物由上海生工合成(PAGE纯化,50D)。合成好的引物用灭菌双蒸水溶解并稀释成终浓度为20 μM的溶液,置于-20℃保存备用。

2 结果与分析

2.1 胭脂鱼基因组 DNA 的大小

所取样本为浸泡于无水乙醇中的胭脂鱼新鲜鳍条,可见其基因组DNA保存完整,且在2 000 bp以上(图1)。其中,M为marker,1和2分别为稀释20倍和50倍胭脂鱼基因组DNA。经分光光度计(Eppendorf Biophotometer)测定,其A₂₆₀/A₂₈₀的比值为1.81,即表明DNA纯度高,无蛋白质或者酚类物质的影响;其A₂₆₀/A₂₃₀的比值为2.14,即DNA较纯净,没有受到碳水化合物、多肽、苯酚等污染物的影响;

其 A_{320} 的数值为 0.000, 即表明为纯样品, 无干扰因子。

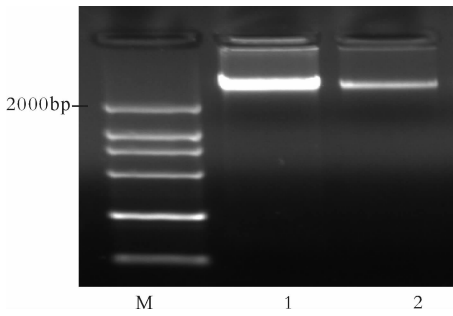


图1 胭脂鱼基因组 DNA

Fig.1 Genomic DNA obtained from Chinese sucker

2.2 PCR 法筛选含微卫星的阳性克隆

本实验共得到 54 个重组阳性克隆, 用 *Mse*I - N 引物序列和微卫星核心序列引物 (AAAG)₅ 对其进行 2 次 PCR 扩增, 共筛选得到 22 个含有微卫星核心序列的 PCR 阳性克隆。图 2 为 2 次 PCR 筛选电泳对比图 (M 泳道为 100 bp Ladder), 上部分为 *Mse*I - N 引物扩增得到的结果, 下部分为双引物同时扩增得到的结果。由图 2 可知, 泳道 3 号和 6 号克隆双引物扩增的结果较单引物扩增结果均出现了新的条带, 另外, 12 号克隆的 2 次扩增结果在上下的位置不一致, 说明 3、6 和 12 号克隆可能含有微卫星位点。

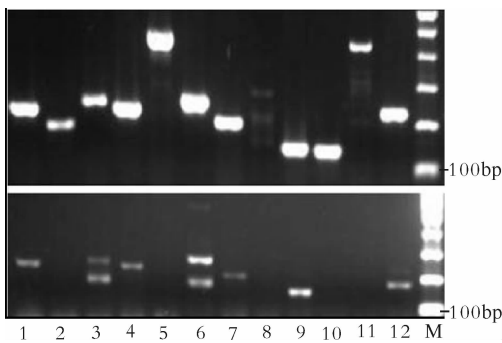


图2 PCR 法筛选胭脂鱼微卫星序列

Fig.2 PCR screening clones containing microsatellites in Chinese sucker

2.3 阳性克隆的测序及序列分析

根据 Weber (1990) 提出的标准, 微卫星序列总体上可分为 3 类, 即完美型 (perfect)、非完美型 (imperfect) 和混合型 (compound)。本实验共获得的 22 个微卫星序列按照上述标准分类, 其结果为完美型 15 个, 占 68.2%; 非完美型 6 个, 占 27.3%; 混合型 1 个, 占 4.5%。除 1 个完美型为二碱基重复、1 个混合型为四碱基重复和二碱基重复混合外, 其它完美型和非完美型的微卫星序列均为四碱基重复, 且

主要为 (AAAG)_n 和 (TTTC)_n 重复 (图 3)。如果按照重复单元的类型进行分类, 则四碱基重复的微卫星序列共有 21 个, 占总数的 95.5%; 二碱基重复的微卫星序列仅 1 个, 占总数的 4.5%; 三碱基重复序列没有在此次实验中发现。进一步分析发现, 重复次数在 5 ~ 10 次的共有 16 个, 占 72.7%; 重复次数在 10 以上的有 6 个, 所占比例分别为 27.3%。

