

文章编号: 1000-5471(2007)05-0104-04

鲇 16SrRNA 基因扩增片段的 RFLP 研究^①

王庆容, 王大忠, 王乾兴, 李学英

遵义医学院 生物学教研室, 贵州 遵义 563003

摘要: 利用 PCR 技术进行了鲇(*Silurus asotus*) 5 个地理种群线粒体 DNA(mtDNA) 限制性片段长度多态性(RFLP) 研究. 这 5 个地理种群是长江上游支流(四川境内的攀枝花雅砻江、岷江、自贡、贵州遵义的乌江)和长江中游支流沅江上游的澧阳河. 选用 10 种限制性内切酶水解, 只有 HaeIII 产生了限制性片段长度多态性. 在长江上游支流的各地理种群之间不存在限制性片段长度多态性, 长江中游支流沅江上游的澧阳河地理种群与长江上游支流的各地理种群间在该基因片段上存在一定程度的多态性变异.

关键词: 鲇; 线粒体 DNA; 16SrRNA; 多态性

中图分类号: Q959.4

文献标识码: A

鲇(*Silurus asotus*) 属于鲇形目(Siluriformes), 鲇科(Siluridae), 鲇属(*Silurus*), 分布于长江水系及长江以南较大的江河中^[1]. 从上世纪 80 年代初开始, 我国对鲇的生殖与人工繁殖、营养等方面的研究已逐步展开^[2,3]. 到目前为止, 有关鲇的研究已有大量报道^[4,5], 但未见其 16SrRNA 基因方面的报道.

本研究采用扩增片段的限制性片段长度多态性(RFLP)方法, 对长江水系中上游主要支流不同地理种群的鲇线粒体 DNA 16SrRNA 基因的扩增片段进行多态性研究, 以寻求种群间的分子遗传标记, 为今后渔业资源管理、种质资源保护和遗传育种提供分子遗传学基础.

1 材料与方 法

1.1 材 料

鲇标本于 2000 年 6—8 月分别采自四川省境内的攀枝花(3 尾)、岷江(3 尾)、自贡(2 尾), 贵州省境内乌江(2 尾)和沅江上游的澧阳河(8 尾). 所有标本活体取肌肉、肝脏、卵巢(雌体), 置于液氮保存, 运回实验室后置于 -20 °C 保存备用.

1.2 总 DNA 的提纯

取 100 mg 肝脏或 200 mg 肌肉, 用含蛋白酶 K 的裂解液(30 mmol/L tris-hcl, ph 8.0, 0.1 mol/L EDTA, 0.1 mol/L Nacl, 1% SDS)于 55 °C 水浴 2~4 h, 用饱和酚: 氯仿: 异戊醇(V/V 25: 24: 1)抽提两次, 氯仿: 异戊醇(24: 1)抽提一次, 随后用低温无水乙醇(-20 °C)沉淀 DNA, 干燥后溶于 TE 中, 置 -20 °C 保存备用.

① 收稿日期: 2006-08-29

基金项目: 贵州省自然科学基金资助项目(1999-3050).

作者简介: 王庆容(1972-), 女, 贵州务川人, 讲师, 硕士研究生, 主要从事分子进化及分子生物学的研究.

通讯作者: 李学英

1.3 16SrRNA 基因片段的扩增

用于 PCR 扩增的 16SrRNA 基因的特异性引物为 LP₁ (5′-CGCCTGTTTATCAAAACAT-3′) 和 HP₂ (5′-CCGGTCTGAACTCAGTCATGT-3′)^[6], 由上海生工生物技术服务有限公司合成, 使用美国 PTC-100 PCR 扩增仪, 反应总体积 50 μL, 其中包括模板 DNA 1 μL, 两种引物各 1 μL, 10×Buffer 5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 25 μL, 1 单位 Taq DNA 聚合酶, 补足灭菌双蒸水至终体积, 其上加 2 滴消毒石蜡油. 扩增反应程序如下: 94 °C 预变性 45 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 45 s, 30 个循环, 再 72 °C 延伸 6 min. PCR 扩增产物上样至 1% 琼脂糖凝胶 (含溴乙锭 0.5 μg/mL) 电泳, 于紫外灯下观察分析.

1.4 PCR 产物的酶切

取 PCR 扩增物 10 μL, 10×Buffer 2 μL, 限制性内切酶 8~10 个单位, 加灭菌双蒸水至 15 μL, 37 °C 温育过夜. 所用的 10 种限制性内切酶是 Taq I, Msp I, Hinf I, Hae III, Dra I, Pvu II, Sac I, Sca I, Hind III, Mlu I.

1.5 电泳分析

用 1% 的琼脂糖凝胶电泳 1.5 h, 缓冲液为 0.5×TBE, 电压 3 V/cm. 电泳结果在紫外灯下观察并拍照.

