

文章编号:1005-8737(2000)02-0018-04

不同鲤鱼种间 DNA 遗传标记多态性

梁利群, 孙效文, 石连玉, 曹鼎臣

(中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要:用 84 个随机引物对黑龙江野鲤 (*Cyprinus carpio haematopterus* Temminck et Schlegel) 和柏氏鲤 (*Cyprinus pellegrini pellegrini* Tchang) 进行种间 RAPD 分析, 结果共扩增出 484 个片段, 二者共有的扩增片段为 13 个, 黑龙江野鲤特有的为 233 个, 柏氏鲤特有的为 225 个, 这些特异片段可做黑龙江野鲤和柏氏鲤的分子遗传标记。并对其特有的片段进行了命名。2 个体间的相似率为 0.028, 遗传距离为 0.972, 说明黑龙江野鲤和柏氏鲤的遗传距离比较远。

关键词:鲤鱼; 种间关系; 随机扩增多态性 DNA; 遗传标记

中图分类号:Q959.468

文献标识码:A

鲤鱼是我国乃至世界淡水养殖的主要种类之一, 自然水域中有许多地理种群。这些种群之间在形态、遗传上存在许多差异。且鲤鱼人工选育的品系较多, 不同品系间形态及遗传也存在较大的差异, 这些差异为鲤鱼常规选育种提供了极好的材料。但是, 对这些遗传上的差异, 特别是与经济性状相关联的数量性状还无法与 DNA 分子遗传标记建立连锁关系, 没有足够的 DNA 分子遗传标记可利用, 使鲤鱼的选育种研究还停留在以性状选择为主的水平上, 从而导致其选育种研究带有一定的局限性。RAPD 随机扩增多态 DNA 技术以其简单快速的特点在对物种进行分子水平鉴定及遗传连锁图谱的制备上得到了广泛的应用^[1-9]。因此, 本研究利用 RAPD 技术对在高纬度地区生长的抗寒能力较强的黑龙江野鲤及在云南杞麓湖和云星湖生长的以浮游动物为食的柏氏鲤的基因组 DNA 进行多态性分析, 从分子水平上对分属 2 个种的这 2 种鲤鱼进行鉴定, 并对它们各自特有的 DNA 片段进行了命名, 为进一步定位、克隆一些与经济性状有关的基因奠

定了基础, 为下一步构建鲤鱼的遗传连锁图谱做了技术上的准备。

1 材料和方法

1.1 材料

黑龙江野鲤采自黑龙江抚远江段, 柏氏鲤采自云南江川养殖场。随机引物购自 Operon Technologies 公司, 生化试剂均购自 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取和分离 将 5 g 肝组织在有液氮的不锈钢研钵中研成粉末, 将样品溶于 50 ml 的裂解液中 (成份: 0.5 mol/L EDTA, pH 8.0, 200 μg/ml Proteinase K, 0.5% Sarcosyl), 搅拌均匀, 在 50℃ 水浴中消化 3 h, 在此期间转动离心管数次, 充分消化, 加等体积的酚抽提 3 次 (为防止因机械损伤使 DNA 链断裂, 每次抽提应缓慢转动离心管 10 min, 离心分相)。吸出含 DNA 的水相, 用等体积的酚/氯仿 (酚: 氯仿: 异戊醇为 25:24:1) 再抽提 2 次, 将上清液转入透析袋中, 对 3 L 透析液 (成份: 50 mol/L Tris · Cl, pH 8.0, 10 mmol/L EDTA, 10 mmol/L NaCl) 进行数次透析, 直到 $OD_{270} < 0.05$ 。再向透析过的液体加入无 DNA 酶的 RNA 酶, 终浓度为 100 μg/ml, 37℃ 保温 3 h, 再用酚/氯仿抽提 3

收稿日期: 1999-06-25

作者简介: 梁利群 (1963-), 女, 黑龙江人, 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所副研究员, 从事鱼类基因工程育种研究。

