

第1卷

中国水产生物 种质资源与利用

王清印 李杰人 杨宁生 主编

(补 遗)



海洋出版社

中国水产生物种质资源与利用

(第1卷·补遗)

王清印 李杰人 杨宁生 主编

海洋出版社

2009年·北京

图书在版编目 (CIP) 数据

中国水产生物种质资源与利用. 第1卷: 补遗/王清印,
李杰人, 杨宁生主编. ——北京: 海洋出版社, 2009. 8

ISBN 978 - 7 - 5027 - 7201 - 7

I. 中… II. ①王… ②李… ③杨… III. ①水产生物—种质
资源—中国 ②水产生物—资源利用—中国 IV. S922 S937.3

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 016771 号

责任编辑: 方 菁

责任印制: 刘志恒

海洋出版社出版发行

<http://www.oceanpress.com.cn>

北京市海淀区大慧寺路 8 号 邮编: 100081

北京顺诚彩色印刷有限公司印刷 新华书店北京发行所经销

2009 年 8 月第 1 版 2009 年 8 月第 1 次印刷

开本: 889mm × 1194mm 1/16 印张: 19.75

字数: 510 千字 定价: 68.00 元

发行部: 62147016 邮购部: 68038093 总编室: 62114335

海洋版图书印、装错误可随时退换

编 委 会

主任委员：张显良

副主任委员：李杰人

编 委：（按姓氏笔画排序）

王清印 史建全 白俊杰 冯建新 庄 平

江世贵 孙效文 杨宁生 邹桂伟 欧阳海鹰

逢少军 桂建芳 徐 跑 葛常水

编 写 组

主 编：王清印、李杰人、杨宁生

成 员：（按姓氏笔画排序）

尹红斌 叶 星 白俊杰 匡友谊 朱彩艳

刘志鸿 刘 萍 阎学春 江世贵 孙效文

劳海华 苏天凤 邱丽华 邹桂伟 张 岩

张殿昌 罗建仁 罗相忠 周发林 黄建华

梁利群 梁宏伟 鲁翠云 简 清 薛淑群

特约编辑：欧阳海鹰 曾首英

前言

我国水产生物种质资源的研究已有多年的科学积累，但早期的工作由于规模比较小，力量分散，研究的深度和广度都不尽人意。1999年和2001年，科技部分别下达了科技基础性工作专项资金项目“主要水产养殖品种种质资源收集、整理、保存”和“我国水产种质资源数据库及网络建设”，为水产生物种质资源的系统研究提供了发展契机。项目承担单位中国水产科学研究院及其所属各研究所、中心的科技人员，藉此开始了全方位的研究工作。在相关研究成果的基础上，2005年出版了《中国水产生物种质资源与利用》第一卷，收录了对58种重要水产养殖生物种质资源研究的学术成果。作为研究者和本书的编著者，我们深知对水产生物种质资源信息的挖掘和整理是一项穷经皓首的事业，很难通过一个或几个项目的实施就能取得完备的结果。正因为如此，所取得的成果也只能是初步的或阶段性的。现有研究的深度、广度以及技术水平的限制，决定了该卷收录资料的准确性、完备性和系统性都只能是差强人意。尽管如此，广大读者特别是很多学术界的老前辈、老专家以及中青年科技人员仍然对该卷的出版给予了充分肯定，希望对完成的研究成果继续结集出版。正是这种肯定和支持，鼓舞着我们继续沿着这条荆棘丛生的道路探索向前，在信息的挖掘和整理方面不懈努力，力求为研究、保护和利用大自然赐予人类的这些宝贵的水产生物种质资源做出更好、更系统的基础性工作。

现代分子生物学理论与分析技术的飞速发展，为从分子水平认识和分析水产生物种质资源信息提供了可能。作为种质资源研究的重要组成部分，分子水平的分析结果有助于从DNA水平上了解各物种的基本特征。有鉴于此，我们将《中国水产生物种质资源与利用》第一卷中收录的45个物种的有关微卫星DNA (Microsatellite DNA, 如SSR, Simple Sequence Repeats, 等)，随机扩增多态性DNA (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA)，线粒体DNA (Mitochondrial DNA, mtDNA)，扩增片段长度多态性 (AFLP, Amplified Fragment Length Polymorphisms) 以及其他分子生物学分析的相关结果整理结集，作为《第一卷补遗》出版，以补充和丰富第一卷的资料。读者在阅读或使用有关资料时，可将《中国水产生物种质资源与利用》第一卷和本《补遗》对照查阅。

将水产生物的分子生物学信息作为种质资源信息的一个重要组成部分结集出版，目的在于丰富和完善相关物种的基础资料。但由于受多方面条件限制，所掌握的资料还很不完善，疏漏或错讹之处在所难免。敬请各位读者不吝赐教，以利于今后的修订和补充。

