

文章编号:1000 - 0615(2005)03 - 0296 - 04

团头鲂“浦江 1 号”一个 RAPD 标记的 SCAR 转化

邹曙明, 李思发, 蔡完其

(上海水产大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 200090)

摘要: 从 100 个 10 bp 寡核苷酸引物的扩增带中, 筛选出了 3 个 RAPD 特异扩增带, 即团头鲂“浦江 1 号”群体所具有的 S_{37}^{277} bp、 S_{11}^{2660} bp 带, 以及对照群体所具有的 S_{28}^{946} bp 带。该 3 条 RAPD 特异扩增带经回收、克隆和测序, 并根据部分序列信息分别设计了 3 对各 20 bp 的正向引物和反向引物。用 3 对引物分别在“浦江 1 号”群体和对照群体中进行 PCR 扩增, 分别产生了 Sc-1(248 bp)、Sc-2(540 bp, 460 bp) 和 Sc-3(320 bp) 4 个 SCAR 扩增带。其中, Sc-2(540 bp, 460 bp) 和 Sc-3(320 bp) 3 个 SCAR 扩增带在“浦江 1 号”和对照群体中均呈阳性, 不能有效地区分这 2 个群体; 而 Sc-1 产生的 248 bp 带仅在“浦江 1 号”群体中出现, 对照群体中未出现此扩增带。采用大样本对该 Sc-1 标记(248 bp) 进行验证, 结果发现, 在团头鲂“浦江 1 号”良种群体的分布频率高达 91.1% (82/90) 以上, 而在淤泥湖原种群体中的分布频率为 14.3% (8/56), Sc-1 标记在良种群体中的高频率, 可作为检测团头鲂“浦江 1 号”良种的一个重要的分子遗传特征指标; 另外, 该 Sc-1 标记在团头鲂“浦江 1 号”群体中的高出现频率, 也说明了在长期(16 年)和高强度(0.03% ~ 0.04% 选择率)的选育过程中, 团头鲂“浦江 1 号”已大大提高了某些优良性状基因的等位基因频率。

关键词: 团头鲂“浦江 1 号”; RAPD 标记; SCAR 标记

中图分类号: S917 **文献标识码:** A

SCAR transformation of a RAPD marker in blunt snout bream “Pujiang No. 1”

ZOU Shu-ming, LI Si-fa, CAI Wan-qi

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecosystem Certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: 3 population-specific RAPD bands, namely S_{37}^{277} bp, S_{11}^{2660} bp from “Pujiang No. 1” blunt snout bream and S_{28}^{946} bp from control, were identified from the amplified bands of 100 10bp-oligo-nucleotide random primers. After gel extraction, cloning and sequencing of the 3 population-specific RAPD bands, three primers (20 base for each forward and reverse primer) were designed according to their sequence information. Then PCR amplification was carried out in the “Pujiang No. 1” and control populations. The results showed that 4 SCAR, namely Sc-1 (248 bp), Sc-2 (540 bp, 460 bp) and Sc-3 (320 bp) bands, were amplified by the 3 pairs of primers. Among them, Sc-2 (540 bp, 460 bp) and Sc-3 (320 bp) could be positively amplified in the “Pujiang No. 1” and control populations as well, but SCAR marker (Sc-1, 248 bp) developed from S_{37}^{277} bp was “Pujiang No. 1” population specificity. Large samples examination (90 individuals of “Pujiang No. 1” population, 56 individuals of control from Yuni Lake) showed that the frequency of Sc-1 marker in “Pujiang No. 1” blunt snout bream reached 91.1% (82/90), but only 14.3% (8/56) in wild population from Yuni Lake. The high frequency of Sc-1 marker in “Pujiang No. 1” blunt snout bream could be used as a specific molecular marker for population identification. And it also indicated that the frequency of some alleles related with economically important trait was increased in “Pujiang No. 1” blunt snout bream, through long-term (16 years) and high selective intensity (0.03% - 0.04% selective rate) mass selection.

