

# 用 RAPD 技术识别中华绒螯蟹性别差异 IDENTIFICATION OF SEX DIFFERENTIATION IN *ERIOCHEIR SINENSIS* WITH RAPD

邱 涛 陆仁后 项超美 张 菁 谢 浩

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

QIU Tao, LU Ren-Hou, XIANG Chao-Mei, ZHANG Jing, XIE Hao

(*Institute of Hydrobiology, CAS, Wuhan 430072*)

关键词 中华绒螯蟹, 性别差异, 随机扩增多态性 DNA

KEYWORDS *Eriocheir sinensis*, Sex differentiation, RAPD

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)又称河蟹,是我国的名贵水产资源。本文用 200 个随机引物对河蟹的雌雄群体和个体进行了 RAPD (随机扩增多态性 DNA)分析,发现 17 个引物扩增出了群体水平的性别差异,其中的一个引物扩增出了个体水平的性别差异,雄蟹个体都有一条 800bp 特异带,可作为候选的有价值的性别鉴定标记。由于河蟹的性别决定机制尚无定论,本文对不同性别群体及个体随机扩增产物的分析有助于这些方面的认识,从而为中华绒螯蟹的遗传育种提供基础。

## 1 材料与方 法

中华绒螯蟹采自湖北武汉市场,取个体的肝胰脏组织,用 70%的酒精固定,4℃保存待用,基因组 DNA 的提取参照 Blin 和 Stafford 的方法[1976]。RAPD 扩增反应根据 Williams 等[1990]的方法改进而成。扩增反应的总体积为 25 $\mu$ L,其中包括:10mM Tris-HCl(pH 8.0),50mM KCl,2mM MgCl<sub>2</sub>,0.001% gelatin,0.2 $\mu$ M 引物,四种核苷酸 dCTP、dGTP、dATP、dTTP 各为 0.1mM,30ng 基因组 DNA,1 单位的 Taq 酶。反应混合物加盖一滴石蜡油后,置于 MJ-150 型 PCR 扩增仪中反应。反应程序如下:前 2 个循环:94℃变性 3 分钟,39℃复性 3 分钟,72℃延伸 3 分钟;后 38 个循环:94℃变性 45 秒,39℃复性 75 秒,72℃保温 10 分钟。扩增产物在 1.4%琼脂糖凝胶中电泳分析。

分别取雌雄个体各 7 只的基因组 DNA 等量混匀,制成雌蟹和雄蟹的群体样品,用 10 组 Operon 公司引物(含 H、I、J、K、L、M、N、O、P、Q 组,每组 20 个引物)首先对雌雄群体样品进行扩增,选取能扩增出性别差异的引物再对雌雄各 7 个个体进行扩增。

## 2 结果与讨论

在 200 个引物中,有 7 个没有任何扩增产物,其余的均能扩出 1~16 条产物带,17 个引物可以扩增出雌雄群体性别差异,但用这些引物对个体扩增时,除引物 OPM<sub>14</sub>外,均找不到雌雄个体的特征差异带。

图 1 所示为 11 个引物的雌雄群体扩增图谱,其中 OPN<sub>5,7,8,9,10,11</sub>、OPL<sub>20,19,9</sub>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 OPK<sub>3</sub>、OPK<sub>4</sub>却在箭头所指处分别存在雄性和雌性特征带,但这些带在用这两引物进行个体检测时并非雌雄特异,仅为其中一些个体所有。由于 RAPD 技术可以得到大量的个体多态性,用混合个体的方法来进行群体研究时,一些个体差异会上升为群体差异,这是造成群体研究中能发现较多性别差异的原因。同时我们发现对某一引物扩增而言,对群体样品的扩增图谱并不等于对个体样品

