

三疣梭子蟹微卫星多重 PCR 技术建立及条件的优化

任宪云^{1,2} 刘萍^{1*} 李健¹ 李晓萍¹ 韩智科^{1,2} 刘磊¹

(¹ 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(² 上海海洋大学水产与生命学院, 201306)

摘 要 选择三疣梭子蟹 22 个多态性高的微卫星标记, 经过引物间的搭配、组合测试以及反应条件的优化(退火温度、Mg²⁺ 含量、dNTPs 的浓度等参数), 构建了多重 PCR 扩增技术体系。本研究最终建立了 47 个二重 PCR 组合, 并在 47 个二重引物的组合基础上建立 15 个三重 PCR 组合, 3 个四重 PCR 组合。该多重 PCR 技术体系的建立为三疣梭子蟹品种选育、种系评估提供快速、有效分子检测技术。

关键词 三疣梭子蟹 SSR 多重 PCR 体系

中图分类号 S94 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2011)03-0076-08

Establishment and optimization of a microsatellite-labeling multiplex PCR system in *Portunus trituberculatus*

REN Xian-yun^{1,2} LIU Ping^{1*} LI Jian¹
LI Xiao-ping¹ HAN Zhi-ke^{1,2} LIU Lei¹

(¹ Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(² College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Ocean University, 201306)

ABSTRACT By selecting 22 pairs of polymorphic microsatellite markers of *Portunus trituberculatus*, primers matching, and combinatorial testing, the multiplex PCR amplification system was built and the reaction conditions were optimized, including annealing temperature, Mg²⁺ concentration, dNTPs concentration and other parameters. Forty-seven combinations of double PCR, 15 combinations of triple PCR, and 3 quadruple PCR combinations were established. The establishment of this technology will provide a fast, effective molecular detecting tool for the *P. trituberculatus* breeding and germ-line assessment.

KEY WORDS *Portunus trituberculatus* SSR Multiplex PCR system

三疣梭子蟹 *Portunus trituberculatus* 是我国重要的渔业资源, 隶属甲壳纲 Crustacea、十足目 Decapoda、梭子蟹科 Portunidae、梭子蟹属 *Portunus*, 主要分布于中国、朝鲜、日本等海域(戴爱云等 1977、1986)。近年

国家高技术研究发展计划项目(2006AA10A406)、国家自然科学基金(30871933)、农业科技成果转化资金项目(2010GB23260589)共同资助

* 通讯作者。E-mail: liuping@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85823291

收稿日期: 2010-10-29; 接受日期: 2010-12-20

作者简介: 任宪云(1984-), 男, 硕士研究生, 主要从事海水养殖生物种质资源与遗传育种研究。E-mail: renxianyun301@163.com

来,随着沿海各地人工养殖规模的扩展、捕捞强度的加大、人工放流以及生态环境变化等因素的影响,三疣梭子蟹自然种质资源受到较大影响,越来越多的学者将目光投向优良品种(系)的选育。在三疣梭子蟹品种选育过程中,需要同时培育几十、甚至上百个家系才能满足选育的要求。当各家系单独培养时,不但空间占用大,更重要的是难于比较相同条件下的生长情况。理想的解决方法是在家系混合培养的同时,科学地识别其谱系关系,从而消除因环境等外界因素造成的影响。分子标识中应用较广泛的是微卫星分析方法,它可以分析和跟踪不同家系或父母本的遗传特征,准确地识别其来源(孙昭宁等 2007;Dong *et al.* 2006)。目前已有关于将微卫星技术应用到三疣梭子蟹家系识别中的报道(刘磊 2010),但需要多个反应体系,因而检测效率低下。多重 PCR 扩增技术不仅可以使检测效率大大提高,而且还可以减少药品消耗和仪器的使用频度(Li *et al.* 2006;公维华等 2008)。

多重 PCR(Multiplex PCR)是在同一个反应中同时扩增两个或多个位点的聚合酶链式反应(Chamberlain *et al.* 1988)。现多重 PCR 已用于多种鱼类、黑鮑 *Haliotis rubra* 和中国对虾 *Penaeus chinensis* 的微卫星遗传分析中(Neff *et al.* 2000;黎中宝等 2005;孔杰等 2007)。由于微卫星检测条件的限制和优化多元 PCR 条件的复杂性,多重 PCR 的使用受到制约。本实验旨在建立多重 PCR 体系,为进一步开展亲缘关系的鉴定和谱系追踪提供高效、快速的技术手段。

