

利用 AFLP 技术筛选锯缘青蟹性别差异 DNA 片段

王艺磊¹, 戴 军¹, 姚扬烈¹, 张子平²

(1. 集美大学水产生物技术研究所, 水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 美国密歇根州立大学 水产与野生生物系, 密歇根 美国)

摘要:采用高盐和酚氯仿异戊醇(PCI)结合法提取 DNA, 利用 AFLP 技术, 应用 52 个引物组合, 检测了锯缘青蟹(*Scylla serrata*)雌雄基因组 DNA 的多态性, 筛选与锯缘青蟹性别相关的分子标记。实验中共扩增出 4 312 条带, 筛选出候选差异 DNA 片段 748 条。这些差异 DNA 片段的获得, 为研究锯缘青蟹性别的分子标记奠定了基础。

关键词:锯缘青蟹; 性别差异; AFLP; DNA 片段

中图分类号: Q958 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2004)04-0286-05

锯缘青蟹(*Scylla serrata*), 隶属于甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、短尾亚目(Brachyura)、梭子蟹科(Portunidae)^[1]。主要分布于我国浙江、福建、台湾、广东等南部水域, 锯缘青蟹个体大、味美, 是我国东南沿海重要的海洋经济蟹类。从营养角度来看, 雌蟹比雄蟹营养价值更高^[2], 若能培育出雌性锯缘青蟹并进行单性化养殖, 将大幅度提高商品的价值和养殖效益, 但蟹的染色体数目多, 且染色体呈点状, 因此, 迄今细胞遗传学观察尚未发现性染色体, 故而, 按传统的方法去寻找锯缘青蟹雌雄遗传差异进而控制青蟹的性别比较困难, 也是目前尚未解决的难题。本实验正是针对该问题, 采用 AFLP 技术从分子水平研究锯缘青蟹性别差异。

AFLP 技术是 1992 年由 Zabeau 等^[3]发明的一种 DNA 指纹技术。与 RFLP、RAPD 相比, AFLP 具有在一次实验中可同时观察到大量的限制性片段的优点^[4]。自该技术诞生以来, 已被广泛应用于基因鉴定、基因作图、基因表达等方面, 本研究从 DNA 水平出发, 利用 AFLP 技术检测锯缘青蟹雌雄基因组 DNA 间的差异, 筛选出与锯缘青蟹性别相关的差异片段, 这些差异 DNA 片段的获得将有助于锯缘青蟹性别鉴定的分子标记的筛选, 旨在为锯缘青蟹的育种提供帮助。

1 材料和方法

1.1 材料

收稿日期: 2003-11-06; 修订日期: 2004-01-09。

基金项目: 国家教育部骨干教师基金项目及福建省重中之重项目。

作者简介: 王艺磊(1963-), 女, 博士, 教授, 从事水产动物分子与细胞生物学研究。E-mail: ylwang@jmu.edu.cn

通讯作者: 张子平。E-mail: zipingcn@msu.edu

锯缘青蟹(*Scylla serrata*)雌、雄各 14 只, 购自厦门集美农贸市场, 取其肌肉迅速放入液氮中速冻, 后置于 -80℃ 下保存备用。

1.2 基因组 DNA 的抽提

称取 0.2 g 肌肉于液氮下研磨成粉末, 加 800 μ L 抽提缓冲液(10 mmol/L Tris/HCl, 10 mmol/L NaCl, 25 mmol/L EDTA)^[5], 100 μ L 的 10% SDS 和 23 μ L 蛋白酶 K(20 mg/mL), 混合于 1.5 mL 离心管中, 再置于 50℃ 铁板槽在摇床中轻微摇晃 3 h。采用高盐法和酚氯仿异戊醇(PCI)法抽提 DNA, 加 70% 的乙醇洗涤, 弃去乙醇, 晾干后加 100 μ L TE 缓冲液溶解 DNA。提取的 DNA 样品进行琼脂糖凝胶电泳检测, OD₂₆₀测定和 UVP 凝胶成像仪拍照分析, 以确保提取的 DNA 样品的纯度和浓度符合 AFLP 反应要求。

