

综述

DNA 指纹技术及其在水产上的应用
DNA FINGERPRINTING TECHNOLOGY AND ITS APPLICATION IN FISHERIES

张跃 朱新平 罗建仁 夏仕玲

(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广州 510380)

Zhang Yue Zhu Xinping Luo Jianren Xia Shiling

(Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Guangzhou 510380)

关键词 DNA 指纹技术, 遗传标记, 水产

KEY WORDS DNA fingerprinting technology, Genetic marker, Fisheries

DNA 指纹技术的发展概况

RFLP(Restriction fragment length polymorphism 限制性片段长度多态性)反映了 DNA 的多态性, 是一种 DNA 的分子标记, 已引起了遗传分析方面的一场革命。然而, 它仍存在局限性, 如: RFLP 反映的大多数是 DNA 小规模变化, 主要是碱基的变换, 引致酶切位点改变。由于 DNA 平均异配率偏低, 且存在于特定位点, 只极少数酶才可以检测出来。另外, 在关键个体是同配子时, 在谱系分析中 RFLPs 难以提供充分信息。

80 年代初, 人们偶然从人类 DNA 随机片段文库中发现了若干高度变异小卫星位点。Jeffreys 等^[16, 17]首次利用小卫星位点探针探测了人类酶切后 DNA, 得到了第一个 DNA 指纹图(即 DNA fingerprinting, DNA typing 或 DNA file, 也称“基因指纹”, 简称为 DFP)。他们全面进行了人的个体鉴定, 亲子鉴定和谱系分析, 建立了最先的 DNA 指纹技术。所探测的小卫星位点由串联重复的短序列(核心序列)组成, 核心序列在人类基因组中多为 11-60bp, 每个位点上有多个等位基因, 它们所含核心序列的拷贝数各异, 所以显示了丰富的限制性片段长度多态性^[20]。Jeffreys 等认为它们在进化中被保留下来, 在绝大多数生物体中都有存在, 从人类, 爬行动物^[11, 18], 鱼类^[31], 鸟类^[7]到昆虫^[24], 植物以及微生物^[27]。如今, 这种利用小卫星位点探针的 DNA 指纹技术在人类遗传和法医学上应用仍很广, 除了个体鉴定、亲子鉴定和谱系分析外, 也可以进行遗传监测、双胞胎识别、肿瘤诊断等^[1]。而它在植物、畜禽方面的应用包括有良种登记、牧畜保险、亲缘鉴定、遗传纯度测定、近交测定等。Miller 等^[23]利用之对海鸟进行过性特异分析。国外水产界也曾大量采用之进行水产遗传分析。

后来, 利用微卫星位点探针的 DNA 指纹技术诞生了。Ali 等人人工合成了 2-4bp 多聚体寡核苷酸探针探测了高变位点即微卫星位点也得到人的 DNA 指纹图。这些位点由 1-6bp 的短序列串联重复形成。随后, (TG)_n、(CAC)_n、(GTG)_n 等寡核苷酸探针, M₁₃噬菌体 DNA^[29], Per 基因^[11]作探针, 荧光素标记的探针^[1]都得到利用。其中申滨等^[1]得到检测效果比用放射性标记的探针更理想, 且简化了操作、省时、省钱。

以上二种 DNA 指纹分析是多位点的, 对操作者技术要求较高。人们为此发展了位点特异小卫星与位

收稿日期: 1996-11-15。

点特异微卫星方法,用小卫星或微卫星的旁侧单一序列作引物进行PCR扩增,产生DNA指纹图。Jeffreys等^[21]利用之从单个细胞得到了DNA指纹图。有人证实位点特异微卫星DNA指纹分析在动物位点特异遗传标记研究上有巨大潜力。进一步提高微卫星DNA多态性的检出水平是利用AFLP(Amplified fragment length polymorphism,扩增片段长度多态性)。倪星群等^[2]利用AFLP、RFLP以及SSCP(Single-strand conformation polymorphism,单链构象多态性)直接检测了人的 γ WF基因40内含子VNIR(Variable number of tandem repeats)基因型以及其亚型。

