

研究简报

鲤鱼抗寒性状的 RAPD 分析

RAPD ANALYSIS FOR THE CHARACTER OF COLD - TOLERANCE OF THE COMMON CARP

梁利群 孙孝文 沈俊宝 闫学春

(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 哈尔滨 150070)

Liang Liqun Sun Xiaowen Shen Junbao Yan Xuechun

(Heilongjiang River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Harbin 150070)

关键词 鲤鱼, 抗寒性状, RAPD, 分子标记

KEYWORDS Common carp, Character of cold - tolerance, RAPD, Molecular marker

鱼类耐寒性状是鱼类的主要经济性状之一。虽然鱼类生物学家对耐寒与不耐寒的现象做了大量的研究,但至今对鱼类耐寒与不耐寒的机理了解得还不清楚,还没有获得与鱼类耐寒有关的基因或因子。沈俊宝等^[1]用常规育种技术把黑龙江野鲤的耐寒性状成功地转移给在黑龙江省越冬不能成活的荷包红鲤,培育出荷怨红鲤抗寒品系^{*};牛鲁琪等对北方鱼类越冬期暴发性鱼病的研究发现,不同遗传背景的鲤鱼种对嗜水气单胞菌的免疫力不同,这种免疫力可能与栖息的温度有关;雷衍之等的研究也证实不同的鲤鱼种对越冬期常见鱼病的免疫能力有差异,对超低温的耐受能力也有明显的不同^{**}。这些研究结果都说明鲤鱼的不同地理种群在耐寒方面存在遗传上的差异,虽然这些差异还没有建立任何遗传标记,如果找到了这种标记,就可能克隆与鱼类耐寒性状相关的基因,并把这种基因用于一些不耐寒鱼类的遗传改良研究,其意义重大。

本实验以黑龙江野鲤、荷包红鲤抗寒品系和荷包红鲤三种鱼的基因组 DNA 为实验材料,用 RAPD 方法分析三种基因组 DNA 与不同随机引物反应的带型差异,探讨鱼类的耐寒性状并进行分子标记。

1 材料与方法

1.1 鱼类材料

黑龙江野鲤(*Cyprinus carpio haematopterus*)采自黑龙江扶远江段,荷包红鲤(Red purse carp)采自江西省婺源县荷包红鲤原种场,荷包红鲤抗寒品系(Frigid-resistant strain of Red purse carp)采自黑龙江水产研究所松浦实验场。

1.2 DNA 的提取与分离

参照《分子克隆》^[2],取 5g 肝组织,用消毒的剪刀剪碎,迅速放入含液氮的不锈钢研钵中,研成粉末状,

收稿日期:1996-08-28。

* 沈俊宝等,1988。荷包红鲤抗寒品系的形态学特征及其主要经济性状。黑龙江水产研究报告,26:12-17。

** 雷衍之,1995。我国北方鱼类越冬死亡原因及提高成活率的研究,1-9。北方鱼类越冬死亡原因及提高成活率的研究。

待液氮蒸发后把样品溶入 50ml 的裂解液中(成分:0.5M EDTA (pH8.0), 200 μ g/ml Protinack 0.5% sarcosyl)用玻璃棒搅匀,在 50 $^{\circ}$ C 水浴中消化 3 小时,在此期间要转动离心管数次。充分消化后加等体积的酚抽提三次。(为避免 DNA 断裂,每次缓慢转动离心管 10 分钟,离心分相)。吸出含 DNA 的水相,用等体积酚/氯仿(酚:氯仿:异戊醇为 25:24:1)再抽提二次,将上清液转入透析袋中,对 3 升透析液(成分:50mM Tris. Cl (pH 8.0), 10mM EDTA, 10mM NaCl)进行数次透析,直到 $CD_{270} < 0.05$ 。将透析袋中的液体转入离心管中,加入无 DNA 酶的 RNA 酶,终浓度为 100 μ g/ml,37 $^{\circ}$ C 保温 3 小时;再用酚/氯仿抽提三次,上清液再用 TE(成分:10mM Tris. Cl (pH8.0), 1mM EDTA (pH8.0)进行透析,透析后的样品用紫外分光光度计测定浓度后待用。

