

文章编号:1005-8737(2000)01-0001-05

鲤鱼的遗传连锁图谱(初报)

孙效文, 梁利群

(中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要:建立了鲤鱼的遗传连锁图谱。图谱有 RAPD 分子标记 56 个, 鲤鱼的 SSLP 标记 26 个, 鲫鱼 SSLP 标记 19 个, 斑马鱼的 SSLP 分子标记 70 个, 鲤鱼基因标记 91 个, 共有标记 262 个; 图谱有 50 个连锁组, 连锁图给出鲤鱼的基因组大小在 5 789CM 左右。

关键词:鲤鱼; 遗传连锁图谱; 分子标记

中图分类号:Q.959.46+8.

文献标识码:A

遗传连锁图谱的建立, 导出了基因在染色体上线性排列这一重要概念, 也是形成基因论的重要理论基础之一; 一个较为详细的遗传连锁图谱不仅对该物种的遗传学基础研究有重要意义, 同时对该物种的育种研究也很有帮助。随着分子生物学的发展, 尤其是 1990 年开始的人和相关的模式动物的基因组计划^[1~4], 使建立多数生物的遗传连锁图谱有了技术上的可能。美国农业部在 1997 年正式确立了 5 种水产养殖动物的基因组计划^[5], 首要任务是建立适当密度的 SSLP 标记的遗传连锁图, 最终建立 DNA 分子标记为选择手段的新一代育种技术。鳙鱼和罗非鱼的遗传连锁图谱已被建立^[6,7]。鲤鱼是养殖产量最高的水产养殖动物, 它的遗传连锁图谱尚未建立, 基因位点间的连锁关系也未见报道。

本文用多种分子标记^①对柏氏鲤与黑龙江鲤的杂交子二代的单倍体样品做基因型分析, 建立了初步的鲤鱼遗传连锁图谱。

1 材料与方

收稿日期: 2000-01-13

基金项目: 国家高技术资助项目(863-101-05-02-01)

作者简介: 孙效文(1955-), 男, 吉林大安人, 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 研究员, 从事鱼类基因工程育种与分子生物学研究。

①有关分子标记的鉴定文章另文发表。

1.1 材料

1.1.1 原种 黑龙江鲤 [*Cyprinus (Cyprinus) carpio haematopterus* Temminck et Schlegel] 采自黑龙江抚远县江段, 柏氏鲤 [*Cyprinus (Cyprinus) pellegrini pellegrini* Tchang] 采自云南江川养殖场, 黑龙江鲤与柏氏鲤杂交 F₂ 单倍体采自黑龙江水产研究所。

1.1.2 试剂及引物 随机引物购自 Operon Technologies 公司, 生化试剂购自 Promega 公司。斑马鱼的 SSLP 标记购自美国 Research Genetics 公司; 鲤鱼的 SSLP 分子标记依据 RPMA Crooijmans 等所设计的引物序列在上海生工生物工程公司合成, 鲫鱼的 SSLP 序列和基因标记依据美国医学研究所基因库中的基因序列, 在网上使用麻省理工学院白头研究所的 Primer3 程序进行设计, 在上海生工生物公司合成。

1.2 DNA 的采集和提取方法

样品的采集是在杂交子代成熟时选取雌性个体, 经催产获得卵子, 对卵子进行假性授精, 即对卵子仅用 16℃ 的水刺激, 然后放入 22℃ 的水族箱发育。在卵子发育到囊胚期时采集卵子内容物加入本实验室用于 PCR 反应的专用的 DNA 提取裂解液进行消化, 并用通用的 DNA 抽提方法获得可用于 PCR 扩增反应的 DNA 样品。

1.3 PCR、RAPD 反应程序及产物的分析方法

用 RAPD 扩增方法和正常的 PCR 方法。RAPD 反应程序是: 94℃, 5 min 变性, 45 个 4 步循环是 94℃ - 2 s, 92℃ - 30 s, 36℃ - 1 min, 72℃ - 1 min, 最后 72℃ 扩增 5 min; SSLP 分子标记和基因标记的 PCR 扩增方法: 在正常 PCR 方法的基础上, 根据引物退火温度的不同和我们的实验材料的差别, 为保证获得可靠的实验结果在退火温度及反应时间上进行了适当变动, 如退火温度在 50~55℃ 范围内调整, 反应循环数为 38 个。反应产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳 2, 溴化乙锭染色, GDS8000 凝胶成像仪 (UVP 公司) 进行分析鉴定。并用 1Gelworks 软件包 (3.0 版本) 对每个扩增带 DNA 的分子量进行估算、测定, 获得基因型分析数据。

