

# 银鲫复合种外源遗传物质整入的 RAPD 分析

周 莉 樊连春 桂建芳 \*

(中国科学院水生生物研究所, 国家淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

**摘要** 在优化 RAPD 检测条件的基础上, 采用 40 对随机引物, 比较分析了银鲫复合种、异育银鲫和兴国红鲤相互间扩增 DNA 片段的异同性。总的来说, 银鲫复合种和异育银鲫具有基本一致的扩增产物, 而与兴国红鲤的扩增产物多数不同。相似率分析表明, 银鲫复合种与兴国红鲤之间的相似率为 31.6%, 异育银鲫与兴国红鲤之间的相似率为 28.6%。在分析中, 除发现银鲫复合种、异育银鲫与兴国红鲤间共有的扩增片段外, 还发现了银鲫复合种与兴国红鲤间共有的扩增片段以及银鲫复合种所特有的 DNA 扩增带。本研究不但为银鲫复合种异源遗传成分的整入提供了新的证据, 而且证实银鲫复合种比异育银鲫整入了更多的异源遗传成分。

**关键词** 异育银鲫, 银鲫复合种, 雌核发育, RAPD, 相似率

银鲫 [*Carassius auratus gibelio (Bloch)*] 是雌核发育繁殖的鱼类之一, 但它与其它雌核发育繁殖的物种明显不同, 其天然群体为实行雌核发育繁殖的三倍体两性型种群<sup>[1-2]</sup>。受传统雌核发育概念影响, 过去一般认为, 行雌核生殖的单性物种由于没有有性生殖所具有的重组和交换的机会, 其突变累积的结果, 必将难以适应变化的环境, 最终导致绝灭。然而, 单性物种的进化成功和对生态环境适应性的事实已改变了上述观点<sup>[3-4]</sup>。特别是分布于我国的天然雌核发育银鲫, 在蒋一珪等发现异源精子不仅可刺激卵子雌核发育, 而且还能影响子代的性状而提出异精雌核发育和异精效应的新观点之后<sup>[5]</sup>, 又相继在人工繁育的异育银鲫群体中发现了整入异源基因组的复合四倍体个体<sup>[6]</sup>, 并由此出发, 采用人工调控银鲫雌核发育机制的方法, 成功地诱导获得了银鲫复合种<sup>[7-8]</sup>。

在获得的银鲫复合种中, 由于整倍体复合种融入了异源精子的一个染色体组, 因而可通过染色体数目来鉴定, 如融入鲤鱼基因组的复合四倍体具有 212 条染色体<sup>[6]</sup>。但对于非整倍体复合种来说, 由于银鲫的染色体数目多, 还无法鉴定整入的染色体成员或 DNA 片段。

建立在 PCR 技术方法上的 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA) 技术自 1990 年诞生以来, 已在品种鉴定、亲缘关系探讨和遗传作图方面获得了广泛应用<sup>[9-11]</sup>。陈洪等曾采用 RAPD 技术从 DNA 水平上证明了异源精子对异育银鲫子代产生效应的分子

国家杰出青年科学基金, 国家自然科学基金和中国科学院院长基金等资助。

\* 通讯联系作者。

1997-01-03 收到; 1997-07-16 修回。

生物学证据<sup>[1,2]</sup>。非整倍体银鲫复合种所产生的生物学效应比异育银鲫大,其整人的异源遗传物质也可能更多。因此,采用 RAPD 技术将有可能检测出银鲫复合种在 DNA 上的证据,并进一步为分离和克隆其特异性 DNA 片段以至产生效应的基因奠定基础。

