|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **分类号** |  | **密级** |  |
| **U D C** |  | **编号** |  |



**硕士学位论文**

**刺参不同群体遗传多样性分析**

王祖哲

**（学号）1114040**

指导教师姓名 王秀利教授

专 业 名 称 水产养殖学

论文答辩日期 2014 年 月 日

学位授予日期 2014 年 月 日

# **Thesis for the Degree of Master**

Analysis of Genetic Diversity for Different Popolation of

*Apostichopus japonicus*

Supervisor: Prof. Wang Xiuli Master Candidate: Wang Zuzhe

**Dalian Ocean University Dalian, LiaoNing Province, P. R. China**

**June, 2014**

**本研究由大连市海洋与渔业局科研项目资助（990564）**

**This Study Was Supported by the** Dalian City Oceanic and Fishery Administration**, China (NO. 990564)**

**中文摘要**

刺参（*Apostichopus japonicus*）隶属于棘皮动物门、游走亚门、海参纲、楯手目、刺参科，自然分布在西太平洋的中国、韩国、日本沿海，深受这些国家人民的喜爱。利用分子标记的方法研究刺参的遗传多样性是近些年发展起来的。本文利用SSR与COⅠ两种分子标记方法对大连自然刺参群体与养殖刺参群体进行遗传多样性研究和遗传结构比对分析。结果表明，SSR标记揭示了自然群体具有高度的遗传多样性。筛选获得33对引物，目的片段大小为67-306bp之间；每个引物检测出等位基因数3-8不等；有效等位基因平均为4.736个；期望杂合度He和观测杂合度Ho分别为0.270-0.8446和0.598-0.875；大连海域自然群体的多态信息含量平均数为0.732，说明遗传多样性丰富；共有23对引物符合哈迪温伯格平衡，被检测位点偏离Hardy–Weinberg平衡的现象普遍存在，我们认为这可能是由实验所采用的样本数量和规格大小有限或者是由于无效等位基因的存在。

COⅠ序列对野生和养殖群体测序、比对和对位排列后的结果表明，有654个碱基具有同源序列，共四个群体选取49个体，40个个体发现变异位点（YSA9个、YSB9个、YZA12个、YZB10个），其中32个为多态位点，其中有29个转换，1个颠换，转换率极高。用MEGA3.0软件进行序列分析，并构建NJ树和MP树，从树中可以看出野生群体与养殖群体都分别的互相聚在一起，这表明了亚群内具有很强的遗传多样性，养殖群体的遗传多样性与野生群体遗传多样性比较接近。

利用微卫星的高度多态性的优势，尝试能否对近缘物种进行种属鉴定，文中通过大量的引物位点的筛选，选择扩增大连海域刺参的条带很单一的位点共有四个，特异性片段变化范围越小越有利于下一步鉴定，我们可以通过该位点对两个不同地域刺参扩增目的片段变化范围不同来鉴别种属。本文中筛选出的四对条带单一的引物对后续的进一步种类鉴定打下基础。

关键词：刺参； SSR； COⅠ遗传多样性种类鉴定

Abstract

**Abstract**

*Apostichopus japonicus*belongs to Echinodermata, Eleutherozoa, Holothuroidea, Aspidochirota, Stichopodidae. It is normally restricted to the shallow sea of China, Korea and Japanese in the Western Pacific, and is liked by their people. Research of the genetic diversity of *A. japonicus* using molecular marker methods is developed in recentyears. In this paper, SSR and COⅠmolecular markers were used for research of genetic polymorphism and comparison analysis of genetic structure of natural population and cultured population of Dalian *A. japonicus*. The results showed that SSR markers revealed the high genetic diversity of natural population. Thirty three pair primers were screened and the purpose fragment were

Between 67and 306bp. The allelic number was from 3 to 8. The average number of effective alleles was 4.736, and expected heterozygosity and observed heterozygosity was 0.270-0.8446 and 0.598-0.875. The average polymorphism information content was 0.732 in Dalian natural population, which showed abundant genetic diversity. A total of 23 pair of primers conformed to Hardy Weinberg equilibrium, and the testing locus which deviated Hardy Weinberg equilibrium existed generally. This may because the limited number and standard size of the samples or the existence of invalid alleles.

Sequencing, alignment, and counterpoint of wild and breeding population COⅠsequence

Showed that the homologous sequences were 654bp. In the 49 individuals which from 4 groups, the variation point was found in 40 individuals, among which the polymorphic site number was 32, and there were 29 conversion and 1 transversion. Using MEGA3.0 software we construct the NJ tree and MP tree. From these trees we found that the wild and breeding population got together respectively, which showed high genetic diversity within subgroup, and the genetic diversity between wild population and breeding population were closed.

We took advantage of the microsatellite polymorphism and tried to identify the closely related species. we selected a total of four single sites of Dalian *A. japonicus*belongs. Because a small scale change of the segments range is beneficial to the next identification, we can use the different variation range of these sites in different sea cucumber to identify species. The four single site primers which we selected laid the foundation of subsequent identification.

**Key words::** *Apostichopus japonicus*SSRCOⅠ; Genetic diversity; Species identification

目 录

**[Thesis for the Degree of Master](#_Toc686765779)** 2

**[Abstract](#_Toc686765781)** 3

[目录](#_Toc686765782) 3

[第一章 文献综述](#_Toc686765783) 5

**[1](#_Toc686765784)** [前言](#_Toc686765784) 5

[1.1 刺参分布](#_Toc686765785) 5

[1.2 刺参种质现状](#_Toc686765786) 5

[1.3 遗传多样性常用研究方法](#_Toc686765787) 5

[1.3.1 遗传标记研究方法的发展](#_Toc686765788) 5

[1.3.2 分子标记](#_Toc686765789) 5

[1.4 分子标记分类](#_Toc686765790) 5

[1.4.1 限制性片段长度多态性（RFLP）分析技术](#_Toc686765791) 8

[1.4.2 随机扩增多态性（RAPD）技术](#_Toc686765792) 9

[1.4.3 扩增片段长度多态性（AFLP）技术](#_Toc686765793) 9

[1.4.4 单核苷酸多态性（SNP）分析技术](#_Toc686765794) 9

[1.4.5 简单序列重复多态性（SSR）](#_Toc686765795) 10

[1.5 用于分子系统学研究的基因](#_Toc686765796) 10

[1.5.1 核基因](#_Toc686765797) 10

[1.5.2 线粒体基因组](#_Toc686765798) 10

[1.5.3 CO I基因的应用](#_Toc686765799) 10

[1.6 本文的研究目的和意义](#_Toc686765800) 10

[1.7 技术路线](#_Toc686765801) 10

[第二章 SSR标记的筛选和CO1序列标记遗传多](#_Toc686765802) 11

**[1](#_Toc686765803)** [实验材料](#_Toc686765803) 11

[1.1 刺参样本](#_Toc686765804) 11

[1.2 实验主要仪器和设备](#_Toc686765805) 12

[1.3 主要试剂以及配制](#_Toc686765806) 14

[1.3.1 Th化试剂](#_Toc686765807) 14

[4. PCR产物纯化试剂盒：购自上海生工生物工程有限公司。](#_Toc686765808) 14

[1.3.2 配制](#_Toc686765809) 14

[5 ×TBE缓冲液：](#_Toc686765810) 14

**[2](#_Toc686765811)** [实验方法](#_Toc686765811) 15

[2.1 微卫星标记研究方法](#_Toc686765812) 15

[2.1.1 刺参基因组DNA的提取方法](#_Toc686765813) 15

[2.1.2 DNA琼脂糖凝胶电泳检测](#_Toc686765814) 16

[2.1.3 微卫星标记的获取](#_Toc686765815) 16

[2.1.4 引物设计](#_Toc686765816) 16

[2.1.5 SSR-PCR体系的建立](#_Toc686765817) 16

[2.1.6 退火温度优化以及筛选引物](#_Toc686765818) 17

[2.1.7 PCR扩增产物的检测](#_Toc686765819) 17

[2.1.8 产物大小的确定](#_Toc686765820) 17

[2.1.9 数据处理](#_Toc686765821) 17

[2.2 COⅠ序列的研究方法](#_Toc686765822) 18

[2.2.1 基因组DNA提取](#_Toc686765823) 18

[2.2.2 DNA琼脂糖凝胶电泳检测](#_Toc686765824) 18

[2.2.3 COⅠ引物获取](#_Toc686765825) 18

[2.2.4 COI-PCR体系建立](#_Toc686765826) 18

[2.2.5 COⅠ-PCR产物纯化](#_Toc686765827) 19

[2.2.6 PCR产物测序](#_Toc686765828) 19

[2.2.7 COⅠ序列分析](#_Toc686765829) 19

**[3](#_Toc686765830)** [结果与分析](#_Toc686765830) 19

[3.1 基因组DNA提取结果](#_Toc686765831) 19

[3.2 微卫星引物获取结果](#_Toc686765832) 19

[3.3 微卫星引物筛选结果](#_Toc686765833) 25

[3.4 聚丙烯电泳结果](#_Toc686765834) 25

[3.5 刺参SSR遗传多态性结果与分析](#_Toc686765835) 25

[3.5.1 等位基因](#_Toc686765836) 25

[3.5.2 Hardy-Weinberg平衡](#_Toc686765837) 26

[3.5.3 多态信息含量](#_Toc686765838) 34

[3.5.4 基因杂合度](#_Toc686765839) 34

[3.5.5 连锁不平衡现象](#_Toc686765840) 34

[3.6 刺参COⅠ遗传多态性结果与分析](#_Toc686765841) 34

[3.6.1 COⅠ扩增结果](#_Toc686765842) 34

[3.6.2 PCR产物测序分析](#_Toc686765843) 34

[3.6.3 COⅠ序列碱基组成和位点突变分析](#_Toc686765844) 34

[3.6.4 分子系统树的构建](#_Toc686765845) 69

**[4](#_Toc686765846)** [讨论](#_Toc686765846) 69

[4.1 从数据库中筛选微卫星](#_Toc686765847) 69

[4.2 DNA提取探讨](#_Toc686765848) 69

[4.3 影响PCR扩增和聚丙烯电泳条带分析](#_Toc686765849) 69

[4.4 群体多样性分析](#_Toc686765850) 69

[4.5 种质资源分析](#_Toc686765851) 69

[5 结论](#_Toc686765852) 69

[第三章 SSR方法鉴别刺参种类](#_Toc686765853) 70

**[1](#_Toc686765854)** [实验材料](#_Toc686765854) 70

**[2](#_Toc686765855)** [实验方法](#_Toc686765855) 70

[2.1 PCR扩增](#_Toc686765856) 70

[2.2 PCR产物的检测](#_Toc686765857) 71

[2.3 结果的整理](#_Toc686765858) 71

**[3](#_Toc686765859)** [结果与分析](#_Toc686765859) 71

**[4](#_Toc686765860)** [结论](#_Toc686765860) 71

[参考文献](#_Toc686765861) 71

# 第一章 文献综述

## **1** 前言

在人口、资源和环境三大问题日益突出的21世纪，发展现代海洋农业已成为世界各海洋大国的重大战略和竞争的焦点。海洋动物资源和海水养殖业在我国都具有较大的规模，并且我国还处在人口不断增长的时期，所以为解决未来人口蛋白质需求，海洋动物资源的发掘和可持续的使用已经成为重要途径。同时也是我国现代农业发展战略的必然选择。因而，对于改善人类膳食结构、提高营养水平、促进国民经济和社会快速健康发展等方面海洋动物多样性的保护和持续利用在将发挥巨大作用。生物多样性通常包括遗传多样性、物种多样性和生态系统多样性三个水平。

刺参（*Apostichopus japonicus*）隶属于棘皮动物门、海参纲、楯手目、刺参科，目前被公认为具有很高的药用价值和营养保健价值，因为其含有丰富的蛋白质，粘性多糖及多种微量元素[1]～[2]，是我国海水养殖中重要的经济品种。一方面野生刺参资源的过度捕捞使开发环境受到破坏，另一方面刺参养殖业长期近亲繁殖、累代养殖，导致近亲衰退，种质逐年下降[3]～[4]，为了筛选培育具有优势生长性状、抗病能力强的优良品种，对现有刺参种质资源遗传多样性进行监测评价是解决这一系列问题，保持刺参养殖业可持续发展的迫切需要。现代分子标记技术的迅猛发展，为种质遗传多样性的监测和评价提供了重要的工具和途径。

### 1.1 刺参分布

海参是指棘皮动物门海参纲，生活在海洋中约有900多个品种，其中可供食用的海参有40种左

右，我国海域中生活的海参共有140种，可供食用的海参约20种，品质最好的为北方沿海的刺参（仿刺参, Apostichopus japonicus）[5]。刺参具有很高的营养与药用价值，明朝的《五杂俎》和清朝末年赵学敏编辑的《本草纲目拾遗》中都对刺参有记载，《本草纲目拾遗》中：“辽东产之海参体色黑褐，肉糯多刺，称之为辽参或刺参，其品质最佳而药性甘温无毒，具补肾壮阳，生脉血，治下痢及溃疡等功效”，由于其“药性温补，足敌人参，故名海参”[3]。

刺参是食用海参中最名贵的一种[6]。含有丰富的蛋白质，粘性多糖及多种微量元素，具有很高的营养保健和药用价值[7]～[8]。自然分布在西太平洋的中国、韩国、日本沿海，在这些国家人民餐桌上海参被认为是美味佳肴[9]。

### 1.2 刺参种质现状

海参是我国重要的海水养殖经济种类，然而刺参的野生资源和养殖资源都存在一定问题，野生自然资源过度捕捞，刺参养殖长期近亲繁殖、累代养殖，导致近亲衰退，种质逐年下降[10]。为了满足海参日益增加的需求，并保护海洋资源，海参产业近年来发展迅速。在努力增加效率和盈利能力

的水产养殖生产系统方面，海参的基因组分析已经进行了。要进行分子标记基因研究，如微卫星多态性已作为主要工具被广泛应用。目前已经有丰富的微卫星资源提供给我们使用[11]，这些微卫星位点使我们对遗传分析和育种计划的实施提供帮助。

### 1.3 遗传多样性常用研究方法

遗传多样性（genetic diversity）是生命进化、物种分化、物种多样性和生态系统多样性的基础，也是对自然生物资源进行评价的重要依据。因为一个物种的灭绝首先表现出来的就是遗传多样性的降低，反之，其繁盛则常伴有遗传多样性的稳定及增加，而一个物种的兴衰又常常决定整个生物群落或生态系统发生演替行为[12]。对海洋动物遗传多样性的研究不仅可以揭示物种的起源与进化历史，为海洋动物分类和进化研究提供有益的资料，而且可为遗传资源的保存、海水养殖动物育种和遗传改良，以及整个海洋生态环境的修复等工作提供理论依据。因此具有重要的理论和实际意义。

多种多样的生物资源是人类赖以生存的基础，但是由于人类活动范围的逐渐扩大，以及需求的不断增加，引起了全球环境的逐渐恶化，导致越来越多的物种资源遭受破坏，物种生存受到了威胁。因此，生物多样性最大限度的得到保护己经成为国际社会广泛关注的热点问题。目前，世界各国政府已达成共识，即开展生物多样性的起源、功能、组成和维持等基础性的研究工作，争取早日实现对生物资源的科学管理以及可持续利用。

#### 1.3.1 遗传标记研究方法的发展

在遗传多样性的研究过程中，学者们一直在寻找一些可靠，而且能够提高研究效率和效益的遗传标记的方法。在这个过程中，遗传标记经历了一个从宏观到微观、从简单到复杂及从表形到本质。随着生物学技术的不断进步和完善，遗传标记技术也在不断发展，主要有形态学标记、细胞学标记、生物化学标记和分子标记等发展阶段，随着分子标记的研究深入，其优势已经明显超过其三种标记，具有更高可信度。

#### 1.3.2 分子标记

DNA分子标记是指反映生物个体或种群间基因组中某种差异特征的DNA片段，它能够直接反映基因组DNA间的差异，伴随分子生物学技术的发展DNA分子标记也越加成熟。

理想的DNA分子标记具有以下几个特点，当然，理想的分子标记目前还没有任何一种能满足所有要求。其特点如下：（1）利用分子标记可鉴别二倍体中的纯合基因型和杂合基因型，即共显性遗传；（2）多态性髙；（3）均匀分布于整个基因组；（4）无基因多效性；（5）检测手段简单、快速，实验程序易自动化；（6）开发成本和使用成本尽量低廉；（7）在实验室内和实验室间重复性好。

DNA分子标记比形态标记、细胞学标记和生化标记具有许多明显的优越性。具体表现为：（1）遍布整个基因组，数量极多，可检测的基因座几乎是无限的；（2）不受季节、环境限制，不存在表达与否的问题，在生物体各个发育阶段均可检测到；（3）许多标记表现为共显性的特点，能区别纯

合子和杂合子；（4）多态性高，无需人为创造，自然界中存在许多等位变异；（5）不影响目标性状的表达，表现为中性。DNA分子标记的多种特性，奠定了它越来越受关注和具有广泛应用的基础。

### 1.4 分子标记分类

近30年，DNA分子标记技术迅猛发展，并且广泛应用在动植物品种改良与鉴定等领域。近几年，人们将分子生物学技术应用于水产养殖，并取得了一定的成果。

所有的生物都会因为环境的影响或者正常细胞自身改变而发生基因突变，产生遗传变异，又称遗传多态性。随着自然选择和遗传漂变，遗传变异产生在个体内、个体间、物种以及更高的类群。这种遗传变异对于遗传学家来说是很有用的，无论是作为一个可识别的表现型变异或通过分子生物学技术可区分的基因突变，都必须满足可识别和可遗传的条件。在DNA 水平，遗传变异类型包括：

