

中国明对虾抗白斑综合症病毒分子标记的筛选

孟宪红¹, 孔杰¹, 刘萍¹, 马春艳², 李颖²

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国海洋大学, 山东 青岛 266003)

摘要:采用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术对经过连续 4 代选育的抗白斑综合症病毒 (WSSV) 中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) (XY₄) 及未经选育的与 XY₄ 来源相同的中国明对虾野生群体 (HB) 进行分析, 以期筛选出与抗病性状相关的分子遗传标记, 为进一步的基因定位以及中国对虾的种质资源保护和分子标记辅助育种提供有力的技术支撑和理论依据。共进行 220 个 RAPD 单引物和 114 对双引物的检测, 产生标记数目共计 2 439 个。依据标记在群体中出现的频率和变化规律, 共筛选出 5 个可能与抗病相关的特异性标记, 对这些特异性标记进行测序并将测序结果进行 BLAST 分析, 发现测得片段的序列与数据库中序列的相似性较低, 未能找到与所测序列同源性较高的功能基因。这与利用 AFLP 技术分析的结果一致。由于选育过程施加人工选择, 推论这些特异性标记虽不是抗 WSSV 分子标记, 但可能与抗病性状密切相关。

关键词:中国明对虾; RAPD; 白斑综合症病毒; 抗病群体; 分子标记

中图分类号: Q959.223 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2005)01-0014-06

对虾养殖是我国海水养殖业中最具代表性的产业, 在我国北方中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 是主要的对虾养殖种类, 而且中国明对虾养殖在我国沿海, 特别是长江以北各省市都有规模巨大的产业基础, 养殖面积和产量都曾经占有十分重要的地位。但由于过度捕捞、栖息地生态环境污染等因素, 中国对虾的自然资源在不断衰减, 尤其是 1993 年发生对虾爆发性流行病 (White Spot Syndrome Virus, WSSV, 白斑综合症病毒) 以来, 育苗和养殖的成活率都非常低, 养殖效益急转直下, 经济效益不足 67 元/亩*^[1-2], 中国对虾养殖业的生存和发展令人堪忧。因此, 优良品种和抗病力已成为对虾养殖业中迫切需要解决的问题。由于大多数经济动物的重要经济性状 (如生长、抗病等) 受许多数量基因座位 (QTL) 和环境因子的共同作用而表现出数量性状的遗传特点, 经典的遗传育种研究方法往往无法区别一个重要性状的产生是由哪一个具体的基因控制的。为了达到遗传改良的目的, 越来越多的科学家把目光投向筛选和建立有效的遗传标记上, 并取得了有意义的进展^[3-5]。国内仅见刘萍等^[6]曾报道过将中国对虾人工感染 WSSV 病毒 10 余天后,

选取仍健康的个体与已死亡或濒临死亡的个体作为对比分析材料, 以 RAPD 技术进行检测, 获得了片段大小在 460~2 305 bp 之间 18 条特异性片段, 但并未进行抗病相关性分析。本研究利用 RAPD 技术对经过累 4 代选育的抗 WSSV 中国对虾及未经过选育的中国对虾进行分析, 以期筛选出与抗病性状相关的分子遗传标记, 为进一步的基因定位、建立连锁图谱以及中国对虾的种质资源保护和分子标记辅助育种技术提供有力的技术支撑和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

以 1998 年 4 月 23 日捕自山东威海外海 (123°E, 37°N) 附近海域的 230 尾中国明对虾作为选育对象 (HB), 连续 4 年从对虾养殖池中选留染病后仍存活的个体作为亲虾进行选育, 经过生产规模的苗种培育繁殖后代, 先后获得 4 代选育群体 (XY₁, XY₂, XY₃, XY₄)。在同等感染条件下, XY₄ 成活率达到 80%, 而未经选育对虾的成活率仅为 10%; 而且在发病的高峰季节, 这些选育群体显示出良好的抗病性, 表明该群体具有明显的抗 WSSV 特性^[7]。随机

