

## 中华鳖群体 DNA 指纹分析中的 RAPD 技术优化

王忠华<sup>1</sup>, 尹尚军<sup>1</sup>, 高佳<sup>1</sup>, 黄雪贞<sup>1,2</sup>, 钱国英<sup>1</sup>

(1. 浙江万里学院 生物技术研究所, 浙江 宁波 315100; 2. 上海海洋大学 生命科学学院, 上海 201306)

**摘要:**以中华鳖(*Pelodiscus Sinensis*)4种不同区域代表性群体黄河鳖、太湖鳖、台湾鳖和日本鳖为研究材料,采用不同反应条件(如退火温度和循环次数等)对 RAPD 扩增技术进行了优化研究,结果表明,在条件优化后(退火温度为 38℃,循环次数为 40 次)有 20 个 RAPD 引物在 4 个群体中均有扩增条带,其中随机引物 S105 能将黄河鳖群体和太湖鳖、台湾鳖、日本鳖群体区分开;随机引物 S327 能将日本鳖群体鉴别出来;而随机引物 S474 可将台湾鳖群体与其他群体分开。由此表明,退火温度和循环次数的优化有利于中华鳖 RAPD 鉴定技术的建立。本研究旨在为中华鳖的种质鉴定与保护提供技术支撑。[中国水产科学, 2010, 17(6): 1346-1351]

**关键词:** 中华鳖; RAPD 标记; DNA 指纹; 种质鉴定

中图分类号: S94

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)06-1346-06

中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)俗称团鱼、甲鱼、王八等,隶属于爬行纲(Reptilia)、龟鳖目(Testudinata)鳖科(Tironychidae)、鳖属(*Peodiscus*)<sup>[1]</sup>。在中国除西藏、青海及新疆外其他地区均有分布,以长江流域和华南地区为多见,国外主要分布于朝鲜、日本和越南。近 20 年来,中华鳖在中国的养殖业得到了长足发展,养殖产量居世界之首,但由于种质保护意识与技术的缺乏,大量境外走私鳖涌入中国,中华鳖种质出现退化、品种混杂等现象<sup>[2]</sup>,极大地限制和影响了中华鳖养殖业的可持续发展。由此开展中华鳖不同区域群体的 DNA 指纹分析是很有必要的。

随机扩增多态 DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)<sup>[3]</sup>是 20 世纪 90 年代发展起来的一种 DNA 分子标记技术,已广泛用于种群遗传结构分析及种群鉴定、种间或种内亲缘关系及系统进化研究、杂交育种等研究领域。目前利用 RAPD 分析中华鳖的研究并不多,主要有刘至治、蔡完其等<sup>[4]</sup>对中华鳖五群体(洞庭湖鳖、鄱阳湖

鳖、太湖鳖、黄河鳖和淮河鳖)的遗传变异的 RAPD 分析,以及肖亚梅等<sup>[5]</sup>的中华鳖种群 RAPD 分析。但上述研究均未找到中华鳖不同群体的特异性 RAPD 引物。这一方面与引物的选择有关,另一方面可能与 RAPD 反应程序中的退火温度和循环次数未达到最佳有关。因此进行中华鳖基因组 RAPD 扩增条件的优化研究有助于建立中华鳖不同群体的指纹鉴定技术。

本实验以中华鳖不同区域的 4 个代表性群体太湖鳖、黄河鳖、台湾鳖和日本鳖为材料,采用不同反应条件进行 RAPD 扩增,明确最佳条件,以期建立中华鳖的 RAPD 鉴定技术。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

选用中华鳖不同区域的 4 个代表性群体太湖鳖、黄河鳖、台湾鳖和日本鳖为实验材料。实验所用材料均采自绍兴市国家级原鳖种质基地,每种群体 12 只。

收稿日期: 2009-11-20; 修订日期: 2010-05-26.

基金项目: 浙江省科技厅重大项目(2006C12011).

作者简介: 王忠华 (1972 - ), 男, 副教授、理学博士, 主要从事 DNA 指纹鉴定技术研究. 并列第一作者: 尹尚军(1968-), 女, 副教授.

