

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)微卫星多重 PCR 体系的建立及其在家系亲权鉴定中的应用*

李东宇^{1,2,3} 孔杰^{1,2,3}① 孟宪红^{2,3} 栾生^{2,3}
罗坤^{2,3} 卢霞^{2,3} 曹宝祥^{2,3}

(1. 南京农业大学无锡渔业学院 无锡 214081;

2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;

3. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071)

摘要 为了在遗传分析研究中提高效率并节约成本,本研究从已报道的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)微卫星位点中选取多态性较高的位点,基于各位点的扩增片段大小及退火温度等因素进行微卫星位点的组合。通过不断优化位点组合、反应体系及反应程序,成功建立了 1 个五重、2 个四重和 1 个三重 PCR 反应体系,并将其应用于 11 个凡纳滨对虾家系的亲权鉴定。结果显示,四组多重 PCR 体系中的 16 个微卫星位点在 11 个凡纳滨对虾家系中的平均等位基因数(N_a)为 6,平均多态信息含量(PIC)为 0.5813,平均观测杂合度(H_o)为 0.513,平均期望杂合度(H_e)为 0.636。利用 Cervus3.0 软件,对已知系谱关系的 11 个凡纳滨对虾家系进行亲权分析,其第一亲本累积排除率(CE-1P)、第二亲本累积排除率(CE-2P)和双亲累积排除率(CE-PP)分别为 0.99525487、0.99990862 和 0.9999986。进一步分析表明,当同时使用四组多重 PCR 体系进行亲权分析时,其模拟配对率和亲权鉴定准确率均为 100%,全同胞和半同胞家系鉴别效果良好,表现出准确的鉴别能力。本研究所建立的四组凡纳滨对虾微卫星多重 PCR 体系均可作为后续的凡纳滨对虾遗传多样性分析和亲权鉴定提供高效、准确的检测手段。

关键词 凡纳滨对虾; 微卫星多重 PCR; 亲权鉴定

中图分类号 Q341 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)03-0058-10

凡纳滨对虾(Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*),又名南美白对虾,隶属于节肢动物门(Arthropoda)、甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、游泳亚目(Natantia)、对虾科(Penaeidae)、滨对虾属(*Litopenaeus*),是世界重要的对虾类养殖品种之一(张伟权, 1990)。凡纳滨对虾适应性广泛、对不良环境抗逆性强、生长速度快、肉质鲜美,深受人们的喜爱,有着十分广阔的市场前景(王兴强等, 2004)。

为了促进我国凡纳滨对虾产业的进一步发展,培育具有优良经济性状的优质苗种已经成为凡纳滨对虾育种领域的重要目标。然而,由于我国不是凡纳滨对虾的原产地,需从国外引进种源,引进的亲本群体的遗传信息未知,种群间个体内的亲缘关系远近未知,如果盲目的进行选育,容易造成严重的近交衰退(张凯, 2013¹); Luo *et al*, 2014)。近交衰退的危害在于,不但会降低已经改良性状的性能,同样会引起其他性

* 泰山学者种业计划专家良种工程项目、农业部 948 项目(2015-Z17)和青岛市科技成果转化引导计划(14-2-4-52-jch)共同资助。李东宇, E-mail: 1138854187@qq.com

① 通讯作者: 孔杰, 研究员, E-mail: kongjie@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-11-25, 收修改稿日期: 2016-01-14

1) 张凯. 凡纳滨对虾引进群体分子系谱构建及中国对虾分子标志家系放流效果评估. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2013, 8-9

状退化。如存活率和繁殖力降低等现象,从而最终导致育种工作功亏一篑(孔杰等, 2009)。所以,为了选育工作能够长久的进行下去,必须对选育群体进行亲权鉴定,明确亲缘关系。

在家系选育过程中,建立完整、准确的系谱信息,可以明确各家系间的亲缘关系远近(苗贵东等, 2011)。目前,系谱信息的构建主要通过对个体采用荧光标记来实现,但是荧光标记易脱落、难弥补、可持续时间短、对幼体无法标记,这些缺点会对系谱信息的准确率产生影响(张涛等, 2010)。随着分子标记的发展,微卫星标记以其分布广、多态性高、重复性和稳定性好、共显性等优点,被应用于家系识别和亲缘关系的分析中,可以很好的解决物理标记的缺点,提高亲权分析的效率和准确率。

微卫星多重 PCR (Multiplex PCR)是指在 1 个 PCR 反应体系中,同时进行多个微卫星位点的特异扩增,产生出多个 PCR 扩增产物(张博等, 2012)。利用微卫星多重 PCR 技术进行水产动物的亲权分析,可以极大地提高基因分型的效率并节约成本。目前,在许多水产动物中都有相关的研究报告,如大菱鲆(*Scophthalmus maximus*) (苗贵东等, 2011)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*) (李佳凯等, 2014)、中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) (李伟亚等, 2012)、斑节对虾(*Penaeus monodon*) (Li *et al.*, 2007)、皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino) (聂洪涛等, 2013)、美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*) (Wang *et al.*, 2010)等。