1.4 连锁图谱的建立

将 46 个单倍体子代 DNA 样品用已鉴定的具遗传异质性的标记进行 PCR 扩增, 得到的基因型分析数据转换成 MAP MANAGER (从洛克菲勒大学生物系软件中心拷贝) 软件可接受的数据形式 M 或 P, M 和 P 分别代表原亲本母本和父本的基因型。将全部的数据输入该软件并运行, 获得标记间的连锁关系和连锁组, 反复比较不同的标记之间的遗传距离, 最终获得置信度较高的连锁组。

2 结果

2.1 基因型分析

选用对柏氏鲤和黑龙江鲤具种间差异性的 RAPD 标记 56 个、鲤鱼 SSLP 标记 26 个、鲫鱼 SSLP 标记 19 个、斑马鱼 SSLP 标记 70 个、鲤鱼基因标记 91 个, 共 262 个 DNA 分子标记对柏氏鲤和黑龙江鲤的杂交子二代的 46 个样品做基因型分析, 获得数据 11 800 多个。PAPD 标记的分析结果如图 1 所示, SSLP 标记的分析结果如图 2 所示。

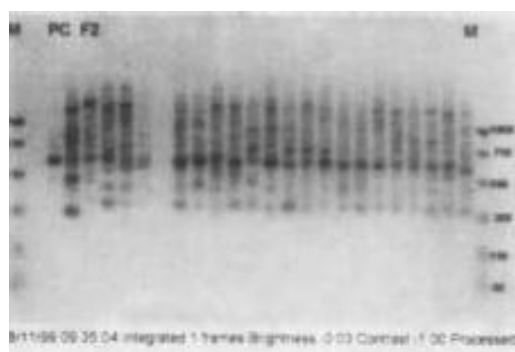


图 1 RAPD 引物所做的子二代基因型分析

Fig. 1 The genotyping of F_2 generation with RAPD primers

M 为分子量标准; P 为柏氏鲤亲本; C 为黑龙江鲤亲本; F_2 以后各泳道均为子二代样品。图二同。M lane is molecular weight marker; P lane is Boshi carp and C lane is Heilongjiang carp; F_2 lane and following lanes are F_2 generations. The same as Fig. 2.

