

## 红毛菜种间遗传差异的 RAPD 分析

谢恩义<sup>1</sup>, 纪焕红<sup>1</sup>, 柳波<sup>1</sup>, 申宗岩<sup>2</sup>, 马家海<sup>1</sup>

(1. 上海水产大学 渔业学院, 上海 200090;

2. 韩国丽水大学水产增殖研究中心, 韩国 丽水 550749)

**摘要:**在对红毛菜丝状体和叶状体 DNA 的提取中, 突破常规海藻 DNA 提取方法, 通过低温研磨以及温浴、冰浴等措施, 提取到较高质量的 DNA。应用随机扩增多态 DNA (RAPD) 技术对取自我国福建莆田海区红毛菜 (*Bangia fusco-purpurea* Lyngb) 和江苏南通海区红毛菜 (*Bangia* spp.) 进行了种间遗传差异分析, 在使用的 20 个随机引物中, 有 14 个引物扩增出条带清晰的多态性片段, 这 2 个种的种间相似率为 0.561 8, 遗传距离为 0.438 2。由此判断福建红毛菜和江苏红毛菜为同一属的 2 个不同物种。

**关键词:**红毛菜; DNA 抽提方法; RAPD; 种间遗传差异

**中图分类号:** Q959.215; Q78

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8737-(2003)04-0282-04

红毛菜 (*Bangia*) 隶属红藻门, 原红藻纲, 红毛菜科, 红毛菜属。它分布范围较广, 从东西半球的亚热带到较冷地区以及中国沿海均有分布<sup>[1-5]</sup>。我国江苏、浙江、福建等近年来已开展了红毛菜的人工栽培。有关红毛菜的染色体和繁殖方式, 孙爱淑等<sup>[6]</sup>作过报道, 但迄今为止, 对红毛菜不同品系的 DNA 遗传差异尚无报道。随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术自 1990 年出现以来, 已广泛用于生物的遗传多样性研究。本实验利用 RAPD 技术对我国江苏红毛菜和福建红毛菜进行 DNA 遗传差异的研究, 以期为我国红毛菜种类鉴定和生产上选育优良栽培种类提供理论依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

分别采自江苏南通海区和福建莆田海区的野生红毛菜 (*Bangia* sp., *Bangia fusco-purpurea* Lyngb.) 叶状体, 以及上海水产大学室内培养的 2 海区红毛菜丝状体, 各取样本 2 份。RAPD 反应引物 20 个, 购自上海生工生物工程技术有限公司。

收稿日期: 2002-09-16; 修订日期: 2003-02-19。

作者简介: 谢恩义 (1966-), 男, 副教授, 在职博士生, 从事水产增殖及生物技术研究。E-mail: xienyi@sohu.com

通讯作者: 马家海。E-mail: mjh25@sh163.net

#### 1.2 方法

**1.2.1 丝状体 DNA 的提取** 取湿重 50 mg 红毛菜自由丝状体于研钵内, 加入 800  $\mu$ L 提取缓冲液 (15% 蔗糖, 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 50 mmol/L EDTA), 把研钵置于冰块上, 低温下充分研磨, 再转移至 1.5 mL 离心管中, 混匀后, 低速离心 8 min。弃上清液, 加 TE I 缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 10 mmol/L EDTA) 300  $\mu$ L, 10% SDS 80  $\mu$ L, 充分摇匀, 然后于 70  $^{\circ}$ C 温浴 15 min, 冰浴 30 min。当冰冻溶液溶解后, 加入 250  $\mu$ L  $\text{NH}_4\text{Ac}$  溶液 (7.5 mol/L), 然后离心 (10 000 r/min, 5 min)。将上清液转移至另一离心管, 并向其中加入 0.6~1 倍体积的异丙醇, 静置 10~15 min, 将 DNA 沉淀, 然后再高速离心 (15 000 r/min) 5 min, 弃上清液, 用 70% 乙醇清洗沉淀, 将 DNA 捞出后再离心甩干, 待乙醇完全挥发干净后加入 50~100  $\mu$ L TE II 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1 mmol/L EDTA) 溶解即得 DNA 抽提物, 最后置于 4  $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