收稿日期: 2004-03-29; 修订日期: 2004-08-30。

基金项目: 国家“863”高技术研究发展计划项目 (2003AA603021); 国家重点基础研究发展规划项目 (G1999012007); 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室开放课题 (2002-07)。

作者简介: 孟宪红 (1974-), 女, 助理研究员, 硕士, 主要从事海洋生物分子生物学研究。E-mail: mengxh@ysfri.ac.cn

* 亩为废止单位: 1 hm² = 15 亩

选取XY₄(选育组)和HB(对照组)各20个个体(均为♀,消除性别差异),活体取样干冰储运实验室后于超低温冰柜(-80℃)保存备用。实验所用系列随机引物购自上海生物工程公司,仪器为Gene公司的PTC-200型PCR仪;其他生化试剂购自Promega公司。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA的制备 参考《分子克隆实验指南》^[8]提取DNA。于尾部取肌肉100mg左右,研钵中充分研磨,加入500μL抽提缓冲液(100mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 10mmol/L EDTA, pH 8.0),再加入终浓度分别为0.5%的SDS和200μg/mL的蛋白酶K,55℃水浴消化,每10分钟缓摇一次,3h消化完全,溶液澄清,冷却后经酚、酚与氯仿混合液(体积比1:1)、氯仿各抽提1遍后,2倍体积冰乙醇沉淀DNA,70%乙醇洗涤,晾干后用适量双蒸水溶解,65℃灭活10min后,-4℃保存备用。DNA浓度通过紫外分光光度计和电泳-EB染色的荧光强度双重测定,依据定量结果将DNA母液用TE(10mmol/L Tris-HCl, pH 7.6; 0.1mmol/L EDTA, pH 8.0)稀释成10ng/μL,分别将对照组和选育组的20个个体等量混合,制成浓度仍为10ng/μL的对照组和选育组混合模板DNA,-20℃保存备用。

1.2.2 RAPD反应 条件与孟宪红等^[9]的报道基本相似。整个反应体系包括50mmol/L KCl, 10mmol/L Tris-HCl, pH 9.0; Triton-X100 0.1%; 2.0mmol/L MgCl₂; 0.1mmol/L dNTPs; 0.2μmol/L引物(若使用双引物,则引物分别为0.2μmol/L^[10]), 20ng混合基因组DNA, 1U Taq DNA聚合酶,总反应体积为25μL。RAPD反应过程为:94℃预变性5min后进入45个PCR循环(每个循环包括94℃ 1min, 37℃ 1min, 72℃ 2min)最后72℃充分延伸10min。RAPD反应结束后4℃保存,每次反应均设置不含模板DNA的空白对照。

1.2.3 RAPD产物的分离鉴定 取5μL RAPD反应产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳分离,EB染色,在凝胶成像系统(Gel Doc 1000)中观察并记录。通过对每个(对)RAPD引物所扩增产物的比对分析,进行下列筛选:①选出选育组与对照组存在差异片段的引物;②由于使用的模板为每组20个个体的混和模板,还需选出二群体对应扩增片段有明显的强弱之分的引物。使用上述2种方法筛选出的引物分别

做二群体的共40个个体的RAPD,进一步确认并统计差异片段在各群体中出现的频率及片段长度。

1.2.4 特异片段的回收、测序 回收上述特异性片段,取适量回收产物做模板,以原引物对其进行二次扩增,RAPD反应体系与前面相同,反应程序改为25个循环,用1.5%琼脂糖凝胶电泳分离,EB染色,检验回收片段是否为目的片段,并将此二次扩增的产物纯化,要求其特异性及产量必须满足克隆、测序的要求,否则重复此步骤。克隆、测序,将测得的序列于NCBI中进行BLAST分析。

2 结果

共进行了220个RAPD单引物和114对双引物的检测,产生标记数目共计2439个。依据标记在群体中出现的频率和变化规律,共筛选出5个特异性遗传标记(表1),约占总标记数的0.2%。BLAST分析结果发现测得片段的序列与数据库中序列的相似性较低,未能找到与所测序列同源性较高的功能基因。图1显示S144引物在二群体中扩增结果及特异性标记回收情况。