Key words: “Pujiang No. 1” blunt snout bream; RAPD marker; SCAR marker

收稿日期: 2004-01-12

资助项目: 国家“十五”攻关(2001BA505B0514); 上海市科技兴农重点攻关项目(02-09)

作者简介: 邹曙明(1972-), 男, 江西宜黄人, 副研究员, 博士, 主要从事水产动物种质资源与遗传育种研究

通讯作者: 李思发, Tel: 021-65710333, E-mail: lsf038@mail.online.sh.cn

SCAR (sequence characterized amplified regions) 标记是一种十分稳定的分子标记,在应用上具有迅速、简便、低成本的特点,非常适合于样品的大量分析,已在水产动物种质鉴别研究上得到应用^[1]。SCAR 标记一般是由 RFLP、RAPD、AFLP 等标记转换而来,其基本原理是根据已获得的标记片段的序列信息,设计一对长度为 20 bp 的特异引物,然后通过普通的 PCR 手段来揭示多态性。团头鲂“浦江1号”是选育的优良品种。其生长速度比原种提高 30%,生长优势十分明显^[2,3]。本文通过筛选、获得了团头鲂良种“浦江1号”特异的 RAPD 标记,将其转换为 SCAR 标记后,可有效地将其与未经选育的团头鲂群体区分开,为确保我国团头鲂养殖业的健康发展提供了技术保障。

1 材料与方法

1.1 材料

用于本实验的团头鲂“浦江1号”90尾和未经选育的淤泥湖团头鲂原种后代群体(以下简称对照群体)15尾均取自上海水产大学南汇水产动物种质试验站,于2003年11月从湖北省淤泥湖引进原种团头鲂56尾,用于 SCAR 标记的验证。随机引物为 10 bp 碱基引物,共 100 个,均为上海生工公司产品。

1.2 实验方法

基因组 DNA 的提取 剪取 0.1 g 左右尾鳍(95%酒精保存样品),加入 400 μL STE 缓冲液(30 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8.0, 200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl)。混匀后加入终浓度分别为 1%的 SDS 和 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的蛋白酶 K,55

作用过夜。加入等体积饱和酚于自制的转轮上缓慢转动 1 h,10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 8 min,吸取上清液加入等体积的氯仿,缓慢转动 5 min,吸取上清液加入等体积的异丙醇或 2 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA,再用 70%的乙醇洗涤,干燥,加入 500 μL 的 TE 溶解备用。

基因组 DNA 的 RAPD 分析 PCR 反应混合物中含 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 9.0, 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, 2.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 0.001%明胶, 0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 每种 dNTP, 引物浓度为 0.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 约 125 ng 基因组 DNA, 2 单位 Taq 酶(Biostar 产品),反应总体积为 25 μL ,加入 30 μL 石蜡油。于 PE480 扩增仪上反应,循环程序为:先 94 变性 5

min;接着 94 45 s,36 45 s,72 90 s,45 个循环后,72 延伸 5 min。取 10 μL 扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳,EB 染色后照像。

RAPD 产物的克隆 利用 DNA 快速回收试剂盒(上海华舜公司),从 0.8%~3.0%的低熔点琼脂糖凝胶电泳回收 RAPD 特异片段,纯化后,用 PGEM-T easy 载体连接,转化于大肠杆菌(*E. coli*)DH5 菌株,测序由上海博亚公司完成。

SCAR 分析 除将 PCR 扩增条件调整为 MgCl_2 浓度为 1.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、退火温度为 64~66 (表 1)、35 个循环外,其它条件参数同 RAPD 分析^[4]。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果

先用 100 个 10 碱基随机引物,对团头鲂“浦江1号”和对照群体样品基因组 DNA 各 8 个样品进行 RAPD 分析。结果在 98 条引物有扩增产物中,表现为多态带的引物有 41 个。2 群体间共产生 3 个特异扩增带,其中,片段 $S_{37}^{277\text{bp}}$ 、 $S_{11}^{2660\text{bp}}$ 为“浦江1号”群体所特有,而 $S_{28}^{946\text{bp}}$ 为对照群体所特有。引物 S_{37} 扩增的 277bp 带如图 1 所示。

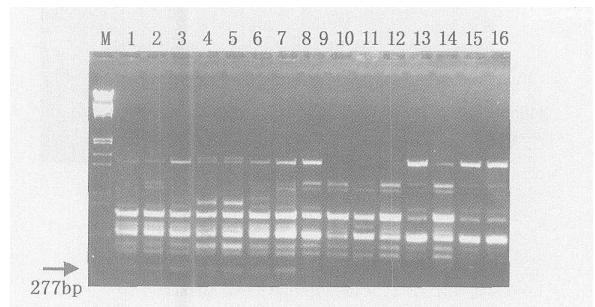


图 1 引物 S_{37} (GACCGCTTGT) 扩增的结果

Fig. 1 The amplification results of primer S_{37} (GACCGCTTGT)

