

文章编号 : 1004 - 7271(2003) 02 - 0102 - 04

鲤鱼耐寒性状研究

常玉梅^{1, 2}, 孙效文¹, 梁利群¹

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070 ;
2. 上海水产大学渔业学院, 上海 200090)

摘要 : 用 80 个随机引物对黑龙江野鲤(耐寒)、柏氏鲤(不耐寒)和杂交 F₁(越冬成活)的群体混合 DNA 样品进行 RAPD-PCR 扩增, 结果引物 S1043、S1052 和 S1066 扩增出与抗寒性状相关的分子标记各一个。至此, 共获得 9 个与鲤鱼抗寒性状相关的分子标记, 进一步表明抗寒性是数量性状(QTL)受微效多基因控制。此外, 就 RAPD-PCR 实验中需要注意的问题如模板纯度、水的去离子和不同商标酶的活性等进行了简单的讨论; 并对目前所应用的淡水鱼类抗寒基因工程研究策略及现状进行了简单概述。

关键词 : 随机扩增多态性 DNA - 聚合酶链式反应; 抗寒基因工程; 抗冻蛋白; 基因; 性状; 鲤鱼

中图分类号 : Q343.1+5 S917 文献标识码 : A

Study on cold tolerant traits for common carp *Cyprinus carpio*

CHANG Yu-mei^{1, 2}, SUN Xiao-wen¹, LIANG Li-qun¹

(1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, the Chinese Academy of Fisheries Science, Harbin 150070, China ;
2. Fisheries College, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract : Population blending DNA samples respectively derived from Heilongjiang wild carp *Cyprinus carpio haematopterus* Temminck et Schlegel(cold tolerance), Boshi carp *Cyprinus pellegrini pellegrini* Tchang(cold sensible) and F₁ generation(survivors experienced through winter), were programmed RAPD-PCR with 80 random primers. Primer S1043, S1052, S1066 resulted in one molecular marker respectively. Up to now, 9 markers associated with cold tolerance of common carp were obtained. It further demonstrates that cold tolerant trait is a quantitative trait loci(QTL), which is controlled by small multi-genes. In addition, author simply discussed the experimental methods, such as template purity, water deionization and enzyme activity with different brands. Author also sketched study tactics and present conditions on cold tolerant gene engineering for fresh water fishes.

Key words : RAPD-PCR ; cold tolerant gene engineering ; anti-freezing protein ; gene ; trait ; *Cyprinus carpio*

淡水鱼类的耐寒问题一直困扰着鱼类遗传学家和育种学家。关键在于对问题的实质没有得到根本性的阐明。不过, 为了解决这一世界性的难题, 众多科学家为之做出了努力, 并取得了一定的成绩^[1-4]。到目前为止, 最有效的解决方法是传统的杂交育种, 荷包红鲤抗寒品系的获得就是最成功的典范^[5, 6]。但是这种方法运作周期长, 而且最大的困难在于无法克服杂交不亲和现象, 所以杂交育种依然不能从根本上解决某些淡水优良品种不耐寒的问题。随着现代分子生物学技术的发展, 尤其是多态性分子标记

收稿日期 2002-11-5

基金项目 : 中国水产科学研究院基金项目(2001 - 3 - 3)

作者简介 : 常玉梅(1978 -) 女, 内蒙古阿拉善盟人, 上海水产大学 2000 级硕士研究生, 专业方向为水产动物物种质资源与遗传育种。

E-mail : ymchang2002@sohu.com

的应用,为深入研究淡水鱼类耐寒机制提供了新的技术。黑龙江水产研究所自 1996 年开始研究黑龙江野鲤 (*Cyprinus carpio haematopterus* Temmink et Schlegel) 的抗寒机制,并首次应用分子标记技术,获得了 6 个与鲤鱼抗寒性状相关的分子标记^[7,8]。本文在此基础上又获得了 3 个标记,现将实验结果简要报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

抗寒性状研究所采用的实验鱼分别为来自黑龙江抚远江段的黑龙江野鲤(父本 χ *Cyprinus carpio haematopterus* Temmink et Schlegel),云南江川养殖场的柏氏鲤(母本 χ *Cyprinus pellegrini pellegrini* Tchang),以及二者的杂交 F_1 (越冬成活),由黑龙江水产研究所培育。本实验所用随机引物购自美国 Opron 公司,生化试剂购自美国 Promega 公司,其它试剂为国产分析纯。RAPD-PCR 反应在美国 PE 公司生产的 9600 和 9700 上进行。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的制备

