

研究简报

用 RAPD 和 SCAR 复合分子标记对黄颡鱼属进行种质鉴定

童芳芳¹ 汤明亮¹ 杨 星¹ 彭 智² 刘思阳¹

(1. 武汉大学生命科学院发育生物学教育部重点实验室, 武汉 430072; 2. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070)

SPECIES AUTHENTICATION OF PELTEOBAGRUS BY MULTIPLEX MOLECULAR MARKER PAPD AND SCAR

TONG Fang-Fang¹, TANG Ming-Liang¹, YANG Xing¹, PENG Zhi² and LIU Si-Yang¹

(1. Key Laboratory of Development Biology in Education Department, College of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072;

2. Fisheries College, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

关键词: 分子标记; 黄颡鱼; 种质鉴定

Key words: Molecular marker; *Pelteobagrus*; Species authentication

中图分类号: Q173

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2005)04-0465-04

黄颡鱼 (*Pelteobagrus*) 是一类中小型经济鱼类, 因其肉质细腻, 肉味鲜美, 近年来被广泛养殖, 并成为一种重要的经济鱼类。本属共有普通黄颡鱼 (*P. eupogon*)、长须黄颡鱼 (*P. fulvidraco*)、瓦氏黄颡鱼 (*P. vachelli*)、光泽黄颡鱼 (*Pelteobagrus nitidus*) 和中间黄颡鱼 (*P. intermedius*) 5 种, 前 4 种在长江水系广泛分布, 而中间黄颡鱼仅分布于闽江至珠江水系及海南岛^[1,2]。对黄颡鱼的分类尚存在一些争议, 主要是所依据的形态学标准存在一定差异^[3,4], 因此寻找一个合适的标准和方法对黄颡鱼的种类进行准确的鉴定意义重大。

基于基因或基因组差异的分子标记技术对物种进行的鉴定是最为准确和可靠的。已经发展起来的分子标记有多种, 包括: RFLPs^[5], AFLPs^[6], SSRs^[7], ISSRs^[8], RAPD^[9,10] 及其基础之上发展起来的 SCAR (Sequence characterized applied region) 标记技术。这些分子标记都被实践所证实是鉴定物种的良好方法, 但是像 RFLPs, SSRs 等分子标记的筛选过程非常昂贵除耗时耗力外, 对设备的要求也较高, 相比较而言 RAPD 无疑是经济和可行的。但 RAPD 技术自身也存在很多缺陷, 尤其是其稳定性和可重复性较低, 另外对其弱带的判读和处理也会对实验的准确性造成一定影响。因此, 本实验在 RAPD 基础之上, 针对每个黄颡鱼属各个种的特异电泳条带设计了类似于 SCAR 引物的特异引物, 从而实现了黄颡鱼

三个主要种类的准确鉴别。

1 材料与方法

1.1 材料来源 普通黄颡鱼采自武汉汤逊湖; 瓦氏黄颡鱼, 光泽黄颡鱼捕自长江嘉鱼县江段, 活体运回, 取肌肉于 95% 乙醇中固定, 形态鉴定和种的确认参考文献^[1,2]。

1.2 试剂和仪器 10 × buffer, MgCl₂, Taq 酶, 100bp ladder 购自华美生物公司; dNTP 购自大连宝生物; 引物由北京奥科生物公司合成; T-vector kit 购自 Promega 公司; DNA Extraction Kit 为 MBI 产品; 测序交由上海基康公司完成。

1.3 基因组总 DNA 的抽提 基因组总 DNA 的抽提参照标准酚-氯仿抽提程序进行, 以 DNA 为标准, 在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳检测, 确定 DNA 的质量及浓度。

1.4 RAPD 反应体系 RAPD 反应体系和扩增程序同以前报道^[11], 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 以 100bp ladder 作为 Marker。

1.5 PCR 特异扩增反应体系 对阳性克隆片段的检测, 按标准 PCR 反应体系加样, 扩增引物为 T-vector M13 通用引物, 94 预变性 4min 后, 按 94 变性 30s, 60 复性 45s, 72 延伸 1min 进行 30 个循环, 最后一个循环完成后 72 延伸 5min。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 以 100bp ladder 参照。

