

# 用 RAPD 技术检测龙须菜色素突变体 基因组的变化\*

李向峰 隋正红 张学成  
(青岛海洋大学海洋生命学院 青岛 266003)

**提要** 龙须菜野生型于 1996 年采自青岛太平角, 经性别、相态确认后进行实验; 突变株为野生型经诱变的配子体。用 RAPD 技术检测野生型龙须菜及 3 株色素突变体的基因组特性及差异。共选用 10 个随机引物进行扩增, 产生 167 条 DNA 片段, 检测到 38 个多态位点, 并显示 gr184 在 0.66、0.79、2.0kb 处的特征带。结果表明, 野生型株藻与突变株基因组有明显差异, 在 3 个突变藻株中, 有 2 株绿色突变体的基因组更相近。

**关键词** 龙须菜 色素突变体 RAPD

**学科分类号** Q789

在对产琼胶红藻——龙须菜的遗传研究中, 人们利用 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)对龙须菜配子体进行诱变, 从中筛选出几株色素突变体, 并对色素突变体的形态及生理生化特性进行研究, 发现色素突变体在生长速度及光合作用器——藻胆体的结构和光谱特性方面均与野生型显著不同, 但对色素突变体基因组的变化却了解很少(张学成等, 1996; Zhang *et al.*, 1988)。随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术能快速有效地进行基因组 DNA 多态性检测, 在褐藻(Ho *et al.*, 1995)、红藻(Patwary *et al.*, 1993, 1994)中已得到广泛的应用。但这些研究集中在用 RAPD 进行种属特征及种群遗传分析方面, 对红藻江蓠属, 以及用于突变体检测分析尚未见有关报道。本文首次利用 RAPD 技术研究龙须菜种内野生型及不同色素突变体的基因组的变化情况, 并对它们之间的遗传相似性关系进行了讨论。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)野生型(GL)于 1996 年采自青岛太平角。野生型藻株为配子体, 绿色突变体 gr180、gr184 和黄色突变体 ye100 为龙须菜经 MNNG 诱变后筛选出的色素突变配子体, 有关这 3 个突变藻株的遗传背景及生理特性见张学成等(1996)。野生型选取混合样品进行分析。

### 1.2 方法

**1.2.1 总DNA的提取** 按李向峰等(1998)的方法进行。取250mg干净的藻体茎尖,

\* 国家攀登计划 B 资助项目, PD B 6- 4- 3 号; 曾呈奎海洋科学发展基金资助项目(1996)。李向峰, 男, 出生于 1971 年 3 月, 硕士, E-mail: xczhang@ouqd.edu.cn

收稿日期: 1998-05-08, 收修改稿日期: 1999-06-28

加 CTAB[3% (W/V) 十六烷基三甲基溴化铵, 1.4mol/L NaCl, 20mmol/L EDTA, 10mmol/L Tris-HCl (pH= 8.0) 和 0.2%  $\beta$ - 巯基乙醇] 缓冲液 700—1000 $\mu$ l, 在冰浴中充分研磨。然后在 60—65 $^{\circ}$ C 温浴 10—15min, 40 $^{\circ}$ C 200r/min 振荡 30—60min, 之后用氯仿抽提 5min, 1000r/min 离心 10min, 用酚: 氯仿: 异戊醇(25: 24: 1) 抽提 5min, 1000r/min 离心 10min。在上清液中加入 2/3 体积的异丙醇, 在 -20 $^{\circ}$ C 下沉淀 15min, 再于室温 5000r/min 离心 10min, 用 70% 乙醇洗沉淀, 真空抽干。37 $^{\circ}$ C 下, 将核酸溶于 100—200 $\mu$ l TE<sub>1</sub>(10mmol/L Tris-HCl, pH= 8.0, 1mmol/L EDTA) 10min, 14000r/min 离心 5min。在不干扰沉淀的情况下, 将上清液移到新的微量管中, 加醋酸钠至终浓度 0.15mol/L 和 2.5 倍体积 95% 的 -20 $^{\circ}$ C 乙醇, 立即离心使 DNA 沉淀, 用 70% 的 -20 $^{\circ}$ C 乙醇洗涤沉淀 DNA, 真空干燥。在 37 $^{\circ}$ C 下, 把 DNA 溶在 100—200 $\mu$ l TE<sub>2</sub>(10mmol/L Tris, pH= 8.0, 0.1mmol/L EDTA) 中稀释到终浓度为 5ng/ $\mu$ l, 4 $^{\circ}$ C 储存备用。

