

# 义乌小鲵微卫星位点的跨种扩增

刘盼, 陈雅琴, 邵晨, 王宇\* (浙江师范大学化学与生命科学学院, 浙江金华 321004)

**摘要** [目的] 筛选具有多态性的义乌小鲵(*Hynobius yiwuensis*)微卫星位点。[方法] 采用跨种扩增的方法从安吉小鲵(*H. amjiensis*)和中国小鲵(*H. chinensis*)的113个微卫星位点中筛选具有多态性的义乌小鲵微卫星位点。[结果] 筛选出11个具有多态性的义乌小鲵微卫星位点。这些多态性微卫星位点的等位基因数为2~6个(平均3.55), 观察杂合度为0.200~1.000(平均0.510), 期望杂合度为0.500~0.732(平均0.662), 多态信息含量为0.375~0.737(平均0.588)。[结论] 筛选得到的具有多态性的11个义乌小鲵微卫星位点可应用于其种群遗传学和保护遗传学的研究。

**关键词** 义乌小鲵; 微卫星; 跨种扩增; 多态性

中图分类号 Q 959.5<sup>3</sup> 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)20-0083-03

## Cross-species Amplification of Microsatellite Loci for *Hynobius yiwuensis*

LIU Pan, CHEN Ya-qin, SHAO Chen et al (College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua, Zhejiang 321004)

**Abstract** [Objective] To screen the polymorphic microsatellite loci of *Hynobius yiwuensis*. [Method] Polymorphic microsatellite loci of *H. yiwuensis* were developed from 113 microsatellite loci from *H. amjiensis* and *H. chinensis* using cross-species amplification. [Result] 11 polymorphic microsatellite loci of *H. yiwuensis* were developed. The number of alleles, observed and expected heterozygosities and polymorphic information content of these polymorphic loci were ranged from 2 to 6 with an average of 3.55 alleles per locus, 0.200 to 1.000 (average 0.510), 0.500 to 0.732 (average 0.662) and 0.375 to 0.737 (average 0.588), respectively. [Conclusion] These 11 polymorphic microsatellite loci of *H. yiwuensis* can be used in population genetic and conservation genetic researches.

**Key words** *Hynobius yiwuensis*; Microsatellite; Cross-species amplification; Polymorphism

微卫星(microsatellite)又称简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)或短串联重复序列(short tandem repeats, STRs),是广泛存在于真核生物基因组中的一种特殊序列,主要由1~6个核苷酸的串联重复单元组成<sup>[1]</sup>。由于微卫星具有高度的多态性、呈共显性标记、选择中性及相对较高的突变速率等特征,而被广泛应用于物种种群遗传结构<sup>[2]</sup>、基因流及进化史分析,物种分类和亲缘关系鉴定和种群数量调查等<sup>[3]</sup>方面。

义乌小鲵<sup>[4]</sup>(*Hynobius yiwuensis*)隶属于两栖纲(Amphibia)、有尾目(Caudata)、小鲵科(Hynobiidae)、小鲵属(*Hynobius*),是我国特有种。目前该鲵仅分布于浙江地区(舟山、镇海、萧山、义乌、温岭、江山)海拔100~200 m植被较繁茂的丘陵山区<sup>[5]</sup>。近年来,适宜于义乌小鲵栖息的生境不断丧失或被破坏,导致义乌小鲵种群数量急剧下降,其被国际自然保护联盟红色名录(IUCN Red List)<sup>[6]</sup>和中国脊椎动物红色名录<sup>[7]</sup>列为易危等级。当前对义乌小鲵的研究多集中于对物种分类地位<sup>[4]</sup>、组织学<sup>[8]</sup>和基本遗传学<sup>[9-10]</sup>的探讨,在物种遗传多样性、物种种群的遗传结构以及基因流等种群遗传学方面的研究鲜见报道。为保护该物种,同时为发掘该物种的遗传资源,并为后续物种遗传现状的评估提供重要的技术支持,笔者拟通过采用跨种扩增的方法,从安吉小鲵(*H. amjiensis*)和中国小鲵(*H. chinensis*)已有微卫星位点中筛选出具有多态性的义乌小鲵微卫星位点,以期通过这些位点很好地反映义乌小鲵的种群结构、遗传多样性、有效种群大小以及基因流等保护遗传学和种群遗传学信息。

