

文章编号 : 1004 - 7271(2006) 01 - 0021 - 04

红鳍东方鲀微卫星 DNA 多态性初步分析

郝 君^{1, 2}, 孙效文¹, 孟雪松³

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所 农业部北方鱼类基因工程育种实验室 黑龙江 哈尔滨 150070 ;
2. 大连水产学院生命科学与技术学院 辽宁 大连 116023 ;
3. 大连天正实业有限公司 辽宁 大连 116023)

摘 要 : 用红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*) 微卫星标记对两个不同群体红鳍东方鲀的 DNA 多态性进行分析。经 20 对引物的扩增, 得到每个个体的微卫星片段, 其中 16 对引物能扩增出较好的谱带。用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测微卫星标记的 PCR 扩增产物, 并对扩增结果进行了统计分析。计算得到两个群体的平均等位基因数分别为 1.875 0 和 2.437 5 ; 多态信息含量 (PIC) 平均值分别为 0.275 1 和 0.379 4 ; 平均杂合度观测值分别为 0.025 和 0.200。统计结果初步表明两个不同群体平均杂合度较低, 遗传多态性不高。

关键词 : 红鳍东方鲀 ; 微卫星 ; 多态性 ; DNA

中图分类号 : S 917 文献标识码 : A

Analyzing the polymorphisms of *Takifugu rubripes* with microsatellite

HAO Jun^{1, 2}, SUN Xiao-wen¹, MENG Xue-song³

(1. Key Lab of Bioengineering Breeding of Northern Finfish, Ministry of Agriculture, Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Harbin 150070, China ;
2. College of Aquaculture Science and Technology, Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China ;
3. Dalian Tianzheng Industrial Company Limited, Dalian 116023, China)

Abstract : Two populations of *Takifugu rubripes* domesticated in different places were analyzed with the *Takifugu rubripes* microsatellite marker and the pattern of each sample was obtained. Altogether 20 primers were used in this experiment, of which 16 primers were assessed for genetic diversity for 10 individuals. The PCR products were electrophoresed by 2% agarose gel, and the data like allelic frequencies and analyzed by statistic method. The results indicated mean number of alleles were 1.875 0 and 2.437 5, PIC value (polymorphism information content) were 0.275 1 and 0.379 4 and the observed heterozygosity values over all loci were 0.025 and 0.200. All of these indices indicated that genetic diversity of *Takifugu rubripes* was not inspiring.

Key words : *Takifugu rubripes* ; microsatellite ; polymorphisms ; DNA

红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*) 属鲀形目 (Tetraodontiformes), 东方鲀属 (*Fugu*), 以日本沿海为主要分布中心, 在我国沿海自然数量较少, 日趋罕见^[1]。红鳍东方鲀肉美味鲜, 富含蛋白质, 是一种经济价值很

收稿日期 : 2005-03-09

基金项目 : 国家重大基础研究项目 (2004CB117405)

作者简介 : 郝 君 (1980 -), 女, 辽宁抚顺人, 硕士研究生, 专业方向为水产动物基因组。Tel : 0451 - 84842646, E-mail : junhao1980@126.com

通讯作者 : 孙效文 (1955 -), 男, 吉林人, 研究员, 博士生导师, 主要从事水产动物基因组研究。Tel : 0451 - 84842646, E-mail : xwsun2002@163.com

高的鱼类,近几年在我国也有养殖^[2]。微卫星 DNA 多态性检测技术具有样品需要量少、样品来源广、操作简单、引物具有通用性、检测多态性高、检测速度快等特点,是分析和评估种群的多态性的有效方法^[3]。Sydney Brenner 等^[4]1993 年首先提出红鳍东方鲀可作为脊椎动物基因研究的模式生物。主要是因为它的单倍体基因组大小为 400 Mb,不到人的基因组织的 1/8,而且许多分析表明红鳍东方鲀与哺乳动物的基因数目大致相同。因此它成为了一种经济的 DNA 序列对比工具。红鳍东方鲀同时也是一种非常有经济价值的海水养殖鱼类。在我国大连、天津等地大量养殖。许多研究报道集中在其传统养殖上,而群体分析、保种鉴定方面未见相关报道。仅有刘振辉等^[2]利用 RAPD 标记分析红鳍东方鲀和假睛东方鲀种群差异。本文采用微卫星 DNA 多态性检测技术检测红鳍东方鲀的多态性,为辅助红鳍东方鲀育种和种质鉴定提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

