

文章编号: 1004-7271(2006)04-0414-05

## 柏氏鲤与荷包红鲤抗寒品系 杂交子二代的 RAPD 分析

高俊生<sup>1,2</sup>, 孙效文<sup>1</sup>, 梁利群<sup>1</sup>

(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. 大连水产学院生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023)

**摘 要** 采用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 分子标记技术, 对荷包红鲤抗寒品系与柏氏鲤进行杂交所获得的 F<sub>2</sub> 代个体进行亲子鉴定分析。从 180 个随机引物中筛选出 5 个多态性较丰富的引物, 并对其产生的多态性 DNA 片段进行统计分析。结果显示, 双亲的 RAPD 谱带全部在 F<sub>2</sub> 代中表现出来, 而子代中产生的所有谱带在双亲中的表现率在 AB02、AB05、AC20、A110、A113 几个引物中分别为 87.0%、100.0%、92.1%、82.8%、92.6%。这也表明 RAPD 技术在对鲤的亲子鉴定中具有很强的可行性。

**关键词** 荷包红鲤抗寒品系; 柏氏鲤; 随机扩增多态性 DNA; 亲子鉴定

中图分类号 S 917; S 961.6 文献标识码: A

## RAPD analysis of second filial generation derived from boshi carp and frigid-resistance strain of red purse carp

GAO Jun-sheng<sup>1,2</sup>, SUN Xiao-wen<sup>1</sup>, LIANG Li-qun<sup>1</sup>

(1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;  
2. Life Science and Technology College, Dalian Fisheries College, Dalian 116023, China)

**Abstract:** Parentage identification of the second filial generation, which derived from Boshi carp and frigid-resistance strain of red purse carp, was carried out with RAPD techniques. Totally 5 out of 180 RAPD primer with fine polymorphisms were screened to represent high polymorphisms. Statistical analysis of the polymorphisms showed that the RAPD bands in parents were totally found in their offspring. The bands of filial generations appeared 87.0%, 100.0%, 92.1%, 82.8% and 92.6% in parents from primers AB02, AB05, AC20, A110 and A113, respectively. It indicates that it is feasible to identify parents of the common carp with RAPD techniques.

**Key words:** frigid-resistance strain of red purse carp; boshi carp; random amplified polymorphic DNA (RAPD); parentage identification

从二十世纪 40 年代至今, 传统的杂交育种技术在鱼类遗传改良上不断取得令人瞩目的成就, 通过这种品种间优良性状的转移先后培育出许多优良的鱼类养殖新品种, 如前苏联的库尔斯克鲤、鳞鲤

收稿日期: 2005-08-18

基金项目: 国家重大基础研究项目(2004CB117405)

作者简介: 高俊生(1979-), 男, 河北石家庄人, 硕士研究生, 专业方向为水产动物遗传育种。Tel: 0451-84842646, E-mail: gaojunsheng

1979@163.com

通讯作者: 孙效文, Tel: 0451-84842646, E-mail: sunxw2002@163.com

等<sup>[1]</sup>我国的建鲤 (*Cyprinus carpio* var. Jian) 和荷包红鲤抗寒品系 (*Cyprinus carpio* var. wananensis) 以及荷元鲤、颖鲤、丰鲤等杂交鲤<sup>[2]</sup> 将其应用于生产后都取得了显著的经济效益。荷包红鲤抗寒品系就是这种通过杂交获得成功的典范<sup>[3]</sup>。由于其抗低温能力较强, 具备进行抗寒研究的优异的亲本种质条件, 所以本实验室自 1996 年以来就将其引入进行抗寒育种研究的实验鱼体系。

鉴于荷包红鲤抗寒品系种质的特异性, 本实验室将柏氏鲤 (*Cyprinus pellegrini pellegrini* Tchang) 和荷包红鲤抗寒品系进行杂交, 经过数年培育之后获得其杂交子二代。为了验证 F<sub>2</sub> 代的种质来源, 特在 F<sub>2</sub> 代中筛选出杂交优势较强, 并且在形态上与父母本较为相似的个体, 采用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 分子标记技术进行分析, 探讨了随机扩增多态 DNA 片段在亲本以及 F<sub>2</sub> 代个体中的分布, 旨在为鲤杂交育种后代的早期选择提供新的方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验鱼材料

