

鳙小卫星 DNA 的克隆

简纪常 夏德全

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 无锡 214081)

摘要 鳙基因组 DNA 经内切酶 *Sau3A I* 完全酶切后, 与 *BamH I* - pUC18 质粒连接, 转化 DH5 α 后, 获得 933 个重组体。用人源小卫星探针 33.15 对重组体进行原位杂交筛选, 获得 14 个阳性克隆, 取其中的 1 个阳性克隆(即小卫星 pBC174)作探针, 与 5 尾鳙和 4 尾鲢基因组 DNA 杂交, 能产生具有高度变异性的、个体特异性的 DNA 指纹图, 表明克隆的鳙小卫星 pBC174 可用于鱼类 DNA 指纹分析。

关键词 鳙, 小卫星 DNA, 克隆

Jeffreys^[1]首次用人源小卫星 33.6、33.15 作探针对人进行 DNA 指纹分析, 发现 DNA 指纹图具有高度变异性、多位点性及简单而稳定的遗传性, 因而被广泛应用于动植物遗传学研究上。DNA 指纹分析所用探针主要是小卫星和微卫星, 不同的探针所产生的 DNA 指纹图谱不尽相同, 且获得的信息可以累加, 故用 DNA 指纹图定位某些性状位点时, 通常需要较多的探针。目前已经在人及畜禽等中克隆了许多小卫星 DNA, 但鱼类在这方面的研究相对薄弱, 仅见已从卢特拉美洲鱈^[2]、鲤^[3]、罗非鱼^[4~7]、几种鲢科鱼^[8~10]、绿鳕^[11]等鱼类基因组中克隆了小卫星 DNA, 并初步应用于鱼类的群体结构、种系发育等研究中。国内仅见方盛国等^[12]利用人工合成 45bp 的寡核苷酸单链作探针, 分析了草鱼、鲤、鲢和鳙的 DNA 指纹图谱。在克隆鱼类小卫星 DNA 的研究上尚未见报道, 本文选择取材方便、种质纯的鳙作为实验材料, 从鳙基因组中克隆小卫星 DNA, 旨在促进我国水产界将其应用于鱼类遗传育种、种群遗传结构、种内分化等研究中, 填补国内在鱼类小卫星克隆上的空白。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期: 1998-04-02

从淡水渔业研究中心养殖场随机取 3 尾鳙(1996 年引自江苏省邗县长江水系四大家鱼国家原种场), 500~1000 g/尾, 尾静脉采血, 从血细胞中抽提 DNA, 将 DNA 样品混匀, 以作克隆小卫星用。另取 5 尾鳙和 4 尾鲢制备 DNA 样品作 DNA 指纹分析用。

1.2 酶切和连接

将 15 μ g 核 DNA 与 15U 的限制性内切酶 *Sau3A I* (美国 BioLabs 产品)混匀, 在 37 $^{\circ}$ C 下酶切 5 h。取完全酶切的 DNA 10 μ l 与 1.0 μ l *BamH I* - pUC18 混匀, 在 16 $^{\circ}$ C 下连接 18 h, 反应体积 20 μ l。

1.3 转化与筛选

将重组质粒转化入 DH5 α 大肠杆菌, 铺 LB 琼脂板, 经 Amp 和 X-gal 等筛选, 挑取白色菌落于主副平板上。

1.4 探针标记

用 DIG 标记人源小卫星 33.15(英国 Jeffreys 教授惠赠)作探针, 进行原位杂交筛选鳙小卫星。

1.5 用克隆的鳙小卫星 DNA 进行鳙和鲢的 DNA 指纹分析

鳙、鲢 DNA 各 10 μ g, 经 20U 的限制性内切酶 *HaeIII* 完全酶切后, 0.9% 琼脂糖电泳 34 h 后, 进行碱性 Southern 转印, 杂交和检测步骤按产品说明书(德国宝灵曼公司产品)进行。

2 结果

2.1 完全酶切的鳙基因组 DNA 片段与 pUC18 连接

鳙基因组 DNA 经内切酶 *Sau3A I* 完全酶切后, 与去磷酸化的 *BamH I* - pUC18 连接, 经 Amp 和 X-gal 筛选, 共获得 933 个重组体(见图 1)。