编者 谨识

2009年6月

目次

施氏鲟（史氏鲟）	1	珠江斑鳢	140
鳊	2	长臀鲢	141
虹鳟	3	革胡子鲶	142
金鳊	5	胡子鲶	143
孟苏大麻哈鱼	7	斑鳢	147
哲罗鲑（哲罗鱼）	9	鳅（翘嘴鳅）	148
短盖巨脂鲤（淡水白鲳、似鲳脂鲤）	12	加州鲈鱼（大口黑鲈）	151
广东鲂	20	奥利亚罗非鱼	163
团头鲂	22	尼罗罗非鱼	230
翘嘴红鲌（翘嘴鲌）	32	鲮鱼	261
松浦银鲫（松浦鲫）	33	真鲷	262
彭泽鲫	35	牙鲆	265
德国镜鲤	44	大菱鲆	268
荷包红鲤	46	红鳍东方鲀	274
松蒲鲤	48	中国对虾	275
建鲤	50	罗氏沼虾	281
兴国红鲤	68	锯缘青蟹	284
鲢	76	中华绒螯蟹	286
鳙	103	栉孔扇贝	288
草鱼	113	三角帆蚌	295
青鱼	115	皱纹盘鲍	296
鲮	129	中华鳖	297
露斯塔野鲮	137		

施氏鲟 (史氏鲟)

学名: *Acipenser schrenckii* (Brandt)。

单位: 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所。

1 微卫星 DNA 分析

采集时间: 2006-09。

样品来源: 黑龙江抚远江段。

实验时间: 2006-10-06。

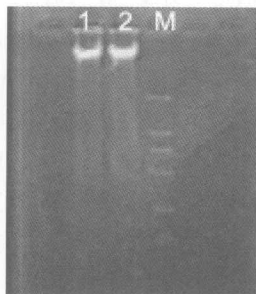
实验员: 梁利群。

取样部位: 鳍条。

样本数: 36 尾。

座位名称: HLJSX7。

DNA 提取方法: 采新鲜的鱼鳍条每 0.1 克加 0.2 mL 裂解液 (0.5% 十二烷基肌胺酸钠, 200 $\mu\text{g/mL}$ 蛋白酶 K, 0.2 mol/L EDTA (pH8.0)) 50 $^{\circ}\text{C}$ 温育 3~4 h, 然后用酚、氯仿、异戊醇混合液 (25:24:1) 抽提两遍, 无水乙醇沉淀, 70% 乙醇洗一次, 自然干燥后加 100 μL 0.1 $\times$ TE 溶解, 保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。



图片说明: 施氏鲟样本的基因组 DNA 电泳图谱
1% 琼脂糖凝胶电泳, M: 分子量标准 DL2000; 1~2: 部分样品

DNA 完整性基因组: 完整。

基因组 DNA 纯度: $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1.8$ 。

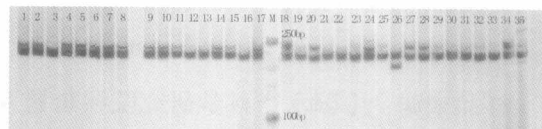
5'引物名称和序列: HLJSX7-F: GAAAG GACACCAGCAGTG。

3'引物名称和序列: HLJSX7-R: AACCC ATTAACAATTACAGC。

PCR 扩增体系和条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;

然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 总计 40 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。

PCR 产物电泳条件: 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 1 倍 TBE 电泳缓冲液, 5 V/cm 电压, 低温电泳。



图片说明: 施氏鲟基因组 DNA 的微卫星扩增电泳图谱
M: 分子量标准 DL2000; 1~35: 样品

微卫星 DNA 大小: 201~256 bp。

微卫星 DNA 序列: CATGAACAGCTAACG
GGATACAATAAATACTTCATTCTTAAAGTGA
AAGGACACCAGCAGTGATGCTGAAAAGAACT
ATAGATGATGGGCAGGGCGATAGCTCTCGAA
TCTCCATCCAGGACAATGTCTGCCTTTATAGC
GCATGCAACATCACGTTTATAGAATCACTGA
ACAGAACTGATTAATATATTGTTCTGTTTCAT
TTACTGTACTGTTTTTTTTTAAACCTTCTTTTAA
AACTGCTGTAATTGTTAATGGGTTCTCTGTGT
GTGTGGTGTGTGTGGTCAAGAATTCGGTACC
GTCGACGATCTGTGTTGTATGTGTGTGTGTGT
GTGTGTGTGTGTGTGTGTGAGGGGATCAGCA
GTATCTAAGGCGGGGGTGTGTGTGTGTGTGT
GTGTGTGTGTGTGTGCGTGAGGGGATCACCA
GTATCTAACGCAGCT

扩增片段长度: 201~256 bp。

等位基因数: 4。

平均杂合度: 0.607 2。

PIC 多态信息含量: $(\text{GT})_{13}$ 。

参考文献

[1] 于冬梅, 匡友谊, 马海涛, 等. 用磁珠富集法制备史氏鲟的微卫星分子标记. 大连水产学院学报, 2007, 22 (6): 431-435.

撰写人: 梁利群

鳊

学名: *Huso dauricus* (Georgi)。

单位: 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所。

1 微卫星 DNA 分析

采集时间: 2006-12。

样品来源: 中国水产科学研究院鲟鱼繁育技术工程中心。

实验时间: 2007-08-12。

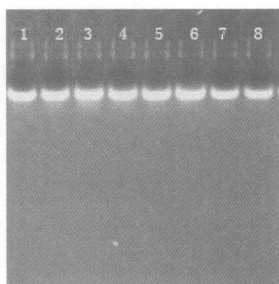
实验员: 殷倩茜。

取样部位: 鳍条。

样本数: 20 尾。

座位名称: HLJHS1。

DNA 提取方法: 采新鲜的鱼鳍条每 0.1 克加 0.2 mL 裂解液 (0.5% 十二烷基肌酸钠, 200 $\mu\text{g/mL}$ 蛋白酶 K, 0.2 mol/L EDTA (pH8.0)) 50 $^{\circ}\text{C}$ 温育 3~4 h, 然后用酚、氯仿、异戊醇混合液 (25:24:1) 抽提两遍, 无水乙醇沉淀, 70% 乙醇洗一次, 自然干燥后加 100 μL 0.1 $\times$ TE 溶解。微卫星序列为自主开发的微卫星富集文库中分离筛选, Primer Premier 3.0 设计, 进行检测。