所用实验鱼为本实验室构建的适于鱼类抗寒研究的实验鱼体系。分别为荷包红鲤抗寒品系、柏氏鲤以及荷包红鲤抗寒品系(父本)和柏氏鲤(母本)的杂交 F<sub>2</sub>。由于荷包红鲤抗寒品系是由荷包红鲤和黑龙江野鲤 (*Cyprinus carpio haematopterus* Temminck et Schlegel) 杂交得到的, 所以本实验也将荷包红鲤和黑龙江野鲤作为对照一起进行研究。F<sub>2</sub> 经过了越冬实验, 作者在研究时将 F<sub>2</sub> 代分为越冬存活个体和越冬死亡个体两类。

#### 1.1.2 主要的试剂及实验仪器

本实验所用随机引物来自北京赛百盛公司, 生化试剂购自美国 Promega 公司, 其他试剂为国产分析纯。RAPD-PCR 反应在美国 PE 公司生产的 9700 上进行。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 基因组 DNA 的提取

参照《分子克隆实验指南》<sup>[4]</sup> 进行基因组 DNA 的提取。用消毒的剪刀将实验鱼的鳍条组织剪碎放入 1.5 mL 的离心管, 然后将样品溶入 300  $\mu$ L 的裂解液中 [成分: 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0), 200  $\mu$ g/mL Proteinase K, 0.5% SDS], 然后在 50  $^{\circ}$ C 的培养箱中消化过夜, 在此期间要来回转动离心管数次。充分消化后加等体积的酚抽提两次 (为了避免 DNA 断裂, 每次缓慢转动离心管 10 min) 4  $^{\circ}$ C 7 500 转离心分相, 吸出含 DNA 的水相, 用等体积的酚/氯仿 (酚: 氯仿: 异戊醇为 25:24:1) 再抽提一次, 将上清转入透析袋中, 放入一定量的透析液 [成分: 50 mmol/L Tris-Cl (pH 8.0), 10 mmol/L EDTA, 10 mmol/L NaCl] 中进行数次透析, 直到 OD<sub>270</sub> < 0.05, 将透析袋中的液体转入离心管中, 加入无 DNA 的 RNA 酶, 终浓度为 100  $\mu$ g/mL, 37  $^{\circ}$ C 温浴 30 min, 最后用冰预冷的无水乙醇沉淀, 70% 乙醇洗涤 2~3 次, 室温干燥后加 TE 溶解并保存在 4  $^{\circ}$ C 备用。

#### 1.2.2 PCR 扩增及电泳检测

PCR 扩增反应的总体积为 25  $\mu$ L, 其中包括 10  $\times$  RAPD 反应缓冲液 2.5  $\mu$ L [成分: 100 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L KCl, 15 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.01% (W/V) Gelatin, 0.05% Triton X-100]; dNTP (2.5 mmol/L) 1  $\mu$ L; 基因组 DNA 1  $\mu$ L (50 ng/ $\mu$ L); Taq 酶 1.5 U (5 U/ $\mu$ L)。

样品在 94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min 后, 93  $^{\circ}$ C 1 min, -36  $^{\circ}$ C 1 min, -72  $^{\circ}$ C 2 min, 45 个循环, 最后在 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 扩增产物在 1.4% 琼脂糖上电泳分离, GDS8000 凝胶成像仪观察后, 采集和处理信息。

## 2 结果

### 2.1 RAPD-PCR 扩增结果

从北京赛百盛公司提供的 180 个 10 个碱基的随机引物中筛选出 5 个重复性好、多态性丰富的引物 (AB02、AB05、AC20、AI10、AI13) 对荷包红鲤抗寒品系(父本)、柏氏鲤(母本)和二者的杂交  $F_2$  代个体以及作为对照的荷包红鲤和黑龙江野鲤进行 RAPD-PCR 扩增,其中每一次实验都进行了三次重复,均能得到较为稳定并且一致的结果,其中 AB05、AC20 两个引物的电泳图谱如下(图 1、图 2)。