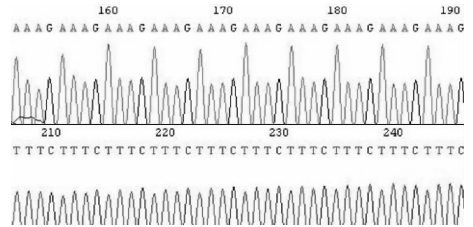


图3 胭脂鱼基因组中微卫星特征的重复序列

Fig.3 Repeat sequences in Chinese sucker genomic microsatellite

2.4 微卫星引物的设计

将测序得到的 22 个胭脂鱼微卫星在 GenBank 上进行 Blast, 没有发现与之相同的微卫星座位, 表明这 22 个座位均为新的微卫星座位。其中除 4 个微卫星由于侧翼序列太短而不能设计引物外, 最终选择、设计得到 18 对胭脂鱼微卫星引物 (表 1)。

3 讨论和展望

本研究首次成功构建的胭脂鱼微卫星富集文库, 对筛选胭脂鱼特有的微卫星及开展胭脂鱼微卫星研究具有十分重要的理论意义和实践价值。从所获得的 18 对胭脂鱼微卫星引物中筛选出鉴别能力较强的微卫星位点, 经有效性检验后, 可应用于种质鉴定和遗传结构分析等, 从而获得胭脂鱼长江种群遗传多样性和遗传结构的本底资料, 将为胭脂鱼遗传连锁图谱的构建、辅助育种、群体遗传学分析、基因组结构分析以及分子进化研究等提供大量的分子标记。

物种保护之目的是尽最大可能维持种内遗传变异水平, 维持物种进化潜力。从某种意义上说, 种质资源的保护就是保护物种的遗传多样性。种内遗传多样性或变异性愈丰富, 物种对环境变化的适应能力愈强, 其进化的潜力也就愈大, 有助于保护物种和水域生态系统的多样性, 或可以减慢由于适应和进化所导致的灭绝过程。濒危动物大多是典型的小种群, 易发生遗传漂变而导致多样性丢失, 因此, 濒危动物保护的关键是保护物种的遗传多样性。切实有效的保护策略和措施的制定必须建立在对濒危物种

表1 胭脂鱼微卫星核心序列及其引物

Tab.1 Microsatellites repeat motifs and relevant primers of Chinese sucker

克隆编号 Clone No.	核心序列 Core repeat sequence	引物序列(5' - 3') Primer sequences	退火温度/°C Temperature	大小/bp Size
YZY1 - 8	(AAGA) ₃ TAGA(AAGA) ₆	F: AAGTAACTGAGGGTAAGG R: TCACTATCTCGGGATCT	54	81
YZY1 - 17	(CTTT) ₆	F: TGCATAGATCTTTGGAGCAGTG R: CGTAATGTGAAGCCGACGTA	58	106
YZY1 - 22	(TTTC) ₅	F: AATGCAAGGGTCTCTGATGG R: AACAAATGTAGCAGGGACTCTCA	58	194
YZY1 - 27	(TTCT) ₂ (T) ₃ (TTCT) ₁₁	F: CAATCAACAGACCCGTGCTA R: TGAACCTAATTCCTCAAAGAGTGAGAG	58	165
YZY1 - 29	(GT) ₁₃	F: ACCAGTCAATGGCGTCTACC R: CTCGCTGGACGAGTTGAGAT	60	184
YZY1 - 30	(AGAA) ₈	F: AGAGGCAGAACAAACAAGG R: CAAATGAGGCATACTGTGA	54	101
YZY1 - 36	(T) ₆ C(T) ₅ (CTTT) ₄ TTC(T) ₁₂	F: CCCACAGAAAATAGCCCTGAG R: ACAGCAACACCTTGCACACC	58	197
YZY1 - 45	(TCTT) ₁₀	F: ATACTGCTTATAACCCTGCTA R: CCTTGAAACACCTCCTCT	54	205
YZY1 - 58	(TTTC) ₅	F: CGAAAAATCATCCGGTCTTTTC R: AACAGCACGAGGTCACGACT	58	169
YZY1 - 79	(TTTC) ₉	无	无	无
YZY1 - 95	(AAGA) ₅	F: GCTGCCTAACATCACCTT R: CTGTATCCTTTACTCACC	55	98
YZY1 - 100	(GAAAA) ₂ (A) ₂ (AAAG) ₆ (A) ₆	F: GCTGTAGCGCTCATGTCTGT R: CAGACCAGCAGTGTGATTCAA	59	151
YZY1 - 109	(AAGA) ₅ AAGG(AAGA) ₅	F: AAGGAAGTGAGGAAGGAAGGA R: GTTGACAGTCGGGAACCATT	58	212
YZY1 - 116	(CTTT) ₂ CT(CTTT) ₉	无	无	无
YZY1 - 124	(AAAG) ₅	F: CAGTCCCTGTAAACCATC R: TACCTTTGTTCTCTTCTCATC	55	89
YZY1 - 133	(AAGA) ₆	F: CGAAGGTAATGGCATCAATC R: TCGCACTGGAAAAGGGACT	56	120
YZY1 - 135	(GAAA) ₈	无	无	无
YZY1 - 138	(TCTT) ₉	无	无	无
YZY1 - 140	(TCTT) ₅ (TC) ₂₆	F: TCTTGCTATCACGGTCGATG R: GGGCTGTCCGATAAAAACAAT	56	201
YZY1 - 144	(AGAA) ₁₁	F: TCCGACTCCTCTATGGATCTG R: TCCTATGCCTCTGCATACCC	60	110
YZY1 - 150	(AGAA) ₅	F: AGACCAAATAAACAAAAC R: GGAGGGAGAAGCCATACT	51	290
YZY1 - 154	(CTTT) ₇	F: CCCTGGATAAACTTGGTGGT R: CTTTCATGGAAGCTGACCTGTT	58	150