## 1 材料与方法

**1.1 样本采集** 于2015年1月在浙江舟山岛不同样点不同卵带中分别采集2~3枚义乌小鲵卵粒样本,共采集到30个卵带中的76枚卵粒。将采集到的卵粒保存在盛有无水乙醇的离心管中,并将其余的卵粒原地放回,将样本带回实验室用于DNA提取。

**1.2 基因组DNA的提取** 取30个不同卵带中的卵粒各1枚,用无菌水清洗3~4次后剪碎,再用经典的Sambrook<sup>[11]</sup>基因组DNA提取方法从卵粒中提取基因组DNA。

**1.3 微卫星备择位点的选取** 通常,跨种扩增微卫星位点选取自与目标研究物种亲缘关系较近的物种。在该研究中,100个安吉小鲵(*H. amjiensis*)微卫星位点(未发表)和13个中国小鲵(*H. chinensis*)微卫星位点(NCBI上已发表)被用于义乌小鲵微卫星位点的开发中。

**1.4 微卫星位点的检测** 为避免由于等位基因丢失所造成的无效PCR扩增,该研究以义乌小鲵8个基因组DNA为混合模板,对上述113个备择位点进行温度梯度(48~62℃)和Mg<sup>2+</sup>浓度梯度(1.5、2.0、2.5 mmol/L)的PCR扩增反应。反应体系如下:10×PCR buffer 2 μL; Mg<sup>2+</sup>(25 mmol/L)3个梯度分别为1.2、1.6和2.0 μL; dNTP(2.5 mmol/L)1.6 μL; 上游和下游引物(10 μmol/L)各0.4 μL; 模板DNA 0.8 μL; rTaq(5 U/μL)0.16 μL; 双蒸水补足至20 μL。PCR反应条件为95℃预变性4 min; 95℃变性30 s, 退火30 s, 72℃延伸30 s, 35个循环; 最后72℃延伸7 min。

上述PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后,将得到单一条带的位点进行多态性检验。以30个不同卵带的义乌小鲵卵粒基因组DNA为模板进行PCR扩增,反应体系和反应条件同上,仅改变退火温度为上述位点初筛时所得单一条带时确定的温度。PCR产物用6%变性聚丙烯酰胺凝胶电

基金项目 浙江省自然科学基金项目(LQ14C040001)。  
作者简介 刘盼(1992—),女,山东潍坊人,硕士研究生,研究方向:动物学。\*通讯作者,讲师,从事动物学研究。  
收稿日期 2018-04-10

泳,经银染<sup>[11]</sup>等过程进行检测。

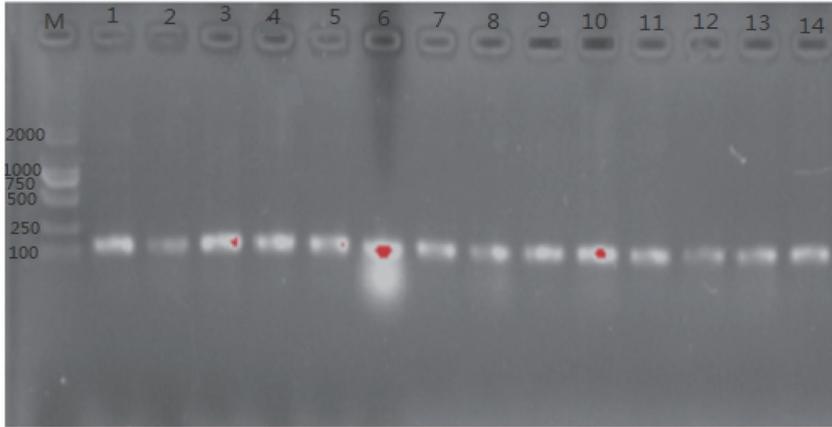
**1.5 等位基因有效性再确认** 将经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测后含多态性的位点合成具有荧光标记的上游引物(FAM和HEX修饰),PCR扩增具有特定等位基因片段的个体,经SSR分型和测序确认微卫星等位基因的有效性、片段大小以及各等位基因的序列组成。

## 2 结果与分析

**2.1 DNA提取结果** 试验提取的30个义乌小鲵卵粒基因组DNA经NanoDrop(Thermo Scientific Inc.)检测其浓度为122.7~248.5 ng/ $\mu\text{L}$ ,OD<sub>260/280</sub>介于1.8~1.9,表明DNA的浓度

