

白条草蜥多态性微卫星位点的分离与鉴定

罗来高 吴义莲 耿军 许雪峰*

滁州学院生物与食品工程学院 安徽 滁州 239012

摘要: 白条草蜥 (*Takydromus wolteri*) 是一种年产多窝卵的蜥蜴。为了对其婚配制度、同一雌性个体所产卵的窝内和窝间的父权状况、种群的遗传结构和物种的进化历史等研究内容进行探讨,本研究筛选出白条草蜥的 9 个具有高度多态性的微卫星位点。微卫星位点筛选自包含 (AC)_n 和 (ATAG)_n 重复片段的微卫星富集文库。在白条草蜥安徽滁州种群的 16 ~ 32 个个体中对上述位点进行检测后发现,上述座位的等位基因数目范围为 12 ~ 20 个,期望杂合度范围为 0.894 ~ 0.955,观测杂合度范围 0.565 ~ 0.938,表明这些微卫星标记具有良好的遗传多样性,它们将在白条草蜥的种群遗传结构、基因流水平、种群分化和婚配制度的研究中发挥重要作用。

关键词: 白条草蜥;微卫星;分离和鉴定;种群遗传学

中图分类号:Q75 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2013)03-367-04

Isolation and Characterization of Nine Polymorphic Microsatellites in White-striped Grass Lizard

LUO Lai-Gao WU Yi-Lian GENG Jun XU Xue-Feng*

School of Biology & Food Engineering, Chuzhou University, Chuzhou, Anhui 239012, China

Abstract: White-striped Grass Lizard (*Takydromus wolteri*) is an oviparous lacertid lizard. Females produce multiple clutches of eggs during the breeding season. To understand the mating system, the paternity of the offspring within and among clutches, the population genetic structure and the evolutionary history of this species, we developed 9 highly polymorphic microsatellites for *T. wolteri* in a population from Chuzhou, Anhui, China. Loci were isolated from a genomic library enriched for (AC)_n and (ATAG)_n repetitive elements and primers were tested in 16 – 32 individuals. The number of alleles ranged from 12 to 20 per locus, the expected heterozygosity (H_e) ranged from 0.894 to 0.955, and the observed heterozygosity (H_o) ranged from 0.565 to 0.938. These loci could be useful markers to investigate population genetic structure, gene flow level, population differentiation and mating systems in *T. wolteri*.

Key words: White-striped Grass Lizard (*Takydromus wolteri*); Microsatellite; Isolation and characterization; Population genetics

白条草蜥 (*Takydromus wolteri*) 分布于中国的东部和东北部 (安徽、江苏、辽宁、吉林和黑龙江)、朝鲜和俄罗斯东部 (Zhao et al. 1993, Arnold 1997)。白条草蜥是一种卵生蜥蜴,雌蜥在繁殖季节产多窝卵 (Luo et al. 2012)。为了解其婚配制度、同一雌性个体所产卵的窝内和窝间的父权状况、种群的遗传结构和该物种

的进化历史等内容,可采取分子生态学研究途

基金项目 安徽省自然科学基金项目 (No. 10040606Q46) 和安徽省高校自然科学基金项目 (No. KJ2010A249);

* 通讯作者, E-mail: xuefxu@chzu.edu.cn;

第一作者介绍 罗来高,男,博士;研究方向:两栖爬行动物进化生态学; E-mail: luolaigao@sina.com.

