

4种沼虾的SRFA指纹研究*

邱涛 陆仁后 项超美 张菁 谢浩

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要 本文用沼虾属(*Macrobrachium*)的4个主要种:罗氏沼虾(*M. rosenbergii*)、海南沼虾(*M. hainanense*)、日本沼虾(*M. nipponense*)、粗糙沼虾(*M. asperulum*)作材料,构建了它们的SRFA-DNA指纹,经比较得到这4个种的SRFA分子标记,并构建了它们之间的谱系关系图,发现日本沼虾和海南沼虾在遗传上比较接近,属于同一“支序”,粗糙沼虾与另外3者在遗传上都相距较远。

关键词 SRFA, 沼虾属, 指纹

SRFA即选择性限制性片段扩增(Selective restriction fragment amplification)技术,为Zabeau等人提出^[1-3],该方法简单方便,其原理及步骤大致为:将总体基因组DNA以限制性内切酶酶切后,在DNA片段两端连接上人工接头(adapters),再以人工接头和邻近的限制性酶切位点为基础设计引物,随后进行PCR扩增。由于采用这种方法所产生的DNA带型过于复杂,因此,通常在人工接头3'端的互补序列上再加上2~3个随机寡核苷酸作为引物,这样,只有两端为限制性酶切位点且能与加上的寡核苷酸相匹配的限制性片段才能被扩增出来。通过调节随机寡核苷酸的数量,可以控制产生带数的多少^[4],从而增强及调节这一方法的特异性。此方法在实际操作中,若能控制好特异的PCR条件,可以达到很好的扩增效果。

SRFA技术采用PCR扩增代替了RFLP的杂交步骤,克服了RFLP和RAPD中的许多问题^[5],可广泛应用于遗传图谱构建^[4]、基因定位^[6]以及种系遗传标记的寻找^[5]。SRFA技术兼顾了RFLP和RAPD的优点,将限制性内切酶酶切技术和PCR技术结合起来,克服了分子杂交的烦琐、复杂,也是一种简单、快速地建立分子遗传标记的方法。但目前

尚未发现SRFA技术在水产动物中应用的报道。本文将SRFA技术引入水产动物的研究中,为水产动物的种系鉴定、资源保护以及遗传结构的研究开发了新的技术手段。

1 材料与方法

1.1 材料

罗氏沼虾采自湖北武汉,海南沼虾采自浙江青田,日本沼虾采自湖北武汉,粗糙沼虾采自湖北洪湖。采集后取肝胰脏用95%乙醇固定。

1.2 基因组DNA的提取

参照Blin和Stafford的方法^[7]改进而成。取固定组织,加入约10倍体积裂解液(10 mol/L Tris·Cl, 0.1 mol/L EDTA, pH 8.0),匀浆;匀浆液加入SDS至终浓度为0.5%,再加入蛋白酶K至终浓度为100 μg/ml,50℃保温3 h,并不时旋动粘滞的溶液。冷却至室温,加等体积的饱和平衡酚,缓慢混匀两相,5 000 g离心15 min,取上清水相。重复酚抽提2次。加0.2倍体积的10 mol/L乙酸铵和2倍体积的无水乙醇沉淀DNA,沉淀用70%乙醇洗涤2次;待乙醇挥发尽,加入TE(pH 8.0)溶解。

1.3 SRFA模板DNA的制备

基因组DNA酶切和与人工接头的连接在同一反应体系中进行。为了保证酶切安全,首先进行酶切,在20 μl的酶切反应体系中含有30 mmol/L

收稿日期:1997-10-05

* 本研究由国家自然科学基金项目(39570571)和国家九五攻关项目(96-008-01-03-05)资助。

Tris·Cl pH 7.8, 10 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L ATP, 基因组 DNA 0.2 μg, Pst I 酶 40 U, 酶切过夜, 再加入人工接头 0.2 μg, T₄DNA 连接酶 2 U, Pst I 酶 20 U, 37℃ 保温 3 h, 加入 NaAc(pH 5.2) 至终浓度 2.5 mol/L, 加 2 倍体积冷乙醇, -20℃ 放置 1 h, 10 000 g 离心 5 min, 收集沉淀, 70% 乙醇冲洗沉淀 1 次, 风干后加入 20 μl TE, 置 -20℃ 冰箱备用。此模板 DNA 稀释 50 倍后方可用于 PCR 反应。