通讯作者: 钱国英, 教授. Tel: 0574-88222298; E-mail: qiangy@zww.edu.cn

## 1.2 基因组 DNA 提取

中华鳖基因组 DNA 采用试剂盒微量提取法进行, 具体操作步骤如下:

(1) 分别称取 50 mg 不同中华鳖群体的肌肉粉末(预先烘干磨碎)到 1.5 mL 离心管中, 用 200  $\mu$ L TE 悬浮后加 400  $\mu$ L Cell Lysis Solution 混匀, 再加入 6  $\mu$ L Proteinase K 混匀, 置于 55  $^{\circ}$ C 水浴 10 min;

(2) 加入 600  $\mu$ L 氯仿(用户自备)混匀(切勿太剧烈), 以保证 DNA 的完整性;

(3) 在台式离心机上, 10 000 r/min, 室温离心 15 min。此时应分成 3 层, 基因组 DNA 在上层中。取 500  $\mu$ L 上层清液, 置于无菌 1.5 mL 离心管中;

(4) 加入 500  $\mu$ L Precipitation Solution 混匀, 室温放置 2 min, 10 000 r/min, 离心 5 min;

(5) 吸出上清液, 注意避免吸入沉淀, 立即加入 100  $\mu$ L 1.2 mol/L NaCl, 轻轻震荡直至 DNA 完全溶解, 加入 3  $\mu$ L RNase A, 样品置于 37  $^{\circ}$ C 10 min;

(6) 加入 300  $\mu$ L 冰冷乙醇,  $-20^{\circ}$ C 下放置 1h。10 000 r/min, 离心 5~8 min, 吸走或倒掉乙醇, 用 70%乙醇洗 1 次。倒置室温干燥 10 min。DNA 用 100  $\mu$ L TE 溶解。4  $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

## 1.3 RAPD 扩增

**1.3.1 引物及 PCR 反应体系** 选用 100 多个 RAPD 扩增随机引物, 由上海生物工程公司合成, 引物长度为 10 bp, 部分引物名称与序列见表 1。

参照 PCR 反应的经典体系以及前人的研究结果<sup>[4-5]</sup>, 在本实验中, RAPD 反应总体积为 20  $\mu$ L, 反应体系如表 2 所示。

**1.3.2 PCR 反应条件** 根据引物序列及中华鳖自身特点, 分别设置了 3 种退火温度和循环次数(表 3)。

**1.3.3 PCR 产物检测** 取 5  $\mu$ L PCR 扩增产物用 1.2%琼脂糖凝胶上电泳, 电泳条件为 80 V 稳压电泳 1h, 溴酚兰作电泳指示剂, 缓冲液为 1 $\times$ TBE, 紫外凝胶成像仪观察, 用凝胶成像设备摄像并通过与 DNA 标准分子量 Marker 比较分析结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 中华鳖基因组 DNA 的提取效果

将所提取的中华鳖基因组 DNA 在 1%琼脂糖凝胶上电泳(图 1)。由图 1 可见, 琼脂糖凝胶电泳时各样品泳道均出现 1 条明显的特异亮带, 这表明中华鳖基因组 DNA 已成功地提取出。但同时发现, 有些泳道出现了一些拖尾现象, 这与 DNA

表 1 部分 RAPD 随机引物名称及其序列  
Tab. 1 Name and sequence of partial RAPD primers

引物名称 Primer name	序列 5'-3' Sequence 5'-3'	引物名称 Primer name	序列 5'-3' Sequence 5'-3'
S4	GGACTGGAGT	S125	CCGAATTCCC
S5	TGCGCCCTTC	S236	ACACCCACACA
S21	CAGGCCCTTC	S238	TGGTGGCGTT
S23	AGTCAGCCAC	S321	TCTGTGCCAC
S36	AGCCAGCGAA	S325	TCCCATGCTG
S37	GACCGCTTGT	S327	CCAGGAGGAC
S41	ACCGCGAAGG	S335	CAGGGCTTTC
S43	GTCGCCGTCA	S336	TCCCCATCAC
S60	ACCCGGTCAC	S337	CCTTCCCCT
S61	TTCGAGCCAG	S465	CCCCGGTAAC
S65	GATGACCGCC	S468	ACATCGCCCA
S104	GGAAGTCGCC	S471	AACGCGTCGG
S105	AGTCGTCCCC	S472	AAGGGCGAGT
S121	ACGGATCCTG	S474	CCAGCCGAAC
S123	CCTGATCACC	S475	GGAAGCCAAC

