

# 中国对虾 SRAP 分子标记体系正交优化及在遗传多样性分析中的应用

陈华增<sup>1,2</sup> 李 健<sup>2</sup> 何玉英<sup>2</sup> 李吉涛<sup>2</sup> 王清印<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>上海海洋大学水产与生命学院, 201306)

(<sup>2</sup>中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

**摘 要** 利用正交设计  $L_{16}(4^5)$  对影响中国对虾 SRAP 分子标记分析的 5 个因素 ( $Taq$  酶,  $Mg^{2+}$ , 模板 DNA, dNTP 和引物浓度) 在 4 个水平上进行了优化, 筛选出各反应因素的最佳水平为: 20  $\mu$ l 反应体系中包含 1.0 U  $Taq$  酶, 2.0 mmol/L 的  $Mg^{2+}$ , 40.0 ng 的模板 DNA, 0.125 mmol/L 的 dNTP 以及 0.4  $\mu$ mol/L 的引物, 退火温度为 53.5  $^{\circ}C$ 。研究表明, 各因素的不同水平对扩增结果有显著影响, 其中  $Mg^{2+}$  影响最大, 影响大小顺序依次为  $Mg^{2+}$ ,  $Taq$  酶, 引物, dNTP 和模板 DNA。利用优化的 SRAP 分子标记体系对中国对虾“黄海 1 号”第 12 世代选育群体进行了遗传多样性分析, 实验结果表明, 此标记技术可作为中国对虾遗传分析的良好技术工具。遗传多样性分析共筛选出 8 对可以扩增出清晰稳定条带的引物组合, 共获得 171 个位点, 其中多态性位点 154 个, 占 90.08%; 有效等位基因数为 1.774 1, 期望杂合度均值为 0.421 9, Shannon 多样性指数为 0.605 5。上述参数值均高于应用 AFLP 技术对前几代选育群体的遗传多样性分析结果。

**关键词** 中国对虾 正交设计 SRAP 遗传多样性

**中图分类号** S966 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2010)06-0043-11

## Optimization of SRAP-PCR system using orthogonal design and its application to genetic analysis in *Fenneropenaeus chinensis*

CHEN Hua-zeng<sup>1,2</sup> LI Jian<sup>2</sup> HE Yu-ying<sup>2</sup> LI Ji-tao<sup>2</sup> WANG Qing-yin<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, 201306)

(<sup>2</sup>Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

**ABSTRACT** The orthogonal design  $L_{16}(4^5)$  was used to optimize SRAP-PCR amplification system in marine shrimp *Fenneropenaeus chinensis* on four levels of five factors ( $Taq$  DNA polymerase,  $Mg^{2+}$ , DNA template, dNTP, and primer). The results showed that the optimum concentrations were 1.0 U  $Taq$  enzyme, 2.0 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 40.0 ng DNA template, 0.125 mmol/L dNTP, and 0.4  $\mu$ mol/L primer, respectively, in 20  $\mu$ l SRAP-PCR system, and the an-

国家科技支撑计划专题(2006BAD01A13)、国家自然科学基金课题(40706052)、公益性行业专项(nyhyzx07-042)和国家虾产业技术体系(nycytx-46)共同资助

\* 通讯作者。E-mail: qywang@public.qd.sd.cn, Tel: (0532)85822959

收稿日期: 2009-12-13; 接受日期: 2010-04-13

作者简介: 陈华增(1983-), 男, 硕士, 主要从事对虾遗传育种研究。E-mail: huazeng114@163.com, Tel: (0532)85826690

nealing temperature was 53.5°C *via* setting temperature gradient. Significant effects of each factor in different levels were observed and the concentration of  $Mg^{2+}$  was the most dominant factor affecting the result of PCR, while *Taq* polymerase, primer, dNTP, and template DNA followed in terms of dominance. Then, the established amplification system was used to analyze the genetic diversity of the 12th generation of selected “Huanghai No. 1” of *F. chinensis*. As a result, 171 bands were generated with 8 primer sets, of which 154 bands were polymorphic bands, accounting for 90.08%. The effective number of alleles, genetic diversity and Shannon’s information index were 1.774 1, 0.421 9, and 0.605 5, respectively. The parameters obtained by SRAP were higher than those reported by authors applying AFLP technique.

**KEY WORDS** *Fenneropenaeus chinensis* Orthogonal design SRAP Genetic diversity

中国对虾 *Fenneropenaeus chinensis* 是主要分布于我国黄、渤海以及朝鲜半岛西海岸的一种洄游性虾类(邓景耀等 1990),营养和经济价值高,曾是我国对虾养殖的主要种类。在 20 世纪 80 年代中后期到 90 年代早期,中国对虾的养殖年产量为 20 多万 t,占当时世界对虾养殖总量的 30%以上(Wang *et al.* 1995)。但 1993 年以后由于受病害传播、环境污染和种质变化等复杂因素影响,中国对虾的养殖产量产生大幅滑坡。近年来的养殖年产量大致维持在 5~6 万 t 的水平(中国渔业年鉴 2005)。为恢复和重建中国对虾养殖业,以满足不断增长的市场需求,水产科技工作者和从业人员一直在持续不懈地努力,其中一个重要途径就是培育生长速度快、抗逆能力强的养殖对虾新品种。中国水产科学研究院黄海水产研究所的科技人员从 1997 年开始进行中国对虾的选育研究,经过 7 代选育获得“黄海 1 号”新品种,并在沿海地区推广养殖(Wang *et al.* 2006)。据有关报道,经世代选育的养殖群体的遗传多态性相比野生群体往往要降低(Wofus *et al.* 1997)。在定向选育过程中,进行表型性状及特定病原监测工作的同时,应对选育群体遗传结构的时空变化进行分析。因此,对经过多代选育的中国对虾养殖群体遗传多样性变化进行分析,在理论上和实践上都具有重要意义。

