

文蛤(*Meretrix meretrix*)地理种群 ISSR 分子标记的初步研究

陈大鹏¹ 沈怀舜² 丁亚平² 杨家新¹ 沈颂东³ 许璞²

(1. 南京师范大学生命科学学院 210097 江苏 南京)

(2. 江苏省海洋与水产研究所 226007 江苏 南通)

(3. 苏州大学生命与科学学院 215021 江苏 苏州)

[摘要] 利用 ISSR(Inter Simple Sequence Repeat) 技术对文蛤(*Meretrix meretrix*) 江苏和辽宁两个地理种群进行了 PCR 扩增. 从 100 条 ISSR 引物中筛选出引物 13 条, 每条引物检测出位点数 1 到 8. 平均每条引物可检测到位点数 4.6 个. 实验结果表明 江苏文蛤的位点多态性(80.7%) 高于辽宁文蛤的位点多态性(68.4%) 种群内平均遗传距离分别为 0.3105 ± 0.090 和 0.2658 ± 0.044 , 江苏文蛤也高于辽宁文蛤. 从筛选得到的引物可以发现, 文蛤简单重复序列中 A、G 碱基含量较高. 通过对不同实验条件的对比, 对 ISSR-PCR 反应体系进行了优化.

[关键词] ISSR-PCR, 文蛤(*Meretrix meretrix*), DNA

[中图分类号] Q958.2, [文献标识码] A, [文章编号] 1001-4616(2004)03-0074-04

ISSR(inter-simple sequence repeats, 简单重复序列中间区域)是 Zietkiewicz 等^[1]创建的一种新型微卫星类分子标记技术. 在真核生物的基因组中广泛存在着的以 1~6 个碱基为一个单位呈串联状重复排列的序列称为简单重复序列(simple sequence repeats, SSR), 又称为微卫星(microsatellite)序列. ISSR 分子标记技术就是利用简单重复序列设计引物, 即引物主要由 1~4 个碱基组成的重复序列, 通常在引物的 3' 端或 5' 端加几个非重复的锚定碱基以保证引物与基因组 DNA 中的 SSR 的 3' 或 5' 端结合.

与其他的分子标记技术相比, ISSR 标记技术具有操作简单、稳定、可重复性好及多态性高等优点^[2], 在种质鉴定、遗传育种等领域具有广阔的前景. 该技术目前已在重要的农作物及果树等物种上得到广泛的应用, 如中国疣粒野生稻^[3]、中国和瑞典油菜^[2]等遗传性状相关标记的选择、品系鉴定、遗传多样性的分析等方面研究. 但目前在水产领域、软体动物方面的应用研究的报道尚少见. 本研究用 ISSR-PCR 技术对江苏文蛤与辽宁文蛤两个地理种群进行了初步的遗传分析.

1 材料与方法

1.1 基因组 DNA 的提取

实验所用江苏文蛤采集于江苏省南通市吕四海区和辽宁省大连市沿海. 在实验室 2~3 d 暂养后, -20℃ 保存. CTAB 方法提取 DNA. 取斧足肌, 加 ctab 缓冲液 3%(质量分数)十六烷基三甲基溴化铵, 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 0.2%β-巯基乙醇, 700~1 000 μL, 冰浴下充分研磨, 60~65℃ 水浴中消化 50~60 min, 加等体积的酚:氯仿:异戊醇(体积比为 25:24:1)混合液抽提 5 min, 4℃ 下 10 000 r/min 离心 10 min. 取上清液, 加 2/3 体积的异丙醇, -20℃ 下充分沉淀. 于室温下 5 000 r/min 离心 10 min, 用 70% 乙醇洗沉淀, 干燥, 加 100 μL 双蒸水溶解, -20℃ 保存备用.

1.2 PCR 反应体系

实验所用的 ISSR 引物为加拿大 British Columbia 大学提供的成套引物. PCR 反应体系为: 总体积为 25 μL, 其中 Mg^{2+} 2.5 mmol/L, dNTP 0.25 mmol/L, ISSR 引物 0.2 μmol/L, 模板 DNA 20 ng, 1.5 U Taq DNA 聚合酶. 上面覆盖石蜡油. 反应程序为 94℃ 预变性 5 min, 然后进入 PCR 循环, 即 94℃ 变性 45 s, 52℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 90 s, 共进行 45 个循环. 最后 72℃ 延伸 10 min. 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳(电泳中含终浓度为 0.5 μg/mL 溴化乙锭)分离, 经紫外分析仪观察结果并拍照.

收稿日期: 2004-04-09.

基金项目: 江苏省科技厅水产三项工程资助项目(00KJB240001).

