

长江江豚微卫星 DNA 分离的初步研究

郑劲松^{1,2} 廖小林^{1,2} 童金苟¹ 王 丁¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要:为了开发物种特异性微卫星标记, 本文采用一种改良的快速微卫星分离法 (FIASCO) 从长江江豚 (*Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis*) 的基因组中筛选得到 72 条微卫星 DNA 序列。根据重复单元的排列特点, 完美型、非完美型及复合型序列所占的比例分别为 58.3%、22.2% 和 19.5%。选择其中 30 条序列设计 PCR 扩增引物, 并用 12 个随机选择的长江江豚样品进行多态性筛选。初步结果表明其中 14 对引物的扩增产物稳定并且具有多态性; 在每个座位上获得 2—13 个等位基因, 平均等位基因数为 5.87 个; 14 个微卫星座位的平均观察杂合度 (H_o) 和期望杂合度 (H_e) 分别为 0.560 和 0.709。本研究获得了长江江豚的第一批物种特异性微卫星座位及其扩增引物, 这些微卫星标记将在后续的保护遗传学研究中发挥重要作用。

关键词: 长江江豚; FIASCO; 微卫星 DNA; 多态性

中图分类号: Q959.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2008)01-0019-07

长江江豚是唯一的、独特的江豚淡水种群^[1], 仅分布于我国长江中下游干流及与其相通的洞庭湖和鄱阳湖中^[2]。在过去的数十年中, 由于长江流域人类活动的迅速膨胀, 导致了长江江豚栖息地环境的萎缩和破坏, 从而使得该种群的数量急剧下降^[3-5]。2006 年年底进行的长江淡水豚中外联合考察表明其种群数量不超过 1400 头^[6]。如不采取强有力的保护措施, 它们很快将会像白鱘豚 (*Lipotes vexillifer*) 一样濒临灭绝的边缘^[5,7,8]。基于该种群所面临的严峻现状, 迫切需要加强保护和管理。

保护遗传学已经成为保护生物学的核心部分之一, 其研究结果可以为濒危物种保护和管理措施的制定提供重要的参考依据。然而, 目前针对长江江豚自然种群进行的保护遗传学研究主要在线粒体 DNA (mtDNA) 水平上开展^[9-12]。由于 mtDNA 是核外遗传物质, 并且具有母性遗传的特性, 不能反映核基因流情况, 因而还需要通过双亲遗传标记进行进一步的研究以获取更为全面的遗传信息, 用于指导保护和管理。微卫星标记由于具有多态性高、易于检测、共显性、孟德尔遗传等特点, 而成为保护遗传学和分子生态学等研究领域最广泛使用的遗传标记之一^[13]。但到目前为止, 还没有长江江豚或者

江豚物种特异性微卫星标记的报道。夏军红等通过跨种扩增的方法从其他鲸类的微卫星引物中筛选到一些适用于长江江豚基因组扩增的引物, 并用这些微卫星引物对石首天鹅洲白鱘豚国家级自然保护区中的一个长江江豚迁地保护群体进行了个体识别、亲子关系分析、遗传多样性评估等方面的研究工作^[14-17]。但在应用这些微卫星标记对长江江豚基因组进行 PCR 扩增时, 得到的扩增产物的特异性并不理想, 在等位基因判读方面存在一些难度。目前这些微卫星标记还未能成功地应用于长江江豚自然种群的保护遗传学研究, 因此, 迫切需要开展该物种特异性微卫星 DNA 标记的开发工作。

本研究采用一种改良的快速微卫星分离法 (FIASCO)^[18,19], 从长江江豚的基因组中分离微卫星 DNA, 并设计 PCR 扩增引物, 试图筛选得到物种特异性和多态性微卫星标记, 以用于后续的保护遗传学研究。

1 材料和方法

1.1 基因组 DNA 的提取 采用常规的蛋白酶 K 消化和酚/氯仿抽提法从长江江豚的肌肉组织中提取高质量和高分子量的基因组 DNA, 并去除 RNA。

收稿日期: 2005-10-25; 修订日期: 2007-07-20

基金项目: 国家自然科学基金 (30570252); 科技部国际合作项目 (2004DFB03000) 资助

作者简介: 郑劲松 (1975—), 男, 汉族, 湖北咸宁人; 博士; 主要从事鲸类保护遗传学研究。E-mail: Zhengjinsong @ihb.ac.cn