3 讨论

在世界范围内已经陆续开展南美白对虾(*Penaeus vannamei*)、蓝对虾(*Penaeus stylirostris*)、日本对虾(*Penaeus japonicus*)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)和中国对虾(*Penaeus chinensis*)等主要养殖种类的品种选育^[3-5],采用的技术主要以经典的选择育种技术和现代分子生物技术的有机结合。美国从20世纪90年代开始将分子标记技术应用到虾类的良种培育上,目前已培育出无特异病原健康虾(Specific Pathogen Free, SPF)^[3-4],使美国的养虾业在全球普遍下滑的情况下仍能保持健康发展。在SPF对虾培育的基础上,夏威夷海洋研究所对凡纳对虾开始实施遗传改良计划,到1998年已建立起两个品系。中国对虾是我国重要的经济种类和海水增养殖品种,在世界水产养殖业中占有举足轻重的地位。但是在近十年的养殖生产中,养殖对虾病害肆虐、养殖环境恶化等问题变得越来越突出,成为制约我国对虾养殖业发展的重要因素。将传统的选择育种结合分子生物学技术手段,筛选与抗病相关的分子遗传标记并应用于中国对虾的选择育种,可以加快选育进度,为中国对虾良种选育提供理论依据。

表 1 5 个特异性标记在中国明对虾自然群体(HB)和第四代选育群体(NY)中的基本信息

[illegible]

(15) (continued)