图片说明: 鳊样本的基因组 DNA 电泳图谱
1% 琼脂糖凝胶电泳, 1~8: 部分样品

DNA 完整性基因组: 完整。

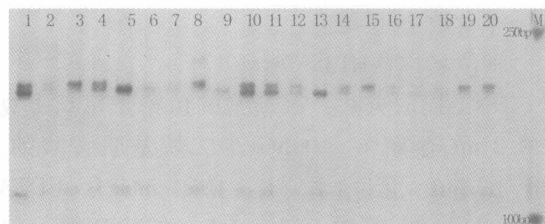
基因组 DNA 纯度: $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1.8$ 。

5'引物名称和序列: HLJHS1-F: TACAG GTACAGCAGCAACGC。

3'引物名称和序列: HLJHS1-R: CATT TTCCCAAACCCAACAC。

PCR 扩增体系和条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 总计 40 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。

PCR 产物电泳条件: 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 5 V/cm 低电压常温电泳 4 h, 银染显带, 扫描。



图片说明: 鳊基因组 DNA 的微卫星标记扩增电泳图谱
M: 分子量标准 DL2000; 1~20: 样品

微卫星 DNA 大小: 305 bp。

微卫星 DNA 序列: GTCGACGATCCTGCT GGAGATGGGAGAGTTCTTCCAGATACAGGTA CAGCAGCAACGCCTTCTGCAGTGTGTGTGTGT GAGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG ATAAC TCCACTGGTCAGTGTGTGTGTGTGTGTG TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTTGGGT TTGGGAAAATGCT。

扩增片段长度: 297~310 bp。

等位基因数: 2。

平均杂合度: 0.502 5。

PIC 多态信息含量: $(CA)_{12}$ 。

撰写人: 梁利群

虹 鳟

学名: *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)。

单位: 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所。

1 RAPD 分析

采集时间: 2005 - 09。

样品来源: 黑龙江水产研究所渤海冷水性鱼试验站。

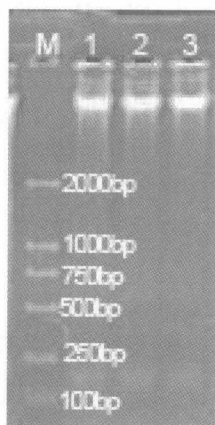
实验时间: 2007 - 09 - 05。

实验员: 鲁翠云。

取样部位: 鳍条。

样本数: 30 尾。

DNA 提取方法: 采新鲜的鱼鳍条每 0.1 克加 0.2 mL 裂解液 (0.5% 十二烷基肌胺酸钠, 200 $\mu\text{g/mL}$ 蛋白酶 K, 0.2 mol/L EDTA (pH8.0)) 50 $^{\circ}\text{C}$ 温育 3 ~ 4 h, 然后用酚、氯仿、异戊醇混合液 (25:24:1) 抽提两遍, 无水乙醇沉淀, 70% 乙醇洗一次, 自然干燥后加 100 μL 0.1 $\times$ TE 溶解。模板原液稀释 200 倍使用。RAPD 引物购自上海生工生物工程服务有限公司, 采用标准程序在 PE9700 型 PCR 仪上进行扩增。



图片说明: 虹鳟部分样本的基因组 DNA 电泳图谱
1% 琼脂糖凝胶电泳, M: 分子量标准 DL2000; 1 ~ 3: 部分样品

DNA 完整性基因组: 完整。

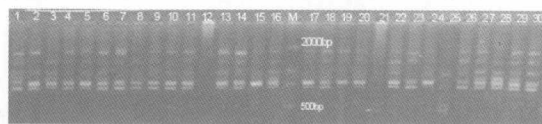
基因组 DNA 纯度: $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1.8$ 。

引物名称: S224。

引物序列: CCCCTCACGA。

PCR 扩增体系和条件: 25 μL 反应体系, 包括 PCR 混合缓冲液 18 μL , 引物 (10 μmol) 1 μL , *Taq* DNA 聚合酶 1 U, DNA 模板 (50 ng) 1 μL , 补无菌水到 25 μL 。反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 36 $^{\circ}\text{C}$ 复性 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 40 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。用 Gel-Pro Analyzer 4.5 软件分析电泳条带的大小。

PCR 产物电泳条件: 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 6 V/cm 电压常温电泳 2.5 h, 凝胶成像仪拍照。



