

海产贝类 DNA 提取及 PCR 扩增*

王 桂 雲

(遼寧師範大學生物學系, 大連 116029)

朱 志 祥

(大連市環境科學設計研究院, 大連 116023)

提要 本文報道海產貝類 DNA 提取方法及 PCR 擴增。採用隨機引物 N_{01-20} 共獲得 391 個片段。其中皺紋盤鮑 2 個個體, 產生 65 個片段, 在 501—2818bp 間; 毛蚶 3 個個體, 產生 76 個片段, 在 398—2818bp 間; 四角蛤蜊 3 個個體, 產生 154 個片段, 在 562—3311bp 間; 中國蛤蜊 2 個個體, 產生 96 個片段, 在 478—3311bp 間。通過比較分析, 可見海產貝類有豐富的遺傳多態現象, RAPD 技術可用于海產貝類的分類及系統演化關係探討等領域。

關鍵詞 海產貝類, DNA, PCR

本文報道海產貝類 DNA 提取方法及 PCR 擴增, 并對 4 種海產貝類的隨機擴增 DNA 片段進行了比較分析。隨機擴增多態 DNA (RAPD) 技術是近年來發展起來的一項 DNA 分子水平的大分子多態檢測手段, 在植物、脊椎動物及人類親緣關係探討、疾病診斷等領域得到廣泛應用, 而在無脊椎動物中的應用只見對某幾種昆蟲的鑒定和種群關係探討, 目前未見將 RAPD 技術用于海產貝類的研究。

一、材料和方法

1. 材料、儀器、藥品

本文所用實驗材料皺紋盤鮑 (*Haliotis discus hannai* Ino) 購于大連市史家口海珍品養殖場, 另三種貝類毛蚶 (*Seapharca suberenata* Lischke)、四角蛤蜊 (*Macraa veneritormis* Deshayes)、中國蛤蜊 (*Macraa chinensis* Philippi) 購于大連市馬欄村市場 (產地庄河)。PCR-90AD 電腦基因自動擴增儀為中科院遺傳研究所生產。RAPD 試劑盒購于京海生物工程公司。

2. 方法

(1) DNA 提取: 參考標準的 DNA 提取方法 (Sambrook 等, 1989), 有所改進。將新鮮或冷凍的皺紋盤鮑的足及瓣鰓類的閉壳肌剪碎, 加 TE 緩沖液, 在磁研鉢中研碎, 移入 5mL 離心管中, 加 SDS 至終濃度為 1%、蛋白酶 K 終濃度為 100 μ g/mL, 放入恒溫水浴中, 65 $^{\circ}$ C 4h 以上, 或 37 $^{\circ}$ C 過夜; 加飽和酚, 輕微倒正旋轉 15min 以上, 1 $\times$ 10⁴r/min 離心

* 此文在李慶偉博士全力支持幫助下完成, 在此深表謝意。

10min 提取上清液;加等量酚和氯仿,再倒正旋转、离心、重复提取,直到有机相和水相的界面无变性的蛋白膜为止。再取上清液,只加氯仿,混均、离心。提取上清液放入干净指管内,向指管内加等量的冷冻无水乙醇,用消毒过的玻璃棒向一个方向缠卷,直到全部缠完。将缠好的 DNA 连同玻璃棒用 75% 乙醇漂洗,放在超静工作台上吹干。将吹干后的 DNA 连同玻璃棒放入微量管中,加 TE 溶解,封口膜封口,放 4℃ 冰箱保存备用。

(2) RAPD 反应

①扩增反应总体积 20μL,其中 ddH₂O 15μL,Buffer 2μL,dNTP 1μL,引物 1μL,模板 DNA,1μL,离心混均,98℃ 预变性 7min,离心 10s。

②每管中加 TaQ 酶 1μL,离心,再加石蜡油,离心 10s。

③在 PCR 扩增仪上进入循环,94℃ 变性 85s,36℃ 复性 100s,72℃ 延伸 160s,共 42 个循环,最后一个循环后在 72℃ 再延伸 7min。