（1）碱基替换的点突变，通常被称为单核苷酸多态性（SNPs），（2）DNA片段的缺失（deletion）或插入（insertion）的突变。经过漫长的进化积累，许多不同的情况下每种类型的突变应该存在于任何特定的物种，各种类型的突变的数量和程度反映出了一个物种内的遗传变异情况。DNA标记技术可应用于发现这些突变。

具体的检测主要分为以下几种情况：（1）较大的缺失或插入引起位移，再由限制性内切酶消化后，根据产生的DNA片段大小的不同，在琼脂糖凝胶上的电泳进行区分，这是一种最简单的突变类型检测；（2）较小的插入或缺失需要DNA测序或更复杂的电泳技术，以确定尺寸较小的变化；（3）涉及限制性酶切位点倒位和重排可以轻松检测，因为它们干扰限制性内切酶在给定的DNA位点的切割，从而可产生DNA片段的大小比较大的变化的范围；（4）因为点突变不会引起片段太大的变动，故更难检测。

表1-1 DNA分子标记及它们的特点和潜在的应用类型

Table 1-1 DNA markers and their characteristics and potential application type

| 标记类型  Marker type | 缩写Acrony m | 序列信息预知Sequenceinfor mation to  predict | 遗传模式Mode of inheritance | 位点  Locus | 等位基因数 Allelenumb  ers | 多态性Polymor phism | 主要应用Majorapplic ations |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 同工酶 |  | 是 | 孟德尔共显  性 | 单一 | 2-6 | 低 | 人口研究，  连锁定位 |
| 线粒体 DNA | mtDNA | 否 | 母系遗传 | 单一 | 多种单体  形 |  | 母系血统 |
| 限制性片段长  度多态性 | RFLP | 是 | 孟德尔共显  性 | 多种 | 2 | 低 | 连锁定位 |
| 随机扩增多态  性 | RAPD | 否 | 孟德尔显性 | 多种 | 2 | 中 | 指纹图谱，  混合识别 |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 扩增片段长度  多态性 | AFLP | 否 | 孟德尔显性 | 单一 | 2 | 高 | 人口研究，  连锁定位 |
| 微卫星多态性 | SSR | 是 | 孟德尔共显  性 | 单一 | 多种 | 高 | 人口研究，  连锁定位 |
| 表达序列标签 | EST | 是 | 孟德尔共显  性 | 单一 | 2 | 低 | 亲子鉴定分  析 |
| 单核苷酸多态  性 | SNP | 是 | 孟德尔共显  性 | 单一 | 2，最多 4 | 高 | 遗传连锁图  谱 |

在过去，同工酶和线粒体DNA标记已在水产养殖遗传学中得到了广泛的应用。目前在水产养殖遗传学方面有如下几种新的标记类型日益收到重视，表1总结了这些标记物的类型的基本性质，并且在下面对每种详细讨论。

#### 1.4.1 限制性片段长度多态性（RFLP）分析技术

1. 背景和基本原理

1974 年，随着限制性内切酶的发现，Grdojieker 研究创立了限制性片段长度多态性分析技术

（Restrietion Fragment Length Polymorphism, RFLP），RFLP的出现大大推动了DNA变异研究的进展，

RFLP是第一个被应用于遗传研究的DNA分子标记技术。在1980年，RFLP由Botstein[13]再次提出，并由Soller和Beckman两位学者最先应用于测定品种鉴别和品系纯度。RFLP标记，被认为是在DNA多态性发展遗传标记中的首个转折点[14]，一个对分子生物学完全不同的认识时代的开始。

2. RFLP种质鉴定

RFLP是从分子水平上研究动物遗传变异的一种比较经济有效的手段，在鱼类的遗传研究中已经得到较广泛的应用[15][16]。RFLP主要是应用PCR技术对特定目的片段进行扩增，扩增产物利用限制性核酸内切酶处理，由此得到的限制性片段长度多态具有相对的稳定性，并能反映一定的变异。利用酶切片段数目和大小的差异鉴别种内遗传组成和群体间细微差异[17][18][19]。

3. RFLP技术注意问题

有研究表明RFLP指纹技术也有其固有的缺陷，在做RFLP分析技术时，有几个问题是需要引起密切注意：

（1）对于一些大分子DNA，为了不影响结果的可靠性，限制性内切酶一定要使DNA消化完全。

（2）要根据杂交后膜上的放射活性等因素决定放射自显影曝光的时间；

（3）被消化的DNA浓度不能太高；

（4）检测对象的DNA分子必须保持大分子，否则最终显示的RFLP图谱可能是一种假象；

（5）探针在杂交前必须充分变性；

（6）采用低压电泳；

（7）要根据探针标记的情况以及探针与靶DNA间序列互补的程度和G、C的含量来掌握杂交和洗膜的条件。

#### 1.4.2 随机扩增多态性（RAPD）技术

##### 1. 基本原理

随机扩增多态性DNA（Random Amplified polymorphic DNA, RAPD）标记，1990年，由加里福尼亚生物研究所Welsh等和美国杜邦公司的Williams等两个研究小组同时提出的，RAPD是一种简便、快速、可自动化分析、多态性检出率高的一项新的DNA分子标记技术，由于它基于PCR技术，故又称RAPD-PCR技术。

##### 2. 种质鉴定应用

RAPD 标记的其他优点是易于获取其中大量位点，并且个体可以进行筛选。Klinbunga 等人，

Crossland等人已应用RAPD技术于物种鉴定在鱼类[20]和软体动物[21][22]；Tassanakajon等人[23]研究了斑节对虾的种群结构；van Oppen等人[24]分析了海藻种群结构的研究；Bagley等人[25]分析环境应激的基因影响，还有很多遗传多样性的分析，如Wolfus[26]（1997）对虾育种计划中的遗传多样性评估的应用；Hirschfeld[27]（1999）对牡蛎的遗传多样性进行了详细分析；Yue [28]（2002）用三种DNA标记系统评估亚洲金龙鱼多样性并进行对比。这种类型的标记物的缺点包括无法证明孟德尔遗传规律，无力区分纯合子和杂合子。此外，旁系同源的PCR产物的存在（不同的DNA它们具有相同的长度，因而似乎是单一位点的区域）限制了使用该标记。Wirgin和Waldman[29]认为，RAPD标记有重复性低，由于在PCR扩增中使用的退火温度低，这些困难限制了这个标记在渔业科学应用。

##### 3. 优势及注意问题

RAPD 标记有基于PCR 的标记的所有优点，而且有引物是通用的好处，不需要预先了解目标

DNA序列或基因结构。许多的扩增位点可以通过琼脂糖凝胶电泳上用溴化乙锭在紫外光下进行分离，虽然更高的条带分辨率已经通过连续聚丙烯酰胺凝胶电泳（dPAGE）和银染[30]来实现，但这是一个费时费力的方法。

#### 1.4.3 扩增片段长度多态性（AFLP）技术

##### 1. 基本原理

扩增片段长度多态性（Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP）技术为第二代分子标记技术，是在RAPD和RFLP技术上发展起来的，AFLP技术是一种结合了PCR的多位点指纹技术。对于之前讨论的RFLP和RAPD方法，结合优点和克服缺点。

##### 2. AFLP种质鉴定

AFLP具有多态性强，实验结果稳定性、重复性好，谱带丰富且清晰可辨的特点，可以在一次实验中同时观察到大量的限制性片段。因此，AFLP 技术广泛应用于基因克隆和定位[31]、遗传图谱构建

[32]、遗传差异分析[33]和种质鉴定[34]等研究[35][36]。

现今AFLP分析揭示基因组的多态性的效率是极其高的。不同的酶可以用的潜在的效率是无穷无尽的用于基因组扫描。Young等[37]所使用的AFLP技术产生133个多态性标记，其中23个在区别是判断虹鳟鱼、沿海ft鳟、它们的杂交种。Young等[38][39]和Felip等[40]将AFLP标记用到虹鳟鱼雄性激素的分析中。

##### 3. 优势和注意问题

AFLP方法的主要优势包括大量（超过100）数字揭示多态性，高重复性由于高的PCR退火温度，并在每个标记基础相对经济。它比RAPD标记更昂贵，但由于大量基因座可以从一个单一的运行进行分析，每个标记的成本被显著降低。像RAPD标记，它不需要任何事先分子信息，因此适用于任何物种，包括较差的研究鱼种。也像RAPD标记，AFLP扩增被认为是双等位基因，因此具有相对低的PIC的分数，但更大的数量个位点的，可以是同时拿下大大增加了其实用性。它的主要缺点包括：需要专用设备，如自动基因测序的电泳分析荧光标记；传统的电泳方法也可以使用，但它们需要使用的放射性标记物或如银特殊染色技术染色。

#### 1.4.4 单核苷酸多态性（SNP）分析技术

##### 1. 基本原理

单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphism, SNP）是一种以PCR方法为基础的第3代遗传标记。最早出现在1994年人类遗传杂志上，Lander[41]在Science上正式提出新一代的分子标记，是基因组水平上单个DNA变异引起的多态性，在群体中发生频率不小于1%。它包括单碱基的转换，颠换、插入及缺失等形式[42]。

SNP在基因组内可以划分为两种形式：一种是遍布于整个基因组中的大量的单碱基变异；第二种是基因编码区中的功能性突变，由于SNP分布在基因编码区（coding region），故又称其为cSNP。

Halushka[43]等检测75个基因后，得出结论是人类基因组有近百万个SNP位点，非编码区中大约有50万个，基因编码区有24～40万个与蛋白质的功能有关，而cSNP中估计只有2.4～4万个SNP是非同义的替换。SNP的频率在基因的5'端非编码区、3'端非编码区、内含子、沉默位点及编码区有显著差异（p=6.6×10 -10），突变热点CpG的频率在这5种区域中也存在显著差异（p=0.025）[44]。

##### 2. SNP在种质鉴定中的应用

SNP在水产动物的分子标记应用有着极为广阔的前景[45]。目前SNP标记开发是通过基因组测序，利用测序获得序列之间比对得到。因此，对于已经开展大规模基因组测序的物种来说，SNP常伴随着基因组序列的拼接而产生[46][47]。目前，EST数据库是开发在缺乏基因组序列时筛选SNP的重要途径。在世界范围内，有数个科研团体进行cDNA（coding DNA）文库的测序研究，由于大多数基因在不同的组织中均有表达，所以存在相同基因被测序数次，这样就造成了EST序列数据库的明显冗余。EST序列数据的冗余性，主要是由于经过聚类，作者将来源于同一基因的序列放在同一个簇之中，通过比对来源于同一基因的冗余EST序列就可以获得不同个体间的序列多态信息，包括候选SNP位点。这些候选SNP位点进而可以用实验方法加以验证[48][49]。

##### 3. 优势及注意问题

SNP作为一类遗传标记得以广泛应用，主要由于具有以下特点：

（1）高密度性，SNP在基因组中分布广泛，几乎遍布了整个基因组[50]。

（2）富有代表性，某些位于基因内部的SNP有可能直接影响蛋白质结构或表达水平。

（3）遗传稳定性，与其他分子标记相比，SNP具有更高的遗传稳定性。

（4）易实现分析的自动化，SNP标记在人群中只有两种等位型（allele），故也称为双等位标记

（biallelic marker）。这样在检测时只需一个―+/-‖或―全/无‖的方式，而无须像检测AFLP、SSR那样对片段的长度做出测量[51]，这使得基于SNP的检测分析方法易实现自动化。

SNP是一种非常有价值的分子标记方法，但在制作SNP结果分析、SNP分型、SNP图等方面有如下问题需要注意：

（1）很难确定选用哪个SNP能够解决错误的遗传问题，并对数据进行分析处理。连锁分析在确定复杂性状的基因方面几乎未取得成功，遗传统计方法和工具也有待于开发和完善。

（2）理论上制作SNP图谱时需要约500个具有代表性的个体，用来开发一套密度至少在100, 000左右的SNP[52]。即使在多重PCR和SNP芯片发展方面取得了很大进展，仍需要大量单个扩增反应对每个SNP进行靶扩增，但成本太高，一般实验室难以开展该工作。

（3）SNP还存在专利问题。因此，那么大量的SNP和cSNP就可以被大量的私人研究机构开发与占有，如果SNP的开发得不到足够的重视和经费支持，这对SNP的研究与应用是很不利的。

#### 1.4.5 简单序列重复多态性（SSR）

##### 1. 背景、定义及其原理

微卫星（Microsatellites）是由简单重复序列（SSR）构成核心序列的多态性，1991年，由Moore和Sollotterer[53]同时提出。微卫星是指几个（1~6）碱基对[54][55]如ATAT或者GCGCGC串联重复的核心序列，最常见的也就是双核苷酸重复，其多态性来源于重复次数的不同。迄今研究的所有物种，都含有丰富的微卫星，据估计，鱼类的频率高达每10 kb的就会出现一次[56]。微卫星往往是均匀地分布在所有染色体基因组上的染色体的所有区域。它们已在基因编码区内[57]内含子、和在非基因序列中发现。微卫星的编码区域内最著名的例子是那些导致在人类遗传性疾病中，诸如CAG重复编码多聚束，从而导致智力迟钝。大多数微卫星位点都比较小，从几个到几百重复。微卫星位点相对较小的尺寸对进行PCR产物基因分型是很重要的。一般来说，含有重复序列数量较多的微卫星是更多态的，但微卫星多态性可以利用已经少至5次重复[58]。微卫星的突变率据Weber and Wong[59]（1993）和Crawford and Cuthbertson[60]（1996）报道每一代高达10-2 。

微卫星多态性的产生是DNA在复制和修复过程中碱基发生错配、滑动或减数分裂中姐妹染色单体的不均等交换[61]。直接对人类家系的研究表明，新的微卫星基因突变通常不同于父母的等位基因只有一个或两个重复，支持逐步突变模型[62]。然而，在一些鱼类物种，我们观察到的等位基因与重复数存在非常大的差异，预测的无限等位基因模型[63]。无论具体机制，改变的重复单元数可能会导致在一个群体中每个微卫星位点有大量的等位基因。

##### 2. 问题与展望

微卫星的孟德尔遗传方式为共显性标记，这是个微卫星标记，除了他们丰富基因组分布、较小的长度和较高的多态性的另一优势。然而，利用微卫星标记涉及大量的前期工作和努力。每个微卫星位点必须被确定，在其侧翼区域序列进行PCR引物的设计。对于最高效的标记的发展，微卫星是由基因组DNA文库富集的方法[64][65]。

微卫星在所有DNA标记里每个位点有大量的等位基因导致其最高的PIC值。近期，微卫星已成为多种多样的遗传研究工作中一个非常受欢迎的标记类型，在过去的十年中，微卫星标记已被广泛应用于渔业研究，包括基因组作图，亲子关系，亲缘关系和种群结构的研究[66]。

### 1.5 用于分子系统学研究的基因

脊椎动物物种的研究普遍显示，线粒体DNA比核DNA序列差异累积更快[67]。这已被归因于线粒体DNA（mtDNA）复制可能会因缺乏修复机制导致较快的突变率[68]和由于单倍体线粒体基因组严格的母系遗传产生较小的有效种群[69]。mtDNA聚合酶缺乏校读能力，功能约束较弱，而且mtDNA大部分裸露于自由基和超氧化物氧化剂中，无组蛋白和DNA结合蛋白的保护[70]。

#### 1.5.1 核基因

rDNA在核基因中是应用最多的一类，rDNA是一类中度重复的DNA序列，在染色体DNA中以串联多拷贝形式存在，每个重复单位由包括3种分别为18SRNA（基因编码区）、5.8SRNA（转录间隔区, internal tran. scribed spacer, ITS）、28SRNA（非转录间隔区, nontranscribed spacer, NTS）组成；rDNA是生物界中普遍存在的基因，在个体和群体内都有较好的均一性，是生物系统进化研究中一个非常有用的分子标记方法[71]。

#### 1.5.2 线粒体基因组

线粒体（mitochondrion）具有一套自己的遗传控制系统，是真核细胞内重要的细胞器。在真核生物细胞内，约99%的DNA存在于细胞核内，其余的1%存在于细胞核外。因为具有自己独立的遗传物质，线粒体又被称为核外遗传因子。mtDNA具有结构简单、母系遗传、分子量小、进化速度快等特点，mtDNA已成为发育生物学、真核生物分子遗传学和分子系统进化研究的重要对象[72]。mtDNA是一种闭合环状双链DNA，分为重链（H 链）和轻链（L 链）。在动物界中其结构大致相同，包括

22个tRNA和13个蛋白质基因（分别为细胞色素c氧化酶亚基Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ，细胞色素b，ATP合成酶亚基6和8，及7个NADH脱氢酶亚基），2个rRNA基因（16s rRNA和12s rRNA）[73]。在保护遗传学研究中，mtDNA目前主要应用于近缘物种亲缘关系分析、近缘物种杂交和渐渗分析、系统发育和分类等。mtDNA的主要特征是不含间隔区和内含子，无重复序列，以碱基替换为主，插入和缺失较少。碱基替换主要发生在基因间隔区和控制区，且不同部位替换速率不同。在种内或种间控制区进化速率最快，通常用它来分析种群间的遗传结构。由于其进化和结构上的特点，mtDNA被作为研究物种进化的重要分子标记。对mtDNA的研究主要有两种方法，即RFLP分析和对mtDNA中特定片段进行序列分析。但是RFLP实验操作繁琐，检测周期长并且成本昂贵，不适于大规模的分子育种。然而由于具有专门的数据库作为支撑，含有较全面的生物学信息，对mtDNA中特定片段进行序列分析的DNA条形码技术已得到广泛应用。一般情况下，16s rRNA和12s rRNA比较适合于研究属间、不同种群间以及分化时间较早的种间的系统关系，而COⅠ、COⅡ等则通常用于分析亲缘关系密切的种、亚种及地理种群之间的系统关系[74]。作为DNA基因条形码的目的基因，COⅠ基因不仅

