

文章编号:1000 - 0615(2006)02 - 0185 - 07

磁珠富集法制备大口鲶的微卫星分子标记

全迎春^{1,2}, 孙效文¹, 刘 伟¹, 梁利群¹, 鲁翠云¹

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070;

2. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090)

摘要:通过磁珠富集的方法分离大口鲶 (*Silurus meriaionalis*) 的微卫星分子标记。将基因组 DNA 酶切, 梯度离心收集 400 ~ 900 bp 片段并纯化, 连接 Brown 接头, 用生物素标记的寡核苷酸 (CA)₁₅ 作探针与其杂交, 杂交复合物结合到包被有链霉亲和素的磁珠上, 然后将这些片段洗脱, PCR 扩增, 进行克隆构建“基因组文库”, 再通过同位素标记的探针 (CA)₁₅ 进行 2 次杂交筛选, 所得到的阳性克隆测序。从所获得 593 个阳性克隆中选取 178 个经测序, 97.19% (173 个) 含有微卫星序列, 90.60% 重复数在 10 以上, 75.98% 为完美型。除探针中使用的 CA 重复单元外, 还观察到 CT、GA、ATG 的重复序列。设计获得 120 对微卫星引物, 合成 40 对经 PCR 筛选, 结果 31 对引物扩增出多态性条带。显示出, 磁珠富集法是获得微卫星分子标记的一种有效的方法, 可成为今后发展该标记的主要方法。同时, 制备出的微卫星标记可为今后研究大口鲶的分子遗传育种提供有用的遗传标记。

关键词:大口鲶; 微卫星; 磁珠富集

中图分类号: S917 **文献标识码:** A

Microsatellite enrichment by magnetic beads in *Silurus meriaionalis*

QUAN Ying-chun^{1,2}, SUN Xiao-wen¹, LIU Wei¹, LIANG Li-qun¹, LU Cui-yun¹

(1. Heilongjiang Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;

2. College of Aquaculture Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Microsatellite enrichment by magnetic beads is a fast and efficient method for isolating this molecular genetic marker. Some microsatellite markers of *Silurus meriaionalis* were obtained by using the method. First, the genomic DNA was cut by the enzyme of *Sau3AI*, and targeted segments were collected with the size of 400 - 900 base pairs by centrifugation of sucrose density gradient. Then the segments were purified in a low melting agarose gel and ligated with a short linkers (20 bp), from which, the “genomic PCR library” was created. These genomic DNA fragments were hybridized with a biotin-labeled SRS (simple repeat sequence) probe (CA)₁₅. The hybrid mixture was incubated with magnetic beads coated with streptavidin. After washing to remove the non-SRS fragments, the eluted single-stranded DNA contained the selected microsatellite DNA. The selected DNAs were then amplified using primers designed complementary to the linkers, cloned into the pMD18-T vector and transformed into competent *E. coli* DH5. In this experiment, we performed the second screening with a radio labeled (CA)₁₅ probe and obtained 178 positive clones. From these clones, 173 microsatellite sequences (about 97.19%) were isolated, among which 90.60% microsatellites repeated more than 10 times and 75.98% microsatellites were perfect repeats. This allowed us to design 120 pairs of primers with the software Primer Premier 5.0. In addition, 40 pairs of primers were composed and screened. 38 pairs were used successfully to amplify special fragments, among which 31 pairs were polymorphism within species. These show microsatellite enrichment by magnetic beads is a suitable method to acquire microsatellite and it should become a main way to develop this molecular maker. At the same time, the

收稿日期: 2005-07-26

资助项目: 鱼类微卫星等遗传标记的筛选和分子标记辅助育种的应用基础研究 (2004CB117405)

作者简介: 全迎春 (1981 -), 女, 湖北武汉人, 硕士研究生, 主要从事水产动物遗传育种研究。E-mail: quan-928@163.com

通讯作者: 孙效文, Tel: 0451 - 84862646, E-mail: xwsun2002@163.com

卫星序列的单链 DNA,放在磁力架上吸出备用。

使用 PCR 扩增含有微卫星序列的 DNA 片段。PCR 反应体系、程序同前。反应完毕后,过旋离柱以去除多余的引物和没有参加反应 dNTP,并浓缩到 15 μ L 左右。

