

研究简报

高寒鲤 RAPD 遗传标记的研究

白庆利 滕春波 徐 伟 刘明华  
(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 哈尔滨 150070)

RAPD MARKER FOR COLD-TOLERANT COMMON CARP

BAI Qing-Li, TENG Chun-Bo, XU Wei and LIU Ming-Hua  
(Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070)

**关键词:** 扩增图谱; 高寒鲤; 种质标准  
**Key words:** RAPD extend atlas; Cold-tolerant common carp; Variety standard  
**中图分类号:** S965.116 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2003)04-0437-003

高寒鲤(Cold-tolerant common carp)是采用单交、三杂交、回交和雌核发育技术相结合,将黑龙江鲤、荷包红鲤、镜鲤的一些优良品质综合到杂交后代,并用雌核发育技术固定优良性状,再与回交系组成合成系,系统选育到F<sub>7</sub>,该品种适应性强、生长快、个体大,现已成为我国北方池塘养殖的主要品种之一,对于这样的优良品种需要制定一个准确的种质标准而使之推广。建立在 PCR 技术基础上的 RAPD 技术非常简单,对所需设备要求也不高,只要很少的 DNA 样品就能进行分析,且扩增片段具有种、品种、品系及个体差异。因此, RAPD 分析是极为有效的 DNA 遗传标记系统之一。本文尝试利用 RAPD 分析方法在分子水平进行高寒鲤的种质标准研究。

1 材料与方法

**1.1 实验鱼** 在取样过程中根据体长和体高的比将高寒鲤分为高体型(GH)、长体型(GL)和中间型(GM)。高寒鲤一龄鱼种的长体型、高背型及中间型三种类型及亲本,亲本包括黑龙江鲤、荷包红鲤、散鳞镜鲤。以上实验鱼各 5 尾均取自本所松浦试验场,体重 84g—144g,体长 13.9cm—16.7cm。

**1.2 基因组的提取** 取上述各实验用鱼剪取鳍条,鳍条剪碎后用组织裂解液[0.5mol/L EDTA (pH8.0), 200μg/mL ProteaseK, 0.5% Sarcosyl]于 55℃ 消化过夜。随后消化液用酚、氯仿、异戊醇(24:24:1)抽提三次后,用 2L[50mmol/L Tris·HCl (pH8.0), 10mmol/L EDTA (pH8.0)透析至 OD<sub>270</sub><0.05, RnaseA 消化去除 RNA,再用上述方法抽提两次,二倍体积乙醇沉淀后干燥,TE(pH8.0)溶解,检测 DNA 浓度,4℃ 保存备用。

PCR 扩增仪为 Perkin-Elmer Cetus 公司的 PE-9600, RAPD 扩增引物购自北方同正生物技术发展公司,为 Operon 公司产品,包括 OPM、OPP 组的随机引物计 12 个。

Tag 聚合酶购自 Promega 公司。参照 Williams 等的方法, RAPD 反应体系包括 10mmol/L KCl, 20mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.001% 明胶; dATP、dGTP、dTTP、dCTP 各为 0.1mmol/L; 引物 15ng, 基因组 DNA 15ng, 1 单位 Tag 聚合酶。反应条件为: 92℃ 变性 1min, 36℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 2min, 共 45 个循环。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶检测, 溴化乙锭染色, 紫外光下观察, 拍照。

2 结果

实验根据对同为鲤科的方正银鲫 RAPD 分析选取扩增效果好的 OPP、OPM 组引物进行扩增,结果表明应用选取的引物对高寒鲤及其亲本黑龙江鲤、荷包红鲤、散鳞镜鲤进行 RAPD 扩增分析均取得了较好的扩增效果(图 1)。不同引物扩增条带数从 2—9 条不等, 扩增片段大小一般在 400bp—3500bp 之间。经过用 12 个引物对高寒鲤、黑龙江鲤、荷包红鲤、散鳞镜鲤的 RAPD 分析均获得了较为清晰的条带,通过对其中清晰条带的分析,结果见表 1。

从图 1 可以看出高寒鲤大部分条带均来自于亲本散鳞镜鲤、荷包红鲤、黑龙江鲤,但不同个体之间差异较大,有些个体扩增图谱偏向于散鳞镜鲤,有些则偏向于荷包红鲤或黑龙江鲤。