具有相对保守性，而且该基因能够被通用引物扩增，同时该基因具有足够的变异来区分不同的物种或种群[75]。

#### 1.5.3 CO I基因的应用

线粒体DNA标记分析已被广泛用于研究种群结构在各种鱼类包括鳗[76]，青鱼[77]，眼斑拟石首鱼[78]，笛鲷[79]，和鲨鱼[80]。线粒体标记在水产养殖遗传学中颇为流行，部分原因是可以用来鉴定亲鱼[81]中使用。在分子生物学分析的初期，线粒体DNA多态性相对于等位酶是更高水平的被利用于研究水产养殖遗传学种群分化。从技术上讲，线粒体DNA 标记是RFLP 标记，除了靶分子是线粒体

DNA而不是核基因组DNA[82]。虽然线粒体DNA位点可以表现出每个位点大量的等位基因，可对线粒体DNA的分子标记提供的数量有限，其PIC数值定位比那些等位酶更高，但比充满变数核标记如

RAPD标记，微卫星，AFLP标记和单核苷酸多态性低。

鲁再丰等[83]利用DNA编码技术对亚洲黑熊的不同亚种之间进行了DNA编码，并与12sRNA基因进行比较，在GenBank中找到其他已有的相关物种的序列构建系统发育树，发现在只针对亚种的关系鉴定时候，CO I基因要比12sRNA基因的作用更为明显有效。张迪等[84]利用CO I基因分析长江中下游太湖新银鱼8个地里种群132个样本的遗传多样性，最终发现CO I基因适用于银鱼科鱼类物种鉴别和系统发育研究，同时可为同种种群遗传关系分析提供一定的信息。李莉好等[85]扩增了3种海豚的线粒体CO I基因，并对其做了序列分析，结果表明CO I基因可以用于鲸类的种类鉴定和系统发育分析。陈丽梅等[86]对ft东荣成、长岛、俄罗斯和日本的刺身及澳大利亚的黄乳海参、冰岛的北大西洋瓜参和福建的二色桌片参的16s rRNA和CO I基因分别进行了扩增和测序，分析结果表明长岛和荣成刺身序列差异最小，和日本刺身序列差异最大；刺身和其他科3种海参种间的序列差异远远高于刺身种内差异。柳淑芳等[87]分析了石首鱼科19属30种鱼类的CO I基因片段的序列，其研究结果证明线粒体CO I基因可作为DNA条形码对石首鱼科鱼类进行有效的物种鉴定，亦可用于探讨石首鱼科的属、种分类单元系统发育问题。

本研究选用了CO I基因作为分子标记来研究大连地区野生及养殖仿刺参的种质资源结构，了解这一经济物种的原种遗传背景，查明其当前的遗传多样性水平，为其种质资源保护和遗传改良提供全面的遗传背景参考资料，在养殖环境日益恶化的情况下维持群体较高的遗传多样性水平，从而为养殖业健康可持续发展提供科学依据。此外，在分子标记研究的基础上，可以建立高密度的遗传图谱，开展分子标记辅助选择育种工作。

### 1.6 本文的研究目的和意义

刺参是重要的经济海参物种，随着人们增加对海参的需求量，在国内外一些学者已经研究了刺参的生物学、生态学和生理学等很多方面；尤其是近十多年来，随着刺参的人工育苗、中间育成、虾池养殖和放流增殖等方面的应用技术的迅速发展，出现一些问题也严重影响了刺参的增产；如苗种品质的优劣就对刺参的生长和成活有直接的影响，但目前海参养殖的苗种，主要来自人工育苗；由于往往用来自同一海区、同一地域作为苗种的亲体，经过多年繁衍以后，亲缘关系越来越近，从

而造成生长速度缓慢、成活率降低、种质严重退化等现象；此外，种的质量还受到养殖容量过大和环境恶化的严重威胁[88]。为了防止刺参种质在增养殖的过程中产生退化，天然种群的优良种质资源得到有效地保护并利用，对养殖刺参和野生刺参进行遗传多样性的研究和对比是非常必要的。

形态特征法和同工酶法是传统的动物分类主要的研究方法。这些研究遗传关系的常规方法是通过对参试材料形态性状的观察分析或追溯种质起源来进行的。遗传变异是利用形态学性状测定的，但由于形态学性状易受环境影响而得到有一定的误差结果，使结论不可靠；而在分子水平上比较基因型的差异，则可以提供一个相对准确的结果，结论可信度很高。分子标记技术的出现并发展了以揭示DNA多态结构为特点，其能够在DNA水平显示性状的遗传差异，使得许多以表现型为基础的遗传分析都能通过利用一个DNA特征分析的方法直接测定基因型，确定孟德尔遗传规律。在实验室里得到分析结果，结论可靠且效率高。因此，在分类研究中DNA标记技术正被广泛应用。

目前，遗传标记技术已经广泛应用在海洋动物遗传多样性分析及种质鉴定中，对于棘皮动物，在检索的国内文献中王秀利等（2006）利用SSR技术对海参基因进行了多态性的研究10。高悦勉（2004）用同工酶对刺参自然群体和养殖群体做了生化遗传分析[89]。[鄢婧婧](http://search.cnki.com.cn/Search.aspx?q=author%3A%E9%96%AF%E3%88%A0%E2%94%83%E6%BF%A0%3F)（2013）研究探讨了仿刺参SNP、

SSR、EST分子标记的有效筛选方法及其在仿刺参分子育种中的应用[90]。

本实验采用两种方法来完成：一是利用SSR分子标记技术，初步建立刺参的SSR反应体系，使其具有良好的重复性和稳定性，为刺参遗传多样性研究打下坚实的基础。应用SSR分子标记从DNA水平上对大连海域野生刺参以及养殖刺参群体的遗传多样性进行研究，分析遗传参数确定遗传多样性。二是应用DNA序列分析法，选取mtDNA中细胞色素C氧化酶I (CO I)作为分子标记，因为其进化速率较快、变异程度较高，且研究比较透彻。旨在研究CO I基因在不同地理野生群体和养殖群体的刺参是否存在差异，并构建系统发生树，分析其亲缘关系的远近和遗传多样性，并确定养殖群体是否发生种质退化。将两种方法获得的聚类结果综合起来分析，以期为仿刺参的种质资源保护、分子标记辅助遗传育种以及为仿刺参遗传图谱的构建等工作提供基础性资料。

琼脂糖凝胶电泳

琼脂糖凝胶电泳

聚丙烯凝胶电泳

PCR 产物回收

谱带统计

PCR 产物测序

### 1.7 技术路线

刺参 DNA 的获取

SSR 引物设计

CO I 引物的获取

PCR 条件优化

PCR

遗传学软件生物信息学分析

测序结果处理

# 第二章 SSR标记的筛选和CO1序列标记遗传多

样性分析

很难用形态学方法鉴定至种，因此需要采用分子手段进行种鉴定。微卫星标记由于多态性高、稳定性高、特异性强、共显性遗传等优点，在物种鉴定上相对于其他分子标记存在绝对的优势。因此为本文首选标记。

本章主要从NCBI中EST、Nucleotide数据库以及发表的文献中获取有关刺参的微卫星标记，然后设计合适引物，再对获得标记进行扩增条件优化，最终获得刺参特异性微卫星标记，分析遗传多样性同时获得刺参分子识别技术。

## **1** 实验材料

### 1.1 刺参样本

刺参样本是由野生型和养殖型两部分组成，全部活体运回实验室分两种类型保存，一种是70％乙醇固定刺参纵肌和体壁于-20℃保存，一种是取刺参纵肌和体壁用液氮处理后，保存于-80℃。其中两个地域采集的野生刺参37头，养殖刺参57头。野生刺参来源于大连獐子岛海域，养殖刺参来源于大连海洋大学农业部北方海水增养殖重点开放实验室。4个群体见表2-1。

表2-1 供试仿刺参数量及采集的地点和时间

Table 2-1 Number, localities and colletion date of the tested sea cucumber.

| 群体名称  (Population Name) | 采样时间  (Collection date) | 样本量  （Number） | 长度  （Length） |
| --- | --- | --- | --- |
| YSA | 2013.6 | 17 | 8-18cm |
| YSB | 2013.9 | 20 | 8-18cm |
| YZA | 2013.11 | 39 | 6-12cm |
| YZB | 2013.12 | 18 | 10-15cm |

### 1.2 实验主要仪器和设备

表2-2 实验仪器名称及型号和Th产厂家

Table 2-2 The equipment’s type and name

| 仪器名称  (Apparatus Name) | 型号  （Type） | 生产厂家  (Manufacturer) |
| --- | --- | --- |
| 电热恒温水槽 | DK-8D | 上海一恒科技有限公司 |
| 台式离心机 | TGl-16B | 上海安亭科学仪器厂 |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 电泳仪 | DYY-4C | 北京六一仪器厂 |
| PCR 仪 | PE9700 | Perkin Elmer 公司 |
| 低温台式高速离心机 | AllegraTM 21R centrifuge | 美国 Beckman 公司 |
| 凝胶成像仪 | Image Station 440 | 柯达公司 |
| 超净工作台 |  | 上海一恒科技有限公司 |
| 高压灭菌锅 | SS-325 型 | TOMY 公司 |
| 微量移液器 | Gilson Pipetman | Gilson 公司 |
| 精密电子天平 | JJ500 | 常熟双杰测试仪器厂 |
| 超纯水仪 | PALL | PALL 公司 |
| 紫外分光光度计 | UV／VisOptizen2120 | MECASYS 公司 |
| 磁力加热搅拌器 | 79-2 双向 | 富化公司 |
| 制冰机 | FM 70 型 | GRANT 公司 |
| PH 计 |  | sartorius 公司 |
| 低温冰箱 | MDF-382E（N） | SANYO 公司 |
| 热空气消毒箱 | GRX-9123A 型 | 上海一恒科技有限公司 |

1.5 ml离心管、200μl薄壁管及各型号Tip头用前须高压灭菌（121.3℃）持续20-25min），灭菌后60℃烘干3-4小时。

### 1.3 主要试剂以及配制

#### 1.3.1 Th化试剂

1. 引物：实验所用引物委托上海生工合成。

2. 酶：rTaq酶，由大连宝生物工程有限公司生产，蛋白酶K、RNA酶等购自上海生工生物工程有限公司。

3. DNA提取以及电泳试剂：DL-2000 DNA Marke、SDS、Tris、无水乙醇、氯仿、乙酸钠、EB

（溴化乙啶）、二甲苯氰、溴酚蓝、碳酸钠、硝酸银、氢氧化钠、甲醛、EDTA-Na2、过硫酸胺、硼酸等购自大连沈联化学试剂玻璃仪器有限公司。TEMED、Tris-平衡酚、琼脂糖、丙烯酰胺（BBI）、N，N-亚甲基双丙烯酰胺购自上海生工生物工程有限公司。Agaroes琼脂糖，西班牙产，购自大连辰钰生物科技有限公司。

## 4. PCR产物纯化试剂盒：购自上海生工生物工程有限公司。

#### 1.3.2 配制

1. DNA提取所用溶液

1mol/L Tris-Cl(pH=8.0)：Tris 121g溶于800ml双蒸水，用盐酸调pH值到8.0（溶液冷却至室温时调PH），定容至1000ml，高压灭菌。

0.5 mol/L EDTA(pH=8.0)：EDTA 186g溶于800ml双蒸水，用NaOH调pH值到8.0，定容至

1000ml，高压灭菌。

10%SDS: SDS 100g溶于900ml双蒸水，加热至68℃助溶，用盐酸调pH值到7.2定容至1000ml。

50×TAE缓冲液：Tris碱242g，冰乙酸57.1ml, 0.5mol/L EDTA(pH=8.0) 100ml，定容至1000ml。

DNA提取液：10mmol/L Tris-Cl(pH=8.0)，100mmol/L EDTA(pH=8.0)，10%SDS。

TE缓冲液：10mmol/L Tris-Cl(pH=8.0)，100mmol/L EDTA（pH=8.0）高压灭菌。

RNaseA溶液：胰RNA酶100mg溶于10mmol/L Tris-Cl(pH=7.5)、15mmol/L NaCl中，100℃煮沸10min，室温冷却后，贮存–20℃。

蛋白酶K: 200mg的蛋白酶K加入9.5ml双蒸水，定容至20ml，混匀后分装成小份于-20℃贮存不需灭菌。

##### 2. 琼脂糖凝胶电泳所用溶液

10 mg/ml溴化乙锭（EB）：按l0 mg/ml的浓度将EB溶于去离子水中，剧烈搅拌，完全溶解后，室温避光保存。

50×TAE电泳缓冲液：称取242 g Tris溶于300ml双蒸水加热搅拌溶解后，加51.7 ml冰乙酸和

100 ml, 0.5 mol/L EDTA（pH8.0）后用冰乙酸调节PH值8.5，然后加双蒸水定容至IL，灭菌后4℃保存。室温保存备用，使用时稀释50倍为工作液。

1 %琼脂糖凝胶：取0.2 g琼脂糖溶于20 ml 1×TAE电泳缓冲液中，微波炉融化后加入1 **###**l EB

贮存液，使凝胶中EB终浓度达到0.5μg/ml。

5%琼脂糖凝胶：取2.0g琼脂糖溶于40 ml 1×TAE电泳缓冲液中，微波炉融化后加入1 **###**l EB

贮存液，使凝胶中EB终浓度达到0.5μg/ml。

##### 3. PAGE胶电泳所用溶液

## 5 ×TBE缓冲液：

|  |  |
| --- | --- |
| Tris 碱 | 54g |
| 硼酸 | 27.5g |
| 0.5 mol/L EDTA(pH=8.0) | 20ml |
| 加去离子水定容至 1L. 电泳缓冲液稀释 5 倍变成 1×TBE 缓冲液。 | |

30%丙烯酰胺溶液：

|  |  |
| --- | --- |
| 丙烯酰胺 | 290g |
| 甲叉酰胺 | 10g |
| 溶解在 70ml 双蒸水中，定容至 1000ml。 | |

10%过硫酸胺溶液：

|  |  |
| --- | --- |
| APS | 10g |
| 溶于 90ml 双蒸水中，定容至 100ml，保存于 4℃适用 2 周。 | |

10%非变性聚丙烯酰胺凝胶（30ml）：

|  |  |
| --- | --- |
| 30%丙烯酰胺溶液（29:1） | 10ml |
| 5×TBE | 6ml |
| 10%过硫酸胺溶液 | 200μl |

|  |  |
| --- | --- |
| TEMED | 15μl |
| 双蒸水 | 13.8ml |
| 加去离子水定容至 1L. 电泳缓冲液稀释 5 倍变成 1×TBE 缓冲液。 | |

染色液：取1ml 20%AgNO3溶液溶于200ml的双蒸水中，配成0.1% AgNO3溶液，现用现配。显色液：2g NaOH, 0.1g Na2CO3，加双蒸水到250ml，在加入800μl 甲醛，现用现配。

4. 引物的溶解

根据引物合成的OD值算出引物的摩尔数质量数=OD值×33（单位为μg）；

分子量=(A的个数×312) +(C的个数×288) +(G的个数×328) +(T的个数×303) -61；摩尔数=质量数/分子量

若将引物稀释为100μM作为母液保存，那么加入双蒸水的量为：摩尔数（单位为nmol）×10（单位为μl）根据实验的需要将母液稀释为合适的浓度，-20℃分装保存。

## **2** 实验方法

### 2.1 微卫星标记研究方法

#### 2.1.1 刺参基因组DNA的提取方法

供提取DNA所使用的刺参组织分2组，一组为乙醇固定保存，一组为-80℃冷冻保存。

##### 1. 实验室传统提取方法

(1)取灭菌的1.5 ml离心管，剪取刺参肌肉组织约0.1 g放入，用小剪刀将其剪成尽可能细。

(2)离心管中加入600 ml DNA提取液和10μl蛋白酶K后充分混匀。

(3)将离心管放入事先打开的55℃水浴锅中水浴加热，每过15 min翻转一次，4 h左右，待样品裂解成澄清粘稠状液体后，取出加入等体积饱和酚，抽提（轻轻摇晃）10 min。然后以12000 rpm，离心10 min。

(4)取上清液（用平头枪头），加入等体积苯酚/氯仿混合液轻柔混匀10 min，放入离心机中，以12000 rpm，离心10 min。

(5)取上清液（用平头枪头），加入等体积氯仿轻柔混匀10 min。放入离心机中，以12000 rpm，离心10 min。

(6)取上清液，加入2倍体积的无水乙醇（转圈摇匀），沉淀DNA。以12000 rpm，离心10 min。

(7)弃上清液，用70 %乙醇洗涤沉淀2-3次后，常温晾干。

(8)加入100μlTE过夜溶解成母液。

(9)加入RNA酶2μl轻弹混匀后，放入事先打开的37℃水浴锅中水浴1 h。

##### 2. 改进的提取方法

取样后将组织立即用PBS缓冲液清洗，裂解液中的EDTA的浓度提高100倍。将普通提取方法第4步的Tris-饱和平衡酚和氯仿1: 1改成Tris-饱和平衡酚和氯仿-异戊醇（按24: 1比例混合）萃取5-8 min