1.4 SRFA 人工接头

按陈洪等^[8]方案合成 2 个互补的寡聚核苷酸, 在 PCR 仪中经 94℃ 变性 3 min, 36℃ 退火 8 min 后自然冷却致室温, 使 2 个互补的寡聚核苷酸退火结合为人工接头。

寡聚核苷酸 1. 5'—CTCGTAGACTGCGTACA
TGCA—3'

寡聚核苷酸 2. 3'—CATCTGACGCATGT—5'

1.5 SRFA 引物

SRFA 引物由 3 部分组成: 核心序列(CORE)、酶特征序列(ENZ)、选择序列(EXT)。根据人工接头的序列合成了 4 个选择性引物(P), 其 3'—端具有 3 个随机碱基。

	CORE	ENZ	EXT
P1.	5'—GACTGCGTACA	TGCAG	ACC—3'
P2.	5'—GACTGCGTACA	TGCAG	CAC—3'
P3.	5'—GACTGCGTACA	TGCAG	GTG—3'
P4.	5'—GACTGCGTACA	TGCAG	TCG—3'

1.6 SRFA—PCR 扩增反应

扩增反应的总体积为 25 μl, 其中包括: 10 mmol/L Tris·Cl (pH 8.0), 50 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl₂, 0.001% gelatin, 0.2 μmol/L 引物, 4 种核苷酸 dCTP, dGTP, dATP, dTTP, 各为 0.1 mmol/L, 30 ng 模板 DNA, 1 单位的 Tag 酶。PCR 反应条件为 94℃ 变性 60 s, 56℃ 复性 60 s, 72℃ 延伸 120 s, 共进行 35 个循环。最后在 72℃ 保温 10 min。扩增产物在 1.7% 琼脂糖凝胶电泳中检测。

2 结果

SRFA 引物 P1、P2、P3、P4 对 4 种沼虾个体的反应中均能产生较清晰的 DNA 谱带, 数量为 3 至 28 条带 (不清楚的带不列入统计), 大小在 0.1 至

2.5 kb 之间 (图 1)。4 种 SRFA 引物的扩增结果在种内个体间均未发现差异, 但在种与种之间可发现差异。4 种 SRFA 引物对罗氏沼虾、日本沼虾、粗糙沼虾的扩增图谱均存在明显差异 (图 2), 在每一引物的扩增图谱中, 均能找到几个它们各自间的 SRFA 标记带; 而每一引物对沼虾和海南沼虾的扩增谱带相似率很高, 差异微小, 但也能看出差异, 如引物 P2 在对日本沼虾的不同个体的扩增中均能扩出 1 条分子量大小为 650 bp 的 DNA 带, 而对海南沼虾的不同个体的扩增中得不到此带。扣除模糊不清的谱带, 罗氏沼虾、日本沼虾、海南沼虾、粗糙沼虾之间的谱带相似率计算结果如表 1。

由表 1 遗传距离的数据, 采用 UPGMA 方法并使用 Statistic 软件构建了谱系关系图 (图 3)。

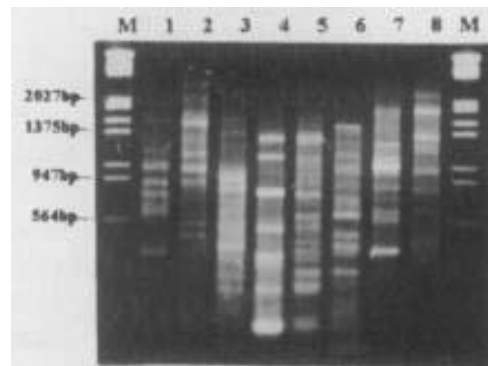


图 1 4 个 SRFA 引物对罗氏、日本沼虾同一个体的扩增图谱
Fig.1 Amplification of DNA isolated from the same individuals of *M. rosenbergii*, *M. nipponense* using 3 SRFA primers
M λ DNA (EcoR I /Hind III) 1,2 引物 P4
1,3,5,7 罗氏沼虾 (*M. rosenbergii*) 3,4 引物 P3
2,4,6,8 日本沼虾 (*M. nipponense*) 5,6 引物 P2
7,8 引物 P1