表 1 应用 12 种引物对高寒鲤及亲本进行 RAPD 扩增结果

Tab.1 RAPD results of cold-tolerant common Carp and its parents using 12 10bp random primers		
引物	碱基序列	RAPD 方法扩增高寒鲤所得的条带
OPP05	CCCCGTAAC	1446, 901
OPP06	GTGGGCTGAC	1693, 1124, 935, 786, 666
OPP07	GTCCATGCCA	1083, 944
OPP08	ACATCGCCCA	3271, 2221, 1597, 1394, 1171, 1121
OPP09	GTGGTCCGCA	<u>2516</u> , 2205, 1634, 1067, 1125, 917, 757, 666
OPP10	TCCCGCCTAC	2212, 1835, 1512, 1119, 721
OPP11	AACGCGTCGG	3577, 2024, 1825, 1123, 778, 533
OPP12	AAGGGCGAGT	2541, 1686, 1107, 736, 676
OPP15	GGAAGCCAAC	2297, 1669, 1324, 1004, 687
OPP19	GGGAAGGACA	948, 844, 627, 455
OPM16	GTAACCAGCC	1884, 1191, 913, 782, 716
OPM19	CCITCAGGCA	<u>2473</u> , <u>1411</u> , 1194, <u>1045</u> , 911, 827, <u>624</u>

注：下划线为高寒鲤特有条带。

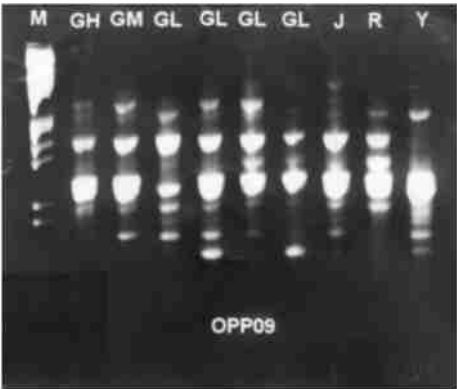


图 1 引物 OPP09 对高寒鲤及其亲本 RAPD 扩增图谱  
Fig.1 RAPD patterns of cold-tolerant common carp and its parents using primer OPP09

从 RAPD 扩增图谱(图 1,图 2)中可以看出表型相同(四



图 2 引物 OPM19 对高寒鲤及其亲本扩增图谱  
Fig.2 RAPD patterns of cold-tolerant common carp and its parents using primer OPM19

个 GL),RAPD 扩增图谱却不一定相同;表型不同,基因型也有可能相同,个体的表型和性状易受到环境因素的影响,RAPD 扩增的结果个体差异较大。

从图 1 及图 3 均可以找到一些高寒鲤不同于其亲本的条带,即以下分子标记: OPP09-2516, OPM19-2473, OPM19-1411,OPM19-1045,OPM19-624,这些分子标记可以作为高寒鲤的种质标准。

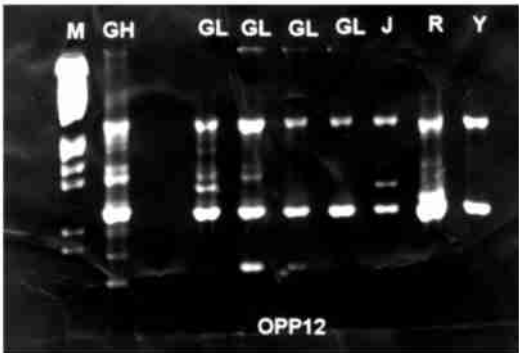


图 3 引物 OPP12 对高寒鲤及其亲本扩增图谱  
Fig.3 RAPD patterns of cold-tolerant common carp and its parents using primer OPP12

3 讨论

3.1 从图2中可见高寒鲤 GH 及 GL 样品 RAPD 扩增结果中有些条带为其亲本散鳞镜鲤、荷包红鲤、黑龙江鲤所没有的。分析其原因一方面是由于取样的散鳞镜鲤、荷包红鲤、黑龙江鲤不一定是所取样品的原始亲本,尽管他们的亲缘关系十分接近,但是在遗传物质上也存在一定的差异。另一方面 RAPD 技术十分灵敏,个体上的差异有时在某个引物扩增时也能显示出来。另外,子代经过自交,遗传物质已经发生重组或突变,所以子代中出现与亲本相异的条带也是正常的。正是由于这些与亲本相异条带的存在,才使制定高寒鲤种质分子标准成为可能。