1.3 AFLP 反应

AFLP 试剂盒购自 invitrogen 公司。AFLP 接头及引物序列见表 1。

1.3.1 酶切反应 取等量的 14 个个体基因组 DNA 组成雌、雄 2 个 DNA 基因池。每个样品酶切混合液包括: DNA 样品 250 ng, EcoR I/Mse I(EcoR I 10 u/ μ L, Mse I 5 u/ μ L) 2.5 μ L, 5 $\times$ 反应缓冲液 5.0 μ L, 再加水至反应总体积 25 μ L。于 37℃ 水浴酶切 3 h。1% 的琼脂糖凝胶电泳检测酶切效果, 证明 DNA 样品已被消化后, 于 70℃ 水浴 15 min, 使酶失

表1 AFLP 接头及引物序列
Table 1 Adapter and primer sequence of AFLP

EcoR I 接头	5' - CTCGTAGACTGCGTACC - 3'
Adapter	3' - CATCTGACGCATGGTTAA - 3'
Mse I 接头	5' - GACGTGAGTCCTGAG - 3'
Adapter	3' - TACTCAGGACTCAT - 5'
预扩增引物	E ₀ 5' - GACTGCGTACCAATTC - 3'
Pre-amplification primers	M ₀ 5' - GATGAGTCCTGAGTAA - 3'
选择性引物	E ₁ - AAC E ₄ - ACC M ₁ - CAA M ₅ - CTA
Selective primers	E ₂ - AAG E ₃ - ACG M ₂ - CAC M ₄ - CTC
	E ₃ - ACA E ₆ - ACT M ₃ - CAG M ₇ - CTG
	M ₄ - CAT M ₈ - CTT

活,4℃下保存备用。

1.3.2 连接反应 每个连接反应混合液包括:酶切样品 5 μL,接头/连接液(*EcoR* I/*Mse* I 接头,0.4 mmol/L ATP, 10 mmol/L Tris - HCl (pH 7.5), 10 mmol/L Mg-acetate, 50 mmol/L K-acetate) 4.8 μL, T₄ 连接酶 (3 u/μL) 0.2 μL, 总体积 10 μL。于 20℃下反应 2 h。加 TE 稀释 5 倍, -20℃下保存备用。

1.3.3 预扩增反应 反应混合液包括:连接产物 1.35 μL, 10×PCR buffer 2.5 μL, 50 mmol/L MgCl₂ 0.75 μL, 10 mg/mL BSA 0.25 μL, 预扩增引物混合物 20 μL, *Taq* DNA 聚合酶 (5 u/μL) 0.15 μL。在 PE 9700 PCR 仪上扩增, PCR 反应条件: 94℃ 2 min; 94℃ 30 s, 56℃ 60 s, 72℃ 60 s, 共 20 个循环。

1.3.4 选择性扩增反应 取 6.25 μL 预扩增稀释混合液, 各加入 18.75 μL 选择性扩增混合液: 无菌水 9.0 μL, 10×PCR buffer 2.5 μL, 0.625 μL 的 50 mmol/L MgCl₂, 0.25 μL 的 10 mg/mL BSA, 0.625 μL 的 10 μmol/L *EcoR* I 引物, 5.625 μL 的 10 μmol/L *Mse* I 引物, 0.125 μL 的 *Taq* DNA 聚合酶 (5 u/μL)。PCR 反应条件: 先 94℃ 2 min, 再 94℃ 30 s, 65℃ 30 s; (每循环退火温度降低 0.7℃), 72℃ 60 s, 12 个循环后变为: 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 60 s, 23 个循环。扩增完的样品 4℃保存。

1.4 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

用 Bio-Rad 公司测序系统进行电泳。采用 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶 (6% 丙烯酰胺, 0.32% 甲

