

筛选与尼罗罗非鱼性别相关的 AFLP 标记

杨东^{1,2} 余来宁^{1,2} 张繁荣¹ 刘红艳¹

(1. 江汉大学医学与生命科学学院, 武汉 430070; 2. 华中农业大学, 武汉 430056)

SCREEN SEX DIFFERENTIAL DNA FRAGMENT IN *OREOCHROMIS NILOTICUS* USING AFLP

YANG Dong^{1,2}, YU Lai-Ning^{1,2}, ZHANG Fan-Rong¹ and LIU Hong-Yan¹

(1. Jiangnan University, Wuhan 430070; 2. Huazhong Agricultural University, Wuhan 430056)

关键词: 尼罗罗非鱼; AFLP 标记; SCAR 标记

Key words: *Oreochromis niloticus*; AFLP marker; SCAR marker

中图分类号: S917 文献标识码: A 文章编号: 1009-3207(2007)06-0904-04

尼罗罗非鱼(*Tilapia*)隶属于鲈形目(Perciformes)、鲈形亚目(Percoidae)、丽鱼科(Cichlidae)的热带性鱼类,是联合国粮农组织向全世界推广的优良养殖鱼类,已成为世界性的主要养殖对象之一。由于繁殖快、成熟早,养殖过程中极易造成繁殖过剩,密度过大,个体过小等不利情况;另外,尼罗罗非鱼的雌雄个体之间具有明显的生长差异,从而影响产量的提高。目前解决这一问题最为理想的措施是单性养殖全雄鱼,这样既可以防止过度繁殖,又可利用雄鱼的生长优势。但是由于缺乏性别或性染色体特异的分子遗传标记,遗传性别的准确鉴定问题也一直是罗非鱼类性别控制研究中的一个难点^[1]。例如,XX型“雄性”与XY正常雄性,XY型遗传雄性与YY超雄性不易区分。对一个群体所有个体的遗传性别进行测交在实践中十分困难。全雄性罗非鱼高产育种路线早已获研究成功^[2],如能较好解决罗非鱼类性别鉴定问题,无疑有更广阔的应用前景。

AFLP技术是1993年由Vos等人发明的一种DNA指纹技术^[3],它继承了限制性片段长度多态性(RFLP)与PCR技术的优点,但省去了RFLP的繁杂过程,同时又克服了随机扩增多态DNA(RAPD)技术不稳定的缺点,因而该技术自诞生以来,已成功用于多种动植物的高密度遗传图谱的构建、分子标记的筛选以及遗传多样性的研究^[4-6]。因此,本研究从DNA水平入手,利用AFLP技术,检测雌雄尼罗罗非鱼基因组DNA间的差异,筛选与性别相关的AFLP标记。与尼罗罗非鱼性别相关的分子标记的获得,具有一定的实用价值和理论价值,为尼罗罗非鱼性别的鉴定提供技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料 材料来自中国水产科学研究院长江水产研究所尼罗罗非鱼原种鱼场(湖北荆州,1978年长江水产研究所从苏丹引进),通过解剖确定其性别。

1.2 DNA的提取 取尼罗罗非鱼肌肉组织适量,基因组DNA的提取参照《分子克隆实验指南》的方法^[7]。

1.3 AFLP实验程序 AFLP反应体系参照Vos(1995)等描述的方法进行^[3],并对其中影响实验结果的关键因素进行了优化。AFLP接头及引物序列见表1。

1.3.1 酶切 样品酶切混合液包括: DNA 500ng、*Mse* IV 5U、*Eco* RI 20U、10×RL Buffer (100 mmol/L Tris-HAc, pH 7.5, 100 mmol/L MgAc, 500 mmol/L KAc, 25 mmol/L DTT, 250 ng/μL BSA) 4 μL、250 μg/μL BSA 0.2 μL,加H₂O至40 μL,37℃下酶切3h。

1.3.2 连接 酶切完成的每个样品,加入10 μL如下的反应液: *Mse* IV接头(50 pmol/μL) 1.0 μL、*Eco* RI接头(5 pmol/μL) 1.0 μL、10 mmol/L ATP 1 μL、T₄ DNA连接酶(3 U/μL) 0.5 μL、10×RL Buffer 1 μL、H₂O 5.5 μL,37℃连接3h。

