

# 马氏珠母贝与解氏珠母贝的随机扩增多态 DNA分析\*

## Comparative Analysis on Random Amplified Polymorphic DNA between *Pinctada martensii* (Dunker) and *P. chemmitri* Philippi

阎冰 叶力 邓凤娇\*\* 毛勇  
Yan Bing Ye Li Deng Fengjiao Mao Yong  
张锡元\*\* 王爱民  
Zhang Xiyuan Wang Aimin

(广西海洋研究所 北海市长青东路92号 536000)

(Guangxi Institute of Oceanography, 92 East Changqinglu, Beihai, Guangxi, 536000)

**摘要** 用 OPM 组 20种碱基随机引物对采自海南洋浦的马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*) 和解氏珠母贝 (*P. chemmitri*) 天然群体进行 RAPD 分析, 其中 6种引物扩增有效。这 6种引物对马氏珠母贝和解氏珠母贝的总扩增带数分别为 52条和 58条。每一引物的扩增带数为 3~ 16条, 同一引物对两种贝类的扩增带数不同 (OPM 19除外), 对两贝类的扩增带型也有较大差异。群体内的各个个体 (实验个体为 10个) RAPD 扩增带谱全部呈多态, 表明在同一群体中, 各个体存在着明显的个体特征带。由于样品数量及引物数均少, 种贝类各自种群的共同特征尚未能确定。

**关键词** 马氏珠母贝 解氏珠母贝 RAPD 分析 遗传多样性

中图法分类号 Q173. S968. 316. 1

**Abstract** The 20 random primers of Group M made in Operon Company were applied to the random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis on natural individuals of *Pinctada martensii* (Dunker) and *P. chemmitri* Philippi from Yangpu Harbor, Hainan Province, southern China. Fifty-two and fifty-eight bands were amplified successfully by six of 20 primers to *P. martensii* and *P. chemmitri* respectively. Each primer amplified three to sixteen bands. The number of bands amplified by the same primer (except for OPM 19 primer) is different in the two species, and their type of bands is clearly different. All bands from individuals (ten individuals in the trial) of a species are diverse. It is suggested that each individual in different species has its own special bands. The species-characteristic could not be determined owing to less samples and primers.

**Key words** *Pinctada martensii* (Dunker), *P. chemmitri* Philippi, random amplified polymorphic DNA (RAPD), genetic diversity

DNA 分子的多态性分析是进行基因组研究的基础。1990年 Williams 等建立了随机扩增多态 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 技

术<sup>[1,2]</sup>。因为 RAPD 技术操作简单, 能够快速提供许多个体或基因型多个位点 DNA 序列的基础性数据, 所以, RAPD 在动植物育种、种群遗传学及生物多样性的研究中得到广泛应用<sup>[3-5]</sup>。

马氏珠母贝 (也称合浦珠母贝 *Pinctada martensii* Dunker) 与解氏珠母贝 (也称长耳珠母贝 *Pinctada chemmitri* Philippi) 都属珍珠贝科 (Preiidae) 珍珠贝属 (*Pinctada*), 北部湾海域和海南沿海是这两种贝类分布的主要区域。马氏珠母贝是我国生产海水珍珠

2001-02-14收稿, 2001-07-26修回。

\* 国家自然科学基金 (39760062) 和广西自然科学基金匹配基金 (9824009) 资助项目。

\*\* 武汉大学生命科学院, 湖北武汉武昌, 430072 (College of Life Science, Wuhan University, Wuchang, Wuhan, Hubei, 430072)。

的主要贝类。它与解氏珠母贝往往重叠分布，虽然在外形、壳色等方面有较明显差异，但两者在分子遗传结构的差异了解不多。

国内外有关贝类的研究多年来集中在基础研究和遗传育种领域，在遗传标记方面（包括蛋白质、同工酶、DNA序列等）也开展过一些研究，如1989年李刚等对贝类蛋白质和同工酶座位的遗传变异进行了分析<sup>[6]</sup>；1994年 Patwary 等在双壳类动物首次应用 RAPD 方法研究遗传多样性，其结果表明 RAPD 技术可以有效辨别扇贝中不同种群的 DNA 频率<sup>[7]</sup>；1998年刘必谦等把 RAPD 技术应用于牡蛎遗传多样性的分析<sup>[8]</sup>；2000年我们对北部湾海域分布的马氏珠母贝 3个天然种群和 1个人工养殖群体进行了 RAPD 分析。至于运用 RAPD 技术来分析马氏珠母贝与解氏珠母贝的遗传多样性，迄今未见报道。作为我国南部沿海重要经济贝类的马氏珠母贝，自 60年代初即开始人工繁殖，现已出现了种质资源的退化，所以对其遗传多样性以及分子遗传标记的研究显得尤为紧迫。本文对海南的马氏珠母贝与解氏珠母贝的基因组 DNA 进行了 RAPD 分析，初步探讨了建立两种贝类遗传分子标记的可能性，以及这种标记在珠母贝种质资源保护中的应用前景。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

