

用 RAPD 技术对 5 种经济海胆基因组 DNA 多态性的研究

常亚青¹, 丁 君¹, 邢荣莲¹, 宋林生², 倪多娇²

(1. 大连水产学院 农业部海洋水产增养殖学与生物技术重点开放实验室, 辽宁 大连 116023; 2. 中国科学院 海洋研究所, 实验海洋生物学开放实验室, 山东 青岛 266071)

摘要:利用随机扩增多态 DNA 技术对紫海胆(*Anthocidaris crassispina*)、海刺猬(*Glyptocidaris crenularis*)、马粪海胆(*Hemicentrotus pulcherrimus*)、光棘球海胆(*Strongylocentrotus nudus*)和中间球海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)等我国最主要的 5 种经济类海胆基因组 DNA 的多态性进行初步研究。经 20 个随机引物扩增,共得到 377 条扩增片段,片段长度为 200 ~ 1 600 bp。根据片段的共享度计算出平均遗传距离并采用 UPGMA 和 NJ 两种聚类分析方法进行处理得到系统树。从聚类图可知长海胆科与疣海胆科有较近的亲缘关系,球海胆科的光棘球海胆与中间球海胆有较近的亲缘关系,其次是马粪海胆。本研究还讨论了 RAPD 技术在海胆的遗传学研究中的广阔应用前景以及从分子生物学方法上为海胆传统分类方法提供科学依据。

关键词:海胆;基因组 DNA;RAPD;亲缘关系

中图分类号:Q959.268 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2004)02-0129-06

海胆是一类比较常见的海洋无脊椎动物,早期研究主要集中在海胆的发育生物学方面^[1],如受精机制、实验胚胎学和分子胚胎学等基础理论的研究上^[2-4]。由于可食用海胆具有很高的医疗保健作用,世界上许多地方都有食用海胆的传统。海胆市场价格很高,消费量却非常大。为满足人们对海胆的需求,世界许多国家如日本、法国、爱尔兰、智利,及美国东北部、加拿大的沿海各省以及从北美西海岸的加利福尼亚州到英国的哥伦比亚都进行了过量捕捞^[5-6],从而,人们对海胆养殖的兴趣不断增加,海胆的人工养殖和苗种生产的研究逐渐开展起来^[5,7-10]。尽管国外对海胆形态学、生物化学以及遗传学的研究都有报道^[11-13],但目前关于海胆分类方面的研究却相对较少^[11,14],只有张凤瀛^[14]在中国动物图谱棘皮动物分册中对海胆进行了比较系统的描述。深入了解海胆的分类地位和亲缘关系是进行合理有效的杂交育种,获得优良经济性状的基础。

近年来,RAPD 技术广泛应用于水产动物如鱼、虾、贝、藻等主要水产生物亲缘关系及其演化过程的研究^[15-19]。Garcia 等^[20]通过 RAPD 技术研究了斑节对虾 *Penaeus monodon* 的遗传变异,并讨论了此技术在虾选育种中的应用前景;宋林生等^[21]对 6 种

海产对虾类基因组 DNA 多态性的 RAPD 标记进行研究,得出 6 种虾的亲缘关系与传统的分类结果基本一致;Patwary 等^[22]用 RAPD 技术研究了扇贝 (*Placopecten magellanicus*) 的遗传结构;Heipel 等^[23]利用 RAPD 对英国西部的大扇贝 (*Pecten maximus*) 的 5 个群体进行了遗传差异分析,比较了它们之间的遗传距离;刘必谦等^[24]利用 RAPD 技术对 4 个不同地区的大连湾牡蛎 (*Cassostrea talienwanensis*) 进行了研究。迄今为止,应用 RAPD 技术对海胆的系统演化的研究国内外尚未见报道。

