

# 六种海产虾类基因组 DNA 多态性的 RAPD 标记研究\*

宋林生 相建海 周岭华 张首临 刘瑞玉

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

**提要** 于1996年10月在青岛胶州湾附近海域采集中国对虾、细巧仿对虾、周氏新对虾、鹰爪虾、脊尾白虾和脊腹褐虾等6种不同科或不同属的海产虾类,用RAPD技术对其基因组DNA的多态性进行了研究。在事先优化的反应条件下,经20个随机引物扩增,共得到282条多态性片段,片段长度在230—2800bp之间。根据扩增片段的共享度计算出相对遗传距离指数,然后用UPGMA和NJ程序进行聚类分析,结果所显示的6种虾的亲缘关系与传统的分类结果基本一致,说明RAPD在海洋动物的遗传学研究中是一种有重要价值的遗传标记。

**关键词** RAPD 海产虾类 基因组DNA 遗传距离

**学科分类号** Q789

随机扩增多态性DNA(RAPD)技术是90年代发展起来的、以聚合酶链反应(PCR)技术为基础的分子生物学技术,目前已在陆地生物的研究中得到了广泛的应用,并取得许多进展(陈洪等,1995;刘旭东等,1996;陆军等,1994;王文等,1994;王义权等,1996;王振山等,1996;Comincini *et al.*,1996;Stothard *et al.*,1996;Virk *et al.*,1995;Wilhelmina *et al.*,1995)。但关于海洋生物尤其是海产虾类的研究,在国际上只有少量的报道(Garcia *et al.*,1995),而国内目前尚未见报道。本文报告用RAPD技术对不同科、属的6种海产虾类基因组DNA多态性的研究结果,并据此分析它们相互间的亲缘关系,以期探讨RAPD标记在海洋动物遗传多样性研究中的应用前景。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

实验所用的6种海产虾类分别为中国对虾(*Penaeus chinensis*)、细巧仿对虾(*Parapenaeopsis tenella*)、周氏新对虾(*Metapenaeus joyneri*)、鹰爪虾(*Trachypenaeus curvirostris*)、脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)和脊腹褐虾(*Crangon affinis*),均为1996年10月捕自青岛胶州湾口附近海域,在取样地点将新鲜样品置于液氮速冻,运回实验室于-20℃保存。

### 1.2 基因组DNA的提取

取100mg组织剪碎,加入500μl匀浆缓冲液(Tris-HCl 10mmol/L, pH=8.0;

\* 国家自然科学基金资助项目,39470141号;国家攀登计划B资助项目,PD-B6-5-3号;中国科学院院长基金资助项目,963054号。宋林生,男,出生于1966年1月,博士,研究员, E-mail: xbyc@ms.qdio.ac.cn

收稿日期:1996-12-11, 收修改稿日期:1998-04-28

EDTA 100mmol/L), 混匀后加入终浓度为 1% 的 SDS 和 100  $\mu\text{g/ml}$  的蛋白酶 K, 55  $^{\circ}\text{C}$  消化 3h, 然后分别用等体积的酚, 酚: 氯仿 (1:1), 氯仿: 异戊醇 (24:1) 抽提, 二倍体积乙醇沉淀, TE 溶解, 置 4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.3 随机引物

实验所用随机引物为 Operon 公司产品, 碱基序列如表 1 所示。

表1 随机引物及其碱基序列  
Tab.1 The sequences of the primers

引 物	序 列	引 物	序 列
V-01	TGACGCATGC	V-11	CTCGACAGAG
V-02	AGTCACTCCC	V-12	ACCCCCACT
V-03	CTCCCTGCAA	V-13	ACCCCCTGAA
V-04	CCCCTCACGA	V-14	AGATCCC GCC
V-05	TCCGAGAGGG	V-15	CAGTGCCGGT
V-06	ACGCCCAGGT	V-16	ACACCCCACA
V-07	GAAGCCAGCC	V-17	ACCGGCTTGT
V-08	GGACGGCGTT	V-18	TGGTGGCGTT
V-09	TGTACCCGTC	V-19	GGGTGTGCAG
V-10	GGACCTGCTG	V-20	CAGCATGGTC