研究所用马氏珠母贝与解氏珠母贝均采自海南洋浦港。取新鲜外套膜肌肉组织，用过滤海水洗净，70%乙醇固定，-20℃冷冻保存。

### 1.2 试剂

蛋白酶 K 为 Merk 公司产品，TaqDNA 多聚酶（以下简称 Taq 酶），dNTPs 为 Pronega 公司产品，其他试剂购自华美公司和原平生物技术公司。

抽提裂解液：Tris-HCl 10 mmol，EDTA pH 值 8.0 200 mmol，SDS 0.5%；电泳缓冲液母液（TAE，25倍）：Tris 12.2%，冰醋酸 2.8%（v/v），EDTA（1 mol/L pH 值 8.0）2.5%；PCR 反应缓冲液（10倍 buffer）：Tris-HCl 100 mmol/L（pH 值 8.3），KCl 500 mmol/L，Triton X-100 1.0%。随机引物为 Operon 公司产品，表 1 是 OPM 组部分引物序列

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 基因组 DNA 的制备

每个样称取 0.1 g 的外套膜组织（70%乙醇冷冻保存），用生理盐水洗涤数次，加入 1.2 ml 抽提裂解液。捣碎组织，加入蛋白酶 K（10 g/L）10 $\mu$ l，50℃消化 48 h，用苯酚和氯仿按常规方法抽提，上清液经

RNase 处理，用苯酚：氯仿：异戊醇（25：24：1）再抽提，水相加入 2 倍体积无水乙醇和 0.1 倍体积醋酸钠（3 mol/L pH 值 5.2）沉淀，用适量 TE 溶解 DNA，-20℃保存备用。

表 1 OPM 组部分引物序列

Table 1 The sequence of some primers in Group OPM

编号 No. primers	序列 Sequence (5' - 3')
OPM-2	ACAACGCCTC
OPM-4	GGCGGTTGTC
OPM-8	TCTGTTCCCC
OPM-12	GGGAGGTTGG
OPM-17	TCACTCCGGG
OPM-19	CCTTCAGGCA

#### 1.3.2 RAPD 实验

RAPD 所用引物为 Operon 公司的 M 组引物（简称 OPM，见表 1），每个引物长 10 mer。RAPD 反应体系参照 Williams<sup>[1]</sup>的方法，在优化反应条件时对 Mg-Cl<sub>2</sub> 引物、模板 DNA 和 Taq 酶的浓度作了适当调整。反应混液总体积 25  $\mu$ l，含 Tris-HCl 10 mmol/L（pH 值 8.3），KCl 50 mmol/L，MgCl<sub>2</sub> 22.5 mmol/L，dNTPs 200  $\mu$ mol/L，明胶 0.001%，引物 20 ng，DNA 模板 25 ng，Taq 酶 1 单位，再加 30  $\mu$ l 石蜡油覆盖。为防止试剂和操作过程中的外源模板污染，先将 1 倍 buffer、dNTP、Taq 酶和超纯水配成混合液，用 3% DNase I（0.03  $\mu$ g/ $\mu$ l）在 37℃处理 30 min，冷却，93℃变性 10 min，小管分装，再加入引物、模板和石蜡油。RAPD 的 PCR 反应过程共 47 个循环：预变性 94℃ 5 min；每次循环包括 94℃变性 40 s，37℃退火 50 s，72℃延伸 90 s。最后 72℃保温 5 min。扩增产物用 1.8% 的琼脂糖凝胶电泳分离（胶中含浓度为 0.5  $\mu$ g/ml 溴化乙锭），电泳检测，紫外透射仪观察并摄影。

## 2 结果与讨论

### 2.1 从外套膜组织提取基因组 DNA

从 2 种贝类外套膜组织提取的基因组 DNA 经紫外吸收测定，A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 比值均超过 1.75，表明基本上没有蛋白质或酚类的污染。0.8% 琼脂糖凝胶电泳结果显示，DNA 样品分子量都大于 50 kb，无拖尾和 RNA 分子污染。

### 2.2 RAPD 技术的稳定性

建立适宜的 RAPD 反应体系是得到稳定谱带的关键。DNA 模板的纯度和浓度、MgCl<sub>2</sub> 浓度、退火温度等因素都可以影响 RAPD 的重复性，通过反复实验我们建立了适宜的 RAPD 反应体系，同一引物对同一样品在相同的条件下多次扩增得到的谱带是一致的。