1 材料与方法

1.1 实验材料

自 2005 年,中国水产科学研究院黄海水产研究所收集 4 个地理群体(鸭绿江口、莱州湾、海州湾、舟山)的三疣梭子蟹作为育种基础群体,采用群体间自交和杂交的方式建立家系。2008 年,三代选育后的实验组与未经选育的对照组相比,生长速度平均提高 13.89%,成活率平均提高 50.14%,单位面积产量平均提高 68.70%,获得了具有明显生长优势的三疣梭子蟹快速生长品系。随机挑出 10 个家系个体,用于基因组 DNA 分析。

采用 Liu 等(2000)的方法,提取 10 个个体的基因组 DNA,DNA 的浓度由 GeneQuant Pro 核酸定量仪(Pharmacia Biotech Ltd.)测定。用 1%琼脂糖凝胶电泳检验 DNA 的质量。

1.2 方法

1.2.1 引物信息

选取 22 个经验证具有多态性的微卫星标记(图 1),引物信息见表 1。

1.2.2 多重 PCR 引物选择与设计

依据引物的设计原则(苗贵东 2010),进行微卫星引物的搭配与组合测试。

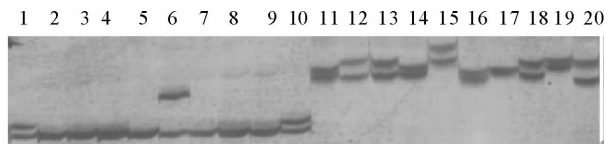
1.2.3 二重 PCR 反应体系构建和聚丙烯酰胺凝胶电泳

通过优化 PCR 反应体系中的 Mg^{2+} 、dNTPs 和引物等的使用量,采用 Touchdown PCR 程序设置,建立二重 PCR 15 μ l 的反应体系。

体系参数为:10 \times Buffer 1.5 μ l, $MgCl_2$ (2.5 mmol/L)1.2 μ l,dNTP(2.5 mmol/L)0.375 μ l,二对正反引物各 1.2 μ l(引物浓度均 20 pmol/ μ l),DNA 模板 1.2 μ l(50 ng/ μ l),ddH₂O 补充至 15 μ l,0.12 μ l Taq 聚合酶(5 U/ μ l)。

退火温度相同的引物组合采用 94 $^{\circ}C$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}C$ 变性 40 s,退火 1 min,72 $^{\circ}C$ 延伸 1 min,共循环 25 次;72 $^{\circ}C$ 延伸 5 min;最后 4 $^{\circ}C$ 保存。

退火温度不同的引物组合采用 Touchdown,94 $^{\circ}C$ 预变性 5 min 后进行循环 1:94 $^{\circ}C$ 变性 40 s,标记 1 退火 1 min,退火温度每个循环降低 0.5 $^{\circ}C$,共循环 12 次,72 $^{\circ}C$ 延伸 1 min;随后进行循环 2:94 $^{\circ}C$ 变性 40 s,标记 2