再次,连接 T-载体,克隆。建立 10 μ L 连接反应体系:2 \times Buffer 5 μ L, pMD 18-T vector 1 μ L(购于 Promega 公司), Insert DNA 2 μ L, T4 DNA ligase3U,加无菌去离子水补足 10 μ L。4 连接过夜。用 CaCl₂ 制备的感受态大肠杆菌 DH5^[4]进行转化,得到微卫星基因组文库。以菌落 PCR 检测插入率。Primer B 为引物,挑单菌落在 PCR 反应液中搅动几下,以不接种菌的为空白对照。反应程序同前所述。琼脂糖检测扩增结果,插入率在 80% 以上则进行下步操作。

最后,原位杂交,用同位素探针进行二次筛选。通过原位杂交对微卫星文库进行二次筛选。将转化所得的克隆转化到杂交膜上,同时保留完全相同大小的菌板,以待杂交结果出来后挑取阳性克隆。用同位素标记的(CA)₁₅进行杂交,压 X 光片,-70 放射自显影 7 d,成相。挑取阳性克隆进行测序分析。

1.2 大口鲶微卫星引物的设计与筛选

根据其两端保守的侧翼序列,用 Primer Premier 5.0 软件进行引物设计,以 2 尾大口鲶(其

中 1 尾雌鱼来自长江武汉江段,1 尾雄鱼来自黑龙江抚远江段)的基因组 DNA 为模板,PCR 筛选其特异性与多态性。

2 结果及分析

2.1 适宜基因组 DNA 片段的筛选

高质量基因组 DNA 用限制性内切酶 *Sau3AI* 进行不完全酶切(图 1),再通过蔗糖密度梯度离心的方法筛选所需的基因组片段。试验选用了 10%、20%、30%和 40% 4 个梯度的蔗糖溶液进行密度梯度离心,离心后用针刺管底收集混合溶液,按每管 400 μ L 共收集 32 管含酶切 DNA 片段的溶液。琼脂糖电泳检测(图 2),选取目的片段 400~900 bp,即第 20、21 管进行下步试验。

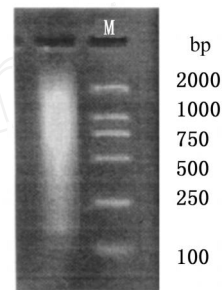


图 1 基因组 DNA 大量酶切

Fig. 1 Genomic DNA fragment cuts by enzyme of *Sau3AI*

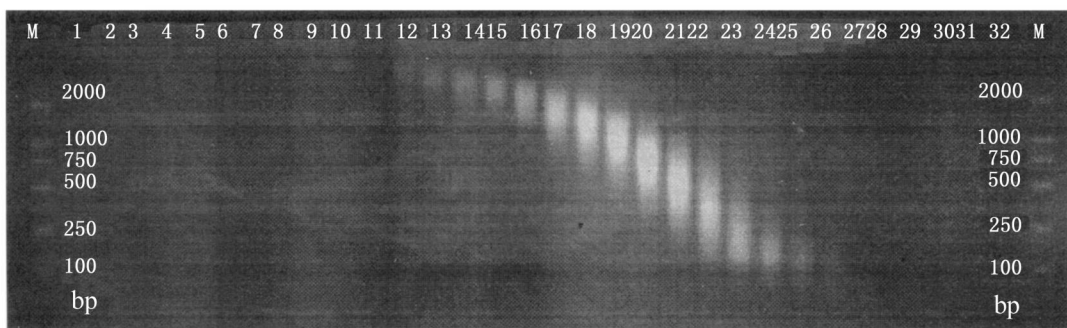


图 2 蔗糖密度梯度离心收集产物的电泳图

Fig. 2 Electrophoretogram of collecting with sucrose density gradients centrifugation