收稿日期: 2004-10-26; 修订日期: 2004-12-28

基金项目: 湖北省科技攻关计划重点项目 (编号: 2004AA205B02); 农业部淡水鱼类种质资源与生物技术重点开放实验室项目 (编号: LFB20040508)

作者简介: 童芳芳 (1979—), 女, 湖北宣城, 硕士; 动物遗传及发育。汤明亮对论文同等贡献

通讯作者: 刘思阳, E-mail: syliu1960@yahoo.com.cn

针对各对特异引物的 PCR 也采用标准反应体系,扩增也采用同一个程序,首先 94 预变性 4min,然后开始第一轮循环:94 变性 30s,63 复性 45s,72 复性 1min,进行 19 个循环;接着进行第二轮循环:94 变性 30s,60 复性 45 ,72 复性 1min,进行 13 个循环;最后在 72 延伸 5min。1.0 %琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,以 100bp ladder 作为参照。

1.6 DNA 特异条带的克隆和筛选 参照 DNA extraction kit、T Vector kit 使用说明进行。

1.7 特异引物的设计 使用软件 Primer Premier 5.0 直接将整理好的片段序列输入,按程序说明进行设计,并选择最佳

引物对。

2 结果

2.1 RAPD 筛选

本实验用随机引物进行筛选(表 1),选择得到最适引物 S₇,由其对三种黄颡鱼基因组总 DNA 进行扩增后各出现一条特异性条带,依图 1 从左至右在其下端用直线标注,即光泽黄颡鱼的带 G(635bp),瓦氏黄颡鱼的带 V(767bp),普通黄颡鱼的带 P(517bp)。

表 1 随机引物及其扩增状况
Tab.1 random primers and their amplification

引物编号 No. of primer	引物序列 Primer sequence	扩增带数 Amplicons	引物编号 No. of primer	引物序列 Primer sequence	扩增带数 Amplicons
S ₁	GTTTCGCTCC	12	S ₁₁	GTTGGTGGCT	10
S ₂	TGATCCCTGG	10	S ₁₂	ACAACGCCTC	12
S ₃	CATCCCCCTG	19	S ₁₃	GGGGGATGAG	0
S ₄	GGA CTGGAGT	14	S ₁₄	GGGGGTGTC	11
S ₅	TGCGCCCTTC	14	S ₁₅	GGGAACGTGT	10
S ₆	TGCTCTGCCC	10	S ₁₆	CTGGGCAACT	11
S ₇	GGTGACGCAG	11	S ₁₇	AGGGAACGAG	16
S ₈	GTCCACACGG	20	S ₁₈	CCACA CCA GT	10
S ₉	TGGGGGACTC	0	S ₁₉	ACCCCCGAAG	9
S ₁₀	CTGCTGGGAC	16	S ₂₀	GGACCCCTAC	0

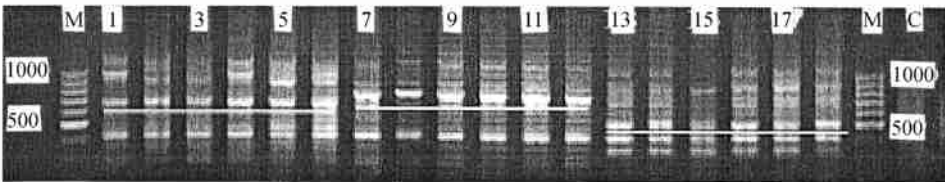


图 1 随机引物 S₇ 扩增结果

Fig.1 The application of random primer S₇

1—6 以光泽黄颡鱼基因组总 DNA 为模板;7—12 以瓦氏黄颡鱼基因组总 DNA 为模板;13—18 以普通黄颡鱼基因组总 DNA 为模板;C 为无模板空白对照