(3) 琼脂糖凝胶电泳:配制 1% 平板凝胶,加 EB,放入 TE 电极缓冲液中,点样后用 40V 恒压电泳 4h 以上。在紫外透射仪上观察拍照。

3. 數據處理

(1) 随机扩增 DNA 片段大小的计算:随机扩增 DNA 片段在电场中的迁移率(d)与分子量(M)的对数值成正比: $d = K \log M$,根据标准片段大小标记(λ DNA + Hind III / EcoRI)的迁移率作出标准曲线,再根据该曲线求出各扩增片段的大小。用标准卡尺测量照片中各片段与点样槽之间的距离。利用泳动距离与分子量对数值成反比的关系,算出每个片段的大小。

(2) 统计分析:随机扩增多态 DNA 片段共享度的计算根据 Nei 和 Li(1979)的公式:

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

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} 为两物之间相同的片段数。

二、 结 果

(1) 20 个引物 $N_{01} - N_{20}$,其中有 4 个引物即 $N_{05}, N_{09}, N_{15}, N_{17}$ 没出现片段,其余 16 个引物共出现强弱不同的 391 个片段,将每个引物出现的片段从小到大排列,共排成 252 号,每个引物平均获 24.4375 个片段。

(2) 每种动物出现的片段数不同,且大部分个体间有差异(图版 I:1—4;另 16 张图及原始数据表从略)。由随机扩增 DNA 片段原始数据统计得知:皱纹盘鲍 2 个个体,共出现 65 个片段,平均每一个体出现 32.5 个片段,大小在 501—2818bp 间。毛蚶 3 个个体,共产生 76 个片段,平均每一个体产生 25.3 个片段,大小在 398—2818bp 间。四角蛤蜊 3 个个体,共产生 154 个片段,平均每一个体产生 51.3 个片段,大小在 562—3311bp 间。中国蛤蜊 2 个个体,共产生 96 个片段,平均每一个体产生 48 个片段,大小在 478—3311bp 间。

(3) 分析 DNA 片段原始数据得知:在 252 个片段中,187 号 933bp 片段为 4 个种共有。鲍和蚶共有片段 6 个,鲍和四角蛤蜊共有片段 13 个,鲍和中国蛤蜊共有片段 10 个,蚶和四角蛤蜊共有片段 11 个,蚶和中国蛤蜊共有片段 10 个,四角蛤蜊和中国蛤蜊共有片段

22 個。瓣鰓綱 3 個種間共享度分別為:

$$F_1(\text{蚶和四角蛤蜊})=0.2872062$$

$$F_2(\text{蚶和中國蛤蜊})=0.2728513$$

$$F_3(\text{四角蛤蜊和中國蛤蜊})=0.4431017$$

三、 讨 论

1. 同種貝類個體間 DNA 含量不同

我们在提取 DNA 过程中,将同种不同个体进行比较,在所用材料相同情况下,个体间 DNA 含量有明显差异。这与个体间细胞分裂时间不同相关,在细胞有丝分裂前 DNA 含量增加一倍。

2. 海產貝類擴增 DNA 片段存在豐富的多態現象(图版 I:1—4)

(1) 本次实验所使用的 20 个引物中,有 $N_{05}, N_{09}, N_{15}, N_{17}$ 等 4 个随机引物没有扩增产物,说明这 4 种海产贝类的 DNA 上没有与之相对应的结合位点。

(2) 同种贝类个体间 DNA 片段数有差异,存在丰富的遗传多态现象。皱纹盘鲍 2 个个体,共出现 65 个片段,只有 14,16,19,52,75,76,81,87,112,129,217,222 等 13 个片段是 2 个个体共有。毛蚶 3 个个体,共出现 76 个片段,只有 73,97 号片段是 3 个个体所共有。四角蛤蜊 3 个个体,共出现 154 个片段,只有 63,73,113,119,135,147,165,221 号共 8 个片段是 3 个个体所共有。中国蛤蜊 2 个个体,共产生 96 个片段,只有 59,66,79,109,110,138,141,183,200,208,220 号共 11 个片段是 2 个个体所共有。

