

两种泥鳅 RAPD 标记遗传稳定性分析

杜启艳 常重杰* 南萍 燕帅国

(河南师范大学生命科学学院 新乡 453007)

摘要:用从 20 个随机引物中筛选出的 7 个引物对泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)和大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)及其自交与杂交子代进行了 RAPD 遗传稳定性分析。结果表明,RAPD 谱带主要呈孟德尔式遗传,该类带纹明亮稳定,在泥鳅子代中占 99.11%,在大鳞副泥鳅子代中占 100%,在杂交子代中占 99.36%。也存在非孟德尔式遗传谱带,该类带纹较暗、稳定性差,在泥鳅子代中为 0.89%,在杂交子代中为 0.64%,在大鳞副泥鳅中未见此类带纹。实验结果说明 RAPD 谱带具有很高的遗传稳定性。

关键词:泥鳅;大鳞副泥鳅;RAPD;遗传稳定性

中图分类号:Q953 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2005)06-09-05

The Genetic Stability of RAPD Marker in Two Species of Loaches

DU Qi-Yan CHANG Zhong-Jie NAN Ping YAN Shuai-Guo

(College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract The genetic stability of RAPD marker was analyzed in adult inbred or hybrid progenies of *Misgurnus anguillicaudatus* and *Paramisgurnus dabryanus* by using 7 primers selected from 20 random primers. The results showed that the major RAPD stripes accorded with Mendelian inheritance. The bright and steady stripes represented 99.11% in *M. anguillicaudatus* inbred progenies, 100% in *P. dabryanus* inbred progenies, and 99.36% in hybrid progenies. And there were also abnormal segregations as shown in weak and unstable bands in low frequency, 0.89% in inbred progenies of *M. anguillicaudatus*, and 0.64% in hybrid progenies. These results indicate that the genetic stability of RAPD marker is very high in loaches.

Key words *Misgurnus anguillicaudatus*; *Paramisgurnus dabryanus*; RAPD; Genetic stability

随机扩增多态性 DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)标记广泛应用于动植物遗传育种中品种鉴定、分子标记的建立以及种属间亲缘关系的探讨等方面^[1-4]。然而由于引物的随机性、序列较短及退火温度低等, RAPD 技术的重复性和稳定性较差。研究人员常常通过优化 DNA 扩增的条件和反应程序以获得可重复的 RAPD 图谱,从方法上解决其稳定性问题。那么, RAPD 谱带的遗传稳定性又是如何呢?迄今有关方面的研究尚不多见。

泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)和大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)是常见的鲤形目

(Cypriniformes)鳅科(Cobitidae)鱼类,亲缘关系较近,也具有一定的经济价值,常常被作为实验材料。本文以泥鳅和大鳞副泥鳅为材料进行 RAPD 分析,探讨了随机扩增多态性 DNA 片段的遗传稳定性。

基金项目 河南省高校杰出科研人才创新工程项目(No. 2001KYCX010);河南省杰出青年科学基金项目(No. 0512001800);

* 通讯作者, E-mail: changzhongjie@tom.com;

第一作者介绍 杜启艳,女,副教授,从事动物遗传学研究。

收稿日期 2005-04-05,修回日期 2005-09-07

1 材料与方法

1.1 试验鱼 泥鳅和大鳞副泥鳅购自河南省新乡市新市场。选择卵巢轮廓明显、外观呈纺锤形的雌鳅,按 800 IU/尾的量背部肌肉注射绒毛膜促性腺激素(HCG,宁波第二激素厂),雄鳅注射剂量减半。7~10 h 后 轻压雌鳅腹部将卵收集于不同的培养皿中,干法授精。同时进行种间杂交,室温孵化。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 对两种泥鳅亲本采用断尾取血提取基因组 DNA^[5]。对两种泥鳅的子代以及它们的杂交子代随机挑取 5 尾约 2 cm 幼鱼,采用全鱼液氮研磨分别提取基因组 DNA。