RAPD技术也有自身的缺陷, RAPD采用随机引物, 不具特异性, 并且 PCR过程中退火温度低(37°C), 因而反应具有高度的敏感性, 实验条件的微小变化都可能导致扩增结果的变化。所以一旦建立适宜的 RAPD反应体系, 重复实验时应严格遵守各个条件, 包括室内温度的控制。另外, 影响 RAPD重复性的一个重要因素是外源 DNA的污染, 我们在进行预备实验时, 阴性对照中经常会出现 PCR扩增带。经多次实验查明, 其主要原因是 Taq酶中含有少量杂质 DNA, 偶而也因操作不慎或其它试剂造成污染。本实验介绍了在 PCR反应之前用 DNaseI 进行处理, 可以保证阴性对照中不会出现 PCR扩增带, 提高了 RAPD的重复性。

### 2.3 RAPD扩增带谱的种属特异性

以 Operon公司生产的 M组随机引物(共20种)对 2种贝类 RAPD扩增的电泳结果表明, OPM2 4 8 12 17 19对 2种贝类的扩增有效(表1), 这些引物对马氏珠母贝的总扩增带数为52条, 对解氏珠母贝为58条(表2)。每一引物的扩增带数3条~16条, 同一引物对 2种贝类的扩增带数一般不同, (OPM19除外), 这些都说明 2种贝类在基因组结构上存在着差异。尤为重要的是, 同一引物对 2种贝类 RAPD扩增的电泳带型有着较大的差别(图1~图4), 这意味着在马氏珠母贝和解氏珠母贝中建立 RAPD遗传分子标记的可能性非常大。

表2 各种引物对马氏珠母贝、解氏珠母贝 RAPD扩增的电泳带数

Table 2 Electrophoretogram bands from amplification of DNA in *Pinctada martensii* (Dunker) and *P. chemnitri* Philippi

	OPM 2	OPM 4	OPM 8	OPM 12	OPM 17	OPM 19	总带数 Total bands
马氏珠母贝 <i>P. Martensii</i> (Dunker)	12	3	16	9	5	7	52
解氏珠母贝 <i>P. chemnitri</i> Philippi	9	15	11	8	8	7	58

### 2.4 马氏珠母贝和解氏珠母贝 RAPD带谱的个体特征与群体特征

2种贝类的不同个体存在着明显的个体特异性带(图1~图4)。上述有效引物 OPM2 4 8 12 17 19在 2种贝类种群内的 RAPD扩增带谱全部呈多态, 即群体内的各个个体(本实验为10个)不是产

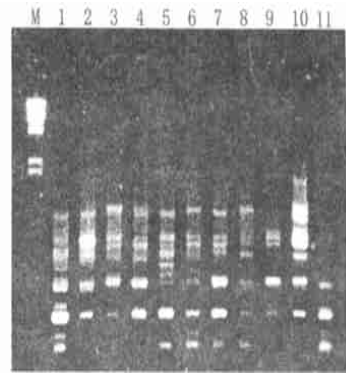


图1 引物 OPM-2对马氏珠母贝群体不同个体的 RAPD电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretogram of RAPD from ten individuals of *Pinctada martensii* using primer OPM-2.

M:  $\lambda$  /EcoRI HindIII

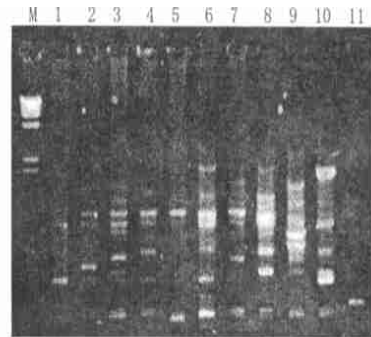


图2 引物 OPM-8对马氏珠母贝群体不同个体的 RAPD电泳图谱

Fig. 2 Electrophoretogram of RAPD from ten individuals of *Pinctada martensii* using primer OPM-8.

M:  $\lambda$  /EcoRI HindIII



图3 引物 OPM-2对解氏珠母贝群体不同个体的 RAPD电泳图谱

Fig. 3 Electrophoretogram of RAPD from ten individuals of *Pinctada chemnitri* using primer OPM-2.

M:  $\lambda$  /EcoRI HindIII

生相同的带谱。这一点与鱼类中的 RAPD扩增带谱不同, 鱼类种群内各个个体的扩增带谱呈单态的比例有时能达到30%~40%。这些呈多态性的 RAPD扩增带谱直接反映了种群内个体基因组的变异, 为研究



图4 引物 OPM-8对解氏珠母贝群体不同个体的 RAPD 电泳图谱

Fig. 4 Electrophoretogram of RAPD from ten individuals of *Pinctada chemnitzii* using primer OPM-8.