## 1 材料与方法

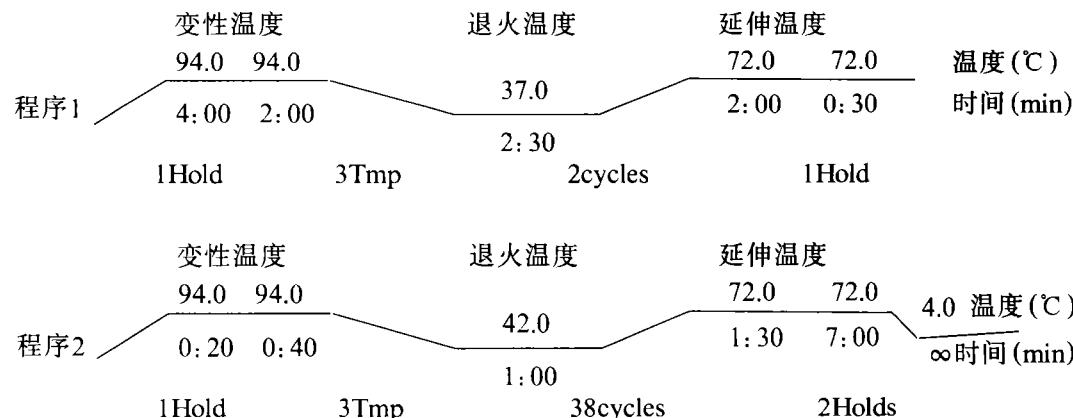
**1.1 实验鱼** 异育银鲫、兴国红鲤(*Cyprinus carpio* red variety)、银鲫复合种均取自本所关桥试验场,其中异育银鲫是从方正银鲫经多代(10代以上)异精雌核发育繁育的后代,银鲫复合种为异育银鲫授精后经冷休克处理获得的掺入了兴国红鲤部分遗传物质的亲鱼<sup>[7,8]</sup>繁育的子代(F1)。三种实验鱼都达性成熟,取材于4月份,为二龄鱼。

**1.2 RAPD 反应仪器及试剂** PCR 扩增仪为美国 PERKIN ELMER CETUS 公司生产的 GeneAmp2400, RAPD 扩增引物购自美国 Operon 公司, Taq 酶和 dNTP 是华美公司分装美国 Promega 公司的产品。

**1.3 基因组 DNA 的提取** 取新鲜活鱼,放血后称取约 1.5g 卵巢或肝脏,加入 10 倍体积的匀浆缓冲液在低温下充分匀浆(缓冲液组分: 10mmol/L Tris-HCl, pH=8.0, 75mmol/L NaCl, 5mmol/L EDTA, 0.5% SDS),随后经 RNA 酶 37℃ 消化 1h,蛋白酶 K 55℃ 消化 2h 后,进行酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提,将所得上清液加入 1/10 体积的 3mol/L NaAc 和 2 倍体积的冰无水乙醇沉淀。用适量的 TE 缓冲液溶解 DNA 沉淀(10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH=8.0),置 -20℃ 冰箱备用。

**1.4 基因组 DNA 的鉴定** 以 Lamda DNA 为标准,用 0.8% 琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/ml 的溴化乙锭)电泳(5—10V/cm)2h,紫外灯下拍照,确定 DNA 的质量及浓度。

**1.5 RAPD 检测** RAPD 反应体系的总体积为 25μl,内含 2.5μl 10 × Reaction Buffer, 1.6μl 25mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 2μl 2.5mmol/L 的 dNTP 混合物, 1μl 引物(约 15ng), 10—20ng 模板 DNA, 0.5 单位 Taq 酶, 15.9 μl 纯水。RAPD 反应扩增程序经预备实验后,确定了下列①和②两个程序:



RAPD 扩增产物鉴定在 1.5% 琼脂糖电泳凝胶上(含 0.5ug/ml 溴化乙锭)进行,紫外灯下拍照。

**1.6 相似率分析** 根据 Nei 等人的相似率分析公式进行数据分析<sup>[13]</sup>。相似率 =  $(2 \times N_{ab}) / (N_a + N_b) \times 100\%$ , 其中  $N_{ab}$  表示个体 a 和 b 之间共有的 DNA 扩增片段的数目,  $N_a$  为个体 a 具有的 DNA 扩增片段的数目,  $N_b$  为个体 b 具有的 DNA 扩增片段的数目。

## 2 结果

### 2.1 RAPD 分析最佳条件的确定

为选取最佳扩增体系和条件, 依次进行了模板 DNA 浓度, 镁离子浓度, dNTP 浓度, Taq 酶浓度梯度对比实验。理论上讲, 一个细胞中的 DNA 量已经足够, 但模板分子数越多, 则错误扩增越少, 因此在本研究中, 每 25 μl 反应体系中, 加入 10—20ng 模板 DNA。在反应体系中, 离子浓度尤其是镁离子浓度, 对 RAPD 反应的特异性和扩增效率都有影响, 镁离子浓度过高, 会使非特异性扩增产物增加, 降低镁离子的浓度会使扩增产物减少。最后确定每一反应体系加入 1.6 μl 的 25mmol/L 的 MgCl<sub>2</sub>。