1.2.2 RAPD 反应条件优化及引物筛选 RAPD 引物及 PCR 相关试剂均购于上海生工。采用正交设计原理,从统计模型上优化 PCR 反应体系。具体方法是:先以混合模板 DNA 的浓度、引物浓度、 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度等 4 种因素的各 3 个水平,采用 $L_9(4^3)$ 正交表作正交设计,根据带的强弱及重复性作为取舍指标,选取最佳组合。RAPD-PCR 反应条件循环参数为:首轮 94℃ 变性 5 min,以后为 94℃ 1 min,36℃ 1 min,72℃ 2 min;5 个循环后提高复性温度至 39℃,共 40 个循环,循环结束后 72℃ 充分延伸 10 min。

参照 Dawis^[6]等提出的混合 DNA 扩增方法筛选引物,然后用筛选的引物分别对子代与其相应亲本扩增。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后拍照。

1.2.3 数据处理 假设 RAPD 标记为一对等位基因按完全显性方式遗传,则具有某条谱带的亲本在该位点上的基因型为 AA 或 Aa,而无该谱带的亲本为 aa,由此推断该谱带在子代中的理论分离。选择重复性好且稳定的谱带进行统计分析,对每一个引物而言,把在特定位置上出现强或弱但具重复性扩增带的记作“1”,未出现或出现但弱且不具重复性扩增带的记作“0”,并对结果进行统计分析。

2 结果

2.1 RAPD 反应体系的优化及引物筛选 采用正交设计优化方案最终确定 25 μ l RAPD-PCR 反应体系包括:dNTP 80 μ mol/L,RAPD 引物 0.8 μ mol/L, $MgCl_2$ 2 mmol/L,Taq DNA 聚合酶 2 U,基因组 DNA 60 ng。

以亲本与子代 DNA 混合为模板,以条带亮且数量适中、重复性好为标准,最终选择 7 个最佳引物,即其编号和序列依次为 S1282(TCACCGTGTG),S1283(TGTAGCCGTG),S1286(CCCGAGATCC),S1289(GAGGTCCTAC),S1292(AGCCGTCGAA),S1293(CTGACTTCCC)和 S1298(TTGCTCACGG)。

2.2 大鳞副泥鳅自交子代及其相应亲本的 RAPD 遗传稳定性 选用上述 7 个引物对大鳞副泥鳅自交子代与相应亲本 DNA 进行扩增,结果统计如表 1 所示。7 个引物在父本中扩增出 96 条谱带,在母本中扩增出 91 条,双亲共 116 条。5 尾子代个体分别扩增出 89、104、99、99 和 96 条谱带。父本 RAPD 标记在其子代中的表现率(子代所具有的与父本相同的 RAPD 标记占子代标记的比例)分别为 86.81%、93.41%、92.31%、89.01% 和 87.91%。母本谱带在其子代中的表现率分别为 78.13%、91.67%、83.33%、89.58% 和 86.46%。亲本标记在子代中的表现率均在 78% 以上,说明大部分位点在亲本中为纯合(图 1)。

经对比分析,在大鳞副泥鳅 5 尾自交子代个体中所扩增出的 RAPD 带纹均对应于亲本中的 116 条谱带,无子代特异带纹出现,即均符合孟德尔式遗传,不存在异常分离现象。

2.3 泥鳅自交子代及其相应亲本的 RAPD 遗传稳定性 上述 7 个随机引物分别对泥鳅亲本及其 5 个子代个体的基因组 DNA 进行随机扩增,也获得了清晰的 RAPD 谱带,统计结果如表 2 所示。在父本中共出现 80 条谱带,母本中出现 80 条,共 111 条不同谱带。5 尾子代个体中分别扩增出 88、87、84、86 和 86 条谱带。父本 RAPD 标记在其子代中的表现率分别为

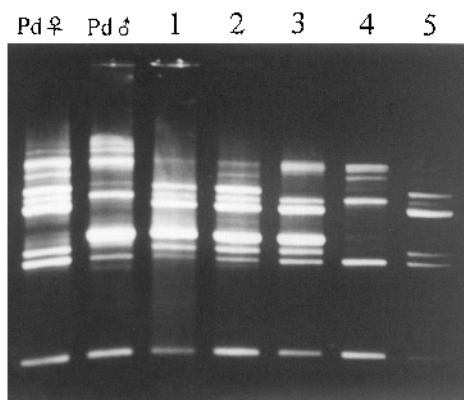


图 1 引物 S1282 在大鳞副泥鳅自交子代与相应亲本的扩增结果

Fig.1 The amplification results of parents and progenies in *P. dabryanus* obtained by using primer S1282