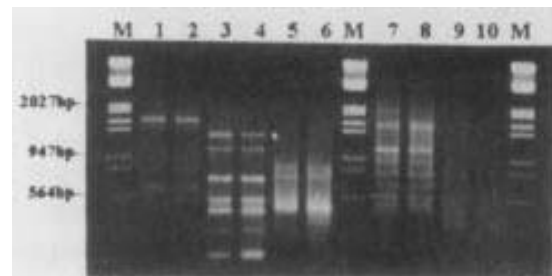


图 2 SRFA 引物 (P3) 对罗氏、日本、粗糙沼虾以及 SRFA 引物 (P2) 对日本、海南沼虾各 2 个个体的扩增图谱
Fig.2 Amplification of DNA isolated from 2 individuals of *Macrobrachium* using SRFA primer (P3) and primer (P2)
1,2 粗糙沼虾 (*M. asperulum*) 1,2,3,4,5,6 引物 P3
7,8 引物 P2

3,4,7,8 日本沼虾(*M. nipponense*) 7,8,9,10 引物 F2
 5,6 罗氏沼虾(*M. rosenbergii*) M λ DNA (EcoRI /HindIII)
 9,10 海南沼虾(*M. hainanense*)

表 1 4 沼虾之间扩增区带的相似率及遗传距离

Table 1 Genetic distances and similarity of shared bands amplified among 4 species of *Macrobrachium*

	罗氏沼虾	日本沼虾	海南沼虾	粗糙沼虾
罗氏沼虾	1	0.783	0.708	0.362
日本沼虾	2.17	1	0.967	0.427
海南沼虾	2.92	0.33	1	0.436
粗糙沼虾	6.38	5.73	5.64	1

注:本表对角线以上的数据为相似率,对角线以下的数据为遗传距离, $\times 100$ 。Up diagonal are similarities and under that are genetic distances.

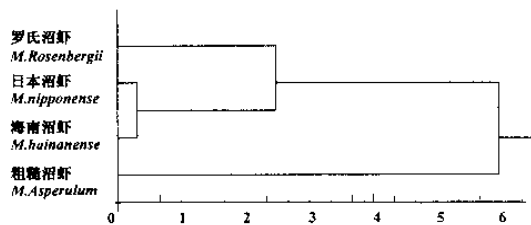


图 3 根据 SRFA 获得的遗传距离,用类平均聚类方法构建的 4 个种沼虾的谱系关系图

Fig.3 Dendrogram of 4 species of *Macrobrachium* according to UPGMA method of cluster analysis based on genetic distance data from SRFA

3 讨论

(1)SRFA 技术可以简单、快速、稳定地得到来源于不同材料的 DNA 指纹图谱,在沼虾属中,几种主要种间存在广泛的遗传多态性差异,这些种间多态性片段是进化中变异活跃片段,它们反应了种间的分化和变异程度,而那些种间共有的片段则为进化中保守的部分。通过 SRFA 标记,本文作出了它们的谱系图。日本沼虾和海南沼虾的相似率为 0.967,在遗传上比较接近,属于同一“支序”,这与它们在形态上相近是吻合的。而粗糙沼虾与另外 3 者在遗传上都相距较远,其中粗糙沼虾与罗氏沼虾相距最远,2 者相似率仅为 0.362。4 种沼虾的谱系

图可以反映出该 4 个种在遗传上的进化关系,首先是粗糙沼虾从共同祖先中分离出来,最后才是海南沼虾与日本沼虾。除罗氏沼虾和粗糙沼虾形态特征较为明显外,另外 2 者在形态上相互间有较多的相似之处,且各自的幼体、年轻个体、成体又各有其特点,给形态学上的种质鉴定带来诸多不便,用 SRFA 图谱则克服了形态学分类上的不足,直接揭示 4 个种间的分子遗传规律,确定种间差异。可见,SRFA 技术可以有效地用于对水产动物种群多样性的研究和不同种系的 DNA 分型。

