

采用 RAPD 技术筛选马口鱼性别差异相关分子标记

邱 晴¹, 罗 文²

(1.绍兴市水产技术推广站, 浙江 绍兴 312000 2.绍兴文理学院 生命科学学院, 浙江 绍兴 312000)

摘 要 选用 SBS A 和 SBS B 两组随机引物(各 20 条)分别对马口鱼卵巢 DNA 和精巢 DNA 进行 RAPD 扩增,并用 1.5 % 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。结果表明,在 40 条随机引物中,有 11 条引物可以扩增出明显的雌雄性别差异条带,条带范围以 SBS A5、SBS A6、SBS A9、SBS A16、SBS A19、SBS A20、SBS B2、SBS B3、SBS B9、SBS B16、SBS B17 为主。运用 RAPD 筛选获得马口鱼性别 DNA 标记将有助于了解其调控雌雄性别发生的差异基因,为进一步的遗传育种提供基础。

关键词 RAPD; 性别差异; 分子标记

中图分类号 Q173 文献标识码 A 文章编号 1004-2091(2012)01-0038-05

马口鱼(*Opsariichthys bidens*)是广泛分布于东亚江河湖泊中的特有的鲤科鱼类,其繁殖力强,生长快,产量较高,为普遍食用野生溪流杂鱼之一。但马口鱼雌雄个体间存在生长速度、性成熟年龄、体色、体型、个体大小等差异,性成熟后生长速度显著下降,大部分能量消耗在性腺发育上,致使可食部分减少,肉质变差。鱼类遗传育种通常是通过鉴别性染色体组来指导繁殖,但马口鱼性染色体分化程度较低,早期的雌雄个体在外部形态上差异不大,性别分化在胚胎发育过程中易受环境影响,导致性表型与遗传基础不一致。因此,寻找简便快速的遗传标记对水产育种具有重要的意义。

RAPD 技术即随机扩增多态 DNA 技术,是美国科学家 Williams^[1]和 Welsh^[2]研究小组在聚合酶链式反应技术的基础上发展起来的,是一种用于检测基因组 DNA 多态性和基因组遗传标记的方法。目前已被广泛应用于系统发育研究、动植物种类鉴定、基因图谱构建、种群的遗传分析、人类基因组研究等领域^[3]。实验利用 RAPD 技术检测马口鱼雌雄基因组 DNA 间的差异,拟筛选出马口鱼雄性性别相关的差异片段,将有助于进一步筛选马口鱼性别鉴定的分子标记,对马口鱼的育种具有重大意义。

1 材料和方法

1.1 实验材料

选取 2 龄性成熟的马口鱼雌(56±1)g/尾、雄(68±2)g/尾各 3 条,分别取卵巢和精巢,-70℃保

存备用。

RAPD 随机引物购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,采用 SBS A 和 SBS B 两组(各 20 条)引物。蛋白酶 K 购自 Takara 公司,Taq DNA Polymerase,购自 Fermentas 公司,PCR 试剂盒和 DL 2000 DNA Marker 购自 Takara 公司;基因组 DNA 的抽提试剂,购自上海易利生物科技有限公司;琼脂糖凝胶电泳试剂,购自 Takara 公司。

1.2 实验方法

按照试剂公司说明书的指示对 RAPD 随机引物进行溶解,将差异性片段从银染胶上准确切下,转至 0.5 mL 离心管中,加入 50 μL 无菌双蒸水中,95℃加热 15 min;在 PCR 管中依次加入去离子超纯水 33.5 μL,10×PCR 缓冲液 5.0 μL,dNTP 4.0 μL,MgCl₂(25 mM)3.0 μL,随机引物 1.0 μL,样品 1.0 μL,Taq 酶(1.0 U/μL)2.5 μL。混匀,3 000 r/min 离心 15 s,置于 PCR 仪中,加盖。

反应条件:94℃预变性 5 min,94℃变性 40 s,37℃退火 45 s,72℃延伸 1 min,40 个循环,最后 72℃延伸 7 min,4℃保存。1.5%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果。