序列相关扩增多态性(Sequence Related Amplified Polymorphism, SRAP)技术是由 Li 等(2001)研究芸苔属 *Brassica species* 植物时开发出的新型 DNA 分子标记技术。其基本原理是借助特定引物对基因组开放式阅读框进行扩增。该技术已广泛应用于植物的遗传多样性分析(Budak *et al.* 2004; Ferriol *et al.* 2003)、杂交优势估计(Riaz *et al.* 2001)、比较基因组学研究(Li *et al.* 2003)、遗传连锁图谱构建(Lin *et al.* 2009; Alwala *et al.* 2008)及相关基因定位(Alwala *et al.* 2009; Rahman *et al.* 2007)等研究中,但是该技术在水产动物研究领域研究应用还较少,仅在罗氏沼虾 *Macrobrachium rosenbergii*(周劲松等 2006)、日本沼虾 *Macrobrachium nipponensis*(姚建华等 2008)和草鱼 *Ctenopharyngodon idellus*(张志伟等 2007; 丁炜东等 2008)的研究中见过报道,因此,有必要构建中国对虾的 SRAP 技术体系,为开展相关的研究工作提供技术参考和支持。

SRAP-PCR 反应结果往往受多种反应因素影响。而正交设计具有均衡分散、综合可比及效应明确的特点(郁昭等 1997),应用正交设计实验结果能够分析各反应因素的内在联系规律,在此基础上可较快地建立最佳反应体系。本文首次将 SRAP 技术应用于中国对虾的研究,并结合正交试验设计,针对模板 DNA、*Taq* 酶、 $Mg^{2+}$ 、dNTP 和引物这 5 种影响 PCR 反应的主要因素,对中国对虾 SRAP 反应体系进行优化分析,并摸索了 PCR 反应程序中的退火温度。同时应用建立的中国对虾 SRAP 反应体系对中国对虾“黄海 1 号”人工选育第 12 代选育群体进行了遗传结构分析,以期从分子水平探讨人工选育对中国对虾养殖群体遗传结构的影响,为中国对虾种质资源的保护和可持续利用构建技术平台。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

试验材料为中国对虾“黄海 1 号”第 12 代选育群体,随机取样 60 尾健康养殖对虾,体长为  $85.45 \pm 1.21$

mm, 体重  $8.75 \pm 0.95$  g, 雌、雄比例大致为 1 : 1, 2008 年 7 月取自“黄海 1 号”中国对虾保种池,  $-80^{\circ}\text{C}$  保存备用。

SRAP-PCR 反应所用试剂: *Taq* 酶,  $\text{Mg}^{2+}$  和 dNTP 购自 TaKaRa 公司; 标准分子量(Marker)100 bp DNA Ladder 购自 TianGen 公司, 2 000 bp DNA Ladder 为 Solarbio 公司产品; SRAP 引物(正向引物和反向引物各 7 条)(表 1)由上海生工生物工程有限公司合成。

表 1 SRAP 引物编号及序列  
Table 1 The names and sequences of SRAP primers

正向引物 Forward primer	序列 Sequence(5'-3')	反向引物 Reverse primer	序列 Sequence(5'-3')
ME1	TGAGTCCAAACCGGAGC	EM1	GACTGCGTACGAATTAAT
ME2	TGAGTCCAAACCGGAAT	EM2	GACTGCGTACGAATTTGC
ME3	TGAGTCCAAACCGGACC	EM3	GACTGCGTACGAATTGAC
ME4	TGAGTCCAAACCGGAAG	EM4	GACTGCGTACGAATTTGA
ME5	TGAGTCCAAACCGGTAA	EM5	GACTGCGTACGAATTAAC
ME6	TGAGTCCAAACCGGTCC	EM6	GACTGCGTACGAATTGCA
ME7	TGAGTCCAAACCGGTGC	EM7	GACTGCGTACGAATTCAG

## 1.2 总 DNA 提取及浓度测定

中国对虾总 DNA 的提取采用酚-氯仿方法(刘 萍等 2000), 用 ND1000 核酸检测仪检测所提 DNA 溶液浓度和纯度, 并将其稀释为  $160 \text{ ng}/\mu\text{l}$  备用。

## 1.3 PCR 反应因素水平及正交试验方案设计

为了确定 SRAP-PCR 反应中 5 个因素(*Taq* 酶、 $\text{Mg}^{2+}$ 、模板 DNA、dNTP、引物)的最佳水平, 采用正交设计  $L_{16}(4^5)$  在 4 个水平上进行试验。参加 PCR 反应的因素水平见表 2,  $L_{16}(4^5)$  设计方案见表 3。

表 2 SRAP-PCR 反应的因素水平  
Table 2 Factors and levels of SRAP-PCR reaction

因素 Factor	水平(体系终浓度) Level(Final concentration)			
	1	2	3	4
<i>Taq</i> 酶 <i>Taq</i> DNA polymerase ( $\text{U}/20 \mu\text{l}$ )	0.8	1.0	1.2	1.4
$\text{Mg}^{2+}$ (mmol/L)	1.0	1.5	2.0	2.5
模板 DNA DNA template ( $\text{ng}/20 \mu\text{l}$ )	40.0	80.0	120.0	160.0
dNTP (mmol/L)	0.05	0.075	0.1	0.125
引物 Primer ( $\mu\text{mol}/\text{L}$ )	0.2	0.3	0.4	0.5

## 1.4 SRAP-PCR 扩增

对表 3 中所列正交设计的 16 个处理重复两次, 于 Eppendorf Mastercycler ep gradient S PCR 扩增仪上进行扩增。反应程序如下:  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 前 5 个循环程序:  $94^{\circ}\text{C}$ , 1 min;  $35^{\circ}\text{C}$ , 1 min;  $72^{\circ}\text{C}$ , 1 min。随后 35

个循环:94℃,1 min;50℃,1 min;72℃,1 min。72℃延伸 10 min,4℃储存。PCR 扩增结束后,向产物中加入 4  $\mu$ l Loading Buffer(10 mmol/L EDTA [0.5 mol/L, pH=8.0],98%甲酰胺,0.025%溴芬兰,0.025%二甲苯氰)。混匀后,取 5  $\mu$ l PCR 产物在 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶中 800 V 预电泳 30 min,1 000 V 恒压电泳 90 min。待指示剂跑出胶板即停止电泳,凝胶经 10%醋酸固定、水洗、银染、显影、定影、阴干后,采集图像并记录结果。统计结果应用 SPSS 13.0 软件进行分析。