M 为 Marker, 1 至 8 为“浦江1号”;9 至 16 为对照群体

M: Marker; 1 - 8: "Pujiang No. 1" bluntnose bream; 9 - 16: control population

2.2 特异 RAPD 带克隆、测序及 SCAR 标记建立

回收 $S_{37}^{277\text{bp}}$ 、 $S_{11}^{2660\text{bp}}$ 、 $S_{28}^{946\text{bp}}$ 片段,并克隆、测序。图 2 显示了 $S_{37}^{277\text{bp}}$ 片段的碱基序列。根据序列结果设计一对各 20 bp 的正向引物和反向引物(表 1),由于需考虑引物中 GC 碱基的含量,部分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。

用表 1 所示的 3 对引物分别在“浦江 1 号”群体和对照群体中进行 PCR 扩增,分别产生了 Sc-1 (248 bp)、Sc-2 (540 bp, 460 bp) 和 Sc-3 (320 bp) 4 个扩增带(表 1)。其中, Sc-2 和 Sc-3 的扩增带在

“浦江 1 号”和对照群体中均呈现,不能有效地区分这 2 个群体;而 Sc-1 产生的 248 bp 带仅在“浦江 1 号”群体中出现,对照群体中未出现此扩增带(图 3)。

表 1 SCAR 标记的引物序列、退火温度及扩增片段大小

Tab. 1 Primer sequence, annealing temperature and size of PCR band of SCAR marker

RAPD 引物 RAPD primer	RAPD 标记带(bp) RAPD marker	SCAR 引物序列 primer sequence	退火温度(°C) annealing temperature	扩增片段(bp) size of PCR band	SCAR 标记 SCAR marker
S ₃₇	277bp	5'-gcgagaccacgctcaccgg-3' 3'-gccttgatggttgaaccg-5'	66	248	Sc-1
S ₁₁₂	660bp	5'-taccgtagctccgtatagg-3' 3'-atcgatcgatccgtatagc-5'	64	540, 760	Sc-2
S ₂₈	350bp	5'-ctccgtccggagtatagtag-3' 3'-gcgatcgatccttagatagc-5'	65	320	Sc-3

GACCGCTTGT **GCGAGACCCACGCTCACC**GGCTCCAGATTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGG
CCGAGCGCAGAAGTGGTCTCGCAACTTTATCCGCCTCCA TCCAGTCTATTAA TTGTTGCCGGGAAGCTA
GAGTAA GTAGTTCCGCAAGTTAA TAGTTTGC GCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCA TCGTGGTGTAC
GCTCGTCGTTTGTA TGGCTTCATTCAGCTC **CGGTTCAACAACCA TCAAGGC**AAA TGCAGTACAAGCGGTC

图 2 S₃₇²⁷⁷ bp 片段的碱基序列(方框内为 SCAR 引物序列)

Fig. 2 Base sequence of the S₃₇²⁷⁷ bp band (show SCAR primer sequence in frame)

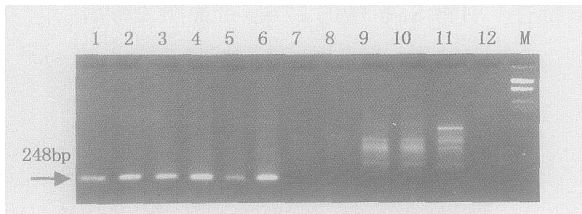


图 3 S₃₇²⁷⁷ bp 片段的 Scar 转化带

Fig. 3 SCAR band from S₃₇²⁷⁷ bp marker

1 - 6: “浦江 1 号”; 7 - 12: 对照群体; M: Marker

1 - 6: “Pujiang No. 1” blunt snout bream; 7 - 12: Control; M: Marker

2.3 Sc-1 标记的验证

采用 Sc-1 标记引物,在“浦江 1 号”群体 90 尾样本和新引进的淤泥湖原种 56 尾样本中,进行大样本分析。在“浦江 1 号”样本中,出现该标记的频率高达 91.1% (82/90);而在淤泥湖原种群体中的出现频率为 14.3% (8/56)。Sc-1 标记的高频率,可作为检测团头鲂“浦江 1 号”良种的依据。

3 讨论

通过累代地选择育种,对基础群体实行择优汰劣,使一些经济性状得以改良并予以稳定,于是

形成新的品种。虽然在育种过程中,自然因素和人为因素作用,也可能诱发突变,但选育本身并不能产生新基因,而是通过等位基因频率的变化,生产一些有别于基础群体的性状,使一些有利的性状在选育过程中得以积累和加强,产生具有特定遗传组成的良种^[5,6]。如兴国红鲤 (*Cyprinus carpio* var. *xingguonensis*)、荷包红鲤 (*Cyprinus carpio* var. *wuyuanensis*) 和玻璃红鲤 (*Cyprinus carpio* var. *wananensis*) 均起源于历史上的自然突变,经过农家的选育,其遗传背景已与野鲤有很大的不同。人工选择的这种巨大的创造性作用,也早已被金鱼家化与变异史所证实。在近代,美国的超级虹鳟^[7]、挪威的大西洋鲑^[8]、原苏联的罗普莎鲤^[9]、以色列的 Dor-70 鲤^[10]、ICLARM 的尼罗罗非鱼^[11],我国的彭泽鲫、建鲤^[12]等优良品种的育成,都证明传统选育技术或传统选育技术同现代生物技术结合,能大大增加优良基因的出现频率,产生良种。

