

曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)ISSR 体系优化 及养殖群体遗传多样性分析*

徐梅英^{1,2} 叶莹莹¹ 郭宝英¹ 祁鹏志² 吴常文¹

(1. 浙江海洋学院海洋科学学院 浙江省海洋养殖装备与工程技术重点实验室 舟山 316004;

2. 浙江大海洋科技有限公司 舟山 316004)

摘要 采用 ISSR-PCR 技术对曼氏无针乌贼基因组 DNA 进行扩增, 筛选分析了 ISSR-PCR 扩增时的主要影响因子, 包括 Mg^{2+} 浓度、引物浓度、dNTPs 浓度、*Taq* 酶浓度以及退火温度, 并用 8 条 ISSR 引物对舟山养殖群体进行了遗传多样性分析, 最终确立的适用于曼氏无针乌贼 ISSR 扩增的 25 μ l 反应体系为: Mg^{2+} 1.5mmol/L, *Taq* DNA 聚合酶 1.0U, 引物 0.15 μ mol/L, dNTPs 2.0mmol/L, 退火温度为 52.2 $^{\circ}C$ 。结果表明, 扩增得到 70 个清晰的扩增位点, 其中多态性位点 60 个, 多态位点率为 85.71%, Nei's 基因多样性为 0.3105 ± 0.1760 , Shannon's 多样性指数为 0.4610 ± 0.2397 。本研究结果表明, 舟山曼氏无针乌贼养殖群体遗传多样性较丰富, 因此舟山曼氏无针乌贼养殖群体可能有比较高的适应生存的能力, 蕴藏着比较大的进化潜能及比较丰富的育种潜力。

关键词 曼氏无针乌贼, ISSR, 体系优化, 遗传多样性

中图分类号 Q955

曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)俗称墨鱼、墨斗鱼、海猫等, 曾广泛分布于俄罗斯远东海、日本濑户内海、朝鲜西南海岸和我国邻近海域(常抗美等, 2008), 是我国四大海产之一。有关其遗传学方面的文章较少, 目前仅见其遗传多样性的 RAPD 分析(励迪平等, 2008)以及养殖对群体遗传多样性的影响(宋微微等, 2009)等报道。

ISSR (Inter-simple Sequence Repeats), 即简单重复序列区间, 是一种 DNA 分子标记技术, 目前已广泛应用 Charters *et al*, 1996; Nagaoka *et al*, 1997), 但在水产动物中应用较少(李跃华等, 2009; 张波等, 2008; 杨太有等, 2008), 在头足类中的应用尚属空白。

本研究以曼氏无针乌贼 DNA 为模板, 建立曼氏无针乌贼 ISSR-PCR 优化扩增体系, 采用 ISSR 标记

对养殖群体进行遗传多样性分析, 旨在筛选出能够显示曼氏无针乌贼群体差异的 ISSR 引物, 摸索出最佳的 ISSR-PCR 反应条件, 揭示其遗传多样性水平。为我国曼氏无针乌贼种质资源的保护利用以及生产实践提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni*)采自于浙江大海洋科技有限公司秀山苗种繁育基地, 活体运输回实验室后, 解剖取样品外套膜肌肉组织于 $-74^{\circ}C$ 超低温冰箱保存备用。

1.2 基因组 DNA 的制备

曼氏无针乌贼基因组 DNA 的提取基本参照《分

* 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目: 名贵头足类苗种规模繁育关键技术, 2010AA10A404 号; 国家海洋公益性行业科研专项, 201005013 号; 海洋渔业科学与技术浙江省重中之重学科开放课题, 20100105 号; 浙江海洋学院人才引进启动项目, 21135011509 号; 国家科技部科技支撑计划: 东海区优势种类扩繁及高效健康养殖技术集成与示范, 2011BAD13B08 号。徐梅英, E-mail: xmy5530@163.com

通讯作者: 吴常文, 教授, E-mail: wucw08@126.com

收稿日期: 2010-10-16, 收修改稿日期: 2010-12-27

子克隆实验指南》(Sambrook *et al.*, 2002), 略有改进, DNA 自然风干后, 加入 100 μ l 双蒸水溶解, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其质量后, 于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3 实验设计