2.2 菌落 PCR 检测重组率

通过 CaCl₂ 制备的感受态大肠杆菌 DH5 转化目的片段,获得的基因组文库共 6 000 个克隆,随机挑选 10 个克隆,以 Primer B 为引物,进行菌落 PCR,检测重组率,结果 10 个克隆均为阳性,重

组率 100%。因此,本次试验所获得的基因组文库约有 6 000 个属于重组克隆。

2.3 测序结果

从以上基因组文库中随机选取 1 400 个,通过杂交进行二次筛选,得到阳性克隆 593 个(阳性

克隆率约为 42.36%),送出测序 178 个,得到 173 个(97.19%)含有微卫星序列的克隆。173 个阳性克隆中含有微卫星座位 231 个,其中以 CA/GT 为单位的重复序列占了绝大多数(223 个,96.54%)。重复次数在 10~20 次间的 78 个(33.77%),20 次以上的微卫星 136 个(58.87%),最高重复

数为 107 次,所得微卫星序列较长。其中,完美型微卫星 175 个(75.76%),非完美型微卫星 49 个(21.21%),复合完美型微卫星 7 个(3.03%)。除探针中使用的 CA 重复单元外,还观察到 CT、GA、ATG 的重复序列。

表 1 大口鲶微卫星的不同类型重复序列所占比例

Tab.1 Percentage of various repeat sequence type of microsatellite in *Silurus meriaionalis*

完美型 perfect repeats	非完美型 imperfect repeats	复合完美型 compound repeats	重复 repeat numbers					
			5~10	10~20	20~30	30~40	40~50	>50
175	49	7	22	78	60	21	26	29
75.76%	21.21%	3.03%	9.52%	33.77%	25.97%	9.09%	11.26%	12.55%

2.4 引物设计与筛选

在 173 个微卫星序列中,除了一些微卫星序列因本身结构或两端太短不能设计引物外,其余微卫星利用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计引物,共设计引物 120 对。所选 40 对微卫星引物以 PCR 扩增,结果有 38 对能扩增出特异条带,其

中 31 对具有多态性,适合作为大口鲶分子标记使用(引物信息见表 2,微卫星序列等信息请查询网站 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。另附筛选出的多态性引物 HLJCF18 在东北大口鲶(*Silurus soldatovi*)群体(来自黑龙江,抚远江段,1~13 雌,14~22 雄)的扩增图片(图 3)。



图 3 HLJCF18 在东北大口鲶群体扩增图谱

Fig.3 Electrophore to grams of HLJ18 in *Silurus soldatovi* population

3 讨论

微卫星侧翼序列是微卫星位点分析的关键,可通过以下 3 种途径获得:构建富含微卫星位点的基因组文库^[6,7]。检索 GenBank、EMBL 和 DDBJ 等 DNA 序列数据库。借用相关物种已有微卫星。第 1 种方法又可分为两类:一类是用传统分子生物学方法建立基因组 DNA 文库,通过人工合成带放射性同位素或非放射性标记的探针进

行 Southern 杂交,筛选阳性克隆、测序。方法简单,但是筛选效率极其低下,阳性克隆率为 2%~3%,且需要大量的人力和资金的投入。另一类是用生物素包被的磁珠富集法分离微卫星分子标记,它是一种简单高效的方法^[8,9],已经应用于一些植物和动物微卫星分子标记的分离^[10-12],现在已经逐步开始在水产动物方面应用^[13,14]。

Cifarelli 等^[15]提出 RAHM (random amplified hybridization microsatellites),而 Lunt 等^[16]提出