表 2 PCR 反应体系  
Tab. 2 PCR reaction system

组分 Composition	体积/ $\mu\text{L}$ Volume
10 $\times$ Buffer	2
MgCl <sub>2</sub>	1.6
dNTP	0.4
Taq 酶	0.25
引物 Primer	2
DNA 模版 DNA template	1
ddH <sub>2</sub> O	20

表 3 PCR 反应条件设计  
Tab.3 Condition designing of PCR

退火温度/ Annealing temperature	延伸时间 Time	循环数 Circles
94	3 min	
94	45 s	
36, 38, 40	45 s	35,40,45
72	90 s	
72	10 min	

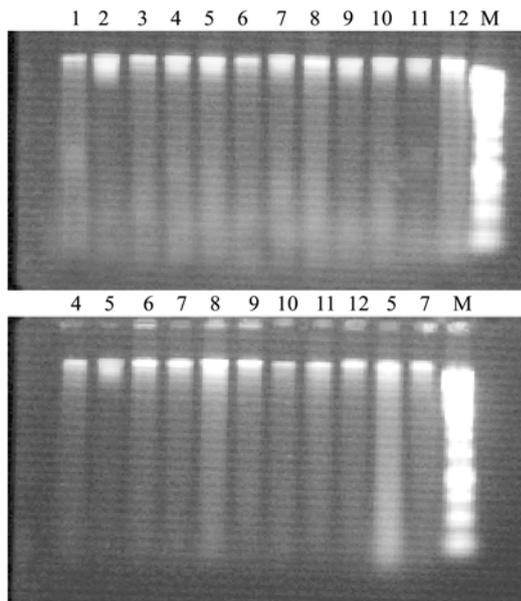


图 1 中华鳖基因组 DNA 电泳图

M: Marker, DL2000; 1-12: DNA 样品

Fig.1 Electrophoretogram of DNA extracted from *Pelodiscus sinensis*

M: Marker, DL2000; Lanes 1-12 were DNA samples from different population of *Pelodiscus sinensis*.

中存在少量蛋白质和 RNA 等杂质有关,但这并不妨碍基因组的 RAPD 扩增,因为 RAPD 技术对 DNA 的纯度要求并不十分苛刻<sup>[3]</sup>。

## 2.2 不同退火温度对中华鳖基因组 RAPD 扩增效果的影响

分别采用 36、38、40 的退火温度对中华鳖不同群体混合基因组进行 RAPD 扩增(表 3)。由表 4 可见,大部分引物在 38 退火温度条件下特异性条带最多;36 次之;40 最少。由此表明,进行中华鳖基因组 RAPD 分析时,退火温度以 38 为宜。

## 2.3 不同循环次数对中华鳖基因组 RAPD 扩增效果的影响

分别采用 35 次、40 次、45 次的循环次数对中华鳖不同群体混合基因组进行 RAPD 扩增(表 5)。由表 5 可见,大部分引物在 40 次循环次数条

表 4 不同退火温度对 RAPD 扩增效果  
(特异性条带数)的影响

Tab. 4 Effects of different annealing temperature on RAPD amplification (numbers of bands)

引物名称 Primer	退火温度/ Annealing temperature		
	36	38	40
S4	5	8	3
S36	5	7	2
S41	7	6	3
S60	6	8	3
S104	7	9	2
S335	7	9	3
S465	5	5	2
S474	6	8	3

表 5 不同循环次数对 RAPD 扩增效果  
(特异性条带数)的影响

Tab. 5 Effects of different cycle numbers on RAPD amplification (numbers of bands)

引物名称 Primer	循环次数/次 Cycle numbers		
	35	40	45
S4	1	7	5
S36	2	5	6
S41	2	5	3
S60	1	6	4
S104	2	6	4
S335	1	5	3
S465	0	4	2
S474	2	6	3