1.3 引物

本实验使用的引物由美国 Operon 公司出品,每个引物长度为 10 个碱基。本实验使用的引物分别为 K 系列的 1~10 号, L、H N 三个系列的 60 个引物,总计 70 个引物。

1.4 RAPD 反应条件

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(成份:100mM tris-HCl, 500mM KCl, 15mM MgCl₂, 0.01% (W/V) Gelatin, 0.05% Triton X-100); dNTP (2.5mM) 1 μ l;基因组 DNA 1 μ l (50ng/ μ l);Taq 酶 1 μ l(IU/ μ l)。

样品在 93 $^{\circ}$ C 变性 60 秒,35 $^{\circ}$ C 复性 60 秒,在 72 $^{\circ}$ C 延伸 120 秒,45 个循环,最后在 72 $^{\circ}$ C 保温 5 分钟,扩增产物在 1.4% 琼脂糖凝胶中电泳过夜,溴化乙锭染色,紫外灯下观察并拍照。

2 结果与讨论

用 70 个随机引物分别对荷包红鲤抗寒品系 DNA、黑龙江野鲤 DNA 和荷包红鲤 DNA 做 RAPD 分析,其中 OPH-0.5, OPL-0.2 等 2 个引物扩增出的结果具有特异性带型,即荷包红鲤抗寒品系和黑龙江野鲤具有而荷包红鲤没有的特殊带型,很显然这些带型表示黑龙江野鲤把遗传物质传给了荷包红鲤抗寒品系,控制荷包红鲤抗寒品系抗寒性状的基因也应在这些特异带型之中或与之相关。图 1 为具有特异性带型的 RAPD 图谱。

虽然荷包红鲤与黑龙江野鲤在鱼类分类中属同一个种,但由于荷包红鲤经长期的人工选育,已成为一个家养的品种,其形态学特性、生理、生化指标等方面已与黑龙江野鲤具有很大的不同,尤其是在抗低温方面,黑龙江野鲤长期生活在黑龙江的冰封水域,具有极强的抗寒能力;而荷包红鲤长期在不封冻的水域中驯化,因此很难忍受约半年左右的严酷低温条件,沈俊宝等在引进江西荷包红鲤的研究中发现,该鱼在黑龙江流域的越冬成活率为零。死亡的原因,可能与牛鲁琪、雷衍之等发现的不同遗传背景鲤鱼的免疫力不同有关,低温使鱼的生理机能和免疫能力下降,以及嗜水气单胞菌等病菌的侵袭,最终在越冬期生病大批死亡。沈俊宝等通过荷包红鲤与黑龙江野鲤的杂交选育,选出了具有荷包红鲤表型并能在冰下安全越冬的荷包红鲤抗寒品系(在黑龙江地区越冬成活率达到了 80%)。以上研究充分表明,不同的鲤鱼品种对长期低温的耐受力 and 长期低温下对疾病的免疫力上存在着遗传上的差异,只是遗传分析手段的限制使我们还不知道这种遗传差异在哪里以及如何标记这些遗传差异。DNA 的分子标记技术 RAPD 和荷包红鲤抗寒品系这个实验材料使探索鲤鱼耐寒性状的分子基础和遗传基础有了技术上的可能性。我们初步分析,鲤鱼的耐寒性状的分子基础在于 DNA 组成不同,这些不同的 DNA 片段有多少与鲤鱼耐寒有关还需要进一步研究。