注:1~10 为引物 pot09 扩增结果,11~20 为引物 pot25 扩增结果

Note:1~10 are PCR amplifications of primer pot09,

11~20 are PCR amplifications of primer pot25

图 1 单对引物 PCR 扩增结果

Fig.1 The results of single-pair primer PCR amplifications

表 1 引物编号及序列
Table 1 Code and sequence of the primers

| 引物编号 Primer code | GenBank 登录号 GenBank accession No. | 退火温度(°C) Annealing temperature | 引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3') |
|---------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|---|
| pot07 | GQ463626 | 58 | F: ATCGTGACCTGAGAAGAGCA R: CCCAAACTGGCTAATCAATG |
| pot08 | GQ463627 | 60 | F: CCACACGAAAAATGCAACTG R: TCACCGTGCAGAATTGAAAG |
| pot09 | GQ463628 | 60 | F: CTTTCAATTCTGCACGGTGA R: ACCTAACCTGCCCTATCC |
| pot10 | GQ463629 | 60 | F: GAACGAAAGGCTGGGTAAAT R: TTCTTGTACACCTGCCATCA |
| pot12 | GQ463631 | 60 | F: TTGTGTGCGAAATGAGGAAG R: CAACAACACCAGCAACAACA |
| pot14 | GQ463633 | 60 | F: AGCGTCTGTCAAAGGAAGGA R: CCAACAAGAAGCGAGTCTCC |
| pot16 | GQ463635 | 59 | F: CACCAAACTGCCATCCTTA R: TTAGGTGCGTATGTTCATCC |
| pot17 | GQ463636 | 55 | F: TTTGCTCTTACCTTCTCACC R: ATGCAATCATGTTTTCGTCT |
| pot18 | GQ463637 | 60 | F: CGCTGTATCATAGCCCTTGC R: GGGCTTTGAAAAGATGTGA |
| pot21 | GQ463640 | 55 | F: CAAAAGACACATGACAAACG R: GGAACAAGGACCACAATAAG |
| pot30 | GQ463649 | 55 | F: GTCTAGTGATTCGTCCCGTA R: CCACCACCACTACTACCAAT |
| pot31 | GQ463650 | 55 | F: TGCCTTCCCATCTGATAAC R: AGCCATAAAGGAAACCAGCA |
| pot34 | GQ463653 | 60 | F: AGGAATGGTTGCAAAGATCG R: TGC GACTTGACACTCACCTC |
| pot38 | GQ463657 | 58 | F: ATTCTCTCGCGTCTTACT R: CCATCCACACTCACTTTTCC |
| pot42 | GQ463661 | 55 | F: TCATCACACAGGCTCACTCA R: CATCTTCCACCTTCTCCAA |
| pot44 | GQ463663 | 60 | F: ATTCACTTATTCGCACTGCT R: GCAAGGGAAAAATAGAAGACA |
| pot48 | GQ463667 | 58 | F: CTTACGTTTCCGTTTTTTCG R: GGTGGGAGACAATCTTGAC |
| pot50 | GQ463669 | 60 | F: CTGTTTATGGCGTTTTTGGT R: CATTTTGTTCAGTTGCT |
| pot53 | GQ463672 | 60 | F: TTGCTGCTGCTGTTACTGCT R: CCTCTCGTAACTTGGGATG |
| pot54 | GQ463673 | 55 | F: CGTCGTATGCCTGAAGTGAG R: TCCTCTTCTCCAACCAAGA |
| pot56 | GQ463675 | 54 | F: TCACAGGACATTCATACACC R: CAGACAATATTTCTTACCTACCC |
| pot57 | GQ463676 | 60 | F: TCTCATTTTCTCCCCCTCT R: TCCTCCTTCTGCTGACCAC |

退火 1 min, 共循环 10 次, 72 °C 延伸 1 min; 随后进行循环 3: 94 °C 变性 40 s, 标记 3 退火 1 min, 共循环 10 次, 72 °C 延伸 1 min, 72 °C 5 min, 4 °C 保存。

PCR 产物经 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 采用硝酸银染色的方法显示结果, 待凝胶干燥后利用扫描仪扫描记录电泳图像。

1.2.4 三、四重 PCR 反应体系构建和聚丙烯酰胺凝胶电泳

根据筛选出来的二重 PCR, 构建三重和四重 PCR 反应体系。

通过调整 PCR 体系中的 Mg^{2+} 、dNTP 和引物等的使用量, 以及采用 Touchdown PCR 程序后, 获得了 3 对引物组成的 PCR 15 μ l 反应体系。

体系参数为: 10 \times Buffer 1.5 μ l, $MgCl_2$ (2.5 mmol/L) 1.2 μ l, dNTP (2.5 mmol/L) 0.375 μ l, 3 对 (或 4 对) 正反引物各 0.4 μ l (引物浓度均 20 pmol/ μ l), DNA 模板 1.2 μ l (50 ng/ μ l), ddH₂O 补充至 15 μ l, 0.12 μ l Taq 聚合酶 (5 U/ μ l)。

对于引物退火温度相同的组合采用常规 PCR。

94 °C 预变性 5 min 后, 94 °C 变性 40 s, 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共循环 35 次, 72 °C 延伸 5 min, 最后 4 °C 保存。