本研究中的 5 种海胆是目前我国最主要的经济类海胆,分属于 3 个科,但在分类学研究方面资料很少,在分子水平上的研究更是尚未起步,本实验尝试用 RAPD 技术进行基因组 DNA 多态性的研究,探讨该技术在海胆的种质鉴定及亲缘关系研究中的可行性,同时探求一种能有效补充传统分类方法的辅助手段,为我国海胆的遗传育种和增养殖的进一步深入研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

紫海胆 (*Anthocidaris crassispina*) 取自广东湛江

收稿日期:2003-05-26; 修订日期:2003-12-11。

基金项目:国家“863”高技术研究发展计划项目(2002AA628170);国家教育部骨干教师资助计划(No. 16)。

作者简介:常亚青(1967-),男,教授,博士,从事海洋动物遗传育种和增养殖研究。

沿海,海刺猬(*Glyptocidaris crenularis*)、马粪海胆(*Hemicentrotus pulcherrimus*)、光棘球海胆(*Strongylocentrotus nudus*)和中间球海胆(*S. intermedius*)均取自大连市沿海,其中,中间球海胆为1989年大连水产学院引种的后代个体,其他为野生个体。

1.2 基因组 DNA 的提取

在海胆围口膜与外壳相连接的部位用刀片轻轻割开,将口器小心取下,用经灭菌消毒过的剪子或刀片将紧贴在齿上的齿间肌肉束刮下,收集到 Effen-dorf 管中,加入 500 μL 匀浆缓冲液(Tris-HCl 10 mmol/L, pH 8.0; EDTA 100 mmol/L)和 50 μL 10% 的 SDS,稍加研磨后加入 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的蛋白酶 K 5 μL ,55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴消化 3~4 h,待样品裂解成为澄清粘稠的液体后,分别用等体积的酚、氯仿:异戊醇(体积比 24:1)各抽提 1 次,12 000 r/min 离心 10 min,取上清加入 2 倍体积冰乙醇和 1/10 体积乙酸钠沉淀 DNA,4 $^{\circ}\text{C}$ 静止 10 min,12 000 r/min 离心 5~10 min,沉淀用 70% 的乙醇洗涤 2~3 次后,常温下晾干,加入 50 μL DEPC 水溶解成为母液,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 DNA 的检测和定量

各取母液 2 μL 用蒸馏水稀释 50 倍,用 BECK-MAN DU-650 紫外分光光度计检测 DNA 的含量。同时,将母液各取 5 μL ,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳,根据电泳结果评价所提取 DNA 的质量。

1.4 PCR 反应

RAPD 反应条件与 Williams 等^[25]的报道基本相似。扩增反应总体积为 25 μL ,其中包括 10 $\times$ PCR 反应缓冲液 2.5 μL ;dNTP (25 mmol/L) 1 μL ; MgCl_2 (25 mmol/L) 2.5 μL ; *Taq* 酶 (5 U/ μL) 0.2 μL ; 随机引物 (5 pmol/ μL) 1 μL ; 基因组 DNA 10 μL (10 ng/ μL)。

样品在 PTC-100TM (Programmable Thermal Controller) 仪器上进行扩增,经 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min 后,

进行 45 个扩增循环,每一循环包括 94 $^{\circ}\text{C}$ 0.5 min, 36 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,最后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离,EB 染色,凝胶成像系统观察、纪录。

1.5 数据处理

记录下电泳后清晰的扩增带,进行数据统计,根据公式: $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ 和 $D = 1 - F$ (式中 N_{xy} 为 X 和 Y 两个个体共有的扩增带; N_x 、 N_y 为 X 和 Y 个体分别拥有的扩增带) 分别计算出随机扩增多态性 DNA 片段的共享度 (F) 和 2 个体间的平均遗传距离指数,采用“PHYLP” (Phylogeny Inference Package, version 3.5 C) 软件包的程序 NEIGHBOR 中的 UPGMA 和 Neighbor-joining 聚类分析方法进行处理。

2 结果

2.1 RAPD 图谱

实验使用了 20 种随机扩增引物,每一引物产生的扩增带均在 8 个左右,片段大小在 200~1 600 bp,图 1 为引物 173 和 S-104 经 PCR 扩增后的电泳结果。