Pd ♀ 大鳞副泥鳅雌性亲本 ; Pd♂ 大鳞副泥鳅雄性亲本 ;
1 ~ 5 : 子代个体。

Pd ♀ : female *P. dabryanus* ; Pd♂ : male *P. dabryanus* ;
1 - 5 : inbred progenies .

86.25%、85%、82.5%、82.5% 和 80% , 母本 RAPD 标记在其子代中的表现率分别为 80%、80%、80%、82.5% 和 85%。此外, 引物 S1282 在子代个体 3 和 5 扩增出一条在父母本中均没有的扩增带, 但带纹较驳 (图 2)。

假设 RAPD 标记是完全共显性遗传, 从理论上讲, 亲子代间谱带的分离方式应符合孟德尔式遗传, 即子代的 RAPD 均应能在亲本中找到对应的带纹。那些子代特有(子代有而双亲无)的带纹为异常分离, 不符合孟德尔式遗传。在泥鳅自交子代中共扩增出 112 条谱带, 其中 99.11% 为孟德尔式遗传。一条为子代特有带, 即非孟德尔式遗传 RAPD 带纹占 0.89%。

2.4 泥鳅 ♀ × 大鳞副泥鳅 ♂ 杂交子代及相应亲本的 RAPD 遗传稳定性 7 个随机引物对泥鳅 ♀ 与大鳞副泥鳅 ♂ 杂交子代与相应亲本的扩增结果列入表 3。父本共扩增出 100 条谱带, 母本中 91 条, 共 155 条不同谱带。5 尾子代个

表 1 大鳞副泥鳅亲子个体间 RAPD 谱带特征

Table 1 The RAPD characteristics of parents and progenies in *P. dabryanus*

差异谱带数 Different bands	一致谱带数 Identical bands						
	Pd♀	Pd♂	PdPd1	PdPd2	PdPd3	PdPd4	PdPd5
Pd♀		71	75	88	80	86	83
Pd♂	45		79	85	84	81	80
PdPd1	35	22		84	81	80	76
PdPd2	24	25	25		91	90	90
PdPd3	34	21	25	20		85	86
PdPd4	23	28	28	23	26		84
PdPd5	26	27	33	20	22	27	

Pd 大鳞副泥鳅 ; PdPd 大鳞副泥鳅自交子代。

Pd : *P. dabryanus* ; PdPd : self-bred progenies of *P. dabryanus* .

表 2 泥鳅亲子个体间 RAPD 谱带特征

Table 2 The RAPD characteristics of parents and progenies in *M. anguillicaudatus*

差异谱带数 Different bands	一致谱带数 Identical bands						
	Ma♀	Ma♂	MaMa1	MaMa2	MaMa3	MaMa4	MaMa5
Ma♀		62	34	35	34	34	35
Ma♂	49		34	35	34	35	35
MaMa1	64	69		31	28	23	31
MaMa2	64	68	72		33	29	32
MaMa3	64	66	73	69		24	23
MaMa4	66	66	75	72	73		25
MaMa5	68	64	72	71	74	74	

Ma 泥鳅 ; MaMa : 泥鳅自交子代。

Ma : *M. anguillicaudatus* ; MaMa : self-bred progenies of *M. anguillicaudatus* .