PIMA (PCR isolation of microsatellite arrays) 两种基于 RAPD 产物富集制备微卫星的方法, 它们均能避免构建基因组文库, 但效率并不高, 富集的微卫星带有一定的随机性。此外, 有学者提出目的性和富集能力更强的基于 ISSP-PCR 的微卫星分离策略。Fisher 等^[17]设计 5'-KKVRVRV (CT)₆₋₃ 为简并引物的 PCR 扩增, 产物克隆测序, 该方法较快捷。Lench 等^[18]的思路是以载体的特异序列与微卫星重复序列为引物先筛选得到一侧翼序列, 设计引物, 再与载体的特异序列一起 PCR 扩增, 得到另一条序列。Lian 等^[19]报道的与其类似, 不

同的是在 DNA 酶切片段两端连接人工接头, 以人工接头序列代替载体的序列。该方法每次测序仅获得微卫星一侧序列, 需要花费较多的时间与费用。Hayden 等^[20]则提出通过建立序列标签文库富集微卫星的方法, 该法可一次获得多个 *Pst* I 和 *Eco* R I 识别位点间隔的 16 个核苷酸序列, 均作为微卫星引物, 但该法技术步骤较多, 对实验室要求高, 周期长。He 等^[10]从 AFLP 产物中富集微卫星序列, 该方法制备的微卫星标记与 AFLP 标记一致, 没有太大的必要, 但却将 AFLP 标记转化成了微卫星标记。

表 2 大口鲶微卫星分子标记及其引物

Tab.2 Microsatellite markers and their primers in *Silurus meriaionalis*

克隆号 clone number	GenBank 注册号 GeneBank accession number	引物序列 primer sequence (5' - 3')		核心 序列 core sequence	位点数 loci no.	产物 (bp) product size	退火 (°C) Ta opt
HLJCF2	DQ223145	F:tcgtcggaaatcgcaatct	R:aggcaggagaacaaggag	(GT) ₂₄	2	230 ~ 245	57
HLJCF3	DQ223147	F:aagcaacgctgaaaggta	R:caecccctcactcttatt	(GT) ₄₄	3	190 ~ 220	48
HLJCF4	DQ223146	F:caacacctgctccactca	R:tccttgcctcctctctac	(CA) ₁₈	2	178 ~ 210	58
HLJCF6	DQ223149	F:ggggagatgtagcagagg	R:aggcgattaagtgggta	(TG) ₃₀	3	188 ~ 231	55
HLJCF7	DQ223150	F:cgatgctgcttctctac	R:gccaccacagagcttact	(CA) ₁₄	1	210	58
HLJCF8	DQ223151	F:ccctgtctccactca	R:tttaggacacctggcact	(CA) ₂₅	2	225 ~ 230	57
HLJCF9	DQ223152	F:ttgtggaatctgcctct	R:ggatgctgtgctgtaa	(GT) ₃₃	2	278 ~ 290	53
HLJCF10	DQ223153	F:gggtgacagactgaggag	R:acctggcactgcaagata	(CA) ₂₅	1	199	48
HLJCF11	DQ223154	F:gtgcatcagtgagacgac	R:aggggacatttcaggtaa	(GT) ₂₀	3	129 ~ 146	55
HLJCF13	DQ223156	F:cagccaatcagcctaacc	R:agaagaatccgtctaccg	(TG) ₂₆	4	182 ~ 235	58
HLJCF15	DQ223160	F:tcgggtgcccatacttt	R:atggctgtgattgattgc	(AC) ₅₁	2	252 ~ 264	53
HLJCF16	DQ223169	F:ctgtaatacacgccaca	R:cccgttcttttactact	(GT) ₂₃	2	184 ~ 195	53
HLJCF17	DQ223170	F:cgatgagcagtgatgga	R:gcccgtatgtagcaggt	(GT) ₂₀	4	189 ~ 224	53.5
HLJCF18	DQ223171	F:agctttcccgtctttgt	R:gcaactgtccacctct	(AC) ₂₀	3	268 ~ 281	58
HLJCF19	DQ223172	F:tggatgatgagcgtatgg	R:ttaccctcaagccaca	(CA) ₁₄	1	169	57
HLJCF20	DQ223173	F:tccaaccaccctgata	R:gcaaccaagtaaatgta	(AC) ₂₈	4	241 ~ 262	50
HLJCF21	DQ223174	F:cagcgtaacctgtaatgc	R:aggtgaaaccgtctatcc	(GT) ₃₃	1	120	56
HLJCF22	DQ223175	F:caatgatgagcgtgaggt	R:caggaggtctgtctaatga	(CA) ₅₀	2	201 ~ 208	55
HLJCF23	DQ223176	F:ccactgagcacagggtaa	R:aggaggtgagggcaaaa	(CA) ₇₆	2	210 ~ 221	57
HLJCF24	DQ223177	F:acctgctcaaacctct	R:gacataaacgaccacat	(CA) ₆₁	1	121	56
HLJCF26	DQ223179	F:caccgtaccctatcaccc	R:tcggctttatcctcact	(AC) ₂₆	3	133 ~ 145	57
HLJCF27	DQ223180	F:ctttcatttctgccact	R:cgagatacaggtccag	(CA) ₉	2	234 ~ 241	57
HLJCF28	DQ223181	F:tcataccaccatcttca	R:accatacggtaacggagt	(GT) ₅₂	2	290 ~ 310	58
HLJCF29	DQ223182	F:aagtgtagctcagaagcgaag	R:cccgcaactggataaagac	(CA) ₉	2	148 ~ 157	48
HLJCF32	DQ223159	F:tggcacatacgacaatcc	R:gaaacatgaaggtgaggc	(CA) ₂₄	3	102 ~ 123	57
HLJCF33	DQ223161	F:caagttctcattccctac	R:ttctccctgtgctctgt	(CA) ₃₉	1	321	57
HLJCF35	DQ223163	F:gacaggccatcaaggag	R:agcaggaactggaggtat	(GT) ₂₇	3	232 ~ 256	57
HLJCF36	DQ223164	F:cacaatgccctgctcaca	R:ctgcttctctaaagctctca	(CA) ₁₆	2	141 ~ 153	58
HLJCF37	DQ223165	F:atggcgtgctgtaaat	R:tccaggtctaaatgtgc	(GA) ₂₄	4	187 ~ 231	58
HLJCF38	DQ223166	F:gaccctaagccaagcct	R:gatccgacggcaacagtg	(CA) ₃₃	3	120 ~ 135	56
HLJCF40	DQ223168	F:gagactggctcaggaag	R:ctaggttgggacaagcac	(GT) ₂₀	2	188 ~ 208	55