20 种引物共扩增得到 377 条扩增带,将这些扩增带对应 5 种海胆按 1 和 0 进行统计,即出现对应的扩增带时记录为 1,没有这条带的记录为 0。5 种海胆没有共享片段,球海胆科的马粪海胆、光棘球海胆和中间球海胆的共享片段则有 3 条(图 2),每 2 种海胆间的共享片段数见表 1。从表 1 中可以看出,5 种海胆间基因组 DNA 扩增片段的共享片段数紫海胆与光棘球海胆的最少仅为 4 条,而紫海胆与海刺猬的最多,为 16 条。球海胆科的马粪海胆、光棘球海胆和中间球海胆它们两两间的共享片段数分别为 10、12 和 13 条,相差不大。根据不同的引物扩增产物所得到的 RAPD 电泳图谱,每一引物对 5 种海胆都显示出较高的多态性,表明了 5 种海胆的分子遗传背景差异较大。

表 1 5 种海胆基因组 DNA 扩增片段的共享片段数

Table 1 Numbers of randomly amplified polymorphic DNA fragments shared among five species of sea urchins

种 类 Species	紫海胆 <i>A. crassispina</i>	海刺猬 <i>G. crenularis</i>	马粪海胆 <i>H. pulcherrimus</i>	光棘球海胆 <i>S. nudus</i>	中间球海胆 <i>S. intermedius</i>
紫海胆 <i>A. crassispina</i>	87				
海刺猬 <i>G. crenularis</i>	16	104			
马粪海胆 <i>H. pulcherrimus</i>	15	9	95		
光棘球海胆 <i>S. nudus</i>	4	5	10	74	
中间球海胆 <i>S. intermedius</i>	11	8	12	13	69

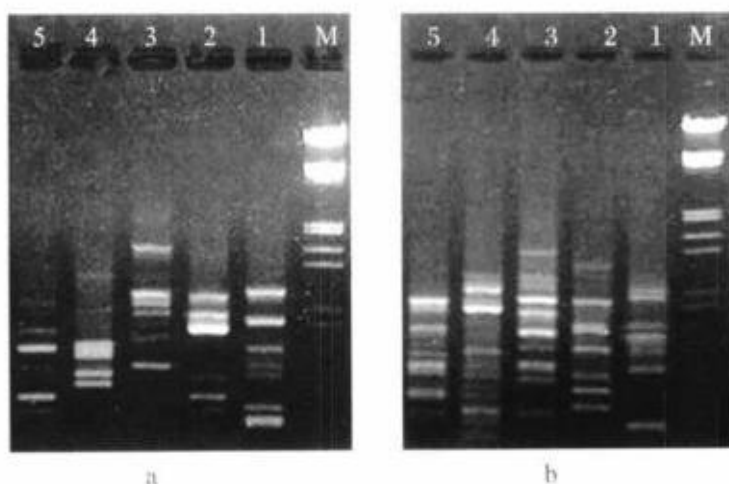


图 1 5 种海胆基因组 DNA 用随机引物 173(a) 和 S-104(b) 扩增产物电泳图

Fig. 1 Electrophoresis patterns of RAPD from five species of sea urchins after random amplified with primers 173(a) and S-104(b)

M. 分子量标记; 1. 紫海胆; 2. 光棘球海胆; 3. 海刺猬; 4. 马粪海胆; 5. 中间球海胆

M. λ DNA/Hind III + EcoRI Marker; 1. *A. crassispina*; 2. *S. nudus*; 3. *G. crenularis*; 4. *H. pulcherrimus*; 5. *S. intermedius*