丙烯酰胺, 7 mol/L 尿素, 1×TBE)^[5]; GDY - 3000 等电聚焦电泳仪恒功率 55 W 预电泳 2 h, 直至温度达到 50℃。将选择性扩增产物加上等体积上样缓冲液于 95℃变性 5 min, 然后每个样品取 5 μL 上样, 恒功率 55 W 电泳 2 h。

1.5 银染^[6]

将电泳完后的胶放入 1% 的冰乙酸中固定摇晃 30 min, 直至前沿颜色褪尽; 然后用预冷的蒸馏水洗涤 3 次, 晾干水后转至染色液 (2 g 硝酸银, 3 mL 甲醛, 0.4 mL 10 mg/mL 硫代硫酸钠溶于 2 L 双蒸水) 中染色 30 min, 再用预冷的双蒸水洗涤 20 s; 再转至显影液 (10 g NaOH, 3 mL 甲醛溶于 2 L 双蒸水) 中显影 3 min, 直至条带清晰; 最后于 1% 冰乙酸中停影 3 min, 蒸馏水洗涤, 自然干燥。

1.6 差异性片段回收与扩增

将差异性片段从银染胶上准确切下, 转至 0.5 mL 离心管中, 加入 50 μL 无菌双蒸水中 95℃加热 15 min。每个扩增反应液的量 25 μL: 样品 5 μL, 2.5 μL 的 10 PCR buffer, 1.5 μL 的 50 mmol/L MgCl₂, dNTP (10 mmol/L) 0.5 μL, *EcoR* I 引物 (10 μmol/L) 0.5 μL, *Mse* I 引物 (10 μmol/L) 0.5 μL, *Taq* DNA 聚合酶 (5 u/μL) 0.25 μL, 无菌双蒸水 14.25 μL。PCR 反应条件: 首先 94℃ 2 min, 再 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 60 s, 循环 35 次, 最后 4℃保存。琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果, 将扩增产物保存以备筛选性别差异基因。

2 结果

2.1 基因组 DNA 的抽提结果

DNA 样品经抽提和纯化后, 样品中 RNA 基本被去除。琼脂糖凝胶电泳结果如图 1 和图 2。

2.2 雌雄 DNA 基因池琼脂糖凝胶电泳结果

雌雄 DNA 基因池的琼脂糖凝胶电泳结果如图 3, 测定的 OD₂₆₀ 值均满足进一步实验的要求。

2.3 酶切结果

EcoR I/*Mse* I 双酶切结果如图 3, 从图中可知, 酶切较为完全。

2.4 银染结果

利用 AFLP 技术, 采用 52 个引物对, 共扩增出 4 312 条带, 平均每个引物对获得约 83 条带, 共回收候选差异 DNA 片段 748 条带, 图 4 为部分引物对扩增的结果。

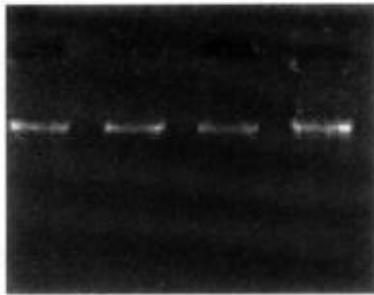


图1 雄蟹基因组 DNA

Fig.1 Genomic DNA of male crab

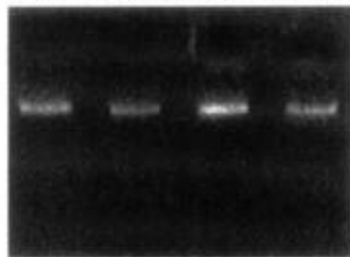


图2 雌蟹基因组 DNA

Fig.2 Genomic DNA of female crab

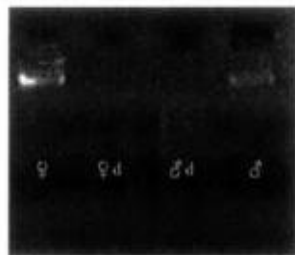
图3 雌雄基因组池酶切前与 *EcoR I/Mse I* 双酶切后的电泳图♀, ♂: 雌雄基因组池未酶切样品; ♀_d, ♂_d: 酶切过的雌雄基因组池

