

白鲢和鳊鱼的随机扩增多态 DNA 分析*

张锡元 杨建琪 张德春 邓凤姣

(武汉大学生命科学学院, 武汉 430072)

余来宁 方耀林

(长江水产研究所, 荆沙 434000)

摘要 根据鱼类外周血细胞都有核的特点, 采用从冷冻和低渗双重处理分离的细胞核提取基因组 DNA. 以此法获得的白鲢和鳊鱼的基因组 DNA 为模板, 和 Operon 公司生产的 OPN 和 OPM 两个组共 40 个随机引物, 对这两种鱼进行了随机扩增多态 DNA (RAPD) 分析; 确定了对这两种鱼基因组相关区域可进行随机 PCR 扩增的有效引物, 特别是哪些可产生种群内或群体的 RAPD 遗传标记, 即可产生个体特异性和群体特异性 RAPD 带谱的引物. 讨论了 RAPD 遗传分子标记在鱼类遗传, 特别是遗传多样性研究, 和鱼类种质资源评估和管理中的应用前景问题.

关键词 鱼类基因组, RAPD 分析, 遗传多样性, 基因组, DNA, 提取

学科分类号 Q311, Q341

DNA 指纹技术中的随机扩增多态 DNA (random amplification polymorphic DNA, RAPD) 技术, 自 90 年代初产生以来, 由于可以在对某种生物基因组不甚了解的情况下, 利用随机引物对其基因组各部分可能存在的 DNA 序列的多态性进行 PCR 扫描分析, 具有灵敏快速和简便易行的特点, 而受到许多学者的重视和采用, 促进了遗传学相关研究领域的发展^[1~3].

对鱼类遗传变异情况的全面掌握与正确评估是保护鱼类资源尚待解决的关键问题之一. 由于鱼类特殊的生活环境与行为习性, 其形态结构和细胞(包括染色体)水平上可供分析的遗传标记非常少, 可用于遗传标记的同工酶数量也很有限, DNA 指纹作为一类各种生物普遍存在并容易用现代分子生物学检测的遗传标记, 则为鱼类遗传学的研究开拓了广阔的前景. 近年来, 已有不少关于将 RAPD 指纹技术用于虾、蟹及鱼类等动物种群关系与系统进化研究的报道^[4~6], 但对于与资源评估更为直接相关的鱼类种群或群体内的遗传变异, 迄今仍少有研究.

白鲢与鳊鱼是我国江河等淡水水体中特有的半迴游性鱼类和主要的养殖对象, 它们以浮游生物为饵, 也是淡水生态食物链的重要环节. 由于污染和大规模水利设施建设导致的在长江等天然水域中的白鲢、鳊鱼等野生群体繁殖量的急剧下降, 也由于多年来人工繁殖缺乏科学规范管理出现的这两种鱼类的退化迹象^[7,8], 白鲢和鳊鱼资源的保护问题引起了有关部门和专家的特别关注, 对它们遗传变异的研究, 也成为是一个非常紧迫的问题.

本研究报告初步探讨了建立白鲢和鳊鱼的 RAPD 遗传分子标记, 并以这些标记对这两种鱼类进行遗传变异分析的可能性, 讨论了这种标记在鱼类种质资源评估、管理中的应用前景问题.

1 材料和方法

1.1 材料

白鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳊鱼 (*Aristichthys nobilis*) 和草鱼 (*Ctenopharygodon idellus*) 来源于长江水产研究所、武汉水产研究所和广西水产养殖中心, 鳗鲡 (*Anguilla sinensis*) 购自武汉集贸市场.

蛋白酶 K 为 Merk 公司产品, Taq DNA 多聚酶、DNA 分子质量标准 and dNTP 为 Promega 公司产品, 随机引物为 Operon 公司产品, 其他试剂(进口分装)均购自原平生物技术公司和华美公司. 其他化学试剂都为分析纯.