表 3 SRAP-PCR 反应的因素水平  $L_{16}(4^5)$  正交试验设计

Table 3  $L_{16}(4^5)$  orthogonal design for the factors and levels of SRAP-PCR reaction

编号 No.	Taq 酶 Taq DNA polymerase (U/20 $\mu$ l)	Mg <sup>2+</sup> (mmol/L)	模板 DNA DNA template (ng/20 $\mu$ l)	dNTP (mmol/L)	引物 Primer( $\mu$ mol/L)
1	0.8	1.0	40.0	0.05	0.2
2	0.8	1.5	80.0	0.075	0.3
3	0.8	2.0	120.0	0.100	0.4
4	0.8	2.5	160.0	0.125	0.5
5	1.0	1.0	80.0	0.100	0.5
6	1.0	1.5	40.0	0.125	0.4
7	1.0	2.0	160.0	0.05	0.3
8	1.0	2.5	120.0	0.075	0.2
9	1.2	1.0	120.0	0.125	0.3
10	1.2	1.5	160.0	0.100	0.2
11	1.2	2.0	40.0	0.075	0.5
12	1.2	2.5	80.0	0.05	0.4
13	1.4	1.0	160.0	0.075	0.4
14	1.4	1.5	120.0	0.05	0.5
15	1.4	2.0	80.0	0.125	0.2
16	1.4	2.5	40.0	0.100	0.3

## 1.5 引物退火温度的确定

在上述试验基础上,根据引物对的  $T_m$  值(ME4 的  $T_m$  值为 54.59℃,EM1 的  $T_m$  值为 50.47℃),利用 Eppendorf Mastercycler ep gradient S PCR 扩增仪中的 Gradient 功能,设立自 45~55℃的 12 级温度梯度以筛选最佳退火温度。

## 1.6 中国对虾“黄海 1 号”选育群体遗传结构的 SRAP 分析

应用已建立的 SRAP 分子标记技术对中国对虾“黄海 1 号”第 12 代选育群体共 60 尾个体进行遗传结构分析,PCR 扩增程序及产物检测方法同 1.4。

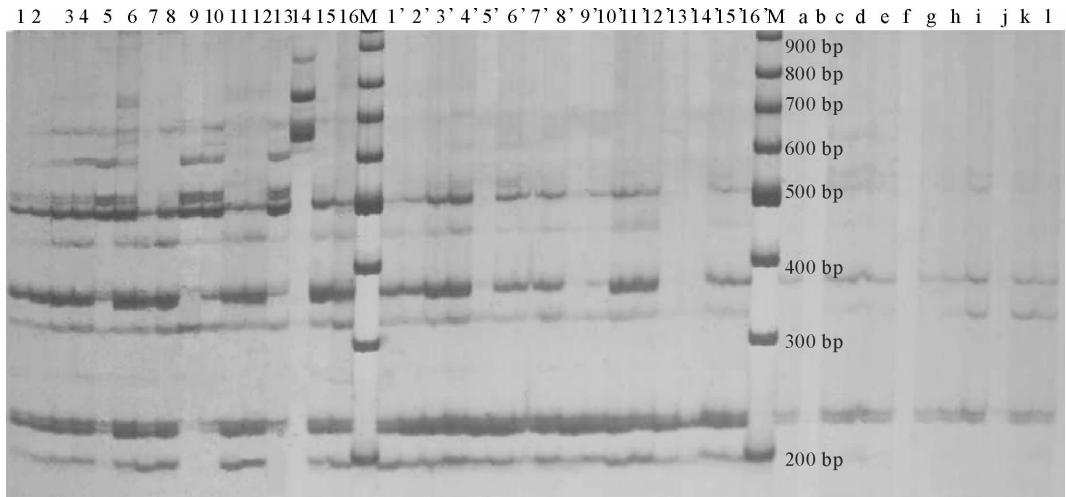
根据条带清晰、稳定的原则对电泳条带进行统计。图谱中每一条带的迁移位置记为一个位点,相同迁移位置条带的有无分别记为 1 和 0,形成 1/0 矩阵,缺失值用点“.”代替。统计结束后,应用 POPGENE 32 分析软件分别统计指标参数:(1)多态位点百分数( $P$ );(2)平均每个位点的观察等位基因数( $N_a$ );(3)平均每个位点的有效等位基因数( $N_e$ );(4)Nei's 遗传多样性( $H$ );(5)Shannon 多样性指数( $I$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 正交试验结果与分析

根据表 3 中设计的水平组合进行 PCR 扩增,两次重复独立进行,所得产物用 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶

电泳检测(图 1)。



注: M: 标准分子量; 1~16: 组合编号, 同表 3; 1'~16': 处理重复; a~l: 引物退火温度梯度, 分别为 45.0、45.3、45.9、46.7、47.8、49.3、51.0、52.4、53.5、54.3、54.8 和 55.0℃

Note: M: 100bp DNA Ladder; 1~16: Treatment No. as showed in Table 3; 1'~16': Repeat treatment; a~l: Annealing temperatures gradient, 45.0, 45.3, 45.9, 46.7, 47.8, 49.3, 51.0, 52.4, 53.5, 54.3, 54.8, and 55.0℃, respectively

图 1 正交设计 PCR 扩增电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretograms of PCR products by orthogonal design

根据图 1 所示电泳结果,按照所得条带数量丰富、清晰度高、重复性强、背景低的原则,依次给 16 个重复评分,最佳产物条带记为 16 分,自高到低依次评分,效果最差者记为 1 分。两次重复独立统计评分。从两次重复的结果来看,各个组合的反应都具有较高的重复性和稳定性。各组合评分结果见图 2。