2 RAPD 扩增结果

图 1 和图 2 分别是 SBS A(A)和 SBS B(B)两组引物(各 20 条)对雌鱼卵巢 DNA 和雄鱼精巢 DNA 的 RAPD 扩增图谱,除 SBS A5、SBS A6、SBS A9、SBS A16、SBS A19、SBS A20、SBS B2、SBS B3、

资助项目 浙江省公益技术研究项目(2011C22086)

作者简介 邱 晴(1982-),女,助理工程师,主要从事淡水渔业研究。E-mail: qingzi1729@zjnm.cn

通讯作者 罗 文,副教授。E-mail: luowen@usx.edu.cn

表 1 RAPD 引物序列

引物序号	SBS A 序列(5'→3')	SBS B 序列(5'→3')
1	CAGGCCCTTC	GTTCGCTCC
2	TGCCGAGCTG	TGATCCCTGG
3	AGTCAGCCAC	CATCCCCCTG
4	AATCGGGCTG	GGACTGGAGT
5	AGGGGTCTTG	TGCGCCCTTC
6	GGTCCCTGAC	TGCTCTGCCC
7	GAAACGGGTG	GGTGACGCAG
8	GTGACGTAGG	GTCCACACGG
9	GGGTAACGCC	TGGGGGACTC
10	GTGATCGCAG	CTGCTGGGAC
11	CAATCGCCGT	GTAGACCCGT
12	TCGGCGATAG	CCTTGACGCA
13	CAGCACCCAC	TTCCCCGCT
14	TCTGTGCTGG	TCCGCTCTGG
15	TTCCGAACCC	GGAGGCTGTT
16	AGCCAGCGAA	TTGCCCCGGA
17	GACCGCTTGT	AGGGAACGAG
18	AGGTGACCGT	CCACAGCAGT
19	CAAACGTCGG	ACCCCCGAAG
20	GTTGCGATCC	GGACCCCTTAC

SBS B9、SBS B16、SBS B17 外的其他引物均得到完全一致的雌雄 DNA 产物图谱，虽然个别带存在强

弱差异。而 SBS B3、SBS B9 和 SBS B16 分别存在约为 400、600 和 500 bp 的雄性特异 DNA 片段。

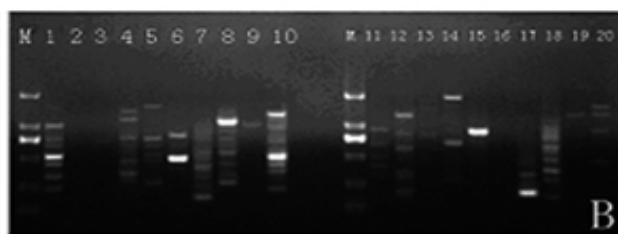
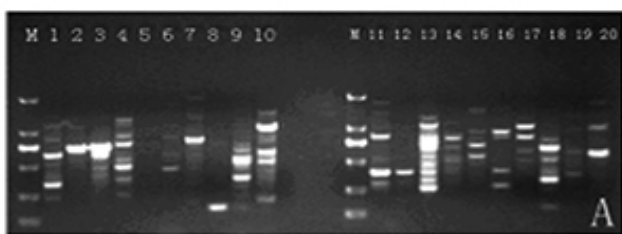
实验用 40 条随机引物对马口鱼的雌雄个体进行了 RAPD 分析，40 条引物均能扩出 1~10 条产物带，其中有 26 条可以扩增出性别差异条带，其中 SBS A5、SBS A6、SBS A9、SBS A16、SBS A19、SBS A20、SBS B2、SBS B3、SBS B9、SBS B16、SBS B17 这 11 条引物扩增出的性别差异条带较为明显，其中 SBS B3、SBS B9 和 SBS B16 还分别存在约为 400、600 和 500 bp 的雄性特异 DNA 片段(表 1)。

实验通过优化条件、多次重复，均能得到与图 1 和图 2 一致的 DNA 扩增图谱。RAPD 技术扩增的 DNA 片段的遗传背景还不太清楚，此三条雄性特征 DNA 片段或其同源序列是否在雌性基因组中存在尚不能定论，但有一点可以肯定，雌雄基因组 DNA 序列中某些片段分子结构的不同、拷贝数量的不同以及片段的扩增、转位等变化都可以引起雌雄 DNA 扩增谱带的差异^[5]。