1.3.3 预扩增 取2 μL连接完成的DNA样品,加入23 μL如下混合液: *Mse* IV引物(Mo 50 ng/μL) 1 μL、*Eco* RI引物(Eo 50 ng/μL) 1 μL、10×PCR Buffer (100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 15 mmol/L MgCl₂, 50 mmol/L KCl) 2.5 μL、Taq 酶(5 U/μL) 0.2 μL、dNTP (10 mmol/L) 2 μL及H₂O 16.3 μL。混合后,在如下PCR条件下扩增: 首先95℃ 2min,而后按照95℃ 30s, 56℃ 30s, 72℃ 60s,循环30次。预扩增完成后,用H₂O稀释20倍, -20℃保存。

收稿日期: 2005-12-26; 修订日期: 2007-01-25

基金项目: 国家自然科学基金(30370701); 农业部淡水鱼类种质资源与生物技术重点实验室项目资助

作者简介: 杨东(1974—),男,湖北武汉人;博士研究生;主要从事鱼类遗传学研究。E-mail: yangdong3336@sohu.com

通讯作者: 余来宁(1948—),男,博士生导师;主要从事分子遗传学研究。E-mail: yulainiing@vip.sina.com

表 1 AFLP 接头及引物序列

Tab 1 The sequences of AFLP adapters and primers	
<i>Eco</i> Riv 接头(Adapter) 5'-CTCGTAGACTGCGTACG-3'	
3'-CTGACGCATGGTTAA-5'	
<i>Mse</i> iv 接头(Adapter) 5'-GACGATGAGTCTGAG-3'	
3'-TACTCAGGACTCAT-5'	
预扩增引物(Pre-amplification primers)	
Eu 5'-GACTGCGTACCAATTG-3'	Mo 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'
选择性引物(Selective primers)	
M1-CAA M4-CTC M7-CTG E1-AAC E4-ACA E7-AGG	
M2-CAC M5-CAG E2-AAG E5-ACC	
M3-CTA M6-CAT E3-ACT E6-AGC	

1.3.4 选择性扩增 取 2 μL 稀释的预扩增混合液,加入 23 μL 如下反应液: *Eco*Riv 引物(50 ng/μL) 1 μL、*Mse*iv 引物(50 ng/μL) 1 μL、10 mmol/L dNTP 2 μL、Taq 酶(5 U/μL) 0.2 μL、10× PCR Buffer 2.5 μL、H₂O 16.3 μL,混合后按如下 PCR 程序扩增: 首先 95℃ 2min,而后按照 95℃ 40s,65℃ 40s(每循环降低 0.7℃),72℃ 60s,循环 12 次,再按照 95℃ 40s,56℃ 40s,72℃ 60s,循环 30 次。

1.3.5 变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染 AFLP 扩增产物采用 5% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染。

1.4 差异带的回收,再扩增及测序 将差异带挖出转至 0.5 mL 离心管中,加 20 μL TE 溶液,95℃ 15min,12000 r/min 离心 10min,以上清液作模板,用原引物进行 PCR 再扩增。PCR 的循环参数同 AFLP 选择性扩增。PCR 产物经 2% 的琼脂糖凝

胶电泳检测,回收的差异片断,然后进行测序。

1.5 SCAR 引物的设计及 PCR 特异扩增 根据片段 A 的测序结果设计一对 20 bp 和 25 bp 的正向引物和反向引物 A1 和 A2。引物序列为 A1: 5' GAAATGAAAACAGGCTGAAG 3'; A2: 5' TTCCTGTCTCTCTCCATCTCCATAA 3'; 扩增程序为 94℃ 变性 4min,然后 94℃ 45s,65℃ 45s,72℃ 30s,40 个循环,最后在 72℃ 下延伸 10min,4℃ 保存。

2 结 果

2.1 AFLP 结果

将雌雄各 10 个的基因组 DNA 等量混合起来,组成雌雄 2 个基因池,用来筛选与性别相关的 AFLP 标记。49 个引物组合共产生 3180 条片段,平均每对引物产生 65 条片段,候选差异 DNA 片段 536 条。去除产生片段太多或太少或者背景较高的引物组合,挑选出 20 对引物进行进一步的分析。