RAPD(Random Amplified Polymorphism DNA,随机扩增DNA多态性分析)是一种独特的DNA指纹分析,可称之DNA扩增指纹技术。它也建立在PCR技术基础上,以随机寡聚脱氧核苷酸作PCR反应引物对基因组DNA进行扩增而显示DNA多态性^[32]。RAPD具有独到的快速、简便、高效的特点,已在植物基因组图谱构建、物种亲缘关系分析、种群遗传学上得到应用。Bielawski等^[3]也确定了海鲈利用RAPD分析的最佳条件。整个水产界正开展把RAPD分析应用到水产遗传学上的工作。

DNA指纹原理

DNA指纹和RFLP一样是基于生物DNA序列多态性。具体而言,这种多态性指同种的不同个体间出现千分之几的碱基对改变,每个这种不同种本身一致序列的改变会存在部分个体。而单个个体会拥有整个改变集合中的一个小集合,从而有个体DNA的核苷酸种类、数量、排序各异,部分引致酶切位点改变,酶切后呈RFLPS。Southern blotting加放射性自显影反映这种多态性。

相对RFLPS而言,DNA指纹分析主要以小卫星或微卫星位点变化为基础。真核生物基因组有许多重复的片段。重复最多的为卫星DNA,它们不编码蛋白质和RNA,主要组成着丝粒和端粒,每个单位在10bp以下,拷贝数高达 $10^5 \sim 10^7$ 。其次为150~300bp中度重复单位,即使基因里也有内含子VNIR。这些为小卫星或微卫星位点形成提供了丰富源泉^[22]。利用合适的探针便可检测和反映这种因重复数各异形成的DNA多态性。结合用多个探针理论上可绝对标记个体,建立标准的分析方法和进行严格对照分析也可消除带纹解释上的一些分歧。

人们认为小卫星的重复单位拷贝数是因有丝分裂或减数分裂中同源卫星间的不等价交换或复制过程中DNA滑动形成。而微卫星的拷贝数在于DNA复制或修复时分子滑动所致,也与Z-DNA形成相关^[30]。

DNA指纹技术的一般过程:核DNA用限制性内切酶消化,电泳分开,再转移至膜,用小卫星、微卫星、合成的寡核苷酸以及其他探针予以探测,形成个体特异性杂交图谱。相对RFLPS,省了DNA片段克隆以及特异探针制备。位点特异DNA指纹分析中还省了Southern印迹转移以及具有需DNA样品量少的优点。

RAPD过程:采用9~10bp的随机引物对基因组DNA进行PCR扩增。模板DNA在93℃左右变性,36℃左右与随机引物退火,允许一定的错配,PCR使之扩增。PCR后产物经琼脂糖电泳,溴化乙锭显示。个体间的多态性源自两个或一个引物结合位点的序列变异,表现为有无某扩增带。而退火位点间的插入或缺失,引起扩增产物长度变化甚至有无。RAPD有时也称为APPCR(Arbitrarily primed PCR)。

DNA指纹特点及其作遗传标记的比较优势

1 DNA指纹特点

DNA指纹具有多位点性、高度变异性和遵循孟德尔遗传规律。指纹图带为20条左右,象商品上的条形码。每条图带一般为独立遗传。在人类^[17],鸟类^[7]及猫狗^[9]均证实DNA指纹图带极少连锁,因而每条带代表独立位点,从而一个DNA指纹探针可以同时提供数十个独立位点的变化内容。但是,鸚鵡^[6],老鼠^[18]的DNA指纹中发现有许多连锁位点以及多片段等位基因。因此,降低了DNA指纹图提供的信息量。谱系分析建议依种进行DNA指纹分析,且要探讨探针所探测信息中连锁和等位基因的有关情况。

DNA指纹具有物种、品种、品系及个体特异性。个体间DNA指纹图的相似系数: $F = 2N_{AB}/(N_A + N_B)$ (N_A 、 N_B 是出现在个体A和B中各自的条带数, N_{AB} 为共有条带数)。最大平均等位基因频率: $q = 1 - \sqrt{1 - x}$

$x = (N_{AB}/N_A + N_{AB}/N_B)/2$ ^[17]。申滨等^[1]得到个体相似系数为 0.19, 全部谱带一致相关概率为 7.4×10^{-11} , 平均等位基因频率为 0.09。因而可以做到对不同个体的绝对否定, 对相同个体绝对肯定。

