

# 应用 RAPD 技术初步分析无裂栉江珧四种类型的基因组 DNA Preliminary RAPD Analysis of Four Groups in *Atrina pectinata* Linnaeus

毛 勇 余祥勇 周 莉\* 桂建芳\* 梁飞龙  
Mao Yong Yu Xiangyong Zhou Li Gui Jianfang Liang Feilong

(湛江海洋大学水产学院 广东湛江 524025)

( Fisheries College, Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang, Guangdong, 524025, China)

**摘要** 利用 3 个随机引物 (S453, S454, S463) 对无裂栉江珧 (*Atrina pectinata* Linnaeus) 的 4 种类型: 青口、黄口、沙螺、棘螺基因组 DNA 进行 RAPD 分析, 并对 RAPD 的实验条件行了优化研究。10~ 20 ng 的高纯度 DNA 用作模板, 退火温度为 39°C 时, RAPD 扩增的效率较高, 扩增的带纹清晰可辨。3 个引物中, 引物 S45 和 S46 获得了清晰的 RAPD 扩增结果, 引物 S45 未获得有效扩增, 共扩增出 8 条清晰的 DNA 片段。8 条清晰的类群特异或类群共享的 DNA 片段, 能将沙螺、棘螺、油螺 (青口与黄口的合称) 区分开来, 尚未发现能将青口与黄口分开的 RAPD 扩增带。

**关键词** 无裂栉江珧 特征性带 RAPD

中图法分类号 S932.6

**Abstract** By RAPD analysis of four groups in *Atrina pectinata* Linnaeus as green pen shell yellow pen shell thorny pen shell and scabrous pen shell, effective amplification was observed in the action of S453 or S463. As a result, some polymorphic DNA fragments of individual were revealed, 8 clear group-specific or group-shared DNA fragments were selected for characteristic bands to preliminarily distinguish the three groups thorny pen shell, scabrous pen shell and oilily pen shell (a general designation of green pen shell and yellow pen shell). No characteristic band can be used to distinguish green pen shell from yellow pen shell.

**Key words** *Atrina pectinata* Linnaeus, characteristic band, RAPD

无裂栉江珧 (*Atrina pectinata* Linnaeus) 隶属于软体动物门、双壳纲、贻贝目、江珧科、江珧属, 是一种广泛分布于我国沿海的较大型的名贵食用贝类<sup>[1]</sup>。分布于中国南部海域的无裂栉江珧, 根据壳形、壳表光泽、棘的有无及分布等特征, 人们习惯将其分为: 青口、黄口、棘螺和沙螺 4 种类型, 其中青口与黄口又被合称为“油螺”。

栉江珧在形态比较学分类上存在较大的分歧, 如 Winckworth 在当初定种时将 Reeve 所分的 7 个种合并为栉江珧 1 种<sup>[2]</sup>, 我国学者王帧瑞也将张空及李复雪所订的 7 个种或亚种合并成 1 种<sup>[3]</sup>。横川浩治<sup>[4]</sup>通过等位基因频率来计算不同类型间的遗传距离, 认为无裂栉江珧应重新区分为有棘和无棘的 2 个种。余祥

勇<sup>[5]</sup>等也通过同工酶分析, 认为沙螺应与青口、黄口分别属于 2 个不同的种。

目前, DNA 水平上的研究亦越来越多地应用在种质标记和遗传多样性的研究上, 尤其是 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 技术, 能提供丰富的显性遗传标记, 操作简便。但在无裂栉江珧的分类研究上尚未见过相关报道。

本研究首次开展了无裂栉江珧的 RAPD 技术研究, 旨在建立相对稳定的 RAPD 技术, 为其类型区分提供 DNA 水平上的证据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

所有的材料包括青口、黄口、棘螺、沙螺 4 种类型, 均购自湛江市场, 经低温包装, 火车运抵武汉进行研究。每种类型选取 8 个活体, 共计 32 个个体。

2003-03-03 收稿, 2003-06-30 修回。

\* 中国科学院水生生物研究所 武汉 430072 (Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan, Hubei, 430072, China)