通讯作者: 王丁, E-mail: wangd @ihb.ac.cn

1.2 文库的构建和富集 基本操作参照 Zhu 等^[19],但本研究中所使用的 3 条生物素标记探针分别为 Biotin-(GT)₁₃、Biotin-(CTAT)₇和 Biotin-(GGT)₉,最适杂交温度分别为 68、60 和 70。

1.3 微卫星 DNA 片段的分离 分离操作基本同 Zhu 等^[19],但增加一次在 55 条件下的非严格洗涤 (Nonstringency wash)。最后通过 95℃ 水浴变性,使得微卫星 DNA 片段溶解于 50μL TE 8.0 溶液中。

1.4 微卫星 DNA 片段的克隆测序 克隆操作基本同 Zhu 等^[19],但所用载体为 pMD 18-T,感受态细胞为 DH5α (TaKaRa)。阳性克隆经培养后由北京华大基因公司测序,测序在 ABI 3730XL 仪器上进行。为了保证序列的准确性,采用一对 M13 通用引物进行双向测序,然后对同一样品的两次测序结果进行核对和拼接。

1.5 微卫星 DNA 序列的鉴定及引物设计 核对和拼接后的 DNA 序列通过程序 tf (Tandem repeat finder, version 3.21)^[20]进行分析,找出微卫星序列,然后用在线引物设计软件 Primer3 (<http://www.genome.wi.mit.edu/genome-software/other/primer3.html>) 为选定的序列设计 PCR 扩增引物,相关的参数均设为默认值(引物长度在 18—27bp 之间,最适长度为 20bp;扩增退火温度在 57—63℃ 之间,最适温度为 60℃;GC 含量在 20%—80%之间,最适含量为 50%;扩增产物长度在 100—1000bp 之间,最适长度为 200bp)。

1.6 多态性检测与基因分型 引物由北京华大基因公司合成, PAGE 纯化。经条件优化之后,随机选择 12 个长江江豚样品对各引物进行有效性和多态性检测。扩增产物通过 8% 非变性 PAGE 电泳、溴化乙锭 (EB) 染色的方法进行基因分型,然后用全自动凝胶成像分析系统 (Gene Genius Bio Imaging System; Syngene) 记录电泳结果,并参照同批次电泳的 PBR322/Msp^I 分子量标准判读不同的等位基因。微卫星多态性参数由种群遗传变异分析软件 POP-GENE (Version 1.31)^[21]计算得到。

2 结果

2.1 阳性克隆测序结果及阳性克隆率

本研究先后用 3 种不同的探针对基因组文库进行杂交筛选。第一次用两碱基重复探针 Biotin-(GT)₁₃,第二和第三次分别用三碱基重复探针 Biotin-(GGT)₉和四碱基重复探针 Biotin-(CTAT)₇。第一次杂交获得的目的 DNA 片段经克隆后,送出 134

个阳性克隆进行测序,共得到 69 条微卫星序列,微卫星阳性克隆率(富集效率)为 51.5%。第二和第三次杂交共送出 32 个阳性克隆,得到 28 条微卫星序列,富集效率为 87.5%。本研究总的微卫星 DNA 富集效率为 58.4%。

2.2 微卫星 DNA 序列及其分类

本研究测序得到 97 条微卫星序列,将出现重复单元中断、测序效果不理想及重复出现的序列排除后,最后获得 72 条完全不同的微卫星序列。依据 Weber 提出的标准^[22],完美型 (Perfect)、非完美型 (Imperfect) 及混合型 (Compound) 序列分别有 42 条、16 条和 14 条,各自所占的比例分别为 58.3%、22.2%和 19.5% (表 1)。此外,按照重复单元的类型进行分类,则两碱基重复的微卫星序列共有 64 条,占总数的 88.8%;三碱基和四碱基重复序列各有 4 条,分别占总数的 5.6% (表 1)。对 64 条两碱基重复微卫星序列进一步的分析发现,其中重复次数在 10 次以上的有 59 条,占 81.9%;重复次数在 20 和 30 次以上的分别有 18 和 3 条,所占比例分别为 25.0%和 4.2%。

表 1 本研究所得微卫星 DNA 序列的分类情况

Tab. 1 Classification of microsatellite DNA sequences obtained in this study			
分类标准	类别	序列数目	百分比 (%)
Criterion	Category	No. of sequence	Percentage
Weber (1990)	完美型	42	58.3
	非完美型	16	22.2
	复合型	14	19.5
重复单元	二碱基 $n > 10$	59	81.9
	二碱基 $n < 10$	5	6.9
	三碱基	4	5.6
	四碱基	4	5.6