试剂: 抗凝剂 (ACD): 柠檬酸 0.48%, 柠檬酸钠 1.32%, 葡萄糖 1.47%; 抽提缓冲液: Tris-HCl 10 mmol/L, EDTA (pH 8.0) 200 mmol/L, SDS 0.5%; 电泳缓冲液 (TAE, 50×): Tris 24.2%, 冰乙酸 5.6% (v/v), EDTA (1 mol/L, pH 8.0) 5.0% (v/v); PCR 反应缓冲液 (10×): KCl 500 mmol/L, Tris-HCl (25℃ 时 pH 9.0) 100 mmol/L, Triton X-100 1.0%.

试剂均以无离子超纯水配制.

* 国家自然科学基金资助项目 (39670582).

收稿日期: 1998-04-12, 修回日期: 1998-09-01

1.2 主要实验方法

1.2.1 取血样: 取活鱼 (体重最好在 500 g/尾以上) 用吸取了 1.0 ml ACD 的注射器从尾静脉取血或剪鳃取血 (3~5 ml). 分装到有适量 ACD 的试管中标号记录后, 冻存于 -20℃ (或短时暂存于 0℃) 备用.

1.2.2 基因组 DNA 的制备: 将实验鱼的冻存血解冻, 取 200 μl 置 1.5 ml eppendorf 管中加入 1 000 μl 0.35% NaCl 淡水鱼生理盐溶液, 混匀, 12 000 r/min 离心 2 min (若上清仍带红色可加入 0.35% NaCl 再洗一次) 去上清; 沉淀加入 100 μl 0.35% NaCl 摇匀, 加入 400 μl 无离子水作低渗处理 15 min, 13 000 r/min 离心 3 min, 去上清, 获乳白色沉淀 (细胞核); 向沉淀中加入 100 μl 0.35% NaCl, 混匀, 再加入 400 μl 裂解液缓缓混匀后, 加入蛋白酶 K (10 g/L) 10 μl, 温和混匀, 置入 50℃ 水浴 4 h, 其间不时转动. 取出样管冷却后, 以饱和平衡酚和氯仿按常规方法提取出基因组 DNA, 并于 -20℃ 保存备用.

1.2.3 RAPD 实验: 所用引物为 Operon 公司的 N 组和 M 组的引物, 每个引物长 10 mer, 每组引物为 20 个, 编号分别为: OPN-1~OPN-20 和 OPM-1~OPM-20. RAPD 的反应体系参照 Williams^[1] 和 Welsh^[2] 的方法, 但 Mg²⁺, 随机引物, 模板 DNA 及 Taq 酶的用量或浓度, 在优化反应条件时作了适当的调整. 总反应体积 25.0 μl: MgCl₂ (30 mmol/L) 2.5 μl, (10×) PCR 缓冲液 2.5 μl, dNTP (2.5 mmol/L) 2.0 μl, 随机引物 (1 mmol/L) 6.0 μl, 模板 DNA (67 μg/L) 9.0 μl, 无离子水 2.7 μl. 各成分充分混合后, 93.5℃ 变性 10 min 后加入 Taq 酶 (5 U/μl) 0.3 μl 再加入 30 μl 石蜡油, 36℃ 反应 2 min, 接着开始热循环反应: 93.5℃, 40 s; 36℃, 50 s; 72℃, 90 s, 共进行 47 次循环, 最后一轮循环于 72℃ 为 7 min, 结束后将反应管 4℃ 保存待测.

2 结果与讨论

2.1 从鱼的外周血提取基因组 DNA

从这四种鱼类外周血分别提取的基因组 DNA (总 DNA) 样品所作的紫外吸收测定结果, A₂₆₀/A₂₈₀ 比值都在 1.77 以上. 0.4% 琼脂糖凝胶电泳结果显示, DNA 样品分子都大于 50 kb 没有拖尾和 RNA 分子污染.

本方法的特点在于: 采用冷冻和低渗双重处理

破坏血球细胞膜, 以差速离心去除血浆和细胞质, 分离获得细胞核, 再直接从细胞核提取基因组 DNA. 提取 DNA 时, 虽不用 RNase 和只用少量蛋白酶 K 处理, 蛋白质和 RNA 也清除得比较干净, 使后续实验不受这二者的干扰. 此外, 由于细胞质中的大量核酸酶随上清液去除, 在常温下操作也能保证大片段基因组 DNA 分子的获得, 为实验研究提供了很大的便利.