次,上清液再用 TE(成份:10 mmol/L Tris·HCl,pH 8.0,1 mmol/L EDTA,pH 8.0)进行透析,透析后的样品用紫外分光光度计测定浓度,4℃ 保存待用。

1.2.2 PCR 反应及 RAPD 产物的鉴定 扩增反应的总体积为 25 μ l,其中包括 10 \times PCR 反应缓冲液 2.5 μ l(成份:10 mmol/L Tris·HCl,500 mmol/L KCl,15 mmol/L MgCl₂,0.01% Gelatin,0.05% Triton X-100);dNTP(2.5 mmol/L)1 μ l;基因组 DNA 1 μ l(50 ng/ μ l),Taq 酶 1 μ l(1 IU/ μ l)。样品在 PE-9600 扩增仪上进行扩增,93℃ 变性 3 s,35℃ 复性 1 min,72℃ 延伸 2 min,经 45 个循环,最后在 72℃ 保温 5 min。扩增产物在 1.4% 的琼脂糖凝胶中电泳过夜,溴化乙锭染色,用 GDS 8000 凝胶成像仪(UVP 公司)进行分析鉴定。并用 GelworksID 软件包(3.0 版本)对每个扩增带 DNA 的分子量进行分析鉴定,弱带峰值强度不小于 48(DNA 含量介于 10~20 ng 之间)(在分析过程中,所选的引物必须为 2 种鱼表现出种间差异,但各自的 10 个样品不表现出个体差异)。

1.2.3 数据分析 2 种鱼基因组 DNA 的相似率计算公式为:

$$F = N_{ab} / N_a + N_b$$

式中: N_{ab} - 物种 a 和物种 b RAPD 扩增分子量相同的 DNA 片段总数; N_a 、 N_b - a、b 物种 RAPD 扩增出 DNA 片段的总数。

2 种鱼基因组 DNA 遗传距离计算公式为:

$$D = 1 - F$$

其中: D - 遗传距离, F - 相似率。

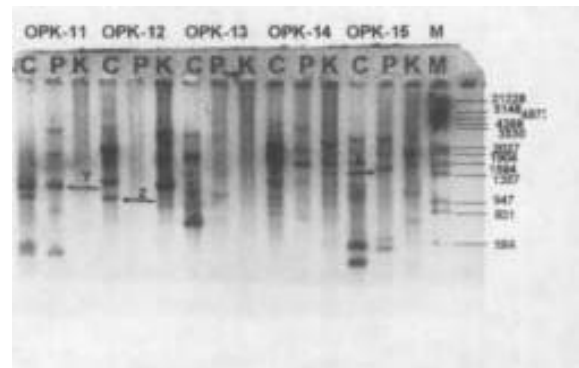
1.2.4 特异 DNA 片段的命名 以 RAPD 分析中某种鱼特有的 DNA 片段分子量和所用引物的序号及这种鱼的学名缩写进行命名。例如:01A752c,“01A”表示 A 系列中的 01 号引物,“752”代表对这种鱼用 A 系列中的 01 号引物经 RAPD 方法,在 752 bp 处扩增出 1 条特异带,最后的小写字母代表扩增实验使用的样品鱼的学名缩写,如“c”代表黑龙江野鲤,“p”代表柏氏鲤。

2 结果

2.1 RAPD 扩增结果

在 RAPD 扩增中,所用引物为 OPA-01~20; OPB-01~20; OPK-01~20; OPH-01~20(无 OPH-14、15、17、19); OPC-80~13、15、19、20,