續表 Tab. 1 continued

引物名称 Primer	引物序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	标记名称 Marker name	标记大小 Marker length	群体中出现频率 Genetic frequency	HB	XY ₂
SI19/ SI46**	CTGACCAAGC/ AAGACCCCTC	SI19&146- 1300	1 300 bp	50	90	CGTGGGTATAATGTAATGGGAACCGAGATCTCTTTTCTAGTTTCAGGATACAGCAATGAGGGGAAGG CGTGGTTTCGGACGACCGGAGATTGTGGAGTTCCACAGCCGCTAAATACACGATCAAAATCCCATCAACA TGTTTGGCGACGGATGGCATGCACTTGCTAGGACAAGAGTGGGACAGACCTTGAGACGCTTGGAGGCTGT TAGCACGAGGGGGAGGAATACAAATATATACATTAACCTTATATCTCTTTTAAATTAACACATAT GAAGAATAAATCAATTACAAAGAAATTCATGCTCAGAGTTGAACTTCACTACTACACGAGAGGTTGACAGCA TAAACATGAAAAAANGTTGGAGACAGATGGAATGATGATTCAGATTTTGACCTATCCCTGTGTAAAAACA AAATACAACTACTAGATAAAATGGAGACTGTAGGGAGATTCACCTTTTGGCTGAGCCATATTTTGGCTCATA CACAAATGATCCCAACTGTGTAGATATCACAGACAAAAAAAATATACAAAGTCTCTTACAACTACCTGCTC TCTGAAATTCACATATATCCATCTACACAAACAGACAGTAAAGTTGATATATGGTCAGAGAGAACTGGGAA GTGTTGAAAGTTACAGGATATTTTCAGTTCTTATTTGAGTGTCTTCCCTTCATATATACATCTGCTGCTAG TTCTAACCACTGCAATAATATAAATCTCAACAGAAATGATGCTCTGTGAGGCGGCTTTTGTCTTTAAT GCCCTACTCTTACCTTTTGGGGCTTTGTTTATATATGAGCTAGGCAAGGTTTCTATTTTCTTCAATTC TCAATATTCAAACTTGCATTTTACTATTTTAAATGACTCCGCTTATATATACGAGTTACTGTATGACCAAA CCTATATTGGTAGGATTCGGCTAACCTGCTTGGCTCACTATCCAAAACTTGTGTGATTTTATATTAGT TTTGTAAGGTAATGATGTTTGTGTTTCTGTAATGTAATCACTATGCTATTTGGCTAGGTTCACTTTCCG TATCTTANGTATTATATCAAAATGTTTAAATATATACATCAACAGCTTGATATATCTTTGGAAATTTGCTCT CGTTCTTTAACTTCAATGAGATGCTCAATGATCACTCAGAAACCTCTCAATCTTGGCTAATGCTGATCTCCCA GTTTGAATCACTAGTGGGCGG
SI19/ SI57**	CTGACCAAGC/ CTACTGAGT	SI19&157- 1350	1 350 bp	0	45	GGGATCGACCAAGCTAATGTTATTTAAAAAATCACTTCAACAGATGTATGTACCTGCTGATGAGTTGCTCTG GGTTTATATTTTCACTATATATCTACGCTCAGATTAATCTTGTCTTTACCTAATTCAGGCTTGACTGTGA GCATCTCAGCTTTTGTGTCTCATTTTAGGCTTACATTAAGCTTTTCTCATTCAGTGCTTTATACCTTA TTTTTGTGTTGTGCTGCTGAAGAGAACAGTATCACTGAGCAATGAACATTTGCTTAAMCTCATCTGCTC TTTTCTCCAGTCTAGTATCTTAACGTTTCTTTAATTAGTTGAACGTTTGTGATGAATGATGCTGCTG ATGGTTGAATATTTTCAACATCTACACAGATCTCTGACGCTTCTATAAATCTCTTAATCTAGAT TATATATCAGACGCTGCTACATAGAGTTTCTGTTATGTTTATTTCTCCCTATTTGGTTAGTTGCTG ATATGATCTGTTCTGAGCACTAACGGGCAAACTATATCTTAACTGCTGAGGTGAACCTGCTGACCGGC GACGACTTTGTAAACCTTTATGAATACTGCTCAGGAACTTAATGTTGCTTATTTGCTCAACCTTTTGAAT TCCATATTGGTGGATTAATAATTACTGTTGCACTCTTGGGCGGTAAAGAGTTGCTTAAAGACCTGACTAGT TTTACTGTGGAGTAAATCTACCTGATGCACTCTCTGACATTTTCCCGGTTTTCATGCTCTTAGTGAAAC TGTTTATTACTTGTATGATGCTCATATTAACTATGCTCCCGGAATTAATGTTGCTGCTCCCGGTAGTTT GGTGAATTTTGTACATACAGATGCTCCACATGTGCTACGAGCTTAACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG GATCTGATTTTCCATCTGTAATTTGGGGAACCTGTTTCTTATTAACATTTGCTATGATCTGTTAT TATATTTGATGATGATTAATTAATTTGTCATTAATATCTTAAATGATTTAGCAATGAATGATCAAAAGACCTTTC CTAAGTGAAGGAAGGGTAAACAGTGAATAGATAGTATGCTGATAACTGGCTATTTGTGTGATTAAGACCTTTC TAGAGGCTATCTATGTGTAATCAATTAAGCTGTTATGCTGATGCTGATGCTGATGCTGCTGCTGCTGCTG GCGAATGGGTTAATGTTGAATTTCTGCTTGGCTGCTGAGTAATCACTAGTGGGCGGCTGAGGCTGAGCAAT

注: * 单引物编号; ** 为双引物组合; H# 为未经选育的自然群体编号; XY 为第 4 代人工选育抗病群体。

Note: * the single primer, ** the combination of double primers. HII is the natural population without selected breeding while XY₄ is the selected breeding population.