将两亲本及 F_1 鳍条或肝脏组织剪碎,放入 1.5mL 离心管,加入 300 μ L 裂解液(成分:100mM EDTA pH 8.0, 100 μ g/mL Proteinase K, 0.5% Sarcosyl)于 50 $^{\circ}$ C 消化 2~3h,在此期间缓慢转动离心管数次,待组织完全消化后,加等体积的饱和酚抽提一次,吸出含 DNA 的水相,再用等体积的酚/氯仿(酚:氯仿:异戊醇为 25:24:1)抽提两次。最后用预冷的无水乙醇沉淀,70%乙醇洗涤 2~3 次,室温干燥后加 1/10TE 溶解并保存在 4 $^{\circ}$ C 备用。

1.2.2 RAPD 反应

扩增反应的总体积为 25 μ L,其中包括 10xRAPD 反应缓冲液 18 μ L(成份:100mM Tris-HCl, 500mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.01%(W/V) Gelatin, 0.05% Triton X-100), dNTPs(2.5 mM) 1 μ L, 基因组 DNA 1 μ L(50ng/ μ L), Taq 酶 1 μ L(1U/ μ L)。

RAPD 反应液 94 $^{\circ}$ C 变性 3min 后, 93 $^{\circ}$ C 1min, 36 $^{\circ}$ C 2min, 72 $^{\circ}$ C 1min, 45 个循环,最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min, 扩增产物在 1.4% 琼脂糖电泳分离, EB 染色, 紫外灯下观察并拍照。

2 结果

本文共用 80 个随机引物对黑龙江野鲤(耐寒), 柏氏鲤(不耐寒), 杂交 F_1 (70 个越冬成活个体) 的群体混合 DNA 样品, 进行 RAPD-PCR 扩增, 结果引物 S1043、S1052、S1066 各扩增出一条与鲤鱼耐寒性状相关的特征带。所谓的与抗寒性状相关, 指的是杂交 F_1 越冬成活个体与黑龙江野鲤共有的条带, 而对对照组柏氏鲤没有出现的, 定义为与抗寒性状相关的分子标记(图 1、2、3)。从图中可看出黑龙江野鲤将抗寒相关因子传递给了子代, 而且这种相关因子, 到目前为止已从 DNA 分子水平上发现了 9 个, 说明鲤鱼抗寒性状由微效多基因控制, 是数量性状。如果继续深入研究下去, 建立 DNA 分子标记与抗寒性状之间的连锁关系, 有望克隆并定位鲤鱼抗寒基因及相关因子, 为解决淡水鱼类不抗寒问题, 提供新的研究策略。

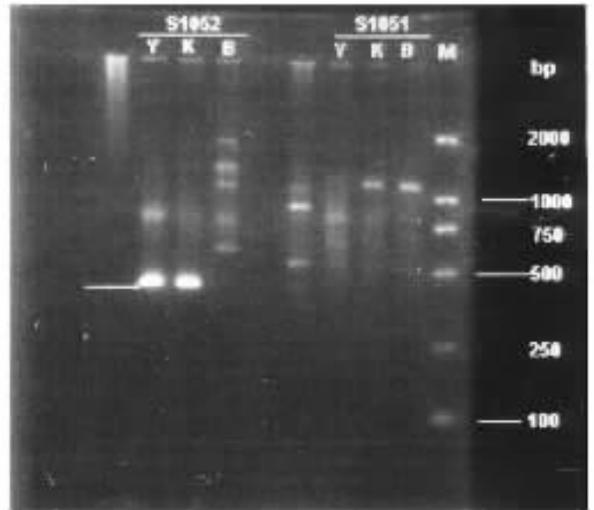


图 1 引物 S1052 扩增后获得的一个与抗寒性状相关的分子标记

Fig.1 Molecular marker associated with cold tolerant traits amplified by primer S1052
M: Marker B: 柏氏鲤 K: 子一代 Y: 黑龙江野鲤

3 讨论

3.1 RAPD-PCR

在名目繁多的分子标记中,如 RFLP、STR、SSCP、AFLP 和 RAPD 等,RAPD 以其操作简单、快捷、无需知道目标序列的有关信息,无种属特异性等优点,备受众多研究人员的青睐。但是 RAPD 也存在诸如重复性差、实验结果不具可比性和共显性比例低等缺陷。作者在研究过程中发现,如果能严格控制实验条件,RAPD-PCR 的实验结果是比较稳定的。现将几点体会及实验中可能遇到的问题做一简单分析。

3.1.1 高质量模板

RAPD-PCR 扩增属于随机扩增,基本上可以覆盖全基因组,所以多态性比较丰富,扩增条带一般较多。但是作者在实验过程中发现,如模板不纯,仅扩增出 1~2 条非常清晰的条带,而且一个系列的引物都出现此情况,表明模板的纯度不够,需要进一步对模板进行抽提纯化。