1—6 use the total DNA of *Pelteobagrus nitidus* as templet , 7—12 use the total DNA of *Pelteobagrus vachelli* as templet , 13—18 use the total DNA of *Pelteobagrus eupogon* as templet , C is control of no templet

2.2 三条特异带的回收

直接将三条特异带切胶回收并纯化,结果见图 2,从大小



图 2 纯化片断

Fig.2 Purification fragments

1,2,3 依次为特异带 G,V,P

1,2,3 are characteristic band of G,V,P in sequence

上看,与目的片段一致。

2.3 阳性克隆的筛选和检测

将回收的特异带分别与 T 载体连接,并转入大肠杆菌 DH5 菌株中扩增,挑取阳性克隆,用 M13 通用引物检测,选取克隆 G6,G7,G8,V4,V7,V8,P17,P18,P19 作为有效克隆(图 3),分别进行测序。

2.4 特异引物

针对三条特异带 G、V、P 设计的引物对依次为 primer G、primer V 和 primer P,扩增跨度依次为 543bp,654bp 和 440bp。结果见表 2。



图 3 克隆 G
Fig.3 Clones G
为由 G 转化得到的克隆,所有 9 个克隆均为有效克隆
The clones from G, in which nine of all are valid

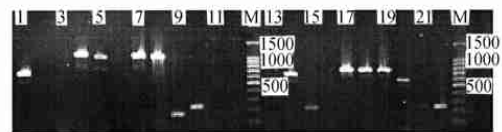


图 4 克隆 V 和 P
Fig.4 Clones V and P
1—12 为由 V 转化得到的克隆,其中 4,7,8 为有效克隆;13—22 为由 P 转化得到的克隆,其中 17,18,19 为有效克隆
1—12 are clones from V, in which 4,7,8 are valid; 13—22 are clones from P, in which 17,18,19 are valid

表 2 特异引物序列
Tab.2 Characteristic primer pairs

名 称 \ 引 物	Forward Primer (5' —3')	Reverse Primer (5' —3')
Primer-G	GCATC TGITC CCGAG CGACT AAT	TCCAC CACAA ACACC ACACC GTA
Primer-V	AGGAA GAAAC CTTGA GAGGA AC	AGAGT CAGAG AGAAG AGCAG CA
Primer-P	AGAGA TGGAT GITTA TTTAT GCTA	GGAAT GAACC TGAGA CTTAT TGIT

2.5 primer-G 对三种黄颡鱼模板 DNA 的检测
由图 5 可以看出,以 primer-G 引物在三种黄颡鱼模板中都能扩增出 543bp 单一的特异带。
2.6 primer-p 对三种黄颡鱼 DNA 模板的检测
由图 6 可以看出,以 primer-P 引物在对三种黄颡鱼模板的扩增中,在普通黄颡鱼和瓦氏黄颡鱼的模板中能够扩增得

到 440bp 的单一特异带,但在光泽黄颡鱼中没有任何带。
2.7 primer-V 对三种黄颡鱼 DNA 模板的检测
由图 7 可以看出,以 primer-V 为引物对三种黄颡鱼模板的扩增中,在光泽黄颡鱼和瓦氏黄颡鱼的模板中能够扩增得到 654bp 的特异带,但在普通黄颡鱼中没有得到。



图 5 primer-G 扩增结果
Fig.5 The application of primer-G
左图 1—9 以普通黄颡鱼总 DNA 为模板,10 为其空白对照;右图 3—12 为光泽黄颡鱼,1 和 2 是其空白对照;13—22 为瓦氏黄颡鱼,23 和 24 是其空白对照
the fig. left, use the total DNA of *Pelteobagrus eupogon* as templet, 10 is control; the fig. right, 3—12 use *Pelteobagrus nitidus*, 1 and 2 are controls; 13—22 use *Pelteobagrus vachelli*, 23 and 24 are controls