参照加拿大哥伦比亚大学 UBC 公司公布的 ISSR 引物序列(University of British Columbia, Set No.9, No.801—900), 共 100 条, 引物由上海英骏公司合成。初次筛选引物时, 从 100 条 ISSR 引物中筛选出扩增产物稳定、条带清晰、重复性好且多态性丰富的 8 条引物用于扩增, 从已筛选出的引物中, 选取扩增效果最好的两条引物(835 和 857)来进行优化实验, 以确定最适的反应体系。8 条引物利用优化后的条件, 对舟山养殖群体进行 PCR 扩增。

1.3.1 ISSR 反应条件的优化 从已筛选出的引物中, 选取扩增效果最好的两条引物 835 和 857, 对曼氏无针乌贼 Mg^{2+} 浓度、引物浓度、dNTPs 浓度、*Taq* 酶浓度以及退火温度等 PCR 反应条件进行梯度实验。筛选出理想的浓度后进行下一个因素实验。预设 PCR 反应体系为 25 μ l: 10 Buffer 2.5 μ l, Mg^{2+} 1.5 μ l (2.5 mmol/L), 引物 1 μ l (10 μ mol/L), dNTP 2 μ l (2.5 μ mol/L), *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μ l (Takara, 5U/ μ l) 0.2 μ l, 用 ddH₂O 补足体积。PCR 扩增程序设置为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 94 $^{\circ}$ C 变性 45s, 52 $^{\circ}$ C 退火 40s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90s, 共 38 个循环; 最后一个循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min, 4 $^{\circ}$ C 保存。为了保证实验的可信度, 均采用同一模板, 所有 PCR 扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳分离, 经溴化乙锭染色, 凝胶成像系统拍照记录结果。

1.3.2 养殖群体遗传多样性的分析 用已筛选出的 8 条引物(表 1), 按照已优化出的 PCR 反应条件, 对舟山养殖群体进行 PCR 扩增, 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳分离, 经溴化乙锭染色, 凝胶成像系统拍照记录结果。

表 1 8 条引物及其序列

Tab.1 Nucleotide sequences of 8 ISSR primers

引物编号	引物序列号(5'—3')
807	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGT-3'
808	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGC-3'
825	5'-ACACACACACACACT-3'
826	5'-ACACACACACACACC-3'
835	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGYC-3'
857	5'-ACACACACACACACYG-3'
861	5'-ACCACCACCACCACC-3'
881	5'-GGGTGGGGTGGGGT-3'

2 结果与分析

2.1 PCR 反应条件的优化

2.1.1 Mg^{2+} 浓度 Mg^{2+} 浓度是影响 PCR 结果的重要变量之一, 对 PCR 扩增效率影响很大。*Taq* DNA 聚合酶是 Mg^{2+} 依赖性酶, 对 Mg^{2+} 浓度非常敏感, Mg^{2+} 浓度过高反应特异性降低, 出现非特异扩增, 浓度过低会降低 *Taq* DNA 聚合酶的活性, 使反应产物减少, 甚至使 PCR 扩增失败而不出扩增条带。dNTPs、引物、扩增产物、模板 DNA 等都会与 Mg^{2+} 结合, 且 Mg^{2+} 浓度对引物和模板双链杂交体的解链与退火温度也有影响。因此, Mg^{2+} 浓度是决定扩增效果的一个重要因子。本研究对 Mg^{2+} 浓度设置了 5 个梯度, 分别为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0mmol/L。从图 1A 可以看出, Mg^{2+} 浓度为 1.5mmol/L 时, 扩增条带最多, 且最清晰。当 Mg^{2+} 浓度较低时, 扩增片段减少; 而 Mg^{2+} 浓度较高时, 扩增片段产生弥散。

2.1.2 *Taq* DNA 聚合酶的用量 PCR 扩增属于酶促反应, 在 *Taq* DNA 聚合酶的作用下, 以 dNTPs 为原料自动合成新的 DNA 链。同时, *Taq* 酶的用量也受到反应体系中其它因素的影响。当 *Taq* DNA 聚合酶的浓度过高时, 不仅成本过高, 还可引起非特异性扩增; 浓度过低, 则扩增条带不明显, 合成产物量减少。本研究设置了 4 个梯度, 分别为: 0.5U、1.0U、1.5U、2.0U。由图 1B 可以看出, 1.0U 时条带最清晰, 且没有弥散现象。