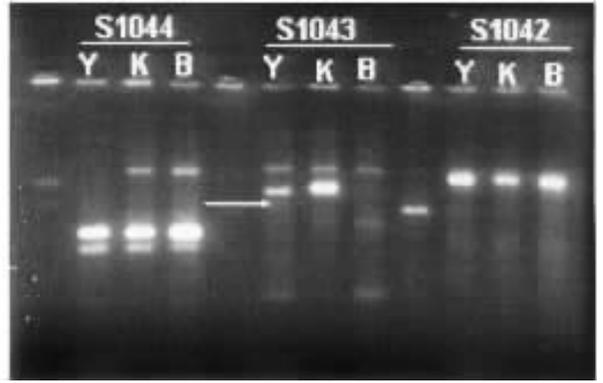


图 2 引物 S1043 扩增后获得的一个与抗寒性状相关的分子标记

Fig.2 Molecular marker associated with cold tolerant traits amplified by primer S1043
B: 柏氏鲤 K: 子一代 Y: 黑龙江野鲤

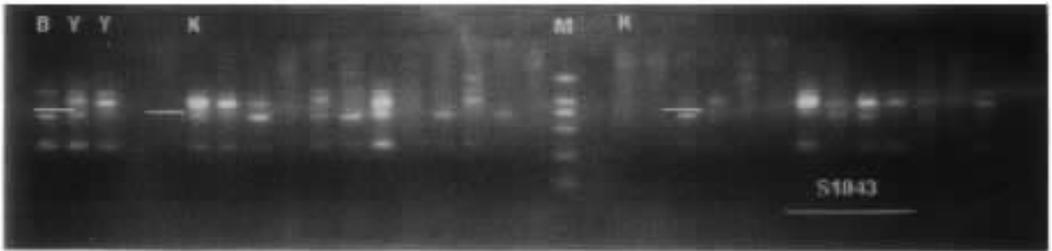


图 3 引物 S1043 对 F₁ 成活个体基因组 DNA 的扩增结果

Fig.3 F₁ Survivors genomic DNA amplified by primer S1043
M: Marker B: 柏氏鲤 K: 子一代 Y: 黑龙江野鲤

3.1.2 Taq 酶

不同生物公司出品的 Taq 酶活性不一,作者通过比较 TaKaRa (日本)和 Promega (美国)生产的 Taq 酶,发现同样的用量,一般为 1U/μL, Promega 的酶可扩增出条带,而 TaKaRa 却不能。必须对其加大用量至 1.5U~2U/μL 方可扩增出条带。这说明不同厂家的 Taq 酶对扩增有影响,这是因为不同厂家从不同菌株上分离的 Taq 酶可能在性能上存在差异。

3.1.3 水

通常人们只注重模板 DNA、Taq 酶、引物、MgCl₂ 和 dNTPs 对 RAPD-PCR 扩增结果的影响,而忽略水的影响。作者通过实验发现,使用去离子灭菌水扩增条带清晰,无拖带现象。

影响 RAPD-PCR 反应的因素很多,每一个环节操作不当均可导致扩增结果不能重复,作者通过严格控制实验条件,如统一试剂(酶、引物和缓冲液),建立最优化的反应条件,使用同一加样器等,最后获得了相当稳定的结果。

3.2 淡水鱼类抗寒基因工程

黑龙江水产研究所自 1996 年开始研究鲤鱼的耐寒机理。梁利群等首次应用分子标记技术,以耐寒的黑龙江野鲤、不耐寒的云南柏氏鲤、江西荷包红鲤及其杂交子代为研究对象,获得了 6 个与鲤鱼耐寒性状相关的分子标记,并将其中的 1 个定位在鲤鱼遗传连锁图谱上,并由此提出鱼类的耐寒性状为数量

性状,受微效多基因控制^[7]。

随着人们对淡水鱼类抗寒分子生物学研究的不断深入,开始逐步探索利用基因工程手段改造鱼类的遗传特性。要实现这一目标,需要考虑以下4个环节的紧密配合:研究比较低温与非低温条件下鱼类某些特定基因表达的改变状况,这项研究我们目前正在进行;分离与鱼类耐寒性状相关的基因;转移抗寒相关基因,并通过测定转基因鱼,证明该基因的作用、功能;利用分离的基因进行遗传转化或转移,提高鱼类的耐寒性。目前虽已获得9个与鲤鱼抗寒性状相关的分子标记,但是真正控制鱼类耐寒性状的主效基因及相关基因有待进一步的深入研究。