（轻轻的摇晃翻转），酚仿萃取之后可以用氯仿再重复步骤5三次，以去除糖类物质和蛋白质，可以得到相对纯净的DNA。

#### 2.1.2 DNA琼脂糖凝胶电泳检测

1. 制胶：制备1％琼脂糖凝胶；

2. 上样：取4μl DNA样品，混匀1μl 6×Loading buffer，加入上样孔；

3. 电泳：120 V稳定电压电泳25 min；

4. 检测：电泳完毕后凝胶成像系统记录电泳结果。

#### 2.1.3 微卫星标记的获取

选取微卫星标记的方法有很多，可通过磁珠富集开发新的微卫星序列，也可以从EST 和

Nucleotide数据库以及发表的文献中获取有关刺参的微卫星标记，还可以通过跨物种筛选，本文选择最便捷、经济的方法，引物由上海生工生物有限公司合成。

##### 1. 直接从文献中获取

直接从文献中获取引物是最高效和简便易行的方法，本文中的引物SX-1、SX-2、SX-3、SX-4、SX-28、SX-30、SX-44、SX-46来自2006年单雪发表的《海参微卫星DNA的多态性》。

##### 2. 从EST数据库中获取

从GenBank([*http: //www. ncbi. nlm. nih. gov/GenBank/*](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/)) EST库中搜索，以*Apostichopus japonicus*为关键词，用FASTA格式下载7739条刺参的EST序列，利用SSRHunter查找：5次以上重复的双碱基至四碱基重复序列，共查找到449个序列。然后将查找到的EST序列的重复类型、重复次数和其所在序列号记录于新的文本文档，利用Vector NTI Suite8.0软件的Contig Express程序去除重复的EST序列。

##### 3. 从Nucleotide数据库中获取

从GenBank ( [*http: //www. ncbi. nlm. nih. gov/GenBank/*](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/)) Nucleotide库中搜索，以*Apostichopus japonicus* and microsatellite为关键词，搜索微卫星序列558个。选取了由Peng，W.等2011和Hu，J 等

2006直接提交的微卫星DNA序列，最初选取54个适合设计引物的微卫星序列以及文献获中取引物

4对引物。

##### 4. 跨物种筛选

跨物种筛选引物是一个常用且有效的方法，也称种间转移扩增，国内外有很多跨物种筛选的例子，例如Meijie Liao等[91]（2011）跨物种筛选了刺参的微卫星标记获得了成功。

#### 2.1.4 引物设计

设计引物采用Primer Premier 5.0 software（PREMIER Biosoft International, Palo Alto, USA）软件，在NCBI上获取的序列选取重复碱基在总序列靠中间的位置以便于设计引物，严格遵循引物设计原则，设计引物54对。

#### 2.1.5 SSR-PCR体系的建立

以自然群体刺参的基因组DNA为模板。

PCR反应体系25l：

|  |  |
| --- | --- |
| 10×PCR buffer （Mg2+ Plus） | 2.5 l |
| dNTP | 2 l |
| 上下游引物（ 10 M ） | 各 1 l |
| DNA 模板 | 1l |
| TaqE（5 U/μl） | 0.3 l |
| ddH2O | 17.2 l |
|  | 共 25 l |

PCR反应条件：

|  |  |
| --- | --- |
| 94℃ | 5 min（预变性） |
| 94℃ | 30 s （变性） |
| 50-62℃ | 30 s （退火） 26 循环 |
| 72℃ | 30 s （延伸） |
| 72℃ | 7 min （延伸） |
| 4℃ | 保存 |

#### 2.1.6 退火温度优化以及筛选引物

PCR扩增产物在1 %的琼脂糖凝胶通过电泳分离，在0.01 %的溴化乙锭（ethidium bromide, EB）溶液中染色，在紫外光激发下通过凝胶成像仪拍摄图片，找出最佳退火温度。退火温度过低会产生非特异性扩增条带，退火温度过高会无法得到特异性扩增条带。所以尽量筛选出扩增55℃以上扩增良好的引物进行下一步实验。

#### 2.1.7 PCR扩增产物的检测

PCR扩增产物经10％非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）检测，银染后用凝胶成像系统检测保存。

##### 1. 10％非变性聚丙烯凝胶的制备方法

经实验条件优化，本实验采用10 %的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳对扩增产物进行检测。主要步骤如下：

(1)玻璃板的清洗：用试管刷沾上洗涤剂把玻璃板擦洗干净后，用清水冲洗干净，放入烘箱备用烘干备用。

(2)凝胶的灌制：玻璃板清洗干净后，用胶条将两块板子底部封住，然后用夹子固定好。将配制好的胶液（30 %丙烯酰胺溶液10 ml，5×TBE6 ml，双蒸水14 ml，10%过硫酸胺溶液300μl，TEMED 25μl）沿着梳子插槽边缘缓慢地倒入玻璃板的空隙中，然后立即插入梳子。如果出现气泡，可以轻轻敲玻璃板，使气泡溢出。一般聚合30 min便可聚合完全。如室温较低时，聚合时间相应延长。

(3)上样与凝胶电泳：划开玻璃板下端胶带，固定在电泳槽上，电泳槽上端加满1×TBE。用注射器冲洗加样孔（注意轻柔）。

(4) 110 V电压，预电泳10 min，同时准备点样。

(5)扩增产物与上样缓冲液按体积比1: 5混匀后，用微量进样器加入点样孔内。点样后，不可挪动电泳槽或取下玻璃板。1×TBE, 130 V恒压电泳6 h，电泳至凝胶底部即可结束。

##### 2. 银染

银染按照许绍斌[92]（2002）的方法并略作改进，具体步骤如下：

(1)凝胶的固定：电泳结束后关闭电泳仪，取出玻璃板并用刀片轻轻撬开，移走上层玻璃板，轻轻用小刀把胶剥开一角，放入加有固定液的染色盘中（固定液10%乙醇溶液，每板用量为200 ml ）在摇床上缓慢摇动10 min。

(2)洗胶：倒掉染色盘中的固定液，倒入双蒸水，左右轻轻摇动清洗凝胶上的固定液，水洗 3

次，每次20 s。

(3)染色：加入染色液（0.1% AgNO3溶液, 每板200 ml ），在摇床上缓慢摇动染色15 min。

(4)洗胶：倒掉染色盘中的染色液，用双蒸清洗凝胶上的染色液，水洗3次，每次20 s。

(5)显色：加入显色液（2 g NaOH，0.1 g Na2CO3，加双蒸水到250 ml，再加入800l甲醛），轻轻振荡显色，一般5-15 min内，带型显现。

(6)终止：待带型清晰时，将胶用清水冲洗干净，以防止污染仪器，然后放置在扫描仪上扫描。

#### 2.1.8 产物大小的确定

泳道中DNA扩增条带的大小，采用T2A凝胶成像系统（美国BIO-RAD公司）软件计算，标准标定Marker为PBR322。

#### 2.1.9 数据处理

在遗传变异的数据分析中，将电泳谱带中的每一条DNA片段作为该座位的一个等位基因来处理，在相同的迁移位置，出现扩增的等位基因按其迁移率的不同从小到大依次定义为：A、B、C、……、

Z. 将数据输入Popgene32软件中进行处理数据，获得等位基因数（NA）、观测杂合度（HO）、期望杂合度（HE）等遗传参数，并进行了连锁不平衡检验（LD）和Hardy-Weinberg平衡检验（HWE）。应用Little Programe软件计算出多态信息含量（Polymorphism information content, PIC）值。Nm（基因流）。

Nei 群体间的相似性系数和群体间遗传距离以及F-统计量进行遗传多样性的分析，FST 在0-0.05之间，群体遗传分化较弱；0.05-0.15之间，表示群体遗传分化中等；0.15-0.25之间，表示群体遗传分化较大；当FST值大于0.25 时，表示分化极大。

### 2.2 COⅠ序列的研究方法

#### 2.2.1 基因组DNA提取

从4个群体中每个群体随机选取15个体为COⅠ研究对象，参考2.1.1中DNA提取方法。

#### 2.2.2 DNA琼脂糖凝胶电泳检测

方法参考2.1.2中的方法

#### 2.2.3 COⅠ引物获取

选取ALLAN ARNDT[93]（1996）线粒体DNA对东太平洋海参育种中使用引物：

COIef: ATAATGATAGGAGG[A/G] TTTGG COIer: GCTCGTGT[A/G] TCTAC[A/G] TCCAT

#### 2.2.4 COI-PCR体系建立

COI-PCR反应条件参照律迎春等（2011）年的刺参COⅠ条形码构建，进行适当的调整。

PCR反应条件：

|  |  |
| --- | --- |
| 94℃ | 5 min（预变性） |
| 94℃ | 45 s （变性） |
| 46℃ | 45 s （退火） 35 循环 |
| 72℃ | 60 s （延伸） |
| 72℃ | 10 min （延伸） |
| 4℃ | 保存 |

COⅠ-PCR反应体系使用ALLAN ARNDT（1996）年使用的方法，进行了适当的调整。

PCR反应体系50l：

|  |  |
| --- | --- |
| 10×PCR buffer （Mg2+ Plus） | 5 l |
| dNTP | 4l |
| 上下游引物（ 10 M ） | 各 2l |
| DNA 模板 | 2l |
| TaqE（5 U/μl） | 0.6l |
| ddH2O | 34.4l |
|  | 共 50 l |

PCR扩增产物在1%的琼脂糖凝胶通过电泳分离，在0.01%的溴化乙锭（ethidium bromide, EB）溶液中染色，在紫外光激发下通过凝胶成像仪拍摄图片，查看PCR扩增情况是否良好。

#### 2.2.5 COⅠ-PCR产物纯化

使用上海生工生物工程有限公司胶回收试剂盒进行PCR产物的纯化。

#### 2.2.6 PCR产物测序

产物测序使用的是PCR产物直接测序的方法，委托上海生工生物工程有限公司，双向测序测通，测序完成后进行拼接获得最终结果。

#### 2.2.7 COⅠ序列分析

##### 1. 序列校对

两端不可信的序列用BioEdit软件去掉，并且人工校对有N值和计算机误读的个别碱基，然后去掉引物部分的序列用DNA Star软件里的EditSeq功能，再对49个序列分别进行序列对位排列分析用clustalx软件可以完成，用于实验分析的每一实验个体最终得出一准确序列。

##### 2. 刺参COⅠ序列聚类分析

将分析后得到养殖群体与野生群体的个体序列，进行不同地区的同一物种的序列分析。对四个不同群体的刺参序列分别用BioEdit软件进行处理，建立本地核酸序列数据库，对每个群体里个体序列与此库作BioEdit比对，观察地区间序列有无差别，并且判断出每个树种的研究个体数。

##### 3. 序列比对

将测序处理后的序列，利用NCBI的BioEdit与GneBank数据库资料进行在线比对分析，检测其是否相似于己报道的刺参COI序列，并检测每个个体的观测对比结果。

##### 4. 刺参COI序列核酸组成

利用BioEdit的Sequence工具下Nucleotide composition分析仿刺参COI序列的长度并用DNA

Star软件里的EditSeq程序计算出核苷酸GC含量。

##### 5. 刺参COI基因的遗传多样性分析

实验中养殖群体和野生群体的刺参的序列进行分析，然后将养殖群体和野生群体的COI序列与从NCBI中挑取的海参纲梅花参属的COI序列一起分析，利用MEGA3.0系统发育分析软件算出遗传距离及转换、颠换率并构建刺参的系统进化树。选择kimur2-Parameater的核苷酸距离模式进行数据处理；采用距离法得到UPGMA树、ME树、NJ树；采用最大简约法得到MP树；应用自展法（bootstrap）对所获得的树进行重抽样检验，自展重复次数定为1000次，所获得的一致树各分支的置信度也采用

bootstrpa法进行检验，共进行1000次循环[94]。

## **3** 结果与分析

### 3.1 基因组DNA提取结果

提取的刺参基因组DNA经1%琼脂糖凝胶电泳检测结果如图2-1，图2-2。

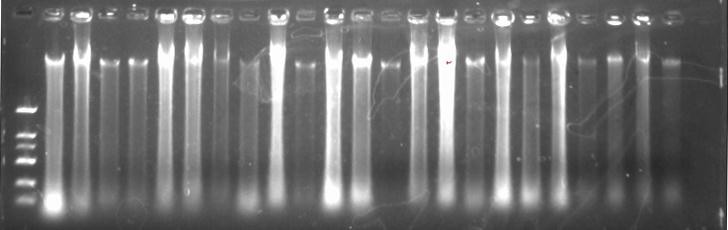


图2-1 普通方法提取刺参DNA 1％琼脂糖电泳图（M=DL2000）

Figure 2-1 stichopus common method of extracting DNA 1% agarose electrophoresis(M = DL2000)



图2-2 改进方法提取刺参DNA 1 ％琼脂糖电泳图（M=DL2000）

Figure 2-2 stichopus common method of extracting DNA 1% agarose electrophoresis(M = DL2000)

经过反复的试验验证，-80℃保存的刺参样品难以提取出DNA，在消化过程中往往粘连在一起成团状，难以消化完全，所得DNA含量低，电泳没有条带或者条带弥散；原因可能是刺参的体细胞中水分和糖含量高（76％-85％），保存于低温下形成结晶，在抽提前的切碎过程中结晶溶解后变成黏糊状，进而引起核DNA的降解，具体原因还有待进一步的探讨[95]。较完整的总DNA提取适用于70％乙醇固定，并可以在后续实验中获得多态性丰富的SSR图谱。因此不同浓度乙醇固定法可以作为一种合适的标本保存方法。

图2-1为普通方法提取的DNA，电泳图可以看出有拖尾，点样孔很亮，说明有杂蛋白。图2-2为改进的方法提取的DNA，可以看出基因组DNA条带清晰、整齐且完整，说明提取的基因组DNA分子较完整，基本没有降解，紫外分光光度计测OD值（OD260/OD280），结果介于1.78-1.83之间，将溶液稀释至50

mg/μL可以用于微卫星DNA的PCR扩增。（稀释倍数=测OD值时总体积/加样体积），用于加样体积。

### 3.2 微卫星引物获取结果

本文刺参微卫星引物是通过文献获取和NCBI数据库获取。EST数据库总查找到449个含有微卫星的序列，但是由于EST数据库为mRNA序列，而我们使用的PCR模版为DNA，设计引物存在内含子的干扰，故本文选取了Nucleotide数据库中的序列，引物信息见表2-3。

