

斑马鱼微卫星分子标记检测鲤鱼种间多态性

全迎春^{1,2}, 梁利群^{4,1}, 孙效文¹, 姚 昆³, 雷清泉⁴

(1. 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所 北方鱼类生物工程育种重点开放实验室, 黑龙江 哈尔滨 150070; 2. 上海水产大学 生命科学与技术学院, 上海 200090; 3. 东北农业大学 生物技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 4. 哈尔滨理工大学, 黑龙江 哈尔滨 150080)

摘要:用6 072对斑马鱼(*Danio rerio*)微卫星引物对黑龙江鲤(*Cyprinus carpio haematopterus* Temminck et Schlegel)、荷包红鲤(*Cyprinus carpio* var. *wuyuanensis*)和柏氏鲤(*Cyprinus pellegrini* Tchang)进行种间遗传差异分析,共发现563个斑马鱼微卫星标记在鲤鱼种间表现出多态性。从中随机抽选25个标记,对斑马鱼和3种鲤鱼的遗传多样性进行分析,使用Phylip3.63软件按照Nei氏标准遗传距离计算种间遗传距离,再用MEGA3.0软件绘制NJ系统发生树,并进行1000次bootstrap检验系统树。结果显示,黑龙江鲤与荷包红鲤首先聚类,然后是柏氏鲤、斑马鱼。这些具有多态性的斑马鱼微卫星标记可用于鲤鱼种间种质鉴定,同时,借用模式生物斑马鱼的丰富遗传标记资源,增加同科的鲤鱼遗传连锁图谱上遗传标记的密度,必将对鲤鱼遗传育种进入分子育种时代起到促进作用。[中国水产科学,2006,13(2):300-304]

关键词:微卫星;斑马鱼;鲤鱼;种间多态性;分子标记

中图分类号:Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2006)02-0300-05

微卫星是当今世界应用最广的几大分子标记之一^[1]。国内外均有微卫星分子标记研究的报道^[2-7]。但鲤鱼(*Cyprinus carpio*)作为中国的主养经济鱼类,其基础研究与发达国家在模式生物、鲑科鱼类方面的研究相比较,还存在一定的差距,其标记数量不足以开展分子育种,且研究技术手段仍需进一步完善。孙效文等^[5]曾借用模式生物斑马鱼的微卫星标记,用于建立鲤鱼遗传连锁图谱,该图谱虽已初具雏形^[4],但离构建一个高密度、应用性较强的图谱还有一段距离。对于微卫星标记缺乏时常有借用近缘物种微卫星标记的研究报道。杨渊^[8]利用5对牛微卫星引物和10对绵羊微卫星引物分析5个山羊品种的遗传多样性,梁利群等^[9]用鳊微卫星标记分析乌苏里江哲罗鱼遗传多样性。

斑马鱼(*Danio rerio*)是人类基因组计划的模式生物之一,国内外各方面的研究成果较多,在细胞和分子水平方面已经进行了大量的研究工作,拥有较完善的数据库资源。黑龙江鲤(*Cyprinus carpio haematopterus* Temminck et Schlegel)、荷包红鲤(*Cyprinus carpio* var. *wuyuanensis*)和柏氏鲤

(*Cyprinus pellegrini* Tchang)与斑马鱼在系统分类上同属鲤形目,鲤科。借用斑马鱼已有的分子标记作为鲤鱼的微卫星分子标记可以大大增加鲤鱼的分子标记数量,也是获得更多遗传标记的捷径之一。另外,采用近缘物种的微卫星引物,能使微卫星分子标记在相近物种间基因组比较图谱研究上得以应用^[10]。本研究使用斑马鱼的微卫星引物对黑龙江鲤、荷包红鲤和柏氏鲤进行分析,并采用Phylip3.63软件包估算数据,MEGA3.0绘制系统发生树,旨在为进一步开展鲤鱼与斑马鱼的比较基因组研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼 黑龙江鲤采自松花江抚远江段,荷包红鲤采自江西婺源,柏氏鲤采自云南江川养殖场,斑马鱼采自黑龙江水产研究所。

1.1.2 试剂 斑马鱼微卫星引物购自美国Research Genetics公司,序列来自美国哈佛大学儿童医院斑马鱼研究中心,相关资料可检索哈佛大学斑马

收稿日期:2005-07-06; 修订日期:2005-09-08.

基金项目:中国水产科学研究院基金项目(2003-2-1).