**1.2.2 引物的筛选和合成** 参考在藻类, 尤其是红藻中成功进行 RAPD 扩增的文献 (Ho *et al.*, 1995; Patwary *et al.*, 1993, 1994; Steane *et al.*, 1991), 设计了 10 个引物, 由上海生物工程中心合成, 记为 P-1 到 P-10, 其碱基顺序及特性见表 1。

表 1 RAPD 引物序列及特性

Tab. 1 Primers with corresponding DNA sequences and characters

引物	引物顺序(5'—3')	大小	GC(%)	文献
P-1	AGGGCCGACC	10	80	Ho <i>et al.</i> , 1995
P-6	CCGGCCTTAG	10	70	Patwary <i>et al.</i> , 1993
P-2	CGACCAGAGC	10	70	Patwary <i>et al.</i> , 1994
P-7	TTCCCGCGC	10	80	Patwary <i>et al.</i> , 1993
P-3	GCGGCATGG	10	80	Patwary <i>et al.</i> , 1994
P-8	TTCCCGACC	10	70	Patwary <i>et al.</i> , 1993
P-4	AAACAGCCCG	10	60	Patwary <i>et al.</i> , 1994
P-9	CGCGAGCAC	10	80	Patwary <i>et al.</i> , 1994
P-5	CCTGGGCCTG	10	80	Patwary <i>et al.</i> , 1993
P-10	ATCGGCTCCG	10	70	Patwary <i>et al.</i> , 1994

**1.2.3 PCR 反应** PCR 反应在 25 $\mu$ l 的体系中进行, 其它条件参见李向峰等(1998)。取 PCR 扩增产物 10 $\mu$ l 在 1.4% 琼脂糖凝胶中电泳 2h (3V/cm), 经含 0.5 $\mu$ g/ml 溴化乙锭染色后, 在紫外灯下观察拍照。

**1.2.4 数据处理** 将照片冲洗放大以后, 测量各片段与各点样槽之间的距离, 根据 DNA 片段在电场中的迁移率( $d$ )与分子量的对数值成反比( $d = k/\lg M$ )的原理, 按照分子量对照算出每个片段的大小。以 DNA 各扩增片段的有无来表示 RAPD 扩增带型的多态性。

**1.2.5 统计分析** 随机扩增 DNA 片段的相似性, 据 Jaccard 公式 (Sneath *et al.*, 1973): 相似性系数  $F = 2N_{xy}/N_x + N_y$  (式中,  $N_x$  和  $N_y$  分别为 X 和 Y 个体拥有的 RAPD 标记数,  $N_{xy}$  表示两个样品共同具有的 RAPD 标记数)。用 UPGMA 软件对相似性系数进行处理。

## 2 结果与讨论

用 10 个引物对野生型龙须菜及色素突变株 gr180, gr184 和 ye100 基因组进行随机扩增, 共产生 167 条 DNA 片段, 平均每个引物每个个体产生 4.1 条, 其中最多产生了 9 条 (P- 10 在野生型中), 最少产生 2 条 (P- 8 在野生型中)。大多数片段分子量大小范围为 0.32—4.0kb。其中 7 个引物扩增产生了 38 条多态性的 DNA 片段, 由 P- 6 扩增产生了最多的 11 条多态性 DNA 片段。作者在统计多态性时, 只以 DNA 片段的有无来表示, 扩增的 DNA 带的强弱也可能反映 DNA 水平上的变化(如拷贝数的不同)(陆军等, 1993)。本文在进行多态性分析时没有考虑这种差异。