图片说明: 虹鳟基因组 DNA 的 RAPD 分析电泳图谱
M: 分子量标准 DL2000; 1 ~ 30: 样本

标记带的分子量大小: 650 ~ 1 200 bp。

扩增 DNA 的条带数: 150。

多态位点比例: 80%。

2 微卫星 DNA 分析

采集时间: 2005 - 09。

样品来源: 黑龙江水产研究所渤海冷水性鱼试验站。

实验时间: 2005 - 10 - 05。

实验员: 梁利群。

取样部位: 鳍条。

样本数: 30 尾。

座位名称: AF352739。

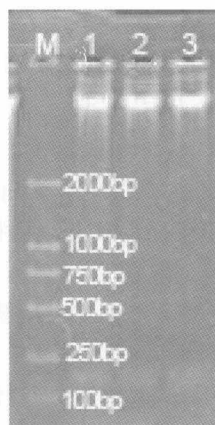
DNA 完整性基因组: 完整。

基因组 DNA 纯度: $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1.8$ 。

5'引物名称和序列: F: AGGCCTTATCTA

TCTGAC。

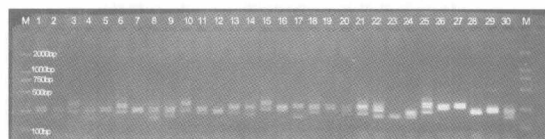
3'引物名称和序列：R：ACACATCAGCTA
CCGTG。



图片说明：虹鳟部分样本的基因组 DAN 电泳图谱
1% 琼脂糖凝胶电泳，M：分子量标准 DL2000；1~3：部分
样品

PCR 扩增体系和条件：94 ℃ 预变性 3 min；
然后 94 ℃ 变性 30 s，58 ℃ 退火 30 s，72 ℃ 延伸
30 s，总计 40 个循环；最后 72 ℃ 延伸 5 min。

PCR 产物电泳条件：2% 琼脂糖凝胶电泳，
0.5 倍 TBE 电泳缓冲液，6 V/cm 电压，常温
电泳。



图片说明：虹鳟基因组 DNA 的微卫星标记扩增电泳图谱
M：分子量标准 DL2000；1~30：样本

微卫星 DNA 大小：295 bp。

微卫星 DNA 序列：ACCACGCCATACCAA

CTGAGCCACACGGGACCTCAGCAGAAAAACT
GAAGGCCTTATCTATCTGACTGTTGGCCCCTA
TTTATCTCTGACTGTTGGCCCCTATTTATCTCT
GACTGTAGGCCCTATCTATCTATCTATCTATC
TATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCT
ATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTGTCTA
TCTATATATCTATCTAGCTATCTATCTATCTAT
CTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATC
TCCACCACGGTAGCTGATGTGTGGTGAGCTTT
CGGGGACCAATGCTTCCCGTGCATCACCCCTA
GGTGGTGGATGAGGTGAGTTCCACCTTACA
GCACTTTGAACATCTGGAAGGCGCTTTAAA
AATGCAATTAATTACTATGTATTACTATTTCAT
CGTTATAAATGTTGCTATATAATACAAGTAGA
CAACCGGCCAACACATTTGTATTTGTATTATT
CTAAGCTGGCTCCTATATGTGGGTCCTGTACG
GCTCAGTTGGTTGAGCATGATGCTTGCAGAGT
GTGGATAGGGGTTTGATTCCCAGGG。

扩增片段长度：197 ~ 370 bp。

等位基因数：16。

平均杂合度：0.583 0。

PIC 多态信息含量：(CA)₁₂。

参考文献

[1] Rexroad C E, Coleman R L, Her shberger W K,
et al. Rapid communication: thirty-eight polymorphic micro
satellite markers for mapping in rainbow trout. Journal of
Animal Science, 2002b, 80: 541 - 542.

撰写人：梁利群

金 鳊

学名: *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)。

单位: 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所。

1 RAPD 分析

采集时间: 2006-09。

样品来源: 黑龙江水产研究所渤海冷水性鱼试验站。

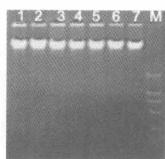
实验时间: 2007-09-05。

实验员: 鲁翠云。

取样部位: 鳍条。

样本数: 30 尾。

DNA 提取方法: 采新鲜的鱼鳍条每 0.1 克加 0.2 mL 裂解液 (0.5% 十二烷基肌胺酸钠, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛋白酶 K, 0.2 mol/L EDTA (pH8.0)) 50 $^{\circ}\text{C}$ 温育 3~4 h, 然后用酚、氯仿、异戊醇混合液 (25:24:1) 抽提两遍, 无水乙醇沉淀, 70% 乙醇洗一次, 自然干燥后加 100 μL 0.1 $\times$ TE 溶解。模板原液稀释 200 倍使用。RAPD 引物购自上海生工生物工程服务有限公司, 采用标准程序在 PE9700 型 PCR 仪上进行扩增。



图片说明: 金鳊部分样本的基因组 DNA 电泳图谱
1% 琼脂糖凝胶电泳, M: 分子量标准 DL2000; 1~7: 部分样品

DNA 完整性基因组: 完整。

基因组 DNA 纯度: $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1.8$ 。

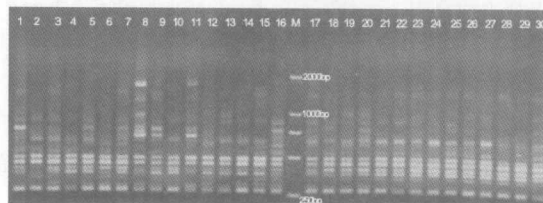
引物名称: S224。

引物序列: CCCCTCACGA。

PCR 扩增体系和条件: 25 μL 反应体系, 包括 PCR 混合缓冲液 18 μL , 引物 (10 μmol) 1 μL , *Taq* DNA 聚合酶 1 U, DNA 模板 (50

ng) 1 μL , 补无菌水到 25 μL 。反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 36 $^{\circ}\text{C}$ 复性 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 40 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。用 Gel-Pro Analyzer 4.5 软件分析电泳条带的大小。