### 2.2 PCR 因素对反应结果的影响

将 16 个处理和最后的评分结果输入 SPSS 13.0 软件进行方差分析,结果见表 4。由  $F$  值可知,SRAP-PCR 反应体系中  $Mg^{2+}$  浓度水平对反应结果影响最大( $F$  值为 67.034),而模板 DNA 浓度水平对结果影响最小( $F$  值为 8.709)。各因素水平对 PCR 结果的影响大小排列依次为: $Mg^{2+}$ 、 $Taq$  酶、引物、dNTP 和模板 DNA。由于各因素水平间的差异均达到极显著水平,所以需要进一步进行因素内水平的多重比较分析。

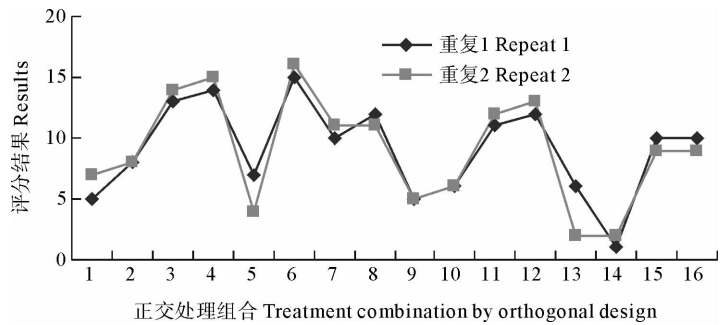


图 2 各处理组合评分结果

Fig. 2 Results of treatment combination

### 2.3 因素内各水平对 SRAP-PCR 结果的影响

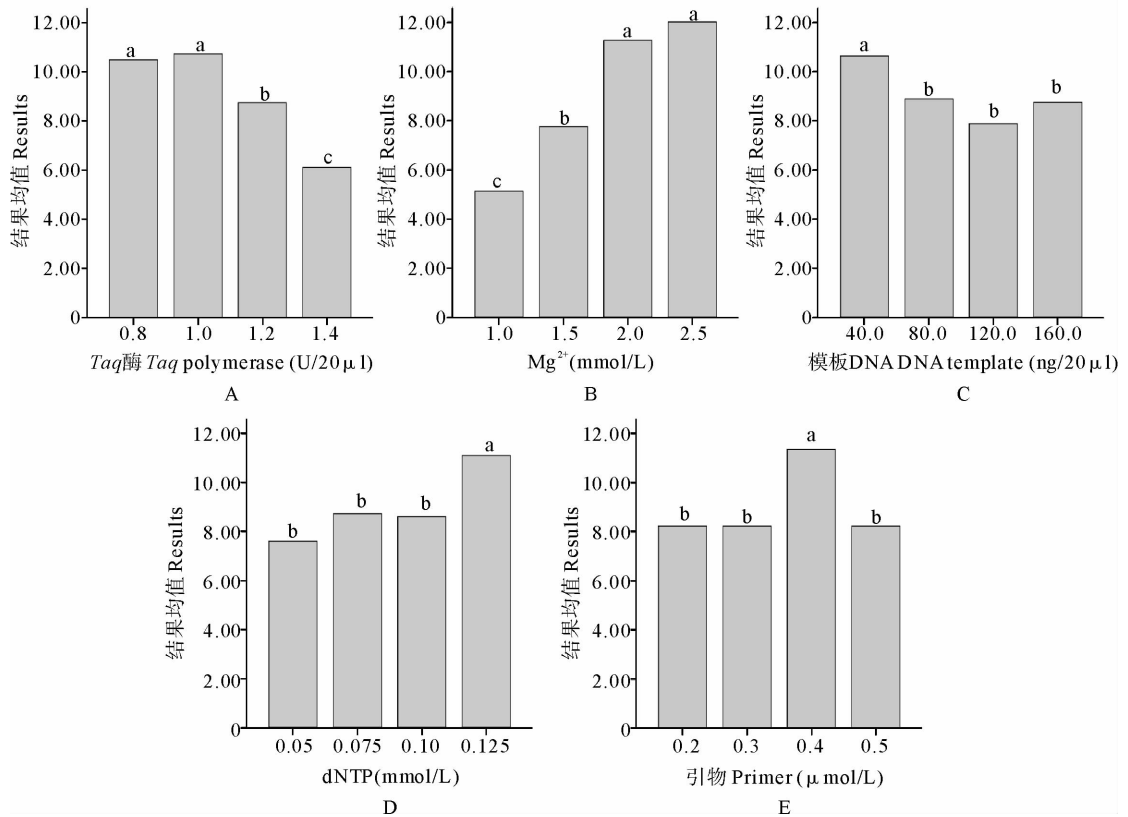
#### 2.3.1 $Taq$ 酶浓度对 SRAP-PCR 结果的影响

$Taq$  酶水平变化对扩增结果影响较大,结果见图 3-A。0.8 U 和 1.0 U 水平间差异不显著( $P > 0.05$ ),但其余每二者组合间差异水平平均达到显著( $P < 0.05$ )。 $Taq$  酶用量高,会使非特异性扩增产物积累,而且产生大量杂带,不利于进一步的分析工作,而用量低会造成合成效率降低,扩增产物减少。因此综合考虑各方面因素,选择 1.0 U/20  $\mu$ l 作为 SRAP-PCR 反应体系中的最佳  $Taq$  酶浓度。

表 4 SRAP-PCR 反应各因素间方差分析

Table 4 Variance analysis for the factors of SRAP-PCR reaction

变异来源 Source of variation	自由度 Df	方差 Sum of squares	均方 Mean square	F 值 F value	显著性检验 Sig.
Taq 酶 Taq DNA polymerase	3	109.094	36.365	29.838	0.000
Mg <sup>2+</sup>	3	245.094	81.698	67.034	0.000
模板 DNA DNA template	3	31.844	10.615	8.709	0.001
dNTP	3	52.844	17.615	14.453	0.000
引物 Primer	3	58.594	19.531	16.026	0.000
误差 Error	16	19.500	1.219		
总计 Total	31	3 127.000			