虽然关于应用微卫星分子标记对凡纳滨对虾进行家系识别(王鸿霞等, 2006)、群体遗传多样性分析(Zhang *et al.*, 2014)、亲缘关系分析(王霞, 2009)¹⁾等方面的研究已有不少,然而这些研究均局限于单个位点,有关凡纳滨对虾微卫星多重 PCR 的研究鲜有报道。本研究利用已报道的凡纳滨对虾微卫星位点,建立了 1 个五重 PCR, 2 个四重 PCR 和 1 个三重 PCR 反应体系,并将其应用于凡纳滨对虾家系亲权鉴定中,旨在为凡纳滨对虾家系选育、亲权鉴定和遗传多样性分析等方面的研究提供高效、准确的检测手段。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用材料来自于 2013 年中国水产科学研究院黄海水产研究所农业部海水遗传育种中心构建的 75 个物理系谱已知的凡纳滨对虾家系。从中选取 11 个家系,其中,2 个家系为父系半同胞家系,2 个家系为母系半同胞家系,其余家系为全同胞家系。每个家系随机选取 10–20 尾个体,加上每个家系对应的亲本,共计 211 个样品。对样品进行肌肉组织取样,并保存在 -80°C 冰箱中备用。

1.2 实验方法

1.2.1 凡纳滨对虾基因组 DNA 的提取与检测 参照王伟继(2008)²⁾的方法提取凡纳滨对虾基因组 DNA。用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性。用超微量紫外分光光度计对 DNA 进行定量检测,检测浓度和吸光值(260 nm/280 nm,最佳范围在 1.8–2.0),定量后将 DNA 溶液稀释至 50 ng/ μl , -20°C 冷冻保存备用。

1.2.2 凡纳滨对虾微卫星引物的筛选及多重 PCR 体系的优化 本研究从 Meehan 等(2003)、Zhang 等(2007)、Alcivar-Warren 等(2007)、Garcia 等(2007)和于洋(2014)³⁾等研究中公布的微卫星数据中筛选多态性微卫星位点。根据每个微卫星位点扩增片段长度的差异性和退火温度进行多重 PCR 位点组合,同时利用 MPEprimers 软件(申志勇, 2009⁴⁾;王稳等, 2010)检测筛选好的多重 PCR 组合反应体系中的引物是否会产生错配、引物二聚体和发卡结构,去除或替换影响整个体系稳定性的引物对。通过优化多重 PCR 反应体系中各引物浓度、退火温度、循环次数以及反应体系中各成分的浓度,达到多重 PCR 体系的最佳扩增效果。

1.2.3 荧光标记修饰及基因分型 本研究采用 4 种不同的荧光标记来修饰引物,分别是 6-FAM、ROX、HEX、TAMRA,保持每个多重 PCR 组合中扩增片段大小相邻的位点引物修饰的荧光种类不同。利

1) 王霞. 微卫星分型技术用于凡纳滨对虾遗传多样性和亲缘关系分析. 西北农林科技大学硕士研究生学位论文, 2009, 35–40

2) 王伟继. I 中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) AFLP 分子标记遗传连锁图谱的构建以及相关性状 QTL 定位分析 II 蓝鳃太阳鱼(*Lepomis macrochirus*) AFLP 分子标记遗传连锁图谱的构建及性别决定机制初探. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2008, 19–20

3) 于洋. 凡纳滨对虾分子标记的开发及其在遗传育种中的应用. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2014, 49–57

4) 申志勇. PCR 引物特异性评估体系及多重 PCR 引物设计系统的构建与应用. 中国人民解放军军事医学科学院硕士研究生学位论文, 2009, 23–37

用 ABI3130xl 测序仪对 PCR 产物进行基因分型。荧光引物合成由金唯智生物技术公司完成。

1.3 数据分析

利用 GeneMapper4.0 软件进行基因分型数据分析。利用 Cervus3.0 软件对基因型数据进行亲权分析, 主要分析内容包括等位基因数(N_a)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)和多态信息含量(PIC), 计算微卫星累积排除概率以及哈迪-温伯格(Hardy-Weinberg)平衡, 模拟家系配对率, 最后进行家系鉴定, 根据已知的亲缘关系估计亲权鉴定准确率。

2 结果与分析

2.1 凡纳滨对虾多重 PCR 反应体系的构建及产物的基因分型

本研究从已报道的凡纳滨对虾微卫星位点中, 选取多态性较高的位点, 通过不断进行位点组合和优化反应条件, 最终构建出 1 个五重 PCR 反应体系, 2 个四重 PCR 反应体系和 1 个三重 PCR 反应体系。四组多重 PCR 体系中 16 个微卫星位点的信息及修饰荧光种类见表 1。四组凡纳滨对虾多重 PCR 的反应体系和反应程序见表 2。

表 1 凡纳滨对虾微卫星多重 PCR 位点信息及其修饰荧光种类

Tab.1 The information and the fluorescence labeling of microsatellite multiplex PCR for *L. vannamei*