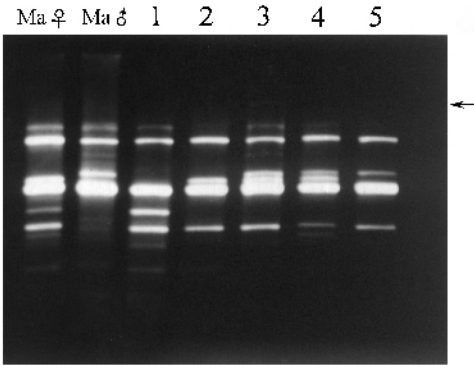


图 2 引物 S1282 在泥鳅自交子代与相应亲本的扩增结果

Fig.2 The amplification results of parents and progenies in *M. anguillicaudatus* obtained by using primer S1282

Ma ♀ 泥鳅雌性亲本; Ma ♂ 泥鳅雄性亲本;
 1~5 :子代个体; 箭头所示为子代特有扩增弱带。
 Ma ♀ : female *M. anguillicaudatus* ;
 Ma ♂ : male *M. anguillicaudatus* ;
 1 - 5 : inbred progenies ;
 arrow indicates the specific RAPD stripe in progenies.

杂交亲本 RAPD 标记在子代中的表现率明显低于自交亲本中相应的比率,但仍大于 50%,说明在两种泥鳅中部分 RAPD 位点是相同的。另外,引物 S1286 在后 3 个子代中分别扩增出一条特异带,且带纹较驳(图 3)。

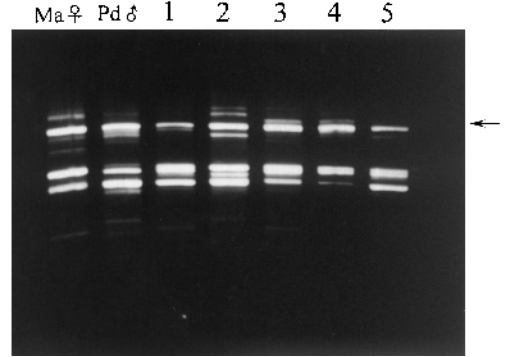


图 3 引物 S1286 在杂交子代与相应亲本的扩增结果

Fig.3 The amplification results of parents and hybrid progenies in *M. anguillicaudatus* and *P. dabryanus* obtained by using primer S1286

Ma ♀ 泥鳅雌性; Pd ♂ 大鳞副泥鳅雄性;
 1~5 泥鳅和大鳞副泥鳅的杂交子代;
 箭头所示为非孟德尔式遗传扩增弱带。
 Ma ♀ : female *M. anguillicaudatus* ; Pd ♂ : male *P. dabryanus* ;
 1 - 5 : hybrid progenies ;
 arrow indicates the specific RAPD stripe in progenies.

体中分别扩增出 109、124、111、107 和 114 条谱带,父本 DNA 谱带在其子代个体中的表现率依次为 75%、82%、68%、68% 和 78%,母本 RAPD 标记在其子代个体中的表现率依次为 73.63%、85.71%、83.52%、76.92% 和 76.92%。

表 3 两种泥鳅杂交亲子个体间 RAPD 谱带特征

Table 3 The RAPD characteristics of parents and hybrid progenies in *M. anguillicaudatus* and *P. dabryanus*

差异谱带数 Different bands	一致谱带数 Identical bands						
	Ma ♀	Pd ♂	MaPd1	MaPd2	MaPd3	MaPd4	MaPd5
Ma ♀		36	67	78	76	70	70
Pd ♂	119		75	82	68	68	78
MaPd1	66	59		101	87	82	89
MaPd2	59	60	21		97	94	98
MaPd3	50	74	45	60		92	90
MaPd4	58	71	42	42	33		89
MaPd5	65	58	46	39	44	43	

Ma 泥鳅; Pd 大鳞副泥鳅; MaPd :两种泥鳅杂交子代。
 Ma : *M. anguillicaudatus* ; Pd : *P. dabryanus* ; MaPd : hybrid progenies.