用鱼血细胞核直接提取的基因组 DNA 为模板所作的 RAPD 反应表明: 当反应体系 Mg²⁺ 浓度、模板 DNA 量、引物和 Taq DNA 聚合酶的量达到一定的程度后, 在相当大的范围内, 同一条鱼用同一种引物的 PCR 扩增带谱是不变的 (图 1, 2), 表明了反应结果的稳定性.

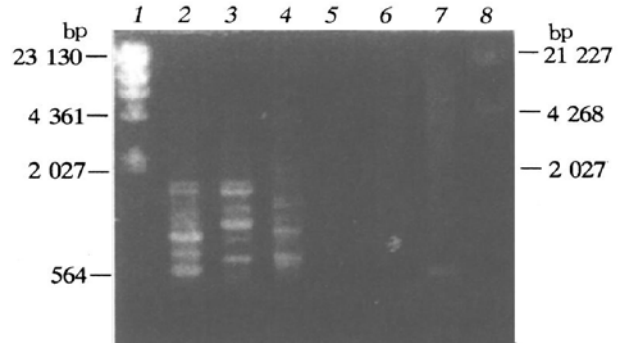


图 1 引物 OPN-2 和 OPN-3 对草鱼、白鲢和鳙鱼所作的 RAPD 电泳图谱

0.8% 琼脂糖凝胶. 第 2、3 和 4 泳道为 OPN-2 的扩增带, 第 5、6 和 7 为 OPN-3 的扩增带. 1: λDNA/Hind III; 2、5: 草鱼; 3、6: 白鲢; 4、7: 鳙鱼; 8: λDNA/Hind III+ EcoRI.

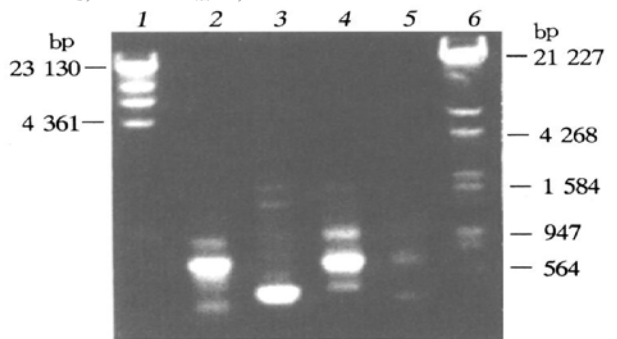


图 2 引物 OPN-15 对草鱼、白鲢、鳙鱼和鳊鱼所作的 RAPD 电泳图谱

0.8% 琼脂糖凝胶. 1: λDNA/Hind III; 2、3、4 和 5: 草鱼、白鲢、鳙鱼和鳊鱼的 RAPD 带谱; 6: λDNA/Hind III+ EcoRI.

RAPD 反应具有高度的敏感性, 实验条件的微小改变都可能导致扩增结果的变化^[9]. 在诸多影响 RAPD 反应的因素中, 模板 DNA 的质量亦是很重要的^[10]. 此处介绍的双重处理提取法可减少,

以至避免因提取过程中的 DNA 分子的降解或反应微环境受到杂质的污染而可能出现的假象, 从而使 RAPD 反应结果较稳定, 可重复性显著提高, 并使产生的电泳带谱更为清晰.

2.2 RAPD 扩增效应与带谱的种属特异性

以 Operon 公司生产的 N 和 M 两组共 40 个随机引物 (OPN-1~ OPN-20, OPM-1~ OPM-20) 对白鲢和鳙鱼所进行的 RAPD 电泳分析表明, 除了 OPN 组中的 OPN-10、11、12 和 17 号引物对两种鱼都没有显示 RAPD 扩增效应, OPN-8 和 12 只对白鲢有效, OPN-3 和 4 只对鳙鱼有效外, OPN 组其余 13 个引物和 OPM 组所有 20 个引物, 对这两

种鱼类都有显著的扩增效应. OPN 组引物扩增的总带数: 白鲢为 46, 鳙鱼为 62; OPM 组引物扩增的总带数: 白鲢和鳙鱼均为 84. 扩增片段的大小均在 0.3kb~ 2.5kb 之间.