使用两代尼罗罗非鱼(F1 代和 F2 代)雌雄个体进行下步分析。其中 F1 代雌性尼罗罗非鱼 15 尾,雄性尼罗罗非鱼 12 尾;F2 代雌性尼罗罗非鱼 15 尾雄性尼罗罗非鱼 10 尾。经过 20 组引物分析,引物组 E4/M5 在 F1 代产生一片段,大小约为 150bp,该条带在 12 尾雄性中均存在,在 15 尾雌性中有 14 尾缺失(图 1);在 F2 代中,该条带在 10 尾雄性中也均存在,在 15 尾雌性中有 13 尾缺失(图 2)。总体上两代 22 尾雄性尼罗罗非鱼均存在该片段,30 尾尼罗罗非鱼中有 27 尾缺少该片段,占雌尼罗罗非鱼总数 90%。

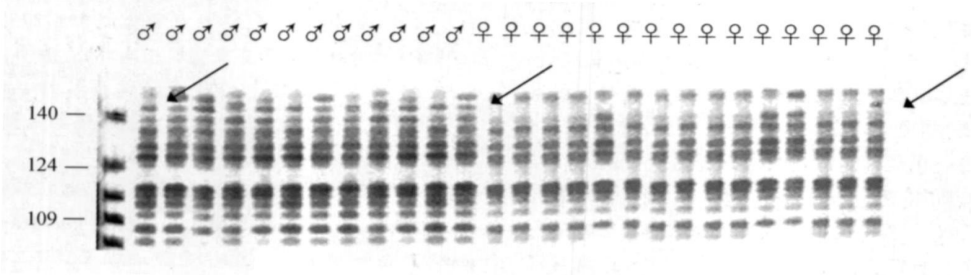


图 1 F1 代雌雄尼罗罗非鱼 AFLP 分析

Fig.1 AFLP profiles generated from 15 females and 12males of F1 *O. niloticus* with the E4/M5 primer

♀ ♂: 雌雄 DNA ; 箭头表示候选差异 DNA 片段

♀ ♂: DNA OF male and female; arrow shows candidate differential DNA fragments

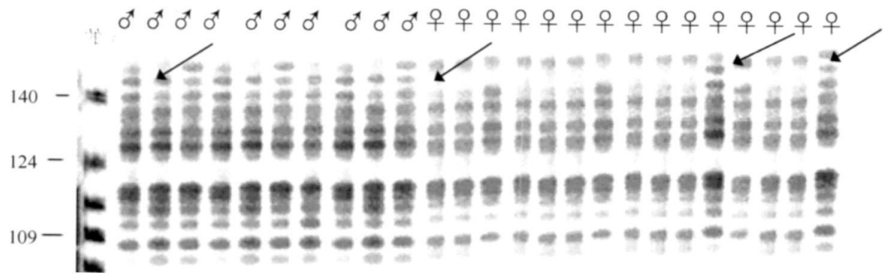


图 2 F2 代雌雄尼罗罗非鱼 AFLP 分析

Fig.2 AFLP profiles generated from 15 females and 10 males of F2 *O. niloticus* with the E4/M5 primer

♀ ♂: 雌雄 DNA; 箭头表示候选差异 DNA 片段

♀ ♂: DNA OF male and female; arrow shows candidate differential DNA fragments

2.2 AFLP 标记片段序列的测序

对该片段进行回收和测序, 片段的碱基序列如下所示,

```
1   AGAGAATCTA  TTGCCATACA  TTGCTCCCTC  TTCCTCCCTC  TTTTTTCTCT
51  GTCTCTCTCC  ATCTCCATAA  CCGACTGCAT  GCACTCCTGT  CGTGGTAGTT
101 TACATTCCCT  CACCCTGTTT  TCATTTCCTG  TTACTCAGGA  CTCATCAA
```

该片段的长度为 148 bp。序列如下:

2.3 SCAR 引物的设计及 PCR 特异扩增

根据片段 A 的测序结果设计一对 20 bp 和 25 bp 的正向引物和反向引物 A1 和 A2, 设计引物的位置没有从片段的两个末端开始, 而是向片段的中间靠拢了一部分。当退火温度