采集地点:A:大连天正实业有限公司,红鳍东方鲀 4 条尾鳍;B:大连水产学院实验室红鳍东方鲀 6 条尾鳍。

1.2 基因组 DNA 的提取

取鱼的尾鳍,加裂解液 50 °C 消化 16 h~18 h,加入等体积的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提,经透析后,加两倍体积的无水乙醇沉淀,70%乙醇冲洗,自然风干。用适量 TE 缓冲液溶解,置于 4 °C 冰箱保存。

1.3 PCR 引物的设计及引物的筛选

基因组序列来源于 UK MRC HGMP-RC The Fugu Genomics Project^[5],运用 Tandem Repeats Finder 软件查找出微卫星序列,在 Primer 5 软件上设计引物。运用这些引物对红鳍东方鲀 2 个群体进行多态性比较。共选取其中 20 对引物,对红鳍东方鲀两个群体的 10 个个体进行了微卫星基因座位分析。

1.4 PCR 反应

试验采用 16 对引物序列(见表 1)。优化的 PCR 反应条件:总体积为 25 μ L 反应体系,内含约 50 ng 基因组 DNA,1 ng/ μ L 引物,1U Taq DNA 聚合酶,18 μ L PCR 缓冲液。在 PE9700 型 PCR 扩增仪上进行,94 °C 预变性 3~5 min,38 个扩增循环,每个循环包括 94 °C 30 s,56 °C 30 s,72 °C 30 s,最后 72 °C 延伸 7 min。扩增产物进行(2.0%琼脂糖凝胶)电泳。用 GDS8000 型凝胶成像系统(UVP 公司)观察拍照、记录分析。

表 1 微卫星引物序列及其退火温度

Tab.1 Microsatellite primers sequence and its annealing temperature

编号	引物序列 5'~3'	退火温度(°C)	编号	引物序列 5'~3'	退火温度(°C)
F0001	ACCCAATCTCACCTCCTG AACCCAAAGTTTGACCCT	56	F0012	GAAGGGCTGCCAGAACAC CCCGCTTAGAATCCTGTT	55
F0002	AAACACCAAAAGAAAGCCACT ATTACCGCACTCCCTACC	56	F0013	CACTCGGCATAGCAGACC TATCAGGCACCGCAAGAA	56
F0003	CCTTGCCCTGTGCTTTAC AGCCACCTACATCCTTCACT	56	F0014	ATTGCTGCATTAGCCCTTCA AACGCTTCCTTTCCTTCACA	56
F0004	GCTGACAGACAAGAGGGAC CCTGAAGGGAGGGAATAT	56	F0015	CCCGCTGTGGTTTGTTC TGTGGGTATGATGTGATGCT	56
F0005	TCTCCCTTACACCAAACG TTCCCACTGCTGAAGACC	55	F0016	AGCGTGTCTG TGGTTTC GATTGCCTGCCTCCCTTT	54
F0006	TTTGCATGCTGGCTTTGT CGTTGCTCATTTCCTGCT	55	F0017	CCATTCACCCAGAAGCAA AAAGCCCTCTTGAACCCT	56
F0007	CTTGGACGAGCAGGA TGT AACGAATCTGCGAGGACA	56	F0019	CCATCTAACTGCGGGTAA TGAGACTCTGCCTTCGTG	56
F0010	G TTGCTCCAGTTTCTTAG TGTAAGAATGACCCAGA	56	F0020	ACAATGAGCCGTGGAAGT GTGAATGGATGTGGAGCA	56

1.5 数据统计方法

按下列公式计算微卫星基因座的等位基因频率(allelic frequency , P)、多态信息含量(polymorphism information content ,PIC)^[6]和基因杂合度(heterozygosity , H)^[6]。杂合度计算公式为：

$$H = 1 - \sum_{i=1}^m P_i^2$$

多态性信息含量的计算公式为：

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^m P_i^2 - \sum_{i=1}^{m-1} \sum_{j=i+1}^m 2P_i P_j^2$$