鱼类的耐寒性状可能受多基因调控,它涉及鱼类神经调控系统、酶系统和生理调节机制等,但肯定有一个或几个基因是控制鱼类耐寒的主基因,正如在鱼类抗冻基因研究中已经表现出来的那样(虽然控制鱼类抗寒性状的基因有多种基因,但抗冻蛋白基因及表达出的抗冻蛋白是鲱鱼等鱼类具有抗冻生理功能的最主要的原因)。虽然现在获得的 RAPD 特异带型与克隆鱼类耐寒基因还有许多工作要做,但可以肯定地讲,对荷包红鲤抗寒品系和黑龙江野鲤所具有而荷包红鲤没有的特异性 DNA 带型及相关 DNA 片段深入研究下去,是能建立抗寒性状与 RAPD 图谱之间的连锁关系,进而克隆出与鱼类耐寒性状有关的主基因。

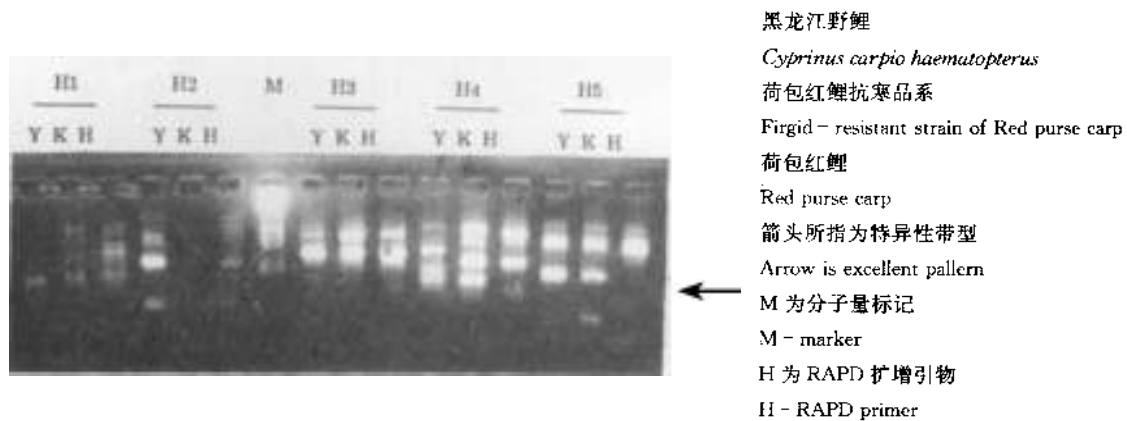


图 1 鲤的基因组 DNA RAPD 扩增电泳图

Fig.1 Electrophoresis plate of these genomic DNA of carps was amplified by RAPD

参 考 文 献

- [1] 沈俊宝等, 1988. 荷包红鲤抗寒品系的筛选. 淡水渔业, 3: 314 - 317.
 [2] 萨姆布鲁克 E. F 费里奇 T. 曼尼阿蒂斯等. 《分子克隆》第二版, 464 - 468.

《中国水产科学》1998 年度征订启事

《中国水产科学》是由中国水产科学研究院主办的学报级学术刊物, 主要刊载水产基础研究、水产资源、海淡水捕捞、水产养殖与增殖、水产品保鲜加工与综合利用、渔业水域环境保护、渔船、渔业机械与仪器等方面的研究论文、调查报告、研究简报, 适当刊载综述和学术动态等文稿。

《中国水产科学》主要服务对象为水产科学研究、教学、科技管理人员及大专院校师生, 它面向水产业、为水产科研和经济建设服务。

《中国水产科学》为季刊, 逢季末出版, 国内外公开发行。从 1998 年起, 由原来的每期 96 页增至 128 页, 刊登文章约 25 篇, 每期定价 14 元, 全年共 56 元。邮发代号: 18-25。欢迎广大老订户和新读者及时到当地邮局办理订阅手续, 也可向本刊编辑部办理邮购。订费亦可通过邮局将订费寄往 100039, 北京永定路青塔村 150 号《中国水产科学》编辑部。联系电话: (010)68673921; 联系人: 吴均。