良种选育需要较长的时期,在漫长的选育期间,如何跟踪观测选育群体所发生的表型变异,尤其是遗传型变异,是育种成败的关键技术。现代分子遗传技术的发展,为此提供了有效手段。常

用的分子标记有 RFLP、RAPD、SSR 以及 SCAR 标记等,其中 RAPD 标记需要的 DNA 量少,操作程序较简单,但重复性及稳定性较差,在实际应用中受到一定限制,而将 RAPD 标记转化为 SCAR 标记后,其特异性和稳定性均大幅度提高,可以更方便快捷地应用于异源等位基因的检测。根据片段 S_{37}^{277} bp 的序列结果设计一对各 20 bp 的正向引物和反向引物,产生的 Sc-1 标记略微缩短至 248 bp。在 PCR 分析中,仅需进行 1.4% 的琼脂糖凝胶电泳 $2.0 \text{ h} (5 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1})$ 即可清晰地分辨出特征带。此外,根据以往经验,电泳时样品上样量直接影响电泳分辨效果,在本 PCR 反应体系中,对于标记 Sc-1,每个点样孔仅需加 $3 \sim 5 \mu\text{L}$ PCR 反应产物,就可获得理想的分辨效果。

本试验用该对引物在“浦江1号”群体和对照群体中进行 PCR 扩增,在“浦江1号”群体的 90 个样本中,出现该标记(Sc-1 标记)的频率高达 91.1%;而在 56 尾检测的野生群体中,出现频率仅为 14.3%。Sc-1 标记带在“浦江1号”群体中的高出现频率,可作为分子标记来检测团头鲂“浦江1号”良种。另外,尽管与该 Sc-1 标记相连锁的具体遗传性状尚有待深入研究,但有一点是肯定,即在长期(16 年)和高强度(0.03% ~ 0.04% 选择率)的选育过程中,团头鲂“浦江1号”已大大提高了某些优良性状基因的等位基因频率。

参考文献:

- [1] Zhou L, Wang Y, Gui J. Molecular analysis of silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch) clones by SCAR markers [J]. *Aquac*, 2001, 201: 219 - 228.
- [2] 李思发,蔡完其. 团头鲂双向选育研究[J]. *水产学报*, 2000, 24 (2): 201 - 205.
- [3] Li S F, Cai W Q. Genetic improvement of the herbivorous blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. *NAGA*, 2003, 26 (1): 20 - 23.
- [4] 邹曙明,李思发,蔡完其,等. 团头鲂良种雌核发育的建立及其遗传变异[J]. *水产学报*, 2001, 25 (4): 311 - 316.
- [5] Allendorf F W. Genetics and fishery management: past, present, and future [A]. In Ryman N and Utter F, eds. *Population genetics and fishery management* [M]. Washington Sea Grant Program, University of Washington Press, Seattle, 1987. 1 - 19.
- [6] 楼允东. *鱼类育种学* [M]. 北京: 中国农业出版社, 1999. 10 - 16.
- [7] Hines N O. Fish of rare breeding-salmon and trout of the donaldson [M]. Washington, Strains Smithsonian Institution Press, 1976. 167.
- [8] Gjedrem T. Selection for growth rate and domestication in Atlantic salmon [J]. *Z Tierz Zuchtungsbiol*, 1979, 96: 56 - 59.
- [9] Kipichnikov V V. Genetic bases of fish selection [M]. Springer-Verlag, Berlin, New York. 1981. 40 - 43.
- [10] Wohlfarth G W, Lahman M, Hulata G, *et al.* The story of “Dor-70”, a selected strain of the Israeli common carp [J]. *Bamidgeh*, 1980, 32: 3 - 5.
- [11] Eknath A E, Tayamen M M, Paladar-de Vera M S, *et al.* Genetic improvement of farmed tilapias: the growth performance of eight strains of *Oreochromis niloticus* tested in different farm environments [J]. *Aquac*, 1993, 111: 171 - 188.
- [12] 张建森,孙小异. 建鲤生物工程育种技术及其品种特性 [J]. *现代渔业信息*, 1997, 12 (3): 20 - 26.