表2-3 引物获取信息及退火温度

Table 2-3 primer annealing temperature and to obtain information

| Locus | Primer pair sequence （5’−3'） | T（℃） | Locus | Primer pair sequence （5’−3'） | T（℃） |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| GF1 | F: GCCGTTCTGTCTGTTTTTGATTC  R: CCTGCCATTGTTGATTTATCGTG | 60 | WF42 | F: GAAGGAATCTATGCGATGGTG  R: AAGTGTTGACGAGCAAGTGG | 58 |
| GF2 | F: TTACCCCTCACTCGGATTGG  R: GTCATCCGAGAACTCCAGGC | 60 | WF39 | F: CAGTTCCAAACAAGCCCTAG  R: GCAGTGTCCCACTTATCAAGG | 60 |
| GF3 | F: TCCTACATCCCCTCTATGCCTG  R: GTCAGTCATCGGTGCATTGC | 60 | WF35 | F: CAAATACAACCACGACGCAG  R: ACTGATGAAAGTCACCCACC | 58 |
| GF4 | F: GAGACGCAGTTATAGGTTCGG  R: ACACAAACAGAAACGCAGCC | 60 | WF16 | F: GGTGAGTTATGCTTCTGTTGC  R: CAAACACAGTTAATCCACCATG | 58 |
| GF5 | F: GAATGCCGCAAATAAACAGC  R: GACTTCCACCAAAGACAATAGG | 60 | WF44 | F: GGTCATCCGAGAACTCCAGG  R: GCCTCATTTTGGCAAAGTGG | 60 |
| GF6 | F: GTGGACCCACAGAATAATTG  R: ATCCAATGGTGTCCTCAGTC | 60 | WF14 | F: GAACATCAACTTATTCTCGCC  R: TTCCCTACTTGAGATACCGTG | 53 |
| GF7 | F: GGATACCTCCAACCACCCATAC | 60 | WF20 | F: TGACTGCTTTCATTGGCTCC | 58 |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | R: ACAACCCTGACAACGTAGCG |  |  | R: CCATGATTCTGCCATTCCAC |  |
| GF8 | F: CACTGTAACAGACATACACACTC  R:GGAGTAGGACAGGAGAACAG | 60 | WF6 | F: TACATTTTCGGTAGCGGGAC  R: AAGGAACCTATGCAGTCAGG | 60 |
| GF9 | F: GCTTCACTAGGCTTTGGCGT  R: GACCCGTCTTTATCAAACCCT | 60 | WF10 | F: CAAGGAATCTATGCGATGGTG  R: TCTGTCTTTTGGTTGCGGAG | 62 |
| GF10 | F: GAGGCACATGAAAGTGAGTAC  R: GATTCCTACGCCATGACTTG | 60 | WF34 | F: AGCCTAAGTCAATGGGGAAATC  R: AACAATTGCCGATTTGCAGG | 58 |
| GF11 | F: GCACACACACCACAACCCAT  R: CTCTTTTGGTGGATTTCGGC | 60 | WS14 | F: TCCGACTTTTAGGACCAGAT  R:: TGGGTTTTCACCTCAGACG | 60 |
| GF12 | F: ATGCAGCACTCTGTATCAGC  R: CATTACAACCGAATCACAGG | 60 | WS16 | F:: AAGGTGTGCGTCAGTCAATG  R:: GTGTGCAATAAACCTTCGGC | 60 |
| GF13 | F: ATGGGCATCTACCTCTCACG  R: GGCAATCGTTCTACCGTGTAT | 60 | WF48 | F: ACCTGTTTGGTCATTTGTGC  R: GTTGTGATAGCCATTCTTGAGG | 55 |
| WS13 | F: TTGGCATTCTGTCAAGTCGT  R: ATGTTCTGCTTAGCGTTCTC | 60 | WF25 | F: CATCGATAAATGGTGAGTAGGAC  R: CAGAAATGGACCAGGAAACC | 55 |
| WS15 | F: GAGAGAGTGTGCGGAGTATGC  R: GGGCTTCTGCTACTCAATGTG | 60 | WF31 | F: GCCCCTTAACCCATGCTTAG  R: CAGAGATGGAGGGAAAATGC | 55 |
| WF50 | F: GGATCAATATGTTCGGTTCGTG  R: TGAGAGCACCACTCCATATTCC | 55 | SX28 | F:GGCCTACATATACAGACAAACGC  R:ATCTCTTTGCCGAAACACTAACG | 55 |
| WF49 | F: GTACTGTGTGGACCGAGACG  R: GGTGGCCTGTATAGTGTAAGAC | 60 | SX44 | F: CGAGACGTTTACTTCCAC  R: AGAGGTTGCTGGCTTTAC | 55 |
| WF45 | F: GGTGAAAATGAATGCTATCGG  R: TCCACCTGCACTTAACAGATTC | 60 | SX46 | F: TCGGAGCTACTGTACCAAC  R: GGCAGGTGATGTAACCCTT | 55 |
| WF13 | F: TGTGCGTTAGTGTTGTAGGAGAC  R: TTATAGGGCGGGTTGTTTGTG | 58 | SX30 | F: AGACTTGAGCGGACACCC  R: CCAACCCTAACAGCAAGAG | 55 |
| WS4 | F: ACCACTTGACCACAACGCTC  R: GACCAGGGTGCTGAGTTGAC | 60 | WF32 | F: ATTCATGTGGCTTGATGATGTC  R: TTGGGAGATATCACAGATTTCG | 55 |
| WS5 | F: GCCTGGTGATTCTTGGGTCG  R: CGTGGTGACTGGAAATATGCC | 60 | WF23 | F: GATGTGCCTAGTGCAGCAATAC  R: CCGCTCTCTATATGTCTCCCTC | 55 |
| WS6 | F: CAGTGAAAGGAAAGCTGCATCT  R: CCAGAGGCACATAATGCTAAGG | 60 | *SX1* | F :GCACCAATCAACCACATGGTCC  R: TGGCGACAGACTAGTGAG | 61 |
| WS7 | F: GTTTCAAAGGGCACCAATAC  R: TTGTCCTAAGCTTTCAGGGAC | 60 | *SX2* | F: CTTCCATAATGGTCCATGCC  R:CACAACATATCACGCAGCAG | 61 |
| WS8 | F: CGTGTTTACGAGCAAGCTGTC  R: CGGTCTGAACGAAACACAAAC | 60 | *SX3* | F: GATTGGTCCAAGCTTCCT  R:ACCTACCGCCATTCACAAGT | 56 |
| WS10 | F: TACCCCTTACACCGACAACT  R: GCCACAGTTGGTTTCATAGC | 60 | *SX4* | F: TGCTAGCATTCTCGGCTC  R: ACTCGCTCGCTTGGAGAGT | 61 |
| WS11 | F: GTCCGAATCCTCAATCCAAC  R: CTATGCAGTCAGGTTGGCG | 60 | WS12 | F: GTGGAACCCCAAGAACAATG  R: ACGTGTATCAGTTGTGCGAGAC | 60 |
| WS18 | F: CCCTTATTGAGATAGAGCGT  R: ATACCTTCCAAACAACTGCC | 60 | WS24 | F: GAAGCACCATACTGTCGTTTG  R: GTGGTTGCCTGTTCTCTGAC | 60 |
| S7 | F:: GTTTCAAAGGGCACCAATAC  R:: TTGTCCTAAGCTTTCAGGGAC | 60 | S18 | F:: CCCTTATTGAGATAGAGCGT  R:: ATACCTTCCAAACAACTGCC | 60 |
| S15 | F:: GAGAGAGTGTGCGGAGTATGC | 60 | S24 | F:: GAAGCACCATACTGTCGTTTG | 60 |

|  |  |
| --- | --- |
| R:：GGGCTTCTGCTACTCAATGTG | R:：GTGGTTGCCTGTTCTCTGAC |

### 3.3 微卫星引物筛选结果

以刺参基因组DNA为模板，进行PCR扩增，摸索退火温度、引物浓度、循环次数等，经多次

PCR反应条件优化，PCR产物通过1%琼脂糖凝胶电泳检测，筛选出能扩增清晰的特异性条带的引物。经检测，所设计的58对引物有33对引物有清晰稳定的扩增结果，扩增片段与预期大小相符，图2-3和2-4是摸索退火温度同一基因组DNA不同引物电泳图。PCR产物可以进行聚丙烯凝胶检测。



图2-3 退火温度60℃全部引物同一基因组PCR检测电泳图



Figure 2-3 annealing temperature 60 ℃all the same genomic PCR primers to detect electrophoresis

图2-4 退火温度60℃全部引物同一基因组PCR检测电泳图

Figure 2-4 Annealing temperature 60 ℃all genomic PCR primers detected the same electrophoresis

### 3.4 聚丙烯电泳结果

采用筛选好的33对引物对采自大连海域自然群体的37个个体进行PCR扩增。扩增产物全部经过1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测，部分见图2-5。经琼脂糖检测后条带清晰且稳定的PCR产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳检测，33对引物有明显多态性，见表2-4，可用于群体遗传多样性分析。部分引物的聚丙烯电泳图，见图2-6。



图2-5 F45引物1.5％琼脂糖检测Figure2-5 Detection F45 Primer 1.5% agarose



图2-6 WF20、WF42、WF6、WF14、WF13位点聚丙烯酰胺凝胶扩增图谱

Figure 2-6 WF20, WF42, WF6, WF14, WF13 amplificationem insidias gel loca polyacrylamide

### 3.5 刺参SSR遗传多态性结果与分析

#### 3.5.1 等位基因

等位基因是衡量微卫星座位多态性的一个重要参数。根据微卫星标记选择标准，每个微卫星位点至少应有4个等位基因能较好地用于遗传多样性的评估。最终我们得到了33对引物扩增37个体的的等位基因。这些位点的详细信息总结于表2-4. Na每个微卫星座位检测到的等位基因数为3-8个，平均为5.5个。Ne有效等位基因数是2.778-6.588个，平均为4.736个。期望杂合度Ho和观测杂合度He分别为0.270-0.8446 和0.598-0.875 。

#### 3.5.2 Hardy-Weinberg平衡

Hardy-Weinberg平衡的实质是指一个较大的群体、随机婚配，在没有突变、没有选择、没有迁移、没有遗传漂变（小群体内基因频率随机波动）的情况下，群体内一个位点上的基因型频率和基因频率将代代保持不变，处于遗传平衡状态。

通过Bonferroni 校正后（P <0.004, adjusted value）发现显著偏离HWE平衡的位点有WF45，WF13，

WF16，WF39，WF6，WS14，WS15，WS18，GF3，GF13。在海洋经济鱼类、贝类、棘皮类的养殖群体中，被检测位点偏离Hardy–Weinberg平衡的现象普遍存在。我们认为这可能是由于本实验所采用的样本数量和规格大小有限或者是由于无效等位基因的存在，发现WF45，WF13，WF16，WF39，WF6，

WS14，WS15，WS18位点有无效等位基因的存在。

表2-4 刺参全部引物序列特征及遗传多样性指数

Table 2-4 All primer sequences japonicus characteristics and genetic diversity index

| Locus | Repeat motif | Size | T（℃ | A | Ne | HO | He | WE(P | PIC | GenBank |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| WF50 | (TG)11 | 144-152 | 55 | 4 | 3.997 | 0.517 | 0.757 | 0.100 | 0.703 | JF795163 |
| WF49 | (AC)12 | 98-110 | 60 | 5 | 4.007 | 0.670 | 0.757 | 0.635 | 0.708 | JF795173 |
| WF45 | (TG)12 | 113-121 | 60 | 4 | 3.461 | 0.393 | 0.718 | 0.000 | 0.656 | JF795185 |
| WF13 | (CA)12 | 170-190 | 58 | 7 | 4.740 | 0.270 | 0.796 | 0.000 | 0.817 | JF795204 |
| WF42 | (TG)10 | 67-79 | 58 | 5 | 4.726 | 0.661 | 0.796 | 0.083 | 0.755 | JF795193 |
| WF39 | (AG)15 | 138-150 | 60 | 5 | 3.949 | 0.286 | 0.754 | 0.000 | 0.704 | JF795207 |
| WF35 | (TG)13 | 166-174 | 58 | 4 | 3.375 | 0.589 | 0.742 | 0.164 | 0.686 | JF795215 |
| WF16 | （GT）4. 。。(TG)9 | 164-171 | 58 | 3 | 2.778 | 0.571 | 0.646 | 0.001 | 0.564 | JF795192 |
| WF44 | (TG)12 | 183-195 | 60 | 5 | 4.755 | 0.607 | 0.797 | 0.107 | 0.756 | JF795187 |
| WF14 | （TG）4. 。。(TG)13 | 202-214 | 53 | 5 | 4.093 | 0.642 | 0.803 | 0.195 | 0.777 | JF795202 |
| WF20 | (TG)12 | 140-156 | 58 | 8 | 5.878 | 0.714 | 0.837 | 0.516 | 0.807 | JF795184 |
| WF6 | (TC)15 | 220-236 | 60 | 8 | 5.458 | 0.661 | 0.824 | 0.000 | 0.792 | JF795238 |
| WF10 | (GT)9 | 236-248 | 62 | 8 | 6.203 | 0.846 | 0.875 | 0.099 | 0.820 | JF795224 |
| WF34 | （AC）8. 。。(CA)15 | 235-254 | 58 | 6 | 5.270 | 0.732 | 0.818 | 0.187 | 0.782 | JF795219 |
| WS14 | (AG)14 | 231-243 | 60 | 5 | 4.888 | 0.607 | 0.803 | 0.002 | 0.762 | EF032102 |
| WS16 | (CA)12 | 290-302 | 60 | 5 | 4.615 | 0.696 | 0.790 | 0.342 | 0.748 | EF032090 |
| WS7 | (CA)8CG(CA) | 173-181 | 60 | 3 | 2.996 | 0.518 | 0.673 | 0.105 | 0.592 | EF032046 |
| WS15 | (TG)11 | 144-156 | 60 | 6 | 5.917 | 0.464 | 0.838 | 0.000 | 0.807 | EF032092 |
| WS18 | (AC)11 | 142-158 | 60 | 7 | 6.588 | 0.482 | 0.855 | 0.000 | 0.829 | EF032081 |
| WS24 | （AG）12. 。。 | 294-306 | 60 | 6 | 5.973 | 0.678 | 0.840 | 0.624 | 0.809 | EF032026 |
| GF1 | (TG)8 | 128-140 | 60 | 4 | 3.054 | 0.571 | 0.679 | 0.098 | 0.703 | HM191716 |
| GF2 | (CA)12 | 211-223 | 60 | 4 | 2.912 | 0.518 | 0.663 | 0.249 | 0.708 | HM189200 |
| GF3 | (CA)11 | 85-97 | 60 | 4 | 2.892 | 0.429 | 0.660 | 0.000 | 0.656 | HM189192 |
| GF4 | (TG)7 | 118-130 | 60 | 3 | 2.632 | 0.679 | 0.626 | 0.607 | 0.817 | HM189190 |
| GF5 | (TG)15 | 225-237 | 60 | 4 | 2.509 | 0.571 | 0.607 | 0.803 | 0.755 | HM189188 |
| GF6 | (CA)11 | 190-202 | 60 | 3 | 2.455 | 0.500 | 0.598 | 0.010 | 0.704 | HM189186 |
| GF7 | (TG)11 | 152-164 | 60 | 4 | 2.762 | 0.607 | 0.644 | 0.606 | 0.686 | HM189184 |
| GF8 | (AC)10 | 145-157 | 60 | 3 | 2.667 | 0.518 | 0.631 | 0.078 | 0.564 | HM189203 |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| GF9 | (TG)12 | 236-248 | 60 | 4 | 2.844 | 0.589 | 0.654 | 0.767 | 0.756 | HM189201 |
| GF10 | (CA)12 | 110-122 | 60 | 4 | 2.668 | 0.518 | 0.631 | 0.075 | 0.777 | HM189199 |
| GF11 | （TC）8. 。。(CT)5 | 154-166 | 60 | 4 | 2.852 | 0.607 | 0.655 | 0.008 | 0.807 | HM189193 |
| GF12 | (CA)14 | 136-148 | 60 | 4 | 3.452 | 0.554 | 0.717 | 0.011 | 0.792 | HM189191 |
| GF13 | (CA)8 | 129-141 | 60 | 4 | 2.701 | 0.482 | 0.636 | 0.000 | 0.820 | F795194 |

注：T为引物的退火温度；*N*A未检测到的等位基因数；*H*O为观测杂合度；*H*E为期望杂合度；*P*HW<0.05 \*表明位点偏离

Hardy–Weinberg平衡；

#### 3.5.3 多态信息含量

Botstein17等提出了衡量基因变异程度高低的多态信息含量指标：PIC是指一个标记用于在群体检测多态性的价值。PIC取决于检测到的等位基因的数目和它们的频率分布。其值等于1减去所有等位基因频率的平方的总和。例如，一个微卫星标记的两个等位基因的PIC 频率各为0.5，应为1〔-（0.5）2 +（0.5）2] = 0.5，而两个等位基因频率是0.9和0.1的微卫星标记PIC为0.18。由此可以看出，等位基因数越大，PIC也就越大；等位基因是一个特定的数，等位基因频率越平等，PIC就越高。PIC值的比较可以给研究人员一个初步的结论，以解决各种标记类型的效率对水产养殖遗传学具体问题的大致了解。

当PIC＞0.5时，该位点被称为高度多态位点；当0．25＜PIC＜0.50时，为中度多态位点；当

PIC＜0.25时，为低度多态位点。本研究采用的33个SSR多态性位点的PIC值均大于0.5，说明这些遗传标记均属于高度多态性位点，说明各个等位基因之间的频率比较接近，可用于遗传多样性分析。

#### 3.5.4 基因杂合度

基因杂合度是衡量群体遗传变异的重要参数，其大小可反映群体的遗传变异程度高低。如果杂合度越高，群体的遗传结构也就越复杂。通常情况下，杂合度高的生物群体适应环境变化的能力更强，并且有可能拥有更多优良的性状。本研究中，位点WF13和WF39上的观测杂合度分别为0.276和0.280，遗传多样性水平较低。但其它位点上则表现出丰富的遗传多态性，最高达到0.732。观测杂合度为0.598-0.875，这说明刺参的遗传多态性在所分析的33个基因位点上呈现分化状态，部分位点的遗传多样性较低，而大多数的位点则表现出极为丰富的遗传变异。

#### 3.5.5 连锁不平衡现象

连锁不平衡现象（linkage disequilibrium, LD）是指不同基因座位的等位基因以一定频率在群体中出现，在某一个群体中，不同座位上的某两个等位基因出现在同一条单元型上的频率与预期的随机频率之间存在明显差异的现象。由于不同基因座位的某些等位基因经常连锁在一起遗传，而连锁的基因并不会完全随机地组成单元型，有些基因总是较多地在一起出现，导致某些单元型在群体中呈现较高的频率，从而引起连锁不平衡[96]。本研究33个位点之间也没有检测到连锁不平衡现象，因此这些位点的等位基因变异被认为是独立的。

### 3.6 刺参COⅠ遗传多态性结果与分析

#### 3.6.1 COⅠ扩增结果

用COⅠ引物对选取的四个群体49个体基因组DNA进行PCR扩增，在反应条件的优化后，扩增结果用1.5％琼脂糖凝胶电泳检测，电泳结果见图2-7。从图中与Marker对比可以确定目的带大小为500-750之间，与预期扩增CO I基因片段654bp大小相符合，从图中清晰的结果可判断出PCR扩增得到了预期的目的片段。再次用琼脂糖分离扩增产物，进行切胶回收纯化。



图2-7 COI引物扩增琼脂糖电泳结果图

Figure 2-7 COI primers agarose gel electrophoresis results of Figure

#### 3.6.2 PCR产物测序分析

四个亚群仿刺参共选取49个个体（每个亚群分别用YZA8个、YZB9个、YSA12个、YSB10个来代替）的COⅠ序列经过CLUSTAL-X（1.8）软件对位排列后，去掉两端不准确序列获得了654bp的同源序列。将49个个体的全部COⅠ序列用BioEdit软件进行处理后作为一个共同数据矩阵进行分析。结果发现，共有10个个体的COⅠ序列没有变异位点，分别为有39个个体的序列出现了变异位点。这49个个体比对结果见图2-8。

#### 3.6.3 COⅠ序列碱基组成和位点突变分析

整理数据后的39个体共有30个变异位点，没有插入或缺失变异，物种间序列变异位点存在转换、颠换和两种同时出现，本实验的研究结果显示出39个刺参个体的CO I序列转换率极高，有29个转换，1个颠换，没有既转换又颠换的位点出现，39个个体出现的变异位点如表2-6所示，在30个变异位点中，多态位点（S）为15个，本实验用DNAStar软件中的Edtisqe程序计算出在所测得的

