

三种群银鲫的 RAPD 分析初报

姚纪花 楼允东

(上海水产大学渔业学院, 200090)

摘要 利用 20 个随机引物对产于方正、彭泽和淇河地区的三个银鲫种群进行了 RAPD 检测, 结果显示 14 个引物的扩增效果良好, 单一引物扩增的 DNA 片段数在 2~13 条之间, 片段长度在 300~4000bp 之间。根据 RAPD 结果, 进行了银鲫种群内、种群间的遗传差异分析。14 个引物中, 引物 OPV-07、OPV-14 和 OPV-20 等对三种群银鲫扩增出的指纹图谱差异显著, 可作为银鲫种群鉴定的分子标记。

关键词 银鲫, 种群, 随机扩增多态 DNA

中图分类号 S917

Preliminary report on the RAPD analysis of three populations of *Carassius auratus gibelio*

Yao Jihua, Lou Yundong

(Fisheries College, SFU, 200090)

ABSTRACT Three populations of *Carassius auratus gibelio* lived in Fangzheng County (Heilongjiang Province), Pengze County (Jiangxi Province) and Qihe River (Henan Province) were analyzed by RAPD method using twenty arbitrary primers. The experiment shows that fourteen primers were effective, each primer gave 2-13 bands for the each individual. The length of the fragment was 300-4000bp. According to the patterns, genetic variations of inter-and intrapopulations of *C. auratus gibelio* were analysed. Among three populations, the differences of fingerprints obtained by primers OPV-07, OPV-14 and OPV-20 were so obviously that might be used to be molecular markers.

KEYWORDS *Carassius auratus gibelio*, population, RAPD

随机扩增多态 DNA (RAPD) 技术是近年发展起来的一种 DNA 多态性检测技术^[1]。由于该方法操作简便, 多态性丰富, 因此广泛应用于物种及种群之间的鉴定和遗传纯度的测定^[2-4]、亲缘关系的重建^[5]及基因定位和分离等研究中^[6]。本文应用 RAPD 技术检测三种群银鲫 (*Carassius auratus gibelio*)——方正银鲫、淇河鲫和彭泽鲫的基因组 DNA 多态性, 据此分析银鲫种群内和种群间的遗传差异。

1 材料和方法

1.1 材料

方正银鲫采自黑龙江方正县双凤水库, 彭泽鲫为江西九江市水产研究所人工选育至第六代的鱼种,

本课题获农业部上海水产大学增殖生态生理重点开放实验室资助, KFT1998-4 号。

第一作者简介: 姚纪花, 女, 1966 年 3 月生, 硕士学位, 副教授, 现主要从事分子生物学方面的研究工作。

收稿日期: 1999-09-23

淇河鲫采自河南鹤壁市白龙庙段淇河。每群体各取6尾,取肌肉组织,提取DNA,进行RAPD分析。

1.2 试剂

引物:随机引物购自Openron公司(Kit-V);Taq DNA聚合酶购自加拿大Binstar公司。

1.3 方法

DNA的提取参照Bemachez等^[7]描述的方法。RAPD扩增反应在SABC公司生产的PCR循环仪上进行,反应混合液组成为:模板DNA1 μ L(50~100ng),引物0.2 μ M/L,4dNTP(各0.5mM)2.5 μ L,10 \times buffer 2.5 μ L,Taq DNA聚合酶1 μ ,加ddH₂O至总体积25 μ L。扩增条件为:94 $^{\circ}$ C预变性2min;然后94 $^{\circ}$ C变性1min,36 $^{\circ}$ C退火1min,72 $^{\circ}$ C延伸1.5min,45个循环;再于72 $^{\circ}$ C下延伸5min。

扩增产物在1.2%的琼脂糖凝胶中(含适量EB)电泳,电泳缓冲为0.5 \times TBE,电压4V/cm,电泳2.5h后,紫外灯下观察结果并拍照记录。

1.4 数据处理

两个个体间的遗传相似性指数按公式 $S_{xy} = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ 来计算, N_x 和 N_y 分别是个体X,Y的扩增带数, N_{xy} 是X,Y个体间的共享带数^[8]。群体内的相似性指数(S)是种群内所有的两个个体间相似性指数的平均值。群体间的遗传相似性指数 S_{ij} 为群体i中的个体和群体j中的个体随机组合所得相似性指数的平均值。统计时仅记录清晰稳定的扩增条带。

2 结果

2.1 RAPD的扩增结果

所使用的20个引物中,14个引物的扩增效果良好,单一引物扩增的条带数由2~13条不等(表1),扩增片段长度大多在300~4000bp之间。14个引物共产生149个DNA标记(条带),其中彭泽鲫、方正银鲫与淇河鲫三种群的DNA标记数分别为96、125和102个,其中61条带(41%)为三个银鲫种群所共有,88条带(59%)具有