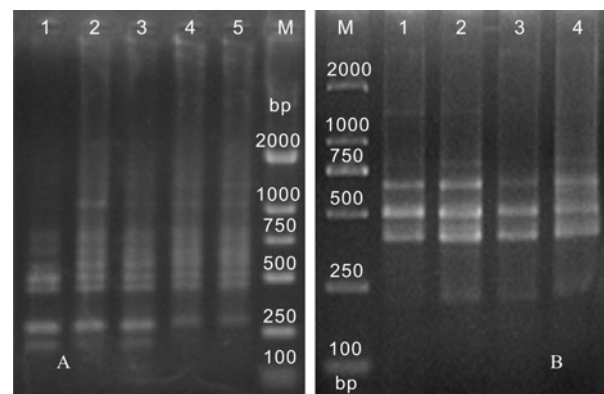


图 1 Mg^{2+} 浓度(A)和 *Taq* DNA 聚合酶的用量(B)对 PCR 反应的影响

Fig.1 The effects of Mg^{2+} concentration (A) and *Taq* DNA polymerase dosage (B) on PCR amplification
M 为 DL2000 DNA marker; A: 1—5 表示 Mg^{2+} 浓度分别为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0mmol/L;
B: 1—5 表示 *Taq* DNA 聚合酶用量分别为 0.5、1.0、1.5、2.0U

2.1.3 引物浓度 引物是 PCR 特异性反应的关键, PCR 产物的特异性取决于引物与模板 DNA 互补的程度。适宜的引物浓度对提高产物特异性、清楚背景及消除杂带等非常重要。引物浓度过高, 会引起模板和引物的错配, 降低反应特异性, 增大形成引物二聚体的概率; 引物浓度过低, 则无法测出所有的 ISSR 位点, 影响实验结果。本研究设置了 5 个浓度梯度, 分别是 0.05、0.1、0.15、0.2、0.25 $\mu\text{mol/L}$ 。由图 2A 可以看出, 当浓度为 0.15 $\mu\text{mol/L}$ 时, 扩增条带最多且最清晰。浓度低于 0.15 $\mu\text{mol/L}$, 条带减少; 浓度高于 0.15 $\mu\text{mol/L}$, 出现弥散现象。

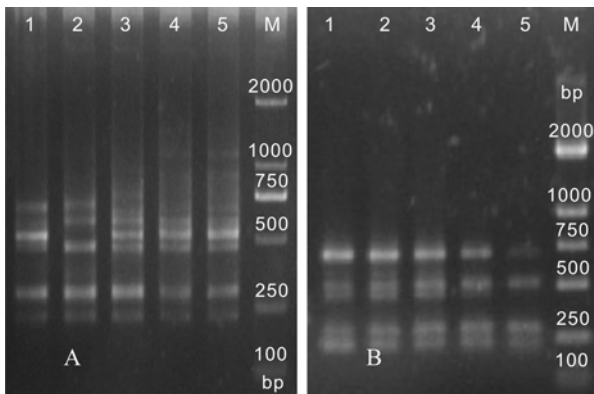


图 2 引物浓度(A)和 dNTPs 浓度(B)对 PCR 反应的影响
Fig.2 The effects of the primer concentration (A) and dNTPs concentration (B) on PCR amplification

M 为 DL2000 DNA marker; A: 1—5 表示引物浓度分别为 0.05、0.1、0.15、0.2、0.25 $\mu\text{mol/L}$; B: 1—5 表示 dNTPs 浓度分别为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mmol/L

2.1.4 dNTPs 浓度 dNTPs 是 PCR 的原料, 浓度过高会增加 PCR 的错配率, 从而出现非特异性扩增; 浓度过低又会影响到合成效率及扩增效果, 甚至会因过早消耗而使产物单链化。此外, dNTPs 中的磷酸基可与游离的 Mg^{2+} 结合, 只有当 dNTPs 浓度与 Mg^{2+} 浓度比例在一定范围内, 才能扩增出高质量的图谱。本研究对 dNTPs 设置了 5 个浓度梯度, 分别 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mmol/L 。从图 2B 可以看出, 当 dNTPs 浓度为 2.0 mmol/L 时, 扩增效果最好; 浓度过高或过低, 条带均减弱。

2.1.5 退火温度 在 PCR 扩增反应中, 退火温度也是影响扩增效果的重要环节之一, 引物退火温度受碱基序列长短和 GC 含量的影响, 不同引物的退火温度并非完全相同。退火就是使引物和模板 DNA 复性, 如果温度过高, 引物不能与模板很好地复性, 扩增效率低; 而温度过低, 引物将产生非特异性复性,