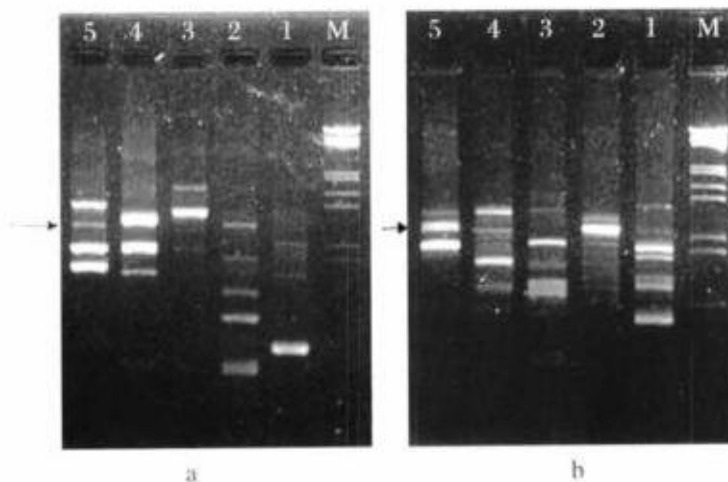


图 2 5 种海胆基因组 DNA 用随机引物 S-27(a) 和 OPH-20(b) 扩增产物电泳图

Fig. 2 Electrophoresis patterns of RAPD from five species of sea urchins after random amplified with primers S-27(a) and OPH-20(b)

M. 分子量标记; 1. 紫海胆; 2. 光棘球海胆; 3. 海刺猬; 4. 马粪海胆; 5. 中间球海胆; →: 球海胆科的马粪海胆、光棘球海胆和虾夷马粪海胆共享片段

M. λ DNA/Hind III + EcoRI Marker; 1. *A. crassispina*; 2. *S. nudus*; 3. *G. crenularis*; 4. *H. pulcherrimus*; 5. *S. intermedius*; →: Fragments shared among *S. nudus*, *H. pulcherrimus* and *S. intermedius*

2.2 数据分析

根据 Nei 等^[26]的公式, 计算 5 种海胆之间的随机扩增 DNA 片段的共享度和相互间的遗传距离指

数, 将遗传距离指数输入计算机, 用“PHYLIP”软件包 (Phylogeny Inference Package, version 3.5 C) 的程序 NEIGHBOR 中的 UPGMA 和 Neighbor-joining 聚

类分析方法进行处理,分别构建聚类图得到图2的结果。在两种聚类方法得到的图上,球海胆科的光

棘球海胆和中间球海胆首先聚在一起,然后与马粪海胆聚在一起,最后再与紫海胆和海刺猬聚在一起。

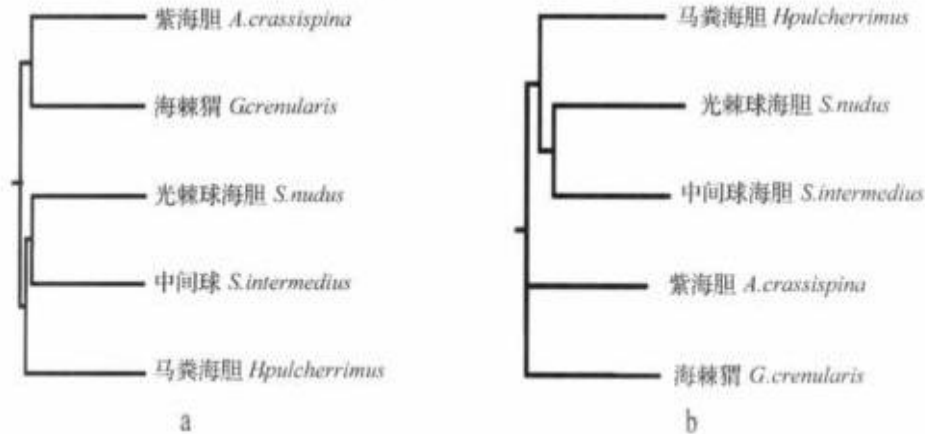


图3 根据遗传距离用UPGMA方法(a)和NJ方法(b)得到的系统树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on genetic distance matrices with method of UPGMA(a) and NJ(b)