OPN 和 OPM 两组的有效引物 RAPD 电泳带谱, 不同的鱼类是完全不同的. 白鲢和鳙鱼的 RAPD 带谱显著不同; 作为实验对照的草鱼和鳊鱼, 与白鲢、鳙鱼也不同, 它们彼此间也很不一样 (图 1~ 4), 反映了每种鱼都有其独特的 (种属特异的) RAPD 扩增模式, 说明不同种的鱼类在基因组结构上存在着本质差异.

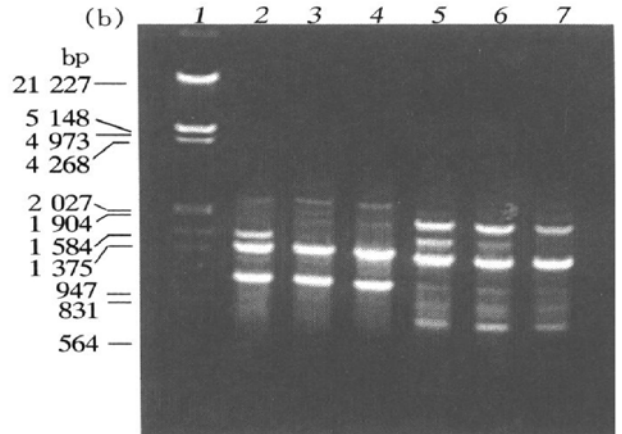
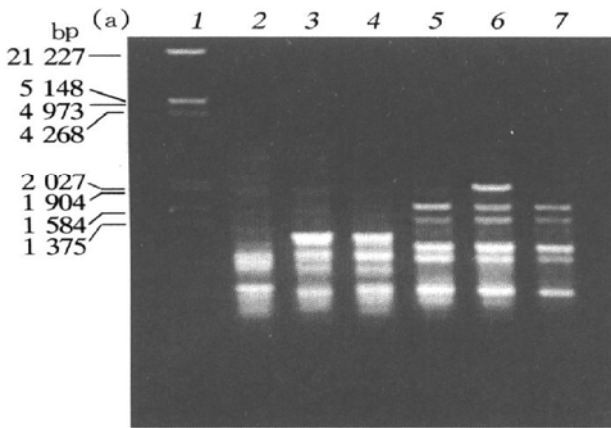


图 3 引物 OPM-2 (a) 和 OPM-14 (b) 对白鲢和鳙鱼所作的 RAPD 电泳图谱
0.8% 琼脂糖凝胶. 1: λ DNA/*Hind* III+ *Eco* R I ; 2、3 和 4: 来自三个不同群体的白鲢 RAPD 带谱; 5、6 和 7: 来自三个不同群体的鳙鱼 RAPD 带谱.

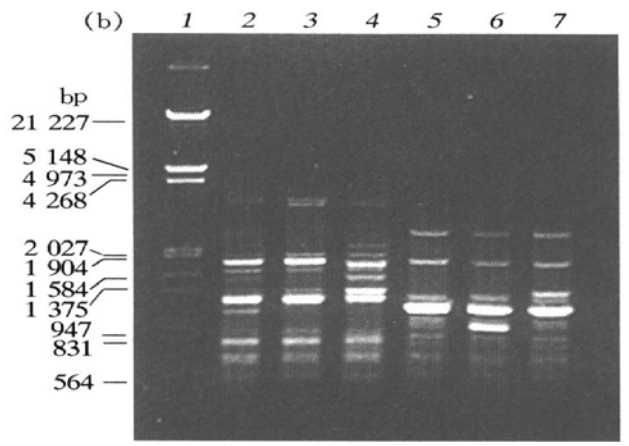
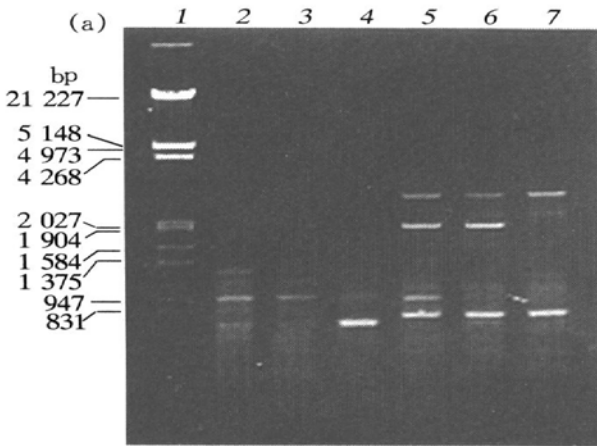


