

RAPD 技术分析荷包红鲤抗寒品系 与亲本的基因组变化

梁利群 孙效文 闫学春

(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 哈尔滨 150070)

摘 要 用 40 个随机引物对荷包红鲤、荷包红鲤抗寒品系和黑龙江野鲤三个品系鱼进行 RAPD 反应, 共扩增出 366 条带, 获得多态性的 DNA 片段 60 条。荷包红鲤抗寒品系与荷包红鲤、荷包红鲤抗寒品系与黑龙江野鲤的基因组变异指数分别为 0.77 和 0.90。说明荷包红鲤抗寒品系的基因组与其亲本黑龙江野鲤的基因组较荷包红鲤具有更大的变异。

关键词 RAPD, 荷包红鲤抗寒品系, 基因组

传统的杂交育种在鱼类遗传改良上取得了举世瞩目的成就。从本世纪 40 年代至今, 通过杂交育种技术先后培育出许多优良鱼类养殖新品种, 如前苏联的库尔斯克鲤、鳞鲤等^[1], 我国的建鲤和荷包红鲤抗寒品系以及荷元鲤、颖鲤、丰鲤等杂交鲤^[2], 应用生产后取得了显著的经济效益。杂交育种的主要目的是把一种或几种优良性状转移到一个目标品种中去。但目标品种在获得优良性状的同时, 不利性状也随之被带入, 为此常规育种多选择回交技术来强化引入性状, 同时减弱不良性状及其对应的基因型, 而按统计遗传学的测算, 用常规育种技术要回交 100 代, 这种愿望实际是难于办到的。DNA 分子标记技术预示了这种前景的可能性, 世界各国正在为此而努力。DNA 分子水平的多态性研究是进行基因组分析的基础, 也为遗传性状的标记提供了技术手段。自 1987 年 Donis - Keller 等人建成第一张人的 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)^[8]图谱以来, DNA 分子水平上研究基因组的多态性、基因定位及遗传图谱等方面的研究进展迅速, 其中 RAPD(Random Amplified Polymorphism DNA 即随机扩增的多态性 DNA)技术用的较多, 原因是其操作简单, 快速并易程序化, 无需同位素等优点, 无种属特异性, 并有无数的引物可供利用, 能产生足够的多态性, 可以鉴别物种之间和种群之间的基因组的差异, 也可以区分个体之间的差异。为此该技术目前已广泛应用于物种进化、生物遗传多样性评价、基因定位^[4~7]、作物新品种的基因组变化检测等方面。本文用 RAPD 技术对荷包红鲤抗寒品系与亲本的基因组进行分析, 以指导鱼类遗传育种。

收期日期: 1997 - 03 - 20。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼 黑龙江野鲤(耐寒)采自黑龙江抚远江段,原种荷包红鲤(不耐寒)采自江西婺源县荷包红鲤原种场,荷包红鲤抗寒品系为本所培育的 F₃。

1.1.2 随机引物 购自美国 Opron 公司。

1.1.3 生化试剂 购自 Promage 公司。

1.1.4 PCR 仪 为美国 PE 公司的 9600 型。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的制备 参照《分子克隆》一书的方法^[3],取 5g 肝脏于液态氮中,深冻后快速研磨,加 50ml 提取液(成分:0.5M EDTA pH8.0, 200μg/ml Proteinase K, 0.5% Sarcosyl)用玻璃棒搅匀,在 50℃ 水浴中消化 3 小时,在此期间要转动离心管数次。充分消化后加等体积的酚抽提三次(为避免抽提过程中 DNA 断裂,每次要缓慢转动离心管 10 分钟,离心分相)。吸出含 DNA 的水相,用等体积酚/氯仿(酚:氯仿:异戊醇比为 25:24:1)再抽提两次,将上清液转入透析袋中,对 4 升透析液(成分:50mM Tris. Cl pH8.0, 10mM NaCl)进行数次透析,直到 OD₂₇₀ < 0.05。将透析袋中的流体转入离心管中,加入无 DNA 的 RNA 酶,终浓度为 100μg/ml, 37℃ 保温 3 小时,再用酚/氯仿抽提三次,上清液再用 TE(成分:10mM Tris. Cl pH8.0, 1mM EDTA pH8.0)进行透析,透析后的样品用紫外分光光度计测定浓度后待用。

1.2.2 RAPD 反应 扩增反应在 25μl 体积中进行,反应体系含有 10mM Tris. Cl (pH8.3), 50mM KCl, 15mM MgCl₂, 0.001% 明胶, 0.1% 的 Tritonx-100, dATP、dGTP、dTTP、dCTP 各 0.2mM,引物为 0.2μM, Taq 酶为 1.5 个单位,模板 DNA 为 50ng,扩增反应在 PE-9600 DNA 扩增仪上进行。程序是 93℃ 变性 1 分钟, 36℃ 复性 1 分钟, 72℃ 延伸 2 分钟,经 45 个循环后, 72℃ 延伸 5 分钟,扩增产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳, EB 染色后在紫外灯下观察并拍照。

1.2.3 数据处理 参照已有文献,记录 DNA 条带并进行数据处理。只记录电泳后清晰的条带,两个个体间的遗传差异用基因组变异系数(1-S)确定。S(重组度)由下式获得: $S = 2N_{XY} / (N_X + N_Y)$, 其中 N_{XY} 是 X, Y 两个个体共享的 RAPD 标记数, N_X , N_Y 分别为 X 和 Y 个体拥有的 RAPD 标记数。

