

牙鲆抗鳗弧菌病 AFLP 分子标记筛选

刘云国¹, 陈松林¹, LIU Zhan-jiang²

(1. 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;
2. Department of Fisheries and Applied Aquaculture, Auburn University, USA)

摘要:牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)感病群体和抗病群体通过注射鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)获得。利用 61 对 AFLP 引物组合扫描了牙鲆感病群体和抗病群体各 20 个个体, 结果共扩增出 3 200 条带, 8 条 AFLP 带在 2 个群体中显示了极大的差异($P < 0.01$), 其中有 2 条带是在抗病群体中出现的高显性基因频率的标记, 另外 6 条带是在感病群体中出现的高显性基因频率的标记。这些标记很可能是与抗病性相关的候选标记。这些抗病性候选标记的获得为实现牙鲆分子标记辅助育种和抗病基因克隆奠定了一定基础。[中国水产科学, 2007, 14(1): 155—159]

关键词:牙鲆; 鳗弧菌; AFLP 标记; 抗病力

中图分类号: Q959.268

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2007)01-0155-05

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) 属于鲽形目、鲽科、牙鲆属, 是一种冷水性、底栖的海产名贵经济鱼类。在中国的渤海、黄海以及东海有广泛的分布。牙鲆具有生长快、个体大、繁殖力强、洄游性小及回归性强等特点, 特别适宜于沿海发展增养殖业。中国从 20 世纪 80 年代开始进行牙鲆的人工育苗和商品养殖, 目前牙鲆养殖业已在海水养殖中占有重要地位^[1]。近年来养殖牙鲆病害频发, 大大增加了养殖成本。利用分子标记技术可以筛选到与抗病基因紧密连锁的分子标记, 在新品种选育的前期就可实现抗病品种的选择, 从而加快育种的进程。目前, 国内外已经有一些有关牙鲆遗传结构研究的报道^[2-5], 但尚未见利用 AFLP 标记筛选抗病分子标记的报道。本研究利用 AFLP 标记技术, 通过比较染病群体和抗病群体之间的遗传差异筛选与抗病相关的分子标记。

AFLP 技术自 1995 年公开发表以来, 以其稳定性和高效性在鉴定与目标基因连锁的分子标记及遗传连锁图谱的绘制中发挥着重要的作用^[6]。其原理是通过基因组 DNA 的限制性酶切片段进行选择扩增而揭示多态性, 是一种结合了 RFLP 和 PCR 优点的新的分子标记技术。它具有带纹丰富、DNA

用量少、灵敏度高和快速高效等优点^[6], 被认为是目前一种比较理想的、有效的分子标记。AFLP 能够检测 DNA 样品间的细微差别而显示多态性, 多态性产物经分离和克隆后, 能够在分子标记辅助育种和更深入的遗传学研究中发挥作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验牙鲆共 300 尾, 取自黄海水产研究所麦岛实验基地, 体长 6.5~8.5 cm, 体质量平均约 10 g。感染用鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*) 为本实验室长期保存的 ATCC19019 菌株。鳗弧菌的培养及感染参照 Chen 等^[7]的方法。将鳗弧菌在灭菌的 2216E 培养基 (Peptone 5 g, 酵母提取物 1 g, $\text{FePO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, 海水 1 000 mL) 中 28 ℃ 培养至对数生长期用于实验。所有牙鲆个体腹腔注射鳗弧菌, 剂量为 0.3 mL OD=0.2 的鳗弧菌悬液, 该剂量为半数致死剂量, 通过对另批牙鲆进行梯度注射获得。感病群体由感染鳗弧菌后 3 天内死亡的牙鲆个体组成, 感染 3 天后牙鲆死亡率趋于下降, 抗病群体由人工感染鳗弧菌 30 天后仍健康存活的牙鲆个体组成。共获得抗病牙鲆群体 101 尾, 感病牙鲆群体 93 尾, 抗病群体和

收稿日期: 2006-04-13; 修订日期: 2006-07-24.