图 4 引物 OPM-9 (a) 和 OPM-17 (b) 对白鲢和鳙鱼所作的 RAPD 电泳图谱
0.8% 琼脂糖凝胶. 1: λ DNA/*Hind* III+ *Eco* R I ; 2、3 和 4: 来自三个不同群体的白鲢 RAPD 带谱; 5、6 和 7: 来自三个不同群体的鳙鱼 RAPD 带谱.

2.3 白鲢和鳙鱼 RAPD 带谱的个体特征与群体特征

无论是白鲢还是鳙鱼, 其不同个体由某特定引物扩增的 RAPD 带谱都具有该种鱼的共同特征 (不同个体共有的标记带或主带). 但是, 在显示出这些共同点的同时, OPN 和 OPM 两组引物中的一

部分引物 (OPN-14、15 和 16 号; OPM-2、4、9、12、14 和 17 号) 对白鲢和鳙鱼所作的 RAPD 电泳带谱中也存在明显的个体特异性带 (图 3~ 5) 和群体特异性带 (图 5). 这些具有个体和或群体特异性的带直接反映了群体 (或种群) 内个体基因组

的变异, 为研究这两种鱼的遗传变异、遗传多样性, 分析它们各自群体遗传结构提供了重要依据.

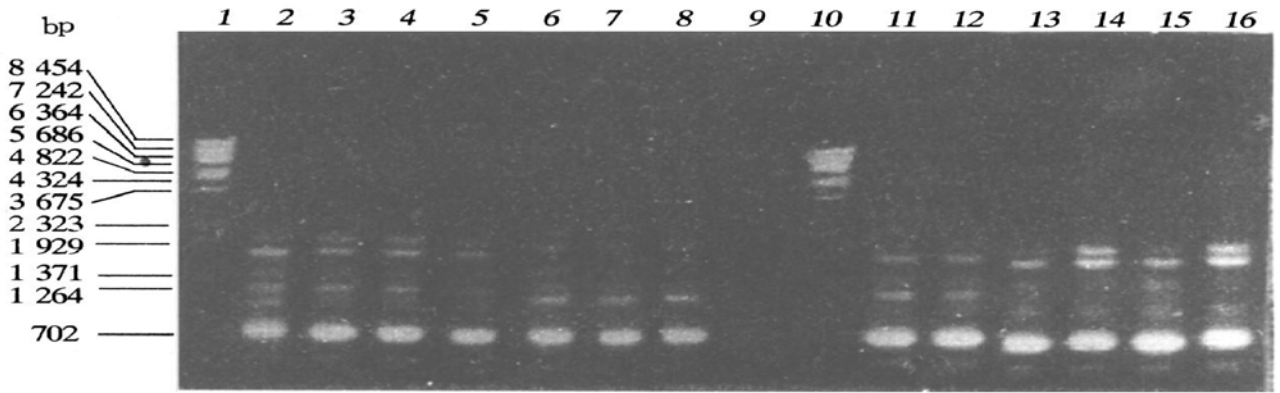


图5 引物 OPN 15 对鳙鱼所作的 RAPD 电泳图谱
0.8% 琼脂糖凝胶。1、9 和 10: DNA/BstE II, 2~8、11 和 12: 广西西江水系邕江段鳙鱼各个体的 RAPD 带谱; 13~16: 长江水系武汉段鳙鱼各个体的 RAPD 带谱。

