

用 RAPD 技术研究 3 种鳗鱼的种质鉴定

杨 弘, 王希道, 吴婷婷, 夏德全

(中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081)

摘 要: 利用 RAPD 技术从 32 个随机引物中筛选出 20 个引物, 对日本鳗 (*Anguilla japonicus*)、欧洲鳗 (*Anguilla anguilla*) 和美洲鳗 (*Anguilla rostrata*) 的 DNA 进行扩增, 均得到 1~13 条大小不等的 DNA 片段, 长度大部分在 500~2 300 bp, 其中 14 个引物共扩增出 37 个特异性标记, 可用来区分这 3 种鳗鱼。日本鳗和欧洲鳗和美洲鳗种群内相似系数分别为 0.885, 0.717, 0.686; 种间遗传距离分别为: 日本鳗和欧洲鳗 0.747, 日本鳗和美洲鳗 0.668, 欧洲鳗和美洲鳗 0.211。这与形态学分析的结果相一致。

关键词: 日本鳗; 欧洲鳗; 美洲鳗; RAPD; 种质鉴定

中图分类号: Q75

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737(2002)03-0269-04

由于鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 的人工繁殖至今未获成功, 其苗种完全依赖于从天然水域中捕捞, 从而使鳗鲡资源迅速减少。为了解决鳗苗匮乏问题, 我国从 1992 年和 1996 年分别引进了欧洲鳗 (*A. anguilla*) 和美洲鳗 (*A. rostrata*)。由于日本鳗、欧洲鳗和美洲鳗的外部形态相似, 特别在苗种阶段更难区分, 为了防止种质混杂, 保护我国鳗鱼资源, 研究不同鳗鱼的种内遗传结构及种间遗传差异, 建立识别这 3 种鳗鱼的分子遗传标记已成为当务之急。有关鳗鱼种质资源方面的研究尚处于起始阶段, 尤其是从分子水平上研究鳗鱼的种质遗传结构还未见报道。为此我们从 DNA 多态性的差异来分析不同鳗鱼种群遗传结构, 旨在为鳗鱼的种质鉴定提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

欧洲鳗 22 尾, 取于江苏泰兴电厂养鳗场; 日本鳗和美洲鳗各 20 尾, 均取于南勇三信鳗业有限公司, 3 种鳗鱼规格均在 80~120 g/尾。

1.2 提取 DNA

从尾静脉抽血 0.5~1.0 mL, 加入 1.5 mL 含 160 μ L ACD 抗凝剂的离心管中, 置 4 $^{\circ}$ C 冰箱中沉淀。吸取约 30 μ L

红细胞, 加入装有 470 μ L 1 $\times$ SETr 1.5 mL Eppendorf 管中混匀, 加入 10 μ L 的蛋白酶 K 至终浓度 200 μ g/ μ L, 加入 12.5 μ L 20% SDS 至终质量分数为 0.5%, 55 $^{\circ}$ C 水浴中过夜。加入等体积 Tris 饱和酚, 缓慢颠倒混合。15 000 r/min 离心 10 min, 将上层水相转入另一离心管中, 弃有机相。重复上述步骤 3~5 次, 直到上清液不再呈现橙红色为止。向水相中加入等体积酚/异戊醇 (体积比 25:24:1), 抽提 1~2 次, 直至向水相中加入有机溶剂时无白色云雾状出现。向水相中加入等体积氯仿/异戊醇 (23:1) 混合 10 min 左右, 离心。再向水相中加入 2 倍体积的冰冷 (~20 $^{\circ}$ C) 无水乙醇, 12 000 r/min 离心 10 min。沉淀用 75% 乙醇洗涤, 干燥。视沉淀块大小, 加入 100~200 μ L TE (pH 8.0), 置 55 $^{\circ}$ C 水浴溶解, 4 $^{\circ}$ C 贮存备用。测定 260 nm 吸光度, 计算 DNA 含量。

1.3 采用的随机引物

32 种随机引物均购自上海生工生物工程有限公司, 序列见表 1。

1.4 RAPD 扩增反应

RAPD 扩增反应体系按文献 [1] 进行。在 PE480 型 DNA 扩增仪中进行 PCR 扩增, 先在 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 循环程序为: 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 36 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共进行 45 个循环。最后 72 $^{\circ}$ C 充分延伸 7 min。扩增反应物在 1.4% 琼脂糖凝胶中电泳, 在 ImageMaster VDS 中进行观察、拍照、分析。

