

# 中国对虾黄、渤海沿岸地理群的 RAPD 分析\*

刘 萍 孔 杰 石 拓 庄志猛 邓景耀

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

徐 怀 恕 韩 玲 玲

(青岛海洋大学海洋生命学院, 青岛 266003)

**摘 要** 采用随机扩增多态 DNA(random amplified polymorphic DNA, 简称 RAPD) 技术, 对中国对虾的黄、渤海地理群的 32 个个体遗传多样性进行了检测. 使用 OPI 系列的 20 个 10 bp 的寡核苷酸随机引物, 对每个个体的基因组 DNA 进行扩增, 结果为: 17 个引物获得了谱带清晰且重复性好的产物, 扩增片段的分子量在 2 000~200 bp 之间, 共检测 106 个位点, 其中多态位点数为 39 个, 占 36.8%; 平均遗传距离为  $0.094 1 + 0.020 6$ , 有 67 个标记(占 63.2%)在整个群体的 32 个个体间表现稳定的一致性.

**关键词** 中国对虾 黄海、渤海种群 RAPD 技术 遗传多样性

**中图分类号**: Q346+.5

## 1 引言

由于我国在海洋水产种质资源遗传学方面的研究相当薄弱, 相对于发达国家有一定的差距, 20 世纪 80 年代才开始涉足这个领域. 近 2a 来, 海洋经济动物的种质资源已引起人们的重视, 并逐渐开展研究工作; 国外有人根据 13 种对虾的同功酶的电泳图谱研究对虾遗传变异程度和对虾的进化关系<sup>[1]</sup>. 1991 年 Stephen<sup>[2]</sup> 研究对虾线粒体 12S 核糖体蛋白基因和细胞色素氧化酶 I 基因, 在 DNA 序列比较和分析的基础上, 研究 3 种对虾在虾类中的进化关系. 1994 年 Garcia<sup>[3]</sup> 分析了养殖美洲白对虾的遗传变异水平. 目前对我国虾类种质资源的遗传背景尚不清楚, 尤其是我国沿岸地理群的中国对虾, 受近十余年的人工放流的影响. 本文试图由分子水平分析中国对虾(*Penaeus chinensis*) 黄海、渤海种群的遗传结构特点.

本文于 1999-02-01 收到, 修改稿于 1999-06-30 收到.

\* 国家自然科学基金重点资助项目(编号: 39620260).

第一作者简介: 刘 萍, 女, 37 岁, 副研究员, 硕士, 从事海洋经济动物种质资源与遗传育种以及对虾病毒病诊断技术的研究.

## 2 材料和方法

### 2.1 材料

#### 2.1.1 样本

中国对虾于 1996 年春季捕自山东省海阳市近海, 32 尾中国对虾全为雌性性成熟个体。

#### 2.1.2 PCR 扩增仪

美国 PE 公司生产的 PCR System 9600。

#### 2.1.3 引物

购自 Operon Technologies 公司, 本试验使用 OPI 系列, 引物序列见表 1。

表 1 OPI 系列引物序列及 RAPD 扩增情况

引物	5'-3'序列	产物的标记数	
		总数	多态数
OPI-01	ACCTGGACAC	6	3
OPI-02	GGAGGAGAGG	4	0
OPI-03	CAGAAGCCCA	2	0
OPI-04	CCGCCTAGTC	8	5
OPI-05	TGTTCCACGG	-	-
OPI-06	AAGGCGGCAG	-	-
OPI-07	CAGCGACAAG	5	2
OPI-08	TTTGCCCGGT	-	-
OPI-09	TGGAGAGCAG	5	2
OPI-10	ACAACGCGAG	10	5
OPI-11	ACATGCCGTG	6	1
OPI-12	AGAGGGCACA	9	2
OPI-13	CTGGGGCTGA	9	3
OPI-14	TGACGGCGGT	8	1
OPI-15	TCATCCGAGG	3	1
OPI-16	TCTCCGCCCT	8	1
OPI-17	GGTGGTGATG	2	0
OPI-18	TGCCCAGCCT	9	6
OPI-19	AATGCGGGAG	5	3
OPI-20	AAAGTGCGGG	7	4
合计		106	39