组别 Groups	位点名称 Loci	扩增片段大小 Amplified fragment size (bp)	最佳退火温度 Annealing temperature (°C)	引物序列(5'-3')及荧光类型 Primer sequences (5' to 3') and the fluorescence labeling of primers
五重 PCR Multiplex PCR of 5 loci	TM6	93-96	60	F: 6-FAM-TGGAGATTTTCGGAACCTTTG R: CTGCTGGAGCACCAAATCT
	TUMXLv3.1	135-153	58	F: ROX-TAAAACCGAAAGACAATGGCG R: CTGACATTGCGTTATGATTGG
	TUMXLv7.121	194-244	58	F: HEX-GGCACACTGTTTAGTCCTCG R: CGAACAGAATGGCAGAGGAG
	TUMXLv9.90	282-298	58	F: TAMRA-GACCAAAGGATATTGGCTCG R: GTAATCAGGAGATGGTCCGC
	1103	376-391	55	F: 6-FAM-GGCTGTGTTTTCGGGTGTAGTTT R: TCATACGATAATGGCATAGAAGG
四重 PCR 1 Multiplex PCR 1 of 4 loci	TUMXLv10.117	101-118	58	F: 6-FAM-CTCCAGGACCGATAATGAGG R: CGACAGTCAAAACAACATCC
	TUMXLv9.103	199-393	58	F: ROX-CACCAAACGAAACGAAACG R: GGATAAAAACGAATTGTATACCG
	TUMXLv10.14	208-263	55	F: HEX-CAGTCTACACGCACAGGCAC R: TTATACGGCGGTTCTCTTGG
	10749	354-416	55	F: TAMRA-GAATACGTAGCGGAGATCCCA R: TAATGCAGCGATGCGATT
四重 PCR 2 Multiplex PCR 2 of 4 loci	Lv12	125-134	55	F: 6-FAM-GATCATTCGCCCCCTTTTT R: ATCTACGGTTCGAGAGCAGA
	Lv14	177-191	55	F: ROX-TATGCTCGTTCCCTTTGCTT R: TTGAAGGAAAAGTGTGGGG
	TUMXLv10.33	252-324	56	F: HEX-CGAAGAGATTTATCCAGGG R: CGTGCATTATTATCCTTTCC
	10592b	372-393	55	F: TAMRA-AAAGACACTTACTAAACAGTCGAT R: CGTCTCGTTGTTGAGTTATAACA
三重 PCR Multiplex PCR of 3 loci	TUMXLv8.256	150-163	55	F: 6-FAM-GGACTCACACTTCTGGTTC R: GGCTGCACCTTGTAAGTC
	TUMXLv8.220	210-458	58	F: HEX-GATGTGGTTGATGAAGTGATG R: CGCATTATCTAAATGGCAAG
	TUMXLv7.56	311-490	62	F: TAMRA-CCATGGCTTTCCTCTTCTTTC R: AGGTAGGGAAGTCGTGAGGG

表 2 凡纳滨对虾微卫星多重 PCR 反应体系和程序
Tab.2 The multiplex PCR systems and corresponding programs for *L. vannamei*

组别 Groups	成分 Ingredient	体积 Volume (μl)	程序 Program	
五重 PCR	DNA 模板(50 ng/μl)	2	94°C 5 min	
Multiplex PCR of 5 loci	10× <i>Taq</i> Buffer	2.8	94°C 30 s	} 8 r
			58°C (每循环降 1°C) 40 s	
	Mg ²⁺ (25 mM each)	2.8	72°C 1 min	} 15 r
	dNTP (2 mM each)	2.8	94°C 30 s	
	TM6 (10μM)	0.2	55°C 40 s	
	TUMXLv3.1 (10μM)	0.25	72°C 1 min	} 15 r
	TUMXLv7.121 (10μM)	0.25	94°C 30 s	
	TUMXLv9.90 (10μM)	0.3	50°C 40 s	} 15 r
	1103 (10μM)	0.3	72°C 1 min	
	<i>Taq</i> 酶(2.5 U/μl)	0.3	72°C 5 min	
	ddH ₂ O	11.7	4°C Hold	
	四重 PCR 1	DNA 模板(50 ng/μl)	2	94°C 5 min
Multiplex PCR 1 of 4 loci	10× <i>Taq</i> Buffer	2.8	94°C 40 s	} 10 r
			62°C (每循环降 0.5°C) 1 min	
			72°C 1 min	} 15 r
	Mg ²⁺ (25 mM each)	2.8	94°C 40 s	
	dNTP (2 mM each)	2.8	58°C 1 min	
	TUMXLv10.117 (10μM)	0.2	72°C 1 min	} 15 r
	TUMXLv9.103 (10μM)	0.25	94°C 40 s	
	TUMXLv10.14 (10μM)	0.25	55°C 1 min	} 15 r
	10749 (10μM)	0.3	72°C 1 min	
	<i>Taq</i> 酶(2.5 U/μl)	0.3	72°C 5 min	
	ddH ₂ O	12.3	4°C Hold	
	四重 PCR 2	DNA 模板(50 ng/μl)	2 μl	94°C 5 min
Multiplex PCR 2 of 4 loci	10× <i>Taq</i> Buffer	2.8	94°C 40 s	} 10 r
			60°C (每循环降 1°C) 1 min	
			72°C 1 min	} 30 r
	Mg ²⁺ (25 mM each)	2.8	72°C 1 min	
	dNTP (2 mM each)	2.8	94°C 40 s	
	Lv12 (10μM)	0.2	55°C 1 min	} 30 r
	Lv14 (10μM)	0.25	72°C 1 min	
	TUMXLv10.33 (10μM)	0.25	72°C 5 min	} 10 r
	10592b (10μM)	0.3	4°C Hold	
	<i>Taq</i> 酶(2.5 U/μl)	0.3		
	ddH ₂ O	12.3		
	三重 PCR	DNA 模板(50 ng/μl)	2	94°C 5 min
Multiplex PCR of 3 loci	10× <i>Taq</i> Buffer	2.5	94°C 40 s	} 10 r
			62°C (每循环降 0.5°C) 1 min	
			72°C 1 min	} 15 r
	Mg ²⁺ (25 mM each)	2.5	72°C 1 min	
	dNTP (2 mM each)	2.5	94°C 40 s	
	TUMXLv8.256 (10μM)	0.2	58°C 1 min	} 15 r
	TUMXLv8.220 (10μM)	0.25	72°C 1 min	
	TUMXLv7.56 (10μM)	0.3	94°C 40 s	} 15r
	<i>Taq</i> 酶(2.5 U/μl)	0.3	55°C 1 min	
	ddH ₂ O	13.7	72°C 1 min	
			72°C 5 min	
			4°C Hold	