群体或个体特异性,显示了丰富的多态性。14个引物中,OPV-07、OPV-14和OPV-20等扩增的三种群的DNA指纹图谱差异非常明显(图1-A、B、C)。图1表明,在OPV-07的扩增产物中,淇河种群中有一800bp左右的特异片段(图1-A);在OPV-14的扩增产物中,淇河种群有一特异片段,长度为4200bp(图1-B);在OPV-20的扩增产物中,方正与彭泽种群各有一特异片段,长度分别为900与730bp,而淇河种群有二个特异片段,长度为1800和1950bp(图1-C)。这6个片段都具有种群的特异性,因此可作为鉴定这三种群的分子标记。

2.2 种群内和种群间的相似性指数

三银鲫种群内和种群间相似性指数见表2。

相似性指数表明:三种群内,以彭泽鲫种群的遗传差异最小(0.816),方正银鲫其次(0.791),而淇河鲫的遗传杂合度较大(0.762);对于种群间,则是彭泽鲫与方正银鲫较为相似(0.619),方正银鲫与淇河鲫次之(0.614),彭泽鲫与淇河鲫之间的差异较大(0.543)。

表1 14个引物的DNA序列及其扩增效果
Tab.1 Sequences and amplified efficiency with 14 primers

引物	序列	扩增条带数	引物	序列	扩增条带数
OPV-01	TGACGCATGG	4~13	OPV-12	ACCCCCCACT	3~11
OPV-02	AGTCACYCC	3~12	OPV-14	AGATCCCGCC	2~7
OPV-03	CTCCICGAA	2~10	OPV-15	CAGTGCCGGT	2~5
OPV-04	CCCCICACGA	2~6	OPV-16	ACACCCACA	3~7
OPV-06	ACGCCAGGT	4~12	OPV-17	ACCGCCTGT	3~6
OPV-07	GAAGCCAGCC	2~10	OPV-18	TGGTGGCGTT	4~8
OPV-10	GGACGTCTG	2~5	OPV-20	CAGCATGGTC	2~9

表2 银鲫种群内和种群间的相似性指数
Tab.2 Inter- and intrapopulation similarity index of *C. auratus gibrlio*