作者简介:全迎春(1981-),女,专业方向为水产动物遗传与育种. E-mail:quan_928@163.com

通讯作者:梁利群. Tel: 0451-84861314. E-mail: liq-1019@163.com

鱼网页(<http://zebrafish.mgh.harvard.edu/>)。

1.1.3 仪器 PCR反应所用DNA扩增仪为ABI公司9700型扩增仪,离心机为BECKMAN GS-15R型离心机。

1.2 方法

1.2.1 高分子量基因组DNA的提取和纯化 黑龙江鲤、荷包红鲤、柏氏鲤和斑马鱼各取5尾,剪取鳍条,加入裂解液(0.5%十二烷基肌氨酸钠;200 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蛋白酶K;0.5 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的EDTA),50℃消化,等体积的酚、氯仿、异戊醇混合液(体积比25:24:1)抽提2次。用不含DNA的RNA酶消化其中含有的RNA,再用上述混合液抽提2次。经数次透析(透析液:50 $\text{m mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris·Cl, pH 8.0;10 $\text{m mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, 10 $\text{m mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl),直到 $\text{OD}_{270} < 0.05$ 。加两倍体积的冰预冷的无水乙醇沉淀,离心除上清液,等体积冰预冷的70%乙醇洗涤,离心除上清液,室温干燥。用适量1/10 TE缓冲液溶解,置于4℃冰箱保存备用。

1.2.2 PCR反应程序 PCR扩增反应总体积为25 μL ,体系参见文献[11]。PCR反应程序为:预变性94℃,3 min。PCR循环程序为:变性94℃,30 s;退火54℃,30 s;延伸72℃,30 s;总计38个循环,最后72℃延伸5 min。

1.2.3 扩增产物检测 PCR扩增反应产物采用2%琼脂糖凝胶电泳检测,5 V/cm电泳2 h, Gold View染色,溴酚蓝为上样液,GDS 8000凝胶成像仪(UVP公司)记录电泳结果,1 Gel works软件包(3.0版本)分析每个扩增条带的分子量与产物量的差异性。

1.2.4 数据统计 根据琼脂糖凝胶电泳结果,统计4种鱼在各个微卫星位点等位基因频率,将基因频率数据输入Phylip3.63软件包,以标准Nei氏遗传距离公式,计算它们之间的遗传距离,并进行1000次bootstrap检验,最后用MEGA3.0绘制NJ(Neighbor-Joining, 邻近结合法)系统发生树。

标准Nei氏遗传距离公式: $D = -\ln I$;

遗传相似系数: $I = J_{xy} / \sqrt{J_x J_y}$;

其中, $J_x = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^k X_{ij}^2 / n$, $J_y = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^k Y_{ij}^2 / n$,

$$J_{xy} = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^k X_{ij} Y_{ij} / n。$$

式中, I 为两个群体间的相似系数, X_{ij} 、 Y_{ij} 分别为X、Y群体中第*r*个基因位点上第*k*个基因的频率,

n 为检测的基因位点数。

2 结果

用6072个斑马鱼微卫星分子标记对黑龙江鲤、荷包红鲤和柏氏鲤3个种群进行检测,结果显示,共有646对斑马鱼微卫星引物在鲤鱼种间扩增出特异条带,能产生多态性的引物563对。其中在黑龙江鲤中能扩增出多态性的有243对(43.16%),荷包红鲤中为304对(54.00%),柏氏鲤中为434对(77.09%);从总体6072对来看,能产生多态性条带的比率由大到小依次为柏氏鲤7.15%、荷包红鲤5.01%、黑龙江鲤4.00%,由于有些引物在几个种类中均能产生多态,合计仅为10.64%。扩增结果显示,斑马鱼微卫星引物在柏氏鲤中能较好地扩增出特异条带,荷包红鲤次之,黑龙江鲤次于上述2种。

从扩增出多态性的引物中随机抽取25对引物在黑龙江鲤、荷包红鲤、柏氏鲤和斑马鱼中进行PCR扩增,电泳结果见图1。统计其基因频率数据,Phylip3.63软件包计算得种间遗传距离(表1)。黑龙江鲤与荷包红鲤遗传距离最近,与柏氏鲤其次,与斑马鱼遗传距离最远。采用MEGA3软件绘制NJ系统发生树结果见图2。检验1000次bootstrap系统树的可靠性,结果显示,黑龙江鲤与荷包红鲤首先聚类,然后是柏氏鲤,最后聚类的是斑马鱼,bootstrap的自引导值在556~1000。