2.3 不同探针的杂交效率

对不同探针获得的微卫星序列进行分析,发现通过两碱基探针 Biotin-(GT)₁₃共获得 44 条微卫星序列,其中 40 条与探针重复序列相符;通过三碱基探针 Biotin-(GGT)₉和四碱基探针 Biotin-(CTAT)₇共获得 28 条微卫星序列,但分别只有 3 条三碱基重复序列和 1 条四碱基重复序列与各自的探针序列相符。在此,把通过探针杂交实际上所获得的与探针序列相符的微卫星序列所占的百分比称为杂交效率 (Hybridization efficiency)。本研究二碱基探针 Biotin-(GT)₁₃杂交效率高达 90.9%;而三碱基探针 Biotin-(GGT)₉和四碱基探针 Biotin-(CTAT)₇的杂交效率则分别只有 10.7%和 3.6% (表 2)。

表 2 本研究所用探针的杂交效率

Tab. 2 Hybridization efficiency of probes used in this study

探针 Probe	微卫星总数 Total no. of SSRs	重复类型 Repeat type	所占数目 No. for each type	百分比 (%) Percentage for each type	与探针相符的序列数目 Sequence matches the probe	杂交效率 Hybridization efficiency
Biotin (GT) ₁₃	44	AC/ GT	40	90.9	40	90.9 %
		AG/ TC	2	4.5	0	
		三碱基	1	2.3	0	
		四碱基	1	2.3	0	
		二碱基	22	78.6	0	
Biotin (GGT) ₉	28	三碱基	3	10.7	3	10.7 %
Biotin (CTAT) ₇		四碱基	3	10.7	1	3.6 %

2.4 微卫星引物设计及扩增情况

本研究选择了 30 条微卫星序列设计扩增引物(表 3),这些序列已提交到 GenBank 中,它们的序列登录号为 DQ159292—DQ159321。

这 30 对微卫星引物在条件优化之后,经过 12

个随机选择的长江江豚样品进行有效性和多态性筛选。初步结果表明:其中的 4 对引物得不到预期扩增产物;12 对引物扩增产物为单态;14 对引物扩增稳定并呈现多态性,所占比例为 46.7 %。引物扩增情况(表 3),多态性座位的主要参数(表 4)。

表 3 本研究设计的 30 对微卫星引物及其扩增情况

Tab. 3 Thirty microsatellite primer pairs and their PCR results

位点 Locus	引物序列(5'→3') Primer sequence	重复单元 Repeat motif	扩增结果 PCR result
YFPSSR1	F:TTTGAAATTGCTAGACTGTGG R:CCTCTTACGCAAGATAAAAGTGG	(AC) ₁₅	多态
YFPSSR2	F:GAGCAGGAAATGCTGAAGGTAT R:CTTTGTTTTCCTCCAAAAGGTG	(AC) ₂₅	无产物
YFPSSR3	F:CCTCTGTCCTATTCCTCTTCC R:TCTTCTGCATTCTGGTGTTTC	(CT) ₁₅ (CA) ₃₅	无产物
YFPSSR8	F:ATACTGCAACAGCCACTAGGT R:CACATTCTTTCCTTTTGTCC	(GT) ₁₆	多态
YFPSSR9	F:AAGGGAAAAGAATCTGAAAAAGAAC R:TGAGTGAAACCAAGCACATTT	(GT) ₁₀	无产物
YFPSSR11	F:AATGGAAQCAAACTGAATGTCC R:GGTCCATCTATATTGCCACAGA	(CA) ₂₁	单态
YFPSSR12	F:TTC AAGGTA GAATCCGCAGAA R:CAAGAGGG AAGGAGGAAAGG	(CTCC) ₄ ...(TCCT) ₆	多态
YFPSSR13	F:CAGGCATATTGGGGGATAGT R:TCCAGAGTCTTAGCCAAATTC	(GT) ₈ ...(GT) ₁₃	单态
YFPSSR16	F:GCAAA GACATGGAAGCAACC R:TGCTGCAAATGGCATTATTT	(GT) ₁₀ GC(GT) ₁₂	单态
YFPSSR17	F:CCTCTCCAAATGGATGICAAA R:CAGGTGAAGACTGTTAGAAACG	(AC) ₂₀ TC(AC) ₃	多态
YFPSSR18	F:TTTTGTCGAGGATTTTGCAT R:TGCAGAGGAAAGAATCCA	(TG) ₁₂	多态
YFPSSR20	F:GGAATCACTTAGGTGCTTTCA R:CCCTCTGGGTTGTTCTTGTT	(CA) ₁₇	多态
YFPSSR26	F:CAGCATAATGCCCTTGAGAAAC R:TGTTGGCCATCTGTATGICTTC	(CAA) ₅	单态
YFPSSR27	F:CCAGAGGAATATAAGGCAGCAT R:AAATTATGGTGGTACCGGATTG	(AC) ₁₉	单态
YFPSSR28	F:TCCAGTGCTCTAAAAGTCAACA R:TGGTTTGTATGICCATGGTTG	(CA) ₄ CT(CA) ₁₀	单态
YFPSSR32	F:CTGCTTTGTCTCACTGAATGG R:TCTTCCACTTTCACCATCTCC	(GT) ₂₂	单态