### 1.4 PCR 反应

RAPD 反应条件与 Williams 等 (1990) 的报道基本相似, 基因组 DNA 在 PE9600 型 PCR 扩增仪上经 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 5min 后, 进行 45 个扩增循环, 每一循环包括 94  $^{\circ}\text{C}$  1min, 36  $^{\circ}\text{C}$  1min, 72  $^{\circ}\text{C}$  2min, 最后在 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10min。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离, EB 染色, 紫外灯光下观察、拍照。

### 1.5 数据处理

记录下电泳后清晰的扩增带, 进行数据统计, 将数据结果输入计算机, 用 PHYLIP3.5 程序对其进行处理。同时根据 Nei 等 (1979) 的公式:  $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$  (式中,  $N_{xy}$  为 X 和 Y 两个个体共有的扩增带;  $N_x, N_y$  为 X 和 Y 个体分别拥有的扩增带), 计算出随机扩增多态性 DNA 片段的共享度 (F) 和两个体间的平均遗传距离指数, 根据遗传距离指数再进行聚类分析。

## 2 结果

### 2.1 RAPD 图谱

实验中所用的 20 种引物都产生了扩增产物, 每一引物产生的扩增带在 10 个左右, 片断的大小在 230—2 800 bp 之间。图 1 为用引物 V-09、V-14—V-16、V-18—V-20 经 PCR 扩增后的电泳结果。20 种引物共扩增得到 282 条清晰稳定的扩增带, 将这些扩增带对应 6 种虾按 1 和 0 进行统计, 即出现对应的扩增带时记录为 1, 没有这条带时记录为 0, 然后输入计算机, 用 PHYLIP3.5 程序中自主叠代 (Bootstrap) 的方法进行 1 000 次叠代, 得到图 2 的结果。

14a 14a 14a 14b 14c 14d 14e 14f 15a 15a 15a 15b 15c 15d 15e 15f 16a 16a 16a 16b 16c 16d 16e 16f M



18f 18e 18d 18c 18b 18a 18a 18a M 19a 19a 19b 19c 19d 19e 19f 20a 20a 20a 20b 20c 20d 20e 20f M 9f 9c 9d 9c 9b 9a M

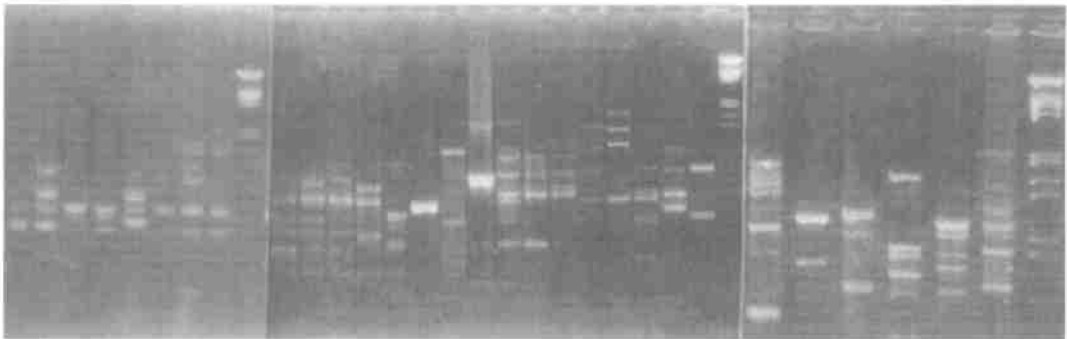


图1 六种海产虾类基因给DNA用随机引物V-09、V-14-V-16、V-18-V-20扩增产物电泳图

Fig.1 The electrophoresis patterns of RAPD from six species of marine shrimps after random amplified with primers V-09, V-14-V-16, V-18-V-20

图版中,9为引物V-09; 14—16为引物V-14—V-16; 18—20为引物V-18—V-20

a. 中国对虾; b. 细巧仿对虾; c. 周氏新对虾; d. 鹰爪虾; e. 脊尾白虾; f. 脊腹褐虾; M.  $\lambda$ DNA EcoR I/HindIII