3 讨论

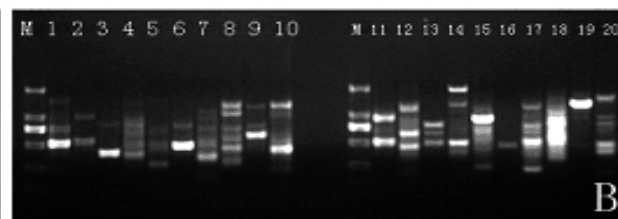
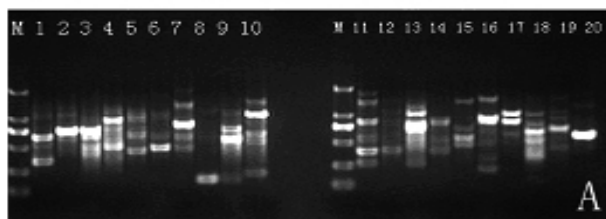
3.1 基因组 DNA 的抽提

蛋白酶 K 是一种切割活性较广的丝氨酸蛋白酶。它切割脂族氨基酸和芳香族氨基酸的羧基端肽键，用于生物样品中蛋白质的一般降解。此酶经纯化去除了 RNA 酶和 DNA 酶活性。由于蛋白酶 K 在尿素和 SDS 中稳定，还具有降解天然蛋白质的能力，因而它应用很广泛，包括制备脉冲电泳的染色



注：M 为 DL 2000 DNA Marker，1~20 代表不同的随机引物。

图 1 SBS A(A)和 SBS B(B)两组引物对雌鱼卵巢 DNA 的 RAPD 扩增图谱



注：M 为 DL 2000 DNA Marker，1~20 代表不同的随机引物。

图 2 SBS A(A)和 SBS B(B)两组引物对雄鱼精巢 DNA 的 RAPD 扩增图谱

表 2 马口鱼雌雄差异片段统计表

Primer 名称	雌鱼特有条带数	雄鱼特有条带数	差异片段大小(bp)
SBS A4	6	0	250~1 500
SBS A5	0	3	400~1 000
SBS A6	0	1	500
SBS A9	1	0	350
SBS A11	0	1	1 500
SBS A13	5	0	250~600
SBS A16	0	1	1 700
SBS A18	1	0	300
SBS A19	0	1	600
SBS A20	1	0	1 000
SBS B1	3	0	250~500
SBS B2	0	2	500 ,1 000
SBS B3	0	1	400
SBS B5	2	0	750 ,1 700
SBS B7	1	0	150
SBS B8	1	0	1 200
SBS B9	0	1	600
SBS B11	0	2	500 ,1 000
SBS B12	0	2	500 600
SBS B13	0	3	500~750
SBS B14	0	1	1 200
SBS B15	0	4	200~700
SBS B16	0	1	500
SBS B17	0	4	500~1 500
SBS B19	0	1	1 500
SBS B20	0	2	300 ,500

体 DNA ,蛋白质印迹以及去除 DNA 和 RNA 制备中的核酸酶等。本实验中我们利用蛋白酶 K 降解雌鱼卵巢和雄鱼精巢中的蛋白质 , 以抽提其基因组 DNA ,作为 PCR 模板。用核酸蛋白检测仪对基因组抽提物的纯度和浓度进行检测 ,雌鱼卵巢基因组抽提物 A260/A280 比值为 1.8678 ,雄鱼精巢基因组抽提物 A260/A280 比值为 1.8269 ,说明纯度较好 ,蛋

白质污染较少 ,可以作为 PCR 模板。
结果提示 ,筛选获得马口鱼性别 DNA 标记将有助于加深对其性别控制机制的认识 ,实验结果除了可运用在人工雌核发育的应用研究之外 ,也可以作为早期幼体雌雄鉴定的一种快速方法。
3.2 雌雄之间的基因差异
在脊椎动物系统进化中 ,鱼类处于承前启后的