基因分型结果显示,四组凡纳滨对虾微卫星多重 PCR 反应体系均可以获得较好的扩增效果。其中,五重 PCR、四重 PCR 1 和四重 PCR 2 的基因分型峰值分别见图 1、图 2 和图 3。

2.2 微卫星位点多态性分析

四组多重 PCR 体系的 16 个微卫星位点在 211 个凡纳滨对虾实验样品中获得等位基因数为 2–12, 平均等位基因数(N_a)为 6, 平均多态信息含量(PIC)为 0.581, 平均观测杂合度(H_o)为 0.513, 平均期望杂合度(H_e)为 0.636。除位点 TM6 和 TUMXLv10.117 观测杂合度略高于期望杂合度外,其余位点观测杂合度均低于期望杂合度,表现为杂合子的缺失。对 16 个微

卫星位点进行 Hardy-Weinberg 平衡检验,结果显示,有 7 个位点偏离不显著($P>0.05$), 9 个位点极显著偏离($P<0.001$)。16 个微卫星位点在凡纳滨对虾 11 个家系中参数信息见表 3。

2.3 凡纳滨对虾家系亲权分析

2.3.1 亲权排除率分析 利用四组微卫星多重 PCR 体系进行家系的亲权分析,当双亲基因型未知情况下,单亲本排除率(E-1P)在 0.046–0.614 之间,平均值为 0.264;当只有一个亲本已知,另一亲本的排除率(E-2P)在 0.130–0.763 之间,平均值为 0.408;当双亲基因型已知时,双亲排除率(E-PP)处在 0.213–0.913 之间,平均值为 0.565。16 个微卫星位点的排除率见表 4。

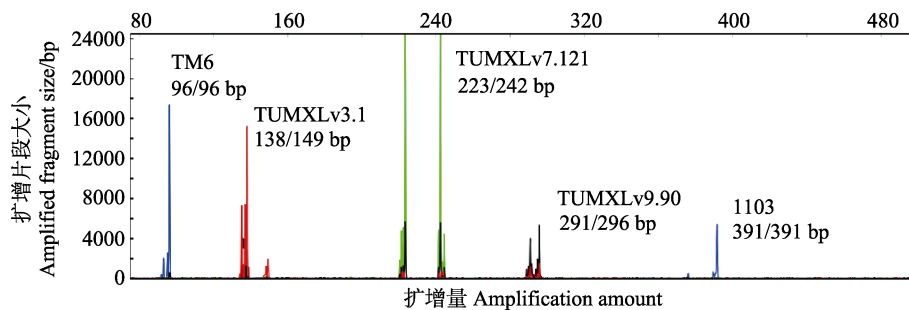


图 1 凡纳滨对虾五重 PCR 经 ABI 3130xl 测序仪分型结果

Fig.1 The genotyping of multiplex PCR of 5 loci for *L. vannamei* using ABI 3130xl platform

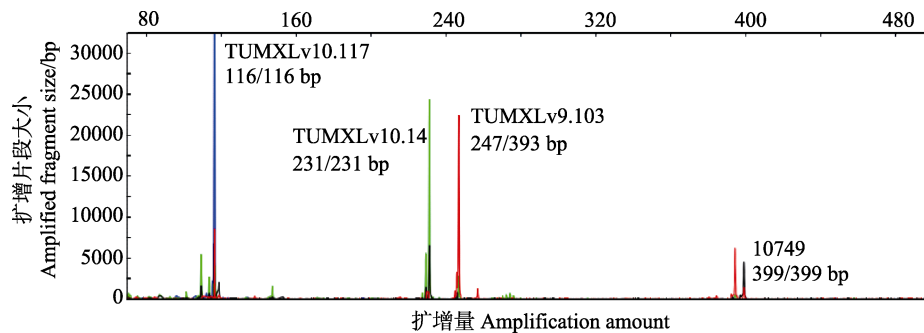


图 2 凡纳滨对虾四重 PCR 1 经 ABI 3130xl 测序仪分型结果

Fig.2 The genotyping of multiplex PCR 1 of 4 loci for *L. vannamei* using ABI 3130xl platform

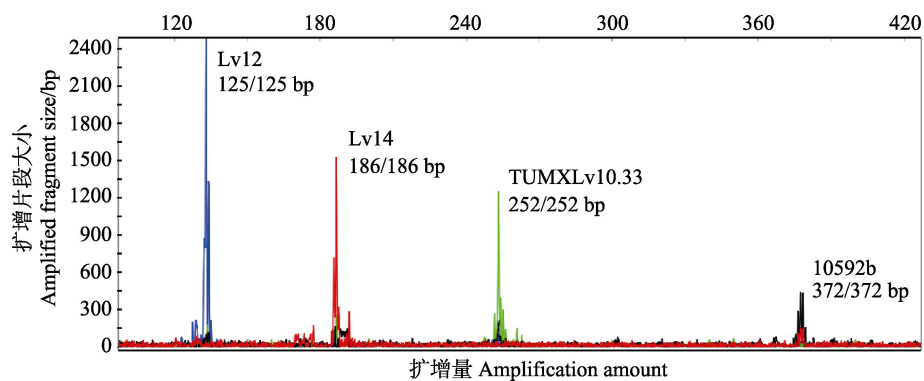


图 3 凡纳滨对虾四重 PCR 2 经 ABI 3130xl 测序仪分型结果

Fig.3 The genotyping of multiplex PCR 2 of 4 loci for *L. vannamei* using ABI 3130xl platform

