

文章编号:1005-8737(2001)02-0005-02

斑马鱼 SSLP 标记检测鲤鱼种间的遗传多态性

孙效文, 梁利群

(中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要:用 500 对斑马鱼 SSLP 标记引物对黑龙江野鲤(*Cyprinus carpio haematopterus* Temminck et Schlegel)和柏氏鲤(*Cyprinus pellegrini pellegrini* Tchang)进行种间遗传差异分析,共发现 110 个斑马鱼标记在鲤鱼种间表现出差异,故可作为黑龙江野鲤和柏氏鲤间的分子标记,也可作为建立遗传连锁图谱的遗传标记。

关键词:黑龙江野鲤;柏氏鲤;斑马鱼;遗传标记

中图分类号:Q346.5;Q959.468

文献标识码:A

鲤是我国养殖产量最高的水产养殖种之一,因此,对鲤的遗传基础研究非常重要,如鲤的遗传连锁图谱的研制、控制重要性状的基因的克隆等。鲤的 DNA 分子遗传标记虽有报道^[1,2],但可用的标记还很有限,无法与经济数量性状建立连锁,利用分子标记进行育种选择还不可能。制备与鉴定^[3,4]物种的 DNA 水平的遗传异质性标记是开展基因组研究的基础和前提。笔者利用 RAPD 标记,鲤、鲫、斑马鱼(*Brachydanio rerio*)的 SSLP 标记等初步建立了鲤的遗传连锁图谱^[5],但还不够充分和完善。斑马鱼作为人基因组计划的模式动物之一,其 SSLP 标记已有 1 500 多个,斑马鱼与鲤的进化关系较近,利用斑马鱼的 SSLP 分子标记是加快鲤基因组研究,获得更多遗传标记的捷径之一。本研究从斑马鱼的 SSLP 标记中筛选到野鲤(*Cyprinus carpio haematopterus* Temminck et Schlegel)和柏氏鲤(*Cyprinus pellegrini pellegrini* Tchang)的 RAPD 遗传异质性分子标记,可直接用来进行这 2 个种的遗传基础研究,从而为建立完善的鲤遗传连锁图做技术贮备。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验鱼 黑龙江野鲤采自黑龙江抚远江段,柏氏鲤采自云南江川养殖场。

1.1.2 试剂 斑马鱼 SSLP 引物购自美国 Research Genetics 公司,其他试剂均购自 Promega 公司。

1.2 实验方法

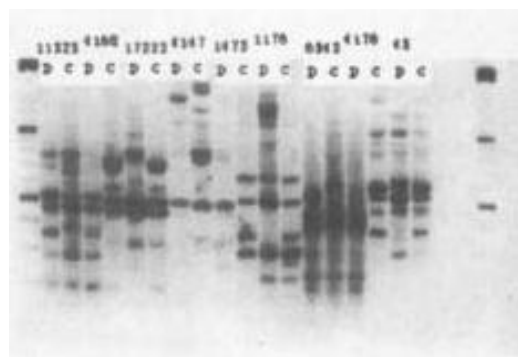
1.2.1 基因组 DNA 的提取和分离 将黑龙江野鲤及柏氏鲤肝组织各 5 g,在有液氮的不锈钢研钵中研成粉末状,溶于 50 ml 裂解液中(10 mmol/L EDTA, pH 8.0;200 µg/ml Proteinase K;0.5% Sarcosyl),搅拌均匀,在 50℃ 水浴中消化 3 h,在此期间转动离心管数次,充分消化,加等体积的酚抽提 3 次(为防止因机械损伤使 DNA 链断裂,每次抽提应缓慢转动离心管 10 min,离心分相),吸出含 DNA 的水相,用等体积的酚/氯仿(体积比酚:氯仿:异戊醇为 25:24:1)再抽提 2 次,将上清液转入透析袋中,对 3 L 透析液(50 mmol/L Tris·Cl, pH 8.0;10 mmol/L EDTA,10 mmol/L NaCl)进行数次透析,直到 OD₂₇₀ < 0.05。再向透析过的液体加入无 DNA 酶的 RNA 酶,终质量浓度为 100 µg/ml,37℃ 保温 3 h,再用酚/氯仿抽提 3 次,上清液再用 TE(10 mmol/L Tris·Cl, pH 8.0;1 mmol/L EDTA, pH 8.0)进行透析,透