在杂交组合中,杂交子代中有 155 条谱带是孟德尔式遗传,即 99.36%子代完全符合孟德尔式遗传;非孟德尔式遗传的条带仅存在一条,即约 0.64% 谱带是异常分离。

3 讨论

RAPD 技术简单方便,但由于其引物的随机性、序列较短及退火温度低等特点,对反应条件非常敏感,许多因素稍有变化就会导致扩

增结果的改变。因此优化反应体系中各组分以提高其重复性和稳定性,是进行 RAPD 研究必须解决的首要问题^[7]。本次实验中,通过正交设计优化 PCR 反应的各组分,最终确定适合泥鳅和大鳞副泥鳅 RAPD-PCR 最优反应体系。

在所有关于 RAPD 的研究中,首先假定 RAPD 是孟德尔共显性遗传,每个谱带代表着一个等位基因,且每条谱带都是由单一序列组成,不存在由于序列差异但大小相同而形成的同一谱带的情形。即使存在这种情形,由于不经序列测定难以发现,也一律视为同一基因位点,这就涉及到一个 RAPD 实验研究中一个最根本的问题,即 RAPD 的遗传稳定性。在本实验中,通过泥鳅和大鳞副泥鳅自交与杂交组合的 RAPD 分析,发现 RAPD 标记具有非常高的遗传稳定性,即有 99% 以上的子代带纹均可在亲本中找到对应的带纹。部分子代个体具有少数特有带纹,在亲本中找不到对应的带纹,即 RAPD 标记中存在异常分离现象,所占比例较少。在泥鳅自交组合中存在 0.89% 异常分离谱带,在杂交组合中有 0.64% 谱带为异常分离。这类异常分离的带纹有一个共同的特征,即带纹较暗稳定性差。其产生原因可能有以下几方面,首先可能受染色体在 DNA 水平上的重排、缺失、插入或突变等的影响。在减数分裂或有丝分裂过程中,他们改变了两个引物结合位点间的距离,进而影响了 PCR 模板使扩增结果异常;第二,由于基因突变使得出现新的引物结合位点或原有位点消失;第三,线粒体 DNA 的影响。代谢活跃的组织中线粒体 DNA 含量相应较高。在基因组 DNA 的提取过程中,可能存在少量的线粒体 DNA,而线粒体 DNA 的存在或突变或断裂均可造成异常分离现象的产生。因此为了防止此类带纹的出现,分析样品应尽可能取自同一组织。第四,可能受实验操作和条件的影响。如在基因组 DNA 的提取过程中 DNA 的断裂或污染、PCR 操作过程中试剂或模

板等的污染亦可影响扩增结果。产生异常分离现象的原因多种多样,在实验过程中应尽可能减少非实验因素的影响,使实验结果更为精确。

RAPD 分子标记技术已广泛应用于生命科学研究的各个领域,目前尽管存在着重复性欠佳等不足,但其遗传稳定性相当高,加之简便、快捷、代价低廉和多态性丰富等优点是其他分子标记无法比拟的。在动物遗传育种、群体遗传分析、遗传性状标记选择等领域,RAPD 技术已经成为一种常规的分子标记手段。为了提高分析的精度,必须十分注意 RAPD 的遗传稳定性和重复性,那些明亮且稳定出现的谱带应当作为首选的对象使用。随着分子生物学技术的发展,RAPD 技术将克服这些缺陷,今后也将随着这项技术的进一步完善发挥其更大的作用。

参 考 文 献

- [1] 张建珍,任俐,郭亚平等.山西省及邻近地区中华稻蝗 5 个种群 RAPD 分析及其亲缘关系.遗传学报,2004,31(2):159~165.
- [2] Zhang Q L,Gu F. Identification of co-segregating RAPD marker linked to powdery mildew resistance gene Pm18 in wheat. *Agricultural Sciences in China* 2004, 3(6):415~409.
- [3] Diaby M,Casler M D. RAPD marker variation among divergent selections for fiber concentration in Smooth Bromegrass. *Crop Sci*, 2005 45:27~35.
- [4] Alves B C,Unanian M M. Use of RAPD markers for identifying Nelore Bulls with early reproductive maturation onset. *Anim Reprod Sci* 2005 85(3~4):183~191.
- [5] Sambrook J,Fritsch E F,Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001.
- [6] Dawis T M. Template mixing: a method of enhancing detection and interpretation of condominant RAPD markers. *Theor Appl Genet* 1995 91:582~588.
- [7] Quintaes B R,Leal N C,Reis E M, et al. Optimization of randomly amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction for molecular typing of *Salmonella enterica serovar Typhi*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004 37(2):143~147.