作者简介: 陈大鹏, 1980-, 南京师范大学生命科学学院硕士研究生, 主要从事分子生物学的学习与研究. E-mail: cdp_1980@163.com

通讯作者: 许璞, 1953-, 江苏省海洋与水产研究所研究员, 主要从事海洋生物技术及水产增养殖学研究.

万方数据

1.3 数据处理

将电泳结果条带的有无转化为 1、0 的数字矩阵.根据 Nei 等(1997)的公式:

$$F = 2N_{xy} / (N_x + N_y),$$

计算扩增片段之间的遗传相似系数和遗传距离.

2 结果与讨论

2.1 PCR 反应条件的优化

影响 PCR 反应的因素比较多,本实验用 808 引物对 Mg^{2+} 、dNTP、模板、引物及退火温度等反应因子进行了优化,结果如下:

2.1.1 Mg^{2+} 、dNTP 浓度对 PCR 结果的影响

在 PCR 反应中,Taq DNA 聚合酶是 Mg^{2+} 的依赖性酶,对 Mg^{2+} 浓度非常敏感.王伟继等(2001)^[4]在对虾的 ISSR-PCR 分析中,采用的 Mg^{2+} 浓度为 1.5 ~ 2.0 mmol/L.本实验对所用的文蛤样品设计了 5 个 Mg^{2+} 浓度梯度:1、1.5、2、2.5、3 mmol/L.从本实验结果来看,除了 Mg^{2+} 为 1 mmol/L 以外,其余的均能扩增出结果,且差别并不明显.在对 dNTP 进行的 5 个浓度梯度 0.1、0.15、0.2、0.25、0.3 mmol/L 实验中,5 种 dNTP 浓度均能扩增出较好的结果.

2.1.2 引物和模板浓度

引物浓度是 PCR 反应体系的重要影响因素. Hobbs(引物提供者)推荐的标准引物浓度为 0.2 μ mol/L,吕林兰等(2003)^[5]对马氏珠母贝的 ISSR-PCR 反应中引物浓度为 1 mol/L.本文设计了 5 个浓度:0.1、0.2、0.3、0.5、1 μ mol/L,从扩增结果来看,引物浓度的增加,电泳条带的亮度明显增加.浓度为 0.1 μ mol/L 时,条带很弱;当浓度增加至 1 μ mol/L 时,出现非特异性条带.从本实验对文蛤的 ISSR-PCR 反应体系采用 0.2 ~ 0.3 μ mol/L 的引物浓度比较合适.余艳等(2002)^[6]在对植物的研究中认为 ISSR-PCR 反应体系中 3 ~ 60 ng 的模板浓度均可以扩增出基本相同的带型,本实验对反应体系中 10 ~ 50 ng 浓度的模板的扩增也都可以得到比较理想的结果.

2.1.3 退火温度

本实验采用的由 University of British Columbia 提供的 100 条 ISSR 引物.根据公式计算的退火温度大多为 55 ~ 56℃,本实验中大多数引物采用 52℃ 为退火温度.根据公式,对 GC 含量高的引物,可将退火温度适当提高,而对 AT 含量高的引物,其退火温度则较低.本实验中,对引物 865、867、870、862,将退火温度提高到 60℃,对引物 803、805、835、838 将退火温度降至 30℃,这两组实验均做退火温度为 52℃ 的对照实验.实验结果:在退火温度 52℃ 时,第一组只有 865 有很弱的条带走出,第二组均无结果.退火温度 60℃ 时,867 没有结果,862、870 有拖带现象,865 产生较弱的可分辨条带.退火温度为 30℃ 时,只有 835 有很弱的产物,其余均没有扩增出条带.

2.2 PCR 扩增和引物筛选结果

用 100 个引物(UBC Primer Set # 9) 801 ~ 900 对江苏文蛤和辽宁文蛤共 12 个样品进行扩增反应,对从中挑选出的 13 个引物进行分析.图 1 分别为 808、809、881 经 PCR 扩增后的电泳结果,从中筛选出 13 条可以扩增出清晰条带的引物.每条引物检测出的位点数从 1 到 8 不等,平均每条引物可检测到位点数 4.6 个.所筛选的引物序列及扩增条带和多态性条带数目见表 1.

从表 1 可以得出江苏文蛤的位点多态性为 80.7%,高于辽宁文蛤的 68.4%.从筛选的引物序列可以看出,两

万方数据

表 1 筛选引物序列及扩增条带和多态性条带数目

引物编号	引物序列(5' ~ 3')	扩增总条带数		多态性条带数	
		JW*	LW*	JW	LW
807	AGA GAG AGA GAG AGA AC	4	5	3	4
808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	7	8	6	6
809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	5	3	4	2
811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	5	5	4	3
812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	3	4	2	3
813	CTC TCT CTC TCT CTC TT	3	5	2	1
814	CTC TCT CTC TCT CTC TA	3	3	3	3
834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	4	4	4	3
835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	6	5	5	4
840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT	2	3	2	1
842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG	2	3	2	2
867	GGC GGC GGC GGC GGC GGC	3	3	2	3
881	GGG TGG GGT GGG GTG	5	6	4	4

* JW 江苏文蛤, LW 辽宁文蛤.