PCR 产物电泳条件: 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 6 V/cm 电压常温电泳 2.5 h, 凝胶成像仪拍照。



图片说明: 金鳊基因组 DNA 的 RAPD 分析电泳图谱
M: 分子量标准 DL2000; 1~30: 样本

标记带的分子量大小: 260~2 000 bp。

扩增 DNA 的条带数: 230。

多态位点比例: 83%。

2 微卫星 DNA 分析

采集时间: 2005-09。

样品来源: 黑龙江水产研究所渤海冷水性鱼试验站。

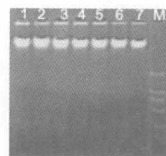
实验时间: 2005-10-05。

实验员: 梁利群。

取样部位: 鳍条。

样本数: 30 尾。

座位名称: AF352740。



图片说明: 金鳊部分样本的基因组 DNA 电泳图谱
1% 琼脂糖凝胶电泳, M: 分子量标准 DL2000; 1~7: 部分样品

DNA 完整性基因组：完整。

基因组 DNA 纯度： $OD_{260}/OD_{280} = 1.8$ 。

5'引物名称和序列：F：GGCCCAAAGTCTT
TTAGTGTG。

3'引物名称和序列：R：GCCCAGCTTACT
CTCATTACC。

PCR 扩增体系和条件：94 ℃ 预变性 3 min；
然后 94 ℃ 变性 30 s，53 ℃ 退火 30 s，72 ℃ 延伸
30 s，总计 40 个循环；最后 72 ℃ 延伸 5 min。

PCR 产物电泳条件：2% 琼脂糖凝胶电泳，
0.5 倍 TBE 电泳缓冲液，6 V/cm 电压，常温
电泳。



图片说明：金鳟基因组 DNA 的微卫星标记扩增电泳图谱
M：分子量标准 DL2000；1~30：样本

微卫星 DNA 大小：240 bp。

微卫星 DNA 序列：GACTTTATGGGGATC
CATAACAAGGCTAGACCTGTTTGCTTCATTCC
CCAAAACACAACATAGTCCCACCACCCTCAT
CTCCCCTCTCATATCCTCTTCCTTCTCCTTTCC
CTCCTCCTCTCCATTCTCCCCTCTCATTTCTCC

CCTCTCCCTGTCTTCTCCCTCTTCCTCTCTCT
TCTCCTCTCTGCTTGTAGCTAGGTCTATACAC
TACCAATAGCAGGCCCAAAGTCTTTAGTGTT
GGTAGTTGGTATGAGAGAATGAGAATAAGGT
AGAGCTTTTTTAAATGCTCCTTTGTTGTGGTG
ACCCACTCTGTCATATGGTAATAGCTCATTCC
TGAGCAGTTCGACTAAATAAGAAGTGAAGTC
TGACACACACACACACACACACACAGACACT
AACACGCACACTCAGTGGTAATGAGAGTAAG
CTGGGCTAACTCTACCCATGTGAGTGGGTGA
GTGGGTGGAGCCAGGTCACCATAAACCTCCA
GCTCACCAAAGTG。

扩增片段长度：190 ~ 260 bp。

等位基因数：8。

平均杂合度：0.5067。

PIC 多态信息含量： $(CA)_{15}$ 。

参考文献

[1] Rexroad C E, Coleman R L, Her shberger W K,
et al. Rapid communication: thirty-eight polymorphic micro
satellite markers for mapping in rainbow trout. Journal of
Animal Science, 2002b, 80: 541 - 542.

撰写人：匡友谊

孟苏大麻哈鱼

学名: *Oncorhynchus masou* (Brevoort)。

单位: 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所。

1 RAPD 分析

采集时间: 2006-09。

样品来源: 黑龙江水产研究所渤海冷水性鱼试验站。

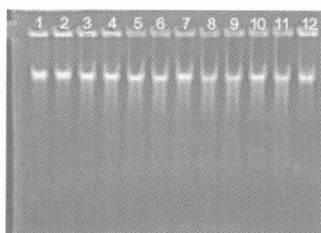
实验时间: 2007-09-05。

实验员: 鲁翠云。

取样部位: 鳍条。

样本数: 30 尾。

DNA 提取方法: 采新鲜的鱼鳍条每 0.1 克加 0.2 mL 裂解液 (0.5% 十二烷基肌胺酸钠, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛋白酶 K, 0.2 mol/L EDTA (pH8.0)) 50 $^{\circ}\text{C}$ 温育 3~4 h, 然后用酚、氯仿、异戊醇混合液 (25:24:1) 抽提两遍, 无水乙醇沉淀, 70% 乙醇洗一次, 自然干燥后加 100 μL 0.1 $\times$ TE 溶解。模板原液稀释 200 倍使用。RAPD 引物购自上海生工生物工程服务有限公司, 采用标准程序在 PE9700 型 PCR 仪上进行扩增。



图片说明: 孟苏大麻哈鱼部分样本的基因组 DNA 电泳图谱
1% 琼脂糖凝胶电泳, 1~12: 部分样品

DNA 完整性基因组: 完整。

基因组 DNA 纯度: $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1.8$ 。

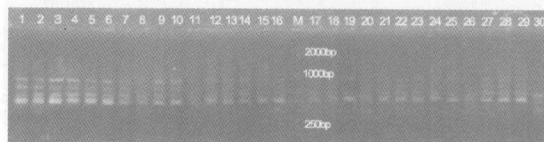
引物名称: S224。

引物序列: CCCCTCACGA。

PCR 扩增体系和条件: 25 μL 反应体系, 包括 PCR 混合缓冲液 18 μL , 引物 (10 μmol)