3 讨论

相近物种侧翼序列具有相当的同源性^[12],可作为种间比较研究的标记。近缘物种微卫星分子标记的研究报道较多,在哺乳动物方面,Moore等^[10]检测了48对牛微卫星引物在羊、马和人的多态性,结果绵羊27对(56%)扩增出特异条带,20对(42%)多态;马3对(6.2%)扩增出特异条带,无多态;人无特异条带,无多态。Sun等^[13]研究16对牛和猪微卫星引物,4对(25%)在人类中扩增出特异条带,2对(12.5%)有多态。在水产生物上,Alcivar-Warren^[14]从斑节对虾中分离出的10对微卫星引物,有3对(33.3%)可在凡纳滨对虾中扩增出等位基因。Mc Quown等^[15]用108对铲鲟(*Scaphirhynchus platyrhynchus* Rafinesque)引物在高首鲟(*Acipenser transmontanus* Richardsom)、湖鲟(*A. fulvescens* Rafinesque)和中吻鲟(*A. medirostris* Ayres)上扩

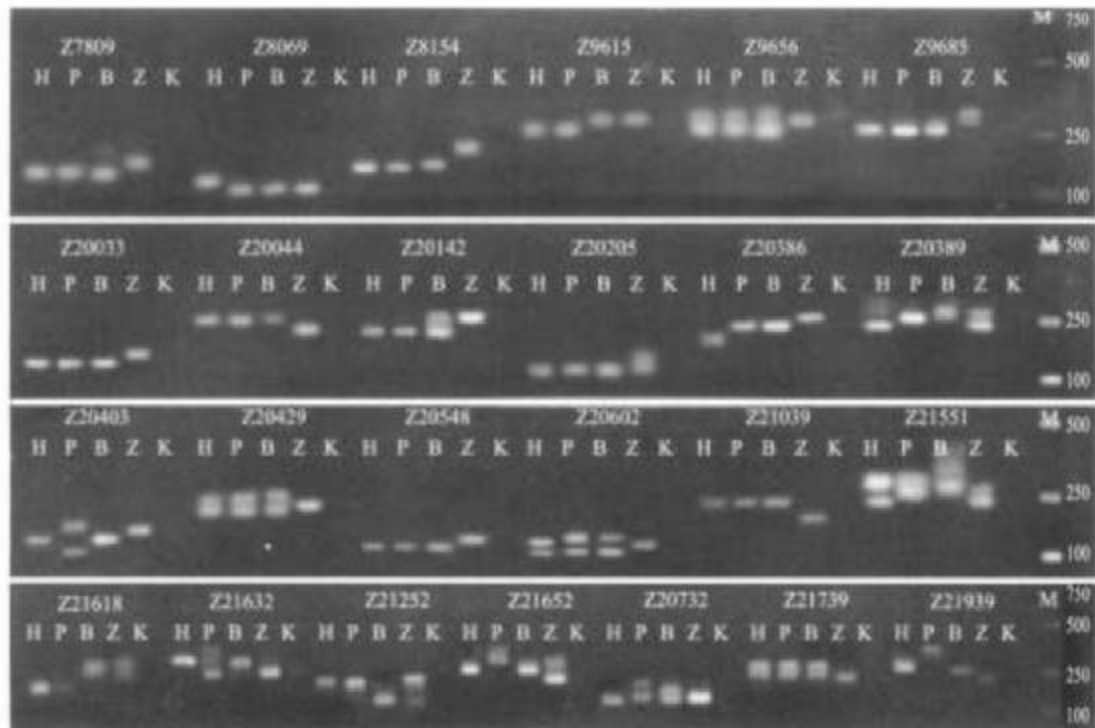


图1 斑马鱼微卫星分子标记检测鲤鱼种间遗传差异的琼脂糖凝胶电泳图
B: 柏氏鲤, H: 黑龙江鲤, K: 空白对照, M: DNA 标记, P: 荷包红鲤, Z: 斑马鱼, Z7809 等: 斑马鱼引物编号
Fig.1 The agarose gel electrophoresis graph of identification of genetic polymorphism among three species of common carp using *Danio rerio* microsatellite

B: *Cyprinus pellegrini pellegrini* Tchun, H: *Cyprinus carpio haematopterus* Temminck et Schlögel, K: Matched group, M: DNA marker, P: *Cyprinus carpio* var. *unyuwanensis*, Z: *Danio rerio*, molecular markers (such as Z7809); the symbols of *Danio rerio* microsatellite

表1 斑马鱼和3种鲤鱼间 Nei 氏遗传距离(左下角)与遗传相似系数(右上角)矩阵

Tab.1 Nei genetic distances matrix(lower-left triangle)and the genetic similarity index (upper-right triangle) of the three species of carps and *Danio rerio*