导致非特异 DNA 片段的扩增。目前大多数 ISSR 实验所采用的退火温度为 52 $^{\circ}\text{C}$ 。本研究在 52 $^{\circ}\text{C}$ 上下设置了 6 个退火温度梯度, 分别是 48 $^{\circ}\text{C}$ 、49.2 $^{\circ}\text{C}$ 、50 $^{\circ}\text{C}$ 、51 $^{\circ}\text{C}$ 、52.2 $^{\circ}\text{C}$ 、54 $^{\circ}\text{C}$ 。从图 3 可以看出, 退火温度在 52.2 $^{\circ}\text{C}$ 效果最好, 扩增出的条带较清晰。

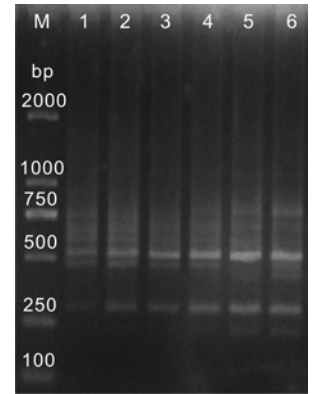


图 3 退火温度对 PCR 反应的影响

Fig.3 The effects of the anneal temperature on PCR amplification

2.2 养殖群体遗传多样性分析

2.2.1 数据统计与分析 在琼脂糖凝胶电泳图谱中, 同一引物扩增产物中电泳迁移率一致的条带被认为属于同一位点。进行人工读带, 统计各个样品的扩增带, 同一引物扩增的电泳迁移率一致的条带

被认为具有同源性, 即同一位点的产物, 有带记为 1, 无带记为 0, 建立(0、1)数据矩阵。并对下列指标进行统计分析。

多态位点比例 $P = (\text{多态位点数} / \text{位点总数}) \times 100\%$,

Nei's 的基因多样性 $H = 1 - \sum X_i^2$ 。

Shannon 信息指数 $I = - \sum X_i \ln X_i$, 其中, X_i 为位点 i 在某一群体中的出现频率。以上分析采用 POPGENE Version1.32 软件进行统计。

2.2.2 ISSR-PCR 扩增结果 在筛选出的 8 条引物中, 共扩增出 70 个清晰的扩增位点, 其中多态性位点 60 个, 多态位点率为 85.71%。每个引物扩增的条带数为 6—11 条。扩增片段大小在 200—2000bp 之间, 见图 4。由表 2 可知, Nei's 基因多样性为 0.3105 \pm 0.1760, Shannon's 多样性指数为 0.4610 \pm 0.2397。

3 讨论

3.1 ISSR 体系优化

曼氏无针乌贼为我国重要海产资源之一, 由于其生活周期短(通常为一年)、生长快、营养价值高等特性, 而成为海水养殖业中引人关注的种类(王如才等, 2008)。由于过度捕捞等原因, 现今种质资源严重退化, 已濒临枯竭。开展养殖、增殖放流等手段进行资源修复势在必行, 利用分子标记手段研究曼氏无针乌贼的遗传多样性, 对研究其资源退化原因及其

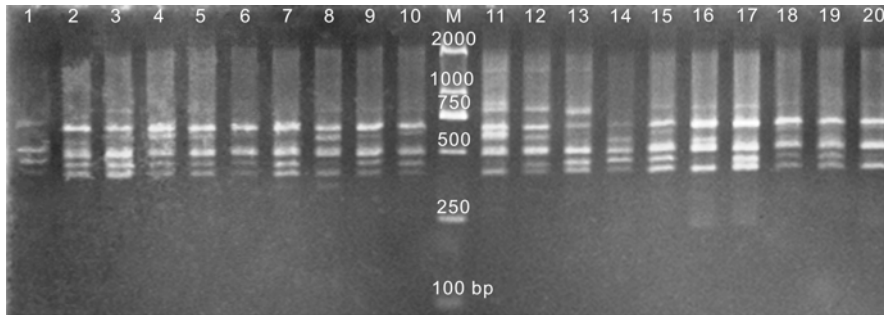


图4 优化 ISSR-PCR 体系引物 857 对曼氏无针乌贼舟山养殖群体 PCR 扩增的结果
Fig.4 PCR amplification results of the optimized ISSR-PCR system of Zhoushan cultured *S. maindroni* with primer 857

表 2 养殖群体 20 个个体的遗传多样性指数
Tab.2 20 specimens of cultured population's genetic diversity index