基金项目: 国家高新技术研究发展计划“863”项目(2002AA626010); 国家自然科学基金项目(30413240); 青岛市科技人才计划项目(043JJ04).

作者简介: 刘云国(1977-), 男, 博士, 主要从事海洋生物技术研究. E-mail: liuyg@ysfri. ac. cn

通讯作者: 陈松林. Tel: 0532-85844606; E-mail: chensl@ysfri. ac. cn

感病群体各取20尾进行抗病标记筛选。

1.2 牙鲈基因组DNA的提取

参考Liu等^[8-9]的方法,略有改动。将100 μL 牙鲈血液加入Eppendorf管中,再加入裂解缓冲液500 μL 和5 μL 蛋白酶K(20 mg/mL),轻轻摇匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。然后在裂解好的样品中加入600 μL 酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)混合液,晃动20 min后室温8 000 g离心10 min,取上清液。再加入酚:氯仿:异戊醇混合液,重复上述操作3次。再取上清液,加入2倍体积冷却的无水乙醇和1/10体积的3 mol/L的醋酸钠,4 $^{\circ}\text{C}$ 8 000 g离心10 min,弃去上清液。70%乙醇洗涤沉淀2次,待乙醇挥发完全后,TE缓冲液溶解DNA,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3 AFLP分析

AFLP试剂盒购自Invitrogen公司。引物为试剂盒中除E-ACA/M-CTA、E-ACG/M-CTC、E-ACG/M-CTG之外的其他61对EcoRI和Mse I引物组合。

1.3.1 酶切 牙鲈基因组DNA 200 ng, EcoRI/Mse I 5 U, 酶切缓冲液 2.5 μL , 加蒸馏水至 12.5 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切7~8 h。酶切完成后,70 $^{\circ}\text{C}$ 处理15 min灭活EcoRI和Mse I酶。

1.3.2 连接反应 连接体系25 μL , 含酶切产物12.5 μL , 12 μL 连接缓冲液(EcoRI/MseI接头, 0.4 mmol/L ATP), T4-DNA连接酶[1 U/ μL 溶于10 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5), 1 mmol/L DTT, 50 mmol/L KCl, 50%甘油(体积分数)] 0.5 μL , 20 $^{\circ}\text{C}$ 过夜连接。

1.3.3 预扩增 酶切连接产物用0.1 $\times$ TE缓冲液稀释至1/10(V/V),按以下体系进行扩增反应,稀释的连接产物2.5 μL ,预扩增引物混合物20 μL ,10 $\times$ PCR缓冲液(含 Mg^{2+})2.5 μL ,Taq DNA聚合酶(5 U/ μL) 0.2 μL ,反应总体积25 μL 。

1.3.4 选择性扩增 预扩增产物用0.1 $\times$ TE缓冲液稀释至1/20(V/V),取5 μL ,加入:EcoRI引物5 ng,Mse I引物30 ng,0.2 mmol/L dNTP,1 U Taq酶,10 $\times$ PCR缓冲液2.0 μL ,加蒸馏水至20 μL 。按如下PCR程序扩增:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性2 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,65 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,进行12个循环,每

个循环退火温度降低0.7 $^{\circ}\text{C}$,至56 $^{\circ}\text{C}$ 。然后94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min再进行30个循环。

1.4 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

选择性扩增产物中加入等体积变性剂(98%甲酰胺,10 mmol/L EDTA,0.05%二甲苯青,0.05%溴酚兰),混匀,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 min,然后转移到冰浴中冷却,80 W恒功率预电泳30 min,使玻璃板温度上升到50 $^{\circ}\text{C}$,然后65 W恒定功率电泳2 h。

1.5 银染显色

在10%冰醋酸溶液(固定/终止液)中轻轻摇动30 min至胶全部脱色。然后用重蒸水冲洗胶板3次,每次2 min。随后加入染色液(含0.1% AgNO_3 ,5.6%甲醛)轻轻摇动染色30 min后,用重蒸水冲洗胶板不超过5 s。将胶板快速转移到冷却的显影液(含3% Na_2CO_3 ,5.6%甲醛)中,轻轻摇动,直至条带出现。加入等体积的10%冰醋酸,并轻摇3~5 min。最后用重蒸水冲洗10 min。胶板室温下自然干燥。胶干燥后用Microtek扫描仪记录谱带。