## 1.2 PAPD反应仪器及试剂

PCR扩增仪为美国 PERKIN ELMER CETUS 公司生产的 Gene Amp 9600, Taq 酶和 dNTP 是华美公司分装美国 Promega 公司的产品

## 1.3 随机引物

实验所测试的 3 个引物是在上海生物工程公司合成的,长度为 10 个核苷酸, G+C 含量为 50%~60%, 其碱基序列为:

S453 GTCAGAGTCC

S454 AGCATGGCTC

S463 CTGATACGCC

## 1.4 基因组 DNA 的提取

将活贝计量壳高、壳宽、重量、雌雄等性状指数后,剖取约 1.5 g 性腺组织,加入 10 倍体积的匀浆缓冲液在低温下充分匀浆(缓冲液组分: 10 mmol/L Tris-HCl, pH 值 8.0, 75 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 0.5% SDS),随后经 RNA 酶 37°C 消化 1 h,蛋白酶 K 55°C 消化 2 h 后,进行酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提,将所得上清液加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc 和 1 倍体积预冷的无水乙醇沉淀。用适量的 TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 值 8.0)溶解 DNA 沉淀,置 -20°C 冰箱备用。

## 1.5 基因组 DNA 的鉴定

以 Lamda DNA 为标准,用 0.8% 琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/ml 的溴化乙锭)电泳(5~10 V/cm) 2 h,紫外灯下拍照,确定 DNA 的质量及浓度。

## 1.6 RAPD 反应条件的优选

在 RAPD 反应体系中,镁离子浓度, dNTP 浓度和 Taq 酶浓度是参考中国水生生物研究所国家重点实验室成熟的方法<sup>[6]</sup>。另外,我们设计选取了蛋白抽提不完全的 DNA 模板,高纯度模板 DNA 以及发生部分降解的 DNA 模板,作对比试验。还对模板 DNA 的浓度,扩增反应的退火温度作了梯度试验进行优选。

## 1.7 RAPD 检测

RAPD 反应体系确定为:总体积为 25 μl, 内含 2.5 μl 10× Reaction Buffer, 1.6 μl 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 2 μl 2.5 mmol/L 的 dNTP 混合物, 1 μl 引物(约 15

ng), 10~20 ng 模板 DNA, 0.5 单位 Taq 酶, 15.9 μl 纯水。反应扩增程序如下: 94°C 变性 4 min 后进入扩增循环, 每个循环包括 94°C 变性 1 min, 39°C 退火 40 s., 72°C 延伸 50 s., 共进行 38 个循环, 然后在 72°C 延伸 7 min, 于 4°C 下保存。RAPD 扩增产物在 1.5% 琼脂胶上(含 0.5 μg/ml 溴化乙锭)电泳后通过紫外凝胶成像系统 Bio-Rad DOC-1000 进行扫描成像。

## 2 结果与分析

### 2.1 RAPD 分析最佳条件的确定

模板 DNA 无论是蛋白抽提不完全, 还是部分发生降解, 用量在 1~125 ng 的范围内, 都能产生有效的 RAPD 扩增。然而, 不纯或部分发生降解的模板 DNA 将导致不稳定的非特异性扩增显著增多, 带纹拖尾严重, 泳道背景杂乱, 多态扩增带重复性较差。实验中, 10~20 ng 的高纯度 DNA 用作模板, 退火温度为 39°C 时, RAPD 扩增的效率较高, 扩增的带纹清晰可辨, 见图 1 图 2。

### 2.2 PCR 扩增产物分析

利用优选的 RAPD 技术参数, 分别对青口, 黄口, 棘螺, 沙螺进行 RAPD 扩增测试。3 个引物中, 引物 S453 和 S463 获得了清晰的 RAPD 扩增结果, 引物