A: Taq 酶; B: Mg<sup>2+</sup>; C: 模板 DNA; D: dNTP; E: 引物

A: Taq DNA polymerase; B: Mg<sup>2+</sup>; C: DNA template; D: dNTP; E: Primer

图 3 Taq 酶、Mg<sup>2+</sup>、模板 DNA、dNTP 和引物浓度对 SRAP-PCR 结果的影响

Fig. 3 The effect of Taq DNA polymerase, Mg<sup>2+</sup>, DNA template, dNTP, and primer concentrations on SRAP-PCR

### 2.3.2 Mg<sup>2+</sup> 浓度对 SRAP-PCR 结果的影响

Mg<sup>2+</sup> 浓度对 PCR 扩增结果的特异性和产量有着显著影响(图 3-B)。本实验中除 2.0 与 2.5 mmol/L 水平间差异不显著外, Mg<sup>2+</sup> 各个浓度水平间差异都是显著的。由表 4 中的 F 值可知, Mg<sup>2+</sup> 浓度在本反应体系中对扩增结果影响最大, 这一结果与其他研究者报道的结果是一致的(王彦华等 2000)。综合考虑, 选择 2.0 mmol/L 为本反应体系的 Mg<sup>2+</sup> 最佳浓度。

### 2.3.3 模板 DNA 浓度对 SRAP-PCR 结果的影响

模板 DNA 浓度在本试验梯度范围内对 PCR 结果产生了一定影响。其中 40.0 ng/20 $\mu$ l 水平与另外 3 水平间差异显著,而 80.0、120.0 和 160.0 ng/20 $\mu$ l 水平间差异不显著(图 3-C)。这一结果与陈万盛等(2008)、谢朝添等(2008)研究报道的结果基本一致。据此,正交实验中得到最佳效果的模板 DNA 浓度 40.0 ng/20 $\mu$ l 作为中国对虾 SRAP-PCR 反应的最佳模板水平。

### 2.3.4 dNTP 浓度对 SRAP-PCR 结果的影响

dNTP 是扩增反应的原料,必须满足一定的浓度才能完成扩增。浓度低时,扩增受限;浓度高时则会与 *Taq* 酶竞争结合  $Mg^{2+}$  而影响酶活性的发挥,以至影响扩增的效果,因此反应体系中 dNTP 浓度需要合理控制。由图 3-D 可见,整体上,随 dNTP 浓度增加,扩增效果渐佳。低浓度水平间对扩增结果的影响差异不显著,但是与较高浓度(0.125 mmol/L)间表现为差异显著(图 3-D)。因此本实验选择 dNTP 最佳水平为 0.125 mmol/L。

### 2.3.5 引物浓度对 SRAP-PCR 结果的影响

由图 3-E 可见,引物浓度 0.2、0.3 和 0.5  $\mu$ mol/L 浓度水平间表现为差异不显著,但三者均与 0.4  $\mu$ mol/L 浓度水平形成显著差异。说明在本实验引物梯度范围内对扩增结果影响较小,但浓度的变化对电泳效果有一定影响,例如背景带的加深等,会影响后续的结果分析。因此选择扩增效果最佳时的峰值 0.4  $\mu$ mol/L 为反应中引物的最佳水平。

### 2.3.6 引物退火温度的筛选

根据本实验所使用的 PCR 仪中的 Gradient 功能设定了自 45~55 $^{\circ}$ C 的温度梯度,依次为:45.0、45.3、45.9、46.7、47.8、49.3、51.0、52.4、53.5、54.3、54.8、55.0 $^{\circ}$ C,扩增结果见图 1。退火温度低,扩增特异性差,条带少,过高则引物与模板结合能力差,电泳条带亮度变低。根据条带丰富性、清晰性原则,确定最佳退火温度为 53.5 $^{\circ}$ C。

## 2.4 第 12 代“黄海 1 号”中国对虾选育群体的 SRAP 遗传多样性分析

### 2.4.1 SRAP-PCR 结果

在 SRAP-PCR 扩增实验中,以随机取样的 30 尾“黄海 1 号”中国对虾样品提取基因组 DNA 为模板进行引物筛选,依据扩增结果多态性高、分辨率强、重复性好的原则,从 7 条正向引物和 7 条反向引物的随机组合中筛选出 8 对引物组合,部分引物组合的扩增结果见图 4。这 8 对引物组合共扩增出 171 个位点,其中多态性位点有 154 个,多态位点百分率(*P*)为 90.058%,每对引物组合扩增产生的位点数为 15~28 个,平均为 21.375 个位点,扩增条带大小在 80~1 000 bp 之间。结果显示,建立的 SRAP-PCR 反应体系具有较高的稳定性和可重复性,SRAP 标记具有较高的分辨率。各引物组合及其扩增结果见表 5。

### 2.4.2 第 12 代“黄海 1 号”中国对虾人工选育群体的遗传多样性分析

根据表 5 所示筛选出的 8 对引物组合对随机取样的第 12 代“黄海 1 号”中国对虾 60 个个体进行 SRAP 扩增,部分扩增结果见图 4。将扩增的条带统计为 0/1 矩阵,利用 POPGENE 32 统计软件分析了第 12 代中国对虾选育群体的遗传结构,结果如表 6 所示。选育群体的有效等位基因数为 1.774 1,Nei's 遗传多样性指数在 0.047 0~0.499 7 之间,平均为 0.421 9;Shannon 多样性指数在 0.113 6~0.692 8 间分布,平均为 0.605 5。

## 3 讨论

### 3.1 SRAP 反应体系的优化

目前应用于中国对虾研究中的分子标记技术主要有 RAPD(随机扩增多态性),AFLP(扩增片段长度多态性)和 SSR(微卫星标记)技术等(孟宪红等 2004;李健等 2005;孙昭宁等 2006;刘萍等 2007;Li *et al.* 2006; Yue *et al.* 2005;孔杰等 2007;王鸿霞等 2008)。这些分子标记技术基本上是扩增非编码