1.5 数据处理及分析

在琼脂凝胶上出现的扩增 DNA 片段, 按出现片段计为 1, 不出线计为 0 进行统计。

种内相似系数计算按 Lynch 等的公式进行: $S_{xy} = 2n_{xy}/$

收稿日期: 2001-12-24。

基金项目: 农业部淡水鱼类种质资源与生物技术重点开放实验室开放课题资助。

作者简介: 杨 弘 (1966-), 男, 副研究员, 从事鱼类生化和生物技术研究。E-mail: yangh@ffrc.wx.net.cn

($n_x + n_y$)

其中: n_{xy} 为个体 x 和 y 共有的扩增条带, n_x 和 n_y 分别为个体 x 和 y 扩增条带数, S_{xy} 为 2 个体间的相似系数。种内相似系数 S 为种群内所测各个体间相似系数 S_{xy} 的平均值。

种间相似系数计算公式为: $S_{ij} = 1 + S'_{ij} - 0.5(S_i + S_j)$

其中 S_i 和 S_j 分别为种群 i 和 j 的种内相似系数值, S'_{ij} 为种群 i 和 j 之间 2 个随机个体相似系数的平均值, S_{ij} 可能大于 1。

种间遗传距离 D'_{ij} 的计算公式为: $D'_{ij} = -\ln[S'_{ij}/(S_i S_j)^{0.5}]$

上述数据处理公式适用于单个引物或各种引物的组合。

2 结果与分析

2.1 RAPD 标记的筛选

用 32 个引物对 3 种鳗鱼的基因组 DNA 分别进行 RAPD 扩增和筛选,共筛选出 20 个引物(S2、S3、S4、S6、S7、S22、S24、S25、S26、S27、S28、S29、S30、S43、S44、S47、S48、S50、S111 和 S112),它们的扩增条带清晰,分别产生 1~13 条大小不等的 DNA 片段,大部分 DNA 片段长度在 500~2 300 bp。各引物对 3 种鳗鱼扩增的 DNA 片段平均在 4.0~8.0 条。

2.2 鉴别 3 种鳗鱼的 RAPD 标记

共筛选出 S2、S4、S7、S22、S25、S27、S28、S29、S30、S43 等 10 个随机引物可作为区分鳗鱼的分子标记, S3、S6、S24、S112 等 4 个随机引物可区分 2 种鳗鱼。S2、S28 引物对 3 种鳗鱼 DNA 扩增产物的电泳检测结果如图 1,其他引物的扩增结果列于表 2 中。

表 1 随机引物及其序列
Table 1 Sequences of random primers

引物编号 Primers code	序列 Sequence (5' to 3')	引物编号 Primers code	序列 Sequence (5' to 3')	引物编号 Primers code	序列 Sequence (5' to 3')
S1	GTTCGCTCC	S22	TGCCGAGCTG	S43	GTCGCGTCA
S2	TGATCCCTGG	S23	AGTCAGCCAC	S44	TCTGGTGAGG
S3	GTTCGCTCC	S24	AATCGGGCTG	S45	TGAGCGGACA
S4	GGACTGGAGT	S25	AGGGGTCTTG	S46	ACCTGAACGG
S5	TGCGCCCTCC	S26	GGTCCCTGAC	S47	TTGGCACGGG
S6	TGCTCTGCC	S27	GAAACGGGTG	S48	GTGTGCCCA
S7	GGTGACGCAG	S28	GTGACGTAGG	S49	CTCTGGAGAC
S8	GTCCACACGG	S29	GGGTAACGCC	S50	GGTCTACACC
S9	TGGGGGACTC	S30	GTGATCGCAG	S111	CTTCGCAGT
S10	CTGCTGGGAC	S41	ACCGGAAGG	S112	ACGCGCATGT
S21	CAGGCCCTTC	S42	GGACCAACC		

表 2 鉴别 3 种鳗鱼的 RAPD 标记
Table 2 RAPD markers in stock identification of three species of eels