引物编号	Nei's 基因多样性(<i>H</i>)	Shannon's 多样性指数(<i>I</i>)
807	0.4156	0.6029
808	0.3205	0.4769
825	0.3957	0.5606
826	0.382	0.4907
835	0.305	0.4656
857	0.2352	0.3548
861	0.1423	0.2207
881	0.2874	0.4327
平均值±SD	0.3105±0.1760	0.4610±0.2397

资源保护、生产实践具有重要指导意义。

本研究的 ISSR 标记采用 17—22 碱基的重复锚定引物扩增重复序列之间的片段, 使用比 RAPD 引物更长的引物, 克服了 RAPD 标记稳定性和重复性差等缺点, 操作简单, 重复性好, 多态性丰富。目前, ISSR 与 SSR 相比, 能检测出更多的多态性, 且一套 ISSR 引物可在多个物种中通用, 利用率高, 在遗传关系研究方面的应用前景更广阔(蒋彩虹等, 2007)。并且 ISSR 标记无需构建基因文库、杂交和同位素显示等步骤, 重复序列和锚定碱基的选择是随机的, 无需知道任何靶标序列的 SSR 背景信息, 从而降低了技术难度和实验成本。无需活材料, 无组织器官特异性, 能实现全基因组无编码取样: 采用了较长的引物, 退火温度较高, 因此, 引物具有更强的专一性, 增强了实验的可重复性。

PCR 反应体系对 ISSR 扩增效果的影响很大, 因此, ISSR-PCR 扩增体系中各因子的浓度的选择十分重要, 关系到扩增条带的真实性、多样性和可重复性。此外, 不同的物种对 ISSR-PCR 反应条件有所差

异, 因此对曼氏无针乌贼 ISSR-PCR 反应进行体系优化是十分必要的。

本研究首次以曼氏无针乌贼基因组 DNA 为模板, 进行 ISSR-PCR 反应体系优化, 得出结果可知: Mg^{2+} 浓度的大小直接影响扩增条带的清晰程度和背景的深浅; dNTPs 是 PCR 反应的原料, 浓度过高易导致错配, 浓度过低则会影响有效条带的强度; 引物浓度的大小对产物的特异性有着

重要的影响; DNA 聚合酶浓度直接关系着产物的合成效率及成本, 且浓度过高易产生非特异性扩增; 退火温度是影响 PCR 特异性的较重要因素, 过高过低都会减少扩增条带, 降低特异性。

3.2 养殖群体的遗传多样性

遗传多样性是生物多样性研究的重要内容, 而种群内的遗传多样性也是种群间以及物种间遗传多样性的基础。最大限度地维持种内遗传多样性水平是持续利用种质资源的前提和保证。同时, 对种内遗传多样性的研究在进行种质鉴定和亲本选择时具有重要的现实意义(陈灵芝, 1993)。但基于 ISSR 技术所反映的物种遗传多样性的定向迄今尚无一个定量的标准, 也没有系统的研究记录可做比较, 与相同技术对缙蛭(牛东红等, 2009)、松江鲈鱼(徐建荣等, 2009)和赤眼鲟(杨太有等, 2008)的结果比较, 舟山曼氏无针乌贼养殖群体的多态位点比例、Nei's 多样性和 Shannon's 多样性指数均较高, 说明舟山曼氏无针乌贼养殖群体的遗传多样性较为丰富。虽然由于头足类的分类地位与贝类、鱼类相差较远, 可能导致它们彼此之间在遗传分化水平上存在差异, 但上述比较结果也可以在一定程度上间接反映出曼氏无针乌贼的遗传多样性水平。本研究没有将养殖群体与野生群体, 或更多不同群体之间的遗传差异进行分析比较, 今后将补充此方面研究。

本研究中曼氏无针乌贼均为养殖个体, 因而避免不了近亲交配等因素对群体遗传多样性的不利影响, 但是从遗传学角度来看, 一个物种遗传多样性的高低与其适应能力、生存能力和进化潜力有密切的关系(姜因萍等, 2008)。因此, 舟山曼氏无针乌贼养殖群体可能有比较高的适应生存的能力, 蕴藏着比较大的进化潜能及比较丰富的育种潜力。但目前我国曼氏

无针乌贼资源急剧衰退,在这种情况下,采取合理措施保护野生曼氏无针乌贼资源十分必要。可以从以下几个方面着手,如曼氏无针乌贼的人工育苗、产卵场的修复、增殖放流、生境保护等,同时还应该避免人为的过度捕捞。本研究通过 ISSR 标记技术对曼氏无针乌贼舟山养殖群体遗传多样性进行分析,以期对整个曼氏无针乌贼分子水平的遗传多样性研究提供依据。