DNA 指纹按孟德尔定律遗传, 后代中每一条带在双亲或之一中找到, 且有体细胞、生殖细胞稳定性。

2 DNA 指纹图作遗传标记的比较优势

遗传标记是遗传分析的工具, 用以分析遗传组成, 检测变异的某些性状或物质, 须有稳定性、特异性和代表性, 能反映个体或群体的特征。

DNA 指纹由 RFLP 发展而来, 具有 RFLP 作遗传标记的比较优势。RFLP 可以进行基因遗传图谱的构建, 基因定位等。RFLP 图谱的多态性足以超出生物育种所要求的与其数量性状相适应的多态性。RFLP 相对以前的形态标记或同工酶标记等, 不受发育时期、环境、基因显隐性影响, 反映遗传信息直接、准确。

3 DNA 指纹(DFP)相对 RFLP 具有新的作遗传标记的比较优势

3.1 DFP 可以在谱系分析中提供充分信息。

3.2 DFP 探针通用性强, 进行 RFLP 分析中克隆可以表现基因组 DNA 多态性的探针较困难。而且 RAPD 根本只须用引物来扩增即可。

3.3 DFP 可以使用任意识别 4 个碱基的内切酶表现出来。RFLP 分析极大地依赖特定内切酶的适用, 酶的筛选费时, 代价高。

3.4 DFP 位点的多态信息含量比 RFLP 高很多。DFP 探测区受到自然选择压力小, 有高的突变率, 丰富了个体特异性。

3.5 一个 DFP 探针可以同时探测多个独立的高变位点, 相当于数十个 RFLP 探针。

3.6 DFP 具有极强的个体特异性, 而即使 mtDNA RFLP, 也多因为个体差异小, 难以得到个体特异性图谱。

3.7 DNA 分离相对简单、便宜。作 DFP 分析可以选择剪取鳍条或取血即可, 勿须杀死动物, 还可以大批量分析样品。血样在 -40°C 存上 8 年尚可利用。各种利用 PCR 技术的指纹分析所要样品量更少^[31]。

3.8 RAPD 更有独到之处: RAPD 标记可等价于序列标记, 但无须克隆 DNA 探针, DNA 测序及分子杂交, 以及随机引物可以广泛用于各个物种, 还有希望自动化^[32]。

因实验条件、目的、对象不同, 同工酶、RFLP 等遗传分析手段仍应当得到充分利用。

DFP 在水产上的应用和前景

Hallerman 和 Beckman^[13]曾经讨论过 DFP 在水产上应用的可能性。时至今日, DFP 在水产上的应用已迅速发展。

在鱼类 DFP 分析中, 人们已经应用许多探针, 表 1 列入部分供参考。在水产上 DFP 应用的主要方面有:

1 鉴定克隆鱼, 评估近亲繁殖率 Han 等^[15]用 DFP 分析鉴定了香鱼的克隆二倍体, 有丝分裂雌核发育二倍体和正常二倍体, 结果发现克隆二倍体 DFP 完全一致, 有丝分裂雌核发育二倍体共有带极少, 可成为个体的遗传标记, 正常的二倍体共有带与独有带都有, 利用相似系数分析了近亲繁殖率。此法也适用那些记录不全的商品鱼或技术操作作用鱼中近亲程度的测定。

2 鉴定雌核发育中父系或母系遗传度 Carter 等^[8]利用 DFP 分析证实 *O. aureus* 罗非鱼有丝分裂雌核发育中有很大的父系成分, 而这个是用异构酶分析和性别决定因子分析没能得到的新信息。他们证实了 *O. niloticus* 罗非鱼中仅有母系遗传。

3 个体鉴定、群体结构分析和进化分析 Fields 等^[10]利用 M_{13} DNA 探测了虹鳟酶切后 DNA, 得到个体特异指纹图, 而远缘杂交后代带型多态化。又分析了银大马哈鱼、大西洋鲑, 进一步确认了 DFP 作个体标记的优越性。

Turner 等^[28]分析了羊头鲷串联重复的 HindIII 的单聚体单位, 利用分散单序列和小卫星序列探测此鱼 DNA, 得到了个体特异性 DFP, 确认了鱼群的歧化, 这也是同工酶分析未得到的新信息。在大西洋狗鱼(具

同配子的雌雄同体的克隆群体)DFP 分析中发现了居群内极强的异质性,引起学者们对它的遗传变异、适应性和起源进行重新探讨。

表 1 鱼类 DFP 分析中曾用过的部分探针

Table 1 Some used probes in analyses of fish DFP

探针名 Probes species	序 列 Arrange
(CAC) ⁵	CACCACCACCACCAC
(GACGCTGGAGGTCT) ⁴	
33.15	AGAGGTGGGCTGGTG
33.6	TGGAGGAGGGCTGGAGGGC
(GACA) ⁴	GACAGACAGACAGACA
(GGAT) ⁴	GGATGGATGGATGGAT
(CT) ⁹	CTCTCTCTCTCTCTCT
(GT) ⁹	GTGTGTGTGTGTGTGT
(GATA) ⁴	GATAGATAGATAGATA
(TTTC) ⁵	TTTCTTCTTCTTCTTCT
Per locus repeat	(ACAGGC) ⁴
High mutation rate	(GGCAGG) ⁴
GHI	GGCTCTGGGCTGTG
YNZ. 132	CAGGCTGTGGGTGATGGTGA
3HVR	AACAGCGACACGGGGGAGG
M ₁₃ repeat	GACGCTGGAGGTCT

4 双亲分析 Rico 等^[26]利用 PYNZ₁₃₂在刺鱼中得到了信息丰富的 DFP,利用相似系数进行了亲子鉴定,建议利用 PYNZ₁₃₂产生的 DFP 来设计刺鱼杂交方案。他们也讨论了双亲之一未明了的情形下不同鱼间的亲缘关系。

5 野生种、引进种鱼种鉴定 Wirgin 等^[33]利用 Per M₁₃等获得条纹鲈野生种和引进种的 DFP,分析了各鱼种间的遗传差异及鱼种内的亲子遗传关系。类似地,Gross 等^[12]利用 DFP 鉴定了小口鲈的群体特异性。

6 用种群内或种群间相似系数分析有关等位基因连锁与 DFP 条带的关系 Bosworth 等^[5]利用 DFP 分析了条纹鲈、白鲈及其杂种,发现两种鲈鱼共有带少,低水平等位基因情况以及连锁关系,认为不同鲈鱼间杂交可以用来研究 DFP 带纹与数量性状位点间的连锁关系。

7 其他应用 DFP 尚可以用来预测鱼生长速度的分布幅度和分布差异,以便鱼群从小以均速生长。也可用之来保护选育品种权,区分捕捉或孵化鱼,监测释放的转基因或其他遗传操作鱼,还可以利用之研究基因渐渗和寻找标记等位基因,促进品种选育^[9,14,25]。

如今,各国水产界逐渐由探索应用发展到成熟运用 DNA 指纹技术。如法国 IFREMER(水产品开发研究所)^[4]继大菱鲆和鲑鱼研究之后,最近利用 DFP 开发鉴定了牡蛎的 12 个遗传标记和尖吻鲈的 7 个遗传标记,正努力鉴定牡蛎抗 bonamid(寄生虫感染)基因。我国水产界也有人正进行本技术的应用研究。

参 考 文 献

- [1] 申滨等,1995. 荧光素标记 JH12.6 探针进行人 DNA 指纹图分析. 遗传学报, 22(3): 167-170.
- [2] 倪星群, 夏家辉等, 1996. 中国汉族群体 γ WF 基因 40 内含子 VHIR. 遗传学报, 23(1): 1-10.
- [3] Bielawski, H.P. et al., 1995. 脊椎动物 DNA RAPD 标记的重复性扩增. 生物技术通报, (2): 39.
- [4] IFREMER, 1996. 指纹法在水产品育种的运用. 生物技术通报, 12: 13.
- [5] Bosworth, B.G. et al., 1994. Restriction of the Striped bass, White bass and their F1 hybrid. Aquac, 123: 205-215.
- [6] Brock, M.K. and White, V.N., 1991. Multifragment alleles in DNA fingerprinting of parrot (*Arazona Venustus*). J. Hered., 82: 209-212.
- [7] Burke, T. and Bruford, M.W., 1987. DNA fingerprinting in birds. Nature, 327: 149-152.

- [8] Carter, R.E. et al., 1991. The application of DNA fingerprinting in the analysis of gynogenesis in tilapia. *Aquac.*, 95: 41 - 52.
- [9] Dunnington, E.A. et al., 1990. DNA fingerprinting of chickens selected for high and low body weight for 31 generations. *Anim. Genet.*, 21: 247 - 257.
- [10] Fields, T.D. et al., 1989. DNA fingerprinting in rainbow trout detected by hybridization with DNA of bacteriophage M_{13} . *Trans. Am. Fish. Soc.*, 118: 78 - 81.
- [11] Georges, M. et al., 1988. DNA fingerprinting in domestic animals using four different minisatellite probes. *Cytogenet. Cell genet.*, 47: 127 - 131.
- [12] Gross, M.L. and Kapuscinski, A.R., 1994. Nest - specific DNA fingerprinting of small mouth bass in Operongo Ontario Lake. *Trans. Am. Fish. Soc.*, Vol., 123: 449 - 459.
- [13] Halleman, E.M. and Beckmann, J.S., 1988. DNA level polymorphism as a tool in fisheries science. *Can. J. Fish. Aquac. Sci.* 45: 1075 - 1087.
- [14] Hillel, J. et al., 1990. DNA fingerprinting applied to gene introgression in breeding program. *Genetics*, 124: 783 - 789.
- [15] Hyon - sob Han. et al., 1992. Application of DNA fingerprinting to confirmation of clone in Ayu. *Nippon. Suisan. Gakkaishi.*, 58(11): 2027 - 2031.
- [16] Jeffreys, A.J. et al., 1985. Hypervariable 'Minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 314: 67 - 73(1985a).
- [17] Jeffreys A.J. et al., 1985. 'Individual - specific' fingerprints of human DNA. *Nature*, 314: 76 - 79(1985b).
- [18] Jeffreys, A.J. et al., 1987. Mouse DNA fingerprinting analysis of chromosome location and germ line stability of hypervariable loci in recombinant inbred strains. *Nucl. Acids. Res.*, 15: 2823 - 2836.
- [19] Jeffreys, A.J. et al., 1987. DNA fingerprints of dogs and cats. *Anim. Genet.*, 18: 1 - 15.
- [20] Jeffreys, A.J. et al., 1988. Spontaneous mutation rates to new length alleles at tandem - repetitive hypervariable loci in human DNA. *Nature* 322: 278 - 281.
- [21] Jeffreys, A.J. et al., 1988. Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction. *Nucl. Acids. Res.*, 16: 10953 - 10971.
- [22] Lehinger, A.J. et al., 1993. *Principles of Biochemistry (II)*. Worth publishers (U.S.A), 797 & 996 - 997.
- [23] Miller, C.D. et al., 1992. Sex - specific restriction fragments and sex ratios revealed by DNA fingerprinting in the Brown Skua. *J. Hered.*, 83: 350 - 355.
- [24] Miroslav Pohl. et al., 1992. Evidence for random distribution of sequence variants in *Tenebrio molitor* satellite DNA. *Genet. Res. Camb.*, 60: 7 - 13.
- [25] Plotsky, Y. et al., 1989. Association between DNA fingerprinting and quantitative traits in high - fat and low - fat broiler lines. *X X VII th Annual Convention of the worlds Poultry Science Association, Israel Branch. Dec., 1989; 27 (abstr.)*.
- [26] Rico, C. et al., 1991. A DNA probe that yields highly informative DNA fingerprints for the three - spine stickleback. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 120: 809 - 815.
- [27] Ryskov, A.P. et al., 1988. M_{13} phage DNA as a universal marker for DNA fingerprinting of animals, plants and microorganisms. *FEBS letter*, 233: 388 - 392.
- [28] Turner, B.J. et al., 1991. Repetitive DNA sequences and the divergence of fish populations: Some hopeful beginnings. *J. Fish. Biol.*, 39(Supp. A): 131 - 142.
- [29] Vassart, G.M. et al., 1987. A sequence on M_{13} phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA. *Science (Washington, D.C.)* 235: 683 - 684.
- [30] Wahls, P.W. et al., 1990. The Z - DNA motif d(TG)₃₀ promotes reception of information during gene conversion events while stimulating homologous recombination in human cell in culture. *Mol. Cell. Biol.*, 2: 785 - 793.
- [31] Walman, J.K. et al., 1988. Review of stock discrimination techniques for striped bass. *North Am. J. Fish. Management.*, 8: 410 - 425.
- [32] Wigin, J.G.K., et al., 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids. Res.*, 18: 6531 - 6534.
- [33] Wigin, I.I. et al., 1991. Use of DNA fingerprinting in the identification and management of a striped bass population in the southeastern United states. *Trans. Am. Soc.*, Vol., 120: 273 - 282.