

与鲤鱼抗寒性状相关的 RAPD 分子标记的筛选及其克隆

梁利群^{1,2}, 高俊生^{2,3}, 李绍戊^{2,4}, 孙效文², 雷清泉¹

(1. 哈尔滨理工大学, 黑龙江 哈尔滨 150080; 2. 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070; 3. 大连水产学院, 辽宁 大连 116023; 4. 上海水产大学, 上海 200090)

摘要:以黑龙江鲤(*Cyprinus carpio haematopterus* Temminck et Schlegel)、荷包红鲤抗寒品系(*Cyprinus carpio* var. *wananensis*)、荷包红鲤(*Cyprinus carpio* var. *wananensis*)、柏氏鲤(*Cyprinus pellegrini* Tchang)以及荷包红鲤抗寒品系和柏氏鲤的杂交 F₂ 的 DNA 样品为材料,用 200 个随机引物对其进行 PCR 扩增,获得了 1 个与鲤鱼抗寒性状相关的分子标记 RAG20,并在 F₂ 代分离个体中得到验证。至此,本实验室共获得 10 个与鲤鱼抗寒性状相关的分子标记,更加证明抗寒性状是数量性状(QTL)受微效多基因控制。此外,将其中 4 个标记从琼脂糖凝胶上进行回收,并与 pMD18-T vector 连接,将其转入感受态大肠杆菌 *E. coli* DH5α,对克隆片段进行序列分析,旨在根据每一序列重新设计引物,将 RAPD 标记转化为稳定的 SCAR 标记。[中国水产科学,2006,13(3):360-364]

关键词:鲤鱼;抗寒;SCAR;RAPD;分子标记

中图分类号:Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2006)03-0360-05

耐寒性状是鱼类的主要经济性状之一,但是目前对鱼类耐寒机理的了解仍然不清楚。王祖熊、吴力钊等^[1-4]一直致力于鲢鱼(*Cirrhina molitorella*)低温耐受能力的研究。孙效文等^[5]、梁利群等^[6]建立了适于抗寒分析的实验鱼体系用于鲤鱼抗寒问题的研究。许多研究结果显示,鱼类的不同地理种群在耐寒方面存在遗传上的差异,如果能够找到体现这种差异的遗传标记,就可能克隆与鱼类耐寒相关的基因,将其用于一些不耐寒鱼类的遗传改良研究,有很重要的经济意义。

随着现代分子生物学技术的不断发展,尤其是多态性分子标记的应用,为深入研究淡水鱼类的耐寒机制提供了新的方法。本实验室自 1996 年开始研究鲤鱼的耐寒机制,并首次应用分子标记技术,获得了 9 个与鲤鱼耐寒性状相关的分子标记,确定了抗寒性状是多基因控制的数量性状,并将 5N1451c 这一与鲤鱼抗寒性状相关的分子标记定位到鲤鱼的遗传连锁图谱上^[7-8]。本研究在此基础上对与鲤鱼抗寒性状相关的 RAPD 分子标记进行筛选,并将这些与抗寒相关标记的 PCR 扩增特异片段进行回收、克隆、测序。根据测序结果重新设计引物,试图对其实施 SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) 标记转化,以期获得能进行正常、重复性好的 PCR 结果,并以此辅助鱼类抗寒育种的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼 所用实验鱼为本实验室构建的适于鱼类抗寒研究的实验鱼体系。分别为黑龙江鲤(*Cyprinus carpio haematopterus* Temminck et Schlegel)、荷包红鲤抗寒品系(*Cyprinus carpio* var. *wananensis*)^[9]、荷包红鲤(*Cyprinus carpio* var. *wananensis*)、柏氏鲤(*Cyprinus pellegrini* Tchang)以及荷包红鲤抗寒品系(父本)和柏氏鲤(母本)的杂交 F₂。由于荷包红鲤抗寒品系是由荷包红鲤和黑龙江鲤杂交得到的,所以本实验也将其作为对照一起进行研究。F₂ 代需要进行越冬实验,在越冬前对所有个体进行标记,同时采其部分鳍条组织,提取 DNA。待越冬后,将越冬存活个体取出,根据对应的标记找到在越冬前提取的每一个体的 DNA,从这些个体 DNA 样品中抽取一部分混合在一起构成 F₂ 代存活个体的 DNA 混合样,从其余个体的 DNA 样品中抽取一部分混合在一起构成 F₂ 代死亡个体的 DNA 混合样。