其中 m 为该位点的等位基因数 ; P_i 、 P_j 分别为第 i 和第 j 个等位基因在群体中的频率 $j = i + 1$ 。

2 结果

2.1 微卫星 PCR 结果及多态性

合成 20 对微卫星引物 ,有 16 对可以扩增出较好的谱带 ,其中有 6 对引物的扩增产物在同一群体不同个体间存在差异。扩增产物的大小范围为 117~242 bp ,等位基因大小差异范围为 125 bp。比较发现 ,同一引物对两群体的扩增图谱没有明显的差异 ,未发现明显的多态性。结果见图 1。

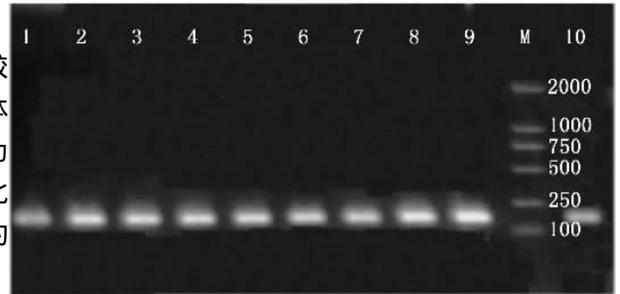


图 1 微卫星引物 F0015 对红鳍东方鲀基因组 DNA PCR 扩增产物电泳图谱

Fig.1 The amplified PCR result of genomic DNA of *Takifugu rubripes* with primer F0015
M 为分子量标记 ;1-4 红鳍东方鲀样品(天正实业);
5-10 红鳍东方鲀样品(实验室);

2.2 遗传多样性分析

两群体的平均等位基因数、平均杂合度观测值、平均杂合度期望值和多态信息含量见表 2。微卫星分析表明 :平均等位基因数分别为 1.875 0 和 2.437 5 ;平均杂合度观测值分别为 0.025 和 0.200 ;平均杂合度期望值分别为 0.342 9 和 0.450 9。多态信息含量平均值分别为 0.275 1 和 0.379 4 ,表明大连水产学院实验室的红鳍东方鲀群体比大连天正实业有限公司的红鳍东方鲀群体多态性略高。

3 讨 论

微卫星具有较高的突变率适合鉴定种群间多态性。但 Taq 聚合酶在扩增过程中的滑动会造成与预期结果相差大约 1~3 个重复单元的不同长度产物出现 ,很难将真实产物与滑动产物区分开^[3]。从精确性考虑 ,所研究分析的位点越多越好 ,但目前还没有简单、清晰的方式说明最有效选择位点的方法^[7]。所以在处理数据时 ,为摒除影响因素 ,把差距在 1~3 个碱基的视为同一条带。

红旗东方鲀基因组测序工作已完成 95% 以上 ,其中发现 6 042 个微卫星位点 ,据估算平均每隔 1876 kb 就会有一个微卫星^[8]。利用 Tandem Repeat Finder 软件在红鳍东方鲀 BAC 库中查找微卫星 ,并设计合成引物。通过对引物的 PCR 分析 ,两群体的电泳图差异甚小 ,多态性不高 ,杂合度比较低。出现这种结果的因素可能有 :其一 ,两群体属于同一种群。我国的红鳍东方鲀鱼种主要进口于日本 ,很可能属于同一家系的后代 ,亲缘性较近 ,DNA 分子水平上的分化程度不高还不足以形成群体特征。这可能是多态性低的主要原因。另外 ,样品均来自养殖场 ,长期的人工养殖条件下 ,人为的干预 ,单方向选择 ,使得红鳍东方鲀过分依赖环境 ,导致多态性降低。再则 ,由于不同国家或地区间相互引种 ,导致种质资源的混杂、群体特征消失。Mathur^[4]指出应用 DNA 指纹标记时 ,每品种或品系有 13~20 个个体就可以获得遗传变异的合理估计值。本实验采用两个群体(共 10 个样品) ,20 对引物其中只有 16 对引物能扩增出较好产物 ,仅能初步鉴定种群的多态性 ,还不足以解释群体间的遗传结构差异。获得更可靠的数据 ,还需

更多的样品和引物来检测其多态性。

表 2 两个红鳍东方鲀群体的微卫星位点
Tab. 2 Microsatellite loci of two populations of *Takifugu rubripes*