对于退火温度不同的组合采用 Touchdown PCR。

1.2.5 对筛选引物进行反应条件的优化

采用 15 μ l 体系对退火温度, 对 Mg^{2+} 体积按 0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、2.0 μ l 梯度进行优化; 对 dNTPs 按 0.275、0.325、0.375、0.425、0.475 μ l 体积梯度进行优化; 根据反应灵敏度的强弱来调节各引物之间的比例, 反应灵敏度高的, 该引物在多元 PCR 中的比率低; 反应灵敏度低的, 在多元 PCR 中的比率适当提高。

2 结果与分析

2.1 二重微卫星引物的组合

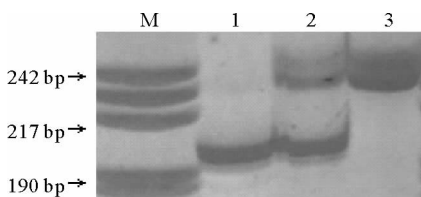
22 个三疣梭子蟹微卫星引物共组成 232 个二重引物的组合, 从中选出 47 对二重引物组合 (图 2)。

47 个二重 PCR 组合的详细情况见表 2。

2.2 微卫星引物的三重组合

在这 47 个二重引物的基础上得到 38 对三重引物的组合。经过筛选, 得到 15 个三重引物的组合 (图 3)。

15 组三重 PCR 组合的详细情况见表 3。

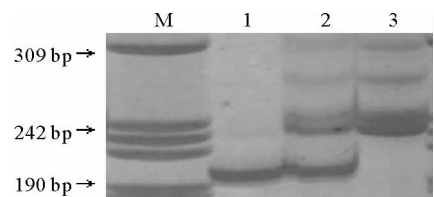


注: M: Marker MD206-pBR322 DNA/MspI (天根生化有限公司), 1: 引物 pot07 扩增结果, 2: 其混合体系, 3: 引物 pot08 的扩增结果

Note: M: Marker MD206-pBR322 DNA/MspI (TIANGEN), 1: Single amplified result of primer pot07, 2: The mixed system, 3: Single amplified result of primer pot08

图 2 二重 PCR 扩增结果

Fig. 2 The results of double PCR amplifications



注: M: Marker MD206-pBR322 DNA/MspI (天根生化有限公司), 1: pot07 扩增结果, 2: 其三重引物的组合, 3: pot31 和 pot57 二重引物的扩增结果

Note: M: Marker MD206-pBR322 DNA/MspI (TIANGEN), 1: Single amplified result of primer pot07, 2: The mixed system, 3: The result of the double primers combinations of pot31 and pot57

图 3 三重 PCR 扩增结果

Fig. 3 The results of triplex PCR amplifications

表 2 微卫星引物的二重组合

Table 2 Double combinations of microsatellite primers

| | | | | | | | | | |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| pot07, pot08 | pot07, pot10 | pot07, pot12 | pot07, pot14 | pot07, pot16 | pot14, pot42 | pot14, pot57 | pot16, pot42 | pot16, pot57 | pot17, pot30 |
| pot07, pot31 | pot07, pot38 | pot07, pot42 | pot07, pot48 | pot07, pot54 | pot17, pot42 | pot17, pot48 | pot17, pot54 | pot17, pot56 | pot17, pot57 |
| pot07, pot56 | pot08, pot10 | pot08, pot12 | pot08, pot16 | pot08, pot38 | pot30, pot54 | pot31, pot48 | pot31, pot54 | pot31, pot56 | pot31, pot57 |
| pot10, pot12 | pot10, pot38 | pot10, pot50 | pot10, pot54 | pot12, pot14 | pot34, pot53 | pot38, pot48 | pot38, pot56 | pot42, pot48 | pot53, pot54 |
| pot12, pot18 | pot14, pot16 | pot14, pot17 | pot14, pot18 | pot14, pot31 | pot53, pot57 | pot54, pot57 | | | |

表 3 微卫星引物的三重组合

Table 3 Triple combinations of microsatellite primers

| | | | | |
|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| pot07, pot08, pot38 | pot07, pot10, pot14 | pot07, pot10, pot16 | pot07, pot14, pot42 | pot08, pot14, pot16 |
| pot08, pot14, pot31 | pot08, pot14, pot42 | pot09, pot16, pot31 | pot09, pot18, pot25 | pot10, pot14, pot16 |
| pot14, pot16, pot31 | pot14, pot16, pot57 | pot14, pot17, pot42 | pot17, pot31, pot57 | pot31, pot54, pot57 |