收稿日期:2012-12-14,修回日期:2013-03-14

径进行。而上述研究途径需要一些灵敏和高效的分子标记来实现,在所有分子标记中,微卫星标记或其他短串联重复序列因为其具有高度的变异性,是以上方面研究采用最多的分子标记方法。基于此,本研究筛选出白条草蜥 9 个高度多态的微卫星标记,并对这些位点的特征进行描述。

1 材料与方法

1.1 实验动物的采集与 DNA 提取 实验动物白条草蜥于 2011 年 4 月捕自安徽滁州琅琊山(E 118.31°, N 32.30°)。捕捉的蜥蜴带回滁州学院实验室,鉴定每条蜥蜴的性别,然后于 -20℃ 保存。使用 EasyPure 基因组 DNA 提取试剂盒(TransGen Biotech),根据产品说明书的步骤,提取每个蜥蜴尾部组织基因组 DNA。

1.2 微卫星富集文库的构建 依据 FIASCO 法来分离微卫星位点(Zane et al. 2002),并稍作修改,具体步骤如下:取单个个体基因组 DNA 250 ng 左右,使用 *Mse* I 消化,同时与 *Mse* I 的 AFLP 受体接头(5'-TAC TCA GGA CTC AT-3', 5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3') 进行连接。将消化产物稀释 10 倍以后,使用 AFLP 受体特异的引物(5'-GAT GAG TCC TGA GTA AN-3', 简并引物 N 为 A、T、G、C, 简称 *Mse* I-N) 进行 PCR 扩增。利用 5'端生物素(AC)₁₂ 和 (TATC)₈ 的寡核苷酸作为探针与扩增产物进行杂交,利用磁珠(Streptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particles, Promega)捕获杂交产物,即可获得所需的单链微卫星重复序列。再以捕获的 DNA 为模板,以 *Mse* I-N 为引物进行 DNA 双链恢复。

1.3 阳性克隆的筛选 扩增产物连接到 pEASY-T1 Simple 克隆载体上(TransGen Biotech),并转化到 Trans5α 感受态细胞(TransGen Biotech)。阳性重组子通过三引物法[M13 载体引物和 (AC)₁₂/(TATC)₈ 寡核苷酸]PCR 进行筛选。琼脂糖凝胶电泳显示双带或三带的产物则为阳性克隆,交生生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.4 序列分析、引物设计及微卫星位点的筛选

测序结果去除 M13 的载体序列后,使用 TRF 软件(Tandem Repeats Finder, Version 4.0)寻找其中的重复单元的序列(Benson 1999)。使用 PRIMER5 软件(Lalitha 2000)在重复单元的侧翼保守序列设计引物,目的片段在 100~500 bp 之间。设计得到的引物进行扩增条件的优化,筛选出扩增稳定且产物单一的引物。

1.5 基因分型及数据的读取和分析 对初选出的微卫星位点的单侧引物 5'端进行荧光标记(FAM/HEX/TAMRA)并在 16~32 个个体中进行 PCR 扩增。PCR 反应体积为 20 μl,反应体系组成为:100~200 ng 基因组 DNA, 10 μl 2 × EasyTaq PCR Supermix(TransGen Biotech)和上下游引物(10 μmol/L)各 1 μl。在 ABI 2720 热循环仪上进行扩增,PCR 的循环设置为:95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 30 s,60℃ 退火 60 s(表 1),72℃ 延伸 60 s,进行 32 个循环;72℃ 10 min。PCR 产物在 ABI PRISM 3730 遗传分析仪(Applied Biosystems)上使用 GS350 作为内标进行等位基因的分型,并使用 GENMARKER(version 1.85, Applied Biosystems)对分型结果进行读取。使用 Excel Microsatellite Tool kit 程序判别不同样品之间相同基因型并统计各位点等位基因数。使用 GENETIX version 4.0 软件(Belkhir et al. 2004)进行等位基因大小范围、等位基因数目、观察杂合度和期望杂合度的数据统计。使用 GENEPOP version 3.4 软件(Raymond et al. 1995)进行哈德温伯格平衡(Hardy-Weinberg Equilibrium, HWE)分析,以马尔科夫链法产生精确的 *P* 值,辅以连续的 Bonferroni 校正来检验各位点是否偏离 HWE 及位点之间是否存在连锁不平衡。