和纯度均较好。

**2.2 微卫星引物筛选结果** 在备选的113对近缘物种的引物中,有52对引物得到了单一、稳定的扩增条带,占据总数的46.0%。来自安吉小鲵的100对引物中共有50对引物可以进行稳定的特异性扩增,约占总数的50.0%;来自中国小鲵的13对引物中,仅有2对可以进行特异性的稳定扩增,约占总数的15.4%,较安吉小鲵来说,比例较低。而其余的61个位点中,有11个位点(9.7%)出现了非特异性的扩增,50个位点(44.2%)显示并无具体的扩增产物产生。用1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果,结果如下(图1)。



注:M.DL2000 DNA分子量标准;1~14号为样本编号

Note:M.DL2000 DNA marker;1-14.Sample No.

图1 微卫星引物Hyyi62的部分PCR扩增电泳结果

Fig.1 Partial PCR amplification electrophoresis results of microsatellite primer Hyyi62

**2.3 具有多态性的微卫星位点筛选结果** 在上述可获得单一、稳定扩增条带的52个微卫星位点中,经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测和微卫星分型及测序,共获得具有多态性的微

卫星位点11个,占总数的21.2%(表1)。图2为引物Hyyi70的STR扫描测序结果。

表1 义乌小鲵的多态性微卫星位点

Table 1 Polymorphic microsatellite loci of *H. yiwuensis*

位点 Loci	重复片段 Repeat fragment	片段大小 Fragment size//bp	退火温度 Annealing temperature// $^{\circ}\text{C}$	等位基因数 Number of alleles	观测杂合度 Observed heterozygosity	期望杂合度 Expected heterozygosity	多态信息含量 Polymorphic information content
Hyyi04	(TGTA) <sub>6</sub>	252~264	60.0	4	0.793	0.712	0.618
Hyyi05	(AT) <sub>7</sub>	488~496	59.5	2	1.000	0.500	0.375
Hyyi38	(CAT) <sub>5</sub>	284~290	60.1	3	0.400	0.659	0.660
Hyyi40	(AGC) <sub>10</sub>	120~132	60.0	4	0.733	0.664	0.641
Hyyi55	(TAT) <sub>6</sub>	152~161	59.5	4	0.233	0.732	0.737
Hyyi56	(TCA) <sub>5</sub>	100~112	60.0	3	0.467	0.647	0.387
Hyyi62	(AC) <sub>5</sub> -(AC) <sub>5</sub>	166~178	59.0	3	0.276	0.646	0.573
Hyyi63	(AG) <sub>10</sub>	238~246	60.0	3	0.467	0.656	0.489
Hyyi70	(CT) <sub>7</sub> -(CT) <sub>6</sub>	262~274	63.1	3	0.200	0.653	0.586
Hyyi83	(CTG) <sub>10</sub>	323~344	61.3	6	0.241	0.703	0.700
Hyyi97	(GT) <sub>9</sub>	337~349	59.0	4	0.800	0.712	0.706

## 3 讨论

利用微卫星重复序列两端相对保守的侧翼序列来进行跨物种微卫星位点的筛选是开发物种特异微卫星位点的方法之一。该方法由于具有开发时间短、花费相对较少、成功率高等特点而被广泛应用于脊椎动物各类群和昆虫的研究中。如董颖等<sup>[12]</sup>通过跨种扩增在赤点石斑鱼(*Epinephelus*)中成功筛选到12个具有多态性的微卫星位点;黄族豪

等<sup>[13]</sup>利用家鸡(*Gallus gallus*)的微卫星位点对灰胸竹鸡(*Bambusicola thoracica*)进行跨种扩增,最终得到10个多态位点;利用大鼠(*Rattus norvegicus*)和小鼠(*Mus musculus*)已知的微卫星位点在黄毛鼠(*R. lossea* Swinhoe)中筛选到8个多态性微卫星位点<sup>[14]</sup>;而已知的21个中华鳖(*Trionyx sinensis*)的微卫星位点则可用于8个近缘物种的跨物种扩增<sup>[15]</sup>;此外,陈东海等<sup>[16]</sup>和Kim等<sup>[17]</sup>分别在两栖动物虎纹蛙(*Hoplo-*