种群	微卫星位点																平均
	F0001	F0002	F0003	F0004	F0005	F0006	F0007	F0010	F0012	F0013	F0014	F0015	F0016	F0017	F0019	F0020	
A	2	2	1	2	2	2	2	4	1	2	3	1	1	2	1	3	1.875
B	208~216	145~157	210	210~216	231~259	182~195	215~223	157~207	132	210~222	186~247	217	165	176~184	157	138~160	
Ho	0.375	0.625	0	0.375	0.375	0.375	0.375	0.750	0	0.444	0.625	0	0	0.500	0	0.667	0.3429
He	0	0	0	0	0	0	0.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.025
PIC	0.305	0.305	0	0.305	0.305	0.305	0.305	0.703	0	0.346	0.555	0	0	0.375	0	0.593	0.2751
A	1	1	3	2	4	2	3	5	3	2	2	2	3	2	2	3	2.4375
B	201	145	200~210	204~225	219~266	182~195	215~231	140~207	132~161	216~222	186~199	206~211	165~181	166~184	152~154	147~169	
Ho	0	0	0.560	0.278	0.444	0.667	0.611	0.778	0.480	0.444	0.444	0.444	0.444	0.500	0.480	0.640	0.4509
He	0	0	0	0	0	0.333	0.5	0.167	0.333	0	0	0	0.667	0	0	0	0.200
PIC	0	0	0.535	0.239	0.620	0.346	0.535	0.744	0.365	0.346	0.346	0.346	0.346	0.375	0.365	0.563	0.3794

注 :A 代表“等位基因数”,B 代表“等位基因大小”,Ho 代表“杂合度期望值”,He 代表“杂合度观测值”,PIC 代表“多态信息含量”

国外主要利用红鳍东方鲀的微卫星进行物种间基因组对比进而分析基因的进化和表达^[9,10]。国内大多关注红鳍东方鲀的毒素研究。刘振辉等^[2]曾利用 RAPD 标记分析红鳍东方鲀和假睛东方鲀群体间差异,单就红鳍东方鲀群体研究未见报道。微卫星数量及种类丰富、分布广泛,具有高度多态性,而且突变率较高,每个位点可能都有很多的等位基因存在,即使在一些等位酶多样性较低的生物中也是如此^[3]。微卫星技术比 RAPD 技术稳定,更适合作为红鳍东方鲀辅助育种的分子标记并且为解决其控制种质混杂问题提供了可能。本实验研究只是初步鉴定,尚有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] 孙中之,陈超,于宏,等.红鳍东方鲀鱼卵孵化和鱼苗实验[J].上海水产大学学报,1997,(4):291-295.
- [2] 刘振辉,石拓,柳学周,等.RAPD 标记鉴定红鳍东方鲀和假睛东方鲀种群的初步研究[J].海洋湖沼通报,1999,(38):38-42.
- [3] 晏鹏,吴孝兵,史燕,等.微卫星多态性检测技术及其在保护遗传学中的应用[J].应用生态学报,2003,14(3):461-464.
- [4] Mathur P K, Ponsuksili S, Groen A F, et al. Estimation of Genetic Variability within and between population using DNA fingerprints Proc [A]. 5th World Congress on Genetics applied to livestock production [C]. 20: 528-531.
- [5] [http://fugu.hgmp.mrc.ac.uk/\[Z\]](http://fugu.hgmp.mrc.ac.uk/[Z]).
- [6] 龚明川,赖松家.微卫星多态性与动物杂种优势预测[J].动物科技,2003,2(4):62-65.
- [7] 杜长斌,孙孝文,楼允东,等.应用微卫星技术对野鲤和两种鲤选用品系的遗传多样性分析[J].上海水产大学学报,2000,(4):5-9.
- [8] Daniel D, Christian S. Two distinct modes of microsatellite mutation processes: evidence from the complete genomic sequence of Nire Speaes [J]. Genome Research, 2003, 13(10): 2242-2251.
- [9] Elgar G, Brenner S. Generation and analysis of 25 Mb of genomic DNA from the pufferfish *Fugu rubripes* by sequence scanning [J]. Genome Research, 1999, (10): 960-971.
- [10] Crollius H R, Weissenbach J. Characterization and repeat analysis of the compact genome of the freshwater pufferfish *Tetraodon nigroviridis* [J]. Genome Research, 2000, 10(7): 939-949.