1.6 片段回收

用刀片切下目的AFLP带放入加有20 μL TE:NaAc(3 mol/L)=5:1(体积比)的1.5 mL Eppendorf管里。40~50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴2~3 h,12 000 g 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心12 min,取3~4 μL 上清作为模板,利用原AFLP引物组合进行2次PCR扩增,反应体系与原选择性扩增反应体系一致。上样再扩增产物200~300 μL ,1%琼脂糖电泳分离目的条带。利用QI-AEX II琼脂糖回收试剂盒回收目的片段。

2 结果与分析

2.1 抗病分子标记的筛选

利用61对AFLP引物组合扫描了牙鲈感病群体和抗病群体各20个个体,共扩增出3 200条带。虽然没有发现在1个群体中全显性而在另1个群体中全隐性的条带,但有一些条带在2个群体中显示了极大的差异(表1)。其中序号为2和8的标记在抗病群体中出现频率较高,其余6个在感病群体中出现频率较高。图1和图2表示了2个群体间差异极显著的带($P<0.01$),这些标记有可能是与抗病相关的候选标记。

表 1 8 个在染病群体和抗病群体中出现的显性基因频率差异极显著的 AFLP 位点

Tab. 1 Eight AFLP loci with significantly different dominant gene frequencies between susceptible and resistant flounder groups

$n=20; \bar{X} \pm SD$

序号 Number	引物组合 Primer combinations	感病群体显性基因频率/% Dominant frequency(S)	抗病群体显性基因频率/% Dominant frequency(R)
1	E-AAC/M-CAA	71±11	27± 4
2	E-AAC/M-CAG	30± 7	70±12
3	E-AAG/M-CAG	71±13	36± 8
4	E-ACC/M-CTC	50± 9	21± 5
5	E-ACC/M-CTG	86±17	43± 7
6	E-ACG/M-CAA	57±10	21± 6
7	E-ACT/M-CAC	57±11	21± 6
8	E-AGG/M-CTG	29± 5	64±14

注:每 1 对引物组合在 2 个群体中产生的显性基因频率经 t 检验,达到了差异极显著($P<0.01$)水平。
Note,Dominant gene frequencies of susceptible and resistant groups were subjected to t test,with significant difference between each other ($P<0.01$).

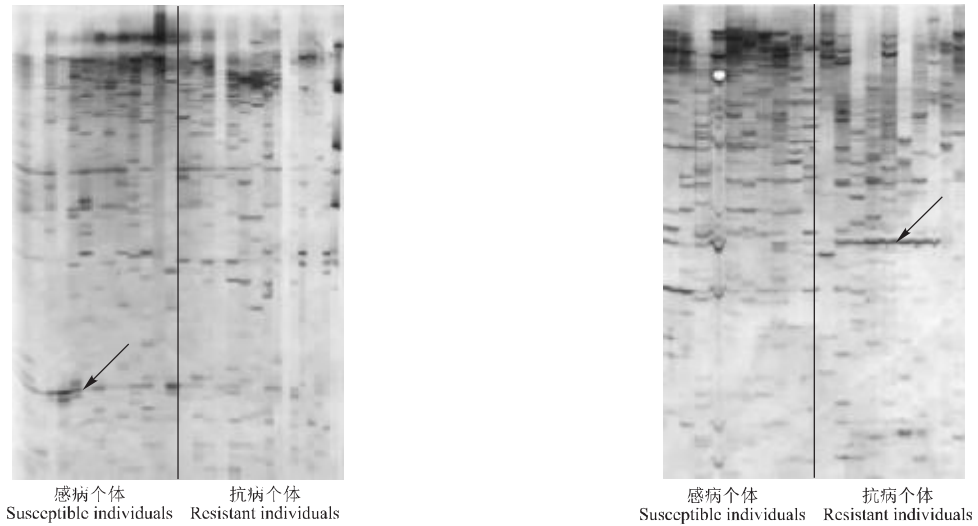


图 1 引物组合 E-ACC/M-CTG 产生的 2 群体间差异极显著的条带

图 2 引物组合 E-AAC/M-CAG 产生的 2 群体间差异极显著的条带

注:箭头指示显性频率差异极显著条带.

