

## 鲫鱼种群的随机扩增多态DNA与遗传多样性分析

王晓梅\* 宋文芹 李秀兰 陈瑞阳

(南开大学生物系,天津 300071)

**摘要** 利用 RAPD 技术检测了两个不同水域(天津于桥水库和独流碱河)鲫鱼种群的基因组 DNA 的多态性。用 45 个 10 bp 的引物对实验鱼的基因组 DNA 进行扩增。实验结果经统计分析得出:种群间 RAPD 标记的相似率为 84.2%,遗传距离为 0.158,而上述两个种群内的相似率分别为 94.3%和 93.5%,遗传距离为 0.057 和 0.065。表明这两个鲫鱼种群内的遗传多态性贫乏,而种群间具有一定的遗传多样性。

**关键词** RAPD, 鲫鱼, 种群, 遗传多样性, 相似率

目前,鲫鱼(*Carassius auratus*)等多种鱼类资源日趋小型化,种质退化,养殖品种的性状亟待得到改良。只有对养殖品种的遗传物质基础有所了解,才可望为品种的改良提供可靠的理论依据。

随机扩增多态 DNA(RAPD)技术是 90 年代初发展起来的以 PCR 为基础的分子生物学技术<sup>[1,2]</sup>,实践证明是揭示物种遗传多样性的有效工具<sup>[3~8]</sup>。

本研究利用 RAPD 技术检测了天津两个不同水域的鲫鱼种群基因组 DNA 多态性,以期对鲫鱼品种的改良提供 DNA 分子水平上的依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

实验鱼取自天津市蓟县于桥水库和天津市西青区南河镇境内的独流碱河自然种群;样本大小为每种群随机取 10 尾。新鲜肝脏取出后置 -20℃ 备用。

#### 1.2 基因组 DNA 的提取

取 -20℃ 下冻存的肝脏 0.2 g 于液氮中研成粉末,加 DNA 提取液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 75 mmol/L NaCl, 0.5% SDS, 5 mmol/L EDTA),于 65℃ 保温后,酚-氯仿抽提,乙醇沉淀,溶于适量的 TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol/L

EDTA)中,再经 RNase 及蛋白酶 K 处理,置冰箱备用。

#### 1.3 PCR 扩增

RAPD 反应基本条件:PCR 反应体系为 25 μl,其中 Tris-HCl 10 mmol/L, pH 8.3, KCl 50 mmol/L, 引物(香港大学孙梅博士惠赠)0.3 μmol/L, dNTP(上海生物工程公司)各 200 μmol/L, MgCl<sub>2</sub> 2.0 mmol/L, 基因组 DNA 20~40 ng, DNA 聚合酶(北京高登沃德生物制品有限公司)1.5 U/taq。

DNA 扩增采用 Progene PCR 循环仪(英国 Techne 公司)。扩增反应条件为:97℃ 预变性 5 min,前 8 个循环 94℃ 变性 1 min, 36℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min,后 32 个循环为 94℃ 变性 30 s, 36℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min,后 72℃ 再延伸 8 min。PCR 产物用 1.8% 琼脂糖凝胶电泳分离(0.5 × TBE, 3V/cm 恒压),溴化乙啶染色,紫外透射仪观察和拍照。

#### 1.4 数据分析

根据 Nei 等人的相似率分析公式进行相似率(S)分析<sup>[9]</sup>: $S = 2N_{ab} / (N_a + N_b) \times 100\%$

$N_a$  和  $N_b$  分别为 a、b 两个个体或种群拥有的 RAPD 标记数; $N_{ab}$  为 a、b 两个个体或种群共同拥有的 RAPD 标记数。