**1.2.2 叶状体 DNA 的提取** 取湿重 50 mg 的复苏藻体, 加提取缓冲液 800  $\mu$ L 低温研磨至匀浆, 低速离心后弃上清液, 再加 400  $\mu$ L 提取缓冲液, 再次离心, 弃上清液再加 TE 缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 10 mmol/L EDTA) 300  $\mu$ L, 10% SDS 120  $\mu$ L, 其他提取步骤与自由丝状体相同。

**1.2.3 叶状体酶解后的原生质体 DNA 的提取** 取 0.4 g 复苏的叶状体,刀片切成 1 m<sup>2</sup> 左右,置于 5 mL 酶液(4% 海藻酶,2% 纤维素酶,0.7 mol/L 甘露醇)中,100 r/min 震荡,25 ℃ 下酶解 3 h。筛绢过滤酶液,低速离心 5 min,收集原生质体,然后用比重为 1.030 的消毒海水清洗,再离心,直至原生质体溶液变为无色为止。把原生质体转移至 1.5 mL 离心管中,加入 400 μL 提取缓冲液混匀后,低速离心 10 min。弃上清液,其他提取步骤与前述相同。

**1.2.4 DNA 的检验** DNA 经含 0.5 μg/mL 溴化乙锭(EB)溶液的 0.8% (0.16 g/20 mL TBE 缓冲液)琼脂糖凝胶电泳,以 Lambda DNA/EcoRI + Hind III Marker 作为分子量标记,检测该法所提取的 DNA。电泳缓冲液为 TBE (89 mmol/L Tris - 硼酸,2 mmol/L EDTA pH 8.0),在 10 V/cm 电场强度下电泳 1.5 h 左右,然后在紫外灯下观察电泳结果并拍照。

**1.2.5 PCR 反应条件** 反应总体积为 25 μL,内含 10 × Buffer (100 mmol/L Tris - HCl pH 8.3, 500 mmol/L KCl) 2.5 μL, MgCl<sub>2</sub> (10 μmol/L) 1.5 μL, TaqDNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.2 μL, 4 × dNTP (10 mmol/L) 0.25 μL, 引物 (10 μmol/L) 0.5 μL, 模板 DNA (20 ng/μL) 1 μL, 去离子水 19.05 μL。

**1.2.6 扩增反应程序** 94 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 变性 1 min, 37 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 2 min, 共运行 36 个循环;最后一个循环结束后 72 ℃ 再延伸 10 min;然后于冰箱中 4 ℃ 保存。

**1.2.7 电泳检测** 取 10 μL PCR 扩增产物和 2 μL 溴酚蓝混合均匀。再取 10 μL 混合液上样至 1.2% 琼脂糖凝胶(含溴化乙锭 0.5 μg/mL)中电泳分离,电压为 5 V/cm,电泳时间 2 h,然后置于 Gene - Genius 凝胶成像仪下检测、拍照。

### 1.3 数据处理

将每条 RAPD 扩增带看作 1 个位点,统计每个群体的多态性位点比例( $P$ ):

$$P = \text{多态位点数} / \text{位点总数} \times 100\%$$

红毛菜种间的遗传相似度( $F$ )和遗传距离( $D$ )的计算公式为:

$$F = 2N_{ab} / (N_a + N_b) \quad D = 1 - F$$

式中: $N_{ab}$ 为物种  $a$  和物种  $b$  共有的 DNA 片段数; $N_a$ 、 $N_b$  分别为物种  $a$  和物种  $b$  各自的 DNA 片段数。 $D$  为遗传距离, $F$  为相似率。

## 2 结果

### 2.1 DNA 的提取技术

用本实验方法所提取的各种材料的 DNA 的  $OD_{260}/OD_{280}$  值在 1.74 ~ 1.93。由图 1 可见,从江苏红毛菜和福建红毛菜自由丝状体和未经酶解的叶状体中抽提的 DNA 条带均为 1 条,分子量在 23 kb 左右(图 1-1、2、6、7)。由于丝状体为二倍体,叶状体为单倍体,所以丝状体的 DNA 条带(图 1-6、7)要比叶状体(图 1-1、2)亮得多。江苏红毛菜叶状体和福建红毛菜叶状体经酶解获得原生质体后所抽提的 DNA 均有 3 条带,其中 1 条(图 1-3、4a)为核 DNA,另外 2 条(图 1-3、4-b、c)分子量较小,推测为质粒 DNA。