收稿日期:2000-01-13

作者简介:孙效文(1955-),男,研究员,从事鱼类基因工程育种与分子生物学研究。

析后的样品用紫外分光光度计测定浓度, 4℃ 保存待用。

1.2.2 PCR 反应及扩增产物的鉴定 扩增反应的总体积为 25 μ l, 其中包括 10 $\times$ PCR 反应缓冲液 2.5 μ l (10 mmol/L Tris · HCl, 500 mmol/L KCl, 15 mmol/L MgCl₂, 0.01% Gelatin, 0.05% Triton X-100); dNTP 1 μ l (2.5 mmol/L); 基因组 DNA 1 μ l (50 ng/ μ l), Taq 1 μ l (1 IU/ μ l)。样品在 PE-9 600 或 EP-9 700 扩增仪上进行 93℃ 变性 30 s, 55℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 总计 38 个循环, 最后在 72℃ 保温 5 min。扩增产物在 1.4% 的琼脂糖凝胶中电泳 2 h, 溴化乙锭染色, 用 GDS8 000 凝胶成像仪 (UVP 公司) 分析鉴定, 并用 1 Gelworks 软件包 (3.0 版本) 对每个扩增带 DNA 的分子量进行估算、测定。



D 为野鲤, C 为柏氏鲤, 数字如 11323 等代表斑马鱼 SSLP 标记的编号。其中 11323, 4168, 17223, 4147 表现出对野鲤与柏氏鲤的共显性差异, 多数表现出太多的多态性, 但也可用作基因型分析。

D is wild common carp, C is Boshi carp, 11323 and 4168 etc are the names of SSLP markers of zebrafish.

图 1 斑马鱼 SSLP 引物检测野鲤和柏氏鲤的遗传差异

Fig.1 The genetic polymorphism of the two carps using zebrafish SSLP markers

2 PCR 扩增结果

使用 500 对斑马鱼 SSLP 标记的引物, 对黑龙江野鲤和柏氏鲤 2 种群进行检测, 共有 110 个标记表现出种间的遗传差异 (图 1)。为排除个体差异,

表现出种间差异的每对引物都要进行 6 个平行样品的重复检测。

3 讨论

用斑马鱼的 SSLP 标记对黑龙江野鲤和柏氏鲤的基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 与使用鲤 SSLP 标记一样, 得到的扩增带是简单重复的微卫星引物的 DNA 序列, 与鲤基因组 DNA 在序列上高度一致, 经复性后可完全重合。扩增带表现了鲤基因组微卫星的真实分布, 其结果也代表了 2 种鲤在遗传物质本质上的异同, 丰富的多态性也反映了鲤这 2 个种间的遗传差异性较大。虽然从 500 对斑马鱼的 SSLP 标记中仅获得 110 个可表现黑龙江野鲤和柏氏鲤种间遗传异质性的引物, 可作为鲤种间的遗传标记, 但由于斑马鱼 SSLP 标记已有 1 500 个以上, 如继续筛选还能得到更多的可用标记以弥补鲤 SSLP 标记在建立鲤遗传连锁图谱的不足。同时本研究显示出可以借用其他物种如人基因组及其模式生物的分子标记, 使目标生物的研究进度加快。

由于通过分子标记可以将重要经济性状定位在连锁图谱上, 进而根据这些结果进行分子育种的技术设计。因此, 制备分子标记、构建遗传图谱便成为目前农业科学研究的热点之一。

参考文献:

- [1] Ratu S A, Motohiro T, Shi D, et al. Isolation and inheritance of microsatellite markers in the common carp[J]. Fish Sci, 1999, 65 (2): 235-239.
- [2] RPMA Crooijmans, VAF Bierbooms, J Komen, et al. Microsatellite markers in common carp[J]. Animal Genetics, 1997, 28: 129-134.
- [3] Johnson S L, Midson C N, Balliger E W, et al. Identification of RAPD primers that reveal extensive polymorphisms between laboratory strains of zebrafish[J]. Genetics, 1994, 129: 152-156.
- [4] Goff D J, Ekker M, Knapik E W, et al. Identification of polymorphic simple sequence repeats in the genome of the zebrafish [J]. Genomics, 1992, 14: 200-202.
- [5] 孙效文, 梁利群. 鲤鱼的遗传连锁图谱 (初报) [J]. 中国水产科学, 2000, 7(1): 1-5.

(下转第 43 页)