1 μL , Taq DNA 聚合酶 1 U, DNA 模板 (50 ng) 1 μL , 补无菌水到 25 μL 。反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 36 $^{\circ}\text{C}$ 复性 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 40 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。用 Gel-Pro Analyzer 4.5 软件分析电泳条带的大小。

PCR 产物电泳条件: 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 6 V/cm 电压常温电泳 2.5 h, 凝胶成像仪拍照。



图片说明: 孟苏大麻哈鱼基因组 DNA 的 RAPD 分析电泳图谱

M: 分子量标准 DL2000; 1~30: 样本

标记带的分子量大小: 650~1 200 bp。

扩增 DNA 的条带数: 120。

多态位点比例: 44%。

2 微卫星 DNA 分析

采集时间: 2005-09。

样品来源: 黑龙江水产研究所渤海冷水性鱼试验站。

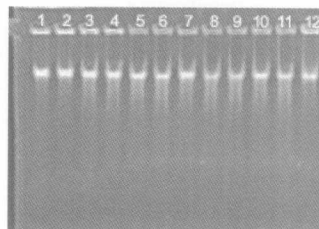
实验时间: 2005-10-05。

实验员: 梁利群。

取样部位: 鳍条。

样本数: 32 尾。

座位名称: AF375010。



图片说明: 孟苏大麻哈鱼部分样本的基因组 DNA 电泳图谱
1% 琼脂糖凝胶电泳, 1~12: 部分样品

DNA 完整性基因组：完整。

基因组 DNA 纯度： $OD_{260}/OD_{280} = 1.8$ 。

5'引物名称和序列：F：GGCTTCAGGATG
GAGACAGA。

3'引物名称和序列：R：GGAGGAGAGGA
TGAGGGGCTAGA。

PCR 扩增体系和条件：94 ℃ 预变性 3 min；
然后 94 ℃ 变性 30 s，58 ℃ 退火 30 s，72 ℃ 延伸
30 s，总计 40 个循环；最后 72 ℃ 延伸 5 min。

PCR 产物电泳条件：2% 琼脂糖凝胶电泳，
0.5 倍 TBE 电泳缓冲液，6 V/cm 电压，常温
电泳。



图片说明：孟苏大麻哈鱼基因组 DNA 的微卫星标记扩
增电泳图谱

M：分子量标准 DL2000；1~30：样本

微卫星 DNA 大小：250 bp。

微卫星 DNA 序列：CTGTGTGCTCTGACC
GTGCTCTCTGCTGTGAGTCTGACCCGTGCTGC
AGCTCCTGGCTCTCTGATGTGATGCTCCAGGC
TTCAGGATGGAGACAGAGAGAGAGAGAGAG

CAAGAGAGACTGAGAGCAAGAGAGAGAGAG
AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
AGAGAGAGACTCAGTCAATCACAACCCTCTT
TTGGAACAGATCTGTCATCACCTGTCCCTCTC
TTTCCCCCTCCTTTCTCGCTCTCCCTCTCTACC
CCTCATCCTCTCCTCCCCTAACAGCTAACCAC
TCTGACCTGTATCTGTGCGCTCTGGATTGGTC
CCAGGTTTGGTTTAAATGCCCAATTATTCTC
ATGAATTATGGTGCTCATCTCTAAACGCTACT
GGTGTGTTGGCACCGCTTCAGGAGAGGGGTT
TTCAACACACTCAGAGTTCTAGAGCAATGCA
ATATATATTATAAGGAATGTGGGAATAGGCA
CATTCTCATCATAGTTCTGTGATCAGT。

扩增片段长度：196 ~ 276 bp。

等位基因数：7。

平均杂合度：0.819 8。

PIC 多态信息含量： $(GA)_{25}$ 。

参考文献

[1] Rexroad C E, Coleman R L, Her shberger W K,
et al. Rapid communication: thirty-eight polymorphic micro
satellite markers for mapping in rainbow trout. Journal of
Animal Science, 2002b, 80: 541 - 542.

撰写人：匡友谊

哲罗鲑 (哲罗鱼)

学名: *Hucho taimen* (Pallas)。

单位: 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所。

1 RAPD 分析

采集时间: 2005 - 10。

样品来源: 乌苏里江虎头江段。

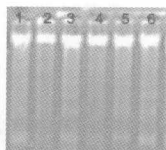
实验时间: 2007 - 09 - 05。

实验员: 匡友谊。

取样部位: 鳍条。

样本数: 20 尾。

DNA 提取方法: 采新鲜的鱼鳍条每 0.1 克加 0.2 mL 裂解液 (0.5% 十二烷基肌胺酸钠, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛋白酶 K, 0.2 mol/L EDTA (pH8.0)) 50 $^{\circ}\text{C}$ 温育 3 ~ 4 h, 然后用酚、氯仿、异戊醇混合液 (25:24:1) 抽提两遍, 无水乙醇沉淀, 70% 乙醇洗一次, 自然干燥后加 100 μL 0.1 $\times$ TE 溶解。模板原液稀释 200 倍使用。RAPD 引物购自上海生工生物工程服务有限公司, 采用标准程序在 PE9700 型 PCR 仪上进行扩增。



