

文章编号: 1004-7271(2003)04-0303-05

枝角类 RAPD 条件优化和遗传多样性分析

陆开宏, 石志猛, 王扬才

(宁波大学生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211)

摘要:以蒙古裸腹溞(*Moina mongolica* Daday)和多刺裸腹溞(*M. macrocopa* Straus)为材料,对枝角类 RAPD 扩增条件进行了摸索和优化,结果表明,枝角类 PCR 扩增反应的最佳体系为:在 25 μ L 体积中,模板 DNA 25ng/ μ L,dNTPs 0.1mmol/L,TaqDNA 聚合酶 1U,引物 0.1 μ mol/L, Mg^{2+} 1.5mmol/L,10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L。按照优化的 RAPD 条件进行实验,重现性良好。2 种裸腹溞在盐胁迫条件下的种群遗传多样性分析表明,同种裸腹溞不同生存盐度之间的种群遗传相似度较高,分别为 0.9134 和 0.9038,而多刺裸腹溞和蒙古裸腹溞两个种间的遗传相似度相对较低,约为 0.5~0.6。

关键词:裸腹溞;随机扩增多态性 DNA;条件优化;遗传多样性

中图分类号: S917 文献标识码: A

Optimization of RAPD conditions and analysis of genetic diversity of Cladocera

LU Kai-hong, SHI Zhi-meng, WANG Yang-cai

(Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Zhejiang Ningbo 315211, China)

Abstract: *Moina mongolica* Daddy and *M. macrocopa* Straus were used as the materials of extracting DNA in this experiment to optimize the reaction factors and to analyze *Moina* genetic diversity. A 25 μ L solution with genomic DNA 25ng/ μ L, $MgCl_2$ 1.5mmol/L, dNTPs 0.1mmol/L, random primer 0.1 μ mol/L, 1U TaqDNA polymerase would be optimum for the amplification reaction. A high reproducibility was obtained with the optimized experiment conditions. The results of the genetic diversity among *M. Mongolic*, *M. macrocopa* and their salt tolerance population show the similarity of RAPD bands accounted for 0.9134 and 0.9038 in homogeneous *Moina* in different salt condition, but 0.5-0.6 in *M. mongolica* and *M. macrocopa*.

Key words: *Moina*; random amplified polymorphic DNA; conditions optimization; genetic diversity

随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, 简称 RAPD) 是 20 世纪 90 年代初发展起来的一种分子遗传标记技术, 已在水产经济动物种质鉴定、基因定位、遗传作图、亲缘关系和系统进化、遗传多样性等方面得到广泛应用^[1,2]。在枝角类方面, 国外学者于 20 世纪 80 年代就开始利用分子技术研究其分类与演变^[3], Hellsten 和 Sundberg^[4]还应用 RAPD 标记检测了两种象鼻溞 (*Bosmina* sp.) 种群的基因变异, 并对其分类予以鉴定。迄今, 国内尚没有枝角类 RAPD 方面的研究报道。为了将 RAPD 技术应

用于枝角类群体遗传多样性的检测,本文通过不同方法提取蒙古裸腹溞(*Moina mongolica* Daday)和多刺裸腹溞(*M. macrocopa* Straus)的基因组DNA,并进行枝角类RAPD-PCR的反应条件摸索,以期获得一套理想的适用于枝角类等小型个体的反应体系。在此基础上,作者通过RAPD标记的方法在分子水平上检验了长期盐胁迫对两种裸腹溞的遗传影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用多刺裸腹溞由宁波大学附近水塘采得,蒙古裸腹溞系1998年厦门引进种。多刺裸腹溞(D)及其盐胁迫组(D5)和蒙古裸腹溞(M)及其淡水胁迫组(M5)分别在淡水、盐度5、盐度20和盐度5的小球藻(*Chlorella* sp.)培养液中单种培养120d,传代50次以上。提取DNA前分别饥饿48~60h,在显微镜中观察,确保肠道排空,并用筛网收集溞体,双蒸水反复冲洗,去除表面杂质,置于4℃保存备用。

实验用生化试剂均由上海生物工程公司(上海生工)提供。PCR扩增仪为Bio-RAD公司的iCycler扩增仪,拍摄凝胶照片紫外成像系统为复日科技FR-200紫外与可见分析装置。

1.2 DNA提取

DNA的提取参考魏群等^[5]的常规方法。

1.3 RAPD扩增及反应条件优选

RAPD扩增基本反应体系中含有:模板DNA 50ng/ μ L,10 \times buffer 2.5 μ L, MgCl₂ 2.0 mmol/L, dNTPs 0.1 mmol/L, 碱基引物 0.2 μ mol/L, Taq DNA聚合酶 1U, 补加双蒸水至 25 μ L。扩增反应程序:94℃预变性 5min, 94℃变性 30s, 38℃退火 1min, 72℃延伸 2min, 40个循环, 72℃延伸 7min。选用多刺裸腹溞(D)为研究材料。反应体系中各因素的梯度水平设置为:模板DNA浓度为10、25、50、100、200和250ng; Mg²⁺浓度为1.0、1.5、2.0和2.5 mmol/L; Taq DNA酶浓度为0.5、1.0、1.5和2U; dNTPs浓度为0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.8和1.2 mmol/L; 引物浓度为0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.35和0.4 μ mol/L。循环反应体系的优化按单因子梯度设置进行^[6]。凝胶电泳:取10 μ L的PCR扩增产物与2 μ L溴酚蓝(0.25%溴酚蓝, 0.25%二甲苯靛蓝, 40%蔗糖)混匀, 点入含有0.5 μ g/mL溴化乙锭的1.5%琼脂糖凝胶中, 在5V/cm电场强度下电泳2~3h, 取出凝胶, 紫外灯下观察照相。

1.4 遗传多样性分析

按照RAPD反应条件优化的最佳反应体系进行PCR扩增。根据Nei等^[7]相似度分析公式进行相似度(S)分析: $S = 2N_{ab} / (N_a + N_b)$ 。N_a和N_b分别为a、b两个种或种群拥有的RAPD标记数; N_{ab}为a、b种或种群共同拥有的RAPD标记数。任意两个种或种群间的遗传距离(P)根据其相似度计算: $P = 1 - S$ 。

2 结果与分析

2.1 RAPD反应条件比较

2.1.1 模板DNA的浓度

模板浓度直接影响扩增产物的重现性、特异性和产量。模板过量会增加错配的机会,从而非特异性的程度增加。模板不足,扩增出来的DNA序列重现性不好,通常检测不到PCR产物。文献报道不同鱼类RAPD反应的模板浓度各不相同,国外学者在对枝角类RAPD分析时模板浓度也有差异^[4]。由本试验PCR扩增结果(图1)可见,模板DNA加样量为25~250ng的情况下,均能产生RAPD条带,表明RAPD技术对模板DNA浓度的要求不很严格。但是,低浓度时只有清晰的主带,而无弱带,高浓度时有非特异扩增产物出现。建议在溞类的研究中选用25~150ng/ μ L的模板浓度。

2.1.2 Mg^{2+} 浓度

Mg^{2+} 为 Taq DNA 聚合酶的激活剂,其浓度不仅影响酶的活性及合成的可靠性,而且还影响引物与模板的结合效率、模板与 PCR 产物的解链温度以及产物的特异性和引物二聚体的形成。试验结果如图 2 所示, Mg^{2+} 浓度 2.0 和 2.5 mmol/L 的 2 个梯度扩增效果一致,1.0 mmol/L 时缺少一条带,高于 2.0 mmol/L 出现非特异性扩增。由此看出, Mg^{2+} 浓度的较小变动能引起 PCR 产物的较大改变。本试验结果表明,枝角类的研究以 Mg^{2+} 浓度 1.5 mmol/L 比较适宜。

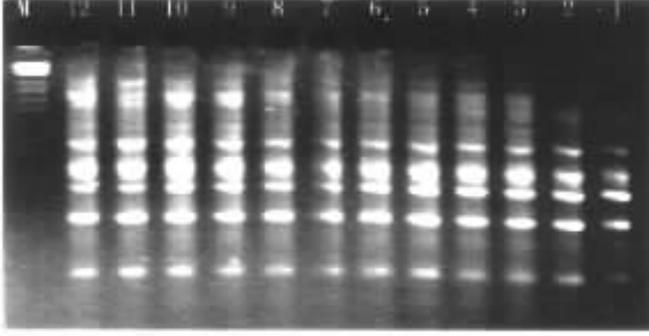


图 1 不同模板浓度的扩增结果(S21)

Fig. 1 Effect of template DNA concentration on amplification pattern(S21)

M 为 λ DNA/EcoRI + HindIII ; 1-2, 3-4, 5-6, 7-8, 9-10, 11-12 分别为 10、25、50、100、200、250 ng/ μ L

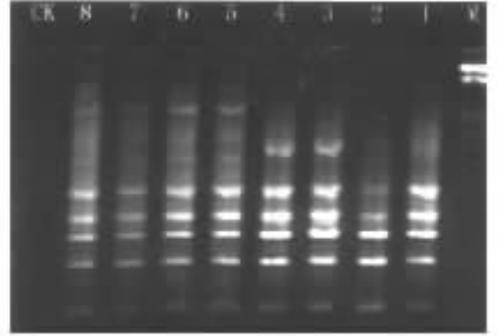


图 2 Mg^{2+} 浓度扩增比较(S21)

Fig. 2 Comparison of Mg^{2+} concentration on amplification pattern(S21)

M 同图 1 ; 1-2, 3-4, 5-6, 7-8 分别为 1、1.5、2、2.5 mmol/L

2.1.3 dNTPs 浓度

作为 PCR 反应的底物,dNTPs 使用的浓度一般在 0.05 ~ 0.4 mmol/L 之间。dNTPs 浓度太高,有可能造成非靶位点启动和延伸时核苷酸的错误掺入,而且还会与 Taq DNA 聚合酶竞争 Mg^{2+} ,抑制聚合酶的活性^[8]。dNTPs 浓度过低,在反应过程中可能被过早耗尽,从而影响扩增产物的产量。图 3 可见,本试验在 dNTPs 浓度 0.05 mmol/L 时扩增条带遗失,浓度为 0.1 ~ 0.4 mmol/L 时扩增条带最为清晰,浓度高于 0.5 mmol/L 时,条带减少,甚至不出带,故综合考虑结果与成本,选择 0.1 mmol/L 比较理想。

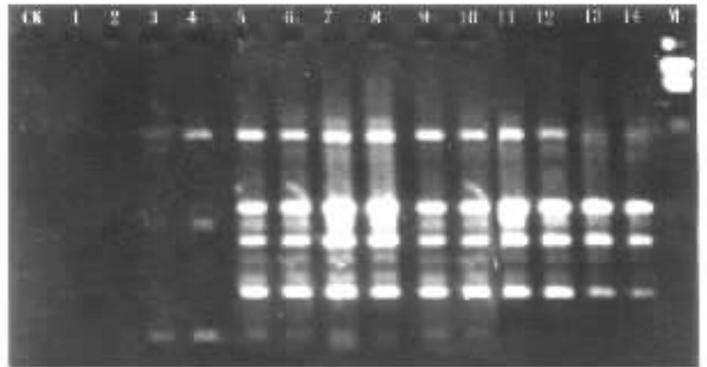


图 3 不同浓度 dNTPs 扩增结果比较(S21)

Fig. 3 Comparison of concentration of dNTPs on amplification pattern(S21)

M 同图 1 ; 1-2, 3-4, 5-6, 7-8, 9-10, 11-12, 13-14 分别为 1.2、0.8、0.5、0.4、0.2、0.1 和 0.05 mmol/L

2.1.4 Taq 酶浓度

由于酶的活性、耐热性不同直接影响扩增结果,TaqDNA 聚合酶的种类及其浓度、甚至同一公司的不同批次都对 PCR 反应有重要影响。在条件合适时,每 100 μ L 体系中一般使用 1 ~ 2.5U 的 TaqDNA 聚合酶^[8]。本试验在 TaqDNA 聚合酶浓度 1 ~ 2U 时,扩增结果条带清晰、稳定性较好,而酶的浓度在 0.5U 时,扩增结果条带弱或减少(图 4)。

2.1.5 引物浓度

引物浓度与特异扩增产物的电泳谱带位置的改变有关。Brund^[9]在研究 RAPD 反应体系中发现,引物的浓度对 RAPD 指纹图谱影响很大。Williams^[10]等认为 RAPD 反应中引物浓度较低时,可能会因扩增产物量少而检测不到,引物浓度较高时,又会产生弥散状的带。本试验共设置 7 个引物浓度,结果显示

引物用量 $0.05\mu\text{mol/L}$ 时,无扩增结果出现或条带非常弱;引物浓度在 0.20 、 $0.30\mu\text{mol/L}$ 时,均可得到丰富、稳定的条带;引物用量超过 $0.40\mu\text{mol/L}$ 时条带增多且不稳定(如图 5)。这是因为引物浓度过低,无法与所有的模板 DNA 结合位点结合,导致扩增结果不理想;引物浓度过高时,会促使引物错误地引导非特异性产物——引物二聚体的合成,非特异性产物和引物二聚体亦均是 PCR 反应的底物,与靶序列竞争 DNA 聚合酶和底物 dNTPs,均使靶序列的扩增量降低,而出现非特异条带。因此,综合考虑实验费用和效果,引物浓度应以 $0.1\mu\text{mol/L}$ 为宜。

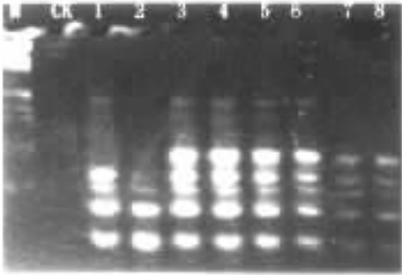


图 4 Taq 酶浓度对扩增结果的影响(S21)
Fig.4 Effect of Taq polymerase concentration on amplification pattern(S21)
M 同图 1, 1-2、3-4、5-6、7-8 分别为 0.5、1.0、1.5 和 2.0U

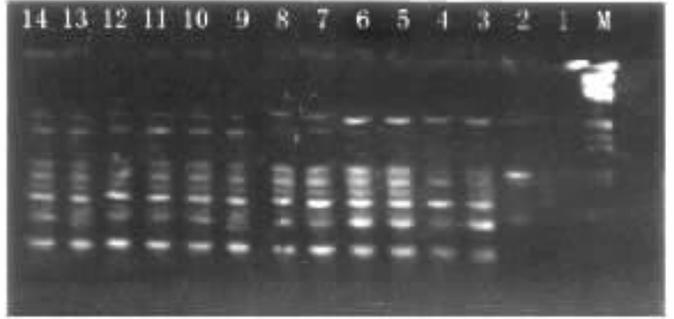


图 5 不同引物浓度的扩增结果(S21)
Fig.5 Result of random primer concentration on amplification pattern(S21)
M 同图 1, 1-2、3-4、5-6、7-8、9-10、11-12、13-14 分别为 0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 $\mu\text{mmol/L}$

2.2 枝角类的遗传多样性分析

2.2.1 2 种裸腹蚤及其盐胁迫种群的 RAPD 分析

实验采用 21 个引物(S16、S18、S22、S23、S24、S25、S26、S27、S28、S29、S30、S32、S33、S34、S35、S36、S37、S38、S39、S40、S54)对 2 种裸腹蚤及其长期盐胁迫组个体分别进行 RAPD 扩增。结果表明,所获得的带谱中,显示出枝角类同种个体间所共有的带型,也就是种的特异性带,同时也显示出不同种之间的特异性带和因盐胁迫影响而出现的种内特异性带。从带型分析可以明显区别出淡水种多刺裸腹蚤和海水种蒙古裸腹蚤,但尚未发现能够区别长期盐胁迫对种群遗传产生变异的带。以 OPA-39 引物的 RAPD 结果为例(图 6、图 7):多刺裸腹蚤(D、D5)和蒙古裸腹蚤(M、M5)4 个种群都具有一条 0.8kb 的带,D 和 D5 分别具有 2.2kb、1.1kb 两条强带和 3 条弱带,M 和 M5 除具有 4 个群体公共的带外还具有 2 条弱带,表明枝角类同一种群内部的不同个体同样存在差异。

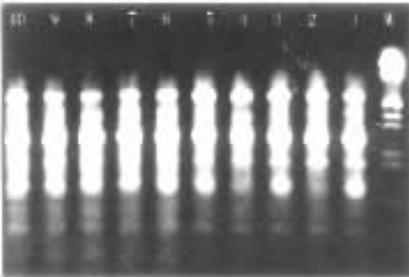


图 6 D 和 D5 种群 RAPD 产物电泳图谱(S39)
Fig.6 Electrophoresis of RAPD products on D and D5 population(S39)
M 同图 1; 1-5 为 D 群体的 RAPD 电泳图谱; 6-10 为 D5 群体的 RAPD 电泳图谱

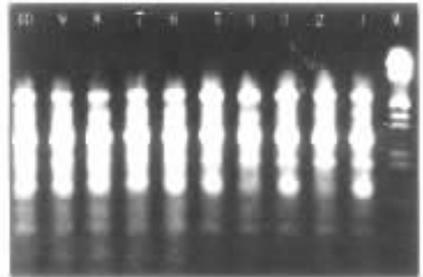


图 7 M 和 M5 种群 RAPD 产物电泳图谱(S39)
Fig.7 Electrophoresis of RAPD products on M and M5 populations(S39)
M 同图 1; 1-5 为 M 群体的 RAPD 电泳图谱; 6-10 为 M5 群体的 RAPD 电泳图谱

2.2.2 2 种裸腹蚤及其盐胁迫种群的遗传相似度和变异度

根据 PCR 扩增的结果,比较枝角类种群内不同个体和不同种群的 RAPD 电泳图谱,统计个体各自拥有的 RAPD 带总数和不同个体和群体间共同拥有的 RAPD 带数,按 Nei(1979)公式计算出 2 种裸腹蚤及其盐胁迫种群之间的遗传相似度和变异度见表 1。

表 1 枝角类种群间的遗传相似度和变异度

Tab.1 Pairwise genetic similarities(S) and variabilities of the populations of Cladocera

种类	D	D5	M	M5
D	* * * *	0.9134	0.5304	0.6017
D5	0.0906	* * * *	0.5131	0.5896
M	0.6342	0.6673	* * * *	0.9038
M5	0.5080	0.5283	0.1011	* * * *

注:Nei's genetic identity(above diagonal) and genetic distance(below diagonal)

表 1 可见,同种裸腹蚤与其盐胁迫种群之间遗传相似度很高,分别为 0.9134 和 0.9038,不存在明显的变异,变异程度近为 10%左右。2 种裸腹蚤之间的遗传相似性较低,大约保持在 50%~60%,平均相似度为 0.5587。

3 结论

实验结果表明,枝角类 RAPD 扩增反应的优化体系为:在 25 μ L 体积中,模板 DNA 25 ng/ μ L,dNTPs 0.1 mmol/L,TaqDNA 聚合酶 1U,引物 0.1 μ mol/L, Mg^{2+} 1.5mmol/L,10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L。经过不同引物实验表明,该扩增体系基本都能得到比较理想的扩增图谱。

用 RAPD 等分子标记方法检测耐盐植物基因组结构差异已有一些报道^[11],从耐盐突变体中检出特异的 DNA 谱带已屡见不鲜,而在盐胁迫动物体中检出特异 DNA 带却至今尚未见报道。通过对枝角类随机扩增 DNA 多态片段的分析表明,实验选用的 2 种枝角类之间存在明显的遗传距离,但同种枝角类不同生存盐度之间的种群遗传相似度都高于 0.9,并未检测到特异性带。这可能由于 2 种枝角类受盐胁迫时间较短,还不足以引起其基因组结构的明显差异。目前,作者正试图进一步延长枝角类盐胁迫培养时间,增加传代次数,同时,扩大引物的数量,应用 RAPD 和 AFLP 等多种方法检测鉴定盐胁迫枝角类基因组 DNA 的结构差异和特异性 DNA 带,以期进一步探明长期盐胁迫对枝角类的遗传生物学效应。

参考文献:

- [1] Bielawski J P. Randomly amplified polymorphic DNA(RAPD) analysis of Atlantic coast striped bass[J]. Heredity, 1997, 78(1): 32-40.
- [2] 夏德全,曹莹,吴婷婷,等.用 RAPD 分析对罗非鱼遗传变异的研究及其对杂种优势的应用[J].水产学报,1999,23(1): 27-31.
- [3] Lieder U. Introgression as a factor in the evolution of polytypical plankton Cladocera[J]. Int Rev Ges, Hydrobiologia, 1983, 68: 269-284.
- [4] Hellsten M E, Sundberg P. Genetic variation in two sympatric European populations of *Bosmina* spp. (Cladocera) tested with RAPD markers[J]. Hydrobiologia, 2000, 421: 157-164.
- [5] 魏群,崔丽华,杨淑杰,等.分子生物学实验指导[M].北京:高等教育出版社,1999. 66-68.
- [6] 孙易,宋文芹,钟贻诚,等.用 RAPD 和 AFLP 的方法对中国卤虫(*Artemia*)种及亲缘关系的研究[J].遗传学报,2000,27(3): 210-218.
- [7] Nei M, Li W H. Mathematical mode for studing genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76(10): 5269-5273.
- [8] W. 迪芬巴赫, G S 德维克斯勒. PCR 技术实验指南[M].北京:科学出版社,2000. 10-52.
- [9] Burno W S. High output genetic mapping of polyploids using PCR-generated markers[J]. Theor Appl Genet, 1993, 86: 105-112.
- [10] Williams J G K, Hanafey M K, Rafalski J A, et al. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers[J]. Methods Enzymol, 1993, 218: 705-740.
- [11] 丁海媛,张耕耘,郭岩,等.运用 RAPD 分析标记水稻耐盐突变系的耐盐主效基因[J].科学通报,1998,43(4): 418-421.