图 1 为 5 个引物对龙须菜野生型及 3 个色素突变体扩增的图谱, 其中图 1a 为引物 P- 1 和 P- 10 的扩增结果, 图 1b 为引物 P- 5、P- 6 和 P- 7 的扩增的结果。

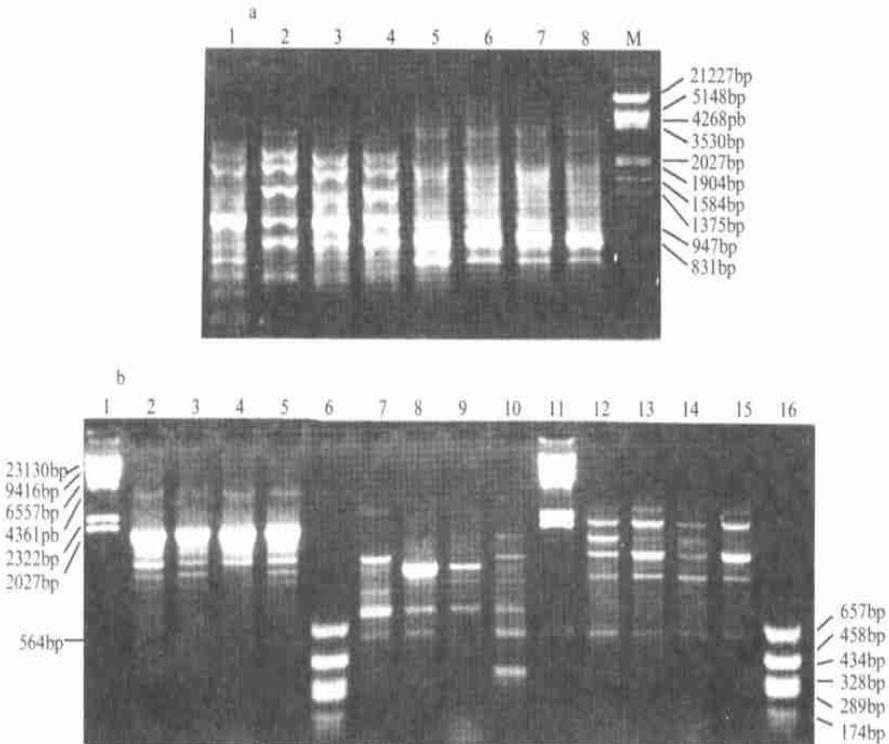


图 1 5 个引物对龙须菜野生型和色素突变体的扩增带型图谱

Fig. 1 The amplified band patterns of *G. lemaneiformis* and pigment mutants by 5 primers

a. P- 1, P- 10 的扩增结果。1—4: P- 10; 5—8: P- 1。M:  $\lambda$ DNA/EcoRI + Hind III; 1,5: GL;

2,6: gr180; 3,7: gr184; 4,8: ye100

b. P- 5, P- 6, P- 7 的扩增结果。2—5: P- 5; 7—10: P- 6; 12—15: P- 7。1,11: M.  $\lambda$ DNA/Hind

III; 6, 16: pGEM7ZII(+)/HaeIII; 2, 7, 12: GL; 3, 8, 13: gr180; 4, 9, 14: gr184; 5, 10, 15: ye100

由引物 P- 1 和 P- 5 扩增产生的条带在实验的 4 个藻株中的分子量及条带数完全一致, 扩增强度也几乎完全相同, 表明虽然野生型龙须菜与突变株之间, 不同的突变株之间藻体颜色、生长速度及某些生理生化性质有很大不同, 但仍属于同一个物种, 它们的基因组仍具有很大的相似性。野生型与绿色突变体之间仍能杂交并产生正常的后代(张学成等, 1996)也证实了这种相似性。另外, 引物 P- 9 产生的带谱在 4 个藻株中分子量及条带