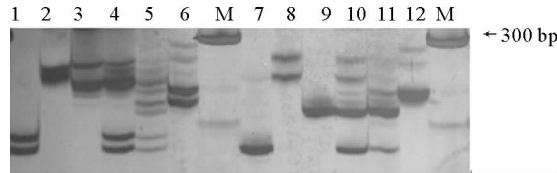
2.3 微卫星引物的四重组合

在 15 组三重引物的基础上,筛选得到 3 个四重引物的组合(图 4)。3 组四重 PCR 组合的详细情况见表 4。

表 4 微卫星引物的四重组合

Table 4 Four combinations of microsatellite primers

| 组合编号 Code | 引物间搭配 Combination of primers | 组合编号 Code | 引物间搭配 Combination of primers | 组合编号 Code | 引物间搭配 Combination of primers |
|--------------|---------------------------------|--------------|---------------------------------|--------------|---------------------------------|
| 1 | pot07, pot14, pot17, pot42 | 2 | pot08, pot09, pot18, pot25 | 3 | pot09, pot17, pot31, pot57 |



注:1~6 对个体 1 的 PCR 扩增结果。其中,1:pot09 扩增结果,2:pot18 的扩增结果,3:pot25 的扩增结果,4:pot09、pot18、pot25 三重引物的扩增结果,5:pot08、pot09、pot18、pot25 四重引物的组合,6:pot08 的扩增结果,7~12:对个体 2 的扩增结果。其中,7:pot09 扩增结果,8:pot18 的扩增结果,9:pot25 的扩增结果;10:pot09、pot18、pot25 三重引物的扩增结果,11:pot08、pot09、pot18、pot25 四重引物组合,12:pot08 的扩增结果。M 为 DNA Marker II(天根生化有限公司)

Note: 1~6 are the results of PCR amplifications of individual 1. 1: Single amplified result of primer pot09, 2: Single amplified result of primers pot18, 3: Single amplified result of primers pot25, 4: Its triplex primers combinations, 5: The four combinations of microsatellite primers pot08, pot09, pot18, and pot25, 6: Single amplified result of primer pot08. 7~12 are the results of PCR amplifications of individual 2. 7: Single amplified result of primer pot09, 8: Single amplified result of primer pot18, 9: Single amplified result of primer pot25, 10: Its triplex primer combinations of pot 09, pot18, and pot 25, 11: The four combinations of microsatellite primers pot08, pot09, pot18, and pot25, 12: Single amplified result of primer pot08. M: DNA Marker II(TIANGEN)

图 4 四重 PCR 扩增结果

Fig. 4 The results of quadruple PCR amplifications

2.4 微卫星引物优化结果

2.4.1 微卫星三重引物优化结果

使用 10 只三疣梭子蟹个体对 15 个微卫星三重引物组进行了筛选,经过对各参数的不断优化,确定了最优 PCR 反应条件,包括各对引物组合反应体系中 Mg^{2+} 、dNTPs 含量以及各对引物量的比例和检测到的等位基因数目(表 5)。

表 5 15 组三重微卫星引物组合优化的 PCR 反应条件

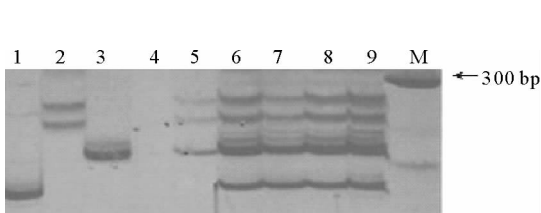
Table 5 Optimized reaction system of 15 pairs of triple PCR SSR primers