的扩增谱带的叠加。

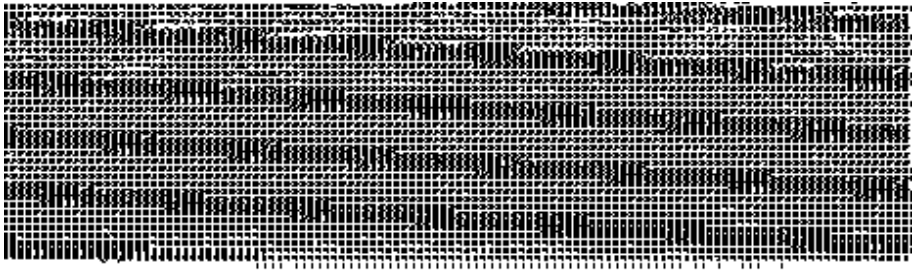


图 1 不同引物对雌雄绒螯蟹群体基因库 DNA 的扩增电泳图谱

Fig. 1 Electropherogram of amplification of DNA isolated from male and female populations of mitten crabs using 11 different primes

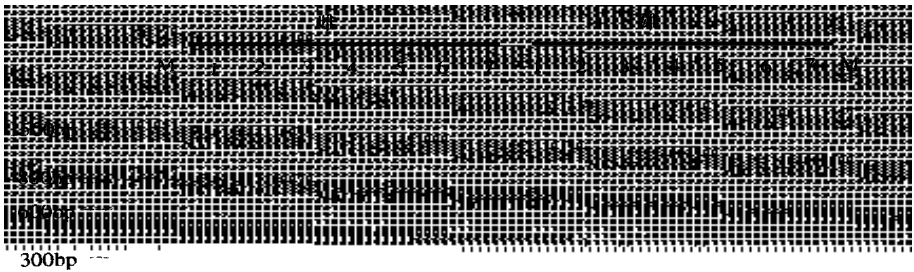


图 2 同一次 PCR 反应中引物  $OPM_{14}$  对雌雄绒螯蟹各 7 个个体的扩增电泳图谱

Fig. 2 Electropherogram of amplification of DNA isolated from 7 male and 7 female mitten crabs using prime  $OPM_{14}$  in one PCR reaction

引物  $OPM_{14}$  (5'-AGGGTCGTTTC-3') 对 14 个个体 (7 雌, 7 雄) 的扩增图谱中 (图 2), 在约 800bp 大小处 (箭头所指), 雌蟹看不到有 DNA 带, 雄蟹却都有一条特异带, 可以作为性别差异的标记。值得注意的是, 在 740bp 处, 雌性个体都为一条亮带, 而雄性个体间则呈多态性分布, 在 500bp 处雄性 DNA 带增亮。另外, 在 100~900bp 之间, 大部分个体间存在显著的个体多态性差异。

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 片断的多态性反映了基因组相应区域的 DNA 多态性。大量的、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 [Vanechoutte 1996] 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。本文首先优化条件, 再用雌雄各 7 个个体, 多次重复, 均能得到与图 2 一致的 DNA 扩增图谱。同一次 14 管 PCR 反应中, 7 个雄性个体出现特征带的概率仅为  $1/2^7$ , 因此具有较高的可靠性。RAPD 技术扩增的 DNA 片段的遗传背景还不太清楚, 这一 800bp 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。

蟹类中尚无性反转的有关报道。其性控机制还没有结论, 由于雌蟹比雄蟹具有明显的经济价值, 在研究中人们很关心两性在遗传结构以及蛋白表达上的差异。细胞学观察未发现明显的特化的性染色体, 寻找雌性蛋白的努力尚未取得成功, 说明传统的方法寻找两性遗传差异比较困难, 而 RAPD 方法提供了一个有效的途径。根据 RAPD 标记的特点, 本文认为河蟹基因组中确实存在 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 组份, 再进一步确定这些组份在染色体中的分布, 可以逐步弄清某些染色体的作用, 图 2 所示的雄性特征 DNA 片段由于在雌性中空缺, 故可能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, 找出中华绒螯蟹两性 DNA 结构的不同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

- Blin N, Stafford D W. 1976 A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res*, 3: 2303
- Williams J G, Kubelik A R, Livak K J, et al. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 18(22): 6631 ~ 6535.
- Vanechoutte M. 1996. DNA finger printing techniques for Microorganisms. *Molecular Biotechnology*, 6: 115 ~ 142.