2 结果

2.1 RAPD 反应产物

40 个随机引物(每个引物为 10 个碱基)对原种荷包红鲤(用 H 表示)、荷包红鲤抗寒品系(用 K 表示)和黑龙江野鲤(用 Y 表示)三个品系鱼的基因组 DNA 进行 RAPD 扩增,除 5 个引物未扩增出 DNA 片段外,其它引物都扩增出较多的带型(见图 1)。共产生 366 条带,平均每个引物为 9.1 条,扩增出的片段大小范围在 0.5-5.0 kb 之间,其中荷包红鲤产生了 135 条,荷包红鲤抗寒品系产生 118 条,黑龙江野鲤产生 113 条;31 个引物(占 77.5%)的扩增产物中出现了多态性 DNA 片段,共 60 条;每两种鱼之间的多态性片段数分别为:H/K 为 29 条、H/Y 为 20 条、K/Y 为 11 条。

2.2 基因组变异指数

计算了荷包红鲤抗寒品系与其两个亲本荷包红鲤与黑龙江野鲤的基因组的变异指数,结果见表1。荷包红鲤抗寒品系与荷包红鲤的变异指数为0.77,而荷包红鲤抗寒品系与黑龙江野鲤的变异指数为0.90。说明荷包红鲤抗寒品系的基因组与黑龙江野鲤的基因组较荷包红鲤具有更大的变异性。其基因组组成更接近荷包红鲤^①。



图1 RAPD 扩增反应产物电泳图

Fig.1 The map of electrophoresis product with RAPD

H: 荷包红鲤 K: 荷包红鲤抗寒品系 Y: 黑龙江野鲤 C-15~C-19 为引物

H: Red common carp K: Red common carp(k) Y: Common carp C-15~C-19 to primer

表1 荷包红鲤抗寒品系的基因组变异指数

Table 1 The variation index of genome of red common carp (k)

	黑龙江野鲤 Common carp	荷包红鲤抗寒品系 Red common carp(k)	荷包红鲤 Red common carp
黑龙江野鲤 Common carp	—	0.0952	0.1613
荷包红鲤抗寒品系 Red common carp(k)	0.9048	—	0.2248
荷包红鲤 Red common carp	0.8387	0.7752	—

表中对角线上方数字为两个品种间基因组组成的重组度。
The numerals abovediagonal are recombination degrees of the genomic.

3 讨论

荷包红鲤抗寒品系是黑龙江水产研究所培育的适合北方池塘养殖的抗寒新品系,它是由黑龙江野鲤(♀)与荷包红鲤(♂)杂交 F_1 再从 F_1 自交分离出来的表型为全鳞、红色、荷包型的 F_2 ,然后自交选育二代,它不仅具有荷包红鲤的表型,且接受了黑龙江野鲤的抗寒品质,从而使该品系适于富营养型池塘养殖和在高寒地区长期低温条件下过冬的能力。这种鱼在遗传上与其亲本有很大的差异,尤其是增加了原亲本荷包红鲤所不具备的抗寒能力,但用生化遗传学技术(同工酶等)没有检测到这种差别,在试用RAPD技术仅40个引物就发现大量的变异带型,也获得了具有标记耐寒性状的特异性片段(另发文章论述),表明RAPD技

^① 沈俊宝,刘明华等,1988。荷包红鲤抗寒品系的形态学特征及其主要经济性状。黑龙江水产研究所研究报告,26:12-17。

术确实是一个多态性较强的分子标记技术。鱼类的常规育种技术至今还是获得新的养殖新品系新品种的主要技术,其缺点是育种周期长,如能结合 RAPD 这一强有力的分子标记技术,将会使鱼类育种周期缩短,达到用较少的人力获得较大的经济效益的目的。因此,用 RAPD 技术来检测育成品种的基因组变化并对一些经济性状进行分子标记,是一项大有可为的新研究领域。

用 RAPD 技术对杂交技术育成的鱼类新品种与原亲本进行的基因组的比较研究还未见到报道。本文用此技术对育成的荷包红鲤抗寒品系的基因组组成与原亲本的基因组组成的差异进行探索分析,并用基因组变异指数描述新品系与亲本之间基因组变化的程度,用基因组组成的重组度即 S 来表示新品种基因组与亲本基因组之间的相似程度。

参 考 文 献

- [1] 李骏民, 鱼类遗传与育种学, 214 - 215。中国林业出版社。
- [2] 沈俊宝, 刘明华, 1988。荷包红鲤抗寒品系的筛选。淡水渔业, 3: 14 - 17。
- [3] 萨姆布鲁克 E. F 费里奇 T. 曼尼阿蒂斯, 1989。《分子克隆》第二版, 464 - 468。科学出版社。
- [4] Martin G. B. et al., 1991. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primer and near-isogenic lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 2336 - 2340.
- [5] Paran I et al., 1991. Identification of markers linked to disease resistance gene by Bulk Segregant Analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (in press), 34: 1021 - 1026.
- [6] Williams J. G. K. et al., 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods Enzymol.* 21(8): 704 - 740.
- [7] Roy, A. et al., 1992. Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*. *Theor. Appl. Genet.* 85: 173 - 180.
- [8] Williams, J. G. K. et al., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18: 6531 - 6535.

RAPD ANALYSIS OF THE GENOMIC CHANGE IN RED COMMON CARP(K)

Ling liqun Sun Xiaowen Yan Xuechun

(Hei Longjiang Rivery Research Institue, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Harbin 150070)

ABSTRACT The genomic changes of red common carp(k) and its parents were analysed with RAPD method. 40 random primers were used to amplify genomic DNA of common carp, red common carp and red common carp(k). 366 bands were produced and 60 among them were polymorphism. The variation index of genome was respectively 0.77 (the genome of red common carp(k) to the genome of red common carp) and 0.90 (the genome of red common carp(k) to the genome of common carp). The results showed that greater variation occurred between the genome of the red common carp(k) and common carp.

KEY WORDS RAPD, Red common carp(k), Genome