| 组合 Combination | 15 μ l 反应体系各成分含量 Content in 15 μ l volume (μ l) | | | 等位基因数 ^① Number of allele |
|-------------------|---|--------------|---------------------------------|--|
| | 25 mmol/ L | 2.5 mmol/L | 10 μ mol/L | |
| | Mg ²⁺ | dNTPs (each) | Primer (each) | |
| 1 | 1.2 | 0.375 | pot07 0.4, pot08 0.4, pot38 0.4 | ≥ 16 |
| 2 | 1 | 0.375 | pot07 0.4, pot10 0.4, pot14 0.4 | ≥ 15 |
| 3 | 1.2 | 0.325 | pot07 0.4, pot12 0.6, pot14 0.4 | ≥ 12 |
| 4 | 1.2 | 0.425 | pot07 0.3, pot14 0.4, pot42 0.5 | ≥ 15 |
| 5 | 1.2 | 0.375 | pot08 0.4, pot14 0.4, pot16 0.4 | ≥ 13 |
| 6 | 1.2 | 0.375 | pot08 0.4, pot14 0.4, pot31 0.5 | ≥ 13 |
| 7 | 1.2 | 0.375 | pot08 0.5, pot14 0.3, pot42 0.4 | ≥ 14 |
| 8 | 1.2 | 0.425 | pot09 0.6, pot16 0.4, pot31 0.3 | ≥ 16 |
| 9 | 1.2 | 0.375 | pot09 0.4, pot18 0.3, pot25 0.5 | ≥ 12 |
| 10 | 1.2 | 0.375 | Pot10 0.3, pot14 0.4, pot16 0.5 | ≥ 13 |
| 11 | 1.4 | 0.375 | pot14 0.4, pot16 0.4, pot31 0.4 | ≥ 13 |
| 12 | 1.4 | 0.375 | pot14 0.3, pot16 0.3, pot57 0.3 | ≥ 12 |
| 13 | 1.2 | 0.375 | pot14 0.5, pot17 0.3, pot42 0.4 | ≥ 12 |
| 14 | 1.4 | 0.375 | pot17 0.5, pot31 0.4, pot57 0.3 | ≥ 11 |
| 15 | 1.2 | 0.375 | pot31 0.4, pot54 0.4, pot57 0.4 | ≥ 15 |

注: ^①为本实验旨在进行微卫星多重 PCR 引物筛选,一方面仅使用 10 个个体,数量相对较少;另一方面是因为等位基因的重叠,不能确定每对微卫星引物所包含的所有等位基因数,因而使用符号“ \geq ”

Note: ^① The experiment was designed to screen microsatellite-based multiplex PCR primers . On the one hand, only 10 individuals was used, which was a relatively small number; on the other hand, due to the overlap of alleles, the number of the alleles can not be determined for each SSR primer, that's why the symbol “ \geq ” was used here

图 5 是 Mg²⁺ 的梯度进行优化的结果。图 6 是 dNTPs 含量的优化的结果。

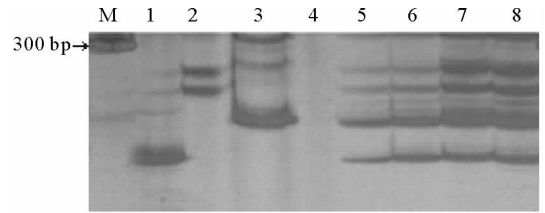


注: 1: pot09 扩增结果, 2: pot18 的扩增结果, 3: pot25 的扩增结果, 4~9 为其三重引物的扩增结果, 依次 Mg²⁺ 梯度为 0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、2.0 μ l。M 为 DNA Marker II(天根生化有限公司)

Note: 1: Single amplified result of primers pot09, 2: Single amplified result of primers pot18, 3: Single amplified result of primers pot25; 4~9: Its triplex primer combinations, followed by gradient Mg²⁺ 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 2.0 μ l. M is DNA Marker II(TIANGEN)

图 5 三重 PCR 扩增的 Mg²⁺ 参数优化

Fig. 5 Mg²⁺ optimization for triple PCR amplifications



注: 1: pot09 扩增结果, 2: pot18 的扩增结果, 3: pot25 的扩增结果, 4~8: 其三重引物的扩增结果, 依次 dNTPs 体积梯度为 0.275、0.325、0.375、0.425、0.475 μ l。M 为 DNA Marker II(天根生化有限公司)

Note: 1: Single amplified result of primers pot09, 2: Single amplified result of primers pot18, 3: Single amplified result of primers pot25, 4~8: Its triplex primer combinations, followed by gradient dNTPs 0.275, 0.325, 0.375, 0.425, 0.475 μ l. M is DNA Marker II(TIANGEN)