2 结果和讨论

挑取阳性克隆 560 个,经三引物 PCR 检测,筛选出 305 个含有目的序列阳性重组子的克隆,测序得到 85 条序列,另有 40 个未能测序成功。在这 85 条序列中,除去重复次数低(< 6)、侧翼序列过短而不能用于设计引物的序列

外,得到了含有微卫星的序列 15 条,并设计得到 15 个初选引物。其中,有 9 个微卫星引物被选作进一步分析并在 16 ~ 32 个个体中进行检测。9 条含有微卫星位点的序列已上传至 GenBank(序列号为 JX436104 ~ JX436112)。

本研究所获得的 9 个微卫星位点的等位基

因数目 12 ~ 20 个,期望杂合度 0.894 ~ 0.955,观测杂合度 0.565 ~ 0.938(表 1)。哈德温伯格平衡和连锁不平衡结果显示,除了位点 Two-a36 以外,其他位点均未偏离哈德温伯格平衡。除了位点 Two-c04 和 Two-c132 之外,其他位点间不存在连锁不平衡。本研究的结果表明白条草蜥的

表 1 9 个白条草蜥微卫星座位的鉴定

Table 1 Characterization of 9 *Takydromus wolteri* microsatellite loci

座位 Locus	引物序列 Primer sequences (5'-3')	重复类型 Repeat motif	退火 温度 T_a ($^{\circ}\text{C}$)	序列大小 Size range (bp)	等位基 因数量 No. of alleles	个体数 N	观测杂 合度 H_o	期望杂 合度 H_e	哈温显 著性 水平 P	序列号 Accession no.
Two-a03	F;TAMRA-GAGTGCTTTTGCCCT TATTTGAT	(AC) ₂₁	60	218 ~ 252	15	29	0.931	0.920	0.326	JX436104
Two-a07	R;GTGTGCCTCCCTCCTGTGA F;HEX-TGCCAAAAGATGAGTC AAGGATGG	(AC) ₂₀	60	330 ~ 370	18	31	0.903	0.929	0.605	JX436105
Two-a43	R;TTGGTCAAATGCTGGTAGGA TAGG F;FAM-AAAATGCGCCTAGAAC AATGG	(AC) ₂₄	60	268 ~ 306	15	31	0.871	0.912	0.689	JX436107
Two-a36	R;AGAGCTACACTACTGGGGAA GGA F;TAMRA-CTGATGGGTTGTGGC TTCTGTG	(GT) ₂₀	55	317 ~ 367	20	23	0.565	0.955	1.000	JX436106
Two-c04	R;TTGCTCGCTTTCTTTCCATTT GT F;HEX-TCCGACTTCCGCTCCC TCTT	(ATCT) ₁₃	55	266 ~ 318	15	31	0.871	0.918	0.708	JX436108
Two-c60	R;ATTATCCCTCGCCAGCCAC AC F;FAM-CCACGAACCAGCAAAT GATAGACA	(TAGA) ₁₄	60	220 ~ 270	13	30	0.733	0.894	0.687	JX436109
Two-c89	R;ACTGGCACCCTGGCACA CTT F;TAMRA-GAGATCATTAGTT GGGAGGAAGG	(TAGA) ₁₃	60	367 ~ 443	17	32	0.875	0.908	0.607	JX436111
Two-c66	R;ACTGATGAGGGTCTAATGT TGTGG F;HEX-TGAGGTTTGCTATTGT TTTACTGT	(TAGA) ₂₄	60	301 ~ 345	12	16	0.938	0.907	0.430	JX436110
Two-c132	R;GAAGGCCGGTCCATTAGGT F;FAM-CTGCTTGGCTTCTGAG TTTTG	(TCTA) ₁₇	60	226 ~ 294	15	32	0.813	0.916	0.795	JX436112
	R;CATATTTGGCATTGTTTTTG TTTC									

T_a . Annealing temperature; N . Number of individuals genotyped; H_o . Observed heterozygosity; H_e . Expected heterozygosity; P . P -value of Hardy-Weinberg equilibrium test.