Fig. 1 Significantly different band amplified by E-ACC/M-CTG primer combination

Fig. 2 Significantly different band amplified by E-AAC/M-CAG primer combination

Note,Significantly different bands are indicated by an arrow.

2.2 目的 AFLP 产物的回收及重新扩增

由于目的 AFLP 产物回收得到的 DNA 含量甚微,而且可能含有非特异的片段,难以直接用于克隆。为了增加目的 DNA 的产量,本研究以回收到的

的 DNA 为模板,利用 AFLP 分析中相应的选择性扩增引物及 PCR 条件重新扩增了这些多态性 DNA 片段。图 3 是将 1 个目的基因片段回收后重新扩增的结果。

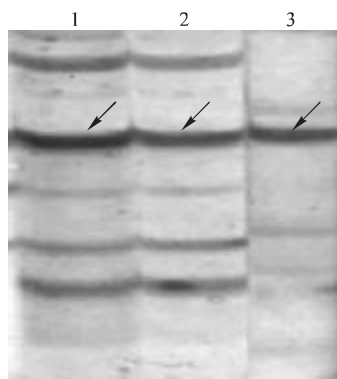


图3 AFLP原始产物及回收反物的重新扩增电泳图
注:1、2为原始扩增产物,3为回收重新扩增产物

Fig. 3 Profile of AFLP original products and re-amplified product

Note: The first and the second are the original AFLP products while the third are the re-amplified product.

3 讨论

分子标记在鱼类遗传育种上的应用大大加速了抗病选择育种的进程。由于鱼类大多数重要经济性状(如生长、抗病等)受数量性状基因座(QTL)和环境因子的共同作用而表现出数量性状的遗传特点,经典的遗传育种研究方法往往无法确定一个重要性状是由哪些具体的基因控制。为了达到遗传改良的目的,越来越多的研究者把目光投向筛选和建立有效的分子标记上^[10-11]。刘萍等^[12]曾报道将中国对虾人工感染 WSSV 病毒 10 余天后,选取仍健康存活的个体与已死亡或濒临死亡的个体作为对比分析材料,以 RAPD 技术进行检测,获得了片段大小在 460~2 305 bp 之间的 18 条特异性条带。AFLP 是一种高效的 DNA 指纹技术,已有研究证明 AFLP 是许多有用标记的来源,在海洋生物中已经应用 AFLP 技术找到了一些与抗病和优良性状相关的标记^[11-13]。在本研究中,抗病群体同感病群体相比,在一些位点显示了较大的显性基因频率差异,其中在抗病群体中出现 2 个高显性基因频率的标记,在感病群体中出现 6 个高显性基因频率的标记。这些位点都可能与抗病基因连锁,而在抗病群体出现的这些高显性基因频率的标记,经过在更大数量的牙鲆个体中进行实验并获得确认之后,还可以应用到分子标记辅助育种中去。根据获得的这些候选标记,可以将其转化成更具特异性的特定顺序

扩增标记(SCAR),有望借助这种标记实现牙鲆抗病分子标记辅助育种。

AFLP 技术在检测多态性的能力方面已得到认可,但多态性 AFLP 产物的回收却鲜有报道。作为一种新的 DNA 指纹技术,不仅应具有强有力的多态性检测能力,而且它所揭示的多态性 DNA 产物应该能够被高效地克隆,以获得有用的分子标记用于辅助育种、常规 PCR 诊断和更深入的遗传学研究。高效克隆的前提是获得足量的模板 DNA,按照本实验方法,特定 AFLP 条带可以有效地从聚丙烯酰胺凝胶上回收并用于再扩增。本文所介绍的 AFLP 扩增产物的回收、重新扩增对于其他海洋生物具有借鉴意义。本研究更深入的工作是将这些抗病候选标记克隆出来,应用到分子标记辅助育种和抗病基因的克隆中去。