件下特异性条带最多; 45 次之; 35 次最少。由此表明, 进行中华鳖基因组 RAPD 分析时, 循环次数以 40 次为宜。

#### 2.4 最佳反应条件下中华鳖 RAPD 扩增效果

本实验选择了部分引物在最佳反应条件下对中华鳖基因组 DNA 进行 RAPD 分析, 结果发现随

机引物 S105 能将黄河鳖群体和太湖鳖、台湾鳖、日本鳖群体区分开; 随机引物 S327 能将日本鳖群体鉴别出来; 而随机引物 S474 可将台湾鳖群体与其他群体分开(图 2)。由此表明, 在退火温度为 38℃, 循环次数为 40 次的扩增条件下, RAPD 技术可用于鉴别不同区域养殖的中华鳖群体。

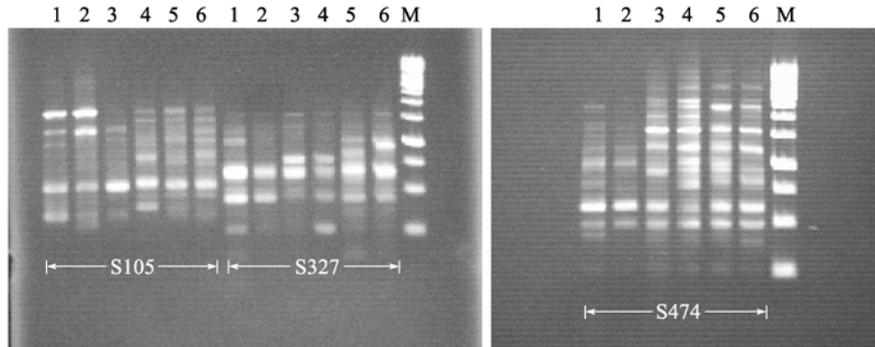


图 2 部分 RAPD 引物的 PCR 扩增结果

M: Marker, DL2000; 1、2: 黄河鳖; 3、4 只太湖鳖混合 DNA 样品;  
4: 4 只台湾鳖混合 DNA 样品; 5、6: 日本鳖。

Fig.2 PCR amplification of partial RAPD primers

M: Marker, DL2000; Lanes 1, 2, 3, 4, 5, 6 were samples from Huanghe, Taihu, Taiwan and Japanese populations, respectively.

### 3 讨论

#### 3.1 RAPD 技术在遗传多态性研究中的应用

20 世纪 70 年代前, 检测鱼类、虾类和贝类等水产生物的遗传多态性主要采用蛋白质电泳技术。蛋白质电泳技术虽然反映了 DNA 水平的差异, 但它仅仅是对基因产物的分析, 即检测的是基因的表型, 在转录和转译区域上的小序列变化不可能改变蛋白质的功能或电泳迁移率, 因此在分析群体遗传多样性过程中, 具有它的局限性。以 RFLP 为代表的第一代分子标记技术, 使遗传变异检测从传统的基因产物(蛋白质等)水平发展到直接检测 DNA 序列本身, 灵敏度极高, 但由于 RFLP 技术成本较高, 操作比较复杂, 工作量大, 特别对于分子遗传背景不清, 且无 DNA 探针可言的生物种类的遗传变异进行检测, 采用 RFLP 就受到很大的限制<sup>[9]</sup>。

RAPD 技术可提供直接在 DNA 水平上检测群体的差异, 不仅直接可靠, 而且灵敏度高, 操作简单, 可以在未知任何遗传背景的情况下对受试生

物进行检测。由于 RAPD 采用的是单个随机引物, 引物在 DNA 模板链上的结合位点及位点之间的距离事先是无法确定的, 通常只有 2 个结合位点之间的距离在 3 kb 范围内才是有效的<sup>[6]</sup>。RAPD 分析时可供选用的引物数很多, 虽然对每一个引物而言, 其检测的基因组 DNA 多态性的区域是有限的, 但利用一系列引物则可使检测区域覆盖整个基因组。因此, RAPD 可对整个基因组进行多态性检测<sup>[7]</sup>。由此可见, RAPD 技术是迄今研究遗传变异最简单快速的方法之一<sup>[8]</sup>。本研究采用 RAPD 技术, 不仅具有 RFLP 技术的优点, 而且方法简便迅速, 适于进行更广泛的遗传多态性分析。本结果表明, 采用 RAPD 技术对中华鳖进行遗传多样性检测是合适的。

#### 3.2 反应体系对 RAPD 扩增的影响

基因组 DNA 的质量对 RAPD 反应有着重要的影响<sup>[10]</sup>, 提取得到高质量的中华鳖基因组 DNA, 才能进行中华鳖 RAPD 反应体系的研究。本实验通过试剂盒抽提法和 CTAB 提取法, 提取