数目完全一致, 但是不同带的扩增强度有差异。

其余 7 个引物对不同藻株的随机扩增产生的扩增带在带的分子量及数量上有差异, 这种差异(或多态性)反映出龙须菜的野生型藻株与突变型藻株之间, 以及不同的突变型藻株之间基因组在分子水平上的差异。

引物 P- 7、P- 8 产生的带谱在 4 株藻中相近, 只有少数几条有扩增强度和位置的差异。

引物 P- 6 产生的带谱在 4 个藻株中差异很大, 由该引物扩增产生的相似性系数见表 2。由表 2 可知, 基于这两个引物计算得到的相似性指数最高才有 0.46, 比 10 引物综合相似性指数低得多, P- 6 充分反映了 4 株藻基因组织的差异。

表 2 龙须菜野生型和突变体之间的相似性系数

Tab. 2 The similarity matrix of *G. lemaneiformis* and its pigment mutants

藻株	野生型(GL)		绿色突变体(gr180)		绿色突变体(gr184)	
	P- 6 扩增	10 引物综合	P- 6 扩增	10 引物综合	P- 6 扩增	10 引物综合
GL						
gr180	0.460	0.571				
gr184	0.150	0.508	0.330	0.770		
ye100	0.310	0.581	0.330	0.766	0.330	0.680

引物 P- 3、P- 10 扩增产生的带谱在 3 株色素突变体间相似而与野生型明显不同, 这一现象说明 3 株突变体涉及的部分突变相差不多, 即这些突变在 3 株色素突变体中均存在, 它们的位置及突变特性相似, 这些突变造成了它们与野生型的差异。

引物 P- 2、P- 4 扩增图谱在 4 株藻相似, 但可见特征条带: 引物 P- 2 在绿色突变体 gr184 产生 0.79kb 处有一条特征带, 而另一个绿色突变体 gr180 却没有这条带, 其它扩增带在这两个绿色突变体中没有区别; P- 4 揭示 gr184 突变体中在 0.66kb 和 2.0kb 处有其它 3 株藻没有的带, 而其它带在 4 株藻中均存在; 在培养过程中也发现 gr184 长得更粗壮, 这可能提示了 gr184 的不同的生理特性, 还有待于进一步的生化研究。这些特征带可作为 gr184 的特异标记。

表 2 中的 4 株藻 10 引物扩增后相似性指数, 反映出 4 株藻有很近的亲源关系; 图 2 为据扩增图谱用 UPGMA 作出的相似性关系图, 由图 2 可见 gr180 和 gr184 基因组织最相近, 而 3 株色素突变体又可构成一个群体, 这与作者通过扩增图谱分析得到的结论是一致的。

由图 2 还可看出, gr180 和 gr184 在基因组织上有很大的相似性, 对这两株绿色突变体的生化研究也提示它们在许多光合特性上是非常相近的, 如吸收光谱特性、藻胆体大小、藻胆蛋白

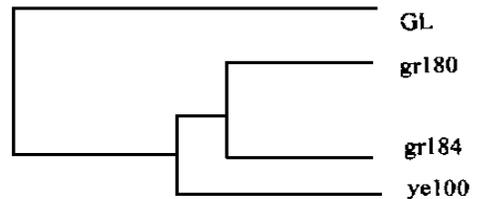


图 2 龙须菜野生型和突变体之间的相似性关系图

Fig. 2 Clustering *G. lemaneiformis* isolates and its pigment mutants

组成等, 由 RAPD 扩增得到的带谱在两株绿色突变体中的相似性与它们在生化基础上的

相似性是一致的。

引物的合成是随机的,所以 10 种引物所涵盖的基因组织应是随机的,并且也是比较全面的。超过一半的引物扩增结果在四品系中的相似性说明 4 株藻大部分的基因组组成相近,序列间同源性较高。这可以理解,因为色素突变体是从野生型诱变来的。