在本实验的 RAPD 分析中, 扩增反应的引物为 10 个核苷酸, G+C 含量为 50—60%。考虑到既要获得扩增产物又有一定的特异性这两个因素, 在本实验中, 最初两个循环中, 选用 37℃ 为退火温度, 先积累一定量的扩增产物。扩增产物与引物具有较好的亲和性, 在后面的 38 个循环中, 选取 42℃ 为退火温度。

### 2.2 扩增片段数大小和相似率分析

稳定条件后, 使用两组 40 个含 10 个碱基的引物分别对异育银鲫、兴国红鲤及银鲫复合种的基因组 DNA 进行 RAPD 扩增。40 个引物中除 1 个没有扩增出任何片段外, 其余 39 个引物共扩增出 749 条可分辨的 DNA 片段, 其中异育银鲫为 237 条, 兴国红鲤为 260 条, 银鲫复合种为 252 条(表 1), 绝大部分扩增片段大小在 300—2 500bp 之间。

对异育银鲫、兴国红鲤和银鲫复合种之间共有的 DNA 扩增片段以及各自的 DNA 扩增片段进行统计分析, 表明异育银鲫与兴国红鲤之间的相似率为 28.6%, 银鲫复合种与兴国红鲤之间的相似率为 31.6%, 而异育银鲫与银鲫复合种之间的相似率最大, 为 71.6% (表 1)。这种相似率的差异既反映了银鲫与红鲤之间较远的非同属的亲缘关系, 又揭示出银鲫复合种比异育银鲫整入了更多兴国红鲤的遗传成份。

表1 40组RAPD可分辨的总片段数及三个样品相互间的相似率

Tab.1 Total number and similarity of distinguishable fragments amplified with 40 primers among the three samples

样 品	扩增的DNA 片段数	共有的扩增DNA片段及相似率%		每对引物DNA 片段平均数
		银鲫复合种	兴国红鲤	
银鲫复合种	252			6.30
兴国红鲤	260	79(31.6%)		6.50
异育银鲫	237	175(71.6%)	77(28.6%)	5.93

### 2.3 银鲫与红鲤种间特异的 RAPD 产物分析

如果就单个引物来分析, 银鲫与红鲤的种间差异特别明显。如引物 P5, P8, H2 和 H18 的扩增产物在异育银鲫和银鲫复合种之间几乎完全一致, 而兴国红鲤则完全不同(图 1), 这一方面反映这些引物的扩增片段是其物种所特有的, 另一方面也说明我们所应用的

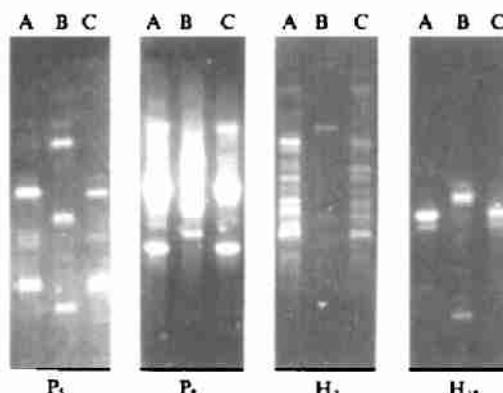


图1 银鲫复合种(A)和异育银鲫(C)具有一致的扩增产物,而兴国红鲤(B)的扩增产物完全不同的4组典型的RAPD扩增产物电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of 4 typical RAPD products, showing similar amplified fragments between the multiple species (A) and allogynogenetic silver crucian carp (C), and different amplified products in red common carp (B)

RAPD分析方法是可靠的。

#### 2.4 银鲫复合种、异育银鲫和兴国红鲤间共有扩增片段的检出

在一些引物如P1, P4, P17和P20等的扩增产物中可以看到1—3条由银鲫复合种、异育银鲫和兴国红鲤相互间共有的DNA扩增带(见图2)。这些共有的带纹反映了种间进化的保守性,也有可能是异育银鲫与银鲫复合种中都整入了兴国红鲤的某些DNA片段的反映。

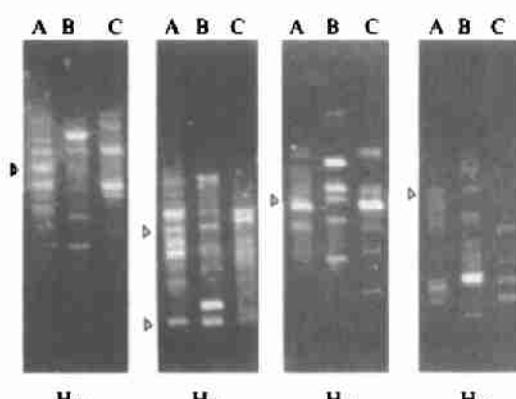


图3 银鲫复合种(A)与兴国红鲤(B)相互间共有的DNA扩增带(用>表示),C为异育银鲫的DNA扩增带

Fig. 3 Electrophoretogram of 4 RAPD products, showing the shared DNA bands between the multiple species (A) and red common carp (B), C is amplified DNA bands of allogynogenetic silver crucian carp