Fig.3 Genomic DNA pool of male and female before digestion and after digestion

♀, ♂: Before digestion; ♀_d, ♂_d: After digestion

2.5 差异性片段再扩增结果

将1~52对引物的组合分别编号为1~52。每个号码后的数字表示的是回收片段从大到小的排列,因此每对引物对的扩增结果也是从大到小排列,如图5所示。

3 讨论

本研究采用 AFLP 技术筛选锯缘青蟹性别差异 DNA 候选片段,由于自 AFLP 技术问世以来,该技术已广泛应用于拟南芥菜^[3]、水稻^[7]、大麦^[8]等植物的高密度遗传图谱的构建、分子标记的筛选以及遗

传多样性的研究。虽然近年来 AFLP 技术也逐渐被用于动物方面的分子标记,但在水产动物上采用 AFLP 技术筛选其性别差异 DNA 片段未见报道。AFLP 技术是一项新的分子标记技术,其原理是基于 PCR 技术扩增基因组 DNA 限制性片段,基因组 DNA 先用限制性内切酶切割,然后将双链接头连接到 DNA 片段的末端,接头序列和相邻的限制性位点序列,作为引物结合位点^[9]。所以 AFLP 技术相比以前的 RFLP 和 RAPD 有其独特的优点,它既具有 RFLP 技术稳定、可靠、重复性好的特点;又具有 RAPD 技术灵敏、方便、多态性强的特点^[10]。加上基因组 DNA 最能反映物种的本质特征,且不受外界条件和发育阶段的影响。本研究利用 AFLP 技术的特点,从分子水平出发,通过分析已知性别雌雄的锯缘青蟹基因组 DNA 间的多态性,筛选与其性别相关的分子标记,寻找雌、雄个体间的本质差异,为锯缘青蟹性别鉴定提供理论依据,同时也为养殖、育种提供辅助手段,有助于缩短选种的周期,也有利于得到更优良的品种。

本研究将雌雄锯缘青蟹各 14 只的基因组 DNA 等量混合起来,组成雌、雄 2 个基因池,用于筛选与性别相关的 AFLP 标记,有利于消除假阳性^[11]。以雌、雄 2 个基因池为模板,选用 52 个引物组合进行 AFLP 分析,共扩增出 4 312 条带,平均每个引物组合约提供 83 条,共回收候选差异 DNA 片段 748 条,该结果表明,雌雄锯缘青蟹基因组间存在 DNA 序列上的差异。

进一步的工作是将这些候选差异片段全部进行再扩增,把能扩增出来的 PCR 产物点在尼龙膜上或玻片上,做雌、雄 Southern 杂交,在确认该片段是雌、雄之间的真正差异 DNA 片段后,再进行测序,这样才可真正筛选出与性别相关的分子标记^[12]。

参考文献:

- [1] 李少卿,王桂忠. 锯缘青蟹繁殖生物学及人工育苗和养成技术的研究[J]. 厦门大学学报,2001,40(2):552-565.
- [2] 檀东飞,吴国欣. 锯缘青蟹营养成分分析[J]. 福建师范大学学报,2000,16(4):79-85.
- [3] Vos P, Rene H, Marjio B, et al. AFLP: a new concept for DNA fingerprinting[J]. Nucleic acids research. 1995,23(21):4 407-4 414.
- [4] 吴敏生,戴景瑞. 扩增片段长度多态性(AFLP)——一种新的分子标记技术[J]. 植物学通报,1998,15(4):68-74.