任意两个个体或种群间的遗传距离(P)根据其相似率来计算<sup>[3]</sup>: $P = 1 - S$

收稿日期:1998-09-29

\* 天津农学院水产系教师,现南开大学生物系研究生

## 2 结果和讨论

### 2.1 RAPD 的扩增结果

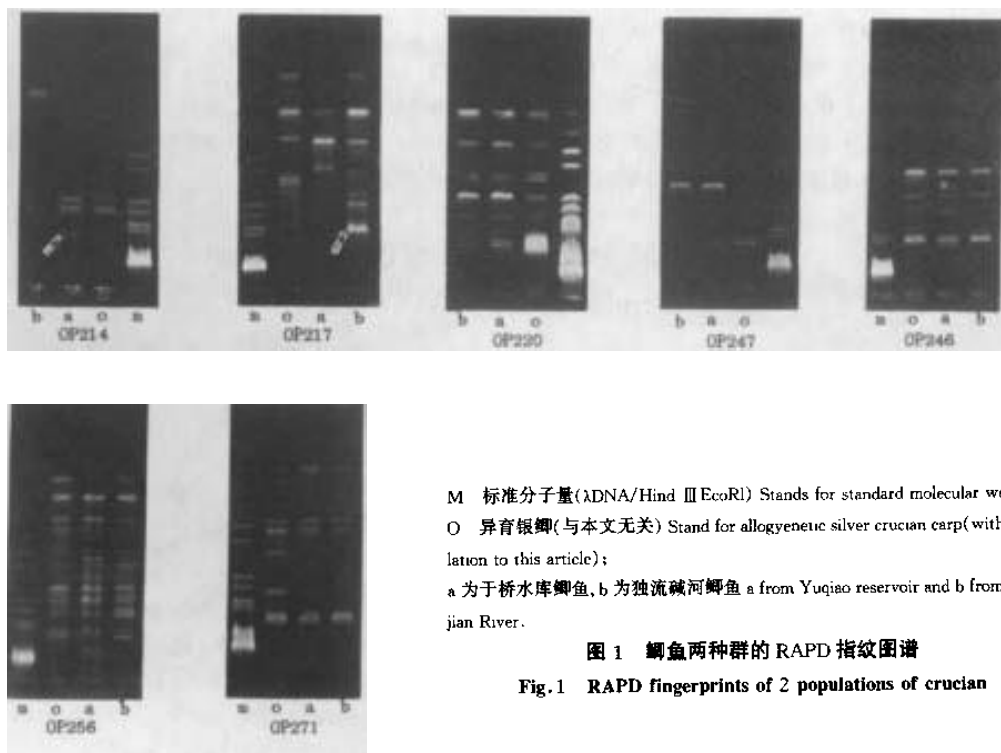
本研究采用 100 个 10 bp 的随机引物对两水域

鲫鱼的基因组 DNA 进行扩增, 其中 45 个引物得出清晰、可重复的带型, 并用于数据分析。实验中, 单个 10 bp 的引物扩增出的 RAPD 标记数在 1~12 之间(表 1), 片段大小为 300~2 600 bp。

表 1 随机引物序列及扩增结果

Table 1 Random oligonucleotide primer sequences and results of amplification

| 引物<br>primer | 序列(5'-3')<br>sequence(5'-3') | 扩增带数<br>numbers of band | 引物<br>primer | 序列(5'-3')<br>sequence(5'-3') | 扩增带数<br>numbers of band | 引物<br>primer | 序列(5'-3')<br>sequence(5'-3') | 扩增带数<br>numbers of band |
|--------------|------------------------------|-------------------------|--------------|------------------------------|-------------------------|--------------|------------------------------|-------------------------|
| OP204        | TTCGGGCGT                    | 1                       | OP221        | CCCGTCAATA                   | 2                       | OP257        | CGTCACCGTT                   | 8                       |
| OP206        | GAGGACGTCC                   | 4-6                     | OP222        | AAGCCTCCCC                   | 4-5                     | OP262        | CGCCCCCAGT                   | 6-7                     |
| OP207        | CATATCAGGG                   | 5                       | OP223        | GATCCATTGC                   | 3                       | OP266        | CCACTCACCG                   | 1                       |
| OP208        | ACGGCCGACC                   | 4                       | OP229        | CCACCCAGAG                   | 6-7                     | OP268        | AGGCCGTTA                    | 8                       |
| OP210        | GCACCGAGAG                   | 7-10                    | OP231        | AGGGAGTTCC                   | 10-11                   | OP270        | TCCGCGCGGG                   | 5                       |
| OP211        | GAAGCGGAT                    | 9                       | OP232        | CGGTGACATC                   | 5-6                     | OP271        | GCCATCAAGA                   | 5-6                     |
| OP212        | GCTGCGTGAC                   | 6                       | OP234        | TCCACGGACG                   | 5-6                     | OP274        | GTTCCCGAGT                   | 3                       |
| OP213        | CAGCGAACTA                   | 6-9                     | OP238        | CTGTCCAGCA                   | 6-9                     | OP275        | CCGGGCAAGC                   | 3                       |
| OP214        | CATGTGCTTG                   | 2-3                     | OP239        | CTGAAGCGGA                   | 5-6                     | OP276        | AGGATCAAGC                   | 5                       |
| OP215        | TCACACGTGC                   | 5-7                     | OP243        | GGGTGAACCG                   | 4                       | OP277        | AGGAAGGTGC                   | 4                       |
| OP216        | CATAGACTCC                   | 4-5                     | OP246        | TATGGTCCGG                   | 6-7                     | OP285        | GGGCGCCTAG                   | 5-8                     |
| OP217        | ACAGGTAGAC                   | 4-8                     | OP247        | TACCAGCGGA                   | 2-3                     | OP286        | CGGAGCCGGC                   | 3                       |
| OP218        | CTCAGCCAG                    | 1                       | OP248        | GAGTAAGCGG                   | 4                       | OP292        | AAACAGCCCG                   | 3                       |
| OP219        | GTCACCTCAG                   | 2                       | OP253        | CCGTGCAGTA                   | 2                       | OP296        | CGCTGGGAG                    | 4                       |
| OP220        | GTCGATGTCG                   | 7-9                     | OP256        | TGCAGTCGAA                   | 10-12                   | OP298        | CCGTACGGAC                   | 3                       |



M 标准分子量(ADNA/Hind III EcoRI) Stands for standard molecular weight;  
O 异育银鲫(与本文无关) Stand for allogeneitic silver crucian carp(without relation to this article);  
a 为于桥水库鲫鱼, b 为独流碱河鲫鱼 a from Yuqiao reservoir and b from Duliujian River.