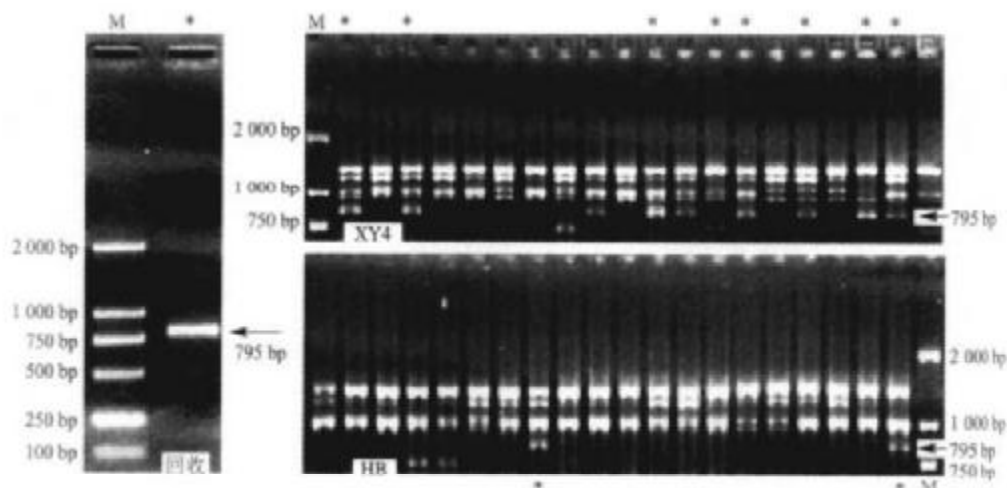


图1 引物 SI44 在选育群体(XY₄)和对照群体(HB)中扩增结果以及特异性标记的回收

"XY₄"及"HB"图谱中"※"指示泳道为含特异性标记个体扩增图谱,可以发现 XY₄检测的 20 个个体中有 9 个个体均有一条 795bp 特异性片段,而 HB 中仅有 2 个个体含有此片段;"回收"图谱中"※"指示泳道为特异性标记回收图谱,"M"为 DL2000 DNA 分子量指示标记。

Fig.1 RAPD fragments of XY₄ and HB population of *Fenneropenaeus chinensis* amplified by primer SI44 and the special marker's recycle

The symbol "※" in XY₄ and HB shows the individual patterns involve special marker. 9 of 20 individuals in XY₄ population while only 2 of 20 in HB population have special markers weighed 795 bp.

The symbol "※" in "recycle" shows the special marker recycled. "M" is the DL2000 DNA ladder.

本研究利用 RAPD 技术检测并克隆测序了中国对虾 5 个抗病相关分子标记,将这些序列进行 BLAST 分析时未发现与其相似性较高的功能基因。这与 Yue Zhiqin 等^[1]利用 AFLP 技术对 XY₁、XY₂、XY₃和 XY₄群体进行检测所得结论相同。AFLP 检测时使用 7 个 *Eco*R I / *Mse* I 引物组合,每一选育群体随机选取 12 个个体共 48 个个体进行 PCR 扩增、PAGE-银染检测,共产生 350 个扩增位点,根据这些位点的基因频率变化情况,筛选到 8 个特异性分子标记(大小在 63~209 bp)并克隆测序,对这些序列进行 BLAST 分析时也未发现与其相似性较高的功能基因。本研究所用的选育材料(XY₄)是经过传统的个体选择的方法获得的,即每一代选取抗病性强的个体(选择系数为 1%~3%)作为亲本繁衍子代,通过病毒感染实验表明选育的中国对虾的抗病性比未经选育的对照组增强^[7]。根据群体遗传学理论,选择会使受选择压力的基因型频率发生变化;对于定向选择,选择压力主要作用于与目标性状相关联的位点。已有学者研究发现,当选育群体与对照群体的遗传结构虽然未发生明显变化,但是

由于人工选择造成的^[11-13]。可以推论,对于已找到的特异性分子标记进行 BLAST 分析时虽未发现与其相似性较高的功能基因,但由于人工选择的作用,这些特异性标记可能与抗病性状密切相关。本研究共获得 2 439 个标记,仅有约 0.2% 标记频率发生了变化,这说明,本研究所进行的抗病群体选育潜力还很大,可以继续保持已有的有效选育方案,最终保证选种育种工作的成功。

参考文献:

- [1] 邓景耀,叶昌臣,刘永昌. 渤海湾的对虾及其资源管理[M]. 北京:海洋出版社,1990,36~164.
- [2] 邓景耀,庄志强. 渤海对虾补充量变动原因的分析及对策研究[J]. 中国水产科学,2001,7(4):125~128.
- [3] Proeder G D, Brown C L, Sweeney J N, et al. High health shrimp systems: seed supply theory and practice. In: CL Browdy and JS Hopkins (Editors), *Swimming Through Troubled Waters*, Proceedings of the special session on shrimp farming[M], 1~4.