较低时, 雌雄都出现扩增带, 无雄性特异带。直到退火温度升到 65℃, 非特异带消失, 20 个雄性样本都扩出一条特异带, 比特异 AFLP 片段小, 大小约为 100 bp, 与预期片段长度一致; 而 20 个雌样本中, 没有特异带出现(图 3)。

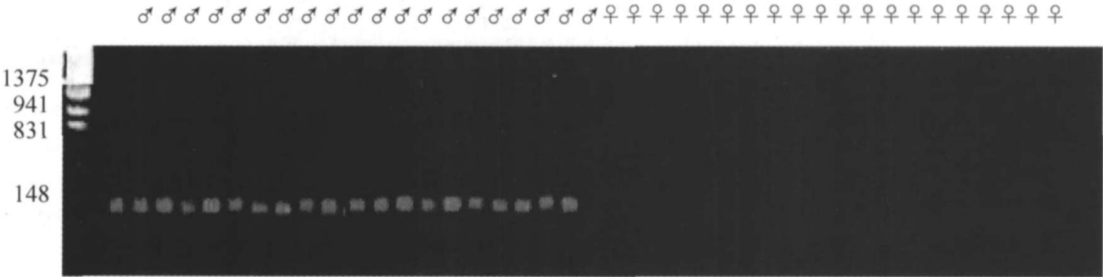


图 3 雌雄尼罗罗非鱼 SCAR 扩增结果

Fig 3 Amplification pattern of SCAR primer for twenty male *O. niloticus* and twenty female *O. niloticus*

3 讨 论

尼罗罗非鱼性染色体类型为 XX/XY, 由于 Y 染色体存在, 在理论上雌雄染色体上存在差异。Carnasco 和 Penman^[8]利用电镜观察联会复合体(Synaptonemal complex SC)对 XX(性逆转雄性)、XY(常规雄性)及 YY(超雄性)尼罗罗非鱼进行核型分析, 结果发现最长染色体末端的非成对区(Unpaired segment)只在 XY 罗非鱼中找到, 而在 XX 和 YY 雄性中没有此区, 认为这个非成对区正是 XY 型性别决定的中心。

我们采用 AFLP 方法筛选雌雄尼罗罗非鱼雄性特异片段, 筛选出的片段在雄性中比例为 100%, 但是雌性中缺失比例高达 90%, 因此此片段应该与性别相关。雌性尼罗罗非鱼中出现的该片段可能是发生染色体重组或者是遗传上的雄性转变成表型上的雌性。

因为尼罗罗非鱼性染色体处于原始阶段, 其性别决定也会受到多种因数影响^[9-12]。Hammenan 和 Avtalion^[13]根据对罗非鱼不同种之间杂交和回交的实验结果, 提出性别决定的“常染色体平衡理论”。该理论认为调节鱼类性别的基因位于性染色体和常染色体上, 鱼类的性别是由染色体上雄性和雌性的基因产物数量优势来决定。如果雄性决定因素超过雌性决定因素, 则雄性比例较高; 反之, 雌性决定因素超过雄性决定因素, 则雌性比例较高。环境温度对性别决定也有影响, 尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼在高温(34℃—37℃)时, 产生较高的雄性率, 而莫桑比克罗非鱼则在低温(19℃或 20℃)时能增加雄鱼比例^[14-16]。

通过比较基因组杂交和差减克隆研究, 在鱼类中已经发现了许多性别或性染色体特异的 DNA 片段(含重复序列),

为定位和鉴定性染色体, 以及鉴定鱼类遗传性别奠定了基础。例如在剑尾鱼(*Xiphophorus maculatus*)^[17]和非洲鲶(*Clarias garipinus*)^[18]中也克隆出性染色体片段, 并以此为基础实现了利用简单的 PCR 方法的遗传性别鉴定。我们实验中分离出来的分子标记和以前报道的性别相关的微卫星标记都代表了性别相关的 DNA 标记^[19], 这些标记都可能被用来在育种中产生单一性别的尼罗罗非鱼, 也能被用来研究原始性别决定机制和常染色体和温度对性别的影响。

参考文献:

[1] Tong J G, Zhu J H, Guan H S. Amini-review of studies on genetic basis of sexdetermination in fish [J]. *J Fish China*, 2003, 27(2): 169—178 [童金苟, 朱嘉濠, 关海山. 鱼类性别决定的遗传基础研究概况. 水产学报, 2003, 27(2): 169—178]