续表

位点 Locus	引物序列(5' -3') Primer sequence	重复单元 Repeat motif	扩增结果 PCR result
YFPSSR42	F:TCCGTAGGCTTGGTCTTGAT R:AGGGGACCCTAAGTTTCAGAG	(GT) ₁₁ (GA) ₈	多态
YFPSSR45	F:CCCATACTCCTACACTTCTCC R:ACTTCCTAAAAGCCCTCAAAAC	(TC) ₁₃ (AC) ₁₀	多态
YFPSSR47	F:CTGAAGTGGGAAAAGCTACAGT R:TAGAGAGTCACTTCGGGACTC	(AC) ₃ (GC) ₂ (AC) ₃₃	多态
YFPSSR59	F:GCACCTGGGTAAGTCCATATT R:TCTTCCAAATACCTGCCTTCAT	(CA) ₁₅	多态
YFPSSR60	F:GTAGCCTCAATGTACCAAAAAC R:CTGTCTGTGGTTTTCCTTTC	(AC) ₁₉	多态
YFPSSR61	F:TCAGACGTCTGATTGAATTGG R:ACTTGAACAGTCTCGGTGGIT	(GATA) ₁₂ TA(GATA) ₂	无产物
YFPSSR62	F:GATGCTGGAAGAGTCCAATAAC R:TGACTGGTATGTGCCGTGATAC	(CA) ₁₈	单态
YFPSSR64	F:CCTCAGTGTGTCCAGAGAAAAT R:GCCTTCTCACTTCACACTCT	(GA) ₃ GG(GA) ₁₉	多态
YFPSSR65	F:CAGCAGGTCCTATTAGTATCC R:TGGTACAGATGAAGTGGTTTGC	(CCA) ₆	单态
YFPSSR66	F:AGACTCCAAATCCACAAGTCT R:CTAGGAGTCTGCAATCCGAAAG	(AC) ₂₀	多态
YFPSSR67	F:CCCATGAAGAGTGTGACGTGT R:TTAGGCACTCTGGCTCAACTCT	(AC) ₁₇	单态
YFPSSR69	F:GAGGACAGGGTGGTATGTTGT R:CATAGTACCAAGTGCATTTCOA	(GT) ₁₄ (GC) ₄ (GT) ₄	多态
YFPSSR78	F:AATGAGCATGGAGGTATTCCAA R:ACTCTGACAGGCAAAAATAGAG	(ACC) ₅	单态
YFPSSR79	F:TGCAAGGCAGAAATATAGGACA R:GTCGAACATCTAAGGGCTTGAA	(TGG) ₆	单态

表 4 本研究获得的 14 个多态性微卫星座位及其主要参数
Tab. 4 Characteristics of 14 polymorphic microsatellite loci in this study

位点 Locus	等位基因范围 Size range (bp)	等位基因数 No. of alleles	观察杂合度 <i>H_o</i>	期望杂合度 <i>H_e</i>	最适退火温度() Optimum <i>T_m</i>
YFPSSR1	163 —179	8	0. 667	0. 806	60
YFPSSR8	172 —182	5	0. 417	0. 747	58
YFPSSR12	170 —174	2	0. 417	0. 469	58
YFPSSR17	155 —163	4	0. 083	0. 635	60
YFPSSR18	150 —168	7	0. 167	0. 764	60
YFPSSR20	128 —138	4	0. 417	0. 705	60
YFPSSR42	169 —195	7	0. 667	0. 764	60
YFPSSR45	156 —202	6	1. 000	0. 646	58
YFPSSR47	179 —221	13	0. 917	0. 882	59
YFPSSR59	155 —175	6	0. 417	0. 698	58
YFPSSR60	109 —141	6	1. 000	0. 743	60
YFPSSR64	204 —222	7	1. 000	0. 781	60
YFPSSR66	153 —161	3	0. 583	0. 656	60
YFPSSR69	189 —199	4	0. 250	0. 629	58
平均值		5. 86	0. 560	0. 709	
标准差		2. 68	0. 318	0. 099	