3 讨论

3.1 海胆模板DNA的制备

海胆是一种比较特殊的动物,实验发现其DNA极易降解,这可能与该类动物的生物学特性有关。与海胆同门的动物海参,当有外物刺激或外界环境变化时,表皮细胞自溶、脱落,直至死亡,海胆的各组织都被石灰质的外壳包裹着,只有围口膜和管足暴露在身体的外面,细胞可能也易自溶,只是现象不明显而已,因此在海胆鲜活时快速及时取样可以有效的防止DNA的降解。为了节省时间,可以不加研磨迅速加入裂解液消化即可。

实验中还发现从海胆的消化道和性腺中可提取出DNA,但消化道内含物和性腺中的酶类都很复杂,干扰PCR扩增。另外性腺组织较粘稠,应少取组织。海胆的围口膜中含有微小的片状石灰质骨板和小棘以及因摄食而带上的藻类碎屑,不利于DNA的提取。围口膜中还含有色素,提取出的DNA带有颜色,不是良好的实验材料。海胆口器齿间的肌肉束柔软,不用研磨就很容易消化,成分较单一,是理想的实验材料。只是肌肉很少,不易获取。

3.2 5种经济海胆的分类地位和亲缘关系

传统的分类方法主要根据形态和表型进行的,而形态和表型是遗传和环境因素相互作用的结果,不能完全或真实地反映出海胆的遗传变异。从蛋白

质和同工酶等方面对海胆的起源和演化进行研究,又可能因这些方面实验所得到的标记是基因表达加工后的产物,受生物发育阶段和环境条件的影响,也不能真正反映海胆的遗传特征。染色体是遗传物质DNA的载体,从染色体着手研究基因,因受到技术手段的限制,其所反映的遗传多态性十分有限。从遗传物质DNA入手,分析基因组DNA的多态性是研究物种之间亲缘关系和系统演化的有效手段。RAPD技术是采用随机合成的较短的单个随机引物(通常为10个核苷酸,G+C含量为50%~70%),对基因组DNA进行PCR扩增,研究的是遗传物质本身,因此可以克服从表型水平、染色体水平和蛋白质水平研究物种遗传多样性所固有的缺点。

在动物的系统分类学上^[5],海胆隶属于棘皮动物门(Echinodermata)、游在亚门(Eleutherozoa)、海胆纲(Echinoidea)。目与科的分各学者所持的分类依据不同,分类方法也各不相同。尹左芬^[5]将海胆纲分为正形目(Centrochinoida)、楯形目(Clypeasteroidea)和心形目(Spatangoida),按照该分类系统,本研究所用的5种海胆均被分为正形目,紫海胆属于长海胆科(Echinometridae),海刺猬属于疣海胆科(Phymosomatidae),光棘球海胆和马粪海胆属于球海胆科(Strongylocentrotidae);张凤瀛^[14]将海胆分为8个目20个科,本研究所用的海胆被分到了两个目中,紫海胆属于拱齿目(Camarodonta)的长海胆科,

光棘球海胆、马粪海胆和中间球海胆均属于该目的球海胆科,海刺猬则属于脊齿目(Stirodonta)的疣海胆科,虾夷马粪海胆(*S. intermedius*)在部分日本的文献中也记作 *Hemicentrotus intermedius*^[5],其属名与马粪海胆(*H. pulcherrimus*)相同。