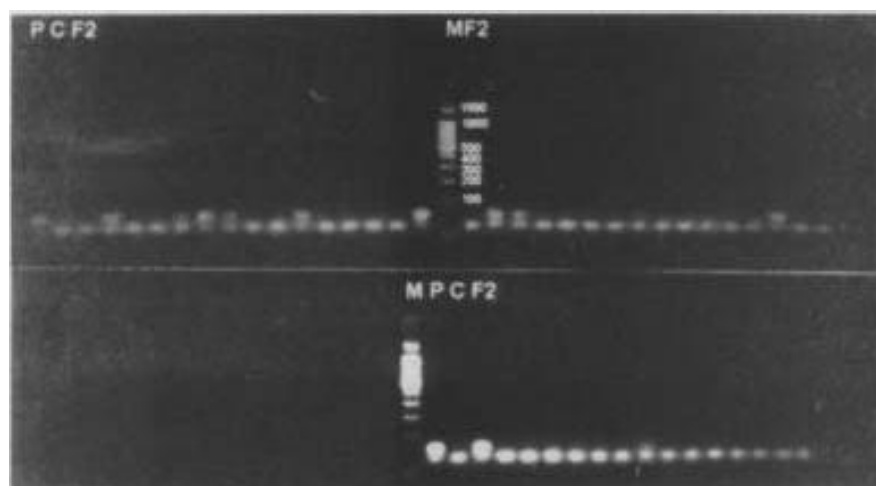


图 2 SSLP 引物所做的子二代基因型分析

Fig. 2 The genotyping of F_2 generation with SSLP primers

2.2 遗传连锁图

上述数据经 MAP MANAGER 软件处理, 获得

50 个连锁组 (图 3), 基因组的长度为 5 789 cM, 最大的连锁组为 347 cM, 最小的连锁组为 17 cM。

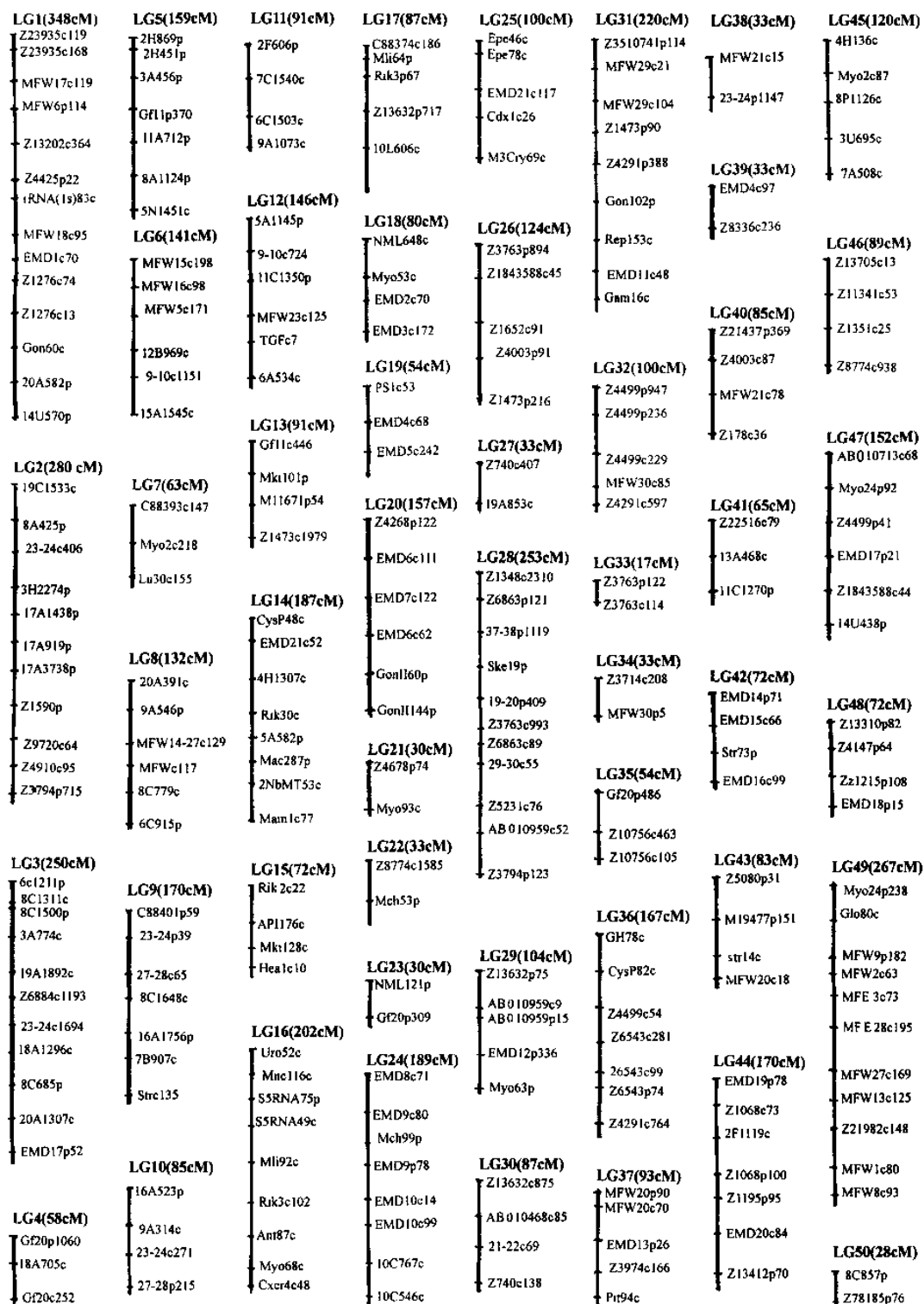


图 3 鲤鱼遗传连锁图谱

Fig.3 Genetic linkage map of common carp

2.3 基因型分析结果

(1)基因型分析显示 SSLP 标记有 31 个标记在单倍体样品中扩增出两条以上的带,经连锁分析显示有 17 个标记被定位在不同的连锁组,有 14 个标记被定位在同一连锁组,但距离较远。