3.2 从12个引物对高寒鲤的扩增结果均可以看出,取样时表型相同即同为长体型的高寒鲤其 RAPD 扩增图谱却并不相同,并且有很大差异。表型不同,RAPD 扩增结果可能相同。除去 RAPD 方法灵敏可以发现个体间差异的因素,也说明动物的形态及表型是遗传性与环境相互作用的综合结果,表型差异并不能完全或真实地反映 DNA 分子水平的遗传变异,同一基因型在不同的环境条件下可发育出不同的形态或生理特征,而相同形态又可能涉及不同的基因型。

3.3 传统的水生生物种质标准检测主要采用同工酶及蛋白质电泳技术,蛋白质电泳技术是对基因产物的分析,在遗传物质 DNA 上的覆盖面较窄,另外一些基因组上的变异通过蛋白质并不能表达出来,所以有其局限性。随着分子生物学的发展,使直接检测基因组 DNA 成为可能,不仅结果直接可靠,而且灵敏度高。DNA 分子标记所检测的是生物基因组 DNA 水平的差异,因而它非常稳定、客观。在分子图谱的帮助下对品种之间的比较可覆盖整个基因组,大大提高了结果

的可靠性。在育种过程中利用分子标记技术进行鉴定、检测、帮助亲本选择和品种的选育成为分子育种这门新兴学科中的重要组成部分。基因组 DNA 的 RAPD 技术提供了丰富的 DNA 多态性,通过 PCR 扩增了 DNA 多态性片段完全遵循孟德尔遗传规律,从而为在短时间内建立个体和群体间的 DNA 分子遗传标记提供了方便,利用分子标记可以区分不同基因型的个体和群体,缩短了选育周期,同时若能找到不同基因型与经济性状的相关性,即可直接选出经济性状优良的个体和群体,从而大大减少工作量,节省选育时间。

**3.4** 我国的水产养殖种类的遗传育种研究至今仍是常规育种,如高寒鲤这个品种就是从 1979 年开始,经过了大约 15 年的定向培育成新的养殖品种,但从高寒鲤的 RAPD 分析可以看出其后代个体差异仍较大。如果将分子生物学技术与常规育种技术相结合,选育具有优良性状的子代,就能进一步缩短育种时间,更快地培育出品质优良的新品种。

#### 参考文献:

- [1] Liu M H, Shen J B, Zhang T Q. Low temperature common carp in selection[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*. 1994, **1**(1):10—19. [刘明华、沈俊宝、张铁齐,选育中的高寒鲤. 中国水产科学, 1994, **1**(1):10—19]
- [2] Liu M H, Shen J B, Bai Q L, et al. Cross breeding of new frigid carp [J]. *Journal of fisheries of China*, 1997, **21**(4):391—397. [刘明华、沈俊宝、白庆利,等,新品种高寒鲤的选育. 水产学报, 1997, **21**(4):391—397]
- [3] Dong Z J, Xia D Q, Wu T T, et al. Application of RAPD technique in a study of fish heterosis[A]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1999, **6**(1):37—40. [董在杰、夏德全、吴婷婷,等, RAPD 技术在鱼类杂种优势研究中的应用. 中国水产科学, 1999, **6**(1):37—40]
- [4] Yi L, Wang W, Li Y M, et al. A study of the geographical differentiation of *Rhodeus Ocellatus* based on RAPD analysis[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, **25**(3):301—304. [易犁、王伟、李墨怡等,基于 RAPD 分析的高体鳊地理分化研究. 水生生物学报, 2001, **25**(3):301—304]
- [5] Zhang S M, Deng H, Wng D Q, et al. Population structure and genetic diversity of silver carp and grass carp from populations of Yangtze River system revealed by RAPD [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, **25**(4):324—330. [张四明、邓怀、汪登强等,长江水系鲢和草鱼遗传结构及变异性的 RAPD 研究. 水生生物学报, 2001, **25**(4):324—330]
- [6] Williams J G K, A R Kubelik, K J Livak, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucl Acid Res*. 1990, **18**:6531—6535