本研究采用 RAPD 技术对 5 种海胆基因组 DNA 的多态性进行分析,根据扩增片段的共享度计算出相对遗传距离指数,用 UPGMA 和 NJ 两种聚类方法进行聚类分析,从分子水平上对 5 种海胆的亲缘关系及其分类地位进行初步研究。从 UPGMA 聚类分析的结果来看紫海胆、海刺猬与其他 3 种海胆聚为 2 类,说明了长海胆科、疣海胆科与球海胆科之间的差别。从聚类图(图 2-a)上可以看出球海胆科中的 3 种海胆之间的亲缘关系,聚类的先后顺序反映了它们亲缘关系的远近,光棘球海胆首先与中间球海胆聚在一起,然后再与马粪海胆聚在一起,说明光棘球海胆与中间球海胆的亲缘关系较近,其次是马粪海胆,此结果初步确定了中间球海胆这一外来种与我国海胆的亲缘关系,光棘球海胆与中间球海胆可能为同一属,而马粪海胆为另一属,这与我国学者观点一致^[18]。在 NJ 聚类分析图(图 2-b)上,紫海胆、海刺猬与球海胆科的 3 种海胆首先聚为 3 类,而恰好它们分属长海胆科、疣海胆科和球海胆科 3 个不同的科,相互间遗传距离的大小基本上反映了它们间的亲缘关系,与 UPGMA 聚类分析的结果大体一致,与传统的分类方法相差不大。

在扩增出的多态性片段中,共享片段条数的多少反映了物种的亲缘关系,亲缘关系较近的物种间共享片段较多,亲缘关系较远,则反之。在 377 条扩增片段中,5 种海胆没有共享的片段,但在球海胆科的 3 种海胆中共享片段则有 3 条,亲缘关系较近的光棘球海胆和中间球海胆间的共享片段为 13 条,紫海胆和海刺猬间的共享片段有 16 条,这些共享片段以及每一物种扩增的特征片段对海胆的种质鉴定以及亲缘关系的确定都具有十分重要的意义。

参考文献:

- [1] 曲淑惠,李嘉禄,黄 浙,等. 动物胚胎学[M]. 北京:人民教育出版社,1980.
- [2] 于豪建译. 发育生物学中的形态模式和实验[M]. 北京:人民教育出版社,1982.
- [3] Gross pau. The sea urchin developmental biology[M]. New York: Mass Information Corporation,1972,224-234.
- [4] Horstadius S. Experimental embryology of echinoderms[M]. Oxford: Oxford University Press,1973,134-151.
- [5] 高绪生,常亚青. 中国经济海胆及其增殖[M]. 北京:中国农业出版社,1999.
- [6] Lawrence J M, Lawrence A L, McBride S C. Developments in the use of prepared feeds in sea-urchin aquaculture[J]. World Aquaculture, 2001, 32(3): 34-39.
- [7] 常亚青,王子臣,孙培海,等. 虾夷马粪海胆的海区渡夏、室内中间培育及工厂化养成[J]. 中国水产科学,1999,6(2):66-69.
- [8] 常亚青,王子臣,宋 坚,等. 四种海胆杂交的可行性及幼体早期发育的研究[J]. 水产学报,2000,24(3):211-216.
- [9] 王子臣,常亚青. 虾夷马粪海胆人工育苗的研究[J]. 中国水产科学,1997,(4):60-66.
- [10] 王子臣,常亚青. 经济类海胆增殖研究进展及前景[J]. 海洋科学,1997,(6):20-22.
- [11] Durham J M, Melville R V. A classification of echinoids[J]. J Paleontol, 1957, 31: 242-272.
- [12] Matsuoka N. Biochemical phylogeny of the sea-urchins of the family Toxopneustidae[J]. Comp Biochem Physiol, 1985, 80B: 767-771.
- [13] Kyoko Saotome, Ryuichi Kamimura, Hisashi Kurokura, et al. Male chromosomes of sea urchin hybrid andromerogones created with cryopreserved sperm[J]. Zoological Science, 2002, 19: 185-189.
- [14] 张凤瀛,廖玉麟,吴宝铃,等. 中国动物图谱·棘皮动物分册[M]. 北京:科学出版社,1964. 74-101.
- [15] 夏德全,曹 莹,吴婷婷,等. 用 RAPD 方法分析太湖大银鱼、太湖新银鱼和寡齿新银鱼的亲缘关系[J]. 中国水产科学,2000,7(1):12-15.
- [16] 邹曜明,楼允东,孙效文,等. 用 RAPD 方法研究草鱼、柏氏鲢和 3 个地理种群鲤的亲缘关系[J]. 中国水产科学,2000,7(1):6-11.
- [17] 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.
- [18] Elo K, Ivanoff S, Vuorinen J A, et al. Inheritance of RAPD markers and detection of interspecific hybridization with brown trout and Atlantic salmon[J]. Aquaculture, 1997, 152:55-65.
- [19] Alison L V E, Eenennaam J P V, Medrano J F, et al. Rapid verification of meiotic gynogenesis and polyploidy in white sturgeon (*Acipenser transmontanus* R.)[J]. Aquaculture, 1996, 147:177-189.
- [20] Garcia D K, Benzie J A H. RAPD markers of potential use in penaeid (*Penaeus monodon*) breeding programs[J]. Aquaculture, 1995, 130:137-144.
- [21] 宋林生,相建海,周岭华,等. 六种海产虾类基因组 DNA 多态性的 RAPD 标记研究[J]. 海洋与湖泊,1999,30(1):62-66.
- [22] Patwey M U, Kenchington E L, Bird C J, et al. The use of RAPD markers in genetic studies of the sea scallop *Plaxipetean magellanicus*[J]. J Shellfish Res, 1994, 13(2):547-553.
- [23] Heipel D A, Bishop J D D, Brand A R, et al. Population genetic differentiation of the great scallop *Pecten maximus* in Western