3 讨 论

本研究将 Zhu 等^[19]改良的 FIASCO 法应用于长江江豚的微卫星 DNA 分离,在较短的时间内得到了 72 条不同的微卫星 DNA 序列,其中 64 条可以用于引物设计,并且重复单元在 10 次以上的序列占总数的 81.9%。此外,本研究的富集效率平均值为 58.4%,最高可达 87.5%,基本上与 Zane 等^[18]的报道相符,最低富集效率为 50%,最高为 95%。本研究选择 30 条微卫星序列用于 PCR 引物设计,经 12 个随机选择长江江豚样品的初步筛选结果表明:其中 26 对引物得到了预期的扩增产物,所占的比例为 86.7%;14 对引物的扩增产物具有多态性,占总数的 46.7%。可扩增引物及多态性引物所占的比例均明显高于夏军红等^[14]用其他鲸类的微卫星引物对长江江豚进行跨种扩增的结果,所占比例分别为 52.2%和 30.4%。以上数据充分体现出这种改良微卫星分离方法最为显著的两个优点:快速和高效。

然而,该方法尚存在一些明显的不足。例如,其中最突出的一个问题是三碱基和四碱基重复探针的杂交效率太低,由它们得到的目的微卫星序列的产量也非常低。本研究由探针 Biotin-(GT)₁₃ 杂交筛选得到 44 条微卫星序列,杂交效率高达 90.9%;而通过探针 Biotin-(GGT)₉ 和 Biotin-(CTAT)₇ 仅得到三碱基和四碱基重复微卫星序列各 3 条,杂交效率分别只有 10.7%和 3.6%(表 2)。虽然三碱基和四碱基重复的微卫星序列在基因组中实际出现的频率较低^[23],但本研究中三碱基和四碱基重复探针如此低杂交效率的最主要的原因很可能还在于多碱基重复探针的杂交条件不够成熟。近年来,微卫星标记的应用趋向于重复单位较长的微卫星位点,主要是三碱基和四碱基重复位点,主要原因是它们可以减少扩增产物中 stutter 带的出现,并且可以方便于实现扩增产物的自动化分析^[24]。因此,目前使用的微卫星分离方法还需要进一步改良,重点解决如何优化多碱基重复探针的杂交条件,以提高三碱基和四碱基重复微卫星位点的产出率。

本研究先后三次采用不同的探针对基因组文库进行杂交筛选。第一次杂交采用二碱基探针 Biotin-(GT)₁₃,平均富集效率相对较低仅为 51.5%。后两次杂交分别采用三碱基重复探针 Biotin-(GGT)₉ 和四碱基重复探针 Biotin-(CTAT)₇,并且在对磁珠-探针-DNA 混合物进行非严格和严格洗涤操作时,分别增加了一次 55℃ 条件下的洗涤步骤。结果后两次杂

交的富集效率得到明显的提高,达到 87.5%。由此看来,适当提高杂交混合物的洗涤温度,应该有利于提高富集效率。Fischer 和 Bachmann 的研究表明,提高洗涤的温度和强度可以非常有效地减少 DNA 片段与磁珠之间的非特异性吸附^[25]。Gao 等的研究也证实,影响富集效率最关键的两个因素是洗涤的强度和洗涤温度^[26]。而在目前已有的相关报道中,不同的研究者采用不同长度的探针、不同的杂交温度和洗涤条件,从而导致不同的富集效率^[27-34]。因此,为了得到较高的富集效率,针对各自不同的研究对象,对洗涤温度等条件进行探索和优化非常有必要^[29]。李琪等^[34]在利用相似的方法分离长牡蛎的微卫星时,在得到的 200 个克隆中,重复次数在 5 次以上的微卫星序列只有 41 个,富集效率仅为 20.5%。经比较发现,李琪等与本研究在实验操作上的最大差别在于前者直接将纯化后的基因组文库用于杂交和富集,而没有经过 AFLP 预扩增步骤。可能正因为如此,导致了他们实验中出现非常低的富集效率。通过适当的扩增,提高了初始目的 DNA 片段的浓度,增加了 DNA 片段与探针杂交的机会,从而有利于提高富集效率。因此,在进行富集操作之前,对基因组文库进行适当的 PCR 扩增是非常有必要的。然而,过度的 PCR 扩增会导致 DNA 片段的不对等放大,从而导致某些微卫星序列多次重复出现^[18]。例如,在本研究第一次杂交的第二批阳性克隆的测序结果出现了 2、3、3 和 9 条各自完全相同的序列。导致出现这种现象的原因很可能是某些优势片段得到不对等扩增。因此,Zane 等^[18]建议,为了确定最适扩增循环数,可以以相同的扩增体系进行系列扩增,循环次数从 14 次开始,依次增加 3 个,以扩增产物在琼脂糖电泳上刚刚开始出现 smear 时的循环数作为最适扩增条件。