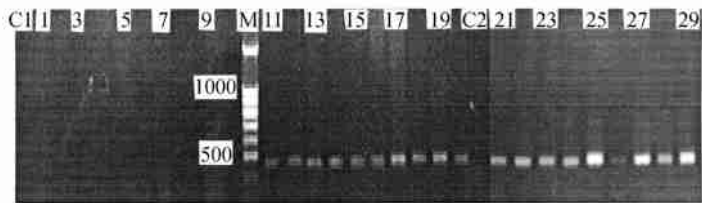


图 6 primer-P 扩增结果
Fig.6 The application of primer-P
1—10 以光泽黄颡鱼的总 DNA 为模板,C1 为其空白对照;11—20 以瓦氏黄颡的总 DNA 为模板,C2 为其空白对照;21—29 以普通黄颡鱼的总 DNA 为模板,C3 为其空白对照
1—10 use the total DNA of *Pelteobagrus nitidus* as templet, C1 is control; 11—20 use the total DNA of *Pelteobagrus vachelli* as templet, C2 is control; 21—29 use the total DNA of *Pelteobagrus eupogon* as templet, C3 is control

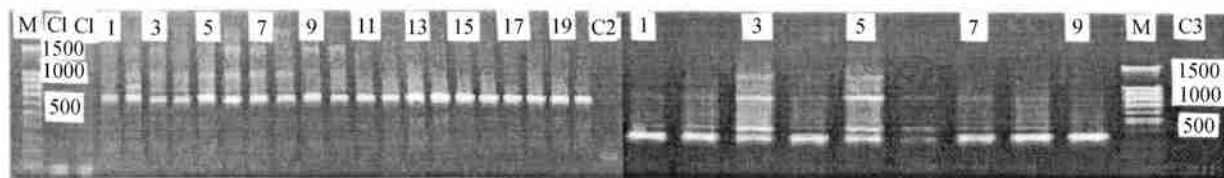


图7 Primer-V 的扩增结果

Fig. 7 The application of primer-V

左图, 1—10 以光泽黄颡鱼的总 DNA 为模板, C1 为其空白对照; 11—20 以瓦氏黄颡鱼的总 DNA 为模板, C2 为其空白对照; 右图, 1—9 以普通黄颡鱼的总 DNA 为模板, C3 为其空白对照

The fig. left, 1—10 use the total DNA of *Pelteobagrus nitidus* as templet, C1 is control; 11—20 use the total DNA of *Pelteobagrus vachelli* as templet, C2 is control; the fig. right, 1—9 use the total DNA of *Pelteobagrus eupogon* as templet, C3 is control

三种特异引物扩增均能够得到相应的特异条带为光泽黄颡鱼; 仅有 primer-P 扩增后得不到相应特异带的为瓦氏黄颡鱼; 仅有 primer-V 扩增后得不到相应特异带的为普通黄颡鱼。

3 讨论

本实验的复合分子标记, 即是筛选得到的随机引物 S_7 的 RAPD 标记和特异引物 primer-G, primer-P, primer-V 的特异性扩增标记, 通过将这两种标记相结合, 能够对三种黄颡鱼实现准确快速的鉴别。RAPD 标记简单快速, 可通过其带谱的差异对三种黄颡鱼进行第一轮鉴别, 然后通过三个特异性引物的扩增对第一轮的结果进行确证, 从而使鉴定结果稳定可靠。

在实验方法上, 本实验一个关键的步骤即特异性片段的克隆。这个步骤的主要目的不是单纯的扩增, 而是对回收片段的一个纯化和筛选过程, 由于 RAPD 反应的性质及琼脂糖凝胶电泳分辨率的限制, 回收纯化所得到的所谓的特异片段中所含的片段并非一种 (图 4)。如果直接将回收纯化的片段测序, 很有可能形成过多杂峰而使测序无法完成, 而且即使测序完成了, 也不能保证测序结果与目的片段大小相符。