碱基重复序列的引物占大多数,并且以 AG 重复序列较多.所以从以上的扩增结果可以得知:文蛤基因组 DNA 中简单重复序列区域中以二碱基重复为主,并且 AG 含量要高于 GC 含量.

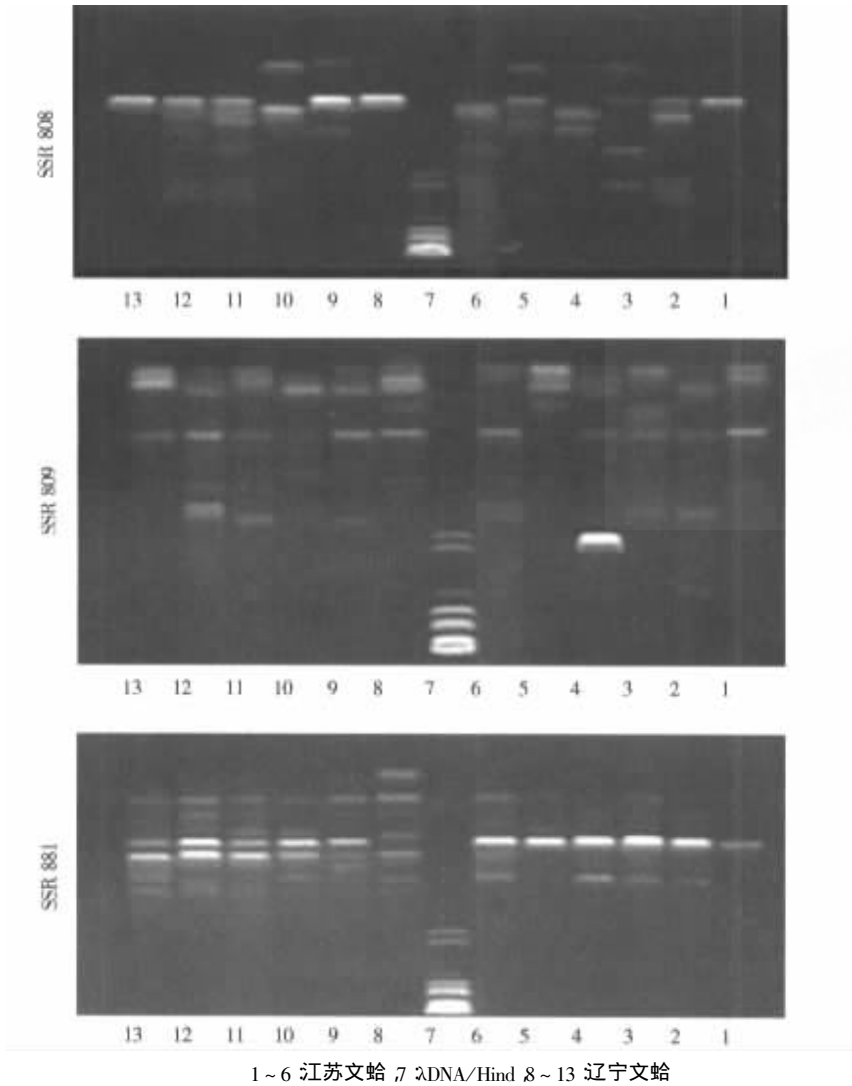


图 1 两种文蛤的基因组 DNA 用 ISSR 引物 S808、S809、S881 扩增产物的电泳图谱

2.3 遗传相似性与遗传距离

统计 13 个引物对两种文蛤的基因组 DNA 进行扩增后电泳产生的条带,用公式

$$F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$$

上式中, F 为共享度,又称为遗传相似性指数. N_{xy} 是 x 、 y 两个个体共有的条带, N_x 、 N_y 是 x 、 y 个体分别拥有的条带,从而计算出扩增片段之间的遗传相似性.再根据 F 算出两种文蛤的遗传距离 $d = 1 - F$.