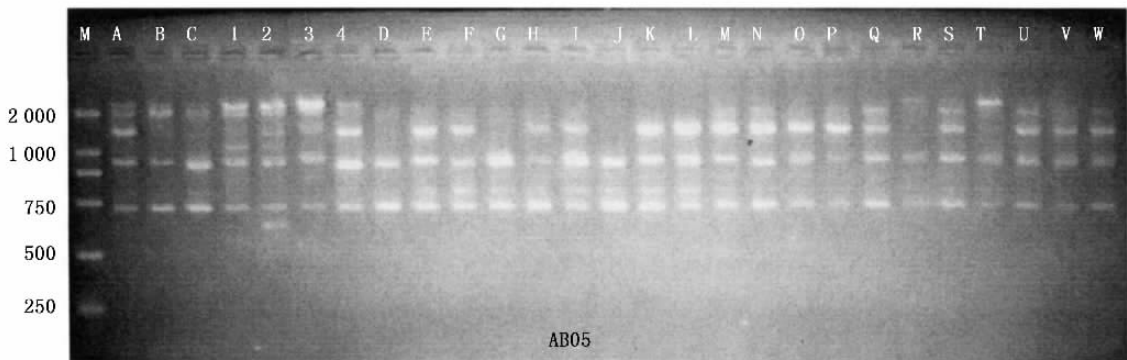


图 1 引物 AB05 对  $F_2$  代个体基因组 DNA 的扩增结果

Fig. 1 Amplified results in  $F_2$  genomic DNA by primer AB05

M: DNA 分子量标准 DL2000 ; 1 野鲤 2 荷包红鲤抗寒品系(父本) ; 3 荷包红鲤 ; 4 柏氏鲤(母本); A-C: 越冬存活  $F_2$  代个体的 DNA ; D-W: 越冬死亡  $F_2$  代个体的 DNA

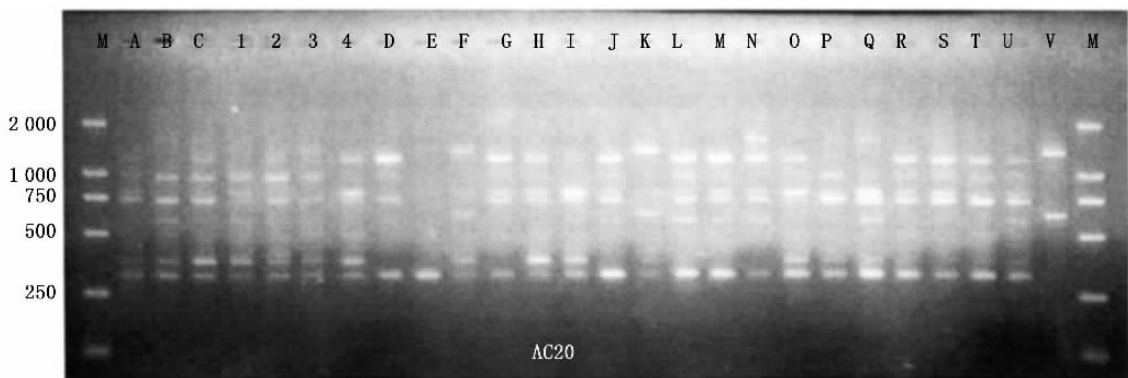


图 2 引物 AC20 对  $F_2$  代个体基因组 DNA 的扩增结果

Fig. 2 Amplified results in  $F_2$  genomic DNA by primer AC20

M: DNA 分子量标准 DL2000 ; 1 野鲤 2 荷包红鲤抗寒品系(父本) ; 3 荷包红鲤 ; 4 柏氏鲤(母本); A-C: 越冬存活  $F_2$  代个体的 DNA ; D-V: 越冬死亡  $F_2$  代个体的 DNA