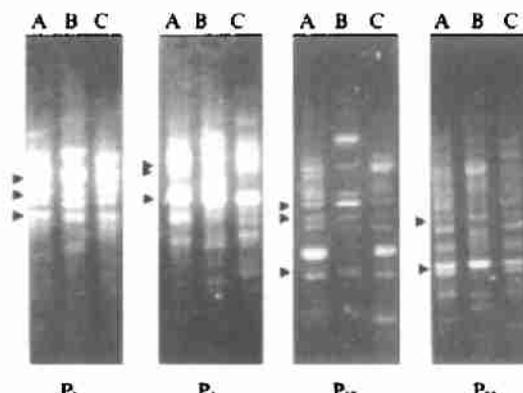


图2 银鲫复合种(A)、异育银鲫(C)与兴国红鲤(B)相互间共有的DNA扩增带(用>表示)

Fig. 2 Electrophoretogram of 4 RAPD products, showing the shared DNA bands among the multiple species (A), allogynogenetic silver crucian carp (C) and red common carp (B)

#### 2.5 银鲫复合种与兴国红鲤间共有DNA扩增片段的检出

RAPD检测分析中看到,在引物H11、H14、H16和H17的扩增产物中含有银鲫复合种与兴国红鲤共有的DNA扩增片段,而异育银鲫在同一位置没有这一片段(图3)

#### 2.6 银鲫复合种特有的DNA扩增片段检出

在检测中,我们还发现了一些由银鲫复合种和异育银鲫各自特有的DNA扩增带纹(图4)。如引物P14, P19, H6, 和H17的扩增结果就可以看出一些片段是银鲫复合种所特有的。同样,在引物P3, H2, H16和H17等(图片未显示)扩增结果中,也见有为异育银鲫所特有的片段。这可能是由

于子代鱼 DNA 变异或重组交换的结果<sup>[12]</sup>。

### 3 讨论

80年代以来, 蒋一珪等在异育银鲫和银鲫雌核发育机理研究实践中, 首先发现了异精效应现象, 提出了异精雌核发育培育异育银鲫的新概念<sup>[5]</sup>。此后, 丁军等采用 DNA 斑点杂交以及陈洪等应用 RAPD 分析研究中, 已经证实异源精核的 DNA 片段掺入了银鲫卵核发育, 并传给了子代<sup>[12, 14]</sup>。最近, Schartl 等在具有雌核发育生殖方式的美帆鱼将 (*Poecilia formosa*) 中, 也发现了类似于银鲫异精效应的现象, 并认为异源 DNA 的掺入补偿了雌核发育鱼类的突变负荷, 从而促进了雌核发育物种的进化<sup>[15]</sup>。

我们在银鲫雌核发育的调控研究中, 发现采用冷休克等方法处理受精卵, 可以提高异源精子 DNA 掺入和整合到银鲫基因组中的效率, 并在子代中显示出比异育银鲫更为明显的包括体型变化和生长加快等生物学效应<sup>[8]</sup>。这进一步刺激我们提出了“异精雌核发育介导基因转移”的新观念, 并由此寻找和鉴定那些被雌核发育机制摄取的并产生了生物学效应的基因或起调控作用的 DNA 片段的设想<sup>[8]</sup>。

本研究通过 RAPD 分析, 不但证明银鲫复合种和异育银鲫中都整入了红鲤的异源 DNA, 与以前陈洪等的报道相符, 而且发现在雌核发育人工调控获得的银鲫复合种中比普通异育银鲫中整入了更多的异源遗传成份。当然, 这一研究仅仅是此项工作的一个开端, 下步工作将就进一步检测出更具特征的扩增谱带, 并由此鉴定和克隆整入到银鲫复合种中并能表达或调控产生生物学效应的基因或 DNA 片段。