每一个体携带一个基因集合体,它不能在别的个体中同样地找到,每个群体有一个基因库,个体的基因即由此而来。在同一海洋环境中其小环境也有很大差异。遗传上的多样性增加了生物利用环境资源的效率,一个单一的基因型无论怎么多能,也不能在所有的环境中都可尽其最高的效率。自然选择保持了各种各样的基因型。

3. RAPD 技術可用于海產貝類親緣關係的探討

本文实验所用 4 种海产贝类属于软体动物门腹足纲(皱纹盘鲍)和瓣鰓綱(另 3 种),不同分类阶元间片段数量和大小有一定规律。

(1) 同一纲里不同目间片段多少有差异。毛蚶属于瓣鰓綱列齿目,3 个个体共获 76 个片段,平均每一个体产生 25.3 个片段。而真瓣鰓目中的四角蛤蜊,3 个个体共获得 154 个片段,平均每一个体产生 51.37 个片段。中国蛤蜊 2 个个体共产生 96 个片段,平均每一个体产生 48 个片段。笔者认为,海产贝类 DNA 扩增,在同一纲里产生片段的多少和演化有正相关性,产生片段多的相对片段也大。同一纲里,在多种引物中产生片段多者为进化种类,反之,片段少者为原始种类。

(2) 同属不同种间扩增 DNA 片段数量及大小相近。四角蛤蜊和中国蛤蜊均是蛤蜊科、蛤蜊属。四角蛤蜊平均每一个个体产生 51.37 个片段,大小在 562—3311bp 间,中国蛤蜊平均每一个个体产生 48 个片段,大小在 478—3311bp 间。同属不同种,片段数量、大小相近;何者为进化种类,需进一步研究。

(3) 通过共享度的计算,得知 $F_3(\text{四角蛤蜊和中国蛤蜊})=0.4431017$,同属间的共享

度大于不同目间的共享度(F_1, F_2)。这进一步说明 RAPD 技术可用于海产贝类系统演化关系的探讨。

参 考 文 献

- 盧聖東, 1995, 現代分子生物學實驗技術, 高等教育出版社, 408—429。
魯毅等, 1995, RAPD 技術的特點及其在昆蟲分類中的應用, 昆蟲學報, 38(1):111—121。
J. 薩姆布魯克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯著(金冬雁等譯), 1992, 分子克隆實驗指導, 科學出版社, 672—691。
T. 杜布贊斯基著(談家楨等譯), 1985, 遺傳與物種起源, 科學出版社, 102—167。
Williams, J. G. K., A. R. Kubelik et al., 1990, DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucl. Acids Res.*, 18(22):653—6535。
Welsh, J., M. Maclelland, 1990, Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers, *Nucl. Acids Res.*, 18(24):7213—7218。

ANALYSIS OF DNA IN SEASHELLS BY THE METHOD OF PCR

Wang Guiyun

(Dept. of Biology, Liaoning Normal Univ., Dalian 116022)