M5/E6 M5/E3 M4/E1 M4/E2 M3/E5 M3/E4 M2/E6 M2/E3 M1/E1
 ♀ ♂ ♀ ♂ ♀ ♂ ♀ ♂ ♀ ♂ ♀ ♂ ♀ ♂ ♀ ♂

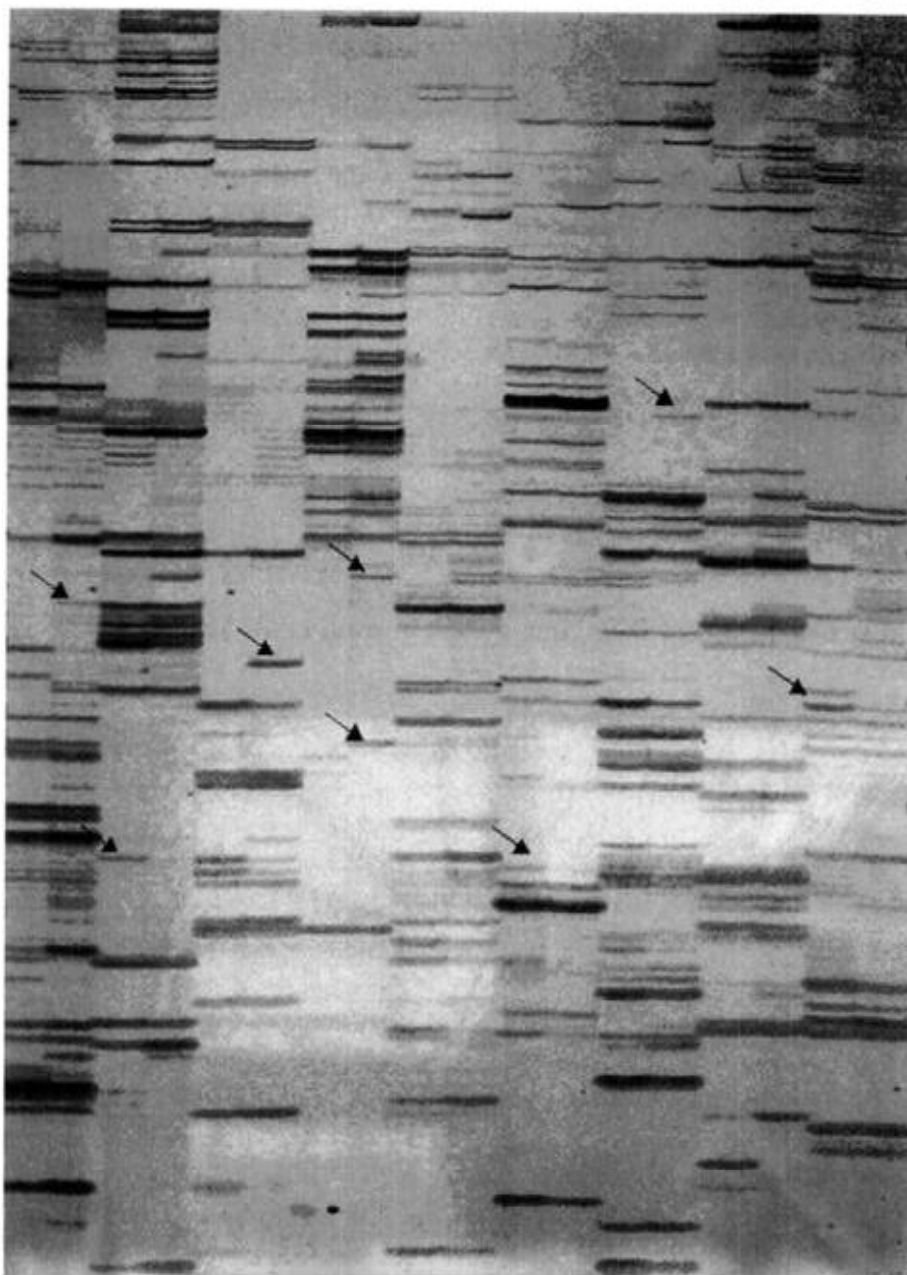


图4 2个基因池的 AFLP 分析

$E_1 - E_6$: 表示不同的引物组合; ♀ ♂: 雌雄基因池; 箭头示候选差异 DNA 片段.