作者曾对野外采集的不同个体野生型龙须菜用 10 引物进行 RAPD 扩增,发现虽然是属于不同个体,但它们的图谱对同一引物几乎完全一致,说明 RAPD 反映了种群内基因组织的相似性,即种群内个体之间的 RAPD 图谱相差不大;而 P- 6 扩增出现如此大的差异,说明色素突变体的一些基因结构的确已发生了变化。而由 P- 2、P- 4、P- 7、P- 8、P- 9 扩增得到的分子量相同的一些条带也有强弱的差异,说明 RAPD 在检测突变体基因组织变化时的灵敏性。

### 参 考 文 献

- 李向峰,隋正红,张学成,1998. RAPD 技术在龙须菜遗传多样性研究中的应用 I. DNA 的提取及 RAPD 反应条件的优化. 青岛海洋大学学报,28(2):7-12
- 张学成,张锦东,隋正红等,1996. 江蓠属藻胆蛋白的研究 I. 诱变、突变体筛选及藻胆蛋白的光谱特性. 青岛海洋大学学报,26(3):318-326
- 陆军,钱惠荣,庄杰云等,1993. 利用 RAPD 技术检测水稻的基因组变化. 科学通报,38(23):2181-2182
- Ho Chai- Ling, Phang Siew- Moi, Pang Tikki, 1995. Molecular characterisation of *Sargassum polycystum* and *S. siliquosum* (Phaeophyta) by polymerase chain reaction (PCR) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) primers. J Appl Phycol, 7: 33-41
- Patway M U, Mackay R M, Van der meer J P *et al*, 1993. Revealing genetic markers in *Gelidium vagum* (Rhodophyta) through the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. J Phycol, 29:216-222
- Patway M U, Van der Meer J P, 1994. Application of RAPD markers in an examination of heterosis in *Gelidium vagum* (Rhodophyta). J Phycol, 30: 91-97
- Sneath P H, Sokal R R, 1973. Numerical Taxonomy. San Francisco: Freeman, 635
- Steane D A, McClure B A, Clarke A E *et al*, 1991. Amplification of the polymorphic 5.8S rRNA gene from selected Australian giant kelp species (Rhodophyta) by polymerase chain reaction. J Phycol, 27: 758-762
- Zhang Xuecheng, Van der meer J P, 1988. A genetic study on *Gracilaria sjoestaltii*. Can J Bot, 66: 2022-2026

## USING RAPD TECHNIQUE TO DETECT GENOMIC CHANGE OF PIGMENT MUTANTS OF *GRACILARIA LEMANEIFORMIS*

LI Xiang-feng, SUI Zheng-hong, ZHANG Xue-cheng

(College of Marine Life Sciences, Ocean University of Qingdao, Qingdao, 266003)

**Abstract** RAPD was used to disclose genomic characters and difference of isolates of wild type and three pigment mutants of *Gracilaria lemaneiformis*. The wild type strains were collected from Taipingjiao cape of Qingdao and experimented after sex and phase identification. A total of 10 random primers were screened for DNA amplification. 167 bands and 38 polymorphic DNA loci were detected, most of which had the molecule weight from 0.32kb to 4.0kb. The result show predominant difference between the genome of wild type strain and mutants, though they belonged to the same species. The polymorphic pattern of the three mutants produced by primer P-3 and P-6 were similar and obviously different from that of the wild type strain, which indicated that partial mutation of the three mutants were not far from each other. The sites and mutation character of the mutants were similar, and the biochemical difference between the wild type strain and the mutants lay in this. The genome of the two green mutants was closer in relationship among the three mutants. Characteristic bands of gr184 with molecular weight of 0.66kb, 0.79kb and 2.0kb were disclosed, which can be used as specific markers of gr184 in the following studies.

**Key words** *Gracilaria lemaneiformis* Pigment mutant RAPD

**Subject classification number** Q789