[1] Yue Zhiqin, Wang Weiji, Kong Jie, et al. Isolation, cloning and sequencing of AFLP markers related to disease-resistance trait in *Fenneropenaeus chinensis*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica* (in printing).

- February, CA: World Aquaculture Society, LA: Baton Rouge, 1995, 40-52.
- [4] Wyban J A, Swingle J S, Sweeney J N, et al. Specific pathogen-free *Penaeus vannamei* [J]. World Aquaculture, 1995, 24: 39-45.
- [5] Carr W, Sweeney J, Swingle J. The Oceanic Institute's SPF shrimp breeding program status [A]. USMSFP (US Marine Shrimp Farming Program) 10th Anniversary Review [C], GCRL: Special Publication, 1994, 47-54.
- [6] 刘萍, 孟宪红, 孔杰, 等. 对虾抗病性状遗传标记的 RAPD 分析[J]. 水产学报, 2002, 26(3): 268-274.
- [7] 张庆文, 刘萍, 王伟雄, 等. 中国对虾抗病群体选育的初步研究[J]. 海洋水产研究, 2002, 23(2): 53-57.
- [8] 萨姆布鲁克, EF 费里奇, 丁曼尼阿蒂斯(金冬雁, 黎孟枫等译). 分子克隆实验指南(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 1996, 464-468.
- [9] 孟宪红, 孔杰, 庄志猛, 等. 真鲷野生种群和人工繁殖群体遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 生物多样性, 2000, 8(3): 248-252.
- [10] 孟宪红, 孔杰, 刘萍. "高效 RAPD" 技术的初步研究及其 PAGE 检测[J]. 海洋水产研究, 2004, 25(2): 13-17.
- [11] Kappe A L, Zande L V D, Vedder E J, et al. Genetic variation in *phoca vitulina* revealed by DNA fingerprinting and RAPD[J]. Heredity, 1995, 74: 647-653.
- [12] English L J, Nell J A, Maguire G B, et al. Allozyme variation in the three generations of whole weight in Sydney rock oysters (*Saccostrea gomerata*) [J]. Aquaculture, 2001, 193: 213-225.
- [13] Liu Z, Nichols A, Li P, et al. Inheritance and usefulness of AFLP markers in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), blue catfish (*I. fuscus*), and their F_1 , F_2 , and backcross hybrids [J]. Molecular and General Genetics, 1998, 258: 260-268.

Screen of white-spot-syndrom-virus(WSSV)-resistance molecular markers in *Fenneropenaeus chinensis*

MENG Xian-hong¹, KONG Jie¹, LIU Ping¹, MA Chun-yan², LI Ying²

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique was applied to investigate the WSSV-resistance molecular markers of *Fenneropenaeus chinensis* based on the samples after four-generation-selected breeding successively (XY₄) and samples of the same origin without selected breeding (HB) in order to supply the theory and technology supports for the protection of *Fenneropenaeus chinensis* germplasm resource and molecular-marker-assistant breeding. 220 single random primers and 114 pair of primers were used and a total of 2 439 reproducible RAPD markers were obtained in which 5 were special according to the band frequency and variety rule appeared in the samples. The 5 special genetic markers were sequenced and BLAST analysis showed no high similarity to the published function genes, and the same low similarities were revealed by the Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP) technique based on the four selective breeding generation samples of *Fenneropenaeus chinensis*. Due to artificial selection, it was indicated that these special markers were tightly linked to WSSV-resistance trait but were not functional genes.

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; RAPD; WSSV; disease-resistance population; molecular marker

* This study was supported by grants from the National Basic Research Priorities Program (973) (G1999012007), the National High-Tech Research and Development Program of China (863) (2003AA603021) and the Program of the Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, P. R. China (2002-07).