注: Ta. 最适退火; F. 正向引物; R. 反向引物

Notes: Ta. annealing temperature; F. forward primer; R. reverse primer

本试验与以上富集方法相比,连接了人工接头,根据接头序列设计引物,扩增由探针捕获的富含微卫星的酶切片段,人工接头增加了其特异性,两侧翼序列由一次克隆测序获得,花费相对较少。且由于二次杂交的应用,大大提高了微卫星在所测序列中的比例,如所测178个序列,173个含微卫星,高达97.2%。试验结果显示本方法富集微卫星的效果较好,筛选出的阳性克隆率为42.36%,优于同类实验。魏东旺等^[21]使用常规方法筛选微卫星序列其效率仅为2.25%,鲁翠云等^[22]的筛选效率为1.25%。Refseth等^[23]研究富集法制备微卫星报道为33%,Gardner等^[24]报道为16.7%,李琪等^[25]在皱纹盘鲍的研究中报道为13.1%,在长牡蛎研究中^[14]报道为20.5%,均低于本试验结果。

这也说明富集法制备微卫星的效率是可以通改进实验方法来提高的,实验中有些关键步骤也是不可轻视的。磁珠富集整个过程是连续而互相依存的,获得高质量的基因DNA是进行实验的基础,接头的连接也是很重要的,它关系到后面PCR扩增,T-载体的连接等步骤。但最关键的一步还是磁珠富集,它影响到克隆中微卫星的质量。磁珠的平衡及洗液和洗涤温度又是富集的关键,必须严格控制,磁珠用前需要用盐溶液反复平衡,直到磁珠顺滑;整个富集过程要严格控制温度,以达到洗涤掉那些不含有微卫星的多余片段,磁珠表面仅保留富含微卫星序列的目的片段。另外,Zane等^[26]认为富集文库中约有50%的阳性克隆重复出现了5~20次,但通过随机挑选来自不同文库板的阳性克隆进行测序,在测序结果中并未发现有重复出现的微卫星序列。