### 2.2 方法

#### 2.2.1 基因组 DNA 提取的方法

方法见《分子克隆实验指南》<sup>[4]</sup>, 并有所改进。主要过程为: (1) 取组织为对虾尾棘肌肉 100 mg, 剪碎后放入 1.5 cm<sup>3</sup> 离心管中, 加入 pH8.0 的 TE 溶液 (10 mmol/dm<sup>3</sup> Tris - Cl, 100 mmol/dm<sup>3</sup> EDTA) 500 mm<sup>3</sup>, 用研磨棒研磨。 (2) 加入 10% SDS 溶液 25 mm<sup>3</sup>, 混匀。 (3) 加入 10 mg/cm<sup>3</sup> RNAse 2 mm<sup>3</sup>, 37 °C 消化 0.5~1 h。 (4) 加入 20 mg/cm<sup>3</sup> 蛋白酶 K 4 mm<sup>3</sup>, 混匀, 50 °C 消化 2.5~3 h。 (5) 抽提。平衡后的重蒸酚抽提两次, 每次 10 min, 10 000 g 离心 5 min, 取上清; 酚比氯仿 (1:1) 抽提一次, 10 min, 10 000 g 离心 5 min, 取上清; 氯仿抽提一次 5 min, 5 000

g 离心 5 min, 取上清. (6) 加入 1/25 体积的  $5 \text{ mol/dm}^3$  NaCl 溶液, 混匀后再加入 2 倍体积的  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  保存的无水乙醇沉淀 DNA 15 min; 挑出的 DNA 用 70% 的乙醇洗涤过夜, 次日去乙醇后使 DNA 干燥, 用灭菌水  $500 \text{ mm}^3$  充分溶解, 并于  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴灭活 5~10 min, 于  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下保存.

### 2.2.2 模板 DNA 定量方法

使用日本岛津产 UV-365 紫外分光光度计, 提取的模板 DNA 溶于  $500 \text{ mm}^3$  灭菌水中, 取出  $250 \text{ mm}^3$ , 加水至  $500 \text{ mm}^3$  进行测定. 在波长 260 nm 时读数用于计算样品中核酸的浓度, 即 OD 值等于 1 时, 相当于大约  $50 \text{ }\mu\text{g/cm}^3$  双链 DNA. 同时测定波长 280 nm 下的读数, 用于估计核酸的纯度 (纯 DNA  $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$  为 1.8~2.0), 同时, 辅以凝胶电泳肉眼观测进行定量. 计算出每个样品的浓度后, 将剩余的  $250 \text{ mm}^3$  DNA 样品取出部分, 用灭菌水稀释成  $20 \text{ }\mu\text{g/cm}^3$ .

### 2.2.3 RAPD 条件

(1) RAPD 反应总体积为  $25 \text{ mm}^3$ , 加样量为下: 模板量 ( $20 \text{ }\mu\text{g/cm}^3$ ) 为  $1 \text{ mm}^3$ , Buffer (KCl,  $500 \text{ mmol/dm}^3$ ; Tris-Cl,  $100 \text{ mmol/dm}^3$ , pH 9.0; Tritonx-100, 1%) 为  $2.5 \text{ mm}^3$ ,  $\text{MgCl}_2$  ( $\text{Mg}^{++}$  浓度  $15 \text{ mmol/dm}^3$ ) 为  $3 \text{ mm}^3$ , Tag 酶 ( $5 \text{ }\mu\text{g/mm}^3$ ) 为  $0.2 \text{ mm}^3$ , dNTP (分别为  $2.5 \text{ mmol/dm}^3$ ) 为  $1 \text{ mm}^3$ , 引物 ( $15 \text{ pmol/dm}^3$ ) 为  $1.5 \text{ mm}^3$ ,  $\text{dH}_2\text{O}$  加至  $25 \text{ mm}^3$ . (2) RAPD 程序为  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  变性 2 min;  $93 \text{ }^\circ\text{C}$  变性 1 min,  $36 \text{ }^\circ\text{C}$  变性 1 min,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  变性 2 min, 45 个循环;  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸 5 min;  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  保存.

### 2.2.4 电泳、照像

用  $0.5 \times \text{TBE}$  溶液溶解琼脂糖, 同时加入溴化乙锭溶液, 至终浓度 0.05%, 制成 2.0% 琼脂糖凝胶. 取 RAPD 产物  $3 \sim 5 \text{ mm}^3$  在琼脂糖凝胶上进行电泳, 电压为  $3 \text{ V/cm}$  左右, 一般电泳进行 2~3 h, 在紫外透射仪上观察并照像.

### 2.2.5 数据处理

随机扩增的 DNA 片段在电场中的迁移率 ( $d$ ) 与分子量 ( $M$ ) 的对数成反比:  $d = k / \log M$ .  $\lambda\text{DNA-HindIII/EcoRI}$  作为分子量大小的标记.

随机扩增多态 DNA 片段的共享度根据 Nei 和 Li<sup>[5]</sup> 的公式计算:

$$F = 2N_{xy} / (N_x + N_y) \quad P = 1 - F,$$

式中,  $F$  为随机扩增多态 DNA 片段共享度,  $N_x$  和  $N_y$  分别为物种  $x$  和  $y$  的随机扩增多态 DNA 片段数;  $N_{xy}$  为两物种间相同的片段数,  $P$  为遗传距离. 当  $F = 1$  时, 物种  $x$  和物种  $y$  的扩增片段完全相同, 说明两者具有高度相似的遗传性; 当  $F = 0$  时, 两物种的扩增片段完全不同, 即具有高度相异的遗传性.