表 3 16 个微卫星在 11 个凡纳滨对虾家系中的参数信息
Tab.3 The information of 16 loci in 11 families of *L. vannamei*

组别 Groups	微卫星位点 Loci	等位基因数 N_a	观测杂合度 H_{Obs}	期望杂合度 H_{Exp}	多态信息含量 PIC	哈迪温伯格平衡 HW	无效等位基因频率 NuLL
五重 PCR	TM6	2	0.640	0.498	0.373	***	-0.1263
Multiplex PCR of 5 loci	TUMXLv3.1	4	0.403	0.607	0.526	***	0.2096
	TUMXLv7.121	5	0.621	0.624	0.557	***	-0.0194
	TUMXLv9.90	6	0.631	0.694	0.640	NS	0.0534
	1103	3	0.384	0.449	0.350	NS	0.0785
四重 PCR 1	TUMXLv10.117	3	0.305	0.304	0.259	NS	-0.0033
Multiplex PCR 1 of 4 loci	TUMXLv9.103	9	0.628	0.834	0.813	***	0.1395
	TUMXLv10.14	12	0.781	0.813	0.790	NS	0.0195
	10749	6	0.367	0.567	0.540	***	0.2198
四重 PCR 2	Lv12	5	0.384	0.601	0.548	***	0.2371
Multiplex PCR 2 of 4 loci	Lv14	5	0.621	0.638	0.575	NS	0.0016
	TUMXLv10.33	4	0.517	0.640	0.571	***	0.1089
	10592b	7	0.227	0.634	0.582	***	0.4805
三重 PCR	TUMXLv8.256	5	0.422	0.579	0.512	NS	0.0509
Multiplex PCR of 3 loci	TUMXLv8.220	12	0.472	0.818	0.795	***	0.2698
	TUMXLv7.56	10	0.807	0.885	0.871	NS	0.0433
平均 Average	—	6	0.513	0.636	0.581	—	—

NS: 不显著偏离; ***: 极显著偏离

NS meant no significant deviation; *** meant highly significant deviation ($P < 0.001$)

表 4 16 个微卫星位点的排除率
Tab.4 The exclusion probability for 16 microsatellite loci

组别 Groups	微卫星位点 Loci	第一亲本排除率 E-1P	第二亲本排除率 E-2P	双亲排除率 E-PP
五重 PCR	TM6	0.123	0.187	0.280
Multiplex PCR of 5 loci	TUMXLv3.1	0.192	0.325	0.478
	TUMXLv7.121	0.208	0.358	0.523
	TUMXLv9.90	0.278	0.445	0.627
	1103	0.100	0.176	0.269
四重 PCR1	TUMXLv10.117	0.046	0.130	0.213
Multiplex PCR1 of 4 loci	TUMXLv9.103	0.503	0.674	0.851
	TUMXLv10.14	0.467	0.643	0.829
	10749	0.188	0.367	0.568
四重 PCR2	Lv12	0.195	0.355	0.528
Multiplex PCR2 of 4 loci	Lv14	0.218	0.374	0.542
	TUMXLv10.33	0.218	0.368	0.533
	10592b	0.226	0.391	0.572
三重 PCR	TUMXLv8.256	0.172	0.315	0.470
Multiplex PCR of 3 loci	TUMXLv8.220	0.480	0.651	0.836
	TUMXLv7.56	0.614	0.763	0.913
平均 Average	—	0.264	0.408	0.565

2.3.2 微卫星多重 PCR 组合与累积排除率及模拟配对率分析 利用 Cervus3.0 软件中模拟分析模块 (Simulation of parentage analysis) 来进行微卫星多重 PCR 组合与累积排除率和模拟配对率之间关系的分析。模拟分析相关参数为: 置信度为 95%, 子代样本数为 10000 个, 基因分型错误率为 1%, 真实亲本采样率为 1。分析结果显示, 五重 PCR 双亲累积排除率为 95.11%,

四重 PCR 1 和四重 PCR 2 双亲累积排除率分别为 99.13%、95.70%, 三重 PCR 双亲累积排除率为 99.24%。四组多重 PCR 组合可以达到 100% 的模拟配对率, 其 16 个微卫星位点第一亲本累积排除率 (CE-1P) 为 0.99525487, 第二亲本累积排除率 (CE-2P) 为 0.99990862, 双亲累积排除率 (CE-PP) 为 0.99999986。四组多重 PCR 的累积排除率及模拟配对率见表 5。

表 5 四组多重 PCR 的累积排除概率和模拟配对率

Tab.5 Combined exclusion probability and simulated assignment rate of four multiplex PCR system

组别 Groups	第一亲本累积排除率 CE-1P	第二亲本累积排除率 CE-2P	双亲累积排除率 CE-PP	模拟配对率 Simulated assignment rate (%)
五重 PCR Multiplex PCR of 5 loci	0.63549976	0.83873049	0.95113086	22
四重 PCR1 Multiplex PCR1 of 4 loci	0.79481014	0.93581102	0.99135259	35
四重 PCR2 Multiplex PCR2 of 4 loci	0.61874957	0.84440207	0.95695493	26
三重 PCR Multiplex PCR of 3 loci	0.83358814	0.94326594	0.99238194	18
总体 Total	0.99525487	0.99990862	0.99999986	100