但也有研究者认为,微卫星富集法虽然使阳性克隆率提高了,但获得有用序列的概率并不高^[27]。经常是由于插入片段过短、侧翼序列太短或二级结构过多,不足以设计高质量的引物。从本次实验来看,该结论并不成立,部分筛选引物在群体中扩增多态性也较好(图3)。这与实验操作也是有很大关系的。重组子中的酶切插入片段一定要有足够的长度,保证富集后的微卫星侧翼序列足够长,以便从中设计引物。

由于微卫星探针的使用,目的微卫星也有很强的针对性,获得的微卫星序列一般较长,本次测序获得的231个微卫星座位,重复次数在10~20

次之间的78个(33.77%),20次以上的136个(58.87%),最高重复数为107次。较高重复数的微卫星序列的获得,也有利于开发更多多态性微卫星分子标记。我们合成的40对微卫星引物,最终获得多态性分子标记31对,它们可以用作大口鲈的遗传标记,或与其相近的物种的遗传育种研究。

参考文献:

- [1] Liu Z J, Karsi A, Li P, *et al.* An AFLP-based genetic linkage map of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) constructed by using an interspecific hybrid resource family[J]. *Genetics*, 2003, 165: 687 - 694.
- [2] 刘占江,冯纪年. 斑点鲈鱼的基因图谱及遗传标记辅助选育研究[J]. *西北农业学报*, 2001, 10(2): 110 - 114.
- [3] Geoffrey C, Waldbieser, Brian G, *et al.* A microsatellite-based genetic linkage map for channel catfish, *Ictalurus punctatus* [J]. *Genetics*, 2001, 158: 727-734.
- [4] 黄培堂(译). 分子克隆实验指南(第三版) [M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [5] 常玉梅,孙效文,梁利群. 中国鲤几个代表种群基因组DNA遗传多样性分析[J]. *水产学报*, 2004, 28(5): 481 - 486.
- [6] Karagyozov L. Construction of random small-insert genomic libraries highly enriched for simple sequence repeats [J]. *Nucleic Acid Res*, 1993, 21: 3911 - 3912.
- [7] Aliah R S, Takagi M, Dong S, *et al.* Isolation and inheritance of microsatellite markers in the common carp *Cyprinus carpio* [J]. *Fisheries Science*, 1999, 65(2): 235 - 239.
- [8] Bronw J, Hardwick L J, Wright A F. A simple method for rapid isolation of microsatellites from yeast artificial chromosomes [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 1995, 9: 53 - 58.
- [9] 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]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 88 - 92.
- [10] He G H, Meng R H, Newman M, *et al.* Microsatellites as DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L) [J]. *BMC Plant Biology*, 2003, 97: 143 - 149.
- [11] Ostrander E A, Jong P M, Rine J, *et al.* Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences [J]. *Proc Nati Acid Sci USA*, 1992, 89: 3419 - 3423.
- [12] 李齐发,赵兴波,罗晓林,等. 牦牛基因组微卫星富集文库的构建与分析[J]. *遗传学报*, 2004, 31(5): 489 - 494.
- [13] 李琪,木岛明博. 长牡蛎微卫星克隆快速分离及特征分析[J]. *海洋与湖沼*, 2004, 35(5): 364 - 370.
- [14] 孙效文,贾智英,魏东旺,等. 磁珠富集法与小片段克隆法筛选鲤微卫星的比较研究[J]. *中国水产科学*, 2005, 12(2): 192 - 196.

