

试论深入开展鱼类基因定位研究的新构思^{*}

NEW IDEAS ABOUT HOW TO DEVELOP THE GENE MAPPING IN FISH DEEPLY

李奎 余其兴

(武汉大学生命科学院, 430072)

Li Kui Yu Qixing

(College of Biology, Wuhan University, 430070)

摘 要 本文根据国内外鱼类基因定位研究的现状,特别是本室近年来在该研究领域的新进展,提出了深入开展鱼类基因定位研究的新方案。其中包括:(1)迅速构建多种鱼类二价体高分辨G带模式图;(2)构建以序列标志微卫星位点为基础的鱼类二价体基本框架图;(3)深入开展基因比较定位研究;(4)鱼类基因定位研究中如何从单条染色体做起;(5)尽快引入酵母人工染色体等大分子克隆技术;(6)单配子PCR分型技术及其在鱼类基因组分析中的应用潜力。

关键词 鱼类, 基因定位, 染色体

KEY WORDS Fish, Gene mapping, Chromosomes

基因定位(Gene mapping)研究主要包含确定基因在某一特定染色体上的准确位置,基因间的距离与线性排列顺序等内容。该研究是了解基因结构、功能和基因组结构的最主要手段,被称为“基因组的解剖学”。它对于阐明基因组功能与结构的关系,分析群体内遗传多态性,以及探索物种染色体进化和分子进化等基础研究有重要的学术价值。此外,在基因诊断治疗,动植物育种等方面也有广阔的应用前景。本世纪八十年代以来,随着有关人类、小鼠和猪等物种基因组作图规划的大规模实施,人类及哺乳动物的基因定位研究进展十分迅速,已成为现代遗传学中发展最快的领域之一。但是,相比之下,鱼类基因定位研究却十分落后,尚处于技术探索的初级阶段,迅速改变鱼类中该项研究的落后局面,已成为当务之急。而要使鱼类基因定位研究迎头赶上人类及哺乳动物的同类研究,甚至缩小二者间的差距,却不是一蹴而就的。若走人类及哺乳动物基因定位研究的老路,循规蹈矩,势必只会加大二者的差距。因此,在借鉴人类及哺乳动物同类研究的新经验、新技术的基础上,结合鱼类的特点和研究现状,寻求一条全新的技术路线是非常必要的。作者深感此问题之重要,特在此提出自己的一孔之见,仅供参考。

^{*} 国家自然科学基金及高校博士点科研基金资助项目,是在余先觉教授的指导下完成的。

迅速构建多种鱼类二价体高分辨 G 带模式图

高分辨 G 带模式图是基因定位研究的重要基础。本室近年来先后建立了较为完善的鱼类二价染色体的制备及多重带显带技术,并绘制了黄鳝带有区带划分和命名的高分辨 G 带模式图。乌鳢和尼罗罗非鱼二价体上的多重带显带结果也明显优于其体细胞染色体的 G 带带型。此外,还成功地进行了黄鳝二价体上核糖体 RNA、生长激素基因及 SRY 同源盒基因 1 的染色体区域定位(余其兴等,1993;李奎等,1993)^[1,2]。因此,构建多种鱼类二价体高分辨 G 带模式图意义重大,且完全可行,应迅速予以推广。

构建以序列标志微卫星位点为基础的

鱼类二价染色体基本框架图

染色体序列标志位点(Sequence-tagged sites, STS)物理图谱的新思路由 Olson 等(1989)首次提出^[6]。并在人类基因组分析中得到迅速应用,被称为不同国家,不同实验室的通用语言,STS 一般是指基因组中单拷贝 DNA 的短片段。其顺序和染色体位置均已知。该位点可以作为染色体上特异的界标(Landmark),不同的 STS 的排列次序和相互之间间隔就构成了 STS 图谱,这是一种染色体框架图,对基因组研究和新基因的克隆很有帮助。但是要获得大量这样的单拷贝探针有一定难度,一般需制备大量染色体特异区带的单拷贝探针群(Single copy probe pool),需大量人力物力。因此目前在鱼类基因组分析中推广运用有一定难度。