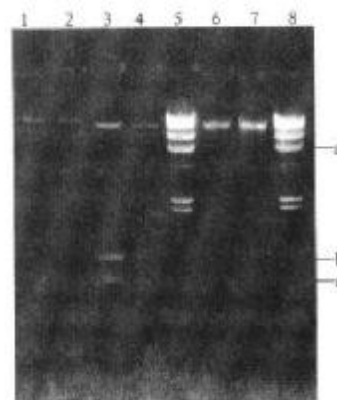


图 1 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳图谱

(示从红毛菜自由丝状体和叶状体中抽提到的总 DNA)

Fig. 1 Electrophoretic patterns of 0.8% agarose gel (showing total DNAs from free-living conchocelis and thallus of *Bangia*)

a - 主带; b, c - 质粒状 DNA 带; 1. 福建产叶状体; 2. 江苏产叶状体; 3. 福建产叶状体(经酶解); 4. 江苏产叶状体(经酶解); 6. 福建产丝状体; 7. 江苏产丝状体; 5, 8. Lambda DNA/EcoRI + Hind III Marker  
a - Main DNA; b, c - Plasmid-like DNAs. 1, Thallus of *Bangia fuscopurpurea* Lyngb; 2, Thallus of *Bangia* sp.; 3, Protoplasts from thallus of *Bangia fuscopurpurea* Lyngb; 4, Protoplasts from thallus of *Bangia* sp.; 6, Free-living conchocelis of *Bangia fuscopurpurea* Lyngb; 7, Free-living conchocelis of *Bangia* spp; 5, 8, Lambda DNA/EcoRI + Hind III Marker

### 2.2 RAPD 分析结果

RAPD 分析结果见图 2。用 20 个随机引物对江苏种和福建种红毛菜扩增出的 DNA 条带数及 RAPD 分析结果如表 1 所示。表 1 和图 2 显示,在

所使用的20个引物中,有14个引物扩增出较明显的多态性片段,多态引物比例为70%,每个引物的扩增条带数为2~6条,片段大小为0.5~3.6 kb。其中江苏红毛菜总位点数为42条,多态位点数为

16条,多态位点比例为38.10%,福建红毛菜总位点数为47条,多态位点数为21条,多态位点比例为44.68%。

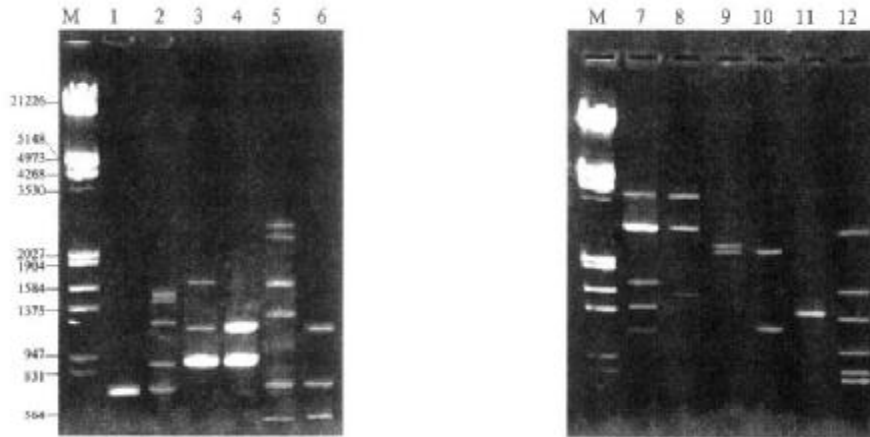


图2 2种红毛菜基因组DNA的随机扩增产物电泳图

Fig. 2 RAPD patterns of *Bangia* sp. (2,4,6,8,10,12) and *Bangia fuscopurpurea* Lyngb (1,3,5,7,9,11) using primers M - Lambda DNA/*Eco*RI + *Hind* III 分子量标记; 1,2:引物 S401;3,4:引物 S402;5,6:引物 S404;7,8:引物 S405;9,10:引物 S406;11,12:引物 S410