引物 Primer	日本鳗/bp <i>A. japonicus</i>			欧洲鳗/bp <i>A. anguilla</i>		美洲鳗/bp <i>A. rostrata</i>	
S2	2500	1950	1300	1750	1100	1750	1100
S3	-	-	-	564	-	564	-
S4	2300	1700	-	530	400	530	400
S6	-	-	-	1250	650	1250	650
S7	880	700	-	-	-	947	-
S22	3000	-	-	-	-	-	-
S24	-	-	-	700	-	-	-
S25	2300	1650	1300	500	400	500	400
S27	1950	530	-	1584	-	-	-
S28	1000	880	-	880	-	1000	880
S29	1400	-	-	-	-	1584	-
S30	900	-	-	831	-	-	-
S43	2300	1550	-	1620	780	1620	780
S112	-	-	-	1584	700	1584	700

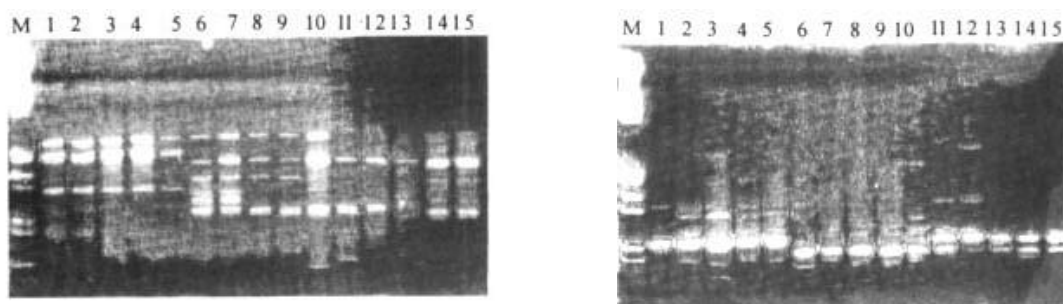


图1 引物 S2(A)和 S28(B)鉴别 3 种鳗鱼的电泳图

Fig.1 RAPD patterns of eel using primers S2(A) and S28(B)

M—分子量标记(λ DNA/*Eco*RI + *Hind*III); 1~5—日本鳗 *A. japonicus*; 6~10—欧洲鳗 *A. anguilla*; 11~15—美洲鳗 *A. rostrata*

以上结果说明 RAPD 标记可作为种质鉴定的 1 种有效分子标记,在鱼类遗传育种中用来鉴定常规方法所不能鉴定的品种,也优于本实验室用同工酶鉴别 3 种鳗鱼的结果。采用同工酶方法,我们曾发现 3 种鳗鱼的肌肉组织酯酶图谱之间存在差异,但结果不够稳定。

2.3 3 种鳗鱼种内及种间相似系数和遗传距离

对 S2、S3、S4、S6、S7、S22、S24、S25、S27、S28、S29、S30、S43、S44、S48、S50、S111 和 S112 等 18 个引物(S26 和 S27 2 个引物由于部分个体缺失不做统计)的扩增片段分别进行了统计(见表 3)。3 种鳗鱼种内相似系数分别为:日本鳗 0.885,欧洲鳗 0.717,美洲鳗 0.686。结果表明,欧洲鳗和美洲鳗比日本鳗拥有更为丰富的遗传多态性。3 种鳗鱼种群间遗传距离分别为:日本鳗和欧洲鳗 0.747,日本鳗和美洲鳗 0.668,欧洲鳗和美洲鳗 0.211,这表明日本鳗和欧洲鳗的亲缘关系较远,和美洲鳗的亲缘关系次之,而欧洲鳗和美洲鳗的亲缘关系很近。

3 讨论

RAPD 标记客观反映了每一生物基因组间的差异,其绝大多数符合孟德尔遗传规律,适用于遗传多态性研究、遗传连锁图谱的构建、基因定位、品系的鉴定及其亲缘关系和群体遗传学等的研究^[2-5]。本实验在采用 20 个引物中 S2、S7、S25、S28、S30 等 5 个引物的扩增条带相互组合,可清晰地区分 3 种鳗鱼,故可作为日本鳗、欧洲鳗、美洲鳗种质鉴定的分子标记。S3、S4、S6、S22、S43、S112 等 6 个引物只能鉴别出其中 1 种鳗鱼,也可在种质鉴定时作为参考。这 3 种鳗鱼的外部特征很相近,尤其是在苗种阶段。传统上根据脊椎骨数目的多少来鉴别它们。但因 3 种鳗鱼脊椎骨数目范围有重叠,因此以形态特征区分鳗鱼种类较困难。本研究建立鳗鱼种质鉴定的分子遗传标记,只要从鱼血或鳍条中提取少量 DNA 就可鉴别。