(2)有 91 个基因标记被定位在 31 个连锁组中,其中与鲤鱼经济性状相关的基因有:生长激素基因,促性腺激素基因,半胱氨酸蛋白酶基因等等,连锁分析结果显示生长激素基因定位在第 36 号连锁组,并与半胱氨酸蛋白酶基因连锁。

(3)基因标记中有部分是根据鲤鱼的 cDNA 序列合成的引物,由于 cDNA 制备多较集中,如美国医学研究所基因库中鲤鱼的一些 cDNA 序列是在胚胎发育至 48 h 抽提到的 mRNA 再合成的,有许多序列。从这个 cDNA 库中合成 18 对引物作为标记,经连锁分析表明这些标记多为成串连锁,如第 18、19、20、24、42、50 连锁组都有 2 个以上这类标记的连锁,共 15 个,占这类标记的 83%。

3 讨论

3.1 基因组的大小

262 个标记所覆盖的基因组大小是 5 789 cM,由于还有 9 个连锁组仅有 2 个标记,随着标记的增加,鲤鱼的基因组要远大于 5 789 cM,另外,50 个连锁组的端粒都没有标记,确定每个连锁组的端粒还有增大至少 $50 \times 10 = 500$ cM。就是不再增加,这已是目前发表的遗传学意义上最大的基因组。鲤鱼标记之间平均交换率如果在 0~1.0 之间,经计算鲤鱼基因组的大小应在 5 000~10 000 cM 的范围内。本连锁图中最大的连锁组长 349 cM,人基因组最大的连锁组是 356 cM,而混合标记的人连锁图中最大的连锁组是 384 cM^[4],即本连锁图中最大的连锁组却不是已发表的最大的连锁组。鲤鱼的基因组是至今得到的最大的基因组,这可能与鲤鱼有四倍体的遗传特点以及染色体数较多有一定关系, Larhammar 和 Risinger^[8] 在分析了鲤鱼的一些 DNA 序列时发现了四倍化位点的存在, RPMA Crooijmans 等人^[9] 在用 SSLP 标记分析发现一些标记扩增出非期望的放大片段,并认为这是由于五千万年发生的鲤鱼四倍体化是由不同种的杂交、加倍而成的。虽然鲤鱼在细胞水平和亚细胞水平的遗传行为与二倍体一至,但由于众多四倍体同源序列的存在使其在减数分裂过程中同源染色体的缠绕和交换要远高于正常

二倍体,这也造成基因组在遗传学意义上的增大。另外,本研究使用的实验材料是雌性的单倍体,雌性的遗传距离约是雄性的 1.5 倍,这也是使本连锁图在遗传学意义上增大的一个因素^[10]。鲤鱼基因组虽然在物理学意义上不是较大的基因组,但在遗传学意义上是目前所建立的遗传连锁图中最大的基因组,也就是说建立同样密度的连锁图,鲤鱼将需要更多的标记,这必将使今后的研究难度加大,包括数量性状的定位和单基因的克隆等。

3.2 关于鲤鱼的多态性

鲤鱼是多倍体动物中较有代表性的一种,进化研究认为鲤鱼是在大约五千万年前完成的四倍体化过程,而染色体行为学研究认为鲤鱼在遗传上已属正常的二倍体。但由于其四倍体是由不同种的杂交形成的而不是同一种的染色体组加倍所得。我们的连锁分析结果与此观点一致。这也是为什么鲤鱼的多态性高于正常的二倍体鱼类如斑马鱼,也高于染色体自身加倍的四倍体鱼类如鲫。关于行雌核发育的银鲫的起源,多数学者认为是由于鲤鲫杂交种衍化而来,但从 RAPD 分析表明其种内多态性过少^[11],认为银鲫来源于鲤鲫杂交的说法还缺少足够的分子生物学证据,由于 RAPD 的扩增带重复性较差,也难于确定杂合性,因此应借用 SSLP 标记分析银鲫的单基因位点的杂合度,才能最终确定银鲫是源于同种染色体加倍的进化方式还是不同种杂交后经染色体加倍的进化方式。