图 1 鲫鱼两种群的 RAPD 指纹图谱

Fig.1 RAPD fingerprints of 2 populations of crucian

45个引物在上述两种群鲫鱼的基因组DNA扩增中分别扩增出229和218条带,平均每个引物提供的标记为5.1和4.8个。本研究中,单个引物提供的RAPD标记数与在其它鱼类的研究相当<sup>[6]</sup>,也与基因组大小与此相当的植物相当,本研究同样说明了RAPD引物所提供的标记数,主要与基因组的大小有关<sup>[10]</sup>。图1列举了几个引物在鲫鱼两种群间基因组DNA扩增产物的电泳带型。本研究中得到了一些种群特异性的RAPD标记(如图1中箭头所示)。种群特异性的分子标记,对于品种或种群的识别、遗传资源的研究都具有重要的应用价值。

## 2.2 种群的遗传多样性分析

45个引物中有22个引物的扩增产物电泳带型在种群间无变化,23个引物扩增产物的电泳带型表现出多态性,但其差异也较小。在两种群平均检测到的223个标记中,有188个标记在两种群间表现为单型性,统计分析得出:两种群间RAPD标记的 $S=84.2\%$ , $P=0.158$ ,而于桥水库和独流碱河种群内的 $S$ 值分别为94.3%和93.5%, $P$ 值为0.057和0.065。随机扩增多态DNA片面相似率的高低从一个方面反映了生物遗传多样性的高低,而遗传距离反映了生物间亲缘关系的远近程度。本研究结果显示:鲫鱼种群内的遗传多样性低,而种群间的遗传物质的差异高于种群内,提示我们在品种改良时可从不同的水域种群中寻找有用的基因。同时,通过分子标记技术并辅以适当的统计分析,根据遗传距离可预测杂种优势,提高亲本的选择效率,加速育种进

程,利用分子标记差异预测杂种优势,在作物中已取得可喜进展<sup>[11]</sup>,但在鱼类育种研究中应用相对较少<sup>[10]</sup>。

## 参 考 文 献

- 1 John Welsh, Micheal McClelland. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(24): 7 213 ~ 7 218
- 2 John G K Williams, Anne R Kubelik, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(22): 6 531 ~ 6 535
- 3 兰 宏, 张文艳, 等. 滇金丝猴的随机扩增多态DNA与遗传多样性分析. *中国科学(C辑)*, 1996, 26(3): 244 ~ 249
- 4 刘必谦, 戴继勋, 等. RAPD标记在大连湾牡蛎种群研究中的应用. *青岛海洋大学学报*, 1998, 28(1): 82 ~ 87
- 5 李宽钰, 黄敏仁, 等. 青杨的DNA多态性及遗传分化-I. 青杨的DNA多态性. *科学通报*, 1997, 42(9): 969 ~ 972
- 6 章怀云, 刘荣宗, 等. 草鱼和鲤鱼体遗传变异的RAPD指纹分析. *水生生物学报*, 1998, 22(2): 168 ~ 173
- 7 Bardacki F, Skibinski D O F. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity*, 1994, 73 (2): 117 ~ 123
- 8 Caetano - Anolles G. Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. *PCR Methods and Application*, 1993, 3: 85 ~ 94
- 9 Masatoshi Nei, Wen - Hsiung Li. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci*, 1979, 76(10): 5 269 ~ 5 273
- 10 陈 洪, 杨 靖, 等. RAPD技术在异精激发方正银鱼比较研究中的应用. *科学通报*, 1994, 39(7): 661 ~ 663
- 11 Waugh R, Powell W. Using RAPD markers for crop improvement. *Tibech*, 1992, 10: 186 ~ 191

## Analysis of genetic diversity of crucian populations using RAPD markers

Wang Xiaomei Song Wenqin Li Xiulan Chen Ruiyang

(Department of Biology, Nankai University, Tianjin 300071)

**Abstract** Intra- and inter-population genetic diversity of crucian (*Carassius auratus*) from 2 areas (Yuqiao Reservoir and Duliujian River) were detected using RAPD technique. The genomic DNA of each population of crucian was amplified with 45 primers of 10 bp. The statistical analysis based on RAPD patterns indicated that the inter-population genetic polymorphism was higher than that of intra-population. The inter-population similarity of RAPD bands was 84.2% and genetic distance was 0.158. However, the intra-population similarity of bands in the populations from Yuqiao Reservoir and Duliujian River were 94.3% and 93.5%, respectively, and the corresponding genetic distances were 0.057 and 0.065, respectively.

**Key words** RAPD, *Carassius auratus*, population, genetic diversity, similarity