中华鳖 DNA, 进行 RAPD 分析。试剂盒抽提法所提取的 DNA 纯度较高, 更适用于中华鳖的 DNA 提取。CTAB 法适合于大量提取, 但初提取的 DNA 纯度不高, 电泳结果显示, DNA 滞留在孔中, 出现大团状的亮点, 而没有出现明显的亮带(数据尚未发表)。因此在进行中华鳖基因组 RAPD 分析时, 建议采用试剂盒提取法为宜。

引物质量、引物浓度是 PCR 失败或扩增条带不理想的常见原因。本实验开展初期, PCR 扩增结果不理想, 结果发现这与引物浓度过高有关。由于引物为短的核苷酸序列, 应高浓度小量分装保存, 防止多次冻融或长期放冰箱冷藏部分, 导致序列降解失效。

Mg<sup>2+</sup>离子浓度对 PCR 扩增效率影响很大, 浓度过高可降低 PCR 扩增的特异性, 浓度过低则影响 PCR 扩增产量甚至使 PCR 扩增失败而不出扩增条带。在本实验中未出现 Mg<sup>2+</sup>浓度对 RAPD 扩增效果产生影响的情况, 这表明中华鳖基因组 RAPD 不需要特别浓度的 Mg<sup>2+</sup>。

由于随机引物碱基序列的随机性, 使它们可能无法在模板上找到完全合适的配对序列。配对不稳定也导致 RAPD 结果很难重复。因此, 筛选合适的引物对于解决 RAPD 结果的重现性问题至关重要。本实验对引物筛选做了大量的尝试, 淘汰了大部分引物。

### 3.3 反应条件对 RAPD 扩增的影响

通过反应条件的优化和适当的结果处理是提高 RAPD 结果可靠性的必要手段。反应条件最重要的参数为退火温度、时间和循环次数<sup>[3, 11]</sup>。本实验分别选用了 3 种退火温度和 3 个循环次数进行中华鳖基因组 RAPD 扩增条件的优化, 结果显示不同的退火温度和循环次数对中华鳖基因组 PCR 扩增位点数有较大的影响。这主要与中华鳖基因组特异序列有关。

RAPD 图谱中条带的选择方法对于 PCR 产物分析也是非常重要的。扩增条带中一般只选择可

以被重复扩增的片段用于最后结果的分析, 而且一些弱带及大于 2 000 bp 和小于 200 bp 的 DNA 片段均不计入结果分析。Moeller 等<sup>[12]</sup>认为, RAPD 结果分析时, 不在于所使用的引物多少和得到的用于分析的条带多少, 关键在于这些用于分析的条带所提供的遗传信息的可信度大小, 如果所分析的条带都真实的反映了一个位点上的差异, 就可以得到可靠的结果。另外, 在扩增条带的取舍上, 条带的强弱不能作为取舍的指标。本实验在结果分析时, 基本上只选用可重现的亮带进行分析。

### 参考文献:

- [1] 王培潮. 中国的龟鳖[M]. 上海: 华东师范大学出版社, 2000: 55-56.
- [2] 沈雪达, 张勤国, 朱伟伟. 中国中华鳖产业现状与发展对策[J]. 甘肃农业, 2006(1): 48-52.
- [3] Williams J G L. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nuc Aci Res, 1990, 18: 6531-6535.
- [4] 刘至治, 蔡完其, 李思发. 中华鳖五群体遗传变异的 RAPD 分析[J]. 水产学报, 2004, 28(2): 119-126.
- [5] 肖亚梅, 陈丽莉, 陈合格, 等. 中华鳖种群 RAPD 分析[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2005, 28(3): 72-75.
- [6] 邱高峰, 常林瑞. 中国近海中国对虾种群遗传差异的 RAPD 分析[J]. 上海水产大学学报, 2001, 10(1): 1-5.
- [7] 季维智, 宿宾主编. 遗传多样性研究的原理和方法[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1999: 130-136.
- [8] 邱涛, 陆仁后, 项超美, 等. 用 RAPD 技术识别中华绒螯蟹性别差异[J]. 水产学报, 1998, 22(2): 175-175.
- [9] Liu Z J, Cordes J F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics[J]. Aquaculture, 2004, 238: 1-37.
- [10] Porebski S, Bailey L G, Bernand R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components[J]. Plant Mol Biol Rep, 1997, 15(1): 8-13.
- [11] 郑光明, 马丽莎, 朱新平, 等. 平胸龟 2 个地理种群遗传差异的比较[J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(4): 510-514.
- [12] Moeller D A, Schaal B A. Genetic relationships among native American maize accessions of the great plains assessed by RAPDs[J]. Theor Appl Genet, 1999, 99: 1061-1067.