Fig. 4 AFLP analysis of male and female DNA pool

$E_1 - E_6$: show different primer combinations; ♀ ♂: DNA pool of male and female; arrow shows candidate differential DNA fragments.

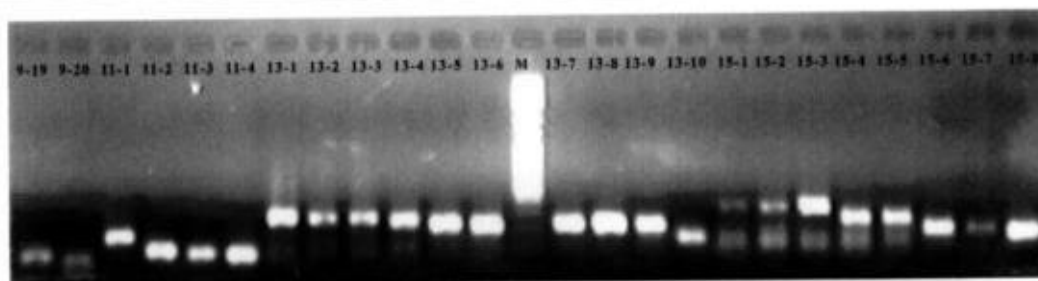


图5 不同引物对差异片段再扩增的电泳图

Fig.5 Re-amplification of differential segments from different primer pair

- [5] 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998, 696-700.
- [6] 卢圣栋. 现代分子生物学技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993, 95-149.
- [7] 翁跃进. AFLP——一种DNA分子标记新技术[J]. 遗传, 1996, 18(6): 29-31.
- [8] Mackill D J, Zhang Z, Redona E D, et al. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice[J]. Genome, 1996, 39: 969-977.
- [9] 张峰, 宋文芹, 陈瑞阳. AFLP-银染法检测植物基因组多态性[J]. 细胞生物学杂志, 1999, 21(2): 98-100.
- [10] 吴丰春, 魏泓, 甘世祥, 等. 贵州小型香猪基因组DNA的AFLP检测研究[J]. 遗传, 2001, 23(5): 423-426.
- [11] Miklas P N, Stavely J R, Kelly J D, et al. Identification and potential use of a molecular marker for rust resistance in common bean[J]. Theor Appl Genet, 1993, 85: 745-749.
- [12] 王晓梅, 宋文芹, 刘松, 等. 利用AFLP技术筛选与银杏性别相关的分子标记[J]. 南开大学学报, 2001, 34(1): 5-9.

Screen on sex-differential DNA fragments in mud crab *Scylla serrata* using AFLP

WANG Yi-lei¹, DAI Jun¹, YAO Yang-lie¹, ZHANG Zi-ping²

(1. Aquaculture Biotechnology, Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Department of Fisheries and Wildlife, Michigan State University, USA)

Abstract: Genomic DNA was extracted from muscle of female and male in mud crab *Scylla serrata* using high concentrated salty-PCI (Phenol, Chloroform, Isoamylalcohol). Equal genomic DNA from 14 female or male individuals was mixed as genomic DNA pool of female and male. Using amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique, which involves three steps: restriction of the DNA and ligation of oligonucleotide adapters, pre-amplification and selective amplification of sets of restricted fragments, and gel analysis of the amplified fragments, genomic DNA polymorphisms of female and male in *Scylla serrata* were detected with 52 primer combinations. The molecular markers related to sex locus in *Scylla serrata* were screened. 4 312 fragments were amplified and 748 candidate differential DNA fragments were obtained. These differential segments from different primer pair were re-amplified by PCR. Further work is that the differential fragments should be confirmed by DNA chip and Southern blot. These markers DNA are important to the development of the sex specific PCR primers or probes that could be used in the sex identification of *Scylla serrata*.

Key words: *Scylla serrata*; sex difference; AFLP; differential DNA fragments

Corresponding author: ZHANG Zi-ping. E-mail: zipingcn@msu.edu