2.4 鱼类遗传多样性与渔业管理

遗传多样性, 从理论上说, 是生物适应环境与进化的基础. 就一个物种而言, 种内遗传多样性愈丰富, 该物种对环境变化的适应能力愈大、其进化的潜力也就愈大, 也就愈有利于保持物种和整个生态系统的多样性^[8,11]. 可见对于鱼类遗传多样性及其变化情况的研究是评估鱼类资源质量、建立鱼类人工繁殖科学管理规范的重要基础工作. 本文所报道的白鲢和鳙鱼的 RAPD 遗传分子标记的建立, 为这两种鱼类的遗传多样性提供了量化分析的有力手段. 它与其他 DNA 指纹技术一起, 将有可能为建立能反映我国各大江河水系中组成鱼类资源的各主要种类的群体或种群的内在变化动态的数据库, 和建立对鱼类人工繁育中的科学选配与选育所必需的亲鱼档案发挥重要的作用.

参 考 文 献

- Williams J G K, Kubelik A R, Liavk K J, *et al.* DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 1990, **18** (22): 6531~ 6535
- Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*, 1990, **18** (24): 7213~ 7218
- Caetano-Anolles G. Amplified DNA with arbitrary oligonucleotide primers. *PCR Methods Appl*, 1993, **3**: 85~ 87
- Garcia D K, Faggart M A, Rhoades L, *et al.* Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1994, **3** (5): 270~ 274
- Garcia D K, Benzie J A H. RAPD markers of potential use in penaeid prawn (*Penaeus monodon*) breeding programs. *Aquaculture*, 1995, **130** (2~ 3): 137~ 141
- 邱 涛, 陆仁后, 项超美, 等 (Qiu T, Lu R H, Xiang C M, *et al.*). RAPD 方法对中华绒螯蟹长江、黄河、瓯江三群体的遗传多样性分析. *淡水渔业 (Freshwater Fisheries)*, 1997, **27** (5): 3~ 6

- 刘乐和, 吴国熙, 赵伟晓, 等 (Liu L H, Wu G X, Zhao W X, *et al.*). 葛洲坝水利枢纽兴建后对青草鲢鳙繁殖生态效应的研究. *水生生物学报 (Acta Hydrobiol Sinica)*, 1986, **10** (4): 353~ 364
- 陈宜瑜 (Chen Y Y). 淡水生态系统中的若干生物多样性问题. *生物科学信息 (Biosci Commun)*, 1990, **2** (1): 197~ 200
- Ellsworth D L, Rittenhouse K D, Honeycutt R L. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *BioTech*, 1993, **14** (2): 214~ 217
- Penner G A, Bush A, Wise R, *et al.* Reproducibility of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PCR Methods Appl*, 1993, **2**: 341~ 344
- 施立明 (Shi L M). 遗传多样性及其保存. *生物科学信息 (Biosci Commun)*, 1990, **2** (1): 158~ 164

RAPD Analysis on *Hypophthalmichthys molitrix* and *Anistchthys nobilis*. ZHANG Xi-Yuan, YANG Jian-Qi, ZHANG De-Chun, DENG Feng-Jiao (*School of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China*); YU Lai-Ning, FANG Yao-Lin (*Yangtze River Fisheries Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Jingsha 434000, China*).

Abstract Total 40 random primers of OPN and OPM groups made in Operon Co. were applied to the RAPD analysis of *H. molitrix* and *A. nobilis*. Besides establishment of species-specific RAPD electrophoretogram, some kinds of primers which can produce molecular genetic markers of RAPD with individuality- or population-specificity of these fish were found. A modified method to extracting genomic DNA from peripheral blood cells of fish, and the application prospects of RAPD technique in genetic diversity and variation of fish, and in fishery management and the evaluation of fish resources were discussed.

Key words fish genome, RAPD analysis, genetic diversity, genomic, DNA, extract