OPN-05、13、14,共用 84 个随机引物(每个引物都要进行 3 次平行扩增)。84 个 RAPD 引物有 82 个个引物扩增出黑龙江野鲤和柏氏鲤的具有多态性的电泳图谱。分析发现扩增片段大于 1 500 bp 时扩增片段的重复性差,而小于 500 bp 时非特异性片段比例增多,故选择在 1 500~500 bp 这一区间扩增的片段做为分析对象。共获得 484 个扩增片段,黑龙江野鲤和柏氏鲤共有的扩增片段为 13 个,黑龙江野鲤特有的 DNA 片段为 233 个,柏氏鲤特有的 DNA 片段为 225 个见图 1。根据黑龙江野鲤和柏氏鲤 RAPD 扩增片段(1 500~500 bp 之间)的结果分析,2 个体间的相似率为 0.028,遗传距离为 0.972。



M- 分子量标准 Marker; C - 野鲤 *Cyprinus carpio haematoferus* Temminck et Schlegel; P - 柏氏鲤 *Cyprinus pellerini pellegrini* Tchang; OPK - 随机引物 Random primer; X - 柏氏鲤特有片段 The fragment of only from P; Y - 野鲤柏氏鲤共有片段 The fragment was share by two species of carps; Z - 野鲤特有片段 The fragment of only from C.

图 1 2 种鲤鱼基因组 DNA 的随机引物扩增产物电泳图

Fig.1 The electrophoresis patterns of RAPD from two species of carp random amplification with primer

2.2 2 种鱼特异 DNA 片段的命名

在对黑龙江野鲤和柏氏鲤这 2 个在经济性状上有较大差异的种之间进行基因组 DNA 的 RAPD 分析过程中,发现其在 DNA 水平上也有很大的差异。用各自特有的 DNA 片段分子量和所用引物的序号及学名进行命名的命名方法与 GelworksID 分析相结合,得到 458 个特异 DNA 片段并被命名,见表 1。其中,黑龙江野鲤为 233 个,柏氏鲤为 225 个。

表 1 2 种鲤鱼特异 DNA 片段的命名(例举部分)

Table 1 Names from only DNA fragment of different species carps(illustrate partly)