微卫星 DNA 属于串联重复顺序,是 1988 年左右才被用于染色体作图工作(Jeffrey 等,1988;Gao 等,1988;Decorate 等,1990),并得到迅速发展的新的 DNA 标记系统。其重复单位长度一般为 1-4 个核苷酸,常以 (AG)_n、(TG)_n、(An)、(Tn) 等形式存在,重复单位数目一般为 10-60 个。它们广泛分布于整个基因组中,与同样是串联重复顺序的小卫星 DNA 的区别就在于其仅分布在染色体特定区域,而微卫星 DNA 则能够较为均匀地覆盖整个基因组,因此能更好地用作遗传标记。微卫星 DNA 还有数目多的特点,据估计,在哺乳动物中约有 65,000~100,000 个(Haley 等,1993)^[7],而且部分微卫星 DNA 在不同物种间具有保守性,可采用同源引物 PCR 技术对其进行快速有效的分析(Moore 等,1991)。又由于其相对较短,高度重复,且相互之间长度较为一致的特点,适宜于回收长度为 200-400bp 的 DNA 片段,构建部分基因组文库,这比构建全基因组文库要简单得多,用人工合成的寡核苷酸从中筛选微卫星克隆亦相对容易。此外,用原位杂交技术和引物原位 DNA 标记技术对其进行染色体定位也比单拷贝基因简便得多。目前,微卫星 DNA 已开始鱼类 DNA 多态性研究中得到应用(Nanda 等,1992;Estoup 等,1993)^[8,9]。

事实上,Beckmann 等(1990)即提出了在真核生物中广泛构建以微卫星 DNA 位点为基础的序列标志微卫星 DNA 位点(Sequence-tagged microsatellite sites, STMS)物理图谱的设想^[10],STMS 物理图谱亦在人类基因组分析中得到成功应用(Melis 等,1993;Hudson 等,1992)。但是,由于人类基因定位研究已初具规模,已知的位点已相

当多, STMS 并未成为人类基因组分析的主要手段。

鉴于分析微卫星 DNA 的诸多优点和鱼类基因定位研究的现状, 我们的设想是率先在鱼类二价染色体上构建 STMS 框架图, 为鱼类基因定位和基因克隆奠定好的基础。

深入开展基因比较定位研究

这将使鱼类基因定位研究事半功倍。除了开展鱼类与哺乳动物基因组比较定位之外, 开展亲缘关系相近鱼种间的基因比较定位更会效果显著, 因为这些鱼种间基因组组成与结构无疑有相同之处。该研究在鱼类基因定位中应用的一个重要方面是选用异源基因探针和 DNA 标记。除本室近年来的工作之外, 张锡元等 (1989), Pendas 等 (1993a; 1993b) 均曾运用异源探针成功地开展了鱼类基因定位研究^[8,11,12]。另一方面, 由于人类及部分家畜单个染色体基因文库构建工作进展顺利, 人类的单个染色体文库已商品化, 采用染色体原位抑制杂交技术及基因组原位杂交技术确定鱼类与其它物种之间, 以及鱼类与鱼类之间一些大的染色体同源片段, 无疑是会行之有效的。

鱼类基因定位研究中如何从单条染色体做起

由于脊椎动物的基因组一般十分庞大, 因而以单条染色体为基础进行基因定位和基因图谱的构建十分必要。这已为人类, 小鼠和酵母的同类研究所证实 (柴建华, 1993; 匡达人, 1992)^[4,5], 但由于多数鱼类染色体数目较多, 黄鳝的染色体数目虽少, 但染色体之间的形态差别不大, 因而分离单条染色体有一定的难度。目前可行的办法是采用显微切割和微克隆技术, 从某一染色体带开始, 逐步构建整条染色体文库, 这比构建整个基因组文库更简便可行。这一方法在人类中也有成功地报道, 如 La.Pillo 等 (1993) 就成功构建了 8q 24.1 的微切割文库, 并进而获得了 19 个 STS 克隆。

尽快引入酵母人工染色体等大分子克隆技术

酵母人工染色体是近几年才发展起来的 DNA 载体系统 (Burke 等, 1987), 已在人类染色体制图研究中发挥了重要作用。其显著特征是能容纳大分子 DNA, 实验证明可将 100-1000kb 的外源 DNA 分子制备成酵母人工染色体 (YAC)。

目前, 对人类基因组的研究主要是采用“从上而下” (Top-down) 策略。其过程大致可分为以下主要步骤, (1) 单条染色体的分离纯化; (2) 单条染色体单拷贝 DNA 探针库的制备; (3) YAC 克隆库构建; (4) YAC 克隆筛选, YAC 大尺度物理图谱及 STS 图谱分析; (5) YAC 重叠群的构建及重叠群的串联; (6) Cosmid 亚克隆和 Cosmid 精细物理图谱分析; (7) 核苷酸顺序分析。由此可见 YAC 克隆在人类基因组分析中的重要性。YAC 克隆被称为人类基因组分析中的第一步, 也是最基本最重要的工作, 与入噬菌体和 Cosmid 克隆相比, 其效率估计要提高 100 倍。因此, 尽管 YAC 技术还处于发展阶段, 我们仍应尽快将其引入鱼类基因组分析中, 以加速鱼类基因定位的研究进展。

单配子 PCR 分型技术及其在鱼类 基因组分析中的应用潜力

构建基因图谱是基因精确定位和分析基因间距离所必不可少的环节。迄今用于人类基因组分析的图谱有多种, 如有关人 21 号染色体至少有 10 种不同类型的图谱 (Sefton 等, 1992; Patterson, 1992)。而最主要的图谱有两种, 即遗传图谱和物理图谱, 二者各有侧重, 互相补充。前面提到的几点设想主要与物理图谱有关, 而单配子 PCR 分型 (Single sperm or egg typing by PCR) 则是构建遗传图谱的新方法 (Li 等, 1988; Arnheim 等, 1990)^[13,14]。与传统的构建遗传图谱的方法, 如家系分析法相比, 该法具有简便, 快速的优点, 即能在较短的时间内分析大量的减数分裂产物, 能直接确定配子的基因型是亲本型还是重组型, 能快速统计重组频率, 且更为精细, 由家系分析法能有效区分的遗传距离一般大于 1-2cM (Centimorgan, 分摩), 而单配子 PCR 分型技术的分辨力能达到 0.1cM (Arnheim 等, 1991, 1992)。该法已卓有成效地应用于人类、牛等的单拷贝基因及微卫星 DNA 的遗传图谱的构建之中 (Goradia 等, 1991; Lewin 等, 1992; Cui 等, 1992; Hubert 等, 1992; Crouan-Roy 等, 1992)。

我们设想将该技术用于鱼类的理由是: (1) 该法简便, 快速, 分辨力高; (2) 鱼类中用于分析的单配子易于获得; (3) 部分鱼类家系分析十分困难, 必须采用新方法构建其遗传图谱。应用该技术的一个前提条件是必须已知多态 DNA 的侧翼顺序, 这可能也是该技术迄今应用不广的主要限制因素。但若将其与前已述及的 STMS 物理图谱和染色体片段的显微切割及微克隆等技术有机结合, 则必将在鱼类基因组分析中充分发挥其优势。

综上所述, 只要我们充分认识开展鱼类基因定位研究的重要性, 适当采用新的研究思路和技术路线, 完全可能迅速提高鱼类基因定位研究的整体水平。由于鱼类种类繁多, 很有必要优先选择一种或几种有代表性的鱼类进行重点研究, 以期为其余鱼类提供可资借鉴的经验, 资料及研究渠道。本室近年来对黄鳝基因组分析方面开展了一系列卓有成效的工作, 很有必要将其深化和提高。

参 考 文 献

- [1] 余其兴等, 1993. 黄鳝二价染色体高分辨G带制备及模式图构建. 中国科学 (B辑), 23 (9): 947-954.
- [2] 李奎等, 1993. 染色体原位杂交技术的新发展, 中国畜禽遗传育种进展, 120-122. 湖南科技出版社.
- [3] 张锡元等, 1989. 草鱼 β HCG基因同类物及其染色体定位. 遗传学报, 16 (4): 299-304.
- [4] 柴建华, 1993. 人类基因图谱分析进展. 生物工程进展, 14 (3): 14-24.
- [5] 匡达人, 1992. 首次完成第一条完整染色体 (酵母三号染色体) 315357bp的制图与测序. 国外医学——分子生物学分册, 14 (6): 251-253.
- [6] Olson, M. et al., 1989. A common Language for physical mapping of the human genome. Science, 245: 1434-1435.
- [7] Haley, C. S., 1993. Progress on gene mapping of domestic animals. Pig News and Information, 14(1): 13N-16N.
- [8] Nanda, I. et al., 1992. Early stages of sex differentiation in fish as analysed by simple repetitive DNA sequences. Chromosoma, 101: 301-310.
- [9] Estoup, A. et al., 1993. (AT) n and (GT) n microsatellites a new class of genetic markers for salmo trutta L. Heredity, 71: 488-496.

-
- [10] Beckmann, J. S. et al., 1990. Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. *Bio / technology*, 8(10): 930-932.
 - [11] Pendas, A. M. et al., 1993a. Replication banding patterns in Atlantic salmon. *Cytogenet. Cell Genet.*, 83: 128-130.
 - [12] Pendas, A. M. et al., 1993b. Ribosomal RNA genes are interspersed through out a heterochromatic chromosome arm in Atlantic salmon. *Chromosome Research*, 1: 63-67.
 - [13] Li, H. et al., 1988. Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm. *Nature*, 335: 414-417.
 - [14] Arnheim, N. et al., 1990. PCR analysis of DNA sequences in single cells: single sperm gene mapping and genetic disease diagnosis. *Genomics*, 8: 415-419.