[2] Yang Y Q, Zhang Z Y, Lin K H. Use of three line combination for production of genetic all-male Tilapia mossambica [J]. *Acta Genet Sin*, 1980, 7: 241—246 [杨永铨, 张中英, 林克宏. 应用三系配套途径产生遗传上全雄莫桑比克罗非鱼. 遗传学报, 1980, 7: 241—246]

[3] Vos P R, Hogers M, Bleeker, *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucleic Acids Res*, 1993, 23(21): 4407—4414

[4] Herbergs J, Sivek M, Grooijmans R P, *et al.* Multicolour fluorescent detection and mapping of AFLP markers in chicken [J]. *Anim Genet*, 1999, 30(4): 274

[5] Ajmone-Marsanp, Valentini A, Cassandro M, *et al.* AFLP markers for DNA fingerprinting in cattle [J]. *Anim Genet*, 1997, 28(6): 418—426

[6] Osten M, den Bieman M, Kuiper M T, *et al.* Use of AFLP markers for

- gene mapping and QTL detection in the rat [J]. *Genomics*, 1996, **37**: 289—294
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a Laboratory Manual [M]. Beijing: Science Press, 1996, 464—468 [萨姆布鲁克, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南(第二版). 北京: 科学出版社, 1996, 464—468]
- [8] Carrasco L A P, Penman D J, Bromage N. Evidence for the presence of sex chromosomes in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from synaptonemal complex analysis of XX, XY and YY genotypes [J]. *Aquaculture*, 1999, **173**: 207—218
- [9] Dong Z J. Studies on sex determination and sex differentiation in Tilapia: State-of-the-Art [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2004, **39** (4): 100—103 [董在杰. 罗非鱼性别决定及分化的研究进展. 动物学杂志, 2004, **39**(4): 100—103]
- [10] Abucay J S, Mair G C, Skibinski D O F. Environmental sex determination: the effect of temperature and salinity on sex ratio in *Oreochromis niloticus* L [J]. *Aquaculture*, 1999, **173**: 219—234
- [11] Harvey S C, Kwon J Y, Penman D J. Physical mapping of the brain and ovarian aromatase genes in the Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, by fluorescence in situ hybridization [J]. *Animal Genetics*, 2003, **34**: 62—64
- [12] Harvey S C, Masabanda J, Carrasco L A P, *et al.* Molecular cytogenetic analysis reveals sequence differences between the sex chromosomes in *Oreochromis niloticus*: evidence for an early stage of sex chromosome differentiation [J]. *Cytogenet Genome Res*, 2002, **97**: 76—80
- [13] Hammeman I S, Avtalion R R. Sex-determination in Sarotherodon (Tilapia) 1. Introduction to the theory of autosomal influences [J]. *The Israeli Journal of Aquaculture Bamidgah*, 1978, **30**: 110—115
- [14] Abucay J S, Mair G C, Skibinski D O F, *et al.* Environmental sex determination: the effect of temperature and salinity on sex ratio in *Oreochromis niloticus* L [J]. *Aquaculture*, 1999, **173**: 219—234
- [15] Mair G C, Beardmore J A, Skibinski D O F. Experimental evidence for environmental sex determination in *Oreochromis* species [A]. In: Hirano R, Hanyu I (Eds.), Proceedings of the second Asian fisheries forum, Tokyo, Japan [C]. 1990, 555—558
- [16] Desprez D, Melard C. Effect of ambient water temperature on sex determination in the blue tilapia *Oreochromis aureus* determinism in the blue tilapia *Oreochromis aureus* [J]. *Aquaculture*, 1998, **162**: 79—84
- [17] Coughlan T, Scharl M, Homung U. PCR-based sex test for *Xiphorus maculatus* [J]. *J Fish Biol*, 1999, **54**: 218—222
- [18] Kovacs B, Egedi S, Bartfai R. Male specific DNA markers from African catfish (*Clarias gariepinus*) [J]. *Genetica*, 2000, **110**: 267—276
- [19] Lee B Y, Penman D J, Kocher T D. Identification of a sex-determining region in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using bulked segregant analysis [J]. *Anim Genet*, 2003, **34**: 379—383