序号 Num	命名 Name	序列 Primer sequenc	长度 Size	序号 Num	命名 Name	序列 Primer sequenc	长度 Size
1	01A982P	CAGGCCCTTC	982	1	01B1068P	GTTCGCTCC	1068
2	01K1040C	CATTCGAGCC	1040	2	01B1088C	GTTCGCTCC	1088
3	01K1262C	CATTCGAGCC	1262	3	01B1258P	GTTCGCTCC	1258
4	01K910C	CATTCGAGCC	910	4	01B1356C	GTTCGCTCC	1356
5	02A1278C	TGCCGAGCTG	1278	5	01B531C	GTTCGCTCC	531
6	02A1315P	TGCCGAGCTG	1315	6	01B588P	GTTCGCTCC	588
7	02A815C	TGCCGAGCTG	815	7	01B677C	GTTCGCTCC	677
8	02A956P	TGCCGAGCTG	856	8	01B856C	GTTCGCTCC	856
9	02A956P	TGCCGAGCTG	956	9	01B870P	GTTCGCTCC	870
10	02K1001P	GTCTCCGCAA	1001	10	01H1450C	GCTCGGAGAA	1540
11	03A1249C	GTCTCCGCAA	1249	11	02B1031C	TGATCCCTGG	1031
12	03A1080C	AGTCAGCCAC	1080	12	02B1169P	TGATCCCTGG	1169
13	03A1282C	AGTCAGCCAC	1282	13	02B1408C	TGATCCCTGG	1408
14	03A630C	AGTCAGCCAC	630	14	02B506C	TGATCCCTGG	506
15	03A645P	AGTCAGCCAC	645	15	02B573P	TGATCCCTGG	573
16	03A891P	AGTCAGCCAC	891	16	02B581C	TGATCCCTGG	581
17	03K596	CCAGCTTAGG	596	17	02B741C	TGATCCCTGG	741
18	03K886P	CCAGCTTAGG	886	18	02B741P	TGATCCCTGG	741
19	04A1017C	AATCGGGCTG	1017	19	02H1113P	TCGGACGTGA	1113
20	04A1113P	AATCGGGCTG	1113	20	02H1289C	TCGGACGTGA	1289
21	04A1189C	AATCGGGCTG	1189	21	02H1289P	TCGGACGTGA	1289
22	04A1271P	AATCGGGCTG	1271	22	02H667P	TCGGACGTGA	667
23	04A1341C	AATCGGGCTG	1341	23	02H716C	TCGGACGTGA	716
24	04A539A	AATCGGGCTG	539	24	02H816P	TCGGACGTGA	816
25	04A943P	AGGGGTCTTG	943	25	03B1052P	CATCCCCCTG	1052
26	04K1262P	CCGCCCAAAC	1262	26	03B1156P	CATCCCCCTG	1156
27	04K1421C	CCGCCCAAAC	1421	27	03B534P	CATCCCCCTG	534
28	04K596C	CCGCCCAAAC	596	28	03B540C	CATCCCCCTG	540
29	04K658P	CCGCCCAAAC	658	29	03B632P	CATCCCCCTG	632
30	04K797C	CCGCCCAAAC	797	30	03B817P	CATCCCCCTG	817
31	04K804P	CCGCCCAAAC	804	31	03H1289P	AGACGTCCAC	1289
32	04K945P	CCGCCCAAAC	945	32	03H1450C	AGACGTCCAC	1450
33	04K954C	CCGCCCAAAC	954	33	04H726C	AGACGTCCAC	726
34	05A786C	AGGGGTCTTG	786	34	03H737P	AGACGTCCAC	737
35	05A805P	AGGGGTCTTG	805	35	03H828P	AGACGTCCAC	828
36	05A875P	AGGGGTCTTG	875	36	03H980C	AGACGTCCAC	980
37	05A919P	AGGGGTCTTG	919	37	04B1069P	GGACTGGAGT	1069
38	05A943C	AGGGGTCTTG	943	38	04B730C	GGACTGGAGT	730
39	05K1390C	TCTGTCGAGG	1390	39	04B931P	GGACTGGAGT	931
40	05N1160P	ACTGAACGCC	1160	40	04H1475C	GGAAGTCGCC	1475
41	05N1183C	ACTGAACGCC	1183	41	04H1475P	GGAAGTCGCC	1475
42	05N505P	ACTGAACGCC	505	42	04H576P	GGAAGTCGCC	576
43	05N729C	ACTGAACGCC	729	43	04H737C	GGAAGTCGCC	737
44	05N811P	ACTGAACGCC	811	44	04H828P	GGAAGTCGCC	828
45	05N819C	ACTGAACGCC	819	45	04H996C	GGAAGTCGCC	996
46	05N949P	ACTGAACGCC	949	46	04H996P	GGAAGTCGCC	996
47	05N978C	ACTGAACGCC	978	47	05B1010P	TGCGCCCTTC	1010
48	06K1020C	CACCTTTCCC	1020	48	05B1200C	TGCGCCCTTC	1200
49	06K1118C	CACCTTTCCC	1118	49	05B709C	TGCGCCCTTC	709
50	06K1329C	CACCTTTCCC	1329	50	05B720P	TGCGCCCTTC	720
51	06K702C	CACCTTTCCC	702	51	05B771C	TGCGCCCTTC	771
52	06K748C	CACCTTTCCC	748	52	05B873P	TGCGCCCTTC	873
53	06K757P	CACCTTTCCC	757	53	05H1500C	AGTCGTCCCC	1500