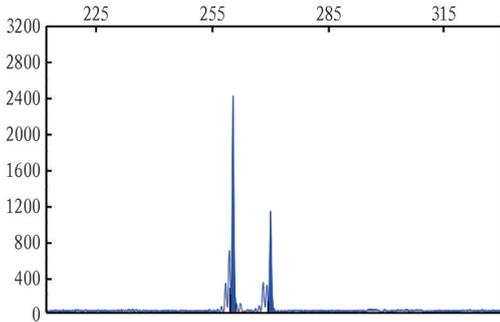


图2 引物 Hyyi70 的 STR 扫描结果

Fig.2 STR scanning result of primer Hyyi70

*batrachus chinensis*) 和昆虫小红蜻蜓 (*Nannophya pygmaea*) 中通过跨种扩增获得了物种特异的微卫星位点。该研究通过利用 113 个安吉小鲵和中国小鲵的微卫星位点成功筛选得到 11 个具有多态性的义乌小鲵微卫星位点,这也再次证明了跨物种筛选是获取物种特异微卫星位点的重要方法。

然而,对于不同的目标物种,其跨种扩增的成功率却有显著差异。如在哺乳动物中,其微卫星位点的跨种扩增成功率为 56% 左右<sup>[18]</sup>;在鸟类的微卫星跨种扩增研究中其成功率约为 91%<sup>[19]</sup>;而在蛙类中其成功率仅为 11%~29%<sup>[20]</sup>。导致不同类群微卫星位点跨种扩增成功率相差较大的原因可能是:①不同类群物种的基因组大小相差较大,两栖动物的基因组大小约是哺乳类的 2 倍,鸟类的 4 倍。物种的基因组越大,其基因序列相似性的概率越低,其跨种扩增的成功率就越低。因此,不同类群物种进行微卫星位点的跨物种扩增其成功率相差较大。此前也有研究指出物种在进行微卫星位点的跨种 PCR 扩增时,其成功率与物种的基因组大小呈负相关<sup>[21]</sup>。②不同研究中各择微卫星位点的来源物种与目标研究物种之间的亲缘关系不同。亲缘关系越近,其基因序列组成越相似,序列越保守,跨种扩增的成功率也将越高。刘罗等<sup>[22]</sup>用乌龟 (*Mauremys reevesii*) 的微卫星位点分别对来自于同科和不同科的 7 个物种进行跨种扩增,结果发现与乌龟同科物种的跨种扩增成功率要远远高于不同科物种的扩增成功率;而选用异齿裂腹鱼 (*Schizothorax o'connori*) 的微卫星位点对来自于同属和不同属的 5 个物种进行跨种扩增,发现同属之间的跨种扩增成功率要高于不同属之间的物种<sup>[23]</sup>。以较近亲缘关系物种的微卫星位点为目标物种的备选位点将使得跨物种 PCR 扩增具有更高的成功率。

两栖动物作为脊椎动物从水生过渡到陆生的重要类群,一直以来在生态系统中扮演了重要的角色。然而,近年来由于气候变暖、栖息地破碎化及丧失、捕猎和疾病等原因,其种群下降速率一直居于脊椎动物第 1 位,全球评估发现有 42.5% 的两栖类动物数量呈下降趋势<sup>[24]</sup>。为保护该类群,两栖动物的保护遗传学和种群遗传学研究得到极大发展<sup>[25-27]</sup>。义乌小鲵是受人为活动影响较大的两栖有尾类物种之一,随城市化发展和经济作物的种植,适合义乌小鲵生存的栖息地发生剧烈的改变,导致义乌小鲵适生环境减少。该研究筛选到的具有多态性的 11 个义乌小鲵微卫星位点,可有效用于