图片说明: 哲罗鲑部分样本的基因组 DNA 电泳图谱
1% 琼脂糖凝胶电泳, 1~6: 部分样品

DNA 完整性基因组: 完整。

基因组 DNA 纯度: $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1.8$ 。

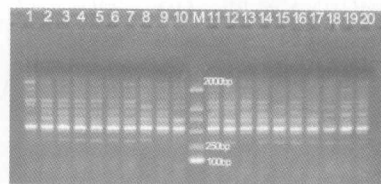
引物名称: B1。

引物序列: GTTTCGCTCC。

PCR 扩增体系和条件: 25 μL 反应体系, 包括 PCR 混合缓冲液 18 μL , 引物 (10 μmol) 1 μL , *Taq* DNA 聚合酶 1 U, DNA 模板 (50 ng) 1 μL , 补无菌水到 25 μL 。反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 36 $^{\circ}\text{C}$ 复性

1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 40 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。用 Gel-Pro Analyzer 4.5 软件分析电泳条带的大小。

PCR 产物电泳条件: 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 6 V/cm 电压常温电泳 2.5 h, 凝胶成像仪拍照。



图片说明: 哲罗鲑基因组 DNA 的 RAPD 分析电泳图谱
M: 分子量标准 DL2000; 1~20: 样本

标记带的分子量大小: 500 ~ 2 000 bp。

扩增 DNA 的条带数: 8。

多态位点比例: 75%。

2 AFLP 分析

采集时间: 2006 - 09。

样品来源: 黑龙江水产研究所渤海冷水性鱼试验站。

取样部位: 血液。

样本数: 20 尾。

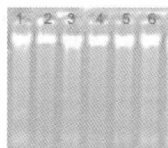
实验员: 匡友谊。

实验时间: 2006 - 11 - 20。

座位名称: AF375010。

DNA 提取方法: 采新鲜的鱼血液每 50 微升加 0.45 mL 裂解液 (0.5% 十二烷基肌胺酸钠, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛋白酶 K, 0.5 mol/L EDTA (pH8.0)) 50 $^{\circ}\text{C}$ 温育 3 ~ 4 h, 然后用等体积酚、氯仿、异戊醇混合液 (25:24:1) 抽提 4 ~ 6 遍, 透析 12 h。双酶切, 连接接头, 预扩增, 将预扩增产物用无菌去离子水稀释 100 倍作为选择扩增的模板。AFLP 分析所用的接头和引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。用 10% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进

行检测, PCR 选择扩增产物加 7 μL 溴酚蓝载样缓冲液 (0.25% 溴酚蓝, 40% 蔗糖), 混匀, 上样 4 μL , 220V 电压低温电泳 8 h, 用银染的方法显带。



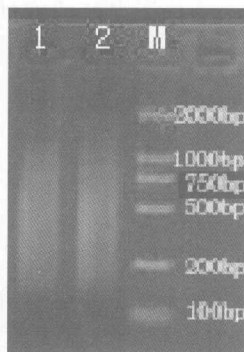
图片说明: 哲罗鲑部分样本的基因组 DNA 电泳图谱
1% 琼脂糖凝胶电泳, 1~6: 部分样品

基因组 DNA 纯度: $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1.8$ 。

内切酶名称: *EcoR* I 及 *Tru9* I。

酶切位点: *EcoR* I: 5' - GAATTC, *Tru9* I: 5' - TTAA。

酶切条件: DNA 模板 (100 ng/ μL) 2 μL , 10 $\times$ buffer 1 μL , BSA (10 ng/ μL) 0.1 μL , *EcoR* I (12 U/ μL) 0.4 μL , 加入超纯水补足 10 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 4 h 后加入 10 $\times$ buffer F 1.5 μL , BSA (10 ng/ μL) 0.15 μL , *Tru9* I (10 U/ μL) 0.45 μL , 加水补足 15 μL , 68 $^{\circ}\text{C}$ 保温 4 h。用酚、氯仿、异戊醇 (体积比为 25:24:1) 抽提 2 次, -20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的无水乙醇沉淀, 12 000r/min 离心, -20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 70% 乙醇冲洗 1 次, 室温干燥后, 10 μL 0.1TE 溶解, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。



图片说明: 哲罗鲑基因组 DNA 双酶切结果
M: 分子量标准; 1~2: 样品

接头序列:

EcoR I:

5'CTCGTAGACTGCGTACC3'

3'CATCTGACGCATGGTTAA 5'

Tru9 I:

5'GACGATGACTCCTGAG 3'

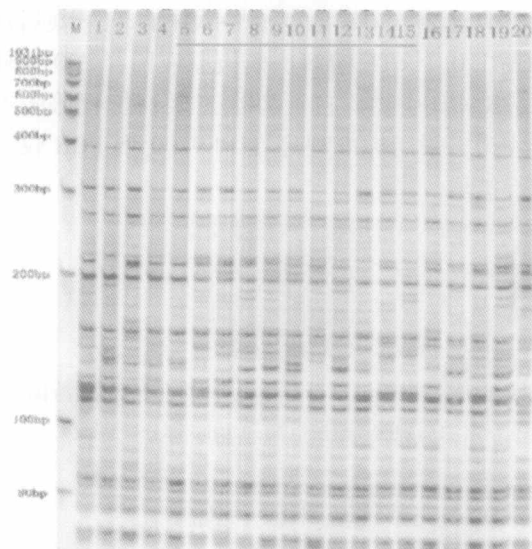
3' TACTCAGGACTC AT 5'