M:  $\lambda$  /EcoRI-HindIII

这两种贝类的遗传变异、遗传多样性及它们各自的群体遗传结构提供了有力的依据。另外，由于本实验的样品数量以及有效扩增的引物数都较少，关于两种贝类的群体特征带（由某特定引物扩增的 RAPD 带谱都具有该种贝类的共同特征，即一个种的不同个体共有的标记带或主带）还不能获得明确的说明，基于各个个体的 RAPD 扩增带谱不同，可以肯定两种贝类具有各自的群体特征带，而群体特征带的确定有待于更进一步的工作。

### 参考文献

1 Williams J G K, Kubelik A R, Liavk K J et al. DNA poly-

morphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 6531-6535.

2 Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *PCR methods Appl*, 1993, 3: 85-87.

3 Garcia D K, Faggart M A, Rhoades L et al. Genetic diversity of cultured *Penaeus monodon* shrimp using three molecular genetic techniques. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1994, 3 (5): 270-274.

4 Garcia D K, Benzie J A H. RAPD markers of potential use of in penaeus prawn (*Penaeus monodon*) breeding programs. *Aquaculture*, 1995, 130 (2): 137-144.

5 邱涛, 陆仁后, 项超美等. RAPD方法对中华绒螯蟹长江、黄河、瓯江三群体的遗传多样性分析. *淡水渔业*, 1997, 27 (5): 3-6.

6 Li Gang, Jin Qizeng, Jiang Weiguo. Biochemical Genetic Variation in the Pearl Oyster *Pinctada fucata* and *P. chemnitzii*. *Acta Genetica Sinica*, 1985, 12 (3): 204-212 (Ch).

7 Patwary M U. The Use of Random Amplified Polymorphic DNA Markers in Genetic Studies the Sea Scallop *Placopecten Magellanicus*. *Shellfish Res*, 1994, 13 (2): 547-553.

8 刘必谦, 戴继勋. 巨扇属 (*Crassostrea*) 牡蛎遗传多样性研究. *水产学报*, 1998, 22 (3): 193-197.

(责任编辑: 蒋汉明)

(上接第 28 页 Continue from page 286)

### 3 小结

本文通过分批补料培养、保持质粒的稳定性来进行 3 000 L 发酵罐中的高密度培养，获得了稳定的结果，一般可得  $OD_{600}$  在 25 左右，酶活力  $600 U \cdot mL^{-1} \sim 700 U \cdot mL^{-1}$ 。但与其它大肠杆菌在小型发酵罐中高密度培养常获得  $OD_{600}$  在 100 左右相比，还有相当大的潜力，有待于进一步研究。

### 参考文献

1 秦玉静, 高东, 刘巍峰. 啤酒生产中双乙酰形成的分子遗传学及其控制. *工业微生物*, 1999, 29 (2): 38-42.

2 Diderichsen B, Wedsted U, Hedegaard L et al. Cloning of ald B, which encodes  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase, an exoenzyme from *Bacillus brevis*. *J Bacteriol*, 1990, 172 (8): 4315-4321.

3 陈炜, 何秉旺, 张建华等. 短芽孢杆菌  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶基因在大肠杆菌中的克隆和表达. *微生物学报*, 1997, 37 (4): 270-275.

4 高健, 铁翠娟, 王忠彦等. 枯草芽孢杆菌  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶基因的克隆及表达. *微生物学通报*, 1998, 25 (6): 336-338.

5 尹东, 卢大宁, 曾庆华等. 醋酸杆菌  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶基因克隆、表达及在啤酒发酵中的作用. *中国生物化学与分*

子生物学报. 1999, 15 (1): 24-26

6 尹东, 曾庆华, 卢大宁等. 产气肠杆菌  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶基因的克隆和表达及影响重组酶活性的因素. *生物工程学报*. 1999, 15 (4): 501-506.

7 Blomqvist K, Nikkola M, Lehtovaara P et al. Characterization of the genes of the 2, 3-butanediol operons from *Klebsiella terrigena* and *Enterobacter aerogenes*. *J Bacteriology*. 1993, 175 (5): 1392-1404.

8 Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual* 2nd ed. New York: Cold Spring Laboratory Press, 1989. 121-1105.

9 L and wall P, Holme T. Removal of inhibitors of bacterial growth by dialysis culture. *J Gen Microbiol*, 1997, (103): 345-352.

10 Seo D J, Bong H C. Glucose-limited fed-batch culture of *Escherichia coli* for production of recombinant human interleukin-2 with the DO-stat method. *J Ferment*, 1992, 74 (3): 196-198.

11 Han K, Lim H C, Hong J. Acetic acid formation in *Escherichia coli*. *J Biotechnol Bioeng*, 1992, 39 (6): 663-671.

12 Sam K Y, Bennett G N, Aristidou A A et al. Strategies in high-level expression of recombinant protein in *Escherichia coli*. *Ann NY Acad Sci*, 1994, 721: 257-267.

13 刘如林. *微生物工程概论*. 天津: 南开大学出版社, 1995. 166-174.

(责任编辑: 蒋汉明)