微卫星位点在等位基因大小范围、等位基因数目、观察杂合度和期望杂合度上都显示了较高的多态性。其他有鳞类已有的研究也显示了微卫星标记高度变异性的特点,如蛇类:森王蛇 (*Drymarchon couperi*) (Shamblin et al. 2011)、路易斯安那松蛇 (*Pituophis ruthveni*) (Kwiatkowski et al. 2010) 和舟山眼镜蛇 (*Naja atra*) (Lin et al. 2011); 蜥蜴类:环颈蜥 (*Crotaphytus collaris*) (Hutchison et al. 2004)、东方水蜥 (*Physignathus lesueurii*) (Frère et al. 2012)、蜡皮蜥 (*Leiolepis reevesii*) (Hua et al. 2012) 和快步麻蜥 (*Eremias velox*) (Li et al. 2012)。

总之,本研究所筛选的高度多态的微卫星标记能够提供足够的变异以研究白条草蜥的种群遗传结构、基因流水平以及同一雌蜥所产后代窝内的和窝间的父权状况。

参 考 文 献

- Arnold E N. 1997. Interrelationships and evolution of the East Asian grass lizards *Takydromus* (Squamata: Lacertidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 119(2): 267 - 296.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, et al. 2004. GENETIX4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Montpellier: Université Montpellier II.
- Benson G. 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 27(2): 573 - 580.
- Frère C H, Prentis P J, Ezaz T, et al. 2012. Isolation and characterization of novel microsatellite and mitochondrial DNA markers for the eastern water dragon (*Physignathus lesueurii*). *Conservation Genetics Resources*, 4(1): 113 - 116.
- Hua L, Mao L X, Chen C, et al. 2012. Isolation and characterization of microsatellite loci in the Reeves' s butterfly lizard *Leiolepis reevesii* (Agamidae). *Conservation Genetics Resources*, 4(3): 791 - 794.
- Hutchison D W, Strasburg J L, Brisson J A, et al. 2004. Isolation and characterization of 11 polymorphic microsatellite loci in collared lizards (*Crotaphytus collaris*). *Molecular Ecology Notes*, 4(4): 554 - 556.
- Kwiatkowski M A, Somers C M, Poulin R G, et al. 2010. Development and characterization of 16 microsatellite markers for the Louisiana pine snake, *Pituophis ruthveni*, and two congeners of conservation concern. *Conservation Genetics Resources*, 2(1): 163 - 166.
- Lalitha S. 2000. Primer premier 5. *Biotech Software & Internet Report*, 1(6): 270 - 272.
- Li H, Zhou Z S, Guo J, et al. 2012. Polymorphic microsatellite loci in the rapid racerunner *Eremias velox* (Squamata: Lacertidae). *Genetics and Molecular Research*, 11(4): 4707 - 4710.
- Lin L H, Mao L X, Luo X, et al. 2011. Isolation and characterization of microsatellite loci in the Chinese cobra *Naja atra* (Elapidae). *International Journal of Molecular Sciences*, 12(7): 4435 - 4440.
- Luo L G, Wu Y L, Zhang Z Y, et al. 2012. Sexual size dimorphism and female reproduction in the white-striped grass lizard *Takydromus wolteri*. *Current Zoology*, 58(2): 236 - 243.
- Raymond M, Rousset F. 1995. Genepop (version 3.4): population genetics software for exact test and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86(3): 248 - 249.
- Shamblin B M, Alstad T I, Stevenson D J, et al. 2011. Isolation and characterization of microsatellite markers from the threatened eastern indigo snake (*Drymarchon couperi*). *Conservation Genetics Resources*, 3(2): 303 - 306.
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11(1): 1 - 16.
- Zhao E M, Adler K. 1993. *Herpetology of China*. Ohio: Society for the Study of Amphibians & Reptiles, 521.