2.3.3 微卫星多重 PCR 组合的亲权鉴定准确率分析

在亲本总数为 20 个, 置信度为 95% 的情况下, 实验验证了四组微卫星多重 PCR 体系亲权鉴定的准确率。从图 4 可以看出, 随着不断累加多重 PCR 体系, 其亲权鉴定准确率逐渐提高。当同时使用四组多重 PCR 体系进行亲权分析时, 无论亲本性别是否已知, 其亲权鉴定准确率均为 100%。半同胞和全同胞家系均鉴别效果良好, 验证结果与模拟结果基本吻合, 说明亲权分析的结果具有较高的准确度和可信度。

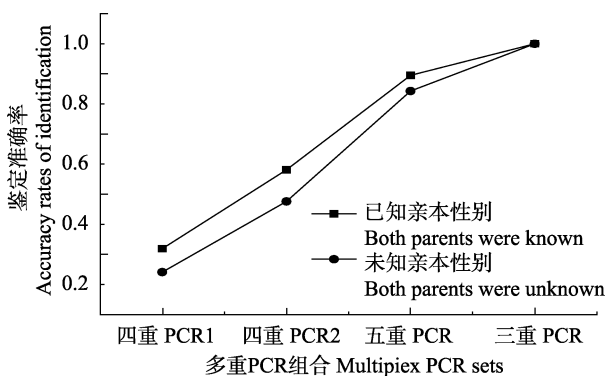


图 4 微卫星多重 PCR 组合的亲权鉴定准确率

Fig.4 The accuracy rates of parentage identification for different multiplex PCR sets

3 讨论

3.1 凡纳滨对虾微卫星多重 PCR 体系的构建

微卫星多重 PCR 即在 1 次 PCR 反应中, 可以同

时进行多个位点的特异扩增, 技术难度较大。理想的多重 PCR 体系的构建, 需要从位点选择、引物组合、反应条件优化等多方面进行全面的分析和反复的试验。本实验在构建凡纳滨对虾微卫星多重 PCR 体系时发现, 微卫星位点选择和引物组合是影响多重 PCR 构建成功与否的主要因素之一。这与张毅等(2008)的研究结果相一致。要在同一 PCR 反应中得到多个扩增片段产物, 首先, 每个位点的扩增片段长度必须有所差异。罗伟等(2013)认为多个位点的产物大小两两之间的差异应大于 20 bp。在本研究中, 相邻位点之间扩增片段长度相差不小于 30 bp, 使相邻位点间的荧光信号不会相互干扰, 从而不会对基因分型结果产生影响。其次, 同一位点上下游引物间, 不同位点的引物之间不能形成错配、二聚体及发卡结构。本研究利用多重 PCR 引物设计软件 MPEprimers 对多重 PCR 组合中的引物进行二聚体结构检测, 排除影响多重 PCR 体系稳定的引物对。在引物组合过程中, 很少有引物之间完全没有影响。在这种情况下, 可以挑选二聚体结构不稳定的引物组合, 来尝试构架多重 PCR 体系。

在确定多重 PCR 组合后, 对多重 PCR 的反应条件进行优化是必不可少的。任宪云等(2011)研究结果显示, 对于多重 PCR 的成功扩增, 退火温度、 $MgCl_2$ 浓度、引物相对浓度等参数是关键影响因素。多重 PCR 反应要求每个位点的引物扩增效率要尽量一致。否则, 扩增效率高的引物会抑制其他引物, 造成多重 PCR 构建失败。调整各引物间的浓度比例, 是使各引

物达到相同扩增效率的主要方法。各引物间的浓度比例,需要反复的实验才能确定。本研究首先以相同的引物浓度来进行多重 PCR 的扩增,再通过条带的明亮度来判断每个引物的扩增效率,适当地增加扩增效率低的引物浓度和降低扩增效率高的引物浓度,使每个引物扩增效率相近。另外,引物的总体浓度过高会大幅度增加形成引物二聚体的可能,严重影响多重 PCR 的扩增效果,要注意控制引物总体浓度。

引物的退火温度是影响多重 PCR 扩增效果的主要因素之一。Kong 等(2006)研究表明,多重 PCR 各引物退火温度最好相近,相差不超过 5℃。作者认为大多数情况下,引物的退火温度是一个温度范围,在此范围内,引物均可有效扩增。所以,本研究在优化多重 PCR 体系的最佳退火温度时,利用 Touch down 程序,从 1 个较高的退火温度开始,每 1 个循环降低一定的温度,这样可以覆盖一定范围的温度值,使每对引物都能达到期望的退火值,往往能获得较好的扩增效果,这与 Markoulatos 等(2000)的研究结果相符。

Markoulatos 等(2000)的研究还表明,在聚合酶反应过程中, Mg^{2+} 的浓度会影响 PCR 扩增的效果。 Mg^{2+} 浓度过大,会造成非特异性扩增;浓度过小,会减少 PCR 产物量。本研究在多重 PCR 体系其他组分浓度不变的前提下,针对 Mg^{2+} 设计了一系列浓度梯度,通过正交实验的方法确定 Mg^{2+} 的最佳浓度,使多重 PCR 得到最佳的扩增效果。

除以上 3 个主要方面外,PCR 反应的循环次数也是多重 PCR 反应体系优化的内容之一。循环次数的多少直接影响着 PCR 反应的产量,但是,并非循环次数越多越好。当 PCR 反应循环次数过多时,体系中某一组分消耗殆尽时,引物错配的几率会增大,极易产生杂带,从而影响 PCR 反应的效果(任宪云等, 2011)。所以,建议普通 PCR 的循环次数为 25–35 次,而多重 PCR 则需要更多的循环次数。本研究所建立的 4 个多重 PCR 体系,分别采用 38、40、40、40 个循环,均能得到较好的扩增效果。