## 3 结果

### 3.1 RAPD 扩增结果

本试验中使用 OPI 系列的 20 个随机引物, 中国对虾的黄、渤海沿岸群 32 个个体, 除 OPI-05, OPI-06 和 OPI-08 3 个引物未产生明显的扩增带外, 其余的 17 个引物均可产生特定的扩增带型, 每个引物可产生 2~10 条的谱带, 其中 OPI-02, OPI-03 和 OPI-17 引物在所有个体中只产生单态, 其余 14 个引物均可产生不同程度的多态, 清晰可辨的扩增带数全部统

计于表 1 中,17 个引物的 RAPD 产物的总标记数可达 106 条,其中 39 条为多态数,占 36.8%,标记的分子量在 2 000~200 bp 之间.

### 3.2 中国对虾黄、渤海沿岸自然种群的 RAPD 遗传多样性结果

根据扩增产物有无建立的二维空间数据矩阵,使用 RAPDistance 软件得到了 32 个个体的遗传距离  $P$  值矩阵,见表 2. 任意两个个体的  $P$  值在 0.038 5~0.158 5 范围之内,大多数在 0.070 0~0.110 0 之间,该地理群 32 个个体的遗传距离的平均值为  $0.094 1 \pm 0.020 6$ .

中国对虾黄、渤海沿岸群的 RAPD 扩增谱带变异不大. 17 个引物中有 3 个引物 OPI-02, OPI-03 和 OPI-17 的扩增带型在 32 个个体中均没有变化,见图版 I-1;有 4 个引物 OPI-11, OPI-14, OPI-15 和 OPI-16 变化不大,各有一个多态位点,见图版 I-2;其余的引物得到的多态位点数为 2~6 个不等,见图版 I-3,4. 在 OPI 系列引物检测到的 106 个 RAPD 标记中,有 67 个标记(占 63.2%)在整个群体的 32 个个体间表现稳定的一致性.

## 4 讨论

中国对虾主要分布在黄、渤海水域,有两个不同的地理群,一个在黄海东岸即朝鲜半岛西海岸海域的朝鲜西海岸地理群,另一个是在渤海和黄海西岸海域出生的中国黄、渤海沿岸地理群. 这两个地理群每年 5~11 月间分别在朝鲜西海岸海域和黄、渤海中国沿岸河口附近繁殖产卵、索饵生长,10~11 月性成熟后交配. 在 11 月末两个种群均开始越冬洄游,最终汇集在黄海中南部的暖水区越冬,两个种群在越冬场的分布稍有不同,前者偏东而后者偏西<sup>[6]</sup>. 渔业生物调查认为这两个群体在地理分布上是隔离的. 本试验采用的是黄、渤海沿岸地理群中的 32 个雌性个体,对其进行随机扩增多态 DNA(RAPD)分析,以期获得该地理群的遗传多样性的背景,据此评价自然灾害和人类实践干预对野生种质资源所带来的遗传学变化,并制定和采取相应的管理和保护措施. 研究种质资源的遗传结构、对遗传多样性进行鉴定,是为了最大限度地维持种内的遗传多样性水平、维持物种和种群的自然繁殖能力、进化潜力,确保种质资源的持续性利用. 我们利用 RAPD 技术分辨率高,能够迅速提供遗传分析中大量的遗传标记特点,根据遗传距离和多态位点的比例等参数,揭示中国对虾不同地理群的遗传变异水平. 中国对虾黄、渤海沿岸地理群的平均遗传距离为 0.094 1,多态位点的百分数为 36.8%;Garcia<sup>[3]</sup>用 6 个引物检测的南美白对虾(*P. vannamei*)的 4 个群体和家系,所测得的多态位点百分数是 58.75%,因而说明黄、渤海沿岸地理群中国对虾的遗传变异程度较小. 对于对虾类低水平遗传变异,Nelson 等<sup>[7]</sup>、Hedgecock 等<sup>[8]</sup>认为随机遗传漂变和营养结构及环境的稳定性是海洋甲壳类遗传变异水平低的主要原因;通过本试验的结果,笔者认为黄、渤海区中国沿岸地理群的中国对虾低水平的遗传多样性与大强度的渔业捕捞、人工养殖个体逃逸以及大规模的不安全的人工放流等有关.