关键地位。与高等脊椎动物相比,鱼类的性别决定机制具有原始性、多样性和易变性,并具有所有脊椎动物的性别决定方式,存在从雌雄同体到雌雄异体的各种性别类型,性逆转在鱼类也是较为常见的现象。与高等脊椎动物一样,鱼类性别发育仍然是以遗传基因为基础,并受到自身内分泌调节和外界环境的影响,是三者相互作用的结果。因此鱼类性别决定机制研究对于整个动物类群性别决定机制的形成及进化途径的揭示有非常重要的理论价值,但其性别决定的复杂性给研究带来了难度。

随着 20 世纪 90 年代分子生物学技术的发展,人们对于鱼类性别决定机制及性别特异分子标记已经有了一定了解。鱼类在性别决定模式上是极其多样的,大多数鱼雌雄异体,还有雌雄同体鱼,有些鱼能自然发生性逆转[如黄鳝(*Monopterus albus*)等],有些能发生天然的雌核发育[如银鲫(*Carassius auratus gibelio*)]。雌雄异体性鱼类表现出多样性的性别决定系统,主要包括 3 种性别决定模式:染色体决定、多基因决定、基因型-环境共同决定。许多鱼类雌雄个体之间存在着明显的生物学性状诸如生长速度、性成熟年龄、繁殖方式、体色、体型、个体大小等差异,而且大多数鱼类性成熟后生长速度显著下降,大部分能量消耗在性腺发育上,致使可食部分减少,肉质变差。若人们可以根据需要专门生产全雌或全雄苗种进行单性养殖,就可以大大提高养殖鱼类的经济效益。因此,鱼类遗传学家通常希望在育种实践中能鉴别其性染色体组成,指导繁殖,或者在养殖早期对其性别作出鉴定。但是大多数鱼类性染色体分化程度低,雌雄早期在外部形态上差异不大,且性别分化在胚胎发育过程中易受环境影响,导致性表型与遗传基础不一致。因此,寻找不同鱼类特异的性别分子标记在水产养殖中具有重要的实践意义。

马口鱼是广泛分布于江河湖泊中的东亚特有的鲤科鱼类。其繁殖力强,生长快,产量较高,为普遍食用杂鱼之一,在丘陵、山区是主要经济鱼类。本实验用 40 条随机引物对马口鱼的雌雄个体进行了 RAPD 分析,40 条引物均能扩出 1~10 条产物带,其中 7 条引物可以扩增出明显的雌雄性别差异条带,它们分别是 SBS A5、SBS A6、SBS B2、SBS B3、SBS B9、SBS B16、SBS B17,其中 SBS B3、SBS B9 和 SBS B16 还分别存在约为 400bp、600bp 和 500bp 的雄

性特异 DNA 片段。

RAPD 技术是迄今研究遗传变异最简单最快速的方法,随机扩增的 DNA 片段的多态性反映了基因组相应区域的 DNA 多态性。大量且足够多的引物使其在理论上可以覆盖全部基因组,这是 RFLP 技术和 AFLP 技术所难以达到的,因此用 RAPD 寻找性别差异有其特有的优势。RAPD 技术本身要求严格,充分控制实验条件,可以获得可重复的理想扩增结果。本实验优化条件、多次重复,均能得到与图 1 和图 2 一致的 DNA 扩增图谱。RAPD 技术扩增的 DNA 片段的遗传背景还不太清楚,此三条雄性特征 DNA 片段或其同源序列是否在雌性基因组中存在尚不能定论,但有一点可以肯定,雌雄基因组 DNA 序列中某些片段分子结构的不同、拷贝数量的不同以及片段的扩增、转位等变化都可以引起雌雄 DNA 扩增谱带的差异。

根据 RAPD 标记的特点,本文认为马口鱼基因组中确实存在 DNA 差异。这一差异是否与两性的形态、行为差异相关,尚需要进一步研究。利用由 RAPD 技术得到的某一性别特异 DNA 片段,找出与其连锁的 DNA 组分,再进一步确定这些组分在染色体中的分布,可以逐步弄清某些染色体的作用,此三条雄性特征 DNA 片段由于在雌性中空缺,故可能是与异配性别紧密连锁的 DNA 片段,在这一点上从染色体角度支持 XY 性别决定机制。总之,找出马口鱼两性 DNA 结构的不同将有助于加深对其两性间性别控制机制的认识,在人工雌核发育的应用研究中,也可以作为早期幼体雌雄鉴定的一种快速方法。

参考文献:

- [1] Williams J.K., Kubelik A.R., Livak K.J. *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetics marks[J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(22): 6531-6535
- [2] Welsh J., Petersen C., McClelland M.. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(22): 7213-7218
- [3] 徐晓飞, 林炜铁, 彭智辉, 等. RAPD 技术及其在微生物学方面的应用[J]. *生命的化学*, 2001, 21(5): 436-438
- [4] 赵云峰, 徐承水. RAPD 在生物学研究中的应用[J]. *曲阜师范大学学报*, 2000, 26(2): 83-85
- [5] 邱 涛, 陆仁后, 项超美, 等. 用 RAPD 技术识别中华绒螯

蟹性别差异[J]. 水产学报, 1998, 22(2): 175-177

(收稿日期 2011-10-17)

Apply RAPD to screen out sex differentiation related molecular marker in *Opsariichthys bidens*

Qiu Qing¹, Luo Wen²

(1. Shaoxing Fisheries Technical Extension Station, Zhejiang Shaoxing 312000 ;

2. Shaoxing University Zhejiang Shaoxing 312000)

Abstract Two groups (20 for each) of random primers (SBS A and SBS B) were used to RAPD apply in spawner's ovary and milt's spermary of *Opsariichthys bidens* in this paper, and the products of PCR amplification were detected by 1.5% agarose gels electrophoresis. The results showed that 11 in 40 primers of PCR could apply obvious gender differences strips between male and female, others were primarily SBS A5, SBS A6, SBS A9, SBS A16, SBS A19, SBS A20, SBS B2, SBS B3, SBS B9, SBS B16, SBS B17. The results indicated that the screening for fish DNA markers will help to understand gender occur and their gene regulation in *Opsariichthys bidens*, and further provide the basis for genetic breeding.

Keywords RAPD, sex differentiation, molecular marker

新疆博斯腾湖野生鱼申报地理标志产品保护

为提升博斯腾湖野生鱼品牌的附加值和知名度,提高野生鱼的经济效益,新疆博湖县成为新疆首家申请水产品地理标志产品保护的县级单位。

据博湖县质量技术监督局局长陈建国介绍,博湖县此次共有《地理标志产品——草鱼、鲢鱼》等 10 个标准的起草任务,目前组织的专家已开始标准草案的起草工作。目前,博湖县质量技术监督局、博斯腾湖管理局、博斯腾湖生态渔业有限责任公司的有关专家组成专家组负责标准的起草工作,经征求意见后报自治区标准化管理委员会审定批准并发布实施,预计 2011 年 12 月底完成此项工作。

博斯腾湖是我国最大的内陆淡水湖,博斯腾湖拥有丰富的渔业、旅游、芦苇、湖盐、蒲草等自然资源,是新疆最大的渔业生产基地。湖内现有 32 个鱼类品种,目前,博斯腾湖出产的池沼公鱼、赤鲈、鲢鱼、鳙鱼、西海龙蟹、西海凤虾等十个水产品种和大湖区 150 万亩水域已通过国家有机认证,是我国最大的有机鱼生产水域。

据了解,通过实施博斯腾湖野生鱼地理标志产品保护,结束了过去产品“多而散”、“散而乱”,形不成“合力”的局面,也为防止和打击假冒博斯腾湖野生鱼的违法行为提供了强有力的法律保障。而《地理标志产品——博斯腾湖野生鱼》标准等的制定,将有利于推动博湖县鱼制品标准化生产,有利于新品种、新技术的推广与应用,对做大做强博斯腾湖野生鱼品牌,推动生产规模化、经营一体化进程,增加产品在市场上的竞争力,具有深远的意义。

据了解,地理标志产品保护工作由国家质量监督检验检疫总局统一管理,将在国家质检总局公报、政府网站等媒体上向社会发布受理公告。

(www.cafs.ac.cn)