种群名称	彭泽鲫	方正银鲫	淇河鲫
彭泽鲫	0.816		
方正银鲫	0.619	0.791	
淇河鲫	0.543	0.614	0.762

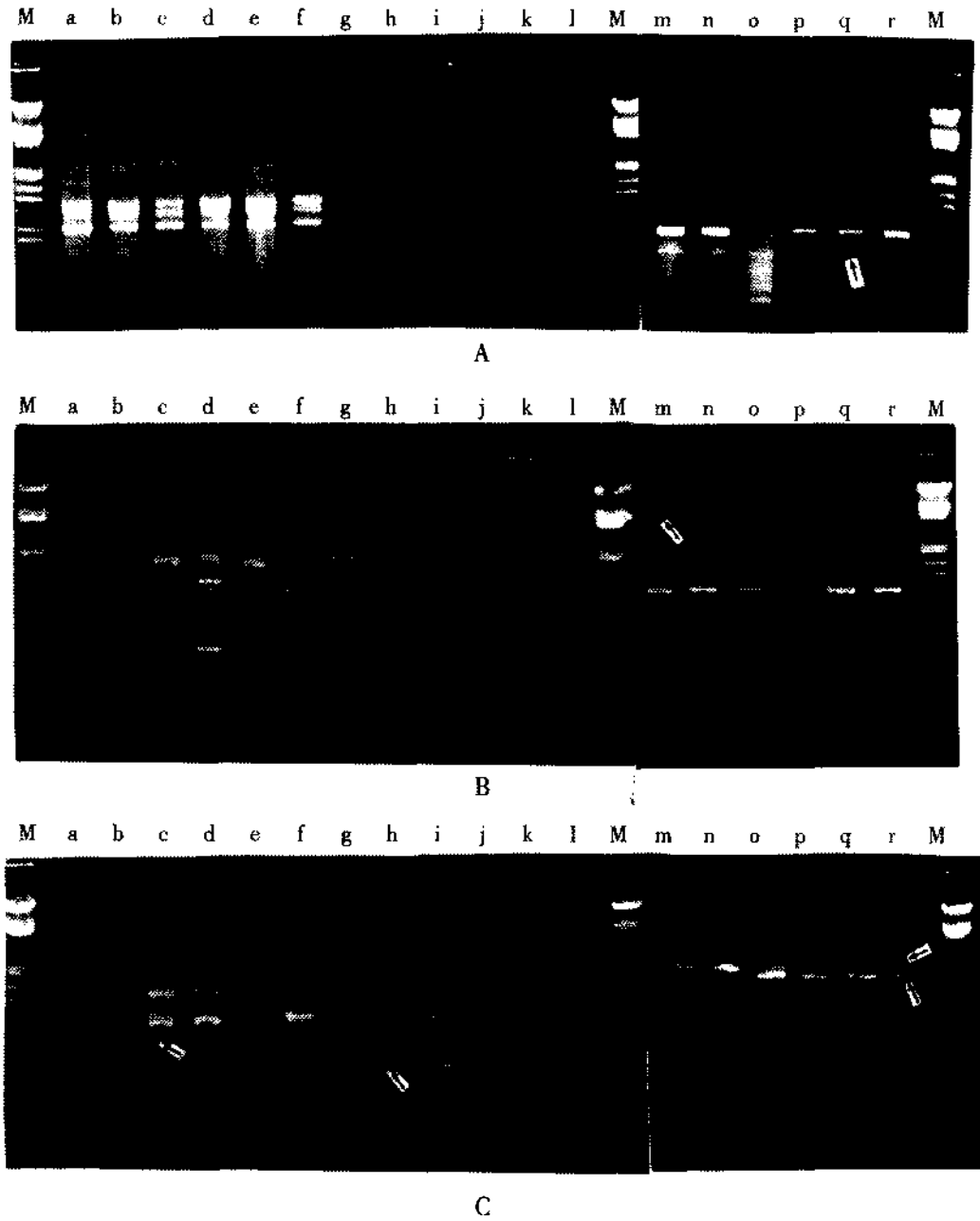


图 1 三种群银鲫在引物 OPV-07, ●PV-14 和 ●PV-20 扩增的 RAPD 结果(箭头示特异带)

Fig.1 The RAPD results of *C. auratus gibelio* produced by OPV-07, ●PV-14 and OPV-20 (Arrows show population-specific bands)

A, B 和 C 分别为 OPV-07, OPV-14 和 OPV-20 扩增的产物。

M:λDNA/HindⅢ + EcoRI; a~f:方正银鲫; g~l:彭泽鲫; m~r:淇河鲫。

3 讨论

我们采用 RAPD 方法对三个地区的银鲫种群内及种群间的遗传差异进行研究,结果显示,对于三种群银鲫,以彭泽鲫种群内遗传差异最小(0.816),方正银鲫次之(0.791),而淇河鲫种群的遗传差异较大(0.762),这一结论与 mtDNA RFLP 分析的结果相吻合^[9],与理论上的分析也相一致,事实上,银鲫种群

内部的遗传差异与它们的生活环境密切相关:淇河鲫生活于天然河道中,受环境影响较大,方正银鲫生存于水库,相对较为封闭,而彭泽鲫则为人工养殖且经多代选育,因而三种群内的遗传差异以淇河鲫最大,方正银鲫次之,彭泽鲫最小。

本试验的随机扩增多态结果进一步显示了 RAPD 方法具有良好的分辨率和丰富的多态性,由于引物数原则上可以任意增加,因此有可能找到任何一个个体的特异 RAPD 标记。在本次试验中,引物 OPV-07, OPV-14 及 OPV-20 对三个种群扩增的 DNA 指纹图谱差异极大,其中有 6 个片段具种群的特异性,因此可作为三银鲫种群鉴定的分子标记。

黑龙江水产研究所沈俊宝老师提供部分样品,1999 届毕业生游学明、夏建宏和周英伦参加了部分工作,照片的摄制由本院张敏同志完成,深表感谢。

参 考 文 献

- 1 Williams J G K, Kubelik A, Livak K, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 1990, 18(22):6531 ~ 6535
- 2 薛国雄, 刘 棘, 刘 洁. 二江水系草鱼种群 RAPD 分析. *中国水产科学*, 1998, 5(1):1 ~ 5
- 3 王晓梅, 宋文芹, 李秀兰等. 用 RAPD 技术检测野生鲫鱼和四个金鱼代表种的基因组 DNA 多态性. *遗传*, 1998, 20(5):7 ~ 11
- 4 夏德全, 曹 莹, 吴婷婷等. 用 RAPD 分析对罗非鱼遗传变异的研究及其对杂种优势的应用. *水产学报*, 1999, 23(1):27 ~ 31
- 5 何舜平, 汪亚平, 陈宜瑜. 五种鲤科鱼类的 RAPD 分析兼论稀有鲫的系统位置. *水生生物学报*, 1997, 21(3):262 ~ 267
- 6 王京兆, 王 斌, 徐琼芳等. 用 RAPD 方法分析水稻光敏核不育基因. *遗传学报*, 1995, 22(1):53 ~ 58
- 7 Brnachez L, Guyonard R, Bonhomme F. DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout *Salmo trutta* populations. *Molecular Ecology*, 1992, 1:161 ~ 173
- 8 Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting. *Mol Biol Evol*, 1990, 7:478 ~ 484
- 9 姚纪花, 楼允东, 江 涌. 我国六地区银鲫种群线粒体多态性的研究. *水产学报*, 1998, 22(4):289 ~ 295