3.2 凡纳滨对虾遗传多样性及亲权分析

多态信息含量(PIC)是一个遗传标记多态性可提供的信息量的度量,是衡量基因变异程度高低的重要指标(贾舒雯, 2012)¹⁾。Bostein 等(1980)提出衡量基因变异程度高低的多态信息量指标: $PIC \geq 0.5$ 时为高度

多态, $0.25 \leq PIC < 0.5$ 为中度多态, $PIC < 0.25$ 为低度多态。本实验所利用的 16 个微卫星位点中,有 13 个位点为高度多态($PIC \geq 0.5$),其余 3 个位点为中度多态($0.25 \leq PIC < 0.5$), PIC 值介于 0.259–0.871 之间,平均多态信息含量(PIC)为 0.5813,为高度多态。表明,16 个微卫星位点在实验群体中有较高的遗传多样性,可以用于后续的家系亲权分析。

微卫星标记因具有符合孟德尔遗传模式,且呈共显性遗传,现已广泛应用于水产动物亲权鉴定、遗传连锁图谱的绘制以及群体遗传研究等多个方面。微卫星多重 PCR,因具有省时、高效和节约等特点,使得微卫星标记识别在实际应用中可以更加方便和快捷。于洋等(2014)²⁾利用 15 个多态性微卫星位点,构建了凡纳滨对虾多重 PCR 体系,并对 8 个家系的子代及其亲本进行亲权分析,其结果显示,在亲本性别已知和亲本性别未知的情况下,模拟分析配对率均为 100%,除 3 个家系鉴定准确率较低外,其余的家系均达到 100%的亲权鉴定准确率,平均鉴定准确率为 98%。虽然于洋等建立的多重 PCR 已经有了较高的鉴定准确率,但其研究也发现,对于亲缘关系较近的个体仍然出现了较高的错判率,其最高鉴定准确率仅能达到 93%。在本研究中,增加了用于亲权分析的微卫星位点数量和家系数量,使亲权分析结果具有更高的准确性和可信度。本研究利用 16 个凡纳滨对虾多态性微卫星位点,构建了 1 个五重,2 个四重和 1 个三重 PCR 体系,在亲本性别已知和亲本性别未知的情况下,应用四组多重 PCR 体系对 11 个家系子代及其亲本进行亲权分析时,其模拟配对率和亲权鉴定准确率均达到 100%,对 2 个父系半同胞家系和 2 个母系半同胞家系也均能准确鉴别。相比于于洋等(2014)²⁾的研究,本研究在微卫星位点数量上仅有较少增加,但是对更多的家系进行亲权分析时,均能达到 100%的鉴定准确率,尤其是对亲缘关系更近的同胞家系鉴别效果较好,显示出建立的四组微卫星多重 PCR 拥有较高的鉴别能力和实际应用效果。

4 结论

本实验构建了 1 个五重,2 个四重和 1 个三重 PCR 体系,凡纳滨对虾多重 PCR 体系扩增效果良好。利用已建立的四组多重 PCR 体系,对 11 个家系子代及

1) 贾舒雯. 脊尾白虾微卫星引物筛选及群体遗传多样性分析. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2012, 28–31

2) 于洋. 凡纳滨对虾分子标记的开发及其在遗传育种中的应用. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2014, 49–57

其亲本进行亲权分析,得到的模拟配对率和亲权鉴定准确率均达到 100%。显示出,该组多重 PCR 可以实际应用在凡纳滨对虾家系育种的过程中,为凡纳滨对虾家系选育、亲权分析、群体遗传多样性等方面的研究提供高效、准确的检测手段。