选择性碱基: *EcoR* I + ACA/*Tru9* I + CAA

PCR 扩增体系和条件: 预扩增: 25 μL 的反应体系包括 PCR 混合缓冲液 18 μL (内含 dNTPs), 预扩增引物各 1 μL , *Taq* DNA 聚合酶 1.5 U, 连有接头的 DNA 模板 1 μL , 补无菌水到 25 μL 。反应程序为 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 20 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

选择扩增: 反应体系同预扩增, 反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 13 个循环, 每个循环复性温度降 0.7 $^{\circ}\text{C}$; 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 25 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

PCR 产物电泳条件: 用 10% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测, PCR 选择扩增产物加 7 μL 溴酚蓝载样缓冲液 (0.25% 溴酚蓝, 40% 蔗糖), 混匀, 上样 4 μL , 220V 电压低温电泳 8h, 用银染的方法显带。



图片说明: 哲罗鲑基因组 DNA 的 AFLP 扩增电泳图谱
M: 分子量标准, 1~20: 样品

扩增片段长度: 196~276 bp。

选择性扩增条带数: 39。

多态性比例: 100~400 bp。

3 微卫星 DNA 分析

采集时间: 2006-08。

样品来源: 黑龙江水产研究所渤海冷水性鱼试验站。

实验时间: 2006-09-10。

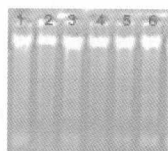
实验员: 匡友谊。

取样部位: 鳍条。

样本数: 24 尾。

座位名称: AF352763。

DNA 提取方法: 采新鲜的鱼鳍条每 0.1 克加 0.2 mL 裂解液 (0.5% 十二烷基肌胺酸钠, 200 $\mu\text{g/mL}$ 蛋白酶 K, 0.2 mol/L EDTA (pH8.0)) 50 $^{\circ}\text{C}$ 温育 3~4 h, 然后用酚、氯仿、异戊醇混合液 (25:24:1) 抽提两遍, 无水乙醇沉淀, 70% 乙醇洗一次, 自然干燥后加 100 μL 0.1 $\times$ TE 溶解。微卫星序列从 Gene Bank 查找。



图片说明: 哲罗鲑部分样本的基因组 DNA 电泳图谱
1% 琼脂糖凝胶电泳, 1~6: 部分样品

DNA 完整性基因组: 完整。

基因组 DNA 纯度: $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1.8$ 。

5'引物名称和序列: F: CTAGCCATCCGAACACACTG。

3'引物名称和序列: R: AGAATAGGGTGCTGTATCTC。

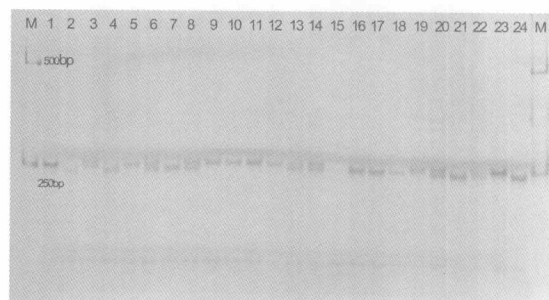
PCR 扩增体系和条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 64 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 总计 40 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。

PCR 产物电泳条件: 2% 琼脂糖凝胶电泳, 0.5 倍 TBE 电泳缓冲液, 6 V/cm 电压, 常温电泳。

微卫星 DNA 大小: 250 bp。

微卫星 DNA 序列: ACCACCCAAGTGGGATGGCTCAGAAATGAAACATCCTAATCCTCTCCCTACATCTTAAATGGACCCTCATTGAGATA

AGTCCGCCTTTTCCCCAGTCTTCACACAATGT
CCATTTCAGTTCTGGTGATCTGTGAGAAAACA
GTGCATCCCTAGCCATCCGAACACTGTGGCT
ACACATCTCTGTCGATAGATAGATAGATAGA
TAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAG
ATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATA
GATAGATAGATAGATAGATAGATAGACAGAG
AGACAGAGAGACAGAGAGACAGAAAGACAG
AAAGACAGAGAGACAGAGAGACATAGAGAT
AGATAGAGAGATTGCTCAGGGATGAGATGCT
TGTGGTTGAATATATAAAACCTGCAGGTGAG
ATACAGGCACCCTATTCTCTATGGGCCCTAGT
TATAAGTAGTGCCATATAGGGAATAGGCTGC
TATTTGGGACGCTCACC GAATCTCCATTA ACT
CTTCACAACACCTTTCTAATTATGCAG。



图片说明: 哲罗鲑基因组 DNA 的微卫星标记扩增电泳图谱

M: 分子量标准 DL2000, 1~24: 样品

扩增片段长度: 201~304 bp。

等位基因数: 3。

平均杂合度: 0.557 0。

PIC 多态信息含量: $(\text{GATA})_{26}$ 。

参考文献

- [1] 匡友谊, 佟广香, 尹家胜, 等. 呼玛河哲罗鱼遗传多样性的 AFLP 分析. 中国水产科学, 2007, 14 (4): 615-621.
- [2] 佟广香, 鲁翠云, 匡友谊, 等. 哲罗鱼基因组微卫星富集文库的构建与分析. 中国水产科学, 2006, 13 (2): 181-186.

撰写人: 匡友谊