3.3 不同物种的基因组比较

Postlethwait 等发表的斑马鱼的基因图谱^[12]揭示了斑马鱼与人和鼠的一些相同基因串有相同的顺序,而这些基因是与发育相关的同源盒基因系列家族(homobox A/D 等),从而提示了斑马鱼以及一般的脊椎动物在基因组水平上的进化过程,也使斑马鱼基因组研究可以借用人和鼠的基因组研究的结果。斑马鱼是基因组计划中的模式动物之一,连锁图的标记密度已达到了平均每个连锁组约 60 个的水平,因此,与人和鼠基因组的比较研究较容易进行。本研究将 91 个鲤鱼基因标记定位在连锁图上,用此方法可把更多的与鲤鱼经济性状相关的基因定位在遗传连锁图上,为鲤鱼的遗传育种奠定基础,同时也增加了连锁图遗传标记的密度。但有关鲤鱼基因组的深入研究尤其是要借用人、鼠及斑马鱼等基因组方面研究得较为深入的动物的基因组研究成果,如与经济性状相关的基因,与疾病的发生及免疫

相关的基因等等,还需要把目前这个鲤鱼的遗传连锁图谱的标记的密度提高,至少应达到 1 000 ~ 1 500 个,即每个连锁组平均在 20 ~ 30 个标记左右,标记间的平均遗传距离在 5 ~ 10 cM。

致谢:对石连玉提供黑龙江鲤与柏氏鲤杂交子代、刘振辉鉴定部分基因型、李丽坤准备实验表示感谢。

参考文献:

- [1] USDA. Five years of progress in the human genome project[A]. In: Human Genome News[R], September - December, 1995;7(3 - 4):4.
- [2] Murray F N, Jeffrey C, et al. A comprehensive human linkage map with centimorgan density[J]. Science, 1994, 265:5181 - 5188.
- [3] Dulbecco R. A turning point in cancer research: Sequencing the human genome[J]. Science, 1986, 231:1055 - 1056.
- [4] Schuler G D, Boguski M A. A Gene map of the human genome based on 5.264 microsatellites[J]. Nature, 1996, 380:152 - 154.
- [5] USDA. Five years of project of genetic maps of aquaculture species [A]. In: USDA Regional Project Number: NE - 186 [R]. Duration: October 1, 1997 - September 30, 2002. USA.
- [6] Thomas D. Kocher, Woo - Jai Lee, Halina Sobolewska, et al. A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia[J]. Genetics 1998, 148:1225 - 1232.
- [7] William P Young, et al. A detailed linkage map of rainbow trout produced using doubled haploids[J]. Genetics, 1998, 148: 839 - 850.
- [8] Larhammar D, Risinger C. Molecular genetic aspects of tetraploidy in the common carp[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 1994, 3:59 - 68.
- [9] RPMA Crooijmans, VAF Bierbooms, et al. Microsatellite markers in common carp[J]. Animal Genetics, 1997, 28:129 - 132.
- [10] Eberhard P. 遗传学与医学遗传学彩色图解[M]. 朱冠山, 等译. 北京:中国医药科技出版社, 1998. 138.
- [11] 滕春波, 孙效文, 等. 利用异源精子激发雌核发育的银鲫及亲本的 RAPD 分析[J]. 水产学报, 1999, 23(4): 420 - 423.
- [12] John H. Postlethwait, et al. Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map[J]. Nature genetics, 1998, 18:345 - 349.

A genetic linkage map of common carp

SUN Xiao-wen, LIANG Li-qun

(Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China)

Abstract: A genetic map has been constructed for common carp, *Cyprinus (Cyprinus) carpio haenatoptenus* Temminck et Schlegel and *C. (Cyprinus) pellegrini pellegrini* Tchang using DNA markers. The segregations of 26 common carp microsatellites, 19 crucian carp and 70 zebrafish microsatellites, 56 RAPD and 91 gene markers were studied in 46 haploid embryos derived from a single female. The linkages were identified among 262 of these markers in fanal map. The map spans 5 789 cM in 50 linkage groups covering 50 chromosomes of this species. This map is a starting point for mapping some gene and quantitative traits loci linked with important economic traits about common carp.

Key words: common carp; genetic linkage map; molecular marker