### 2.2 统计结果

根据 PCR 扩增后所得到的电泳图谱,分别对 AB02、AB05、AC20、AI10、AI13 等 5 个引物获得的谱带进行统计,统计结果如表 1 所示。

表 1 杂交 F<sub>2</sub> 代 PCR 扩增带数与来源Tab.1 Amount of bands of F<sub>2</sub> and their origin by PCR

引物	碱基序列 5'→3'	个体数 (个)	D	DI(♀♂, ♀+♂)	P(DI/D)
AB02	GGAAACCCCT	24	92	80(10,16,54)	87.0%
AB05	CCCGAAGCGA	23	95	95(12,0,83)	100.0%
AC20	ACGGAAGTGG	22	113	104(12,18,74)	92.1%
AI10	TCGGGGCATC	24	151	125(17,0,108)	82.8%
AI13	ACGCTGCGAC	24	162	150(11,0,139)	92.6%

D: F<sub>2</sub> 出现的总谱带数; DI: F<sub>2</sub> 出现的可以在双亲中检测出来的总带数; P: F<sub>2</sub> 出现的可以在双亲中检测出的总带数占 F<sub>2</sub> 出现的总带数的百分率; ♀: 只在母本中检测出的谱带数; ♂: 只在父本中检测出的谱带数; ♀+♂: 在父母本中共同检测出的谱带数

引物 AB02 分析了 24 个子代, 在子代中共扩增出 92 条谱带, 每个子代平均扩增出 3.75 条。其中, 子代产生的 54 条谱带可以共同在两个亲本中检测出来, 占谱带总数的 60.0%。10 个个体在 1 500 bp 处产生一条仅在母本中检测到的谱带, 16 个个体在 850 bp 处产生一条仅在父本中检测到的谱带, 分别占到总谱带的 10.8% 和 17.4%。另外, 12 个个体在 400 bp 处产生了一条特异带, 未在双亲中检测出来, 占总谱带的 13.0%。

引物 AB05 分析了 23 个子代, 共扩增出 95 条谱带, 平均每个子代产生 4.13 条。其中, 子代产生了 83 条带谱可以共同在两个亲本中检测出来, 占到总谱带的 87.4%。12 个个体在 550 bp 处产生一条带谱仅在母本中检测出来, 占总谱带的 12.6%。另外, 在分析电泳图谱时没有发现特异带。

引物 AC20 分析了 22 个个体, 共扩增出 113 条谱带, 平均每个子代产生 5.14 条。其中, 有 74 条谱带可以共同在两个亲本中检测出来, 占总带数的 65.5%。4 个个体在 1 300 bp 处产生的一条带谱, 14 个个体在 1 000 bp 处产生的一条只在父本中检测出的谱带, 占总带数的 15.9%。12 个个体在 750 bp 处产生的一条只在母本中检测出的谱带, 占总带数的 10.6%。另外, 2 个个体在 180 bp 处、2 个个体在 650 bp 处、5 个个体在 600 bp 处分别产生了一条未在双亲中检测出来的谱带, 占总谱带的 7.7%。

引物 AI10 分析了 24 个子代, 共扩增出 151 条谱带, 平均每个子代产生 6.29 条。其中, 有 108 条谱带可以共同在两个亲本中检测出来, 占总带数的 71.5%。17 个个体在 650 bp 处产生了一条仅在母本中检测出的谱带, 占总带数的 11.2%。另外, 14 个个体在 1 200 bp 处、12 个个体在 500 bp 处产生了一条未在双亲中检测出的谱带, 占总带数的 17.2%。

引物 AI13 分析了 24 个个体, 共扩增出了 162 条带谱, 平均每个子代产生 6.75 条。其中, 139 条可以共同在两个亲本中检测出来, 占总带数的 85.8%。11 个个体在 230 bp 处产生了一条仅在母本中检测出来谱带, 为总带数的 6.7%。12 个个体在 2 000 bp 处产生的一条未在双亲中检测出的谱带, 占总带数的 7.4%。