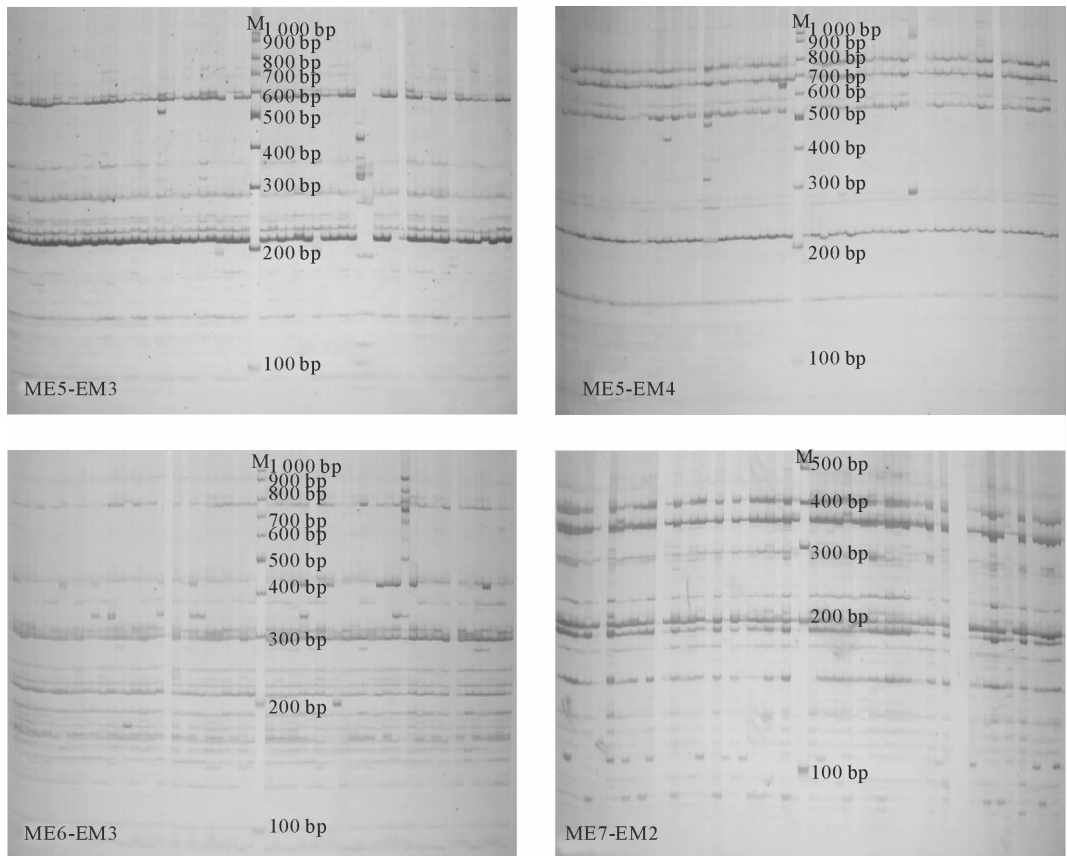


图4 部分引物组合的SRAP-PCR扩增结果

Fig. 4 Results of SRAP-PCR amplification with some primer combinations

表5 不同引物组合扩增位点数和多态位点数

Table 5 Number of loci and polymorphic sites with different primer combinations

引物组合 Primer combination	ME7-EM2	ME7-EM7	ME2-EM5	ME1-EM4	ME6-EM3	ME3-EM6	ME5-EM3	ME6-EM4	总计 Total
位点数 Number of loci	21	28	17	26	24	23	17	15	171
多态位点数 Number of polymorphic sites	20	23	15	24	23	20	17	12	154

表6 中国对虾“黄海1号”第12世代选育群体遗传多态性

Table 6 Genetic diversity in the selected population of 12th generation of *F. chinensis* “Huanghai No. 1”

参数 Parameter	等位基因数 Observed number of alleles	有效等位基因数 Effective number of alleles	Nei's (1973)遗传多样性 Nei's(1973) genetic diversity	Shannon 多样性指数 Shannon's information index
数值 Value	1.983 3±0.129 1	1.774 1±0.246 9	0.421 9±0.107 8	0.605 5±0.135 5



区或者是随机扩增基因组,所获得结果一般与目标候选基因距离较远,不利于目标性状紧密相关分子标记的筛选。而 SRAP 技术可较紧密连锁基因组表达序列,有利于目标性状候选基因的筛选,且 SRAP 技术具有简便、稳定、中等产率、条带易回收、引物成本低以及部分共显性等优点(Li *et al.* 2001),并在植物研究中已有广泛应用(Budak *et al.* 2004; Ferriol *et al.* 2003; Riaz *et al.* 2001; Li *et al.* 2003; Lin *et al.* 2009; Alwala *et al.* 2008, 2009; Rahman *et al.* 2007),但在水产动物相关研究中还鲜见报道。本文是首次将该技术应用于中国对虾的研究。经正交优化设计确定的中国对虾 SRAP 分子标记分析的最佳反应体系为:20  $\mu\text{l}$  反应体系中包含 1.0 U *Taq* 酶,2.0 mmol/L 的  $\text{Mg}^{2+}$ ,40.0 ng 的模板 DNA,0.125 mmol/L 的 dNTP 以及 0.4  $\mu\text{mol/L}$  的引物,退火温度为 53.5 $^{\circ}\text{C}$ 。由于引物的不同,其退火温度也不一样。温度高,扩增产物的特异性强,反之则产物量高。因此换用不同引物前,需先进行温度梯度退火实验以确定最佳退火温度。

PCR 体系的优化一般采用多次单因素设计方法,本文利用统计软件将正交设计和分析应用于反应体系优化中,使实验结果更简便、科学,因素间和因素内水平的变化规律更清晰,具有一定的客观准确性,但也存在一定局限性,如对实验结果评价标准具有主观性、不能很好估计实验误差等。因此可通过多次实验重复,建立更客观判断标准以使此实验方法更加科学和完善。