图 6 三重 PCR 扩增的 dNTPs 参数优化

Fig. 6 dNTPs optimization for triple PCR amplifications

2.4.2 微卫星四重引物优化结果

微卫星四重引物的优化结果见表 6。

表 6 3 组四重微卫星引物组合优化的 PCR 反应条件

Table 6 Optimized reaction system of three pairs of quadruple PCR SSR primers

| 组合 Combination | 15 μl 反应体系各成分含量 Content in 15 μl volume (μl) | | | 等位基因数 Number of allele |
|-------------------|--|----------------------------|--|---------------------------|
| | 25 mmol/L Mg^{2+} | 2.5 mmol/L dNTPs (each) | 10 $\mu\text{mol/L}$ Primer (each) | |
| 1 | 1.2 | 0.375 | pot07 0.4, pot14 0.5, pot17 0.4, pot42 0.3 | ≥ 20 |
| 2 | 1 | 0.375 | pot08 0.4, pot09 0.5, pot18 0.4, pot25 0.4 | ≥ 21 |
| 3 | 1.4 | 0.325 | pot09 0.4, pot17 0.3, pot31 0.5, pot57 0.4 | ≥ 20 |

3 讨论

优化单个位点的 PCR 扩增条件,使多个位点 PCR 扩增条件趋于一致,是进行多重 PCR 的基础。对于多重 PCR 的成功扩增,退火温度、 MgCl_2 浓度、引物相对浓度和 dNTPs 浓度参数是十分必要的。但一般认为退火温度、 MgCl_2 的浓度和引物的相对浓度,是最重要的 3 个因素(Henegariu *et al.* 1997; Rithidech *et al.* 1997)。具备一致退火温度的单个位点,虽然这些单个位点能被同时扩增,但有效扩增的位点能影响非有效扩增位点 PCR 产物的量。具备不同退火温度的单个位点,由于引物的退火温度不同可采用 Touchdown PCR。Touchdown PCR 的温度开始于一个较高的退火温度,然后每一循环系统地降低一定温度,使每对引物都能达到期望的退火值,Touchdown PCR 能使具备不同退火温度的多个位点进行多元 PCR 扩增时消除人为带的产生(Markoulatos *et al.* 2000)。

Mg^{2+} 的浓度是另一个重要的影响因素,这是因为 *Taq* DNA 聚合酶发生作用需要有镁离子的参与,因此 MgCl_2 浓度是重要的影响因素之一。Markoulatos 等(2002)证实过量的镁离子可导致非特异性条带的生成, Mg^{2+} 的不足则会减少 PCR 产物的量。本实验中, pot09、pot18 和 pot25 的三重组在 Mg^{2+} 体积为 0.8 μl 时没有条带产生;在体积为 1.0 μl 时,PCR 产物的量明显减少;但在体积增大到 2.0 μl 时未发现非特异性条带的生成,可能该条件下 Mg^{2+} 浓度并没有过量。

第 3 个重要影响因素是引物的相对浓度。如果引物的相对浓度过高,就会形成引物二聚体;如果浓度过低,就会减少 PCR 产物的量或者阻止 PCR 产物的形成(谢建云等 2003),因此必须调节引物的相对浓度以避免二聚体的形成和 PCR 产物的量的减少。另外,需根据各位点 PCR 反应灵敏度的强弱来调节各引物之间的比例,反应灵敏度强的,在多元 PCR 中的比率适当降低;反应灵敏度弱的,在多元 PCR 中的比率需适当提高。在进行单对引物 PCR 扩增实验时,采用 15 μl 体系,正反引物各 1.2 μl (引物浓度均为 20 pmol/ μl)。在进行三重 PCR 或四重 PCR 采用的引物体积一般为 0.4 μl (引物浓度均 20 pmol/ μl),这样能有效减少引物二聚体的形成。

为了不影响 PCR 产物的量,循环次数就成为一个重要的影响因素,循环次数过少就会减少 PCR 的产量,循环次数过多虽然可以增加 PCR 的产量,但会使错配几率增大,增加杂带的产生。普通的单对引物 PCR 扩增的循环次数为 25 次,而多重引物的循环,比如引物 pot07、pot14、pot42 三重组,对其采用的 PCR 扩增程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min 后进行循环 1:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,退火温度每个循环降低 0.1 $^{\circ}\text{C}$,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,循环进行 10 次;随后进行循环 2:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,共循环 10 次;再进行循环 3:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,共循环 10 次。最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存并结束程序,循环数为 40 次。从比较来看,三重 PCR 的循环次数比单重多 15 个循环。