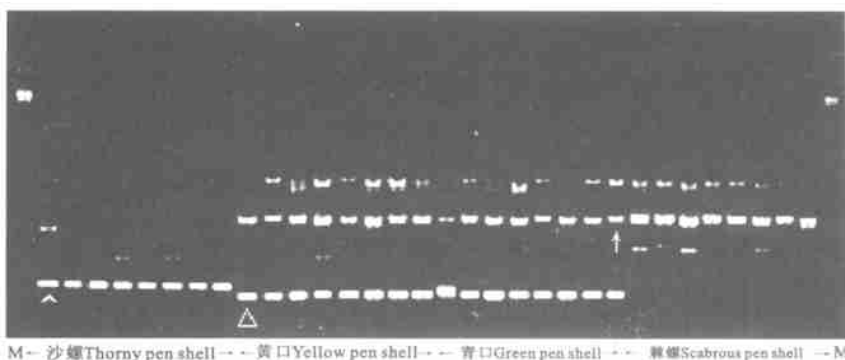


图 1 随机引物 S453 的 RAPD 扩增图谱 (M: λ DNA/EcoR I-Hind III 分子量标记)

Fig. 1 RAPD amplification profile generated by primer S453

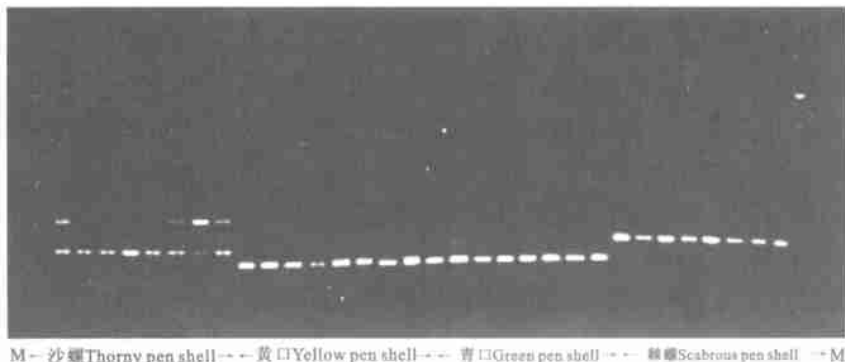


图 2 随机引物 S463 的 RAPD 扩增图谱 (M: λ DNA/EcoR I-Hind III 分子量标记)

Fig. 2 RAPD amplification profile generated by primer S463

S45未获得有效扩增。共扩增出了8条清晰的DNA片段,为某一或某几种类型所有个体所共有。但也出现了数条弱带不易辨认,它在某些个体中比较清晰,在另一些个体中比较模糊,无法确认该片段的性质是多态性带,还是特征性带,只有经过进一步的实验(如southern杂交等)确证后,方可用于遗传种质分析。

S45扩增产物中,沙螺中总共有10条带,其中至少7条带为多态带;S46扩增产物中,沙螺总共有4条带,其中至少2条带是多态带。而S45扩增产物中分子量大约为0.4 kb的DNA片段和S46扩增产物中分子量大约为0.6 kb的DNA片段,带纹特征强烈,既是所有沙螺个体共有的带,又是该类型所特有的带,它们可以作为特征性带将沙螺与其它3种类型区分开。

S45扩增产物中,棘螺共有8条带,其中至少3条是多态带,S46共扩增出6条带,至少2条是多态带。在S45扩增产物中有2条带的分子量分别为1.4 kb和0.9 kb,带纹扩增强烈且清晰可辨,是所有棘螺个体共有的带,但不是棘螺所特有的带,它在青口与黄口所有个体中同样存在。S46扩增产物中有2条带的分子量分别为1.4 kb和0.7 kb,它既是所有棘螺个体所特有的带,也是棘螺个体所特有的带,可作为特征性带将棘螺与其它2种类型区分开。