Weber 对人类基因组中 CA 重复 DNA 序列的研究表明,当重复次数低于 12 时,微卫星主要表现为单态行为,而超过这个阈值时,出现多态的可能性会随微卫星的长度增加而增加^[22]。在本研究合成的 30 对微卫星引物中,多态位点所含的重复单元的数量基本在 12 次(YFPSSR18)至 33 次(YFPSSR47)之间,某些单态位点所含重复单元的数量也超过 20 次,如 YFPSSR11 和 YFPSSR32,而重复次数最高的 YFPSSR3 以及 YFPSSR2 却没有得到扩增产物。因此,在进行微卫星引物设计时不能一味地选择重复次数非常高的序列,否则会忽略一些多态性位点。

本研究从长江江豚的基因组中筛选得到 72 条

不同的微卫星 DNA 序列,并为其中的 30 个座位设计了 PCR 扩增引物,初步筛选结果表明其中的 14 个位点表现出多态性。这是国内外首次为长江江豚这一独特的种群分离微卫星 DNA,也获得了该物种第一批特异性微卫星标记。这些微卫星标记的获得将有利于进一步阐明长江江豚自然种群的遗传资源现状、保护管理单元的划分等与该濒危物种的保护紧密相关的一些保护遗传学核心问题,也将在亲子鉴定、保护区和人工繁殖群体的遗传管理,以及其他一些后续的保护遗传学研究中发挥重大作用。此外,目前已公布的鲸类的微卫星标记也并不多^[35-41],因此,这批长江江豚特异性微卫星序列及引物不但丰富了鲸类的微卫星 DNA 数据库,也为其他鲸类的微卫星遗传变异研究提供了更多的跨种扩增引物选择。

致谢:

鲸类保护生物学学科组的赵庆中高级工程师等同事在样品采集和资料整理过程中给予了大力支持,在此表示感谢!

参考文献:

- [1] Gao A L, Zhou K Y. Geographical variation of external measurements and three subspecies of *Neophocaena phocaenoides* in Chinese waters [J]. *Acta Theriologica Sinica*, 1995, **15** (2): 81—92 [高安利, 周开亚. 中国水域江豚外形的地理变和江豚的三亚种. 兽类学报, 1995, **15** (2): 1—92]
- [2] Zhang X F, Liu R J, Zhao Q Z, et al. The population of finless porpoise in the middle and lower reaches of Yangtze River [J]. *Acta Theriologica Sinica*, 1993, **13** (4): 260—270 [张先锋, 刘仁俊, 赵庆中, 等. 长江中下游江豚种群现状评价. 兽类学报, 1993, **13** (4): 260—270]
- [3] Liu R J, Wang D. Studies on population size and activities alteration regularities of *Lipotes vexillifer* and *Neophocaena phocaenoides* in the Yangtze River [A]. IBI Reports [C]. 1996, **6**: 1—8
- [4] Wei Z, Wang D, Zhang X F, et al. Population size, behaviour, movement pattern and protection of Yangtze finless porpoise at Ba Li Jiang section of the Yangtze River [J]. *Resources and Environment in the Yangtze Basin*, 2002, **11** (5): 427—432 [魏卓, 王丁, 张先锋, 等. 长江八里江江段江豚种群数量、行为及其活动规律与保护. 长江流域资源与环境, 2002, **11** (5): 427—432]
- [5] Wang D, Liu R J, Zhang X F, et al. Population status and conservation of the Yangtze finless porpoise [A]. Occasional Papers of the IUCN/SSC [C]. 2000, **23**: 81—85
- [6] Gao J, et al. River dolphins down for the count, and perhaps out [J]. *Science*, 2006, **314**: 1860
- [7] Liu R J, Zhang X F, Wang D, et al. Once again studies on the conservation of *Lipotes vexillifer* and *Neophocaena phocaenoides* [J]. *Resources and Environment in the Yangtze Basin*, 1996, **5**: 220—225 [刘仁俊, 张先锋, 王丁, 等. 再论白鱘豚和江豚的保护. 长江流域资源与环境, 1996, **5**: 220—225]
- [8] Zhang X F, Wang K X. Population viability analysis for the Yangtze finless porpoise [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 1999, **19** (4): 529—533 [张先锋, 王克雄. 长江江豚种群生存力分析. 生态学报, 1999, **19** (4): 529—533]
- [9] Yang G, Zhou K Y. Variability of the mitochondrial control region in population of finless porpoise, *Neophocaena phocaenoides*, in Chinese waters [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1997, **43** (4): 411—419 [杨光, 周开亚. 中国水域江豚种群遗传变异的研究. 动物学报, 1997, **43** (4): 411—419]
- [10] Yang G, Liu S, Ren W, et al. Mitochondrial control region variability of baiji and the Yangtze finless porpoises, two sympatric small cetaceans in the Yangtze River [J]. *Acta Theriologica*, 2003, **48**: 469—483
- [11] Yang G, Zhou K, Ren W, et al. Population genetic structure of finless porpoises, *Neophocaena phocaenoides*, in Chinese waters, inferred from mitochondrial control region sequences [J]. *Marine Mammal Science*, 2002, **18** (2): 336—347
- [12] Zheng J S, Xia J H, He S, et al. Population genetic structure of the Yangtze finless porpoise *Neophocaena phocaenoides asiaorientalis*: implications for management and conservation [J]. *Biochemical Genetics*, 2005, **43**: 307—320
- [13] Scribner K T, Pearce J M. Microsatellites: evolutionary and methodological background and empirical applications at individual, population and phylogenetics [A]. In: Baker A (Eds.), *Molecular Ecology* [C]. Cambridge: Blackwell. 2000, 235—271
- [14] Xia J H, Zheng J S, Wang D. Applicability of cetacean microsatellite primers in the Yangtze finless porpoise [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28** (6): 640—646 [夏军红, 郑劲松, 王丁. 鲸类微卫星引物对长江江豚的适用性研究. 水生生物学报, 2004, **28** (6): 640—646]
- [15] Xia J H, Zheng J S, Wang D. Individual identification of the Yangtze finless porpoises *Neophocaena phocaenoides asiaorientalis* inhabiting the Tianre Zhou Natural Reserve based on microsatellite fingerprints [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2005, **51** (1): 142—148 [夏军红, 郑劲松, 王丁. 用微卫星指纹识别天鹅洲保护区长江江豚个体. 动物学报, 2005, **51** (1): 142—148]
- [16] Xia J H, Zheng J S, Wang D. *Ex situ* conservation status of an endangered Yangtze finless porpoise population, as measured from microsatellites and mtDNA diversity [J]. *ICES Journal of Marine Science*, 2005, **62**: 1711—1716
- [17] Xia J H, Zheng J S, Xu L, et al. Parentage determination of an isolated Yangtze finless porpoise population in the Tianre Zhou baiji National Natural Reserve based on molecular data [J]. *Progress in Natural Science*, 2005, **15** (2): 149—156
- [18] Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation: a review [J]. *Molecular Ecology*, 2002, **11**: 1—16
- [19] Zhu B, Liao X, Shao Z, et al. Isolation and characterization of microsatellites in Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis* [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2005, **5**: 888—892
- [20] Benson G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences [J]. *Nucleic Acids Research*, 1999, **27** (2): 573—580