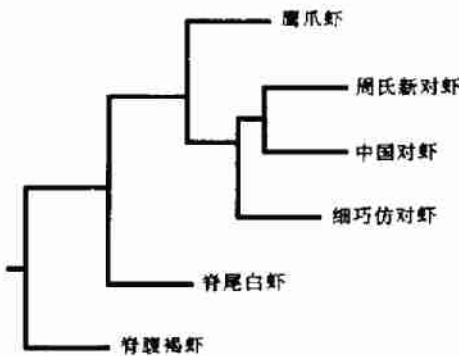


图2 根据扩增多态性片断的有无经1000次自主叠代得到的简约树

Fig.2 Parsimony tree based on 1000 bootstrap replicates with the present or absent of amplified polymorphic DNA fragments

### 2.2 数据分析

根据 Nei 等 (1979) 的公式, 计算了 6 种虾之间的随机扩增 DNA 片段的共享度 (表 2) 和相互间的遗传距离指数 (表 3), 将表 3 的结果输入计算机, 用 PHYLIP 3.5 软件中的 UPGMA 和 NJ 聚类分析方法进行处理, 得到图 3 的结果, 这些结果与图 2 的基本相似。

### 3 讨论

中国海产虾类种质遗传学的研究起步较晚, 目前所采用的遗传标记大多来源于表型变异、染色体的多态性和蛋白质的多态性。由于生物的形态和表型是遗传因素和环境因素相互作用的结果, 表型变异不能完全或真实地反

表2 六种虾随机扩增多态DNA片段共享度( $F$ )

Tab.2 The proportion of randomly amplified polymorphic DNA fragments shared among six species of marine shrimps

	中国对虾	细巧仿对虾	周氏新对虾	鹰爪虾	脊尾白虾	脊腹褐虾
中国对虾	1.000 00	0.344 26	0.344 83	0.243 48	0.162 60	0.108 10
细巧仿对虾	0.344 26	1.000 00	0.250 00	0.210 53	0.233 00	0.153 85
周氏新对虾	0.344 83	0.250 00	1.000 00	0.224 72	0.141 41	0.141 18
鹰爪虾	0.243 48	0.210 53	0.224 72	1.000 00	0.250 00	0.186 00
脊尾白虾	0.162 60	0.233 00	0.141 41	0.250 00	1.000 00	0.297 86
脊腹褐虾	0.108 10	0.153 85	0.141 18	0.186 00	0.297 86	1.000 00

表3 六种海产虾类间的遗传距离指数( $1-F$ )

Tab.3 The genetic distance of six species of marine shrimps

	中国对虾	细巧仿对虾	周氏新对虾	鹰爪虾	脊尾白虾	脊腹褐虾
中国对虾	0.000 00	0.655 74	0.655 17	0.756 57	0.837 40	0.891 90
细巧仿对虾	0.655 74	0.000 00	0.750 00	0.789 47	0.767 00	0.846 15
周氏新对虾	0.655 17	0.750 00	0.000 00	0.775 28	0.858 59	0.858 82
鹰爪虾	0.756 75	0.789 47	0.775 28	0.000 00	0.750 00	0.814 00
脊尾白虾	0.837 40	0.767 00	0.858 59	0.750 00	0.000 00	0.702 13
脊腹褐虾	0.891 90	0.846 15	0.858 82	0.814 00	0.702 13	0.000 00

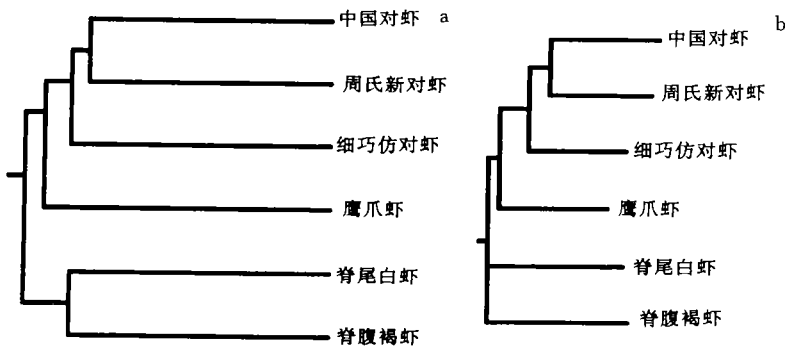


图3 根据遗传距离用UPGMA方法(a)和NJ方法(b)得到的系统树

Fig.3 Phylogenetic tree based on the genetic distance matrices with the method of UPGMA (a) and NJ (b)