25个仿刺参COI序列中，A、G、T、C碱基的平均含量分别为26.52%、18.91%、32.31%、21.98%，

T含量最高。其中A+T含量（58.83%）明显高于G+C含量（41.18%），每个地理亚群的A、T、G、

C碱基含量的统计见表2-5。

表2-5 各类群碱基含量

Table 2-5 nucleotide content of each group

| 亚群 | A | G | T | C | A+T | C+G |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| YSA | 26.62％ | 18.82％ | 32.36％ | 21.91％ | 58.99％ | 41.01％ |
| YSB | 26.46％ | 18.89％ | 32.21％ | 22.01％ | 58.67％ | 41.33％ |
| YZA | 26.62％ | 18.91％ | 32.33％ | 21.99％ | 58.95％ | 41.05％ |
| YZB | 26.38％ | 19.00％ | 32.32％ | 22.02％ | 58.69％ | 41.31％ |
| 平均值 | 26.52％ | 18.91％ | 32.31％ | 21.98％ | 58.83％ | 41.18％ |

10 20 30 40 50 60 70 80 90

.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |

**YSA3** **TAAATGATTAATTCCTCTAATGATAGGTGCTCCAGACATGGCTTTCCCACGAATGAAAAAAATGAGATTTTGACTAATACCTCCCTCCTTCATTC YSA5...............................................................................................**

**YSA7...............................................................................................**

**YSA8.................................................................................... T..........**

**YSA9...............................................................................................**

**YSA11...............................................................................................**

**YSA12...... G........................................................................................**

**YSA14.................................................................................... T..........**

**YSB2............................................................................................. C.**

**YSB4...............................................................................................**

**YSB5...............................................................................................**

**YSB6.................................................................................... T..........**

**YSB7.............................. C................................................................**

**YSB10...............................................................................................**

**YSB12...............................................................................................**

**YSB13...............................................................................................**

**YSB15...............................................................................................**

**YZA1...............................................................................................**

**YZA2...............................................................................................**

**YZA4...............................................................................................**

**YZA5...............................................................................................**

**YZA6...............................................................................................**

**YZA7.................................................................................... T..........**

**YZA8...............................................................................................**

**YZA9...............................................................................................**

**YZA10...............................................................................................**

**YZA12...... G........................................................................................**

**YZA13...............................................................................................**

**YZA14...............................................................................................**

**YZB2...............................................................................................**

**YZB3...............................................................................................**

**YZB5...............................................................................................**

**YZB8...............................................................................................**

**YZB9...............................................................................................**

**YZB10...............................................................................................**

**YZB13...............................................................................................**

**YZB17...............................................................................................**

**YZB18...............................................................................................**

**YZB19...............................................................................................**

110 120 130 140 150 160 170 180 190

.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |

**YSA3** **CTTGCCTCTGCAGGAGTTGAAAGAGGGGCCGGAACAGGGTGAACAATTTACCCTCCACTCTCAAGCAATATTGCCCACGCAGGAGGATCTGTTGA YSA5...................................... A.............. C.........................................**

**YSA7...............................................................................................**

**YSA8..... T.........................................................................................**

**YSA9..................................................... C.........................................**

**YSA11...............................................................................................**

**YSA12...............................................................................................**

**YSA14..... T.........................................................................................**

**YSB2...............................................................................................**

**YSB4...............................................................................................**

**YSB5..................................................... C................................ G........**

**YSB6..... T............................................ T............................................**

**YSB7...............................................................................................**

**YSB10..................................................... C............................. G...........**

**YSB12...............................................................................................**

**YSB13...............................................................................................**

**YSB15...............................................................................................**

**YZA1...............................................................................................**

**YZA2......................................................................................... C.....**

**YZA4..................................................... C.........................................**

**YZA5...................................... A.............. C.........................................**

**YZA6...............................................................................................**

**YZA7..... T.........................................................................................**

**YZA8...................................... A.............. C.........................................**

**YZA9...................................... A.............. C.........................................**

**YZA10...............................................................................................**

**YZA12...............................................................................................**

**YZA13...................................... A.............. C.........................................**

**YZA14...............................................................................................**

**YZB2...............................................................................................**

**YZB3..... T.........................................................................................**

**YZB5...............................................................................................**

**YZB8...............................................................................................**

**YZB9...............................................................................................**

**YZB10..................................................... C.........................................**

**YZB13...............................................................................................**

**YZB17...............................................................................................**

**YZB18...............................................................................................**

**YZB19...............................................................................................**

210 220 230 240 250 260 270 280 290

.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |

**YSA3** **CTATTTTTTCACTACACTTGGCTGGTGCCTCCTCAATTCTAGCTTCCATAAAATTCATAACCACAATTATTAAAATGCGGACTCCGGGGATAACT YSA5...............................................................................................**

**YSA7...............................................................................................**

**YSA8............................................................................... A..... A.........**

**YSA9...............................................................................................**

**YSA11................... A.............................................................. C............**

**YSA12...............................................................................................**

**YSA14............................................................................... A..... A.........**

**YSB2...............................................................................................**

**YSB4...............................................................................................**

**YSB5...............................................................................................**

**YSB6............................................................................... A..... A.........**

**YSB7................... A.............................................................. C............**

**YSB10...............................................................................................**

**YSB12...............................................................................................**

**YSB13...............................................................................................**

**YSB15................... A...........................................................................**

**YZA1...............................................................................................**

**YZA2...............................................................................................**

**YZA4...............................................................................................**

**YZA5...............................................................................................**

**YZA6...............................................................................................**

**YZA7..................................................................................... A.........**

**YZA8...............................................................................................**

**YZA9...............................................................................................**

**YZA10...............................................................................................**

**YZA12................... A...........................................................................**

**YZA13...............................................................................................**

**YZA14................... A........................................................... A...............**

**YZB2...............................................................................................**

**YZB3...............................................................................................**

**YZB5................... A.............................................................. C............**

**YZB8...............................................................................................**

**YZB9...............................................................................................**

**YZB10.................................................................................. C............**

**YZB13...............................................................................................**

**YZB17...............................................................................................**

**YZB18..................................................................................... A.........**

**YZB19...............................................................................................**

310 320 330 340 350 360 370 380 390

.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |

**YSA3** **TCGACTTCCCTTATTCGTGTGATCCGTATTTATAACTGCTATTCTTTTACTTCTGAGCCTTCCAGTACTAGCTGGAGCTATAACGATGTTACTAA YSA5.............................................................................. C................**

**YSA7.............................................................................. C................**

**YSA8.................................................................................... A..........**

**YSA9...................................................... A........ G...............................**

**YSA11.............................................................................. C................**

**YSA12...............................................................................................**

**YSA14...............................................................................................**

**YSB2.............................................................................. C................**

**YSB4.................................................... T......................... C................**

**YSB5...................................................... A........ G.............. C................**

**YSB6.................................................................................... A..........**

**YSB7.............................................................................. C................**

**YSB10...................................................... A........ G.............. C................**

**YSB12.............................................................................. C................**

**YSB13.............................................................................. C................**

**YSB15.............................................................................. C................**

**YZA1...............................................................................................**

**YZA2.............................................................................. C................**

**YZA4............................................................... G.............. C................**

**YZA5.............................................................................. C................**

**YZA6.......... C................................................................... C................**

**YZA7...............................................................................................**

**YZA8.............................................................................. C................**

**YZA9.............................................................................. C................**

**YZA10...............................................................................................**

**YZA12.......... C................................................................... C................**

**YZA13.............................................................................. C................**

**YZA14.......... C......... A..........................................................................**

**YZB2.................................................................. G........... C................**

**YZB3.................................................................. G............................**

**YZB5.............................................................................. C................**

**YZB8...............................................................................................**

**YZB9.......... C................................................................... C................**

**YZB10...................................................... A........ G.............. C................**

**YZB13.......... C................................................................... C................**

**YZB17.................................................... T..........................................**

**YZB18...............................................................................................**

**YZB19...................................................... A....................... C................**

410 420 430 440 450 460 470 480 490

.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |

**YSA3** **CGTAAAATTAAAACAACTTTTTTTGACCCAGCAGGTGGAGGAGACCCAATATTGTTTCAACACTTGTTCTGATTCTTCGGACACCCAGAAGTTTA YSA5...............................................................................................**

**YSA7...............................................................................................**

**YSA8.............. G................................................................................**

**YSA9....................... C.......................................................................**

**YSA11...............................................................................................**

**YSA12...............................................................................................**

**YSA14...............................................................................................**

**YSB2...............................................................................................**

**YSB4...............................................................................................**

**YSB5....................... C.......................................................................**

**YSB6.............. G................................................................................**

**YSB7...............................................................................................**

**YSB10....................... C.......................................................................**

**YSB12...............................................................................................**

**YSB13...............................................................................................**

**YSB15...............................................................................................**

**YZA1...................................... G........................................................**

**YZA2...............................................................................................**

**YZA4...............................................................................................**

**YZA5...............................................................................................**

**YZA6...............................................................................................**

**YZA7...............................................................................................**

**YZA8...............................................................................................**

**YZA9...............................................................................................**

**YZA10...................................... G........................................................**

**YZA12...............................................................................................**

**YZA13...............................................................................................**

**YZA14...............................................................................................**

**YZB2...............................................................................................**

**YZB3...............................................................................................**

**YZB5...............................................................................................**

**YZB8...................................... G........................................................**

**YZB9...............................................................................................**

**YZB10....................... C.......................................................................**

**YZB13...............................................................................................**

**YZB17...................................... G........................................................**

**YZB18...............................................................................................**

**YZB19....................... C.......................................................................**

510 520 530 540 550 560 570 580 590

.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |

**YSA3** **TAATACTACCTGGATTTGGTATGATCTCTCACGTTATAGCACATTATAGAGGTAAGCAAGAACCCTTCGGTTATTTAGGTATGGTGTATGCCATG YSA5...............................................................................................**

**YSA7...............................................................................................**

**YSA8...............................................................................................**

**YSA9...............................................................................................**

**YSA11........................................... C...................................................**

**YSA12...............................................................................................**

**YSA14...............................................................................................**

**YSB2...............................................................................................**

**YSB4...............................................................................................**

**YSB5............................ C.............. C...................................................**

**YSB6...............................................................................................**

**YSB7........................................... C...................................................**

**YSB10...............................................................................................**

**YSB12...............................................................................................**

**YSB13...............................................................................................**

**YSB15...............................................................................................**

**YZA1...............................................................................................**

**YZA2...............................................................................................**

**YZA4...............................................................................................**

**YZA5...............................................................................................**

**YZA6...............................................................................................**

**YZA7...............................................................................................**

**YZA8...............................................................................................**

**YZA9...............................................................................................**

**YZA10...............................................................................................**

**YZA12...............................................................................................**

**YZA13...............................................................................................**

**YZA14................ C..............................................................................**

**YZB2...............................................................................................**

**YZB3...............................................................................................**

**YZB5........................................... C...................................................**

**YZB8...............................................................................................**

**YZB9...............................................................................................**

**YZB10...............................................................................................**

**YZB13...............................................................................................**

**YZB17...............................................................................................**

**YZB18...............................................................................................**

**YZB19...............................................................................................**

610 620 630 640 650

.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... |.... **YSA3 TATAGGGATACTAGGATTTCTTGTTTGGGCCCACCATATGTTTACTGTTGGTAT YSA5......................................................**

**YSA7......................................................**

**YSA8......................................................**

**YSA9......................................................**

**YSA11......................................................**

**YSA12......................................................**

**YSA14......................................................**

**YSB2......................................................**

**YSB4......................................................**

**YSB5......................................................**

**YSB6......................................................**

**YSB7......................................................**

**YSB10......................................................**

**YSB12......................................................**

**YSB13......................................................**

**YSB15......................................................**

**YZA1......................................................**

**YZA2......................................................**

**YZA4......................................................**

**YZA5......................................................**

**YZA6......................................................**

**YZA7......................................................**

**YZA8......................................................**

**YZA9......................................................**

**YZA10......................................................**

**YZA12......................................................**

**YZA13......................................................**

**YZA14......................................................**

**YZB2......................................................**

**YZB3......................................................**

**YZB5......................................................**

**YZB8......................................................**

**YZB9......................................................**

**YZB10......................................................**

**YZB13......................................................**

**YZB17......................................................**

**YZB18......................................................**

**YZB19......................................................**

图 2-8 各类群不同个体的COⅠ测序结果比对

Figure 2-8 each group of different individuals than for CO Ⅰsequencing results

表 2-6 COⅠ间的变异位点Table 2-6 CO Ⅰlocus variation between

| 个体 | 7 | 3  1 | 8  5 | 9  4 | 1  0  6 | 1  3  9 | 1  5  1 | 1  5  4 | 1  8  4 | 1  8  7 | 1  9  0 | 2  2  0 | 2  8  0 | 2  8  3 | 2  8  6 | 3  1  1 | 3  2  1 | 3  5  3 | 3  5  5 | 3  6  4 | 3  6  7 | 3  7  9 | 3  8  5 | 4  1  5 | 4  2  4 | 4  3  9 | 5  0  0 | 5  1  7 | 5  2  9 | 5  4  4 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| YSA3 | A | T | C | T | C | G | C | T | A | A | T | G | G | T | G | T | G | C | G | A | A | T | G | A | T | A | T | T | T | T |
| YSA5 | · | · | · | · | · | A | · | C | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | C | · | · | · | · | · | · | · | · |
| YSA7 | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | C | · | · | · | · | · | · | · | · |
| YSA8 | · | · | T | · | T | · | · | · | · | · | · | · | A | · | A | · | · | · | · | · | · | · | A | G | · | · | · | · | · | · |
| YSA9 | · | · | · | · | · | · | · | C | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | A | G | · | · | · | · | C | · | · | · | · | · |
| YSA11 | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | A | · | C | · | · | · | · | · | · | · | C | · | · | · | · | · | · | · | C |
| YSA12 | G | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · |  | · | · | · |
| YSA14 | · | · | T | · | T | · | · | · | · | · | · | · | A | · | A | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · |
| YSB2 | · | · | · | C | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | C | · | · | · | · | · | · | · | · |
| YSB4 | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | T | · | · | · | C | · | · | · | · | · | · | · | · |
| YSB5 | · | · | · | · | · | · | · | C | · | G | · | · | · | · | · | · | · | · | A | G | · | C | · | · | C | · | · | · | C | C |
| YSB6 | · | · | T | · | T |  | T | · | · | · | · | · | A | · | A | · | · | · | · | · | · | · | A | G | · | · | · | · | · | · |
| YSB7 | · | C | · | · | · | · | · | · | · | · | · | A | · | C | · | · | · | · | · | · | · | C | · | · | · | · | · | · | · | C |
| YSB10 | · | · | · | · | · | · | · | C | G | · | · | · | · | · | · | · | · | · | A | G | · | C | · | · | C | · | · | · | · | · |
| YSB12 | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | C | · | · | · | · | · | · | · | · |
| YSB13 | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | C | · | · | · | · | A | · | · | · |
| YSB15 | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | A | · | · | · | · | · | · | · | · | · | C | · | · | · | · | A | · | · | · |
| YZA1 | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | G | · | · | · | · |
| YZA2 | · | · | · | · | · | · | · |  | · | · | C | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | C | · | · | · | · | · | · | · | · |
| YZA4 | · | · | · | · | · | · | · | C | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | G | · | C | · | · | · | · | · | · | · | · |
| YZA5 | · | · | · | · | · | A | · | C | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | C | · | · | · | · | · | · | · | · |
| YZA6 | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | C | · | · | · | · | · | C | · | · | · | · | · | · | · | · |
| YZA7 | · | · | T | · | T | · | · | · | · | · | · | · | · | · | A | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · |
| YZA8 | · | · | · | · | · | A | · | C | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | C | · | · | · | · | · | · | · | · |
| YZA9 | · | · | · | · | · | A | · | C | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | C | · | · | · | · | · | · | · | · |
| YZA1 | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | G | · | · | · | · |
| YZA1 | G | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | A | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · |
| YZA1 | · | · | · | · | · | A | · | C | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | C | · | · | · | · | · | · | · | · |
| YZA1 | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | A | A | · | · | C | A | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | C | · | · |
| YZB2 | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | G | C | · | · | · | · | · | · | · | · |
| YZB3 | · | · | · | · | T | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | G | · | · | · | · | · | · | · | · | · |
| YZB5 | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | A | · | C | · | · | · | · | · | · | · | C | · | · | · | · | · | · | · | C |
| YZB8 | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | G | · | · | · | · |
| YZB9 | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | C | · | · | · | · | · | C | · | · | · | · | · | · | · | · |
| YZB10 | · | · | · | · | · | · | · | C | · | · | · | · | · | C | · | · | · | · | A | G | · | C | · | · | C | · | · | · | · | · |
| YZB13 | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | C | · | · | · | · | · | C | · | · | · | · | · | · | · | · |
| YZB17 | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | T | · | · | · | · | · | · | · | G | · | · | · | · |
| YZB18 | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | A | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · |
| YZB19 | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | A | · | · | C | · | · | C | · | · | · | · | · |

#### 3.6.4 分子系统树的构建

根据测序结果，由表2-6可以看出，39个个体中有32个体具有2个以上的变异位点，在构建系统树时，我们只考虑这32个个体。将32个个体的COI序列用BioEdit软件的ClusatlW程序对其进行对位排列，将核苷酸序列输入MEGA3.0，采用Kimura-Parameter距离模型，分析中加入外类群。由于我们分析的是种内群体，所以外类群我们选择了同是海参纲的其它属的海参——梅花参