M - Lambda DNA/*Eco*RI + *Hind* III Marker. 1,2, Primer S401; 3,4, Primer S402; 5,6, Primer S404; 7,8, Primer S405; 9,10, Primer S406; 11, 12, Primer S410

在14条多态性引物中,有3条引物的扩增结果显示出种群的特异性。S402为江苏种红毛菜的特异引物,用它扩增福建红毛菜无扩增反应,引物S411和S414为福建种红毛菜的特异引物,用它扩增江苏红毛菜无扩增反应。用20个随机引物进行种间RAPD分析,结果共扩增出89个片段,二者共有片段为25个,江苏特有的为17个,福建特有的为22个。

### 3 讨论

#### 3.1 DNA的提取

有关海藻DNA提取方法已有很多报道<sup>[7-8]</sup>,但尚难找到一种理想的方法。常规的酚/氯仿法提取DNA,费时、费力;液氮、蛋白酶K、CTAB和巯基乙醇、PVP的处理过程也比较繁琐,所获得的DNA仍需进一步纯化后才能进行PCR扩增和RAPD分析。实验证明,海藻组织中含有能耐受海水渗透压变化的丰富的碳水化合物——硫酸多糖和羧酸多糖<sup>[9]</sup>。由于海藻多糖是水溶性的,并将DNA缠绕包裹其中,在提取过程中使溶液十分粘稠,很难分离。海藻细胞较小(直径大约10 μm),细胞壁又厚,因此,多

糖的去除是海藻DNA提取所面临的难题。本研究突破常规实验方法,通过把研钵放在冰块上低温研磨,利用10% SDS、温浴(60℃)、冰浴和NH<sub>4</sub>Ac(7.5 mol/L)有效去除了蛋白质和多糖的干扰,不需经过进一步的纯化和酶切等繁琐步骤就可提取到较高质量的DNA。与传统的海藻提取方法如LiCl法、CTAB法<sup>[7-8,10]</sup>和蛋白酶K法<sup>[11]</sup>等相比,该法具有重复性高、操作简单、成本低廉、提取比率高,即从少量材料(50 mg)中就能获得足量DNA(10 μg左右)的优点;其次该法避免了液氮、酚/氯仿反复抽提对DNA所造成的机械损伤和降解,保证了所抽提到的DNA的完整性;同时该法还有效解决了包裹缠绕DNA的海藻多糖的干扰问题,因此所获得的DNA纯度较高,值得推广。

#### 3.2 RAPD分析

本研究用20个随机引物进行的RAPD分析结果表明,2种红毛菜之间相似率为0.5618,遗传距离为0.4382。根据Theorpe<sup>[12]</sup>,遗传相似率 $I < 0.85$ 、遗传距离 $D > 0.15$ 的2个种群不可能是同一物种,同属种间 $I$ 为0.2~0.8, $D$ 为0.2~0.8,同种种群间 $I$ 是0.8~0.97, $D$ 为0.03~0.2。据此福建

红毛菜和江苏红毛菜应为同属的不同物种,这与前人<sup>[6]</sup>对江苏红毛菜和福建红毛菜的染色体研究结果一致(前者  $n=8$ , 后者  $n=6$ )。

表1 不同引物对江苏种和福建种红毛菜扩增出的 DNA 条带数及多态片段数、多态比例、种间的遗传距离和遗传相似率  
Table 1 Numbers of amplified polymorphic DNA fragments and inter-population fragments sharing/genetic distances of *Bangia*

| 红毛菜种类<br>Species of <i>Bangia</i>         | 扩增片段数<br>Amplified DNA fragments | 多态片段数<br>Polymorphic DNA fragments | 多态比例/%<br>Proportion of polymorphic loci | 遗传距离<br>Genetic distance | 遗传相似率<br>Fragments sharing |
|-------------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| 江苏种<br><i>Bangia</i> spp.                 | 42                               | 16                                 | 38.10                                    |                          |                            |
| 福建种<br><i>Bangia fusco-purpurea</i> Lyngb | 47                               | 21                                 | 44.68                                    | 0.4382                   | 0.5618                     |