### 3 讨论

#### 3.1 存在的问题

在研究过程中我们发现 F<sub>2</sub> 代个体不但可以表现出双亲的带型, 而且还出现了一些在双亲中没有出现的特异带型, 这除了是由于杂交过程中由于基因突变、基因易位等因素造成的基因组 DNA 碱基顺序的变化以外, 更由于 F<sub>2</sub> 代的亲本荷包红鲤抗寒品系是一个杂合体, 其杂交后代势必更容易出现基因组结合上的差异<sup>[5]</sup>。另外, 对在实验过程中发现的一些难于准确统计的弱带, 通常从三个方面来克服, 首先, 操作要精到熟练, 出现问题要进行重复实验予以检验; 其次, 对引物要进行筛选, 排除因弱带引起估算误差的引物; 再者, 可以设计实验进行判别, 即将 F<sub>2</sub> 中亲本没有的特异谱带克隆, 作为探针, 然后与父母本 DNA 进行 Southern 杂交, 以阳性杂交结果作为 F<sub>2</sub> 确实来自该亲本的依据。

### 3.2 RAPD 分子标记技术在鲤鱼亲子鉴定中应用的可行性

从本实验所采用的荷包红鲤抗寒品系(父本)、柏氏鲤(母本)和二者的杂交子二代的 RAPD 标记结果来看,双亲的谱带全部在  $F_2$  代中检测出来,其杂交  $F_2$  代中所产生的谱带在其亲本中也具有很高的再现性(表现率分别达到 87.0%、100.0%、92.1%、82.8%、92.6%)。其中,还有一些子代产生的谱带仅在父本或是母本中出现,而作为对照的野鲤和荷包红鲤中并没有出现,如 AB02 引物在 850 bp 处检测到的一条谱带(荷包红鲤抗寒品系特有)、A113 在 300 bp 处检测到的一条谱带(柏氏鲤特有)。如果再检测其他几种鲤(镜鲤、建鲤等)后仍发现都不具有此标记,就有可能将此标记定义为荷包红鲤抗寒品系或是柏氏鲤的特异性分子标记。寻找到一定量的这种特异性的分子标记后,就可以通过单方面对子代进行的 RAPD 分析确定其父母本。以上都表明 RAPD 分子标记技术在鲤的亲子鉴定中具有很强的可行性,可以为以后鲤的品种鉴定、种质鉴定和亲子鉴定提供一种有效的分析方法。由于 RAPD 分析一方面可以筛选出与目标基因连锁的 DNA 片段,另一方面也可利用与目标基因紧密连锁的分子标记追踪目标基因,这样可以对杂交后代群体进行早期定向选择。应用此技术我们可以在进行荷包红鲤抗寒品系与柏氏鲤杂交子二代早期亲子鉴定的同时将抗寒与不抗寒的个体区分开来,就无须再通过越冬实验来区分这些个体,这将会大大提高育种效率,缩短育种周期。

另外,引物 AB05 分别在 2 000 bp 处和 1 500 bp 处产生的一条谱带(图 1)、引物 AC20 分别在 1 300 bp 处和 1 000 bp 处产生的一条谱带(图 2)都表现出一定的特殊性。可以看到它们在越冬存活和越冬死亡个体的出现率上存在很大差异,如 AB05 在 2 000 bp 处产生的一条谱带在 3 个越冬存活的个体中均出现,而在 20 个越冬死亡的个体中仅出现了 2 次。从亲本谱带在抗寒和非抗寒后代中的遗传分离情况来看,这些片段有可能与鲤的抗寒性状相关。如果我们能够证实这些片段是能够体现出耐寒差异的遗传标记,就可能克隆与鱼类耐寒相关的基因,将其用于一些不耐寒鱼类的遗传改良研究。

#### 参考文献:

- [1] 李骏珉. 鱼类遗传与育种学[M]. 北京:中国林业出版社,1988.214-215.
- [2] 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.
- [3] 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[R]. 黑龙江水产研究所研究报告,1988,26:12-17.
- [4] 黄培堂(译). 分子克隆实验指南(第3版)[M]. 北京:科学出版社,2002.
- [5] Hemmat M, Weeden N F, Manganaris A G, et al. Molecular marker linkage map for apple[J]. J Heredity, 1994, 85:4-11.