1.1.2 主要试剂及实验仪器 本实验所用随机引物来自美国 Operon 公司、北京赛百盛公司和上海生工。生化试剂购自美国 Promega 公司,其他试剂为国产分析纯。

收稿日期:2005-07-14; 修订日期:2005-10-24。

基金项目:国家“973”基础研究项目资助(2004CB3117404)。

作者简介:梁利群(1963-),女,研究员,硕士生导师,从事水产动物基因组研究。Tel:0451-84861314; E-mail:llq-1019@163.com

RAPD-PCR 反应在美国 PE 公司生产的 9700 上进行。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 用消毒的剪刀将实验鱼的鳍条组织剪碎放入 1.5 mL 的离心管,然后将样品溶入 300 μ L 的裂解液中(成分:0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)、200 μ g/mL Proteinase K、0.5% SDS),然后在 50 $^{\circ}$ C 的培养箱中消化过夜,在此期间要来回转动离心管数次。充分消化后加等体积的酚抽提 2 次(为了避免 DNA 断裂,每次缓慢转动离心管 10 min),4 $^{\circ}$ C 7 500 r/min 离心分相,吸出含 DNA 的水相,用等体积的酚/氯仿(酚、氯仿、异戊醇混合液体积比为 25:24:1)再抽提 1 次,将上清转入装有一定量的透析液[成分:50 mmol/L Tris-Cl (pH 8.0)、10 mmol/L EDTA、10 mmol/L NaCl]的透析袋中进行数次透析,直到 $OD_{270} < 0.05$,将透析袋中的液体转入离心管中,加入无 DNA 的 RNA 酶,终浓度为 100 μ g/mL,37 $^{\circ}$ C 温浴 30 min,最后用冰预冷的无水乙醇沉淀,70% 乙醇洗涤 2~3 次,室温干燥后加 TE 溶解并保存在 4 $^{\circ}$ C 备用。

1.2.2 PCR 扩增及 RAPD 特异片段的筛选 PCR 扩增反应的总体积为 25 μ L,其中包括 10 $\times$ RAPD 反应缓冲液 2.5 μ L (100 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L KCl, 15 mmol/L $MgCl_2$, 0.01% (W/V) Gelatin, 0.05% (TritonX-100); dNTP (2.5 mmol/L) 1 μ L; 基因组 DNA 1 μ L (50 ng/ μ L); Taq 酶 1.5 U (5 U/ μ L)。

样品在 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min 后,93 $^{\circ}$ C 1 min $\rightarrow$ 36 $^{\circ}$ C 1 min $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 2 min,45 个循环,最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min,扩增产物在 1.4% 琼脂糖凝胶上电泳分离,GDS8000 凝胶成像仪观察记录结果。比较扩增产物的多态性,筛选出目的片段。

1.2.3 RAPD 特异片段的回收、克隆和序列分析 利用凝胶回收试剂盒(QIAGEN)从 1.0% 的低熔点琼脂糖凝胶上回收和纯化特异的 RAPD 片段,并将其连接至载体 pMD18-T vector。参照《分子克隆实验指南》^[10]用 $CaCl_2$ 法制备感受态细胞,并将重组质粒转入其中,通过测序引物 RV-M 和 M13-47 进行菌落 PCR 分析,以检测片段的插入情况。确认插入片段的大小与对应的 RAPD 特异产物大小一致后,挑取菌株,送北京诺赛基因组研究中心有限公司进行两端测序。