遗传多样性水平和种群遗传结构充分了解的基础上,否则任何物种水平上的保护活动都可能成效不大。国内在对胭脂鱼保护遗传学和分子生态学方面的研究有了一定的基础,但仍缺乏系统性和完整性,尤其是缺乏长江胭脂鱼种群遗传变异的底本资料,通过本研究所建立的胭脂鱼微卫星分子标记便可获得这些基础数据,不仅能为进一步研究中国胭脂鱼不同地理种群之间的遗传分化奠定基础,还将为开展对这一珍稀濒危鱼类的遗传多样性修饰、遗传育种和繁殖保护工作提供科学依据。

水利工程建设导致的生境破碎和阻隔效应对生物遗传多样性和群体遗传结构的改变和影响,是近年来在国内外广泛关注和存在争议的焦点问题。葛洲坝枢纽工程和三峡水利枢纽建设后,胭脂鱼在坝的上游和下游虽仍存在可自然繁殖的群体,但葛洲坝和三峡工程的阻隔可能会影响不同群体之间的基因交流。同时,目前长江胭脂鱼种群不能完全依靠自然繁殖维持,而是以人工放流作为资源保护和增殖的主要手段。鉴于中国胭脂鱼种质资源现状,在种群复壮的过程中,应注意加强提高胭脂鱼后代群

体的遗传多样性。但在实行人工放流的过程中,仍有很多问题需要进一步研究解决,特别是要注意近亲交配现象的发生,应加强种质资源的管理,保证放流鱼苗的质量,提高种苗在野生环境下的成活率。为避免人工繁殖过程中随机交配的盲目性,建立可靠的遗传谱系和制定科学的繁殖策略很重要,而微卫星高度的变异性使其在一个座位上可形成很多个等位基因,在群体中表现出丰富的多态性,十分适用于个体水平的亲子鉴定与交配系统等研究(Jarne P & Lagoda P J,1996)。张亚平等(1995)用筛选的10个微卫星座位成功地对大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)进行了亲子鉴定,并澄清了2组未知的父子关系,为饲养大熊猫遗传谱系的建立奠定了基础。因此,在胭脂鱼人工养殖过程中,通过高度多态的微卫星分子标记来选择遗传变异较大的个体作为亲鱼群体,以丰富胭脂鱼后代群体的遗传多样性,这对于合理规划人工繁殖放流工作、建立胭脂鱼全人工种群、品种改良等都有着不可或缺的意义。

参考文献:

黄磊,王义权.2004.微卫星分子标记在濒危动物保护遗传学中的应用[J].生物多样性,12(5):528-533.

孙玉华,王伟,刘思阳,等.2002.中国胭脂鱼线粒体控制区遗传多样性分析[J].遗传学报,29(9):787-790.

孙玉华,刘思阳,彭智,等.2003.中国胭脂鱼种群的遗传分析[J].水生生物学报,27(3):248-252.

孙玉华.2004.中国胭脂鱼遗传多样性及亚口鱼科分子系统学研究[D].武汉:武汉大学.

汪松,乐佩琦,陈宜瑜.1998.中国濒危动物红皮书-鱼类[M].北京:科学出版社.

薛辉,吴孝兵,晏鹏.2005.微卫星标记在分子生态学中的应用及其位点的分离策略[J].应用生态学报,16(2):385-389.