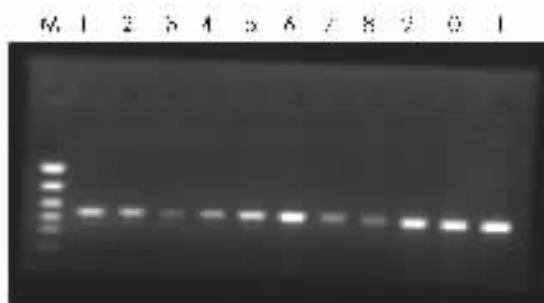
2 结果

2.1 PCR 扩增结果

不同地理种群的鲇 16SrRNA 基因均扩增出约 610 bp 的片段, 未发现其片段长度多态性 (图 1).

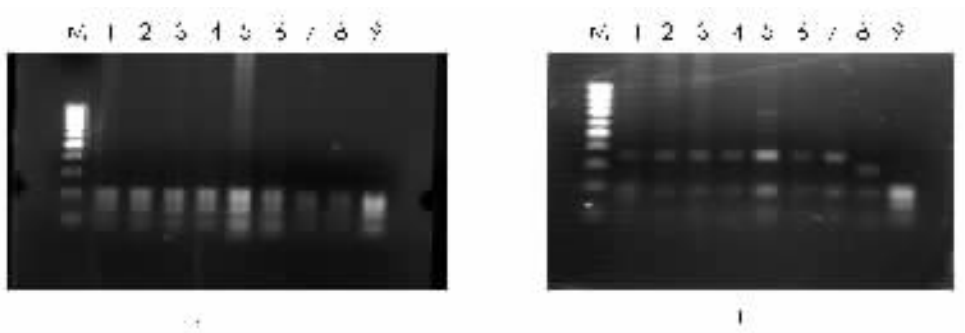
2.2 16SrRNA 基因扩增片段的限制性内切酶水解分析

用 Hae III, Hinf I, Msp I, Dra I, Pvu II, Taq I, Sac I, Sca I, Hind III, Mlu I 10 种限制性内切酶分别对不同地理种群的鲇的 16S rRNA 基因扩增片段进行水解, 电泳结果发现, 在所用的 10 种限制性内切酶中, Hind III, Msp I, Dra I, Taq I, HaeIII 在该片段上有限制性位点, 只有 HaeIII 产生了限制性片段长度多态性, 其余 4 种限制性内切酶不存在位点变异. HaeIII 在长江上游支流的各地理种群间不存在限制性片段长度多态性, 但长江中游支流沅江上游的溆阳河地理种群与长江上游支流的各地理种群间在该基因片段上存在一定程度的多态性变异 (图 2, 表 1).



M: 100 bp ladder

图 1 鲇 16SrRNA 基因扩增片段的电泳图谱



a、b 图的 9 号泳道是来自长江不同地理种群; b 图的 1-8 号是溆阳河地理种群. M: 100 bp ladder

图 2 鲇 16SrRNA 基因扩增片段经 HaeIII 酶切后的电泳图

表 1 不同地理种群的鲇 16SrRNA 基因扩增片段的限制性片段长度模式(kb)

地点	Hind III	Msp I	Dra I	Taq I	Hae III
攀枝花	0.35, 0.26	0.43, 0.18	0.49, 0.12	0.50, 0.09, 0.02	0.21, 0.15, 0.15, 0.1
岷江	0.35, 0.26	0.43, 0.18	0.49, 0.12	0.50, 0.09, 0.02	0.21, 0.15, 0.15, 0.1
宜宾	0.35, 0.26	0.43, 0.18	0.49, 0.12	0.50, 0.09, 0.02	0.21, 0.15, 0.15, 0.1
乌江	0.35, 0.26	0.43, 0.18	0.49, 0.12	0.50, 0.09, 0.02	0.21, 0.15, 0.15, 0.1
濠阳河	0.35, 0.26	0.43, 0.18	0.49, 0.12	0.50, 0.09, 0.02	0.36, 0.15, 0.1 0.30, 0.21, 0.1

3 讨 论

到目前为止,在对真核生物 DNA 多态性的研究中,有关以 mtDNA 16SrRNA 基因扩增片段为研究对象作限制性内切酶分析的相关报道较少, Bouchon 等^[7]扩增了斑节对虾和日本对虾 16SrRNA 基因,利用限制性内切酶水解扩增片段后,进行 RFLP 分析,没有发现限制性片段长度多态性. 张辉等^[8]扩增了野鲫、红鲫、缩骨鲫、金鱼、白鲫和银鲫的 16SrRNA 基因,扩增片段的长度约为 0.66 kb,扩增片段长度不存在多态性,但利用限制性内切酶水解扩增片段后,进行 RFLP 分析,发现 Hinf I、Msp I 和 HaeIII 的水解结果呈现限制性片段长度多态性. 笔者曾用相同的方法分析长江上游支流不同地理种群的南方鲇(*Silurus meridionalis*),只有 HaeIII 的水解结果呈现限制性片段长度多态性. 通过对水解结果的分析,各种野生地理种群内和种群间无限制性片段长度多态性,野生地理种群和养殖品种之间有限制性位点的差异^[9].