### 参 考 文 献

- [1] 桂建芳. 单性脊椎动物的进化遗传学. 自然杂志, 1989, 12(2): 116—122
- [2] Fan Z T, Shen J B. Studies on the evolution of bisexual reproduction in crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch). *Aquaculture*, 1990, 84: 235—244
- [3] Quattrocchi J M, Arise J C, Vrigenhoeck R C. Ancient clonal lineage in the fish genus *Preciliopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 348—352
- [4] Smith J M. Age and the unisexual lineage. *Nature*, 1992, 356: 661—662
- [5] 蒋一珪等. 异源精子在银鲫的雌核发育子代中的生物学效应. 水生生物学报, 1983, 8(1): 1—3
- [6] 桂建芳等. 异育银鲫人工繁育群体中复合四倍体的发现及其育种潜力. 科学通报, 1992, 37(7): 646—648
- [7] 丁军等. 异源精子质膜蛋白的潜在银鲫雌核发育初级控制中的作用. 科学通报, 1993, 38(5): 455—458
- [8] 桂建芳. 银鲫天然雌核发育机理研究的回顾与展望. 中国科学基金, 1997, 11(4): 11—16

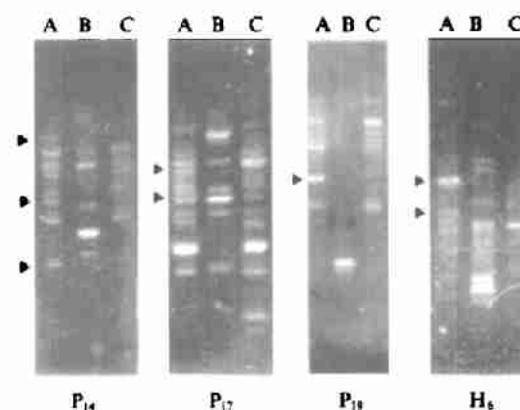


图 4 银鲫复合种(A)特有的 DNA 扩增带(用▶表示), B 和 C 分别为兴国红鲤和异育银鲫的 DNA 扩增带

Fig. 4 Electrophoretogram of 4 RAPD products, showing specific DNA bands in the multiple species (A), B and C are amplified products of red common carp and allogynogenetic silver crucian carp respectively

- [9] Williams J G K, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 1990, **18**:6531
- [10] Gregory B M, Rapid identification of markers linked to a *Psedomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, **88**:2332
- [11] Postlewait J H, et al. A Genetic Linkage Map for the Zebrafish. *Science*, 1994, **264**:699—703
- [12] 陈洪等. RAPD技术在异精激发方正银鲫比较研究中的应用. 科学通报, 1994, **39**(7): 661—663
- [13] Nei M, et al. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, **76**:5269
- [14] 丁军等. 异育银鲫及其人工杂合体中外源遗传物质的检测分析. 水生生物学报, 1993, **17**(1): 22—26
- [15] Schartl M, et al. Incorporation of subgenomic amounts of DNA as compensation for mutational load in a gynogenetic fish. *Nature*, 1995, **373**:68—71

## RAPD ANALYSIS OF INCORPORATION OF HETEROLOGOUS GENETIC MATERIALS IN MULTIPLE SPECIES OF SILVER CRUCIAN CARP

Zhou Li Fan Lianchun and Gui Jianfang \*

(Institute of Hydrobiology, the Chinese Academy of Sciences, State Key Laboratory for Freshwater Ecology and Biotechnology, Wuhan 430072)

**Abstract** The similarities and differences of amplified DNA fragments among the multiple species of silver crucian carp, allogynogenetic silver crucian carp and red common carp (*Cyprinus carpio*) were analysed through the RAPD technique optimized in this system. Forty random primers of 10 nucleotide long sequence were used in the RAPD analysis. Generally, there existed similar amplified products between the multiple species and allogynogenetic silver crucian carp, whereas most of the products were obviously different in red common carp. The similarity of the amplified DNA bands between the multiple species and red common carp was 31.6%, and the similarity between allogynogenetic silver crucian carp and red common carp was 28.6%. Some amplified DNA bands were discovered to be shared by the multiple species, allogynogenetic silver carp and red common carp, and some bands were revealed to be shared between the multiple species and red common carp. Moreover, a few of specific bands were found only in the multiple species. The results not only provided new molecular evidences for incorporation of heterologous genetic materials in the multiple species, but also demonstrated that heterologous genetic materials in the multiple species were more than that in allogynogenetic silver crucian carp.

**Key words** allogynogenesis, multiple species, gynogenesis, RAPD, similarity

Supported by the grants from National Natural Science Foundation and the Chinese Academy of Sciences

\*Corresponding author