作者所在实验室已连续多年进行三疣梭子蟹微卫星引物的开发工作,得到一些多态性信息含量较高且可应用于三疣梭子蟹遗传多样性研究的位点。本文通过实验优化和引物筛选,建立起多重微卫星 PCR 技术体系,获得了 47 组二重 PCR、15 组三重 PCR 和 3 组四重 PCR。目前,三疣梭子蟹微卫星引物的开发还处于初级阶段,很多引物扩增片段都在 200~300 bp 之间,导致了各引物扩增片段的交叉重叠。如果采用具有荧光标记的引物开展多重 PCR 检测,只需考虑引物间相容性,各引物扩增片段大小可以交叉重叠,使多重 PCR 体系更容易建立。

参 考 文 献

- 孔 杰,高 焕,于 飞,罗 坤,王伟继,孟宪红,刘 萍,张天时. 2007. 微卫星三重 PCR 基因扫描技术在中国明对虾家系标识中的应用. 中国水产科学,14(1): 59~66
- 公维华,张宁波,程佳月,杨述林,黄宏刚,冯书堂,王爱德,甘世祥,李 奎. 2009. 小型猪微卫星标记多重 PCR 体系的建立与应用. 中国比较医学杂志,19(2):21~25
- 孙昭宁,刘 萍,李 健,何玉英 张秀梅. 2007. 微卫星 DNA 标记用于中国对虾亲子关系的鉴定. 海洋水产研究,28(3):8~14
- 刘 磊. 2010. 三疣梭子蟹形态性状对体重影响及微卫星 DNA 标记进行家系鉴定的研究. 见:中国海洋大学硕士学位论文
- 苗贵东. 2010. 半滑舌鳎微卫星标记开发、应用及遗传连锁图谱的构建. 见:中国海洋大学博士学位论文
- 谢建云,邵伟娟,高 诚. 2003. 多重 PCR 在几个近交系小鼠遗传检测中的应用初探. 中国实验动物学报,11(2):92~95
- 黎中宝, Appleyard, S. A., Elliott, N. G. 2005. 多元 PCR 在黑鲍(*Haliotis rubra*) 微卫星遗传研究中的应用. 海洋与湖沼,36(4):319~325
- 戴爱云,冯钟琪,宋玉枝,黄志翔,吴赫昌. 1977. 三疣梭子蟹渔业生物学的初步调查. 动物学杂志,(2):30~33
- 戴爱云,杨思谅,宋玉枝. 1986. 中国海洋蟹类. 北京:海洋出版社,213~214
- Chamberlain, J. S., Gibbs, R. A., and Ranier Jenguyen, P. N. 1989. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. Nucl. Acids. Res. 16:11 141~11 156
- Dong, S. R., Kong J., and Zhang, Q. W. 2006. Pedigree tracing of *Fenneropenaeus chinensis* by microsatellite DNA markers genotyping. Acta Oceanologica Sinica, 5:151~157
- Henegariu, O., Heerema, N. A., and Dlouhy, S. R. 1997. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. BioTechniques, 23: 504~511
- Li, Y. T., Wongprasert, K., and Shekhar, M. 2007. Development of two microsatellite multiplex systems for black tiger shrimp *Penaeus monodon* and its application in genetic diversity study for two populations. Aquaculture, 266:279~288
- Liu, P., Kong, J., and Shi, T. 2000. RAPD analysis of wild stock of Penaeid shrimp (*Penaeus chinensis*) in Chinese coastal waters of the Huanghai Sea and Coastal waters of the Bohai Sea. Acta Oceanologica Sinica, 19(1):119~126
- Markoulatos, P., Georgopoulou, A., Kotssovassilis, C. et al. 2000. Detection and typing of HSV-1, HSV-2 and VZV by a multiplex polymerase chain reaction. J. Clin. Lab. Anal. 14:214~219
- Markoulatos, P., Siafakas, N., and Moncany, M. 2002. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. J. Clinical Laboratory Analysis, 16: 47~51
- Neff, B. D., Fu, P., and Gross, M. R. 2000. Microsatellite multiplexing in fish. Transactions of the American Fisheries Society, 129: 584~593
- Rithidech, K. N., Dunn, J. J., and Gordon, C. R. 1997. Combining multiplex and touchdown PCR to screen murine microsatellite polymorphisms. BioTechniques, 23: 36~44