- [15] Cifarelli R A, Gallitelli M, Cellini F. Random amplified hybridization microsatellites (RAHM): isolation of a new class of microsatellite-containing DNA clones [J]. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23: 3802 - 3803.
- [16] Lunt D H, Hutchinsom W F, Carvalho G R. An efficient method for PCR-based identification of microsatellite arrays (PIMA) [J]. *Molecular Ecology*, 1999, 8: 893 - 894.
- [17] Fisher P J, Gardner R C, Richardson T E. Single locus microsatellites isolated using 5' anchored PCR [J]. *Nucleic Acids Research*, 1996, 24: 4369 - 4371.
- [18] Lench N J, Norris A, Bailey A, *et al.* Vectorette PCR isolation of microsatellites repeat sequences using anchored dinucleotide repeats primers [J]. *Nucleic Acids Research*, 1996, 24: 2190 - 2191.
- [19] Lian C L, Zhou Z H, Hogetsu T. A simple method for developing microsatellite markers using amplified fragments of inter-simple sequence repeat [J]. *J Plant Research*, 2001, 114: 381 - 385.
- [20] Hayden M J, Sharp P J. Sequence-tagged microsatellite profiling (STMP): a rapid technique for developing SSR markers [J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(8): 43e - 43.
- [21] 魏东旺, 楼允东, 孙效文, 等. 鲤鱼微卫星分子标记的筛选 [J]. *动物学研究*, 2001, 22(3): 238-241.
- [22] 鲁翠云, 孙效文, 梁利群, 等. 鳙鱼微卫星分子标记的筛选 [J]. *中国水产科学*, 2001, 12(2): 192 - 196.
- [23] Refseth U H, Fangan B M, Jakobsen K S. Hybridization capture of microsatellites directly from genomic DNA [J]. *Electrophoresis*, 1997, 18: 1519 - 1523.
- [24] Gardner M G, Cooper S J B, Bull C M, *et al.* Isolation of microsatellite loci from a social lizard, *Egernia stokesii*, using a modified enrichment procedure [J]. *J Hered*, 1999, 90: 301 - 304.
- [25] 李 琪. 皱纹盘鲍微卫星研究进展 [J]. *中国海洋大学学报*, 2004, 34(3): 365 - 370.
- [26] Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation: a review [J]. *Molecular Ecology*, 2002, 11: 1 - 16.
- [27] 李明芳, 郑学勤. 开发 SSR 引物方法之研究动态 [J]. *遗传*, 2004, 26(5): 769 - 776.

会议预告 ·

第六届世界华人鱼虾营养学术研讨会

2006年9月5-9日,第六届世界华人鱼虾营养学术研讨会将在山东青岛举行。本次会议设立“营养、饲料与水产品的质量及食品安全”为主题,首次开启“水产饲料企业发展战略论坛”,邀请国内外著名水产饲料企业的负责人就企业管理和品牌创建策略等与企业发展壮大相关话题展开演讲和讨论。

在“营养、饲料与水产品的质量及食品安全”的主题下,本次世华会拟设定如下的一些议题:

(1) 营养需求及其生理代谢; (2) 营养与水产品安全; (3) 营养与水环境; (4) 饲料原料的研究与开发; (5) 饲料添加剂的研究与开发; (6) 饲料的加工工艺与投饲技术; (7) 亲鱼(虾)和仔稚鱼(虾)营养; (8) 水产动物营养与饲料学的研究方法; (9) 其它。

会议诚征有关上述议题的论文。请在2006年6月30日前将摘要以附件形式(Microsoft word 97及以上版本)通过E-mail投寄至:wzhang@ouc.edu.cn。摘要要求中英文各一份,请按照《水产学报》的格式要求撰写,同时提供通讯作者的详细通讯地址、电话、传真和E-mail。

联系人:张文兵、王小洁

通讯地址:青岛市鱼山路5号,中国海洋大学水产学院,邮政编码:266003,电话:0532-82032495,传真:0532-82032495,手机:13869899023,E-mail:wzhang@ouc.edu.cn