- [21] Yeh F C, Yang R C, *et al.* POPGENE, the user-friendly share ware for population genetic analysis [M]. Canada: University of Alberta, 1997
- [22] Weber J L. Informativeness of human (dC-dA)_n (dG-dT)_n polymorphisms [J]. *Genomics*, 1990, 7:524—530
- [23] Bth G, Gápai Z, Jurka J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis [J]. *Genome Research*, 2000, 10:967—981
- [24] O'Connell M, Wright J M. Microsatellite DNA in fishes [J]. *Review in Fish Biology and Fisheries*, 1997, 7:331—363
- [25] Fischer D, Bachmann K. Microsatellite enrichment in organisms with large genomes (*Allium cepa* L.) [J]. *BioTechniques*, 1998, 24:796—802
- [26] Gao G, He G, Li Y. Microsatellite enrichment from AFLP fragments by magnetic beads [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2003, 45(11):1266—1269
- [27] Karagoyozov L, Kalcheva I D, Chapman V M. Construction of random small-insert genomic libraries highly enriched for simple sequence repeats [J]. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21:3911—3912
- [28] Armour J A, Neumann R, Góbert S, *et al.* Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection [J]. *Human Molecular Genetics*, 1994, 3:599—565
- [29] Kandpal R P, Kandpal G, Weissman S M. Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping clones, and hybridization selection for region-specific markers [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1994, 91:88—92
- [30] Kijas J M, Fowler J C, Garbett C A, *et al.* Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles [J]. *Biotechniques*, 1994, 16:656—662
- [31] Edwards K J, Barker J H A, Daly A, *et al.* Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants [J]. *Biotechniques*, 1996, 20:758
- [32] Refseth U H, Fangan B M, Jakobsen K S. Hybridization capture of microsatellites directly from genomic DNA [J]. *Electrophoresis*, 1997, 18:1519—1523
- [33] Hamilton M B, Pincus E L, Di-Fiore A, *et al.* Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites [J]. *Biotechniques*, 1999, 27:500—507
- [34] Li Q, Kijima A. Microsatellite clones in pacific oyster *Crassostrea gigas*: rapid isolation and characteristic analysis [J]. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2004, 35(4):364—370 [李琪, 木岛明博. 长牡蛎微卫星克隆快速分离及特性分析. 海洋与湖沼, 2004, 35(4):364—370]
- [35] Amos B, Schlötterer C, Tautz D. Social structure of pilot whales reveals by analytical DNA profiling [J]. *Science*, 1993, 260(30):670—672
- [36] Valsecchi E, Amos W. Microsatellite markers for the study of cetacean populations [J]. *Journal of Molecular Ecology*, 1996, 5:151—156
- [37] Rooney A P, Merritt D B, Derr J N. Microsatellite diversity in captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) [J]. *Journal of Heredity*, 1999, 90:228—230
- [38] Rosel P E, France S C, Wang J Y, *et al.* Genetic structure of harbour porpoise *Phocoena phocoena* populations in the northwest Atlantic based on mitochondrial and nuclear markers [J]. *Molecular Ecology*, 1999, 8:41—54
- [39] Waldick R C, Brown M W, White B N. Characterization and isolation of microsatellite loci from the endangered North Atlantic right whale [J]. *Molecular Ecology*, 1999, 8:1753—1768
- [40] Berube M, Jorgensen H, McEwing R, *et al.* Polymorphic di-nucleotide microsatellite loci isolated from the humpback whale, *Megaptera novaeangliae* [J]. *Molecular Ecology*, 2000, 9:2155—2234
- [41] Rosel P E, Forgetta V, Dewar K. Isolation and characterization of twelve polymorphic microsatellite markers in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2005, 5:830—833

A PILOT STUDY ON ISOLATION OF MICROSATELLITE DNA IN THE YANGTZE FINLESS PORPOISE (NEOPHOCAENA PHOCAENOIDES ASIAEORIENTALIS)

ZHENG Jir-Song^{1,2}, LIAO Xiao-Lin^{1,2}, TONG Jir-Gou¹ and WANG Ding¹

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

Abstract: To the aim of developing specific microsatellite markers for the endangered Yangtze finless porpoise *Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis*, 72 microsatellite DNA sequences were isolated using an improved FIASCO (Fast Isolation by AFLP of Sequences Containing Repeats) protocol. According to Weber's classification rules, these sequences were divided into three categories: perfect repeat sequences (58.3% of total), imperfect repeat sequences (22.2%), and compound repeat sequences (19.5%). Thirty PCR primer pairs were designed and synthesized, and then screened by a sample panel of 12 random selected Yangtze finless porpoises. As a result, 14 of them were proved to be polymorphic exhibiting 2 to 13 alleles (mean 5.86 alleles/locus). Their average observed heterozygosity and expected heterozygosity were 0.560 and 0.709 respectively. These are the first batch of specific microsatellite markers for the Yangtze finless porpoise, and they should play great role in succedent conservation genetics studies.

Key words: The Yangtze finless porpoise; *Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis*; FIASCO; Microsatellite DNA; Polymorphism