## Optimization of RAPD technique of fingerprinting analysis of *Pelodiscus sinensis* populations

WANG Zhonghua<sup>1</sup>, YIN Shangjun<sup>1</sup>, GAO Jia<sup>1</sup>, HUANG Xuezheng<sup>1,2</sup>, QIAN Guoying<sup>1</sup>

(1. Institute of Biotechnology, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China; 2. College of Biological Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Four populations of *Pelodiscus sinensis* from Yellow River, Taihu Lake, Taiwan and Japan were used to optimize PCR amplification conditions to develop DNA fingerprinting technology by RAPD primers. The results showed 20 RAPD primers could amplify PCR products in four different populations under the optimization conditions. The result also demonstrated that PCR products amplified by RAPD primer S105 in *sinensis* population Yellow River were different from those in other three populations, while RAPD primers S327 and S474 could differentiate Japan and Taiwan populations from other three populations, respectively. Therefore, the optimization of annealing temperature and cycles numbers is beneficial to the development of RAPD technique of *P. sinensis*. Meanwhile, the reasonability and its affecting factors of RAPD technique was also briefly discussed in this paper, which can provide the interest information for similar researches. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010,17(6): 1346–1351]

**Key words:** *Pelodiscus sinensis*; RAPD marker; DNA fingerprinting; germplasm identification

**Corresponding author:** QIAN Guoying. E-mail: qiangy@zww.edu.cn

## 书 讯

《科技论文规范写作与编辑》由清华大学出版社于 2010 年 6 月出版发行, 由《机械工程学报》编辑部梁福军博士撰写。

该书是作者在总结长期工作实践经验的基础上, 将科技论文写作与编辑融为一体, 以有关国家标准、规范以及现代汉语语法等为依据, 并结合大量实例撰写而成, 有很强的针对性、指导性和实用性。

全书共分 8 章。内容包括科技论文的基础理论和知识, 科技论文各组成部分及其中量、单位、插图、表格、公式、数字、字母、词语等的规范使用与表达, 现代汉语书面语的使用及科技论文的常见语病, 英文规范表达的原则及英文标点符号的正确使用等。本书约 605 千字, 175×245 开本, 430 页, ISBN 978-7-302-21710-7, 定价 45 元。

本书特点: 全面系统, 实例丰富。论述与实例相结合, 很多实例及分析渗透着作者长期的工作经验及创新研究成果。以点带面, 层次清晰。抽象问题具体化, 复杂问题简单化, 帮助读者带着问题学习, 解决实际写作、编辑中遇到的问题。分散难点, 循序渐进。帮助读者由浅入深地理解和掌握论文规范表达的原则和技巧。抛砖引玉, 读者之友。使读者领悟并掌握写作、编辑技巧, 推动同行之间的交流研讨。

本书适合科研、工程技术人员等科技工作者和科技期刊、图书、网络出版编辑参考, 也可作为高等学校教师、学生的论文写作参考或自学用书, 以及科技写作、编辑的培训教材或学习材料。

读者可以通过《机械工程学报》编辑部网站 <http://www.cjmenet.com.cn> 主页中的“《科技论文规范写作与编辑》订购通知”框, 下载“订购信息反馈单”填写后发到联系人邮箱, 或进入订购通知页面在线填写并提交。

联系人: 卞波 Tel: 010-88379907 李楠 Tel: 010-88379909

传真: 010-88379504 E-mail: fjliang2002@sohu.com

邮局汇款 通信地址: 北京百万庄大街 22 号《机械工程学报》编辑部 邮编: 100037

银行汇款 户名: 机械工业信息研究院 开户银行: 工行北京百万庄支行

帐号: 0200001409014473834