另外, 此次实验还发现了一个现象就是: 依据 RAPD 所反映出来的特异带所设计的特异引物 primer-G 能够在三种鱼中都扩增出来, primer-P 能够在普通黄颡鱼和瓦氏黄颡鱼中扩增出来, primer-V 也不只是在瓦氏黄颡鱼中才扩增出来。通过设计 SCAR 引物对三个物种的基因组进行扩增至少能在两个物种中得到同源片段, 甚至大多数情况下在三个物种中都能得到相同的片段, 这说明随机引物 S_7 扩增出来的三条“特异性片段”在三个物种中具有高度的同源性。因此, 推断这种现象的原因是因为所谓的“特异序列” (至少包含特异引物扩增的那些片段), 其实为两种或三种鱼所共享, 而之所以表现出“特异”, 是因为在特定的 RAPD 扩增条件下, 只有一种鱼能够扩增出来, 其中的本质原因可能还是由于基因组中片段拷贝数的差异或旁侧结构 (Lateral Structure) 的差异。本试验中, 针对每个特异片段, 设计了多对特异引物, 虽然大部分都能扩增出来, 但是没有找到只在一种鱼中将相应的特异片段扩增出来的特异引物。然而, 通过三个特异性引物同样能达到从分子水平对三种鱼进行鉴别的目的。如果要筛选

得到只针对一种黄颡鱼的特异引物, 还可以尝试进行更多的 RAPD 筛选以得到更多的特异片段, 再由这些特异片段筛选出符合要求的特异引物。

参考文献:

- [1] Cheng Q T, Zheng B S. Systematic Synopsis of Chinese Fishes [M]. Beijing: Science Press. 1987, 213—214 [成庆泰, 郑葆珊. 中国鱼类系统检索 (上册). 北京: 科学出版社, 1987, 213—214]
- [2] Yang G R. Fishes of Hubei [M]. Hubei: Hubei Science and Technology Press. 1987, 159—165 [杨干荣. 湖北鱼类志. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1987, 159—165]
- [3] Yue Z H, et al. Fresh Water Fishes of Guangxi [M]. Nanning: Guangxi People Press. 1981, 187—188 [岳佐和. 广西淡水鱼类志. 南宁: 广西人民出版社, 1981, 187—188]
- [4] Mao R J, et al. Fauna of Zhejiang (Division of Fresh Water Fishes) [M]. Hangzhou Zhejiang Science Press. 1991, 158—159 [毛荣节. 浙江动物志 (淡水鱼类). 杭州: 浙江科学出版社, 1991, 158—159]
- [5] Billot C, Boury S, Benet H, et al. Development of RAPD markers for parentage analysis in *Laminaria digitata* [J]. Bot. Mar. 1999, 42: 307—314]
- [6] Cervera M T, Cabezas J A, Sancha J C, et al. Application of AFLPs to the characterization of grapevine (*Vitis vinifera* L.) genetic resources: a case study with accessions from Rioja (Spain) [J]. Theor. Appl. Genet. 1998, 97: 51—59]
- [7] Huang X Q, Borner A, Roder M S, et al. Assessing genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm using microsatellite markers [J]. Theor. Appl. Genet. 2002, 105 (5): 699—707]
- [8] Gilbert J E, Lewis R V, Wilkinson M J, et al. Developing an appreciate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections [J]. Theor. Appl. Genet. 1999, 98: 1125—1131]
- [9] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucleic Acids Res. 1990, 18: 6531—6535]
- [10] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. Nucleic Acids Res. 1990, 18: 7213—7218]
- [11] Zhao W X, Yang X, Liu S Y. Molecular Mark between Species of *Pelteobagrus* and the Analyse of Hybridization Genetic Fashion [J]. Acta Hydrobiol. Sinica, 2005, 29 [赵文学, 杨星, 刘思阳. 黄颡鱼属种间分子标记及其杂交遗传方式分析. 水生生物学报, 2005, 29]