2 结果

2.1 鲤鱼抗寒性 RAPD 分子标记的筛选结果

在实验过程中希望利用 RAPD 技术筛选出与

鲤鱼抗寒性状相关的分子标记。所谓与抗寒相关特异带是指在 PCR 分析中荷包红鲤抗寒品系(父本、抗寒)和越冬存活的 F_2 代混合样共有,而柏氏鲤(母本、不抗寒)和越冬死亡的 F_2 代混合样不具有的条带;或是荷包红鲤抗寒品系(父本、抗寒)具有,柏氏鲤(母本、不抗寒)不具有,而两种 F_2 代混合样都具有,但在 PCR 产物量上存在不同量的特异条带。通过对 200 个随机引物的筛选,筛选出 1 个能够扩增出特异片段的分子标记 RAG20,箭头所指为特异性条带(图 1)。通过对子代的分析可以看到在越冬存活的 10 个子代中有 9 个出现了该标记,而越冬死亡的 18 个子代个体中只有在 13、15 和 25 这几个泳道出现的该标记比较模糊。加上本实验室以前所获得的 9 个分子标记(其中一个引物可以扩增出两条特异片段),到目前为止一共获得了 10 个这样的标记。本实验对其中的 4 个引物进行了分析(表 1),其中每个都做了 3 次重复实验,得到的电泳图谱基本保持一致,特异条带的重复性也很好,证明了这些标记的可靠性,可以进行回收。其中引物 S1043 和 AG20 的电泳图谱见图 2 和图 3。箭头所指为特异性条带。

2.2 鲤鱼抗寒性 RAPD 特异片段的克隆、转化结果与分析

得到的 4 个 RAPD 特异片段经回收、纯化后,与 pMD18-T vector 连接,并转入感受态大肠杆菌 *E. coli* DH 5 α 中。通过测序引物 RV-M 和 M13-47,进行菌落 PCR 检测片段的插入情况,发现引物 S1043 和 AG20 的插入片段的大小为 1000 bp 左右,S1052、KIT N-05 的片段较小分别为 500 bp 和 600 bp 左右,与各引物扩增出的特异条带的片段大小基本一致,挑取这样的菌株进行序列分析。

2.3 RAPD 特异片段测序的结果与分析

克隆片段用 RV-M Primer 和 M13-47 Reverse Primer 两个测序引物进行双向序列分析,其中 3 个片段的测序工作已经完成,与预期想得到的片段的大小基本一致,并且在各序列的始端和末端分别含有对应引物的 10 个碱基和其反向互补序列,证实克隆片段是由其对应的引物扩增得到的。由引物 AG20 扩增得到的 RAPD 特异片段大小为 1021 bp,提交到 GeneBank,接受号为 DQ250155。同样,由引物 S1052 得到的 RAPD 特异片段大小为 422 bp,接受号为:QD250156;由引物 S1043 得到的 RAPD 特异片段大小为 1043 bp,接受号为 QD250157。

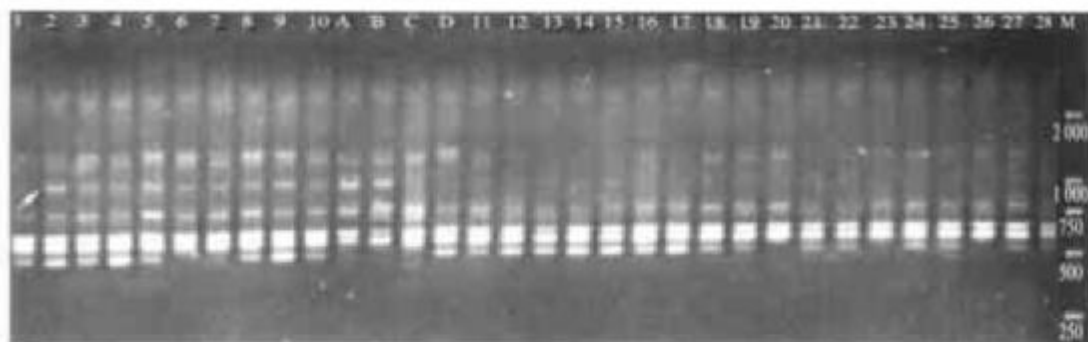


图1 引物 AG20 对 F_2 代个体基因组 DNA 的扩增结果

M: DNA 分子量标准 DL2000; A: 黑龙江鲤; B: 荷包红鲤抗寒品系(父本); C: 荷包红鲤; D: 柏氏鲤(母本); 1~10: 越冬存活 F_2 代个体的 DNA; 11~28: 越冬死亡 F_2 代个体的 DNA

Fig.1 F_2 genomic DNA amplified by primer AG20

Line M: DNA marker DL2000; Lane A: Wild carp; Lane B: Frigid-resistance strain of red purse carp (father); Lane C: Red purse carp; Lane D: Boshi carp (mother); Lane 1~10: DNA samples of survived F_2 ; Line 11~28: DNA samples of dead F_2

表1 各引物来源及序列

Tab.1 Resource and sequence of primers

引物号 Primer number	引物来源 Primer origin	引物序列 Primer sequence
KIT N-05	美国 Operon 公司 Operon, USA	ACTGAACGCC
AG20	北京赛百盛公司 Beijing SBS Genetech Co., Ltd	TGCGCTCTC
S1052	上海生工 Shanghai Sangon Biological Engineering & Technology and Service co., Ltd	CAGTTCCCGT
S1043	上海生工 Shanghai Sangon Biological Engineering & Technology and Service co., Ltd	AGCACTCTGT



图2 引物 S1043 的3次重复扩增结果

M: DNA 分子量标准 DL2000; 1: 黑龙江鲤; 2: 荷包红鲤抗寒品系(父本); 3: 荷包红鲤; 4: 柏氏鲤(母本); 5: 存活 F_2 代的 DNA 混合样; 6: 死亡 F_2 代的 DNA 混合样; 7: 空白

Fig.2 Three-time repeat amplified by primer S1043

Line M: DNA marker DL2000; Lane 1: Wild carp; Lane 2: Frigid-resistance strain of red purse carp (father); Lane 3: Red purse carp; Lane 4: Boshi carp (mother); Lane 5: DNA blending samples of survived F_2 ; Lane 6: DNA blending samples of dead F_2 ; Lane 7: Blank

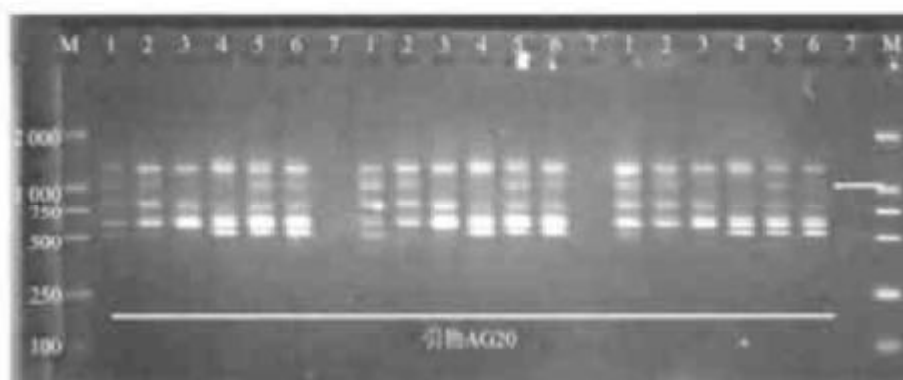


图3 引物 AG20 的 3 次重复扩增结果

M: NDA 分子量标准 DL2000; 1: 黑龙江鲤; 2: 荷包红鲤抗寒品系(父本); 3: 荷包红鲤; 4: 柏氏鲤(母本); 5: 存活 F_2 代的 DNA 混合样; 6: 死亡 F_2 代的 DNA 混合样; 7: 空白

Fig. 3 Three-time repeat amplified by primer AG20

Line M: DNA marker DL2000; Lane 1: Wild carp; Lane 2: Frigid-resistance strain of red purse carp (father); Lane 3: Red purse carp; Lane 4: Bonhi carp (mother); Lane 5: DNA blending samples of survived F_2 ; Lane 6: DNA blending samples of dead F_2 ; Lane 7: Blank

3 讨论

在利用 RAPD-PCR 技术研究鲤鱼抗寒性状的过程中,最希望得到的是抗寒的父本和越冬存活的 F_2 代混合样具有的分子标记,而不抗寒的母本和越冬死亡的 F_2 代混合样都不具有的分子标记。但在本研究中发现,所筛选到的几个标记都是抗寒亲本具有、不抗寒亲本不具有,而两个 F_2 代混合样都具有,但在 PCR 扩增量上抗寒与不抗寒 F_2 代存在差异,即产生了一个拷贝数差异的图谱。分析认为,鱼类在越冬过程中引起死亡的原因有很多,遗传因素决定其不抗寒是引起越冬死亡的主要因素,由于操作不当对鱼体产生损伤引发疾病也是产生死亡的一个因素。因此在越冬过程中很可能造成的极少数具有抗寒能力的子代混入到死亡群体中,从而产生上述的结果。另外,作者认为鱼类在某些与抗寒相关基因的表达量上存在一定的差异,而表达量达不到一定水平很可能是引起越冬死亡的另一个因素,如图 1 所示的死亡个体中出现的几个弱标记。在以往利用分子标记进行抗寒分析过程中,笔者获得了许多与抗寒性状相关的分子标记,据此确定鱼类的抗寒性状是受多基因控制的是一个数量性状,一个基因拷贝数的不同对抗寒鱼群体之间的遗传不同有很大的影响。而在提高鲤鱼抗寒能力的育种研究过程中,亲本将抗寒性状向子代传递,子代获得抗寒基因的几率就会出现不均一的现象,在子代基因组中获

得与抗寒相关基因的拷贝数必将有所不同。作为数量性状遗传的抗寒基因只有在相关基因拷贝数达到一定时方能表达出与该基因相对应的蛋白产物,抗寒 F_2 代的表现型为对低温有较强的抵抗力(低温存活),而不抗寒的 F_2 代在一定程度上也获得了亲本遗传的抗寒基因,但在遗传抗寒基因的数量上(拷贝数)未达到产生足以抵御低温的表达产物蛋白质的量,导致其表现型为抗寒能力弱或不抗寒(低温死亡)。因此,在 PCR 扩增后出现的扩增量不同的特异片段有可能与亲本的抗寒性状在传递过程中基因拷贝数多少有关,笔者将在后续的研究工作中做进一步的研究。

由于 RAPD 技术具有的操作简单、快捷、无需知道目标序列的有关信息、无种属特异性等优点,这对研究背景相对贫乏的鱼类抗寒研究进入基因组水平是非常有意义的。但由于 RAPD 技术存在的重复性差、实验结果不具有可比性等缺陷使其在数量性状基因的定位等研究上难以进行。Weeden 等的研究也表明^[11],RAPD 技术本身存在 5%~10% 的检测误差。因此目前采用的 RAPD 技术并不是进行鱼类抗寒研究的最好方法。在今后的研究中,应该更多的采用共显性分子标记。同时,在实验过程中,虽然通过严格的控制实验条件,比如,获得高质量的模板、稳定高效的 *Tag* 酶、优化的反应条件、专一的实验器材,利用 RAPD 技术依然能够得到重复性好,且比较稳定的实验结果。但是其信息量少,进行常规 PCR 困难等缺点,需要将其转化为共显性分

子标记才得以解决。SCAR 标记作为一种共显性的分子标记具有的重复性好、信息量大等一些优点,已经被越来越多的国内外学者应用^[12-14]。比较 RAPD 分子标记而言,这种共显性的 SCAR 标记更加适合鱼类抗寒性状方面的研究,在鱼类耐寒育种研究问题上具有更加广阔的应用前景。目前,作者已经分别根据得到的测序片段设计合成了一对大小为 18~20 bp 的 SCAR-PCR 引物,并送至上海生工进行合成。

参考文献:

- [1] 王祖熊,张朝霞,黄文都,等. 鲢鱼遗传改良的研究[J]. 水生生物学报,1984,8(2):195-204.
- [2] 冯祖强,王祖熊. 鱼类对环境温度适应问题[J]. 水产学报,1984,8(1):79-83.
- [3] 冯祖强,王祖熊. 鲢鱼冷休克及其死亡的某些生化因素[J]. 水生生物学集刊,1984,8(3):290-297.
- [4] 吴力钊,王祖熊. 鲢鱼和二代混糖鲢鱼低温耐受能力的差异[J]. 水生生物学报,1993,17(3):206-210.
- [5] 梁利群,孙效文. 鲤鱼抗寒性状的 RAPD 分析[J]. 中国水产科学,1997,4(3):89-91.
- [6] 孙效文,梁利群. 鲤的遗传连锁图谱(初报)[J]. 中国水产科学,2000,7(1):1-5.
- [7] Sun Xiaowen, Liang Liqun. Ageretic linkage map of common carp (*Cyprinus carpio* L.) and trapping of a locus associated with cold tolerance [J]. Aquaculture, 2004, 238:165-172.
- [8] 常玉梅,梁利群,孙效文. 鲤鱼耐寒性状研究[J]. 上海水产大学学报,2003,12(2):102-105.
- [9] 沈俊宝,刘明华. 荷包红鲤抗寒品系的筛选和培育[J]. 淡水渔业,1988(3):14-17.
- [10] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南(第3版)[M]. 北京:科学出版社, 2002: 8.
- [11] Wendon N F, Timmerman G M, Hemmat M, et al. Identification and reliability of RAPD marker [J]. Crop Sci Soc Am, 1992,12-17.
- [12] 谢传晓,朱苏文,李培金. 玉米对生性状两个显性基因 SCAR 分子标记[J]. 高技术通讯, 2002, 08:38-40.
- [13] Wang J X, Yang G S, Fu T D. Development of PCR-based Markers Linked to the Fertility Restorer Gene for the Pollen Cytoplasmic Male Sterility in Rapeseed (*Brassica napus* L.)[J]. 遗传学报,2000,27(11):10-12.
- [14] Liu Z Y, Sun Q X, Li H J. Molecular Identification and Marker-assisted Selection of *Pm21* Gene Conferring Resistance to Powdery Mildew in Wheat[J]. Acta Genetica Sinica, 1999,26(6):673.

Screening and cloning of RAPD marker interrelated to cold tolerance in common carp

LIANG Li-qun^{1,2}, GAO Jun-sheng^{2,3}, LI Shao-wu^{2,4}, SUN Xiao-wen², LEI Qing-quan¹

(1. Harbin University of Science and Technology, Harbin 150080, China; 2. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China; 3. Dalian Fisheries College, Dalian 116023, China; 4. Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: RAPD-PCR was performed with 200 random primers on DNA samples of Heilongjiang wild carp (*Cyprinus carpio haematopterus* Temminck et Schlegel), frigid-resistance strain of Red purse carp (*Cyprinus carpio* var. *wananensis*), Red purse carp (*Cyprinus carpio* var. *wananensis*), Boshi carp (*Cyprinus pellegrini* Tchang), cross F₂ of frigid-resistance strain of Red purse and Boshi carp, respectively. RAG20 was identified to be a molecular marker which associated with cold tolerance traits of common carp (*Cyprinus carpio*). Examination to F₂ segregated individuals verified that this molecular marker was reliable. Up to now, 10 molecular markers associated with cold tolerance of common carp were obtained, and the marker 5N1451c interrelated with cold tolerance *Cyprinus* (*Cyprinus*) *pellegrini* Tchang has been mapped on linkage 5. It further demonstrates that cold tolerance trait is a quantitative trait loci (QTL), which is controlled by small multi-genes. In addition, specific fragments from four primers above were extracted from the agarose and purified respectively. The purified products were then ligated to pMD 18-T vector which were transformed to competent *E. coli* DH 5a for sequencing. The sequencing of three specific fragments has been finished. The length of the amplified fragments was 1 021 bp, 422 bp, 1 043 bp respectively. The purpose of this study is to redesign primers upon the sequences and convert RAPD markers into the stable SCAR markers finally. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(3):360-364]

Key words: *Cyprinus carpio*; cold tolerance; SCAR; RAPD; molecular marker