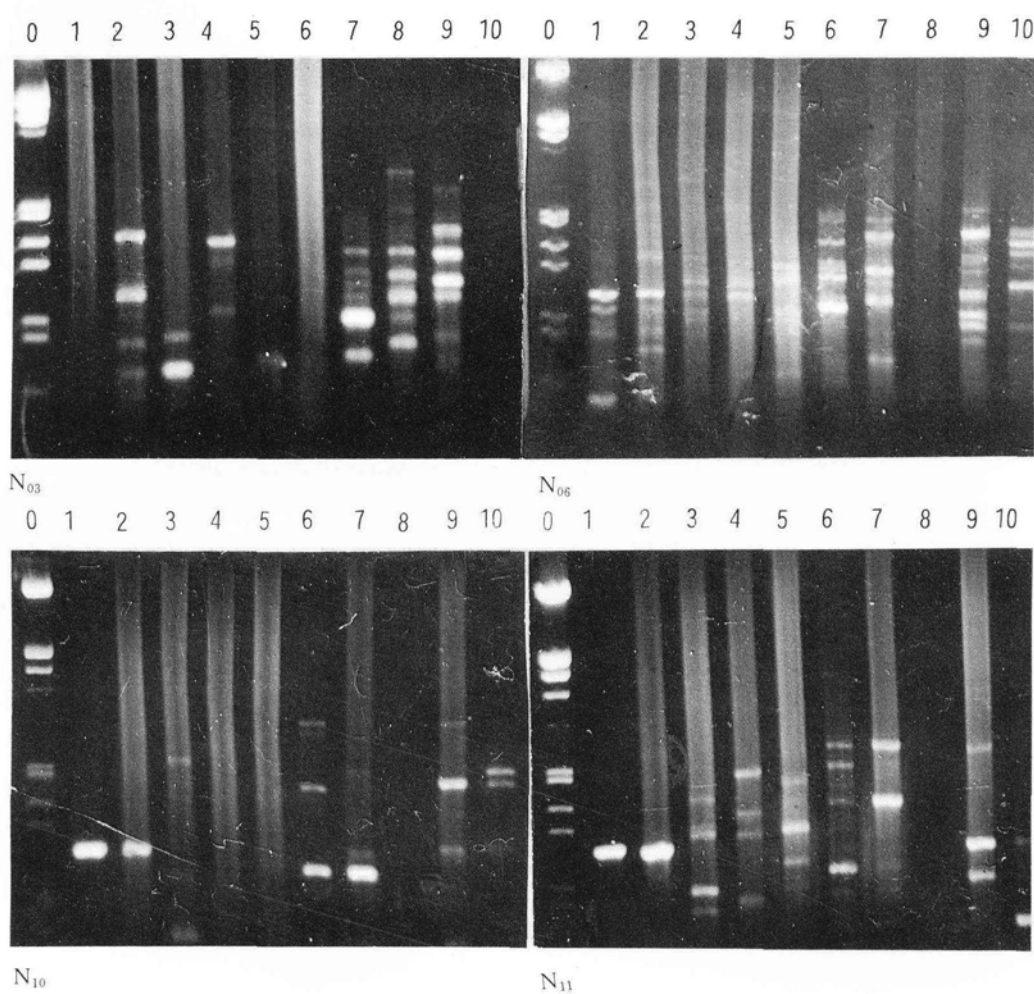
Zhu Zhixiang

(Dalian Design and Research Institute of Environmental Science, Dalian 116023)

ABSTRACT

Polymerase chain reaction PCR was induced in seashells, use of 20 primers yielded 391 amplified fragments; 2 individuals of *Haliotis discus hannai* Ino, yielded 65 amplified fragments between 501 to 2818bp; 3 individuals of *Seapharca suberenata* Lischke, yielded 76 amplified fragments between 398 to 2818bp; 3 individuals of *Macraa veneritormis* Deshayes, yielded 154 amplified fragments between 562 to 3311bp; and 2 individuals of *Macraa chinensis* Philippi, yielded produced 96 amplified fragments between 478 to 3311bp. The result indicated that seashells have abundant genetic polymorphism. RAPD can be used to facilitate study on the taxonomy and the phylogeny of seashells.

Key words seashells, DNA, PCR



4 种海产贝类用随机引物 N_{03} , N_{06} , N_{10} , N_{11} PCR 扩增产物电泳图谱

0. 标准片段 λ DNA; 1, 2. 皱纹盘鲍; 3-5. 毛蚶; 6-8. 四角蛤蜊; 9, 10. 中国蛤蜊