本研究建立的 SRAP-PCR 体系与罗氏沼虾(周劲松等 2006)和日本沼虾(姚建华等 2008)体系差别较大(表 7),这可能与种属间差异有关。各反应因素对结果影响大小顺序依次为  $\text{Mg}^{2+}$ 、*Taq* 酶、引物、dNTP 和模板 DNA。其中  $\text{Mg}^{2+}$  浓度变化对结果影响最大,与姚建华等(2008)的研究结果一致。这主要是因为  $\text{Mg}^{2+}$  对扩增的特异性和产量有显著影响,浓度过低会使 *Taq* 聚合酶活性降低,导致反应产量下降;反之,浓度过高,则 PCR 反应特异性降低,影响结果的真实性与可靠性。也可能是与其他因素交互作用所致。试验结果表明,*Taq* 酶也是影响结果特异性和产物量的重要因素之一,这与谢朝添等(2008)研究结论相一致。模板 DNA 浓度对结果影响最小,说明 SRAP-PCR 对模板 DNA 的浓度要求较低。dNTP 用量较少,是因为浓度过高则会与 *Taq* 酶竞争结合  $\text{Mg}^{2+}$  而影响酶活性的发挥进而影响扩增结果,同时也可能与因素间的互作效应有关。模板和 dNTP 用量对 PCR 结果影响不大,这与在紫菜研究(谢朝添等 2008)中获得的两因素对 SRAP-PCR 结果影响差异不显著结论相类似,说明 SRAP-PCR 技术体系对模板和 dNTP 的要求比较宽泛。本研究确定的引物浓度与日本对虾和罗氏沼虾 SRAP 体系中引物用量相差不大。

表 7 中国对虾与日本对虾、罗氏沼虾 SRAP 反应体系比较

Table 7 The comparison of SRAP reaction system in *M. nipponense*, *M. rosenbergii*, and *F. chinensis*

种类 Species	$\text{Mg}^{2+}$ (mmol/L)	dNTP (mmol/L)	<i>Taq</i> 酶 <i>Taq</i> polymerase (U/20 $\mu\text{l}$ )	引物 Primer ( $\mu\text{mol/L}$ )
日本沼虾 <i>M. nipponense</i>	2.5	0.25	0.64	0.6
罗氏沼虾 <i>M. rosenbergii</i>	1.5	0.25	0.8	0.4
中国对虾 <i>F. chinensis</i>	2.0	0.125	1.0	0.4

### 3.2 第 12 代“黄海 1 号”中国对虾选育群体遗传结构分析

种质资源是遗传育种的基础,对其遗传多样性的合理评价是有效利用和创新的前提,也可为资源的保护和养殖产业的健康、可持续发展提供理论指导。水产生物分子生物技术的研究起步相对较晚,借鉴植物、畜牧研究领域先进技术和研究方法,对于促进水产新品种选育以及种质资源保护等都具有积极且重要的意义。本研究利用建立的 SRAP 反应体系对第 12 代中国对虾“黄海 1 号”选育群体进行了遗传多样性分析,发现 SRAP 标记具有很高的多态位点比例(90.06%),而应用 AFLP 技术对第 3~10 世代选育群体分析得到的多态位点比例为 38.12%~43.01%(李朝霞等 2006;安 丽等 2008),第 12 世代 Shannon 信息指数( $I$ )值明显高于 1~10 世代的  $I$  值(0.136 6~0.212 0)(李朝霞等 2006;安 丽等 2008;何玉英等 2004),与罗氏沼虾多态

性分析结果一致。周劲松等(2006)对罗氏沼虾、张志伟等(2007)对草鱼 SRAP 遗传多样性研究获得的对多态位点比例分别为 55.6%~64.1%和 53.33%~76.67%,多样性指数分别为 0.175~0.197 和 0.2618~0.3139,中国对虾与之相比具有较高的遗传优势。遗传结构分析结果验证了 SRAP 标记技术具有较高的分辨率,是评价遗传多样性、分析遗传结构的有效工具,能更好地反映表型的多样性和进化历史。

针对多态位点比例和 Shannon 指数表现出的明显差异,笔者分析认为:首先 SRAP 技术主要扩增基因组的开放读码框(ORFs),因物种的内含子、启动子与间隔长度不等而产生多态性,而此三者在不同物种甚至同物种的不同个体间变异也会很大,从而产生较高的多态性,这与其他研究者所用的 RAPD 或 AFLP 技术原理是不同的,也是产生研究结论差异的主要原因。其次,SRAP 具有较高的共显性比例(Li *et al.* 2001),研究得到 20%的共显性比例,而 AFLP 的共显性比例一般在 4%~15%间(林斌彬等 2008)。但由于 SRAP 整体为显性标记,在软件分析时不得不选择显性标记分析功能进行统计计算,所以实验结果较实际偏高。第三,样本数大小、取样材料的组成等可能会影响最终实验结果对总体的评价。