青口与黄口合称为“油螺”,在S45和S46扩增产物中总共有1条带,其中至少6条带出现了个体间的多态现象,但没有发现扩增信号强烈的稳定的带纹能将青口与黄口分开。在S45扩增带纹中,分子量为0.3 kb,0.9 kb,1.4 kb的3条带纹在青口与黄口的所有个体中都能有效扩增,0.9 kb和1.4 kb的带纹还在棘螺中有扩增。S46扩增产物中,分子量为0.4 kb的带纹在青口与黄口的所有个体中都有扩增。S453中的0.3 kb的带和S463中0.4 kb的带可作为青口与黄口共同具有(即“油螺”)的特征性带而与沙螺与棘螺区分开来。

### 3 讨论

在2种引物的RAPD扩增产物中,体现了无裂栉江珧种内的遗传多样性,也出现可用作种下类群划分的特征性带,只是外部形态上较为相似的青口、黄口<sup>[5]</sup>,在S45和S46的RAPD扩增产物中也没发现能将二者分开的特征性DNA片段。实际上,青口与黄口,它们的壳面较具光泽,后闭壳肌都相对较大,具有相同的市场价格,经济价值较高,被合称为“油

螺”<sup>[5]</sup>,而沙螺的后闭壳肌的相对较小,市场售价要比油螺低20%~30%。通过S45和S46两种引物的RAPD分析已完全能将“油螺”、棘螺和沙螺有效区分,每种类型都具有自己的特征性带。

要区分青口与黄口,较大的个体通过外部形态就能区分,对于外形相似的幼体及苗种,尚未找到能将其区分的RAPD扩增片段,但已报道的同工酶分析中找到了能将其区分的标记,如从肾组织和后闭壳肌的EST、鳃及后闭壳肌的SOD酶谱中都可以寻找出区别这4种类型的特征谱带<sup>[7,8]</sup>。

无裂栉江珧种质及种下种群的划分存在较大的分歧<sup>[1-5]</sup>,通过外部形态比较、同工酶技术和RAPD分析,积累了丰富的外部及遗传性状资料,也反映了青口、黄口、棘螺和沙螺4种类群之间的遗传相似性和类群间的差异。这几种分析方法各有优劣,我们可根据实际需要来进行选择。其中RAPD技术所需模板DNA的量极少,能对不同大小及不同发育程度的个体进行检测和类群区分,不受取材部位的限制,也可不必杀死成贝。另外,RAPD技术快速简便,已成功运用在多种贝类的种质鉴定中<sup>[9]</sup>,能满足对不同经济价值的无裂栉江珧的类型区分,对优良的繁育亲本和增殖群体的选择有着重要的意义。

### 参考文献

- 1 王桢瑞.中国动物志软体动物门.双壳纲.贻贝目.北京:科学出版社,1997.214~237.
- 2 Winck worth R. Marine mollusca from South India and Ceylon III. Pinna Proc Mal Soc London, 1929, 18(6): 267~297.
- 3 王桢瑞.中国近海江珧科的初步报告.海洋科学集刊,1964,(5): 30~41.
- 4 横川浩治.タイラキ 2型の遗传的分化.贝类 JENUS, 1996, 55(1): 25~39.
- 5 余祥勇,王梅芳,李宏吾等.无裂栉江珧形态差异的比较研究.热带海洋,2000,19(2): 39~44.
- 6 周莉,樊迎春,桂建芳.银鲫复合种外源遗传物质整入的RAPD分析.水生生物学报,1998,22(4): 301~306.
- 7 王梅芳,余祥勇,杨书婷等.无裂栉江珧种内同工酶表型差异的比较研究.热带海洋,2000,19(4): 45~50.
- 8 余祥勇,王梅芳,杨书婷等.有棘和无棘两种表型栉江珧同工酶差异的比较.湛江海洋大学学报,1999,19(2): 6~9.
- 9 杜晓东,叶富良.合浦珠母贝基因组DNA多态性的RAPD标记.湛江海洋大学学报,2000,20(2): 83~84.

(责任编辑:邓大玉)