种类 Specie	Nei 氏遗传距离(D)与相似系数 Nei genetic distances and similarity index matrix			
黑龙江鲤 <i>Cyprinus carpio haematopterus</i> Temminck et Schlögel	0.00000000	0.867414379	0.793313098	0.181788137
荷包红鲤 <i>Cyprinus carpio</i> var. <i>unyuwanensis</i>	0.14223847	0.00000000	0.769244236	0.261968416
柏氏鲤 <i>Cyprinus pellegrini</i> Tchun	0.23153731	0.26234676	0.00000000	0.446439199
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	1.70491335	1.33953133	0.80645206	0.00000000

增,得到多态性条带的引物所占比例分别为:9.2%、22.2%和11%。邵昭君等^[16]用21对鲈鱼微卫星引物筛选出2对(9.5%)能在中华鲟(*Acipenser sinensis* Gray)中扩增出清晰条带的引物。本实验共计筛选了斑马鱼微卫星引物6072对,其中,能在鲤鱼种间扩增出特异条带的引物共计646对

(10.64%),表现出较明显多态性的563对(9.27%)引物,该结果与前人的研究结论基本相吻合。由于本实验采用了较大数量的微卫星引物,具有一定的可信度。在借用近缘物种的微卫星分子标记时,预期能扩增出多态性的引物数可以根据本实验的统计值推算,从而探讨实验的可行性。

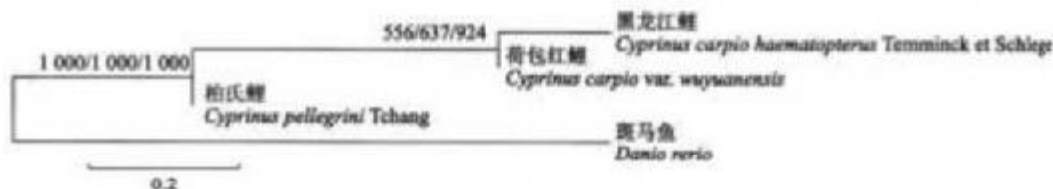


图2 斑马鱼与3种鲤鱼NJ聚类图

注:分支上的数值为最大似然法、UPGMA法和邻接法的1000次bootstrap检验的自引导值

Fig.2 NJ dendrogram of three species of common carps and *Danio rerio*

Note: The number above the branches are the bootstrap values using Maximum Likelihood method, UPGMA method or Neighbor-joining method of 1000 times bootstrapping

从理论上说,系统分类上相距越近的物种,微卫星引物在种间的适用性越高。因此,由5.41%(黑龙江鲤)、6.37%(荷包红鲤)和8.51%(柏氏鲤)的扩增比率可推出,柏氏鲤与斑马鱼同源性较黑龙江鲤和荷包红鲤高,而荷包红鲤与斑马鱼的同源性又较黑龙江鲤高。这与聚类分析的结果相符。在柏氏鲤中斑马鱼微卫星具有较高的适用性,这可能与二者的同源关系更近有关。柏氏鲤虽然与黑龙江鲤、荷包红鲤同属鲤科鲤属。但作为云南四大名鱼之一,柏氏鲤原产于江川,为星云湖特有种,因此黑龙江鲤与荷包红鲤首先聚类,而柏氏鲤后聚类,很可能与地理隔离有关。柏氏鲤与另2种鲤鱼基因型差异较大,且耐低温能力也较它们差,而斑马鱼属热带鱼,亦即柏氏鲤生活水温与斑马鱼更接近,由此推测二者可能亲缘关系较近,即较黑龙江鲤、荷包红鲤与斑马鱼的亲缘关系更近。对所建的系统树进行1000次bootstrap检验,结果证明该系统树基本符合这几种种群的发生史,自引导值不是很高,与所使用的样本容量大小有一定关系。

借用模式生物丰富的基因组资源,对养殖鱼类进行遗传连锁图谱的构建及种间遗传分析,开展与模式生物的比较基因组研究,是提高中国主养鱼类的分子遗传研究水平,缩小与发达国家在养殖鱼类基因组研究上的差距的一个行之有效的途径。

参考文献:

- [1] Goldstein D B. The use of Microsatellite variation to infer population structure and demographic history in a natural model system[J]. *Genetics*, 1999, 151: 791-801.
- [2] Aliah R S, Takagi M, Dong S, et al. Isolation and inheritance of microsatellite markers in the common carp *Cyprinus carpio* [J]. *Fish Sci*, 1999, 65(2): 235-239.
- [3] Crooijmans RPMA, Bierboom VAF, Komen J, et al. Identification of RAPD primers that reveal extensive polymorphism between laboratory strains of zebrafish[J]. *Genetics*, 1994, 119(1): 152-156.
- [4] 孙效文, 梁利群. 鲤鱼的遗传图谱(初报)[J]. *中国水产科学*, 2000, 7(1): 1-5.
- [5] 孙效文, 梁利群. 斑马鱼微卫星标记检测鲤鱼种间的遗传多态性[J]. *中国水产科学*, 2001, 8(2): 5-6, 43.
- [6] 魏东旺, 楼允东, 孙效文, 等. 鲤鱼微卫星分子标记的筛选[J]. *动物学研究*, 2001, 22(3): 238-241.
- [7] 杜长斌, 楼允东, 沈俊宝, 等. 微卫星分子标记在鱼类遗传连锁图谱构建中的应用[J]. *上海水产大学学报*, 2000, 9(3): 254-258.
- [8] 杨 圃. 利用微卫星标记分析五个中国地方山羊品种的遗传多样性[D]. 武汉: 华中农业大学畜牧兽医学院, 1999.
- [9] 梁利群, 常玉梅, 董崇智, 等. 微卫星 DNA 标记对乌苏里江哲罗鱼遗传多样性的分析[J]. *水产学报*, 2004, 28(3): 241-244.
- [10] Moore S S, Sargant L L, King T J, et al. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species[J]. *Genomics*, 1991, 10(3): 654-660.
- [11] 孙效文, 贾智英, 魏东旺, 等. 磁珠富集法与小片克隆法筛选鲤鱼微卫星的比较研究[J]. *中国水产科学*, 2005, 12(2): 192-196.
- [12] Dietz A B, Womack J E, Swarbrick P A, et al. Assignment of five polymorphic ovine microsatellites to bovine syntenic groups [J]. *Animal Genetic*, 1993, 24(6): 433-436.
- [13] Sun H S, Kirkpatrick B W. Exploiting dinucleotide microsatellites conserved among mammalian species[J]. *Mammal Genome*, 1996, 7(2): 128-132.
- [14] Xu Z, Dhar A K, Wyrzykowski J, et al. *Animal*[J]. *Genetic*, 1998, 30: 1-7.
- [15] McQuown E C, Slone B L, Sheehan R J, et al. Microsatellite analysis of genetic variation in sturgeon (*Acipenseridae*): new primer sequences for *Scaphirhynchus* and *Acipenser* [J]. *Trans Am Fish Soc*, 2000, 129: 1380-1388.
- [16] 邵昭群, 赵 娜, 朱 滨, 等. 鲈科微卫星引物对中华鲟的适用性研究[J]. *水生生物学报*, 2002, 26(6): 577-584.

Identification of genetic polymorphism between three species of common carp using zebrafish *Danio rerio* microsatellite molecular markers

QUAN Ying-chun^{1,2}, LIANG Li-qun^{4,3}, SUN Xiao-wen¹, YAO Kun³, LEI Qing-quan⁴

(1. Key Laboratory of Finfish Bioengineering & Breeding in North China, Heilongjiang Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China; 2. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China; 3. College of Biotechnic, The Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China; 4. Harbin University of Science and Technology, Harbin 150080, China)

Abstract: Using 6 072 pairs of zebrafish (*Danio rerio*) microsatellite primers to analyze the genetic variances between three species of common carp collected from the Heilongjiang River (*Cyprinus carpio haematopterus* Temminck et Schlegel, *Cyprinus carpio* var. *wuyuanensis*) and Yunnan province (*Cyprinus pellegrini* Tchang), totally 563 zebrafish microsatellites reveal inheritance polymorphism, which could be used in genotyping of these common carp. 25 pairs of zebrafish microsatellite primers were randomly selected from these 563 primers to identify the genetic diversities. The Nei genetic distances were computed by the software package of Phylip3.63, and the evolutionary tree based on Neighbor-Joining method of Saitou and Nei (1987) were drawn by the software of MEGA3.0. Also 1 000 times of bootstrapping were tested using the maximum likelihood method, the UPGMA method and NJ method. The results show that *Cyprinus carpio haematopterus* Temminck et Schlegel and *Cyprinus carpio* var. *wuyuanensis* cluster first and then *Cyprinus pellegrini* Tchang and *Danio rerio*. The polymorphic microsatellites can be used as genetic markers of these species, so as to increase the molecular markers of the carp genetic linkage map. Screening interspecies microsatellite primers, especially from a model organism can advance the relative research rapidly. Then we can compare genetic data conveniently, in order to breed carps at a molecular level more quickly. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(2): 300–304]

Key words: microsatellite; *Danio rerio*; common carp; interspecies variation; molecular marker

Corresponding author: LIANG Li-qun. E-mail: llq-1019@163.com