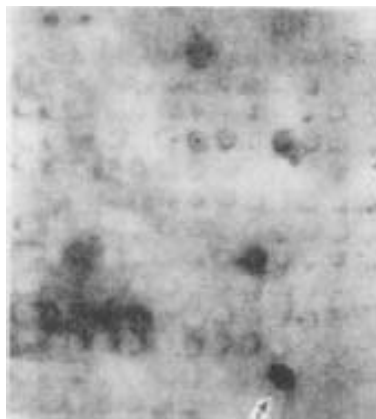


图 1 对 933 个重组体的鉴定图谱(箭头所示为阳性克隆)
Fig.1 In situ hybridization of 933 recombinants with human satellite 33.15 (Arrow indicates the positive clone)

2.2 含小卫星 DNA 的重组体的鉴定

用人源小卫星 33.15 作探针对 933 个重组体进行原位杂交筛选, 获得 14 个阳性克隆(图 1 上为 9 个阳性克隆), 阳性克隆的编号为 pBC174、209、533、583、591、673、773、804、805、806、807、826、832、877 (阿拉伯数为细菌菌落的序号), 阳性率为 1.5%。

2.3 克隆的小卫星对鳙、鲢进行 DNA 指纹分析

从 14 个阳性克隆中随机选取 pBC174 作探针, 与经 *Hae III* 酶切的 5 尾鳙和 4 尾鲢的基因组 DNA 进行 Southern 杂交, 检测出鳙平均为 10.4 条大于 4.0kb 的 DNA 条带, 鲢平均为 5 条, 且鳙的 DNA 条带的平均相似系数为 0.1173 ± 0.0780 (图 2)。

3 讨论

由于小卫星位点上的等位基因的长度差异较大, 为确保所克隆的小卫星位点更具有代表性, 故采用将 3 尾鳙的核 DNA 混合样品进行酶切。将完全酶切的 DNA 片段重组入 pUC18 中, 经 Amp 和 X-gal 筛选, 挑选白色菌落, 共获得 933 个重组体。

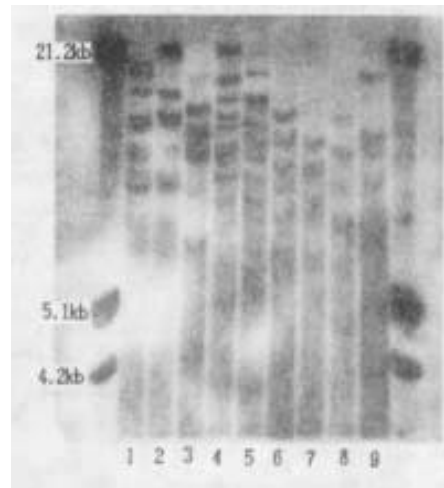


图 2 鳙小卫星 DNA pBC174 探针产生的鳙和鲢 DNA 指纹
Fig.2 Pattern of DNA fingerprints of bighead carps and silver carps by pBC174 (1~5, lanes, bighead carps; 6~9 lanes, silver carps)

Harris 等^[6]用人源小卫星 33.6、33.15 的混合探针从罗非鱼基因文库中筛选到大量的含小卫星位点的重组体, 但不能确定哪一种探针在筛选鱼类小卫星时更为有效。为了保证本研究顺利进行, 我们首先用鱼基因组 DNA 与这 2 种探针进行斑点杂交预试验, 发现探针 33.15 产生的结果较好, 而 33.6 的结果不太理想, 因此选用 33.15 作探针对 933 个重组体进行小卫星 DNA 的筛选, 共获得了 14 个阳性克隆, 阳性检出率较高。Wong 等^[1]在约 2000 个含人类基因组 5~15 kb 的 *Sau3A I* 完全酶切片段的克隆中筛选出 5 个阳性克隆, 明显低于我们的阳性检出率, 这可能是因为在鱼类基因组中含有更多的小卫星位点。