表 3 3 种鳗鱼种群内及种群之间相似系数

Table 3 Interpopulation and intrapopulation genetic similarity indices and interpopulation genetic distances of three species of eel

	日本鳗 <i>A. japonicus</i>	欧洲鳗 <i>A. anguilla</i>	美洲鳗 <i>A. rostrata</i>
日本鳗 <i>A. japonicus</i>	0.885	0.747	0.668
欧洲鳗 <i>A. anguilla</i>	0.557	0.717	0.211
美洲鳗 <i>A. rostrata</i>	0.582	0.880	0.686

注:对角线上数字为种内相似系数,对角线左下方为种间相似系数,对角线右上方为种间遗传距离。

Note: Data on the diagonal represent intrapopulation genetic similarity indices; below the diagonal represent interpopulation genetic similarity indices, and above the diagonal represent interpopulation genetic distances.

研究还表明,日本鳗种内相似系数最高,达 0.885,这表明其遗传多态性已丧失很多。说明我国沿海天然鳗苗资源急需加强保护,并应加强鳗鱼人工育苗的研究。欧洲鳗种内相似系数为 0.717,美洲鳗的种内相似系数为 0.686,均比日本鳗低,这是因为欧洲鳗与美洲鳗的引种晚于日本鳗,养殖规模也较小,人为因素对天然种群的遗传多态性尚未产生显著的影响,但应引起重视。从遗传距离来看,日本鳗和欧洲鳗 0.747,日本鳗和美洲鳗为 0.668,欧洲鳗和美洲鳗 0.211。欧洲鳗与美洲鳗间的亲缘关系较近,遗传差异较小,而日本鳗则与它们存在着较大差异,这与 3 种鳗鱼的天然分布及形态分类是一致的。

参考文献:

- [1] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymor-

- phisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucl Acids Res, 1990, 18; 6 531 - 6 535.
- [2] 邹喻萍. RPAD 分子标记简介[J]. 生物多样性, 1995, 3(2): 104 - 108.
- [3] 徐吉臣, 朱立煌. 遗传图谱中的分子标记[J]. 生物工程进展, 1992, 12(5): 1 - 5.
- [4] Penner G A, Clarke J, Bezte L J, et al. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA(RAPD) analysis laboratories[J]. PCR Methods Applic, 1993, 2: 341 - 345.
- [5] Castellanos C, Barragan C, Rodriguez M C. Detection of four porcine Y-specific markers by RAPD[J]. Anim Genet, 1996, 27: 433.

RAPD analysis of genetic structure and molecular genetic markers of stock identification in three different species of eel populations

YANG Hong, WANG Xi-dao, WU Ting-ting, XIA De-quan

(Freshwater Fisheries Research Center,

Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: In 32 random primers selected for use, 20 were chosen to amplify the individuals' DNAs of *Anguilla japonicus* (20 inds), *A. anguilla* (22 inds) and *A. rostrata* (20 inds) by RAPDs. The DNA samples were extracted from the vein blood of the eels. The 20 primers could generate 1 - 13 amplification bands for each species with fragments sized from 500 to 2 300 bp. Among the 20 primers, 14 could produce 37 special genetic markers which could identify the three species of eels. Within population *A. japonicus*, there was 0.885 similarity between individuals and within population *A. anguilla* 0.717, within population *A. rostrata* 0.686. There was 0.582 similarity between *A. japonicus* and *A. rostrata*, and 0.880 between *A. rostrata* and *A. anguilla* and 0.557 between *A. anguilla* and *A. japonicus*. The genetic distances were 0.747 between *A. anguilla* and *A. japonicus*, 0.668 between *A. japonicus* and *A. rostrata*, 0.211 between *A. anguilla* and *A. rostrata*.

Key words: *Anguilla japonica*; *Anguilla anguilla*; *Anguilla rostrata*; RAPD; stock identification

(P268 continued)

Research progress on feed attractant for aquatic animals

WANG An-li¹, MIAO Yu-tao², WANG Wei-na², HU Jun-rong³

(1. College of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

2. College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China;

3. Library, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: The author reviews the effects and study progress of some feed attractants for aquatic animals, including amino acids, bio alkaloid, lipids, carbohydrate, organic acids, S-containing organic compounds and animal & plant products. The conclusion is that feed attractant can reduce the waste of feed and improve the feed efficiency of aquatic animals, and furthermore, the aquaculture water pollution can be avoided. So the research on it is very necessary.

Key words: aquatic animals; attractant; feed