

微隨體在魚類遺傳育種研究中的應用

余俊欣、朱惠真、曾福生

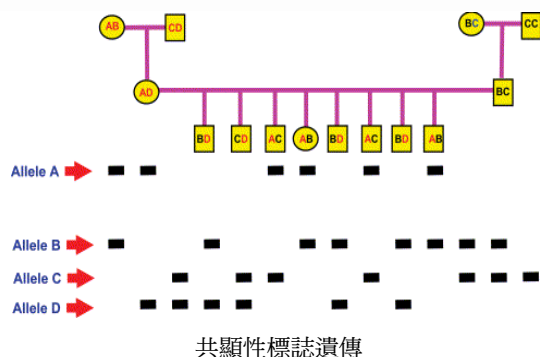
水產試驗所水產養殖組

微隨體 (microsatellite) 大量存在於現今所研究物種的基因組 (genome) 中，是由許多大小從 1—6 bp (如 ACA 或 GATA) 的 DNA 序列重複排列而組成，又稱為簡單重複序列 (simple sequence repeats, SSRs) (Tautz, 1989; Litt and Luty, 1989)。估計魚類的 DNA 序列中，每 10 kb 就有一個微隨體片段的存在 (Wright, 1993)。微隨體均勻分布於染色體 (chromosome) 所有基因組區域，目前研究已發現存在於基因編碼區 (gene coding regions)、插入子 (introns) 和非基因編碼區 (non-gene sequences) 等序列中 (Liu et al., 2001)。微隨體和人類遺傳疾病有關的最著名例子，是人類體基因組編碼區中的 CAG 重複單元，造成 polyglutamine tract，導致人類智能產生缺陷。大部分微隨體基因座都相當小，重複單元個數從 5 個到數百個，容易使用聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR) 的操作擴大此單元而標定出其基因型。一般而言，重複單元個數愈多的微隨體，其多型性也愈高 (Karsi et al., 2002)。

微隨體的多型性基礎，是由於 DNA 複製時聚合酶滑動 (slippage) 造成重複單元的數目改變 (Tautz, 1989)，不同重複個數產生大小不同的對偶基因，根據報告，微隨體的突變率每代最多約百分之一 (Crawford and Cuthbertson, 1996)。有關於微隨體的突變模式，目前最主要有 2 種理論，分別為階梯式

突變模式 (stepwise mutation model; SMM) 及非限定對偶基因突變模式 (infinite alleles model; IAM)。所謂的 SMM 係指在 2 個對偶基因中，只有多 1 個或少 1 個重複性片段的差異，此種遺傳突變模式取決於大小的不同 (size matter)，常被用來估算個體和族群的遺傳相關性。在人類親緣關係的研究指出，子代的微隨體突變通常與親本對偶基因的重複單元僅有 1 到 2 個差異 (Weber and Wong, 1993)，即符合 SMM 理論 (Estoup and Cornuet, 1999)。而 IAM，則是只要有重複性片段的不同，就視為 1 個新的對偶基因。在此模式下，片段大小並不是重點，端看生物族群的每個微隨體基因座，只要重複單元的個數不同，即認定為不同的對偶基因；在此，科學家觀察到有些魚種在微隨體基因座的重複單元，重複個數有很大的不同，即符合 IAM 理論 (Balloux and Lugon-Moulin, 2002)。

此外，微隨體在遺傳上符合孟德爾定律且具有共顯性標誌的特點 (如圖)；再加上其基因座大小適中、在基因組中分布均勻、高度多型性及豐富性等優點，使得微隨體標誌極具個體遺傳差異的解析價值。但在微隨體標誌使用前，先要進行標誌的選殖，確認每一個微隨體基因座，尋找其 flanking region，即兩端非重複單元區域，此區域為微隨體前後兩端不易產生突變的保守區域，由此區域的 DNA 序列設計專一性 PCR 引子，利用這



兩對親代交配產生 F1 子代。第 1 對，雌性親代基因座上的基因型為 AB；雄性親代基因型為 CD；他們的 F1 雌性個體基因型為 AD。第 2 對，雌性親代基因座上的基因型為 BC；雄性親代基因型為 CC；他們的 F1 雄性個體基因型為 BC。這 2 個 F1 交配產生的 F2 子代，在獨立分配下，有 4 種可能的基因型：AB、AC、BD 和 CD。F2 子代出現 2 個對偶基因(其中 1 個來自 F1 雌性親代，另 1 個來自 F1 雄性親代)，即為遺傳上共顯性的標誌。如果只有出現 1 個條帶(如第 2 對雄性親代)，在此基因座上則為同型結合 (Liu and Cordes, 2004)