杨星,杨军峰,汤明亮,等.2006.长江中国胭脂鱼群体的遗传分化[J].武汉大学学报(理学版),52(4):503-507.

张春光,赵亚辉,康景贵.2000.我国胭脂鱼资源现状及其资源恢复途径的探讨[J].自然资源学报,15(2):155-159.

张亚平,王文,宿兵,等.1995.卫星DNA以及大熊猫的亲子鉴定[J].动物学研究,16:301-306.

张云武,张亚平.2001.微卫星及其应用[J].动物学研究,22(4):315-320.

Brook A L, Cook D, Paul B, et al. 1994. Organization of microsatellites differs between mammals and cold-water teleost fishes [J]. Can. J Fish Aquat Sci, 51: 1959-1966.

Bruford M W & Wayne R K. 1993. Microsatellites and their ap-

plication to population genetics [J]. Curr Opin Genet Dev, 3: 939-943.

Chen X, Temnykh S, Xu Y, et al. 1997. Development of a microsatellite framework map providing genom-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Theor Appl Genet, 5: 557-567.

Houlden B A, England P R, Taylor A C, et al. 1996. Low genetic variability of the koala (*Phascolarctos cinereus*) in south-eastern Australia following a severe population bottleneck [J]. Mol Ecol, 5(2): 269-281.

Jarne P & Lagoda P J. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back [J]. Trends in Ecology and Evolution, 11: 424-429.

Noack K, Zardoya R, Meyer A. 1996. The complete mitochondrial DNA sequence of the Bichir (*Polypterus ornatipinnis*), a basal ray-finned fish: ancient establishment of the consensus vertebrate gene order [J]. Genetics, 144: 1165-1180.

O'Connell M & Wright J M. 1997. Microsatellite DNA in fishes [J]. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 7: 331-363.

Rooney A P, Honeycutt R L, Davis S K, Derr J N. 1999. Evaluating a putative bottleneck in a population of bowhead whale from patterns of microsatellite diversity and genetic disequilibria [J]. Mol Evol, 49: 682-690.

Sun Yuhua & Liu Siyang. 2004. Genetic Structure of Chinese Sucker Population *Myxocyprinus asiaticus* in the Yangtze River Based on Mitochondrial DNA Marker [J]. Fisheries Science, 70: 413-421.

Tautz D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers [J]. Nucleic Acid Research, 17: 6463-6471.

Tranah G J, Agresti J, May B. 2001. New microsatellite loci for suckers (Catostomidae): Primer homology in *Catostomus*, *Chasmistes*, and *Deltistes* [J]. Molecular Ecology Notes, 1: 55-60.

Turner B J. 1984. Evolutionary Genetics of Fishes [M]. New York: Plenum Press.

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

Weber J L & May P E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction [J]. American Journal of Human Genetics, 44: 388-396.

Zane L, Bargelloni, Pataenello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review [J]. Molecular Ecology, 11: 1-16.

Construction of Microsatellite Library Enriched and its Application Prospect in Chinese sucker (*Myxocyprinus asiaticus*)

YANG Zhong¹, SHI Fang^{1,2}, QUE Yan-fu¹, XIONG Mei-hua¹, XU Nian^{1,2}, ZHU Bin¹

(1. Institute of Hydroecology MWR & CAS, Wuhan 430079, China;

2. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: This research gets the fins of Chinese sucker from Wuhan city of Hubei province and Yibin city of Sichuan province, which are belong to releasing generation one. We have extracted the whole genomic DNA from these tissues. The enriched microsatellite library of Chinese sucker were constructed by FIASCO (Fast Isolation by AFLP of Sequences containing repeats) magnetic beads method, using the biotin-labeled probe (AAAG)₇ by artificial synthesization. 22 microsatellites in 54 recombinant positive clones were obtained through PCR screening the library with *Mse*I-N primers and simple tandem repeats primer (AAAG)₅. Among these microsatellites, there were 15 perfect ones (68.2%), 6 imperfect ones (27.3%) and 1 compound ones (4.5%). The results indicated that microsatellite sequences characterized by (AAAG/TTTC)_n were abundant in genomic DNA of Chinese sucker. Among the 22 microsatellite sequences, 18 pairs of primers were designed to analyze genomic DNA of Chinese sucker according to unique microsatellite flanking sequences with the software Primer3, Premier primer 5.0 and Oligo 6. After testing their validity, these microsatellite primers can be used to further study the genetic diversity, population genetic structure and assess the artificial propagation releasing effect in Chinese sucker.

Key words: Chinese sucker; microsatellite; enriched library