（*thelenota ananas*）。系统发育分析采用距离法得到ME树、NJ树。采用最大简约法得到MP树。应用自展法（bootstrap）对所获得的树进行重抽样检验，自展重复次数定为1000次，所获得的一致树各分支的置信度也采用bootstrap法进行检验，bootstrap检验所得的各分支的支持率标在各个分支上，重复抽样次数为1000次。本文仅将MP树（图2-9）NJ树（图2-10）列出，得到的32个个体间的遗传距离的百分比见表2-7。

通过图2-9与图2-10可以看出，我们分析的养殖刺参与野生刺参并没有完全分离开，而是互相聚在一起，通过这点我们知道，分析的类群之间存在着遗传变异的现象，更主要原因亚群间的变异较小，亚群内的变异往往大于亚群间的变异，而成为变异的主要方式。也进一步说明了养殖的刺参种质的优良，与野生刺参遗传多样性相似。



图2-9 MP法构建不同个体进化树

Figure 2-9 MP phylogenetic tree was constructed different individuals



图2-10 NJ法构建不同个体进化树

Figure 2-10 NJ phylogenetic tree was constructed different individuals

表2-7 个体间遗传距离百分比

Table 2-7 Percentage of genetic distance between individuals



## **4** 讨论

### 4.1 从数据库中筛选微卫星

获取微卫星的主要方法有三种，第一种方法是从公共数据库（如Genbank、EMBL、EST数据库等）或已发表的文献中查找到微卫星位点，但只限于已发布序列数据的物种；第二种方法是种间转移扩增，即从相近的其他物种的数据库中查找微卫星位点，或使用遗传距离相近已有数据发表的物种的微卫星标记，也就是跨物种筛选；第三种方法是从基因组DNA中筛选微卫星位点，其中用于富集微卫星的方法有引物法、尼龙膜杂交法、分子标记技术法以及磁珠富集法。在上述三种方法中，最简便最省时的就是从已发表的文献或公共数据库中查找到微卫星位点。许多微卫星研究都是以公共数据库为出发点，比如从Genbank或EST以及EMBL数据库中查找微卫星位点。从这些数据库中，可以很方便地通过电子查询方式获得所需要的序列或寻找已存在的微卫星引物。研究者可以利用Clustal W等程序，对大量序列进行处理，根据相似性程度，剔除冗余的EST，再剔除过短的序列（小于100bp）和过长的序列（大于1000bp），再利用SSRHunter等软件搜索微卫星的序列的核心序列，并根据核心序列侧翼设计引物。本文中的引物直接选择Genbank和已发表文献，选择的Genbank微卫星占大多数，设计引物后扩增出条带效果良好，总设计54对引物有33对获得目的片段。

### 4.2 DNA提取探讨

动物基因组DNA提取技术的原理和操作并不是十分复杂，但是在实际工作中发现刺参DNA的提取并不容易，往往耗去大量的时间和精力；不同的组织材料，蛋白质、多糖、次生代谢物含量不同，即使是同样的组织，在其不同生长阶段，提取DNA的方法也会有所不同；比如对于乙醇固定材料来说，大多实验要求用蒸馏水置换乙醇过夜，中间换水3～4次，可以消除乙醇对所提DNA纯度以及电泳检测的影响[97]。但在本实验中发现，经这种方法处理的刺参材料反而不能提取出总DNA，而将材料从固定剂取出后，先将刺参皮肤去除，皮肤上有藻类以及微生物，再进行抽提前先用PBS缓冲液充分冲洗，所获得的总DNA效果良好[104]，有关原因有待进一步研究。

另外，本实验应用稍加改进的SDS法去除多糖效果比原有方法提取的效果好。对于含有丰富多糖的组织来说，在消化之前充分洗涤可以较充分地除去多糖，这对DNA的提取是非常必要和有利的。在经过多次对比操作实验中，发现了样品在消化时若不经过前面的处理，则经常粘连成团，即使将粘团搅散后又马上凝聚，消化时间延长很久后也难以消化。这主要是由于消化过程中刺参部分多糖分泌到细胞外，洗涤可以除去部分多糖和刺参体外杂质的影响，从而能够顺利地提取基因组DNA。

### 4.3 影响PCR扩增和聚丙烯电泳条带分析

PCR扩增受DNA模版浓度，引物浓度，Mg2+含量，循环次数，退火温度等影响。聚丙烯凝胶的条带，受到胶浓度、PCR循环次数和退火温度的影响，受到循环次数的影响尤其严重，如果循环次数过多，将导致非特异性扩增，聚丙烯酰胺凝胶电泳条带将变得非常复杂，难以辨认等位基因，

但循环次数也不宜过少，太少将会是目的片段含量很低，造成显色很淡，同样难以区分目的片段，推荐循环次数为25次左右。退火温度越高会使特异性扩增越强，推荐选取退火温度高的引物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。本文采用的大部分退火温度为60℃或更高，取得了良好的扩增图谱。

### 4.4 群体多样性分析

遗传多样是生物多样性的重要组成部分。一方面，任何一个物种都有自己独特的基因库和遗传物质，所以物种的多样性也可以显示遗传的多样性[98]。另一方面，物种是构成生物群落进而组成生态系统的基本单元，物种的多样性与生态系统的多样性息息相关，进而与物种所具有的遗传多样性息息相关。因此，遗传多样性是生态系统多样性和物种多样性的基础。

对刺参基因组DNA进行扩增筛选出的33个多态性高、稳定性强的SSR引物，均扩增出清晰可辨的条带，等位基因为3-8不等，大部分符合哈迪温伯格平衡，PIC值普遍大于0.7为高度多态性。没有发现连锁不平衡现象，说明分析本实验所得到的遗传相似系数较大，证明了所选的四个群体之间的遗传物质差别不大，仍然隶属于同一地理群体。

从对四个地理亚群中32个具有多态位点的个体构建的系统树来看，并没有一个地理亚群的所有个体完全聚在一起的现象，这种现象在MP方法所构建的系统树中尤其明显。可是从NJ法所构建的系统树中可以看出，虽然有个别的个体与其他的地理亚群聚在了一起，但是总体上看来，这四个亚群被分为多支，可能与采样的地点有关，这种现象可能是由于地理的隔离与变异共同造成的。人工养殖的刺参经过多年的繁衍后，可能会减少基因流的产生而发生变异，使得四个群体产生了不同分支。有些个体与其他地理亚群聚在一起，说明了各地理亚群内的个体间存在着差异，群体内的遗传多样性较高。两种标记共同得出的结论是养殖群体的遗传多样性像自然群体一样，并没有退化。从两种方法分析的四个亚群间的遗传多样性来看，在大连海域内，两个养殖群体与两个自然群体的刺参，具有较高的遗传多样性，在亚群间具有较大的相似性。在养殖群体间已产生了遗传分化，但是分化较小。

### 4.5 种质资源分析

瓶颈效应、遗传漂变和近交是影响海洋生物种群内遗传多样性的三个重要的因素。此外，人类活动也会对生物的遗传多样性产生一定的影响。瓶颈效应，当环境发生灾害性剧变时，生物大量死亡，群体数目急剧减少。瓶颈效应发生时，相当程度改变了群体的等位基因频率，尤其是对特殊的等位基因丧失的危险性更大。遗传漂变，基因频率在小的群体里随机增减的现象。在这种情况下，可能会由于具有某个特别基因的个体没有交配或者偶然死亡，而使这种基因在种群内消失。一般来说，种群越小遗传漂变就越显著。近交是指近亲间的交配率多余随机交配。近交个体间比远亲个体之间在遗传上更相似。近亲会增加群体中纯合子的频率，而降低了杂合子的频率。尤其当群体很小的时候，近交率大大地提高了，这将在很大程度上减少群体的遗传变异，使资源的遗传多样性水平下降。同时，劣质有害基因纯合化后会造成近交衰退。人类活动影响海洋生物栖息地，使其生活环境发生了变化，产生瓶颈效应、遗传漂变和近交衰退，相当程度地改变了群体等位基因频率，使群体的遗传多样性降低。

刺参在我国是黄海、渤海区特有的经济和濒危物种。大量的开采和人工养殖对自然资源造成了较大的破坏，使原种遗传多样性加速下降。目前，养殖业大规模地进行苗种培育，并且将人工培育的幼苗投入到固定海区进行天然养殖，这势必会造成与自然群体间的基因流的发生，从而改变原种的基因。因此，保护仿刺参的遗传多样性迫在眉睫。要维持种内遗传多样性水平，维持物种和种群的自然繁殖能力，提高刺参的生存能力，以保证种质资源的持续利用。本研究验证了养殖群体和自然群体的遗传多样性，证明了四个群体有高度多样性。

目前，养殖的刺参具有产量低、皮薄、生长速度缓慢等弊端。对于养殖的刺参，要进行遗传改良，与优良的品种进行杂交，提高杂交率。另外，减少养殖周期，从而改善刺参的性状特征、提高其生长速度、抗逆性和成活率等。

## 5 结论

本研究以刺参养殖群体与野生群体为研究对象，采用SSR和CO I分子标记技术，进行群体遗传多样性的研究，并对微卫星引物获取方法和刺参DNA的提取方法进行了探讨，以及对SSR-PCR和CO I-PCR的反应体系进行了优化。主要结论如下：一、由于棘皮动物门的生理特性，刺参组织含有丰富多糖和极易产生自溶的现象，这给刺参提取DNA带来了极大的困难。为了减少DNA的降解，首先PBS处理样品后，提取步骤中缩短氯仿和酚的抽提时间然后重复氯仿抽提次数，并加入异戊醇消泡，为了更好地除去仿刺参体内大量的蛋白质，我们将裂解液中EDTA的浓度提高了100倍，为100mM。二、对大连海域自然群体的SSR分析中，从58对引物中筛选出33个多态性好的引物，目的片段大小为67-306 bp之间；每个引物检测出等位基因数3-8不等，有效等位基因平均为4.736个。期望杂合度Ho和观测杂合度He分别为0.270-0.8446和0.598-0.875.23对引物符合哈迪温伯格平衡，大连海域自然群体的多态信息含量平均数为0.732。所有的33对引物都表现出高度多态性，这表明现有自然群体具有很大潜力，一个物种的遗传多样性高低与其适应能力、生存能力和进化潜力密切相关，由于仿刺参巨大的繁殖力，人工繁育过程中总是采取较小数量的亲本，这将造成建群者效应(Founder effect)从而引起仿刺参遗传多样性下降。所以我们有必要对养殖群体遗传多样性进行评估。三、用CO I序列对刺参养殖与野生群体的遗传多样性比较分析。经过测序、比对和对位排列后序列有654 bp，在39个个体中有25个个体具有变异位点，变异位点数为30个，在30个变异位点中有29个转换位点，1个颠换位点，没有发现转换与颠换同时存在的位点。根据Kuma：遗传距离构建了NJ和MP系统树。并不是每个个体都按照地理位置或者养殖与自然的关系聚在一起，我们可以得到结论，即对于个别个体与其它地理位置的群体聚在一起的现象，这表明了不仅在地理亚群间存在遗传差异，而且在地理亚群内也同样存在遗传差异性。在SSR论证了养殖群体拥有自然群体同样的遗传效应，说明了采样的养殖群体具有优良的种质。

# 第三章 SSR方法鉴别刺参种类

利用第二章获得的条带清晰的等位基因相对比较少的微卫星标记，探讨能否利用5％的琼脂糖对野生群体和养殖群体进行种类鉴定。如果能找到特异性好的微卫星标记位点，将会为刺参的鉴定提供方便快速的方法。这对物种鉴定分类有重大意义。

## **1** 实验材料

实验材料为第二章进行遗传多样性分析的野生群体37个体，和养殖群体57个体。70％乙醇固定避光保存于-20℃冰箱。

## **2** 实验方法

### 2.1 PCR扩增

PCR反应条件：

|  |  |
| --- | --- |
| 94℃ | 5 min（预变性） |
| 94℃ | 15 s （变性） |
| 50-62℃ | 15 s （退火） 35 循环 |
| 72℃ | 15 s （延伸） |
| 72℃ | 7 min （延伸） |
| 4℃ | 保存 |

PCR反应体系20l：

|  |  |
| --- | --- |
| 10×PCR buffer （Mg2+ Plus） | 2.5 l |
| dNTP | 2 l |
| 上下游引物（ 10 M ） | 各 1 l |
| DNA 模板 | 1l |
| TaqE（5 U/μl） | 0.2 l |
| ddH2O | 13.3l |
|  | 共 20l |

### 2.2 PCR产物的检测

PCR产物首先经过1％琼脂糖凝胶检测，确定扩增片段为所需扩增的目的片段，并确保每个个体有良好的扩增。然后经过5％琼脂糖凝胶电泳1个小时再次检测扩增结果，观察不同个体的条带图。

### 2.3 结果的整理

观测野生群体和养殖群体的条带区别。筛选条带大小相对单一的引物，可用于进一步鉴别的相关研究。

## **3** 结果与分析

3.1高浓度琼脂糖检测结果

1、2、3、4点样孔为YZA；5、6、7、8点样孔为YZB；9、10、11、12点样孔为YSA；13、

14、15、16、17点样孔为YSB。经PCR产物电泳鉴定，在同一种属的养殖与野生群体之间很难找到差异交大的位点，经过高浓度琼脂糖凝胶分离后，条带单一的引物只有WS14、WS16、WF45、WF16四个位点（如图3-1）；其余全部引物为多条带，部分电泳结果见图3-2。实验结果表明，用SSR的方法在大连海域的养殖与野生刺参之间无法鉴别，但是我们可以筛选出条带单一的位点，例如WS14、

WS16、WF45、WF16条带单一的四个位点。这对进一步鉴定其他地域的刺参品种（比如青岛海域刺参）打下基础，如果找到对于两个地域刺参扩增条带差异大的位点，对刺参种类的快速鉴定具有重大意义。



图3-1 筛选单一条带电泳图

Figure 3-1 Screening single band electrophoresis



图 3-2 多条带引物电泳图

Figure 3-2 Part of the multi-band electrophoresis

## **4** 结论

高浓度的琼脂糖具有更高的分辨率，也有着制作简单，出结果时间快，省工省力等优点，制作高浓度琼脂糖时候对电泳槽要求很高，因为倒胶要在沸腾后立即完成，如果冷却至55℃，琼脂糖凝胶将黏在瓶子中无法倒出，另外制作高浓度琼脂糖不能用EB显色，因为EB的在高温度下很容易挥发，高温度倒胶会使EB染色效果很不好，而且EB毒性很大。可以用无毒的Goldview代替EB，但其萤光基团在紫外下很容易淬灭，应及时观察记录结果。

对于近缘刺参的种类鉴定一直都是一个难提，为了寻求更简便快速的方法，遗憾的是本文中做的尝试没有成功鉴别出，但是我们找到了大连海域刺参SSR标记等位基因很少的4个位点。特异性片段变化范围越小越有利于下一步鉴定，我们可以通过该位点对两个不同地域刺参扩增目的片段变化范围不同来鉴别种属。本文中筛选出的四对条带单一的引物对后续的进一步种类鉴定打下基础。99

参考文献

[1] 樊绘曾. 海参: 海中人参——关于海参及其成分保健医疗功能的研究与开发[J]. 中国海洋药物, 2001, 4(82): 37-44.

[2] 沈鸣. 海参的化学成分和药理研究进展[J]. 中成药, 2001, 23(10): 758-761.

[3] 常亚青, 隋锡林, 李俊. 刺参增养殖业现状, 存在问题与展望[J]. 水产科学, 2006, 25(4): 198-201.

[4] 黄华伟, 王印庚. 海参养殖的现状, 存在问题与前景展望[J]. 中国水产, 2007 (10): 50-53. [5] Chen J X. Brief introduction to mariculture of five selected species in China[J]. UNDP/FAO RegionalSeafarming Development and Demonstration Project. National Inland Fisheries Institute Kasetsart University Campis, Bangkok, Thailand, 1990, 16.

[6] 李万滋. 八珍之一——刺参[J]. 河北渔业, 1993, 1: 021. [7] 李丹彤, 常亚青, 陈炜, 等. 獐子岛野生刺参体壁营养成分的分析[J]. 大连水产学院学报, 2006, 21(3): 278-282.

[8] 苏秀榕, 娄永江, 常亚青, 等. 海参的营养成分及海参多糖的抗肿瘤活性的研究[J]. 营养学报, 2003, 25(2): 181-182.

[9] 张春云, 王印庚, 荣小军, 等. 国内外海参自然资源, 养殖状况及存在问题[J]. 海洋水产研究, 2004, 25(3): 89-97.

[10] 王秀利, 单雪, 仇雪梅, 等. 海参微卫星DNA的多态性[J]. 生物技术通报, 2006 (06): 118-121.

[11] Zhan A, Bao Z, Lu W, et al. Development and characterization of 45 novel microsatellite markers for sea cucumber (Apostichopus japonicus)[J]. Molecular ecology notes, 2007, 7(6): 1345-1348.

[12] 张国范, 张福绥. 贝类遗传多样性及其永续利用(I)[J]. 海洋科学, 1993, 5: 17-21.

[13] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. American journal of human genetics, 1980, 32(3): 314. [14] Dodgson J B, Cheng H H, Okimoto R. DNA marker technology: a revolution in animal genetics[J]. Poultry science, 1997, 76(8): 1108-1114.

[15] 肖武汉, 张亚平. 鱼类线粒体DNA的遗传与进化[J]. 水生生物学报, 2000, 24(4): 384-391.