- Britain investigated by randomly amplified polymorphic DNA[J]. Marine Ecology Progress Series, 1998, 162: 163-171.
- [24] 刘必谦, 戴维勋, 喻子牛. RAPD 标记在大连湾牡蛎种群研究中的应用[J]. 青岛海洋大学学报, 1998, 28(1): 82-88.
- [25] Williams J G K, 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.
- [26] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proceeding of the National Academy of Sciences, 1979, 76(1): 5 269-5 273.

Genomic DNA polymorphism in five species of sea urchin by RAPD

CHANG Ya-qing¹, DING Jun¹, XING Rong-lian¹, SONG Lin-sheng², NI Duo-jiao²

(1. Key Laboratory of Mariculture and Biotechnology, Agriculture Ministry; Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China; 2. Experimental Marine Biology Laboratory, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: RAPD technique was applied to study the polymorphism of genomic DNA from five species of sea urchins in different families of the same order. *Anthocidaris crassispina*, *Glyptocidaris crenularis*, *Hemicentrotus pulcherrimus*, *Strongylocentrotus nudus* and *Strongylocentrotus intermedius* are most important edible sea urchin in China. In this experiment, the samples of *A. crassispina* were from coast line along Zhanjiang, Guangdong Province, and the samples of *G. crenularis*, *H. pulcherrimus*, *S. nudus* and *S. intermedius* were all from the coast line along Dalian, Liaoning Province. The samples were wild except *S. intermedius* individuals which were the offspring of the parents introduced by Dalian Fisheries University in 1989. The amplification with 20 random primers produced 377 reproducible amplified fragments ranging from 200 bp to 1 600 bp. The amplified fragments were scored as present(1) or absent(0) for each DNA sample and an index of band sharing(F) was calculated by Nei and Li's matching coefficient method. The value of $(1 - F)$ was used to evaluate genetic distances between species. The phylogenetic trees were constructed with the methods of UPGMA and NJ on the basis of genetic distances. The results of the two methods of cluster analysis are in agreement, and the relationship expressed by the RAPD analysis revealed the difference between families, genus and species. *S. nudus* and *S. intermedius* shared the closest phylogenetic relationship in the phylogenetic trees, and the result was in good agreement with the concept from Chinese scholar about the taxonomy in sea urchin. The prospect of RAPD application in the field of genetics and taxonomy of sea urchin is discussed in this paper.

Key words: sea urchin; genomic DNA; RAPD; phylogenetic relationship