3 讨论

以往多从形态学、细胞学、生化指标(同工酶、蛋白质)等方面对物种进行鉴定研究,而这些测量和实验所得到的标记结果是基因表达加工后的产物,受个体发育和环境条件的影响较大,往往不能反映物种本身固有的特征。在鱼类遗传育种研究上依据这样的标记势必导致育种研究一定的盲目性,也增加了不必要的工作量。对黑龙江野鲤和柏氏鲤的基因组 DNA 进行的 RAPD 分析,研究的是遗传物质的本质(DNA),图谱上的条带反映了随机引物在基因组中的结合位点,也反映这些物种的遗传多态性,这种标记含有丰富的遗传信息。同时,它也是物种进化的记录仪,补充了以往对物种进行鉴定研究的不足。物种基因组的组成在 RAPD 图谱上也得到了体现,物种亲缘关系越近,基因组中的同源序列越多,相同引物扩增出的共有标记也越多。因此, RAPD 技术是鉴定物种有利的工具。

黑龙江野鲤和柏氏鲤从分类上看是同一属的 2 个不同的种,从鱼类区系分布看,黑龙江野鲤主要分布在黑龙江流域,属于旧北区;柏氏鲤仅限于云南高源水库,地理位置属于中国-印度区。二者无论从鱼类区系分布和分类上,作为同一属的鲤鱼相距较远。而本文用 84 个随机引物进行的 RAPD 分析结果证明,黑龙江野鲤和柏氏鲤之间个体相似率为

0.028,遗传距离为 0.972,说明二者的亲缘关系远,遗传距离比较远,与前者的结果是相吻合的。从而也进一步证实用 RAPD 方法对鱼类进行物种鉴定是可行的。

参考文献:

- [1] 王仪权,周开亚,秦树臻.用 RAPD 标记检测六种蛇基因组 DNA 多态性[J]. 动物学报,1996,42(2):172-181.
- [2] 陈永久,张亚平,齐 璩,等.中国籍随机扩增多态 DNA 及其物种分化关系[J]. 遗传学报,1998,25(1):16-21.
- [3] 何舜平,汪亚平,陈宜瑜.五种鲤科鱼类的 RAPD 分析兼论稀有胸鲫的系统位置[J]. 水生生物学报,1997,21(3):262-267.
- [4] 章怀云,刘荣宗,张学文,等.草鱼和鲤鱼群体遗传变异的 RAPD 指纹分析[J]. 水生生物学报,1998,22(2):168-173.
- [5] 梁利群,孙效文,闫学春,等. RAPD 技术分析荷包红鲤抗寒品系[J]. 中国水产科学,1998,5(1):6-9.
- [6] 梁前进,彭奕欣,余秋海.野生鲫和五种金鱼品种的判别分析和聚类分析[J]. 水生生物学报,1998,22(3):236-243.
- [7] Postlethwait, John H, Johnso, et al. A genetic linkage map for the zebrafish[J]. Science, 1994, 264:699-703.
- [8] Stephen L Johnso, Michael A Gates, Michael Johnso, et al. Centromere-linkage analysis and consolidation of the zebrafish genetic map[J]. Genetics, 1995, 142:1 272-1 288.
- [9] Ela W Knapik, Alec Goodmanj, O Scott Atdinso, et al. A refence cross DNA panel for zrbrafish (*Danio rerio*) anchored with simple sequence length polymorphisms[J]. Development, 1996, 123:451-460.

Genetic marker polymorphisms of genomic DNA between 2 species of carp

LIANG Li-qun, SUN Xiao-wen, SHI Lian-yu, CAO Ding-chen

(Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China)

Abstract: Two species of carps *Cyprinus carpio haematopterus* Temminck et Schlege and *Cyprinus pellegrini pellegrini* Tchang were analysed using 84 random primers by RAPD method. Four hundred and eighty-four fragments were generated, and 13 fragments are shared by 2 species of carps. Two hundred and thirty-three fragments are produced only from DNA samples of *Cyprinus carpio haematopterus* Temminck et Schlege, and 225 fragments are produced only from *Cyprinus Pellegrini Pellegrini* Tchang. These distinctive DNA fragments can be used for molecular genetic marker. Similarity rate of the amplified DNA bands between the 2 species was 0.028, and genetic distance was 0.972, indicating that the genetic distance of the 2 species is far.

Key words: common carp; interspecific relationship; RAPD; genetic marker