为了弄清克隆的鳙小卫星能否产生高变异的 DNA 指纹图, 我们从阳性克隆中随机选出 pBC174 小卫星作探针, 与经 *Hae III* 酶切的 5 尾鳙和 4 尾鲢的基因组 DNA 进行 Southern 杂交, 结果见图 2。从图 2 上可看出, 这个小卫星能产生许多与之杂交的 DNA 条带, 并且鳙和鲢的 DNA 指纹图谱具有高度变异性和个体特异性。且鳙的 DNA 条带平均相似系数为 0.1173 ± 0.0780 , 可见其种内的遗传变异性很高。由于鲢的 DNA 样品不够理想, 与 pBC174 杂交的小卫星位点不多, 不好比较, 但从图中可以看出, 个体特异性也较明显。此外, pBC174 可与罗非

鱼的许多小卫星位点杂交(另文发表)。以上结果表明本文所克隆的鱮小卫星 pBC174 适用于鱼类 DNA 指纹分析。pBC174 小卫星探针能同时与鱮、鲢和罗非鱼等基因组中多个小卫星位点杂交,说明它含有保守的核心序列,其核心序列与其它鱼类的核心序列在进化上有什么关系,尚待序列测定后再进行研究。

参 考 文 献

- 1 Jeffreys A J, et al. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature*, 1985, 237:98~99
- 2 Moyer S P, et al. Characterization of a highly repeated satellite DNA from the Cyprinid fish *Notropis lutrensis*. *Comp Biochem Physiol*, 1988, 91(4):639~646
- 3 Datta, et al. Cloning and characterization of a highly repetitive fish nucleotide sequence. *Gene*, 1988, 62:331~336
- 4 Franck J P C, Wright J M. Genetic variability in a family of satellite DNA from tilapia(Pisces:Cichlidae). *Genome*, 1992, 35:719~725
- 5 Franck J P, Wright J M. Conservation of a satellite DNA sequence (SATB) in the tilapiine and haplochromine genome(Pisces: Cichlidae). *Genome*, 1993, 36:187~194
- 6 Harris A S, Wright J M. Nucleotide sequence and genomic organization of Cichlid fish minisatellites. *Genome*, 1995, 38:177~184
- 7 Wright J M. Nucleotide sequence, genomic organization and evolution of a major repetitive DNA family in tilapia(*Oreochromis mossambicus thornotum*). *Nucleic Acids Research*, 1989, 17(13):5 071~5 079
- 8 Goodier J L, Davidson W S. A repetitive element in the genome of Atlantic salmon, *salmo salar*. *Gene*, 1993, 131:237~242
- 9 Goodier J L, Davidson W S. Characterization of a repetitive element detected by Nhe I in the genomes of salmo species. *Genome*, 1994, 37:639~645
- 10 Bentzen P, Wright J M. Nucleotide sequence and evolutionary conservation of a minisatellite variable number tandem repeat cloned from Atlantic salmon, *salmo salar*. *Genome*, 1993, 36:271~277
- 11 Denovan E M, Wright J M. A satellite DNA family from pollock (*Pollachius virens*). *Gene*, 1990, 87:279~283
- 12 方盛国,等. 鱼类 LZFI DNA 指纹探针的制备. *遗传学报*, 1997, 24(1):7~14
- 13 Wong Z, et al. Characterization of a panel of highly variable minisatellites cloned from human DNA. *Ann Hum Genet*, 1987, 51:269~288

Cloning of minisatellite DNA from bighead carp

Jian Jichang Xia Dequan

(Research Center of Freshwater Fisheries, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081)

Abstract When DNA fragments of bighead carp were completely digested with restriction endonuclease Sau 3A I and were linked with BamH I - pUC18, then screened by Amp and X-gal, 933 recombinants were obtained. Then using human satellite 33.15 as a probe to screen the 933 recombinants, 14 positive recombinants were gained, of which one (i. e. pBC174) was selected randomly as a probe to be crossed (Southern hybridization) with DNA fragments from 5 bighead carp and 4 silver carp, digested with Hae III, then 10.4 DNA bands (ave.), each longer than 4.0 kb, were observed in bighead carp and 5 in silver carp. The average similar index in bighead carp was 0.1173 ± 0.0780 . All the results indicate that pBC174 minisatellite was suitable for analysing DNA fingerprints of fish.

Key words bighead carp, minisatellite DNA, cloning