些引子才可自基因組中以 PCR 放大出微隨體 DNA。為了有效率的發展標誌，科學家們建立豐富的微隨體基因組 DNA 資料庫 (Ostrander et al., 1992; Kijas et al., 1994)。由於複製時，聚合酶的滑動可能僅造成微隨體對偶基因座大小上的些微改變 (如在 2 個核苷酸重複所構成的對偶基因座，其變化可能僅有 2 個 bp 大小)，因此，用 PCR 放大微隨體 DNA，傳統上須使用放射線來標定，用定序膠分離，再經 X 光片壓片顯影 (Sambrook et al., 1989)。現今多以螢光標定引子，經 PCR 放大後利用自動螢光定序偶合顯影，再以電腦影像分析 (O'Reilly and Wright, 1995)。

DNA 標誌的有效性，可以其多型性資訊內容 (polymorphic information content, PIC; Botstein et al., 1980) 來評估，PIC 的大小與標誌所能偵測到生物族群中對偶基因的數目

及其分布的頻度有關，其值相當於 1 減去此一標誌在族群中所有對偶基因頻度的平方和。例如一個微隨體標誌有 2 個對偶，基因頻度皆為 0.5，其 PIC 值等於 $1 - [(0.5) \times (0.5) + (0.5) \times (0.5)] = 0.5$ ；若其對偶基因頻度分別為 0.9 和 0.1，其 PIC 值等於 $1 - [(0.9) \times (0.9) + (0.1) \times (0.1)] = 0.18$ 。以此評估 DNA 標誌發現，微隨體標誌具有較高的 PIC 值，所以成為極流行的標誌類型，並廣泛的應用在遺傳學研究上。

由於微隨體具共顯性、基因座大小適中、在基因組中分布均勻、高度多型性及可利用引子自基因組中以 PCR 放大等優點，目前已廣泛的應用在魚類遺傳育種上研究，以下敘述幾個重要的研究方向。

一、基因圖譜 (Genetic map)

描述染色體基因連鎖中 DNA 標誌的相對位置，而標誌間的距離以基因重組機率表示。基因距離標準單位是 cM (centiMorgan)，以百分比表示在子代中兩個 DNA 標誌的重組機率。1 個 cM 大約是 1000 kb，也就是表示基因重組的機率為百分之一。在很多生物體中各別染色體長度大約是 100 cM，也就是說每複製一次，每一條染色體都有一次互換的現象發生，以產生基因重組。

DNA 標誌可分為 2 類。第 1 類來自已知功能的基因，稱為可轉錄 DNA 標誌 (type I coding marker)；第 2 類來自未知的基因組片段，稱為不轉錄 DNA 標誌 (type II noncoding marker)。由於微隨體有較高 PIC 值和方便操作的特性，雖然大部分屬於第 2 類 DNA 標誌，但當它與第 1 類 DNA 標誌合併運用時，非常有助於建立基因圖譜架構的飽和度。

以微隨體為基礎，在基因組中每隔一定距離找一個多型性微隨體標誌，當這些標誌達到一定飽和度時（平均間隔不大於 20 cM 並覆蓋 90%以上基因組），便可據以繪製出一個基本的基因圖譜。主要家畜如牛、綿羊、豬等以微隨體為主的基因圖譜已建成，並且飽和度日趨增大。1992 年，Crawford 等發表第一張用微隨體標誌構建的綿羊基因圖譜，當時所使用的微隨體標誌還很少。1998 年，de Gortari 等發表了綿羊的第二代基因圖譜，其上共有 519 個標誌，其中 504 個為微隨體，常染色體 (autosome) 圖譜總長度為 3063 cM，標誌間距為 6.4 cM。

目前以微隨體標誌為主，且已建立基因圖譜的重要魚種有大西洋鮭魚 (Moen et al., 2004)、虹鱒 (Nichols et al., 2003)、斑馬魚 (Woods et al., 2000)、日本比目魚 (Coimbra et al., 2003) 和尼羅吳郭魚 (Agresti et al., 2000)。這些基因圖譜的建立為數量性狀基因座 (quantitative trait loci) 和標誌輔助育種 (marker-assisted selection) 的發展奠定基礎。

二、數量性狀基因座 (Quantitative trait loci, QTL) 定位

是以基因圖譜為基礎，透過連鎖分析，確定物種之 QTL 在圖譜上的位置與特定 DNA 標誌間的遺傳距離。QTL 定位已成為目前遺傳育種研究領域的一個熱門課題，其中基因組掃描是 QTL 定位的主要方法之一，即以已經構建的基因圖譜為基礎，利用連鎖分析的原理，分析基因組中大量散布的多型性標誌與數量性狀變異的連鎖關係，進而借助這些標誌跟蹤對數量性狀表現型有影響的功能基因在染色體上的位置及其效應，

從而找到 QTL。QTL 在魚類上的研究操作是以具有數量性狀兩極端品系的雜交子代和兩親代分別進行反交，再分析子代所出現的性狀，並與微隨體標誌的分析結果進行比對，以定位 QTL。