参 考 文 献

- 王如才,王昭萍,2008. 贝类养殖学. 青岛:中国海洋大学出版社,484—490
- 李跃华,陈婵娟,许志强等,2009. 三角帆蚌 ISSR-PCR 优化反应体系的建立. 江苏农业科学, (2): 61—64
- 杨太有,关建义,陈宏喜等,2008. 丹江口水库赤眼鲮 (*Squaliobarbus curriculus*) 遗传多样性的 RAPD 和 ISSR 分析. 海洋与湖沼, 39(2): 157—161
- 励迪平,王春琳,朱悦,2008. 曼氏无针乌贼遗传多样性的 RAPD 分析. 水利渔业, 28(4): 21—24
- 宋微微,王春琳,2009. 养殖对曼氏无针乌贼 (*Sepiella maindroni*) 群体遗传多样性的影响. 海洋与湖沼, 40(5): 590—595
- 张波,孟学平,陈建安,2008. 西施舌 ISSR-PCR 扩增条件优化. 海洋湖沼通报, (1): 47—51
- 陈灵芝,1993. 中国的生物多样性: 现状及其保护对策. 北京: 科学出版社, 99—113
- 姜因萍,何毛贤,黄良民等,2008. 两个大珠母贝群体遗传多样性的 ISSR 分析. 热带海洋学报, 27(3): 61—65
- 常抗美,吴常文,吕振明等,2008. 曼氏无针乌贼 (*Sepiella maindroni*) 野生及养殖群体的生化特征及其形成机制的研究. 海洋与湖沼, 39(2): 145—151
- 蒋彩虹,王元英,孙玉合,2007. SSR 和 ISSR 标记技术应用进展. 中国烟草科学, 28(2): 1—5
- 樊晓旭,王春琳,邵银文等,2008. 投喂四种饵料对曼氏无针乌贼 (*Sepiella maindroni*) 繁殖性能的影响. 海洋与湖沼, 39(6): 634—642
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, 2002. 黄培堂译, 2004. 分子克隆实验指南 (第 3 版). 北京: 科学出版社, 463—471
- Charter Y M, Robertson A, Wilkinson M J *et al*, 1996. PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L. ssp. *oleifers*) using 5'-anchored simple sequence repeat (SSR) primers. Theor Appl Genet, 92: 442—447
- Nagaoka T, Ogihara Y, 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA makers in comparison to RFLP and RAPD markers. Theor Appl Genet, 94: 597—602

OPTIMIZATION OF THE ISSR SYSTEM FOR *SEPIELLA MAINDRONI* AND ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY OF THE CULTURED POPULATION

XU Mei-Ying^{1,2}, YE Ying-Ying¹, GUO Bao-Ying¹, QI Peng-Zhi², WU Chang-Wen¹

(1. Marine Science College of Zhejiang Ocean University, Key Laboratory of Mariculture Equipments and Engineering Technology of Zhejiang Province, Zhoushan, 316004; 2. Zhejiang Dahaiyang Science and Technology Co., Ltd., Zhoushan, 316004)

Abstract In this study, ISSR-PCR amplification technology was adopted on *Sepiella maindroni* genome DNA, and the effect of Mg²⁺ concentration, *Taq* DNA polymerase, dNTPs, primer and the annealing temperature on the ISSR-PCR amplification was analyzed. 8 ISSR primers were used to assess the genetic diversity of Zhoushan cultured *S. maindroni*, and established the suitable ISSR-PCR system with a total volume of 25 μl was as followed: Mg²⁺ 1.5 mmol/L, *Taq* DNA polymerase 1.0U, primer 0.15 μmol/L, dNTPs 2.0 mmol/L, and the annealing temperature is 52.2 °C. Of the 70 ISSR loci tested, 60 (85.71%) were polymorphic, Nei's genetic diversity is 0.3105±0.1760, Shannon's information index is 0.4610±0.2397. The results of this study showed that there was a higher genetic diversity level in the Zhoushan cultured population of *S. maindroni*. Therefore, Zhoushan cultured *S. maindroni* maybe have higher adapt ability to survive, containing larger evolution potential and relatively rich breeding potential.

Key words *Sepiella maindroni*, ISSR, System optimization, Genetic Diversity