映遗传变异。染色体的多态性对于生物遗传多样性的研究是十分重要的,但对于染色体数目相等、形态相似的物种或种群,或同一种群的不同个体来说,单纯用染色体的多态性来研究遗传多样性是不够的。研究蛋白质多态性的重要手段是同工酶电泳技术,但由于同工酶是基因的表达产物而不是基因的本身,因此常受环境及发育状态的影响。同时,同工酶所能分析的位点是有限的,根据有限的位点所得出的遗传多样性不可能完全代表整个基因组的真实情况。到目前为止,尽管已有不少研究者用不同的标记技术分别对一些海产虾类资源的种质遗传结构进行了研究,但尚未发展完善成为一套快速有效的种质鉴

定技术体系,所以对我国主要经济海产虾类的遗传结构和背景尚不十分清楚,对其遗传多样性如何进行保护尚不能制定出有效的措施和手段。

在 DNA 分子水平上研究海产虾类的亲缘关系及其演化过程,目前在国际上只有少量报道,国内尚未开展这方面的工作。为此,本文选取不同科以及不同属的 6 种海产虾类用 RAPD 技术进行初步研究,以探讨该技术在海产虾类的种质鉴定以及亲缘关系研究中的可行性。本研究所用的 6 种虾分属于十足目的两个亚目,前 4 种属于枝鳃亚目(Dendrobranchiata)的对虾总科(Penaeoidea),后 2 种属于腹胚亚目(Pleocyamata)的真虾总科(Caridea),差异较大。在这 6 种海产虾中,中国对虾、细巧仿对虾、周氏新对虾和鹰爪虾属于枝鳃亚目对虾总科中的 4 个不同属;脊尾白虾和脊腹褐虾分属于腹胚亚目真虾总科中长臂虾科和褐虾科。从 UPGMA 聚类分析的结果来看,脊尾白虾、脊腹褐虾与其它 4 种虾聚为两类,说明了真虾总科与对虾总科之间的区别。在对虾科中的 4 种虾分属于 4 个不同的属,从聚类图(图 3a)上可以看出它们亲缘关系,聚类的先后顺序反映了它们亲缘关系的远近,中国对虾首先与周氏新对虾聚在一起,然后再与细巧仿对虾、鹰爪虾聚在一起,说明中国对虾与周氏新对虾的亲缘关系较近,其次是细巧仿对虾,然后是鹰爪虾,这一结果与根据形态进行传统分类的结果(Dall *et al.*, 1990; 刘瑞玉, 1955)大体一致。在 NJ 聚类分析图(图 3b)上,脊尾白虾、脊腹褐虾与对虾科的 4 种虾首先聚为 3 类,而恰好它们分属对虾科、长臂虾科和褐虾科 3 个不同的科,相互之间遗传距离的大小基本上反映了它们间的亲缘关系,与 UPGMA 聚类分析的结果大体一致。在扩增出的多态性片段中。共享片段的多少反映了物种的亲缘关系,亲缘关系较远的物种间共享片段较少,反之则较多。在 282 条扩增片段中,6 种虾共享的片段只有两条,但在对虾科的 4 种虾中共享片段则有 10 条,亲缘关系较近的中国对虾和周氏新对虾间的共享片段为 21 条,这些共享片段以及每一物种的特征扩增片段对种质标准的确定以及种质鉴定技术的建立都是十分重要的。因此, RAPD 技术对于海洋生物学在分子水平上研究生物遗传多样性,确定物种的系统演化关系和分类地位,进行物种和种质的鉴定等方面具有十分广阔的应用前景。