基于前人对红毛菜染色体的研究,本研究用 RAPD 进一步证明,江苏红毛菜和福建红毛菜为同一属的不同物种,为红毛菜栽培育种提供了理论依据,也进一步证实用 RAPD 方法对红毛菜进行物种鉴别是可行的。

#### 参考文献:

- [1] Muller K M. Biogeography and systematics of *Bangia* (Bangiales, Rhodophyta) based on the Rubisco spacer, rbcL gene and 18S rRNA gene sequences and morphometric analysis, I North America [J]. *Phycologia*, 1998(37): 195-207.
- [2] Sheath R G, Cole K M. Systematics of *Bangia* (Rhodophyta) in North America. I. Biogeographic trends in morphology [J]. *Phycologia*, 1984(23): 383-396.
- [3] Sheath R G, Cole K M. Distribution and salinity adaptations of *Bangia atropurpurea* (Rhodophyta), A putative migrant into the Laurentian Great lakes [J]. *J Phycol*, 1980(16): 412-420.
- [4] 曾呈奎, 张德瑞, 张峻甫. 中国经济海藻志 [M]. 北京: 科学出版社, 1962. 97-99.
- [5] 李伟新, 朱仲嘉, 刘凤贤. 海藻学概论 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1981. 28-30.
- [6] 孙爱淑, 曾呈奎. 中国红毛菜繁殖方式和染色体的研究 [J]. 海洋与湖沼, 1998, 29(3): 269-273.
- [7] 郭宝太, 毕玉平, 戴继勋, 等. 条斑紫菜高纯度总 DNA 及其质粒状 DNA 的提取 [J]. 海洋学报, 2000, 22(2): 87-90.
- [8] 杨君, 王茜, 刘美华, 等. 一种简便的海藻 DNA 提取方法 [J]. 生物技术, 1999, 9(4): 39-42.
- [9] 纪明侯. 海藻化学 [M]. 北京: 科学出版社, 1997. 5-373.
- [10] 王茜安, 利佳, 杨君, 等. 蜈蚣藻和管形藻的 RAPD 分析 [J]. 海洋与湖沼, 2000, 31(5): 506-510.
- [11] Shivji M S, Rogers S O, Stanhope M J. Rapid isolation of high molecular weight DNA from marine macroalgae [J]. *Mar Ecol Prog Ser*, 1992, 84: 197-203.
- [12] Theorpe J P. The molecular clock hypothesis: Biochemical evaluation, genetic differentiation, and systematics [J]. *Am Rev Ecol Syst*, 1982, 13: 139-168.

## Interspecific difference of *Bangia* (Bangiales, Rhodophyta) assessed by RAPD

XIE En-yi<sup>1</sup>, JI Huan-hong<sup>1</sup>, LIU Bo<sup>1</sup>, SHIN Jong-ahm<sup>2</sup>, MA Jia-hai<sup>1</sup>

(1. Fisheries College, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;

2. Department of Aquaculture and Aquaculture Research Center, Yosu National University, Chonnam 550-749, Korea)

**Abstract:** The DNA extraction method from free-living conchocelis and thallus of *Bangia*, which is simple, effective and new, was presented in this paper. RAPD markers were used to detect genetic difference of *Bangia* collected from Fujian and Jiangsu. Fourteen primers screened from 20 random primers generated 89 RAPD bands of which 37 bands varied. The genetic distance between the two species was 0.438 2. The conclusion indicates the *Bangia* samples collected from Fujian and Jiangsu belong to two species, respectively.

**Key words:** *Bangia*; DNA extraction method; RAPD; inter-species heritable difference

**Corresponding author:** MA Jia-hai. E-mail: mjh25@sh163.net