由技术原理上来说,随机扩增多态 DNA 技术所揭示的分子水平的遗传多样性是核苷酸碱基变化的结果. 改变引物的结合位点,或在扩增范围内有突变(如插入或缺失)都会导致一个位点上扩增产物的有或无,这意味着该技术只是提供一种显性标记,难以区分某一个位点是纯合或是杂合,即使某一个多态的,若抽样个体不够,抽不到隐性纯合个体,也会把多态位点统计为单态位点,造成  $P$  的统计值低于实际值. 因此,RAPD 技术不能进行等位基因分析,这是相对于同工酶分析的一个明显的缺点,解决的方法是两种手段互补. 如果进行同工酶分析



检测不出某些物种的遗传多样性时,使用 RAPD 技术可以获得种群更多的遗传变异信息. 在本试验中,单一引物的扩增谱带往往为大多数个体所共有,但对整个群体使用 17 个引物的全部扩增产物的电泳谱带进行统计,没有发现任何两例个体拥有完全相同的遗传标记,显示出 RAPD 技术具有良好的分辨率,如表 2 所示,任意两个个体的  $P$  值均大于 0,最小值为 0.038 5,最大值可达 0.158 5. 一般而言,随检测物种个体数量增加,遗传相似率会有所提高. 由于随机引物原则上也可以任意增加,因此理论上可能找到任何一个个体特异性的 RAPD 标记,从而将所有个体区别开来,表明了 RAPD 技术在遗传标记方面有着巨大的潜力.

### 参考文献

- 1 Mulley J C, Latter B D R. Genetic variation and evolutionary relationships within a group of thirteen species of penaeid prawns. *Evol*, 1980, 34: 904~916
- 2 Stephen R. Palumbi, John Benzie. Large mitochondrial DNA differences between morphologically similar penaeid shrimp. USMSFP Progress Report, Vol. 1. 1991. 25~35
- 3 Garcia K G. Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, 3(5): 270~280
- 4 金冬雁,黎孟枫,等译. 分子克隆实验指南. 第 3 版. 北京:科学出版社,1993
- 5 Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76(10): 5 269~5 273
- 6 邓景耀. 对虾. 海洋渔业生物学. 北京:农业出版社,1991
- 7 Nelson K. Enzyme polymorphism and adaptive strategy in the decapod crustacean. *American Naturalist*, 1980, 116: 238~280
- 8 Hedgecock D. Genetics. In: Bliss D E, ed. *The Biology of Crustacean*. 1982

## RAPD analysis of wild stock of penaeid shrimp (*Penaeus chinensis*) in the China's coastal waters of Huanghai and Bohai Seas

Liu Ping,<sup>1</sup> Kong Jie,<sup>1</sup> Shi Tuo,<sup>1</sup> Zhuang Zhimeng,<sup>1</sup>

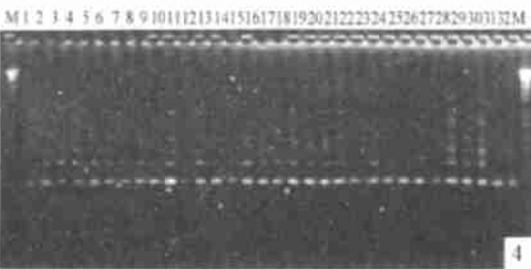
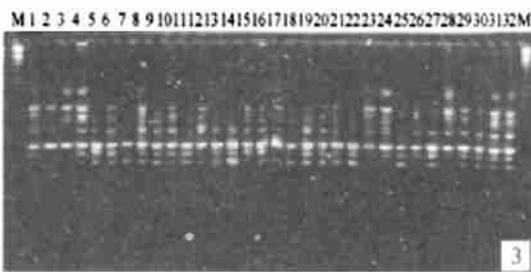
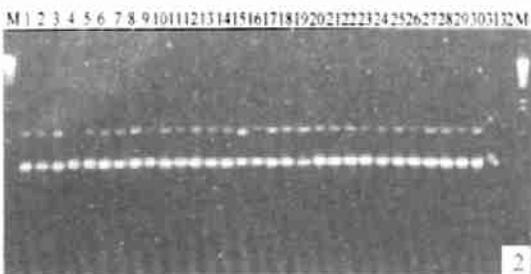
Deng Jingyao,<sup>1</sup> Xu Huaishu,<sup>2</sup> Han Lingling<sup>2</sup>

1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071

2. Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003

**Abstract**—Genetic diversities of 32 individuals of *P. chinensis* in the China's coastal waters of the Huanghai and Bohai Seas are detected by RAPD technique. 20 decamer primers of OPI are used for DNA amplification for each individual. The results show that of reproducible fingerprints 17 primers are obtained, and the bands are clear. 39 of 106 loci detected are polymorphic, amounting to 36.8%. Mean genetic distance is  $0.094 1 \pm 0.020 6$ ; 68 markers (63.2% of the total) show stable homogeneity in all of the 32 individuals.

**Key words** *Penaeus chinensis*, stock of the Huanghai and Bohai Seas, RAPD technique, genetic diversity



1. OPI-17, 2. OPI-07, 3. OPI-12, 4. OPI-18