## 参 考 文 献

- 王 文, 兰 宏, 宿 兵等. 1994. 云南四个少数民族的随机扩增多态 DNA 分析. 科学通报, 39(20): 1900—1903
- 王义权, 周开亚, 秦树臻. 1996. 用 RAPD 标记检测六种蛇基因组 DNA 多态性. 动物学报, 42(2): 172—181
- 王振山, 陈 洪, 朱立煌等. 1996. 中国普通野生稻遗传分化的 RAPD 研究. 植物学报, 38(9): 749—752
- 刘旭东, 相建海. 1996. 新的遗传标记技术——RAPD 及其在遗传分析中的应用. 海洋科学, 4: 45—47
- 刘瑞玉, 1955 中国北部的经济虾类. 北京: 科学出版社, 8—60
- 陈 洪, 朱立煌, 徐占臣等. 1995. RAPD 标记构建水稻分子连锁图. 植物学报 37(9): 677—684
- 陆 军, 钱惠荣, 壮杰云等. 1994. 应用 RAPD 标记快速鉴定水稻的抗稻瘟病基因. 科学通报, 39(22): 2 103—2 105
- Comincini S, Sironi M, Bandi C *et al.*, 1996. RAPD analysis of systematic relationships among the Cervidae. Heredity, 76: 215—221
- Dall W, Hill B J, Rothlisberg P C *et al.*, 1990. The biology of the Penaeoidea. Mar Biol, 27: 50—205
- Garcia D K, Benzie J A H, 1995. RAPD markers of potential use in penaeid prawn (*Penaeus monodon*) breeding programs. Aquaculture, 130: 137—144
- Nei M, Li W-H, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction

endonucleases. Proc Natl Acad Sci USA, 76:5 296—5 273

Stothard J R, Rollinson D, 1996. An evaluation of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for identification and phylogeny of freshwater snails of the genus *Bulinus* (Gastropoda: planorbidae), J Moll Stud, 62: 165—176

Virk P S, Ford-Lloyd B V, Jackson M T *et al*, 1995. Use of RAPD for the study of diversity within plant germplasm collections. Heredity, 74:170—179

Wilhelmina T G, Van de Ven, Mnicol R J, 1995. The use of RAPD markers for the identification of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) clones. Heredity, 75:126—132

Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J *et al*, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl Acids Res, 18(22):6 531—6 535

## STUDIES OF RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD) MARKERS ON GENOMIC DNA POLYMORPHISM IN SIX SPECIES OF MARINE SHRIMP

SONG Lin-sheng, XIANG Jian-hai, ZHOU Ling-hua, ZHANG Shou-lin,  
LIU Rui-yu (J. Y. Liu)

(*Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071*)

**Abstract** Random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was applied to study the polymorphism of genomic DNA of six marine shrimps in different families or genres *Penaeus chinensis*, *Parapenaeopsis tenella*, *Metapenaeus joyneri*, *Trachypenaeus curvirostris*, *Exopalaemon carinicauda* and *Crangon affinis*, which were collected from Jiaozhou Bay, Qingdao in Oct. 1996. Amplifications with 20 primers under predetermined optimal reaction conditions (samples were first heated at 94°C for 5 min. and followed by 45 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 36°C, and 2 min at 72°C, then held at 72°C for 10 min.) gave 282 reproducible amplified fragments ranging between 230 and 2 800bp. The amplified fragments were scored as present (1) or absent (0) for each DNA sample and an index of degree of band sharing ( $F$ ) was calculated by using Nei and Li's matching coefficient method. The value of  $(1 - F)$  was used to evaluate genetic distances between species. The phylogenetic trees were constructed with the method of bootstrap on the basis of the presence and absence of the amplified polymorphic DNA fragments, and with the methods of UPGMA and NJ on the basis of genetic distances. The results from the three methods of cluster analysis are similar in general, and the relationships indicated by the phylogenetic trees show the difference between orders, families, genus and species. The results are in good overall agreement with classical taxonomy. It is suggested that random amplified polymorphic DNA (RAPD) approaches are as useful in providing markers for marine animal genetics as they have been for other species.

**Key words** RAPD Marine shrimp Genomic DNA Genetic distance

**Subject classification number** Q789