目前養殖魚類以微隨體為基礎的 QTL 研究，在鮭魚方面已經找到了有關於溫度耐受性 (Cnaani et al., 2003; Somorjai et al., 2003)、體重 (Borrell et al., 2004; Reid et al., 2005)、體長 (Borrell et al., 2004)、孵化率 (Sakamoto et al., 1999; O'Malley et al., 2003)、胚體發育 (Nichols et al., 2000; Robison et al., 2001) 及肥滿度 (Perry et al., 2003; Reid et al., 2005) 相關的 QTL。在虹鱒的研究上則找出了和性別分化相關的微隨體標誌 OmyFGT19TUF，此標誌和體長及溫度忍受性具有高度相關性 (Perry et al., 2005)。

三、標誌輔助育種 (Marker-assisted selection, MAS)

借助微隨體進行 MAS 的第一個應用是將有利及有優勢的基因做轉移的動作。在育種過程中利用回交的方式，會將有利及有害的基因一起導入生物體中，使生物的下一代出現 2 種極端的品系造成基因的負累。使用與目的基因緊密連鎖的微隨體標誌，可選擇在目的基因附近發生重組的個體，從而避免或顯著減少連鎖負累，進而提高選擇效率。MAS 的另一應用是基因的累加。有許多基因的表現型是相同的，在這種情況下，傳統的遺傳育種研究並無法區別不同的基因，因而無法鑑定一個性狀是受單個基因還是多個具有相同表型的基因所共同控制。使用微隨體標誌，先在不同親本中將基因定位，然後透

過雜交或回交將不同的基因轉移至一個品系中，經由檢測與不同基因連鎖的微隨體標誌的基因型，來判斷個體是否含有某個或某幾個基因，以此幫助選種。

在養殖魚類的育種方面，MAS 已經應用到一些魚種上，如大西洋大比目魚 (Jackson et al., 2003)、河鯰 (Waldbieser and Wolters, 1999)、歐洲鱸魚 (García de León et al., 1995)、日本比目魚 (Sekino et al., 2003) 及鮭魚 (Herbinger et al., 1995, Fjalestad et al., 2003; Wilson et al., 2003) 等，利用此種技術準確篩選已知特性的品系，來進行雜交育種，可獲得經濟及學術方面的雙重效益。

四、遺傳多樣性評估與親緣分析

遺傳多樣性一般指品種內個體在 DNA 基因型上的差異，透過對遺傳多樣性的評估，可瞭解品種的遺傳結構、生活背景，分析其進化的歷史和潛力，以及探討品種瀕危的原因和現狀，提出合理的保種措施。為此，利用微隨體標誌檢測個體基因型，統計群體中的微隨體標誌等位基因的數目和頻率，結合分子遺傳學和數量分類學原理，計算各個品種的遺傳變異程度及生存穩定性，進而評估品種的遺傳多樣性及品種間的親緣關係與分化關係。

在育種的過程中必須清楚親緣關係，才能根據親緣訊息準確選留個體，並防止群體近交的發生。而品系的鑑定極為複雜，在同種生物一般傳統的 DNA 標誌如同功異構酶 (allozymes)、限制片段長度多型性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 或是隨機擴增片段多型性 DNA (random amplified polymorphism, RAPD) 基因型的變化較少，

難以區隔不同品系。微隨體透過多樣的基因座對偶基因頻度，在養殖魚種的不同品系上，可以提供較為有力的解析。不同品系的每個微隨體基因座的對偶基因頻度都可以被估算出來，因此在品系間具有高度不同的對偶基因頻度之微隨體標誌，即可應用於品系的鑑定。養殖品系之遺傳特性如今研究的尚未透徹，不同形式的養殖操作將會控制其子代的產出，如今借助多個微隨體標誌在群體中的等位基因頻率進行分析比對，通過計算排除率便可進行親緣鑑定和血緣控制。

目前在虹鱒研究上已有成功的實例。使用 4 個微隨體標誌，從同一池中各 10 條雄性和雌性親魚 100 種可能的配對組合中，追溯出池中 91% 子代各別源自於其中 1 或 2 種可能的親魚配對組合 (Herbinger et al., 1995)。其他如太平洋鮭魚 (Bentzen et al., 2001) 和大西洋鮭魚 (Norris et al., 2000; King et al., 2001) 也已有類似的應用實例。

除了上述各項研究外，微隨體標誌還可應用於疾病的基因診斷、性別控制及保護遺傳學等方面。相信隨著人們對微隨體標誌認識的不斷深入與完善，它必將發揮其獨特的優勢成為遺傳育種研究領域強而有力的工具。

註：本文主要參考資料

Chistiakov, D. A., Helleman, B. and Volckaert, F. A. M. (2006) Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*, 255: 1-29.

Liu, Z. J. and Cordes, J. F. (2004) DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238: 1-37.