参考文献:

- [1] 周丽,宫庆礼,俞开康. 牙鲆的疾病[J]. 青岛海洋大学学报, 1997, 27(2): 173-180.
- [2] Sekino M, Hara M, Taniguchi N. Loss of microsatellite and mitochondrial DNA variation in hatchery strains of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Aquaculture, 2002, 213: 101-122.
- [3] Sekino M, Hara M. Application of microsatellite markers to population genetics studies of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Mar Biotechnol, 2001, 3: 572-589.
- [4] Sekino M, Hara M. Inheritance characteristics of microsatellite DNA loci in experimental families of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Mar Biotechnol, 2002, 3: 310-315.
- [5] 尤锋,王可玲,相建海,等. 山东近海褐牙鲆自然与养殖群体生化遗传结构及其遗传变异的比较分析[J]. 海洋与湖泊, 2001, 32(5): 512-518.
- [6] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23 (21): 4 407-4 414.
- [7] Chen S L, Xu M Y, Ji X S, et al. Cloning and characterization of natural resistance associated macrophage protein (Nramp) cDNA from red sea bream (*Pagrus major*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2004, 17(4): 305-313.
- [8] Liu Y, Chen S, Li B. Assessing the genetic structure of three Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) stocks by microsatellite markers [J]. Aquaculture, 2005, 243: 103-111.
- [9] Liu Y, Chen S, Li B, Wang Z, et al. Analysis of genetic variation in selected stocks of hatchery flounder, *Paralichthys olivaceus*, using AFLP markers [J]. Biochem Syst Ecol, 2005, 33: 993-1 005.
- [10] Liu Z, Nichols A, Li P, et al. Inheritance and usefulness of AFLP markers in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), blue

- catfish(*I. fucatus*), and their F1, F2, and backcross hybrids [J]. *Molec General Gen*, 1998, 258: 260—268.
- [11] 王艺磊, 戴 军, 姚扬烈, 等. 利用 AFLP 技术筛选锯缘青蟹性别差异 DNA 片段[J]. *中国水产科学*, 2004, 11(4): 286—290.
- [12] 刘 萍, 孟宪红, 孔 杰, 等. 对虾抗病性状遗传标记的 RAPD 分析[J]. *水产学报*, 2002, 26(3): 268—274.
- [13] Garcia D K, Benzie J A H. RAPD markers of potential use in penaeid prawn (*Penaeus monodon*) breeding programs [J]. *Aquaculture*, 1995, 130: 137—144.

Screening of AFLP markers for *Vibrio anguillarum* resistance in Japanese flounder

LIU Yun-guo¹, CHEN Song-lin¹, LIU Zhan-jiang²

(1. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fishery Resources, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Department of Fisheries and Applied Aquaculture, Auburn University, USA)

Abstract: Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) is a commercially important flat fish widely distributed throughout coastal areas of northern China. Market landings of this species have not increased greatly over the last decade in spite of extensive fishery management efforts, because viral and bacterial diseases plague Japanese flounder aquaculture industry all over the China. An important approach to prevent disease is to screen populations of fish that show innate genetic resistance to a certain disease. Susceptible and resistant populations of Japanese flounder were obtained by artificially challenged with *Vibrio anguillarum*. Twenty flounder individuals from the susceptible and resistant populations, respectively, were screened by 61 pairs of AFLP primers. A total of 3 200 fragments were obtained and eight showed significant dominant gene frequency differences ($P < 0.01$) between susceptible and resistant groups, among which, two were in resistant group, six were in susceptible group. An efficient method for recovery of DNA fragment from denaturing polyacrylamide gels was developed to allow re-amplifying them. It is a basic work for the application of marker-assisted selection and cloning of anti-disease gene in Japanese flounder selective breeding program. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(1): 155—159]

Key words: *Paralichthys olivaceus*; *Vibrio anguillarum*; AFLP marker; disease-resistance

Corresponding author: CHEN Song-lin. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn