

文章编号:1005-8737(2000)02-0086-04

·综述·

DNA 标记技术在海洋生物种质资源开发和保护中的应用

Application of DNA - marking on exploitation and conservation
of germplasm resource of marine life

刘萍

(中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

LIU Ping

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

关键词: DNA 标记技术; 海洋生物; 种质资源

Key words: DNA - marking; marine organism; source of species

中图分类号: Q814

文献标识码: A

对自然界的生物来说, 保护天然群体的基因库, 维持生物多样性是种质资源开发和保护的主题之一^[1]。生物多样性包括3个层次: 生态系统多样性、物种多样性和遗传多样性^[2]。其中, 遗传多样性的研究是其重要的组成部分, 又是物种多样性的基础, 是评价自然生物资源的重要依据。研究生物的遗传多样性首先要找到合适的遗传标记, 这些遗传标记应该是随机选取并能够稳定遗传, 代表生物个体的遗传组成, 可以反映出生物个体或群体的遗传学特征, 具有足够变异类型的标记组合。

遗传标记涉及生物体的表型标记、染色体的多态性、蛋白质的多态性和遗传物质 DNA 的多态性等各种不同水平。早期, 对于生物物种间关系的研究、分类鉴定等多以形态性状、生理性状、杂交的亲合性及生态地理分布等特征作为遗传标记。生物学的研究进入细胞水平后, 染色体组型的分析成为研究生物遗传多样性的重要工具。

同工酶电泳技术的问世^[3]将遗传标记技术推向了一个新的发展阶段, 在之后的20年成为研究群体遗传变异和群体间遗传分化、系统发育的主要手段。使用生物化学的方法, 通过比较不同生物在基因表达产物之间的差异来研究物种的遗传多样性, 是一种鉴别物种的生化遗传标记技术。

收稿日期: 1999-07-15

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目(39630260)

作者简介: 刘萍(1962-), 女, 辽宁省兴城人, 中国水产科学研究院黄海水产研究所副研究员, 硕士, 主要从事海洋经济动物种质资源与遗传育种以及对虾病毒诊断技术的研究工作。

1 DNA 标记技术在海洋生物种质资源开发和保护中的研究方法

1.1 随机扩增多态性 DNA (RAPD)

随机扩增多态 DNA 技术简称为 RAPD 技术, 是以一系列不同的随机排列碱基顺序的寡核苷酸单链(通常是十聚体)为引物, 对所研究的基因组 DNA 进行单引物扩增。扩增产物片段的多态性反映了基因组相应区域的 DNA 多态性。Williams 等^[4]首次运用随机引物扩增寻找多态 DNA 片段作为分子遗传标记。Welsh 等^[5]也发现以任意寡核苷酸作为引物对基因组 DNA 进行扩增, 产物的扩增图谱表现出高度的变异性。

RAPD 技术是一种全新的研究基因组遗传标记的方法, 具有相对简便、易于操作, 省时省力, 无需专门设计引物, 产物遗传多样性丰富等优点。其原理是采用一系列不同的寡核苷酸单链引物, 对所研究的基因组 DNA 进行单引物扩增。模板 DNA 经 90℃ 变性解链后, 在较低的温度下(低于 40℃)退火, 这时形成的单链模板会有许多位点与引物互补配对形成双链结构, 完成 DNA 合成, 即产生片段大小不等(200~4 000 bp)的扩增产物, 扩增产物片段的多态性反映了基因组相应区域的 DNA 多态性。尽管 RAPD 技术诞生的时间短, 但由于其独特的方式得到广泛应用, 可用于基因的分离、克隆和 DNA 序列分析, 突变体和重组体的构建、基因表达与调控的研究, 遗传病和传染病的诊断、法医鉴定等诸多方面, 还可用于基因多态性(遗传多样性)的检测。

RAPD 技术也有其自身的局限, 主要表现在以下方面:

(1) RAPD 标记呈现显性孟德尔分离方式, 所以 RAPD

标记技术难以区分显性纯合和杂合基因型,即不能鉴别出杂合子。

(2) RAPD 反应受诸多因素的影响,其特异性和重复性是该技术的关键,只有严格地控制实验条件,优化选择最佳的试剂浓度,才能得到可重复的扩增效果。

1.2 限制性酶切片段长度多态性(RFLP)

RFLP 是 80 年代中期发展起来的一种研究遗传多样性的新技术。是指由于 DNA 分子中限制性内切酶切点之间的插入、缺失、重排或点突变导致酶切位点的增减所引起的基因型间限制性片段长度的差异^[6,7]。严格地讲,RFLP 是指基因组 DNA 用已知的限制性内切酶消化,经电泳印迹后用 DNA 探针进行杂交,放射自显影后所得到的多态性图谱。且对 PCR 扩增产物也可以用已知的限制性内切酶酶切进行 RFLP 分析。这是因为物种由于长期的进化,使得生物属间、种间和种群间同源 DNA 序列上限制性内切酶位点的不同,或者由于点突变、重组、转换、插入、缺失等原因造成限制性内切酶位点的改变,从而引起 RFLP 的产生与变异。与形态学 and 同工酶技术相比,RFLP 技术有其自身的优点:

(1) RFLP 标记数目的无限性 因为 RFLP 标记来源于 DNA 的自然变异,在数量上几乎不受限制,可以随机选取足够数量能代表整个基因组的 RFLP 标记,因此,可产生和获得能反映物种遗传物质的大量多态性,用于物种的分类或构建高密度的遗传图谱。

(2) RFLP 标记的共性 大部分 RFLP 标记符合孟德尔遗传的共显性,杂种 F_1 代显示出双亲的 RFLP 标记,而 F_2 代自由分离,因而很容易将杂合子和纯合子分离。

(3) RFLP 标记的稳定性 由于 RFLP 标记是研究物种的遗传物质本身,不象形态学 and 同工酶标记是研究基因表达的产物,甚至是多基因控制的表现型。因此,不受显隐性、环境、发育阶段和组织特异性的影响,可以检测到编码区和非编码区的变异。

RFLP 作为分子水平上的遗传标记,有其独特的优点和充分的可靠性,当然也具有自身的局限性,主要表现在:RFLP 标记的获得依赖于限制性内切酶识别位点中碱基的改变,这在很大程度上限制了 RFLP 技术的应用。

1.3 线粒体 DNA(mtDNA)

80 年代以来,线粒体 DNA 由于具有进化速度快,母系遗传和分子简单易于分析等特点而成为研究近缘种间和种内群体间遗传分化的有力工具。在真核生物的细胞内,大约 99% 的 DNA 存在于细胞核内,余下的 1% 存在于细胞核外。动物细胞的 mtDNA 是共价闭合的双链 DNA,基因组小,分子量范围在 14~26 kb 之间,基因组中不含间隔区与内含子,无重复序列,无不等交换,无基因重组、倒位、易位等畸变。与核基因组不同的是线粒体基因组严格遵守母系遗传方式,因而 1 个个体就可以反映出整个母系集团的情况。目前,关于 mtDNA 的研究方法有 3 种,即 mtDNA 的 RFLP 分析;对 mtDNA 中的特定片段进行序列分析;提取细胞总

DNA,用限制性内切酶消化处理,用另 1 种 mtDNA 作为探针进行杂交来研究这 2 种生物之间的亲缘关系。

mtDNA 技术的不足之处是 mtDNA 进化较同工酶慢,即每百万年 2%、或每百万年 3 bp,即使自冰河期更新世以来完全隔离了的种群,离异也较微。

1.4 扩增片段长度多态性(AFLP)

AFLP 是 1993 年由荷兰科学家发明的一种 DNA 标记技术。其原理是提取基因组 DNA,并对其进行限制性酶切,产生分子量大小不等的酶切片段,将其两端连接在特定的接头上,形成一个两端带接头的特异片段,通过接头序列和 PCR 的引物识别,对 DNA 片段进行 PCR 扩增,最后经过电泳对这些片段进行分离。AFLP 技术具有谱带丰富、样品用量少、灵敏度高、快速高效等特点,可应用于遗传多样性研究,识别定位基因,构建遗传图谱,鉴定品种等领域。

1.5 单链构型多态性(SSCP)

SSCP 技术的基本原理是根据双链 DNA 经变性处理为单链 DNA 后进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,由于 DNA 分子在凝胶电泳中的迁移率与其自身的分子量和空间构型有关,在非变性条件下,ssDNA 受分子内力的作用形成卷曲的构型,这种结构与 ssDNA 的序列有关。ssDNA 在凝胶板上位置的差异反映了 DNA 序列的差异。SSCP 技术可以检测到点突变和多态性位点。SSCP 技术与 PCR 技术相结合,在检测癌症和遗传性疾病突变位点和多态位点上发挥了重要作用^[8]。再与 RFLP 技术相结合,形成了 PCR-RFLP-SSCP 技术,扩大了 SSCP 技术的使用范围,并提高了突变检测的敏感性和灵敏度。

1.6 DNA 序列测定(DNA Sequencing)

该技术在现代分子生物学中占有举足轻重的位置,基因的分离、定位、转录、复制的调控、基因产物的表达、基因工程载体的组建、基因片段的合成、放射性探针的制备、基因工程产物水平的提高等,都与对基因组一级结构的详细了解有密切关系。其原理是使用酶学和化学方法,将待测定的 DNA 片段成为携带标记,然后,使 DNA 片段在凝胶电泳中进行分离。由于具有相同末端的片段在同一泳道中分离,因而 DNA 序列可以直接从电泳中读出。

1.7 微卫星 DNA(Satellite DNA)

在真核生物的基因组中,除单拷贝的 DNA 序列外,还存在着大量的重复序列,是由 1 个短序列经串联重复形成。根据核心序列长度不同,将这些重复序列分为小卫星 DNA 和微卫星 DNA。小卫星 DNA 重复单位长度为十几到几十个碱基,1 个小卫星长度为几十个到几千个碱基不等,因而显示出限制性长度多态性。微卫星 DNA 位点也具有高度限制性长度多态性,多态小卫星 DNA 及微卫星 DNA 位点能以孟德尔方式稳定遗传和分离。许多实验已证实同一个体的体细胞和生殖细胞的卫星 DNA 指纹图谱完全一致,大大提高了遗传分析的效率。

2 DNA 标记技术在海洋生物中的应用

与陆地生物相比,海洋生物分子遗传标记技术目前还相对落后,制约着海洋生物种质资源的开发和利用。将现代生物学技术引入海洋领域,建立完善一套快速、准确、有效的分子遗传标记技术,应用于海洋生物的物种鉴定、家系确定和分析、近交测定、种群遗传结构分析、标记辅助选育,以及寻找更多的与优良性状相关的遗传标记,进行基因作图、定位分离、控制重要经济性状的基因,已经成为世界各国海洋生物资源开发和研究的重点之一,也是海洋生物学的热门研究领域。

2.1 混合渔业分析

在海洋渔业中,了解鱼类的来源及组成非常重要。对于洄游性鱼类来说,其产卵场所在的国家或地区拥有的资源,并非由捕捞区决定。因此,区分捕捞区的鱼类来源很重要。如在太平洋马哈鱼(*Oncorhynchus* spp)渔业中应用同工酶技术进行混合渔业分析取得了成功^[9]。由于太平洋马哈鱼来自不同河流的产卵群体,有各自不同的进化方式,因而其群体遗传结构也不相同。在捕捞时可以加以区分,以保护一些遗传多样性脆弱的群体而捕捞过剩的群体,可以通过对不同基础群体基因频率以及混合渔业基因频率进行估算。

Wrgin 等^[10]运用 mtDNA 分析技术进行了条纹鲈混合渔业分析,发现加拿大的条纹鲈的几个群体与哈得逊河和 Chesapeake 海湾的不同,提出了恢复加拿大条纹鲈群体的方法是应以加拿大群体为孵化群体,而不应选用美国条纹鲈,以防止异源群体对地方群体的遗传影响。

2.2 人工增殖放流效果评估

人工增殖放流通常是为了恢复某一地方群体的数量,采取移植同种不同群体或放流人工孵化苗种。但移植或放流的苗种与天然种群是否发生作用只有通过生物技术才可以监测到。

2.3 家养群体与野生群体的遗传差异

Danzmann^[11]研究了加拿大溪红点鲑的 2 个人工繁育群体和 2 个天然群体 mtDNA RFLP,运用 51 种内切酶,其中 11 种显示出多态性,可以组成 9 个母系。不仅找出了可区分繁育群体和天然群体的遗传标记,而且也找出了可区分 2 个繁育群体和 2 个天然群体的遗传标记。应用这些遗传标记,可以监测家养品系在天然水域的繁殖行为,防止天然基因库的遗传污染。

2.4 系统演化、种及种间鉴定

有些种类外部形态非常相似,以至难以确定其具体分类地位,种与种之间的亲缘关系依外部形态的相似程度来判断其亲缘关系的远近能否代表遗传构成的类同,必须借助分子生物学方法进行区分。

2.5 遗传渐渗监测

如果不同种或不同种群个体发生了交配则基因流发生,天然基因流对物种进化是有益的,但人为造成的大量基因流

可能会破坏物种天然基因库。运用同工酶技术可以监测出杂交 F_1 代,但多代回交后同工酶技术则难以监测到遗传渐渗。而 mtDNA 由于母性遗传特征能监测到多代回交后母性杂交情况。因此,同工酶技术必须与 mtDNA 分析技术相结合研究遗传渐渗。目前,由人为养殖活动、人工放流引起的种内不同群体间非自然遗传渐渗已相当普遍。

2.6 濒危物种的保护

1973 年美国濒危物种保护纲要规定,物种保护应建立在对种、亚种及群体 3 个水平上。遗传结构资料不仅可区分不同群体或亚种,还可以确定群体遗传变异的大小,是划分亚种及种群保护的重要依据^[12]。在重建濒危物种种群时必须考虑到人工移植群体与本地群体的遗传结构是否相同,防止外来群体对地方群体的排斥作用,对于引进或移植物种应持十分谨慎的态度,以达到真正保护濒危物种的目的。利用 RAPD 技术可监测遗传变异,根据不同群体遗传多样性大小以及各群体遗传结构特征提出具体的保护措施。

3 在我国海洋生物种质资源开发和保护中的应用前景

美国 90 年代开始实施高健康对虾和无特异病原虾的系统工程,同时将分子遗传标记技术应用于该项目之中,先后使用 RFLP、RAPD、微卫星 DNA 技术对斑节对虾(*Penaeus monodon*)、凡纳对虾(*P. vannamei*)的遗传多样性及种群的遗传结构进行了调查和评估,指导了高健康虾的选育工作,已经培育出高健康虾和无特异病原虾品系^[13,14],并得到了这些品系的特征分子标记。Wolfus 等人在 1997 年还发现凡纳对虾的生长速度和抗病能力的下降与这些位点上遗传变异水平的降低有关^[15]。

目前,RAPD 标记已经应用到群体遗传学研究中,检测种群内和种群间的遗传多样性,并为种群的识别提供可靠的遗传标记。澳大利亚利用 RAPD 技术分析斑节对虾不同地理群体间的遗传差异,并就其在虾类标记选育中的应用作了初步探讨^[16]。显而易见,RAPD 技术在海洋生物种质遗传学研究中有着很好的应用前景。特别是在海水虾类中同工酶所表达和揭示的种内水平的遗传变异水平非常低,而 RAPD 技术可以填补同工酶的技术空白。

我国的海水鱼、虾、贝等种类繁多,其中不少优良种类,如中国对虾、栉孔扇贝、鲍、刺参、真鲷和牙鲆等。近年来,我国又先后从国外引进了海湾扇贝、美洲凡纳对虾、红绿鲍等优良种类,进一步丰富了我国海水养殖的品种资源。但是,我国人工养殖用的苗种基本上没有经过系统的人工选育,其遗传基础还是野生型的,生长速度、抗病能力乃至品质质量还没有象农业、畜牧业那样达到良种化程度。应用现代分子生物学技术,快速确定优良性状的分子标记,结合遗传学原理,可缩短良种选育周期,在 3~5 年内培育出优良品种。从野生种中选择生长快、抗病力强的家系,是我国实现集约化养殖的根本,也是人们不懈追求的目标。筛选与保存高产、优质、抗逆的种质,是把我国海水养殖业推向新的台阶必不

可少的重要环节。

参考文献:

- [1] 李思发. 主要养殖鱼类种质资源研究进展[J]. 水产学报, 1993, 17(4): 344 - 358.
- [2] 许再复. 生物多样性保护的现状趋势与展望[J]. 未来十年的生物科学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991. 88 - 100.
- [3] Lewontin R C. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura* [J]. Genetics, 1966, 54: 595 - 609.
- [4] Williams J G, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucl Acids Res, 1990, 18: 6 531 - 6 535.
- [5] Welsh J, Petersen C, M McClelland. Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic [J]. Nucl Acids Res, 1991, 19: 303 - 306.
- [6] Avise M C. Polymorphism of mtDNA in populations of higher animals[A]. Nei M, Koehn R K, eds. Evolution of Gene and Proteins, Sinauer, Sunderland[M]. 1983. 147 - 164.
- [7] Brown W M, George M, Wilson A C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76: 1 967 - 1 971.
- [8] Lin J J, Kuo J. AFLP: A novel PCR - based assay for plant and bacterial DNA fingerprint[J]. Focus, 1995, 17: 52 - 56.
- [9] Waples R S. Genetic approaches to the management of Pacific salmon[J]. Fisheries, 1990, 15(5): 19 - 25.
- [10] Wrgin I. Use of mitochondrial DNA polymorphisms to estimate the relative contribution of Hudson River and Chesapeake Bay striped bass stocks to the mixed fishery on the Atlant coast[J]. Tran Am Fish Soci, 1993, 122: 669 - 684.
- [11] Danzmann R G. Genetic discrimination of wild and hatchery populations of brook charr, *Salvelinus fontinalis* (Mitchll), in Ontario using mitochondrial DNA analysis [J]. J Fish Biol, 1991, 39: 69 - 77.
- [12] 张四明. 分子生物学技术及其在渔业科学中的应用[J]. 水产学报, 1997, 21(增刊): 97 - 106.
- [13] Carr W, Sweeney J, Swingle J. The Oceanic Institute's SPF shrimp breeding program status[A]. USMSFP 10th Anniverasry Review[C]. GCRL Sprcial Pulication, 1994(1): 47 - 54.
- [14] Pruder G D. Health shrimp systems: seed supply - theory and practice[A]. C L Browdy, J S Hopkins, eds. Swimming Throught Troubled Waters. Proc of the special session on shrimp farming [C]. 1 ~ 4 February, San Diego, CA World Aquaculture Soc, Baton Rouge, LA, USA. 1995, 40 - 52.
- [15] Wolfus G M, Garcia D K, A Alcivar - Warren. Application of the microsatellite techniques for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs[J]. Aquaculture, 1997, 152: 35 - 47.
- [16] Garcia D K, A K Dhar, A Alcivar - Warren. Molecular analysis of a RAPD marker(B20) reveals two microsatellites and differential mRNA expression in *Penaeus vannamei* [J]. Mol Mar Biol Biotech, 1996, 5(1): 71 - 83.