(2)用 SRFA 技术对沼虾属不同物种的 DNA 扩增中,发现种间的差异是明显存在的,但根据对种内不同个体的分析发现,4 种 SRFA 引物的扩增结果在种内个体间未发现存在差异,我们认为原因是多方面的。可能是由于本文取材品系的个体遗传特性相似,4 个引物在数量上偏少,尚不能揭示个体间的遗传多样性。更主要的原因应与本文采用的实验方案有关,按 Pieter Vos^[4],SRFA 技术的优化方案通常对基因组 DNA 采用双酶切,即用一个稀有性切点的限制性酶和一个经常性切点的限制性酶,且扩增谱带用分辨率高的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(测序胶)分离,通过放射性自显影得到大量的多态性片段,进而可大大提高检测灵敏度。而本文直接采用内切酶 Pst I,进行单酶切,Pst I 的切点序列为 CTGCAG 6 个碱基序列,为稀有切点性的酶,这样两端都为 Pst I 切点且附近有 3 个选择性碱基互补的片段才能被扩增出来,限制了产生的 DNA 片段的数量,以利于在琼脂糖凝胶电泳上展示出来。前一方案虽然效果较好,但必须针对两个酶分别设计引物,要使用同位素,且实验耗费也比较大。而本文的方案简便、快速。但这样在分辨率方面比原方案会有所损失,因此在检测个体多态性方面可能会显得不足。另外,3 个碱基的选择序列可能限制了个体多态性的产生。因此根据不同的实际情况,也可适当减少选择性碱基的数目。

(3)在一般情况下,我们认为 SRFA 技术与 RAPD 一样,可视为显隐性遗传模式,但 SRFA 技术扩增出的谱带却不能完全被看作是显隐性的,可能存在少量的共显性谱带,选择性碱基的数目越少,共显性的成分就越多。SRFA 技术考察的是酶切点上的变化,当不使用选择性碱基时,2 个等位基因如果存在不同的酶切点,其纯显性、纯隐性及杂合子应形成 3 种不同的图谱,应视为共显性遗传模式。

随着选择性碱基数目的增多,对扩增谱带有一种挑选作用,这样得到的谱带更多的应具显隐性作用。就显隐性遗传模式而言,有带即为显性,无带则为隐性,不能考察出等位基因的杂合体形式,也就不能准确地估算基因频率,因此在用于种群进化的研究时有一定的局限性。

参 考 文 献

1. Lun J J, Kuo J. AFLPTM: a novel PCR - based assay for plant and bacterial DNA fingerprinting. *Focus*, 1995, 17: 52 ~ 56
2. Smith D R. Ligation - mediated PCR of restriction fragments from large DNA molecules. *PCR Methods Applications*, 1992, 2: 21 ~ 27
3. Zabeau M. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. *European Patent Application*, 1993, 0 534 858A1.
4. Vos P, Hoger R, Bleeker, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acids Res*, 1995, 23: 4407 ~ 4414
5. Liu J J, Kuo J, et al. A PCR - based DNA fingerprinting technique: AFLP for molecular typing of bacteria. *Nucleic Acids Research*, 1996, 24: 3649 ~ 3650
6. Thomas C M, Vos P, Zabeau M, et al. Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato Cf - 9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum*. *The Plant J*, 1995, 8: 785 ~ 794
7. Blin N, Stafford D W. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res*, 1976, 3: 2303
8. 陈洪, 王振山, 等. SRFA 法构建水稻 DNA 指纹图谱. *生物工程学报*, 1996, 12(3): 266 ~ 269

Studies on 4 species of *Macrobrachium* with SRFA fingerprinting

Qiu Tao Lu Renhou Xiang Chaomei Zhang Jing Xie Hao

(Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract This paper demonstrated DNA fingerprinting of 4 species of *Macrobrachium* (*M. rosenbergii*, *M. hainanense*, *M. nipponense*, *M. asperulum*) with Selective Restriction Fragment Amplification (SRFA) technique. The similarity of the shared bands amplified among the 4 species was calculated and the dendrogram of them was drawn according to UPGMA method of cluster analysis and the genetic distance data from SRFA. It is found that the genetic distance between *M. nipponense* and *M. hainanense* is shorter while those between *M. asperulum* and other 3 species are longer.

Key words SRFA, *Macrobrachium*, fingerprinting