参 考 文 献

- 王兴强, 马牲, 董双林. 凡纳滨对虾生物学及养殖生态学研究报告. 海洋湖沼通报, 2004(4): 94-100
- 王鸿霞, 吴长功, 张留所, 等. 微卫星标记应用于凡纳滨对虾家系鉴别的研究. 遗传, 2006, 28(2): 179-183
- 王稳, 屈武斌, 申志勇, 等. 利用 MPprimer 设计引物并优化扩增条件以提高多重 PCR 效率的实验研究. 生物化学与生物物理进展, 2010, 37(3): 342-346
- 孔杰, 金武, 栾生, 等. 水产动物选择育种的近交分析. 自然科学进展, 2009, 19(9): 917-923
- 任宪云, 刘萍, 李健, 等. 三疣梭子蟹微卫星多重 PCR 技术建立及条件的优化. 渔业科学进展, 2011, 32(3): 76-83
- 李伟亚, 王伟继, 孔杰, 等. 中国对虾微卫星四重 PCR 技术的建立及其在模拟放流效果评估方面的应用. 海洋学报(中文版), 2012, 34(5): 213-220
- 李佳凯, 王志勇, 韦信键, 等. 大黄鱼微卫星多重 PCR 体系的建立及其应用. 水产学报, 2014, 38(4): 472-477
- 张伟权. 世界重要养殖品种——南美白对虾生物学简介. 海洋科学, 1990(3): 69-73
- 张涛, 庄平, 章龙珍, 等. 可视荧光硅橡胶标志用于西伯利亚鲟幼鱼标志的初步评价. 水生生物学报, 2010, 34(3): 639-641
- 张博, 宋文平. 微卫星多重 PCR 在水生动物亲权分析中的研究进展. 海洋渔业, 2012, 34(3): 350-356
- 张毅, 孙东晓, 俞英, 等. 家养水牛 30 个微卫星标记的多重 PCR 体系建立及其多态性检测. 遗传, 2008, 30(1): 59-64
- 苗贵东, 杜民, 杨景峰, 等. 大菱鲆亲子鉴定的微卫星多重 PCR 技术建立及应用. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2011, 41(1/2): 97-106
- 罗伟, 高泽霞, 曾聪, 等. 团头鲂微卫星多重 PCR 体系的建立及应用. 大连海洋大学学报, 2013, 28(5): 418-423
- 聂鸿涛, 李琪, 孔令锋. 皱纹盘鲍微卫星多重 PCR 体系构建及其在家系鉴定中的应用. 水产学报, 2013, 37(2): 207-215
- Alcivar-Warren A, Meehan-Meola D, Park SW, et al. Shrimp Map: A low-density, microsatellite-based linkage map of the pacific white-leg shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Identification of sex-linked markers in linkage group 4. J Shellfish Res, 2007, 26(4): 1259-1277
- Botstein D, White RL, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am J Hum Genet, 1980, 32(3): 314-331
- Garcia DK, Alcivar-Warren A. Characterization of 35 new microsatellite genetic markers for the pacific white-leg shrimp, *Litopenaeus vannamei*: their usefulness for studying genetic diversity of wild and cultured stocks, tracing pedigree in breeding programs, and linkage mapping. J Shellfish Res, 2007, 26(4): 1203-1216
- Kong F, Gilbert GL. Multiplex PCR-based reverse line blot hybridization assay (mPCR/RLB)-a practical epidemiological and diagnostic tool. Nat Protoc, 2006, 1(6): 2668-2680
- Li YT, Wongprasert K, Shekhar M, et al. Development of two microsatellite multiplex systems for black tiger shrimp *Penaeus monodon* and its application in genetic diversity study for two populations. Aquaculture, 2007, 266(1-4): 279-288
- Luo K, Kong J, Luan S, et al. Effect of inbreeding on survival, WSSV tolerance and growth at the postlarval stage of experimental full-sibling inbred populations of the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. Aquaculture, 2014, 420-421(3): 32-37
- Markoulatos P, Georgopoulou A, Kotsovassilis C, et al. Detection and typing of HSV-1, HSV-2, and VZV by a multiplex polymerase chain reaction. J Clin Lab Anal, 2000, 14(5): 214-219
- Meehan D, Xu Z, Zuniga G, et al. High frequency and large number of polymorphic Microsatellites in cultured shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* [Crustacea:Decapoda]. Mar Biotechnol, 2003, 5(4): 311-330
- Wang Y, Wang X, Wang A, et al. A 16-microsatellite multiplex assay for parentage assignment in the eastern oyster (*Crassostrea virginica* Gmelin). Aquaculture, 2010, 308(S1): 28-33
- Zhang K, Wang W, Li W, et al. Analysis of genetic diversity and differentiation of seven stocks of *Litopenaeus vannamei* using microsatellite markers. J Ocean Univ China, 2014, 13(4): 647-656
- Zhang L, Yang C, Zhang Y, et al. A genetic linkage map of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): sex-linked microsatellite markers and high recombination rates. Genetica, 2007, 131(1), 37-49

(编辑 马瑾艳)

Development of Multiplex PCR Systems of Microsatellite Markers for Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and Its Application for Parentage Identification

LI Dongyu^{1,2,3}, KONG Jie^{1,2,3}①, MENG Xianhong^{2,3}, LUAN Sheng^{2,3}, LUO Kun^{2,3},
LU Xia^{2,3}, CAO Baoxiang^{2,3}

(1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071)

Abstract Microsatellite markers have been widely used in parentage identification, genetic linkage mapping, and diversity study of aquatic animals, due to the advantages including mendelian inheritance pattern, wide distribution, high polymorphism, high repeatability and stability, and co-dominant inheritance. This technique efficiently helps with analysis of genetic background of different populations, as well as selective breeding. Multiplex PCR could amplify many microsatellite loci simultaneously, therefore is an efficient, rapid, and economic method, and could be a powerful tool of parentage identification, pedigree management, and population genetic analysis of aquatic animals. In order to improve the efficiency and reduce the cost of genetic studies of *Litopenaeus vannamei*, previously reported microsatellite loci with high polymorphism were selected in developing multiplex PCR systems in this study. Four multiplex PCR systems were successfully established and optimized based on the allelic lengths and annealing temperatures of the microsatellite loci. We used these systems to perform pedigree analysis of 11 families of selected *L. vannamei*, and found that the average number of alleles (N_a) was 6, the average polymorphism information content (PIC) was 0.5813, and the average observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_e) were 0.513 and 0.636 respectively. Together with Cervus 3.0 software, the four multiplex PCR systems were also used to verify the capacity of parentage assignment in the 11 families of *L. vannamei* of which the pedigree relationships were already known. The combined exclusion probability of the first parent (CE-1P), the second parent (CE-2P), and a parent pair (CE-PP) were shown to be 0.99525487, 0.99990862, and 0.99999986 respectively. Further analysis suggested that if all the multiplex PCR systems were used for pedigree analysis, the accuracy rates of both simulated assignment rate and parentage identification could reach 100%. It also indicated that the full-sib and half-sib families had great capability for precise identification. In conclusion, the four multiplex PCR systems for microsatellite markers could serve as an efficient and accurate approach in further genetic diversity and pedigree analysis of *L. vannamei*.

Key words *Litopenaeus vannamei*; Microsatellite multiplex PCR; Parentage identification

① Corresponding author: KONG Jie, E-mail: kongjie@ysfri.ac.cn