## 参 考 文 献

- 丁炜东,曹丽萍,曹哲明. 2008. 草鱼种质相关 SRAP 及 SCAR 的分子标记. 动物学报, 54(3): 475~481
- 孔杰,高焕,于飞,罗坤,王伟继,孟宪红,刘萍,张天时. 2007. 微卫星三重 PCR 基因扫描技术在中国明对虾家系标识中的应用. 中国水产科学, 14(1): 59~66
- 邓景耀,叶昌臣,刘永昌. 1990. 黄渤海的对虾及其资源管理. 北京:海洋出版社,36
- 王彦华,候喜林,徐明宇. 2000. 正交设计优化不结球白菜 ISSR 反应体系研究. 西北植物学报, 24(5): 899~902
- 王鸿霞,张晓军,李富花,相建海. 2008. 应用微卫星标记分析野生中国明对虾的亲权关系. 水生生物学报, 32(1): 42~46
- 孙昭宁,刘萍,李健,孟宪红,孔杰,张秀梅. 2006. RAPD 和 SSR 两种标记构建的中国对虾遗传连锁图谱. 动物学研究, 27(3): 317~324
- 刘萍,孔杰,石拓,刘志鸿,李健,韩玲玲. 1999. 爆发性流行病病原对中国对虾亲虾人工感染及对子代影响的 PCR 检测. 海洋与湖沼, 30(2): 139~144
- 刘萍,徐怀恕. 2000. 中国对虾黄、渤海沿岸地理群的 RAPD 分析. 海洋学报, 22(5): 88~93
- 刘萍,何玉英,孙昭宁,孔杰,王清印. 2007. 中国对虾生长性状相关遗传标记的筛选与克隆. 海洋水产研究, 28(2): 1~6
- 李朝霞,李健,何玉英,刘萍,王清印. 2006. 中国对虾人工选育快速生长群体不同世代间的 AFLP 分析. 高技术通讯, 16(4): 435~440
- 安丽,刘萍,李健,何玉英,王清印,孔晓瑜. 2008. “黄海 1 号”中国对虾不同世代间的 AFLP 分析. 中国海洋大学学报, 38(6): 921~926
- 李健,刘萍,何玉英,宋全山,牟乃海,王清印. 2005. 中国对虾快速生长新品种“黄海 1 号”的人工选育. 水产学报, 29(1): 1~5
- 张福绥. 2003. 近现代中国水产养殖业发展回顾与展望. 世界科技研究与发展, 25(3): 5~13
- 张志伟,韩曜平,仲霞铭,张志勇,曹哲明,吴婷婷. 2007. 草鱼野生群体和人工养殖群体遗传结构的比较研究. 中国水产科学, 14(5): 720~725
- 陈万盛,王元英,罗成刚,杨爱国,蒋彩虹,范静苑. 2008. 利用正交设计优化烟草 SRAP 反应体系. 分子植物育种, 6(1): 177~182
- 孟宪红,马春燕,刘萍,王清印,孔杰. 2004. 黄渤海中国对虾 6 个地理群的遗传结构及遗传分化. 高技术通讯, 14(4): 97~102
- 何玉英,刘萍,李健. 2004. 中国明对虾第一代和第六代人工选育群体的遗传结构分析. 中国水产科学, 11(6): 572~575
- 周劲松,曹哲明,杨国梁,李建林,张志伟,吴婷婷. 2006. 罗氏沼虾缅甸引进种和浙江本地种及其杂交种的生长性能与 SRAP 分析. 中国水产科学, 13(4): 667~672
- 林斌彬,张子平,王艺磊,张雅芝. 2008. AFLP 技术发展及其在水产生物学中的应用. 集美大学学报(自然科学版), 13(1): 45~51
- 姚建华,傅洪拓,龚永生. 2008. 日本沼虾 SRAP 反应体系正交设计及优化. 华北农学报, 23(增刊): 122~125
- 郁昭,李树航,邵本力. 1997. 田间试验与统计分析. 哈尔滨:黑龙江科学出版社, 210~212
- 谢朝添,陈昌生,纪德华,徐燕,徐元君. 2008. 坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)SRAP 分子标记体系的构建及种质材料的遗传分析. 自然科学进展, 18(3): 247~253
- Alwala, S., Kimbeng, C. A., Veremis, J. C., and Gravois, K. A. 2008. Linkage mapping and genome analysis in a *Saccharum* interspecific cross using AFLP, SRAP and TRAP markers. *Euphytica*, 164(1): 37~51
- Alwala, S., Kimbeng, C. A., Veremis, J. C., and Gravois, K. A. 2009. Identification of molecular markers associated with sugar-related traits in a *Saccharum* interspecific cross. *Euphytica*, 167(1): 127~142
- Budak, H., Shearman, R. C., and Parmaksiz, I. 2004. Molecular characterization of Buffalograss germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers. *Theor. Appl. Genet.* 108: 328~334

- Ferriol, M., Pico, B., and Nuez, F. 2003. Genetic diversity of a germplasm collection of Cucurbitapepo using SRAP and AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 107: 271~282
- Li, G., and Quiros, C. F. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theor. Appl. Genet.* 103: 455~461
- Li, G., Gao, M., Yang, B., and Quiros, C. F. 2003. Gene for gene alignment between the Brassica and A rabidopsis genomes by direct transcriptome mapping. *Theor. Appl. Genet.* 107: 168~180
- Li, Z. X., Li, J., Wang, Q. Y., He, Y. Y., and Liu, P. 2006. AFLP-based genetic linkage map of marine shrimp *Penaeus (Fenneropenaeus) chinensis*. *Aquaculture*, 261(2): 463~472
- Lin, Z. X., Zhang, Y. X., Zhang, X. L., and Guo, X. P. 2009. A high-density integrative linkage map for *Gossypium hirsutum*. *Euphytica*, 166(1): 35~45
- Rahman, M., McVetty, P. B. E., and Li, G. 2007. Development of SRAP, SNP and multiplexed SCAR molecular markers for the major seed coat color gene in *Brassica rapa* L. *Theor. Appl. Genet.* 115(8): 1 101~1 107
- Riaz, A., Li, G., and Quresh, Z. 2001. Genetic diversity of oilseed Brassicanapu inbred lines based on sequence-related amplified polymorphism and its relation to hybrid performance. *Plant Breeding*, 120(5): 411~415
- Wang, Q. Y., Kong, J., Li, J., and Wang, W. J. 2006. Selective breeding and genetic improvement in fleshy shrimp continue in China. *Global Aquaculture Advocate*, 9(6): 74~75
- Wang, Q. Y., Yang, C. H., and Yu, J. 1995. The shrimp farming industry in China: past development, present status and perspectives on the future. In C. L. Browdy and J. S. Hopkins editors. *Swimming through troubled waters. Proceedings of special session on shrimp farming.* Page 1~12, *Aquaculture '95*, World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA
- Wofus, G., Garcia, D. K., and Alcivar-Warren, A. 1997. Application of micro satellite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs. *Aquaculture*, 152: 35~47
- Yue, Z. Q., Wang, W. J., and Kong, J. 2005. Isolation, cloning and sequence of AFLP markers related to disease-resistance traits in *Fenneropenaeus chinensis*. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 23(4): 442~447