

条纹斑竹鲨基因组的 RAPD 分析初报

吴冰^① 陈元霖 桂慕燕

(福建省厦门大学细胞生物研究室, 厦门 361005)

摘要 采用 11 种随机引物对 4 条条纹斑竹鲨基因组进行了 RAPD 检测。结果表明, 11 种引物在每条个体上扩增的 DNA 片段总数在 77~84 之间, 单个随机引物扩增的 DNA 片段数目由 1 至 11 条不等, 平均为 7.5 条 DNA 片段, 片段的大小在 300~2 800bp 之间。个体之间的相似率在 90% 以上。

关键词 条纹斑竹鲨, 基因组 DNA, RAPD 分析

中图分类号 Q953, Q523

Preliminary Report on the Genome RAPD Analysis of the *Chiloscyllium Plagiosum*

WU Bing CHEN Yuan-Lin GUI Mu-Yan

(Laboratory of Cell Biology, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstracts 4 individuals of *Chiloscyllium plagiosum* were analyzed by RAPD method using 11 arbitrary primers. For the 11 arbitrary primers, each individual showed 77~84 bands corresponding to amplified products. Each primer gave 1~11 bands for each individual. On average, about 7.5 bands were obtained per primer per individual. The length of the fragment is 300~2 800 bp. The similarity between band profiles of the four individuals was over 90%.

Key words *Chiloscyllium plagiosum*, Genome, RAPD

DNA 分子的多态性分析是进行基因组研究的基础。1990 年, 两个实验室几乎同时建立了运用随机引物扩增寻找多态性 DNA 片段作为分子标记的方法, 即 RAPD(Random amplified polymorphic DNA, 随机扩增多态性 DNA)。RAPD 技术是在 PCR 技术的基础上建立起来的, 它是通过利用单一的随机合成的 10 碱基寡聚核苷酸作为引物, 对基因组进行 PCR 扩增, 这些扩增产物 DNA 片段的多态性, 反映了基因组相应区域的 DNA 多态性。由于 RAPD 技术可应用于无任何分子生物学研究基础的物种, 方法简单、快捷, 已在动植物育种、种群遗传学及生物多样性等研究中得到了广泛应用^[1,2]。

条纹斑竹鲨(*Chiloscyllium plagiosum*) 在鱼类分类学中属软骨鱼纲, 是厦门地区常见的一种海洋低等经济鱼类, 有科学研究和食用价值。本文应用 RAPD 技术对条纹斑竹鲨的遗传多样性进行了初步研究。

1 材料与 方法

1.1 基因组 DNA 提取和纯化

条纹斑竹鲨购自厦门市农贸市场。剖取鲜活条纹斑竹鲨的肝脏, 置玻璃匀浆器中, 加缓冲液(100mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 500mmol/L NaCl, 5mmol/L EDTA, 1.25% SDS)洗涤、剪碎、匀浆, 随后进行氯仿: 异戊醇抽提和乙醇沉淀, 经 RNA 酶和蛋白酶 K 常规消化处理后, 再用酚: 氯仿: 异戊醇抽提进行纯化, 乙醇沉淀、洗涤, 干燥后加 TE(1mmol/L EDTA, 10mmol/L Tris-HCl, pH8.0) 溶解, -20℃ 冰箱贮存备用。

^① 吴冰, 女, 29 岁, 硕士, 专业方向为细胞生物学; 现工作单位: 暨南大学“211 工程”办公室, 广州 510632。

1.2 RAPD 检测

RAPD 扩增引物为美国 Operon 公司产品, 引物的编号及其序列如表 1。Taq 酶及 dNTP 为华美生物工程公司产品。PCR 扩增仪为 Perkin Elmer Cetus 公司产品, 型号为 PE480。

表 1 RAPD 扩增引物编号及序列

引物编号	序列(5'~3')	引物编号	序列(5'~3')
OPI-01	ACCTGGACAC	OPW-15	ACACCGGAAC
OPI-04	CCGCTAGTC	OPW-16	CAGCTACCA
OPI-05	TGTTCCACGG	OPW-17	GTCCTGGGTT
OPI-06	AAGCGGCAG	OPW-18	TTCAGGGCAC
OPI-07	7CAGCGACAAG	OPW-19	CAAAGCGCTC
OPI-08	TTTGCCGGT		

参照 Williams 等方法^[3], RAPD 反应体系(25 μ l)中含 1u Taq 酶, 2.5 μ l 10 \times 缓冲液, 1 μ l(2.5mM) dNTP, 1 μ l(约 5P mol)引物, 1 μ l(约 25ng)基因组 DNA, 加纯水至 25 μ l, 石蜡油覆盖。反应扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 5s, 36 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 共 40 个循环, 最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。

扩增产物用 1.4% 琼脂糖凝胶电泳, 经溴化乙啶(EB)染色, 紫外光下观察, 拍照。

1.3 相似率(similarity)分析

根据 Nei 等人的相似率分析公式进行数据分析^[4]。相似率 = $2Nab / (Na + Nb) \times 100\%$, 其中 Nab 为个体 a 和 b 之间共有的 DNA 扩增片段数目, Na 为个体 a 具有的 DNA 扩增片段数目, Nb 为个体 b 具有的 DNA 扩增片段数目。

2 结 果 和 讨 论

条纹斑竹鲨在鱼类分类学中属软骨鱼纲、须鲨目、须鲨科、斑竹鲨属, 为厦门地区常见的小型鲨鱼。我们采用了 11 种 RAPD 随机引物检测了 4 条鱼的基因组 DNA, 每个个体扩增出 77 ~ 84 条可分辨的 DNA 片段。一种引物可扩增出的 DNA 片段数目多者有 11 条(OPW-17 和 OPW-19), 少则只有 1 条(OPW-15), 平均为 7.5 条(见表 2 和图版 I)。扩增片段的大小在 300 ~ 2800bp 之间。相似率分析表明, 不同个体之间的相似率极为相近(见表 2)。由此提示, 分布在厦门近海的条纹斑竹鲨的种群可能是比较单一的。

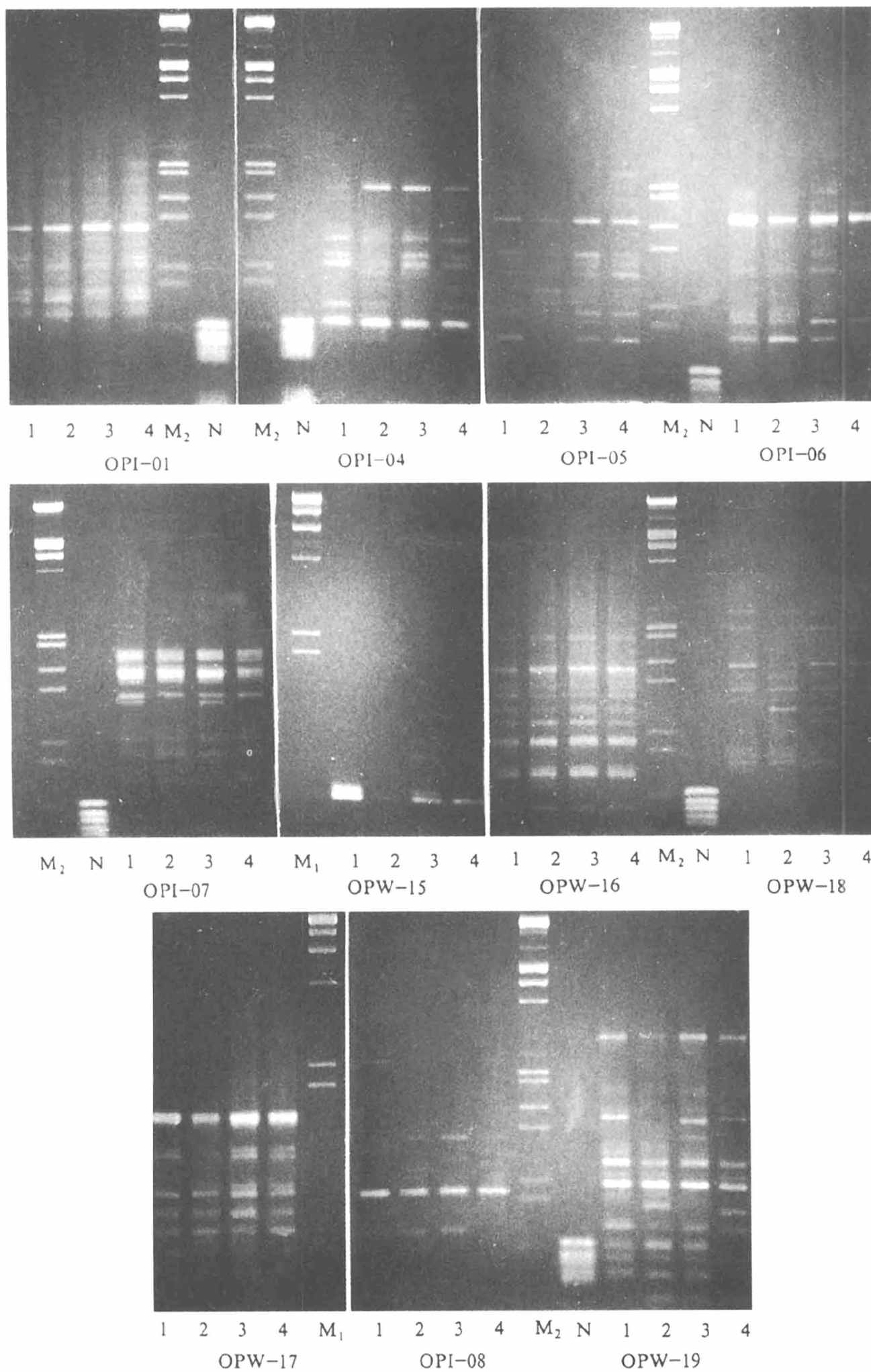
表 2 条纹斑竹鲨基因组 DNA RAPD 扩增片段数及相似率

个 体	DNA 片段 总 数	共有片段数			相似率(%)		
		CP ₂	CP ₃	CP ₄	CPT ₂	CP ₃	CP ₄
CP ₁	77	72	74	73	91.1	91.9	91.8
CP ₂	81	-	76	74	-	92.1	90.8
CP ₃	84	-	-	78	-	-	92.8
CP ₄	82	-	-	-	-	-	-

参 考 文 献

- 1 惠东威等. RAPD 技术及其应用. 生物工程进展, 1992, 12 (6): 1~5
- 2 严华军等. DNA 分子标记技术及其在植物遗传多样性研究中的应用. 生命科学, 1996, 8(3): 32~36
- 3 Williams T G K *et al.* DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers and useful genetic markers. Nucl. Acids Res., 1990, 18(22): 6531~6535
- 4 Nei M *et al.* Mathematical model for studying genetical Variation interms of restriction endonucleases. Proc. Natl., Acad. Sci. USA, 1979, 74: 5267~5273

1997-05-19 收稿, 1998-04-10 修回.



条纹斑竹鲨 4 条个体基因组 DNA RAPD 扩增电泳图

1~4. 4 条不同个体; M₁. λDNA / HindIII; M₂. λDNA / HindIII + EcoRI; N. pBR322 DNA / HaeIII.