义乌小鲵种群结构、遗传多样性、有效种群大小以及基因流等保护遗传学和种群遗传学研究,从而为该物种提供重要的技术方法支持。

## 参考文献

- [1] 张云武, 张亚平. 微卫星及其应用[J]. 动物学研究, 2001, 22(4): 315-320.
- [2] GABRIELSEN C G, KOVACH A I, BABBITT K J, et al. Limited effects of suburbanization on the genetic structure of an abundant vernal pool-breeding amphibian[J]. Conservation genetics, 2013, 14(5): 1083-1097.
- [3] 王宇. 有效种群容量下景观格局及尺度对景观遗传模拟影响的研究[D]. 沈阳: 辽宁大学, 2015.
- [4] 朱弼成, 蔡波. 中国稀有两栖动物——义乌小鲵[J]. 大自然, 2015, 20(6): 66-67.
- [5] 费梁, 叶昌媛, 江建平, 等. 中国两栖动物检索及图解[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2005: 42-43.
- [6] BAILLIE J, HILTON-TAYLOR C, STUART S N. 2004 IUCN red list of threatened species: A global species assessment[M]. Switzerland: IUCN-the World Conservation Union, 2004.
- [7] 蒋志刚, 江建平, 王跃招, 等. 中国脊椎动物红色名录[J]. 生物多样性, 2016, 24(5): 500-551.
- [8] 罗键, 李越, 黄仕友, 等. 我国小鲵科物种的分类和分布现状[C]// 第二届中国西部动物学学术研讨会论文集. 西安: 陕西省动物学会, 2013.
- [9] FU J Z, HAYES M, 刘志君, 等. 中国西南部小鲵属的遗传分化[J]. 动物学报, 2003, 49(5): 585-591.
- [10] 陈勤, 卿立燕, 曾晓茂. 小鲵属 *Hynobius* 系统学研究回顾[J]. 四川动物, 2008, 27(3): 468-477.
- [11] 魏开建. 中国蛙科的遗传多样性与系统发育的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2004.
- [12] 董颖, 韩洁, 蔡厚才. 对赤点石斑鱼多态性微卫星位点的跨种扩增和特征分析[J]. 北京师范大学学报(自然科学版), 2008, 44(5): 511-514.
- [13] 黄族豪, 廖信军. 家鸡微卫星引物在灰胸竹鸡中的跨种扩增和特征分析[J]. 中国鸟类, 2010(1): 77-79.
- [14] 韩金巧, 谭江东, 王艳妮, 等. 跨物种筛选黄毛鼠的微卫星分子标记[J]. 浙江师范大学学报(自然科学版), 2017, 40(3): 312-317.
- [15] 卜兴江, 聂刘旺. 中华鳖多态性微卫星标记跨物种扩增研究[J]. 生物学杂志, 2013, 30(1): 27-30.
- [16] 陈东海, 邵晨, 王宇. 虎纹蛙微卫星位点的跨种引物筛选[J]. 湖北第二师范学院学报, 2011, 28(2): 37-40.
- [17] KIM M J, WANG A R, KIM S S, et al. Development and validation of microsatellite markers for the tiny dragonfly, *Nannophya pygmaea* (Odonata: Libellulidae), which is endangered in South Korea[J]. Applied entomology zoology, 2018, 53(1): 151-156.
- [18] 孙波, 鲍毅新, 张龙龙, 等. 大鼠及小鼠微卫星引物在社鼠中的跨种扩增[J]. 动物学杂志, 2009, 44(6): 145-150.
- [19] PRIMMER C R, MOLLER A P, ELLEGREN H A. A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds[J]. Molecular ecology, 1996, 5(3): 365-378.
- [20] NAIR A, GOPALAN S V, GEORGE S, et al. Cross-species testing and utility of microsatellite loci in *Indirana* frogs[J]. BMC Research Notes, 2012, 5(1): 1-5.
- [21] GARNER T W J. Genome size and microsatellites: The effect of nuclear size on amplification potential[J]. Genome, 2002, 45(1): 212-215.
- [22] 刘罗, 聂刘旺, 卜兴江, 等. 乌龟十个新微卫星位点的分离鉴定及在其它曲颈龟类中的跨物种扩增[J/OL]. 中国科技论文在线, 2012, 3(2): 70-72 [2018-02-20]. <http://www.docin.com/p-392569338.html>.
- [23] GUO X Z, ZHANG G R, WEI K J, et al. Development of twenty-one polymorphic tetranucleotide microsatellite loci for *Schizothorax o'connori* and their conservation application[J]. Biochemical systematics ecology, 2013, 51(21): 259-263.
- [24] 顾垒, 闻丞, 罗玫, 等. 中国最受关注濒危物种保护现状快速评价的新方法探讨[J]. 生物多样性, 2015, 23(5): 583-590.
- [25] 方耀林. 两栖动物的保护遗传学(译文)[J]. 中国农学通报, 2011, 27(1): 419-423.
- [26] 廖平虎, 王倩, 朱柳芳, 等. 舟山群岛中华大蟾蜍种群系统分化与保护遗传学研究[C]// 浙江省动物学会第十二届会员代表大会暨学术讨论会论文集摘要集. 杭州: 浙江省科学技术协会, 2013.
- [27] 于晓云, 黄华, 陈平, 等. 两栖动物 MHC 基因研究进展[J]. 四川动物, 2011, 30(6): 998-1002.