表 2 江苏文蛤与辽宁文蛤间的遗传距离

	江苏文蛤(JW)	辽宁文蛤(LW)
江苏文蛤(JW)	0.3105 ± 0.090	
辽宁文蛤(LW)	0.3821 ± 0.048	0.2658 ± 0.044

2.4 ISSR-PCR 技术在文蛤遗传分析中作用

文蛤养殖是吕四海区及沿岸地区海水养殖中的支柱产业之一.近年来,由于文蛤苗种资源衰竭,生产规模受到抑制,养殖量大幅度下降等原因,文蛤苗种生产的形势已很严峻.本实验对所选的两种文蛤地理种群的 ISSR 初步研究可以得出,江苏文蛤的遗传多样性比辽宁文蛤要高,群体内平均遗传距离比辽宁文蛤大,这与沈怀舜等^[7]用 RAPD 标记对辽宁、江苏和广西三个文蛤地理种群的研究中的结果是一致的,说明江苏文蛤仍存在较大的遗传改良潜力. ISSR 标记由于其引物为在真核生物基因组中大量存在的简单重复序列和锚定序列,该技术有非常高的稳定性,在遗传多样性分析方面有较明显的优势,对文蛤遗传标识的确定、遗传图谱的构建将发挥重要的作用,为文蛤种质资源的保护和遗传育种等工作提供基础资料.

[参考文献]

- [1] Zietkiewicz E , Rafalske A , Labuda D. Genome fingerprinting simple sequence repeat(SSR) anchors polymerase chain reaction amplification[J]. Genome ,1994 20(2) :178—183.
- [2] MA Chao-zhi , FU Ting-dong. Genetic Diversity if Hinese and Swedish Rapeseed(*Brassica napus* L.) Analyzed by Inter-Simple Sequence Repeat(ISSR) [J]. Agriculture Sciences in China 2003 2(2) :137—143.
- [3] 钱韦 ,葛颂 ,洪德元. 采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样[J]. 植物学报 2000 27(7) :741—750.
- [4] 王伟继 ,孔杰. ISSR-PCR 技术在对虾中的应用初步研究[J]. 海洋水产研究 2002 23(1) :1—4.
- [5] 吕林兰 ,王爱民 ,杜晓东 ,等. 马氏珠母贝 DNA 快速一步法(ROSE)提取及 ISSR-PCR 应用[J]. 海洋科学 2003 27(10) :42—45.
- [6] 余艳 ,陈海山 ,葛学军. 简单重复序列区间(ISSR)引物反应条件优化与筛选[J]. 热带亚热带植物学报 2003 11(1) :15—19.
- [7] 沈怀舜 ,朱建一 ,丁亚平 ,等. 我国沿海三个文蛤地理群的 RAPD 分析[J]. 海洋学报 2003 25(5) 98—102.

Using Inter-simple Sequence Repeats (ISSR) Technique in Two Populations of *Meretrix meretrix*

Chen Dapeng¹ , Shen Huaishun² , Ding Yaping² , Yang Jiaxin¹ , Shen Songdong³ , Xu Pu²

(1. School of Life Science , Nanjing Normal University , 210097 , Nanjing , China)

(2. Oceanographic and Fisheries Institute of Jiangsu Province , 226007 , Nantong , China)

Abstract The technique of Inter-Simple Sequence Repeats(ISSR) was applied to study on the genetic variations of two populations of *Meretrix meretrix*. Thirteen ISSR primers were selected from 100 ones offered by University of British Columbia. Each primer yielded 1 to 8 bands with the average of 4.6 bands. By comparing the different reaction conditions , the ISSR-PCR reaction system was improved. The reactions composed of 0.2 μ mol/L primer , 2.5 mmol/L Mg^{2+} , 1.5 U Taq polymerase , 20 ng template DNA ; The optimized programs were predenaturation at 94 $^{\circ}$ C for 5 min , then 45 cycles containing denaturation 45 s at 94 $^{\circ}$ C , annealing 45 s at 52 $^{\circ}$ C , and elongation 1.5 min at 72 $^{\circ}$ C ; at last holding 10 min at 72 $^{\circ}$ C . The optimized conditions could result in satisfactory specificity and reproducibility of ISSR-PCR amplification patterns bands.

The study through preanalysed two kinds of two stocks of *Meretrix meretrix* (*Meretrix meretrix* of Liaoning and *Meretrix meretrix* of Jiangsu) demonstrated that the genetic polymorphism of Jiangsu 's (80.7%) was higher than Liaoning 's (68.4%) , and its average genetic distance in the Jiangsu 's population(0.3105 \pm 0.090) was bigger than that of Liaoning 's (0.2658 \pm 0.044) as well. It was found by the selected primers that the simple sequence tandem repeats(STRs) of *Meretrix meretrix* were mainly composed of AG dinucleotides. Comparing *Meretrix meretrix* of Liaoning , Jiangsu 's have larger genetic improving potential. The results showed that ISSR-PCR technique have application potential in study of genetic polymorphisms and germplasm of shellfishes.

Key words ISSR-PCR , *Meretrix meretrix* , DNA

[责任编辑 孙德泉]