3.2.1 鲤鱼总 DNA 转移策略

自鱼类外源总 DNA 转移成功报道以来,此技术已被广泛应用于鱼类品种改良如生长、抗逆等研究中。朱新平等通过显微注射技术将鲤鱼总 DNA 转移到广东鲮鱼受精卵内,发现外源 DNA 对鲮鱼脑乙酰胆碱酯酶活力有一定的影响,但是并不能改变鲮鱼的不抗寒性^[9,10]。

3.2.2 抗冻蛋白基因转移策略

生活在极区高寒水域的鱼类,为适应寒冷的生存环境,可以在体内产生大分子物质如抗冻蛋白(antifreeze protein, AFP)、抗冻糖蛋白(antifreeze glycoprotein, AFGP)和多肽。这些物质可以降低血液冰点,避免冰晶形成。近几年来,国内外学者对抗冻蛋白的研究十分关注。加拿大科学家 Davies 等对美洲拟鲾(*Pseudopleuronectes Americanus*)的抗冻蛋白及基因进行了深入细致的研究,利用果蝇(*Drosophila*)建立了抗冻蛋白表达模型^[11],同时在转移抗冻蛋白基因的大西洋鲑(*Salmo Salar*)中获得表达^[11]。另外,将抗冻蛋白基因转移到植物中也获得了表达^[12,13]。李晶等和朱新平等将抗冻蛋白基因转移到极不耐寒鱼类罗非鱼(*Oreochromis aureus*)和鲮鱼(*Cirrhinus molitorella*)中,以期改善这两种鱼类不耐寒特性。目前均已获得转抗冻蛋白基因鱼,而且部分鱼的耐寒性也有一定的改善,并通过检测发现抗冻蛋白基因已整合到受体鱼染色体上,但在转录及转译水平上均未获得结果,说明抗冻蛋白基因在受体鱼体内表达量极微,亦或是不表达^[14,15]。

总之,通过转基因技术来提高鱼类的耐寒性,需要考虑适合的启动子、转基因的表达、外源基因的定点整合,更要突破基因数量的限制(包括不同抗寒基因数量及基因拷贝数等)以提高表达量。

参考文献:

- [1] 王祖熊,张锦霞,黄文郁,等. 鲮鱼遗传改良的研究[J].水生生物学报,1984,8(2):195-204.
- [2] 冯祖强,王祖熊.鱼类对环境温度适应问题[J].水产学报,1984,8(1):79-83.
- [3] 冯祖强,王祖熊.鲮鱼冷休克及其死亡的某些生化因素[J].水生生物学集刊,1984,8(3):290-297.
- [4] 吴力钊,王祖熊.鲮鱼和二代混精鲮鱼低温耐受能力的差异[J].水生生物学报,1993,17(3):206-210.
- [5] 沈俊宝,刘明华.荷包红鲤抗寒品系的筛选和培育[J].淡水渔业,1988,3:14-17.
- [6] 沈俊宝,刘明华.荷包红鲤抗寒品系的形态学特征及其主要经济性状[J].黑龙江水产研究所研究报告,1988,26:12-17.
- [7] 梁利群,孙效文.鲤鱼抗寒性状的 RAPD 分析[J].中国水产科学,1997,20(3):89-91.
- [8] 梁利群,孙效文.鲤鱼抗寒性状分子标记在遗传连锁图谱上的定位[C].水产学会年会论文集,2000.
- [9] 朱新平,刘家照,夏仕玲,等.外源 DNA 对鲮鱼脑乙酰胆碱酯酶活力的影响[J].淡水渔业,1996,26(6):7-8.
- [10] 朱新平,刘家照,夏仕玲,等.鲤鱼总 DNA 对鲮鱼耐寒性能的影响[J].淡水渔业,1996,26(3):14-16.
- [11] 杨志兴.美洲拟鲾抗冻蛋白基因在 *E. coli* 中表达的研究[J].遗传,1992,14(1):12-15.
- [12] 达来,朱晔荣,王文艳,等.用美洲拟鲾抗冻蛋白基因转化植物的问题[J].生物工程进展,2002,22(1):25-29.
- [13] 杨典洱,王岳光,张承亮,等.植物抗性基因研究新趋势[J].生物技术通报,2001,6:2-4.
- [14] 李晶,李荣萍,张淑梅,等.低温对转抗冻蛋白基因罗非鱼影响的初步研究[J].生物技术,1996,5(5):9-10.
- [15] 朱新平,夏仕玲,张跃,等.转抗冻蛋白基因鲮鱼的初步研究[J].中国水产科学,1997,20(2):79-80.