[16] 吴清江, 桂建芳. 鱼类遗传育种工程[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.46-70. [17] Fajardo V, Gonzalez I, Lopez-Calleja I. et al. Identification of meats from reddeer(Cervuselaphus), fallowdeer(Dama dama), and roedeer(Capreoluscapreolus) using polymerase chain reaction targeting specific sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene[J]. Meat Science, 2007, 76: 234-240.

[18] Zhang J B, Huang H, Cai Z P, etal. Species identification in salted products of red snappers by seminested PCR-RFLP based on the mitochondria 12S rRNA gene sequence[J]. Food Control, 2007, 18: 1331-1336.

[19] 曹萤, 夏德全. 尼罗非鲫和奥利亚非鲫线粒体DNA遗传差异的研究[J]. 水产学报, 1997, 21(4): 360-364.

[20] Partis L, Wells R J. Identification of fish species using random amplified polymorphic DNA (RAPD)[J]. Molecular and cellular probes, 1996, 10(6): 435-441.

[21] Klinbunga S, Ampayup P, Tassanakajon A, et al. Development of species-specific markers of the tropical oyster (Crassostrea belcheri) in Thailand[J]. Marine biotechnology, 2000, 2(5): 476-484.

[22] Crossland S, Coates D, Grahame J, et al. Use of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in separating two sibling species of-Littorina[J]. MARINE ECOLOGY-PROGRESS SERIES, 1993, 96: 301-301.

[23] Tassanakajon A, Pongsomboon S, Jarayabhand P, et al. Genetic structure in wild populations of black tiger shrimp (Penaeus monodon) using randomly amplified polymorphic DNA analysis[J]. Journal of marine biotechnology, 1998, 6: 249-254.

[24] Van Oppen M J H, Klerk H, Olsen J L, et al. Hidden diversity in marine algae: some examples of genetic variation below the species level[J]. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 1996, 76(01): 239-242.

[25] Bagley M J, Anderson S L, May B. Choice of methodology for assessing genetic impacts of environmental stressors: polymorphism and reproducibility of RAPD and AFLP fingerprints[J]. Ecotoxicology, 2001, 10(4): 239-244.

[26] Wolfus G M, Garcia D K, Alcivar-Warren A. Application of the microsatellite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs[J]. Aquaculture, 1997, 152(1): 35-47.

[27] Hirschfeld B M, Dhar A K, Rask K, et al. Genetic diversity in the eastern oyster (Crassostrea virginica) from Massachusetts using the RAPD technique[J]. Journal of shellfish research, 1999, 18(1): 121-126.

[28] Yue G, Li Y, Chen F, et al. Comparison of three DNA marker systems for assessing genetic diversity in Asian arowana (Scleropages formosus)[J]. Electrophoresis, 2002, 23(7‐8): 1025-1032.

[29] Wirgin, I. I., & Waldman, J. R. (1994). What DNA can do for you. *Fisheries*, *19*(7), 16-27.

[30] Dinesh K R, Chan W K, Lim T M, et al. RAPD markers in fishes: an evaluation of resolution and reproducibility[J]. Asia-Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol, 1995, 3: 112-118.

[31] 林斌彬, 张子平, 王艺磊, 等. AFLP 技术发展及其在水产生物学研究中的应用[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2008, 13(1): 45-51.

[32] 张辛, 许璞, 许广平, 等. 中国东海日本鳗鲡种群遗传结构的AFLP分析[J]. 水生态学杂志, 2010, 3(1): 82-86.

[33] 张丽艳, 苏永全, 丁少雄, 等. 福建近海蓝圆鲹种群遗传多样性的AFLP 分析[J]. 水产学报, 2010, 34(5): 680-687.

[34] 王伟继, 岳志芹, 孔杰, 等. AFLP分子标记技术的发展及其在海洋生物中的应用[J]. 海洋水产研究, 2005, 26 (1): 82-87.

[35] 彭志兰, 柳敏海, 傅荣兵, 等. 舟ft鮸鱼群体遗传多样性的AFLP研究[J]. 上海水产大学学报, 2010, 19(2): 172-177.

[36] 邵艳卿, 陆荣茂, 董迎辉. 三种蛏的遗传多样性分析[J]. 海洋科学, 2009, 33(10): 26-30.

[37] Young W P, Ostberg C O, Keim P, et al. Genetic characterization of hybridization and introgressionbetween anadromous rainbow trout (Oncorhynchus mykiss irideus) and coastal cutthroat trout (O. clarki clarki)[J]. Molecular Ecology, 2001, 10(4): 921-930.

[3838] Young W P, Wheeler P A, Fields R D, et al. DNA fingerprinting confirms isogenicity of androgenetically derived rainbow trout lines[J]. The Journal of heredity, 1995, 87(1): 77-80.

[39] Young W P, Wheeler P A, Coryell V H, et al. A detailed linkage map of rainbow trout produced using doubled haploids[J]. Genetics, 1998, 148(2): 839-850.

[40] Felip A, Martníez -Rodrgíuez G, Piferrer F, et al. AFLP analysis confirms exclusive maternal genomic contribution of meiogynogenetic sea bass (Dicentrarchus labrax L. )[J]. Marine Biotechnology, 2000, 2(3): 301-306.

[41] Lander E S, Linton L M, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome[J]. Nature, 2001, 409(6822): 860-921.

[42] 杨昭庆, 洪坤学等. 单核苷酸多态性的研究进展[J]. 国外遗传学分册, 2000, 23(1): 4-8.

[43] HalushkaM K, Fan J B, Bentley K, et al. Patternsof single nucleotide polymorphism s in candidate genesfor blood -pressure homeostasis [J]. Nat. Genet., 1999, 22: 239-247.

[44] CargillM K, A ltshulerD, Ireland J, et al. Characterization of single-nucleotide polymorphism s in coding region of human genes. [J]. Nat Genet, 1999, 21: 231-239.

[45] 刘福平, 白俊杰, 2008. 单核苷酸多态性及其在水产动物遗传育种中的应用. 中国水产科学, 15(4): 704—712.

[46] 杨仑, 沈文飚, 陈虹等, 2004. 基于生物信息学的水稻候选SNP的发掘. 中国水稻科学, 18(3): 185—191.

[47] 陈炜, 张戈, 张思仲, 2001. 基于生物信息学的候选位点搜寻方法.遗传, 23(2): 153—156

[48] 李延恩, 周艳红, 2007. SNP功能分析的生物信息学方法及其资源. 计算机仿真, 24(4): 297—300

[49] HeC, ChenL, SimmonsMetal, 2003. PutativeSNPdiscovery ininterspecifichybridsof catfishbycomparativeEST analysis. Anim Genet, 34: 445—448

[50] 刘万清, 贺林. SNP-为人类基因组描绘新的蓝图[J].遗传, 1998, 20(6): 38-40.

[51] 黄淑浈, 等. 以PAH基因第399密码子A→T顺序多态性为遗传标记产前诊断苯丙酮尿症[J]. 中华医学杂志, 1990, 70(3): 170-172.

[52] Kruglyak L. The use of a genetic map of bialleicmarkers in linkage studies[J]. Nat. Genet., 1997, 17: 21-24.

[53] 许丽, 李玥莹, 林凤. DNA分子标记及其在作物遗传育种中的应用[J]. 沈阳师范大学学报: 自然科学版, 2006, 24(4): 466-469.

[54] Tautz D. Hypervariabflity of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers[J]. Nucleic acids research, 1989, 17(16): 6463-6471.

[55] Litt M, Luty J A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene[J]. American journal of human genetics, 1989, 44(3): 397. [56] Wright J M. DNA fingerprinting of fishes[J]. Biochemistry and molecular biology of fishes, 1993, 2: 57-91.

[57] Liu Z, Li P, Kocabas A, et al. Microsatellite-containing genes from the channel catfish brain: evidence of trinucleotide repeat expansion in the coding region of nucleotide excision repair gene RAD23B[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2001, 289(2): 317-324.

[58] Karsi A, Patterson A, Feng J, et al. Translational machinery of channel catfish: I. A transcriptomic approach to the analysis of 32 40S ribosomal protein genes and their expression[J]. Gene, 2002, 291(1): 177-186.

[59] Weber J L, Wong C. Mutation of human short tandem repeats[J]. Human molecular genetics, 1993, 2(8): 1123-1128.

[60] Crawford A M, Cuthbertson R P. Mutations in sheep microsatellites[J]. Genome Research, 1996, 6(9): 876-879.

[61] Levinson, G., Gutman, G. A., 1987. High frequency of short frameshifts in poly-CA/GT tandem repeats borne by bacteriophage M13 in Escherichia coli K-12.0Nucleic Acids Res. 15, 5323–5338.

[62] Estoup, A., Cornuet, J., 1999. Microsatellite evolution: inferences from population data. In: Goldstein, D. B., Schlotterer, C. (Ed.), Microsatellites: Evolution and Applications. Oxford Univ. Press, New York, pp. 49–65.

[63]] Balloux F, Lugon‐Moulin N. The estimation of population differentiation with microsatellitemarkers[J]. Molecular Ecology, 2002, 11(2): 155-165.

[64] Ostrander E A, Jong P M, Rine J, et al. Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992, 89(8): 3419-3423.

[65] Kijas J M, Fowler J C, Garbett C A, et al. Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles[J]. Biotechniques, 1994, 16(4): 656-60, 662.

[66] O'Connell M, Wright J M. Microsatellite DNA in fishes[J]. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 1997, 7(3): 331-363.

[67] Brown W M. The mitochondrial genome of animals[J]. Molecular evolutionary genetics, 1985: 95-130. [68] Wilson A C, Cann R L, Carr S M, et al. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionarygenetics[J]. Biological Journal of the Linnean Society, 1985, 26(4): 375-400.

[69] Birky C W, Fuerst P, Maruyama T. Organelle gene diversity under migration, mutation, and drift: equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes[J]. Genetics, 1989, 121(3): 613-627.

[70] Flynn J J, Nedbal M A. Phylogeny of the Carnivora (Mammalia): congruence vs incompatibility amongmultiple data sets[J]. Molecular phylogenetics and evolution, 1998, 9(3): 414-426.

[71] Tautz D, Hancock J M, Webb D A, et al. Complete sequences of the rRNA genes of Drosophila melanogaster[J]. Molecular Biology and Evolution, 1988, 5(4): 366-376.

[72] Saavedra C, Pelta J B． Phylogenetic relationships of commereial European and Australasian kingscallops(pecten spp.) based on partial 16S ribosomal RNA gene sequences[J]． Aquaculture, 2004.235: 153—166．

[73] 陶翠花. (2009). 威海仿刺参野生种群遗传多样性分析(Master's thesis, ft东大学).

[74] Boulding E G. Genetic variation in bottlenecked and two wild population of the Japanese scallop (patinopecten yesspensis): empirial parameter estimates from coding regions of mitochondrial DNA. Candian *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1993, 50: 1147-1157.

[75] 郭凤娟阳建春胡诗佳李咏施. 利用DNA条形码技术鉴定一批鳄鱼产品. 生物技术通报[J]. 2013, 8: 99-104.

[76] Avise J C, Helfman G S, Saunders N C, et al. Mitochondrial DNA differentiation in North Atlantic eels: population genetic consequences of an unusual life history pattern[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1986, 83(12): 4350-4354.

[7777] Graves J E, McDowell J R, Jones M L. A GENETIC-ANALYSIS OF WEAKFISH CYNOSCION-REGALIS STOCK STRUCTURE ALONG THE MID-ATLANTIC COAST[J]. Fishery bulletin, 1992, 90(3): 469-475.

[78] Gold J R, Richardson L R, Furman C, et al. Mitochondrial DNA differentiation and population structure in red drum (Sciaenops ocellatus) from the Gulf of Mexico and Atlantic Ocean[J]. Marine biology, 1993, 116(2): 175-185.

[7979] Chow S, Kishino H. Phylogenetic relationships between tuna species of the genus Thunnus (Scombridae: Teleostei): inconsistent implications from morphology, nuclear and mitochondrial genomes[J]. Journal of Molecular Evolution, 1995, 41(6): 741-748.

[80] Heist, E. J., Gold, J. R., 1999. Microsatellite DNA variation in sandbar sharks (*Carcharhinus plumbeus*) from theGulf of Mexico and mid-Atlantic bight. Copeia 1, 182–186.

[81] Benzie J A H, Ballment E, Forbes A T, et al. Mitochondrial DNA variation in Indo‐Pacific populationsof the giant tiger prawn, Penaeus monodon[J]. Molecular Ecology, 2002, 11(12): 2553-2569.

[8282] Cronin M A, Spearman W J, Wilmot R L, et al. Mitochondrial DNA variation in chinook (Oncorhynchus tshawytscha) and chum salmon (O. keta) detected by restriction enzyme analysis of polymerase chain reaction (PCR) products[J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1993, 50(4): 708-715.

[83] 鲁再丰, 蒋国红, 白素英. 亚洲黑熊CO Ⅰ序列变异及其DNA条码的应用[J]. 东北林业大学学报, 2010, 38(10): 79-81.

[84] 张迪, 雷光春, 龚成, 王忠锁. 基于CO Ⅰ基因序列的太湖新银鱼遗传多样性[J]. 湖泊科学, 2012, 24（2）: 299-306.

[85] 李莉好, 喻达辉, 黄桂菊. 三种海豚线粒体CO Ⅰ基因的序列分析[J]. 动物学杂志, 2007, 42(3）: 20-27.

[86] 陈丽梅, 李琪, 李赟. 4种海参16s rRNA和co1基因片段序列比较及系统学研究, 中国水产科学[J], 2008, 15(6): 935-942.

[87] 柳淑芳, 陈亮亮, 戴芳群, 庄志猛. 基于线粒体co1基因的DNA条形码在石首鱼科（Scianidae）鱼类系统分类中的应用, 海洋与湖沼[J], 2010, 2(41): 223-232.

[88] 王秉和, 李文波, 李玉珍, 等. 世界海参渔业[J]. 齐鲁渔业, 1998, 15(4): 45-46.

[89] 高悦勉, 孙静波. 刺参种群同工酶的生化遗传分析[J]. 大连水产学院学报, 2004, 19(1): 30-34.

[90] 鄢婧婧. 仿刺参(*Apostichopus japonicus*) 分子标记开发及应用[D]. 中国海洋大学, 2013.

[91] Liao M, Wang Y, Rong X, et al. Development of new microsatellite DNA markers from Apostichopus japonicus and their cross-species application in Parastichopus parvimensis and Pathallus mollis[J]. International journal of molecular sciences, 2011, 12(9): 5862-5870.

[92] 许绍斌, 陶玉芬, 杨昭庆, 等. 简单快速的DNA银染和胶保存方法[J]. 遗传, 2002, 24(3): 335-336.

[93] Arndt A, Marquez C, Lambert P, et al. Molecular phylogeny of eastern Pacific sea cucumbers(Echinodermata: Holothuroidea) based on mitochondrial DNA sequence[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 1996, 6(3): 425-437.

[94] 吕宝忠, 钟扬, 高莉萍. 分子进化与系统发育[J]. 2002.

[95] 常林瑞, 李莉, 孙振兴, 等. 刺参DNA提取方法的探讨[J]. 江苏农业科学, 2006 (5): 119-121.

[96] Spielman R S, McGinnis R E, Ewens W J. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM)[J]. American journal of human genetics, 1993, 52(3): 506.

[97] 刘保忠, 宋林生, 相建海. 海湾扇贝样品不同保存条件下DNA 的提取及RAPD 扩增比较[J]. 海洋科学, 2001, 25(3): 51-53.

[98] 施立明. 遗传多样性及其保存[J]. 生物科学信息, 1990, 2(4): 158-164.

攻读硕士学位期间发表的学术论文

王祖哲，王利，顾晨雷，马普， 王秀利. 从固定液保存的刺参样品中提取基因组DNA 的改进方法[J]. 河北渔业, 2014（8）。 （已接收）

**独创性说明**

作者郑重声明：本硕士论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包括其他人已经发表或撰写的研究成果，也不包含为获得大连海洋大学或其他单位的学位或证书所使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的贡献均已在论文中做了明确的说明并表示了谢意。

作者签名：年月日

致 谢

光阴似箭，日月如梭，三年的学习时光一晃即逝。在论文即将交梓之际，不禁回想起曾在学习和生活中给过我许多帮助和支持的良师益友，正是他们陪伴我走过了这段终身难忘的风雨岁月。

首先特别感谢我的导师王秀利教授，他严肃的科学态度，严谨的治学精神，精益求精的工作作风，深深地感染和激励着我。王老师不仅在学业上给我以精心指导，同时还在思想、生活上给我以无微不至的关怀，在此谨向王老师致以诚挚的谢意和崇高的敬意。他的为人师表、人格魅力将继续引航和鞭策着我的人生前程！

感谢实验室的仇雪梅教授和刘洋副教授在学习和生活中给予的关心和帮助！

感谢常亚青院长及大连海洋大学北方农业部海水增养殖重点实验室的老师和同学们，他们在实验材料等方面上给了极大的帮助。

感谢同届的孙赛红、王玉芳、王洪迪、陈亚东、徐进、陈孝红、王利。感谢我的师兄（姐），师弟（妹）。这个友爱互助的大家庭是我学习和生活的坚强后盾！

最后感谢多年来一直给我无限关爱和支持的父亲、母亲及姐姐！谢谢大家！

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者和指导教师完全了解大连海洋大学有关保留、使用学位论文的规定：即学校有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的纸质版和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人同意大连海洋大学可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索、交流。

学位论文作者签名：导师签名：

签字日期：签字日期：