本研究扩增了不同野生地理种群的鲇 16SrRNA 基因,扩增片段的长度约为 0.61 kb,经琼脂糖凝胶电泳分析,该扩增片段长度不呈现多态性(图 1). 利用 10 种限制性内切酶水解扩增片段后,进行 RFLP 分析. 在所用的 10 种限制性内切酶中, Hind III, Msp I, Dra I, Taq I, HaeIII 在该片段上有限制性位点. 只有 HaeIII 产生了限制性片段长度多态性,其余 4 种限制性内切酶不存在位点变异. HaeIII 在长江上游支流的各地理种群间不存在限制性片段长度多态性,但长江中游支流沅江上游的濠阳河地理种群与长江上游支流的各地理种群间在该基因片段上存在一定程度的多态性变异. 说明长江中游支流沅江上游的濠阳河地理种群与长江上游支流的各地理种群间已出现了分化.

濠阳河位于沅江上游,与长江干流中间相隔一个洞庭湖,与长江上游支流的各地理种群间在地理位置上相隔较远. 鲇通常土著性地生活在各支流的某些江段中,个体较小,迁移趋向弱,地理隔离较明显,各种群间基因交流少. 因此,长江中游支流沅江上游的濠阳河地理种群与长江上游支流的各地理种群间已出现了分化,长江中游支流沅江上游的濠阳河地理种群与长江上游支流的各地理种群间在 16SrRNA 基因片段上存在 HaeIII 的分子标记. 但由于样本量较小,无法确定限制性片段 0.36 kb 和 0.30 kb(表 I),谁是鉴定长江中游支流沅江上游的濠阳河地理种群与长江上游支流的各地理种群的稳定的分子遗传标记,这有待于增加样本量作进一步的研究.

参考文献:

- [1] 陈湘舜. 我国鲶(鲇)科鱼类的总述[J]. 水生生物学集刊, 1977, 6(2): 197-216.
- [2] 魏 刚, 陈怀辉. 鲇卵巢发育组织学的初步研究[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 1994, 19(5): 517-521.
- [3] 魏 刚, 黄林. 鲇人工繁殖试验的研究. 四川经济鲇类研究[M]. 重庆: 西南师范大学出版社, 1998: 294-298.
- [4] 李 懋, 万松良, 黄二春, 等. 大口鲇和普通鲇的同工酶研究初报[J]. 湖北农业科学, 1998, (3): 54-57.
- [5] 魏 刚, 黄 林, 戴大临, 等. 鲇卵膜形成的显微和超显微结构比较的研究[J]. 西南农业大学学报(自然科学版), 2005, (1): 25-28.
- [6] Meyer A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In Hochachka & Mommsen[J]. Biochemistry and molecular Biology of Fishes, 1993, 2. Elsevier Science Publishers B. V.

- [7] Bouchon D., Souty-Grosset C., Raimond R., Mitochondrial DNA Variation markers of species identity in two penaeid shrimp species: *Penaeus monodon fabricius* and *P. japonicus*[M]. *Bato*[j] *Aquaculture*, 1994: 127 – 135.
- [8] 张 辉, 陈宜瑜. 鲫不同种系线粒体 DNA 物理图谱的构建[J]. *水生生物学报*, 2000, 24(3): 219 – 227.
- [9] 王庆容, 李学英, 王大忠. 南方鮠 16S rRNA 基因扩增片段的 RFLP 研究[J]. *遵义医学院学报*, 2004, 27(4): 324 – 326.

RFLP of the Amplified Fragments of Mtdna 16SrRNA Gene of *Silurus Asotus*

WANG Qing-rong, WANG Da-zhong,
WANG Qian-xing, LI Xue-ying

Department of Biology, Zunyi Medical College, Zunyi Guizhou 563003, China

Abstract: The authors analyzed the restriction-fragment length polymorphism(RFLP)of the amplified fragment of 16SrRNA gene of mitochondrial DNA of *Silurus asotus* from five geographical populations. The five geographical populations include four populations (Panzhuhua'yalongjiang, Minjiang, Zigong and Wuyanghe) from the upper reach of the Changjiang river and the other populations(Wuyanghe) from the middle reach of Changjiang. 10 restriction enzymes were used to analyze the amplified fragments. Only Hae III produced restriction fragments length polymorphism. The results showed that there was no variation of restriction fragments length polymorphism on the gene of the four upper branch populations from the Changjiang river area. But there were some variations between the upper reach of Changjiang populations and the the middle reach's.

Key words: *Silurus asotus*; mitochondrial DNA; 16SrRNA; polymorphism

责任编辑 胡 杨