

文章编号:1005-8737(2000)02-0014-04

9种鱼类非放射性DNA指纹图谱

王进科,夏德全

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心,江苏无锡214081)

摘要:用DIG标记Jeffreys人源小卫星33.6和33.15为探针,与青鱼、草鱼、鲢、鳙、鲤、团头鲂、鳊鱼、尼罗罗非鱼、奥利亚罗非鱼基因组DNA进行Southern杂交,获得多态性丰富的个体特异性DNA指纹图谱,建立了9种鱼类的非放射性DNA指纹图谱。用DIG标记小卫星探针制作鱼类DNA指纹图谱安全可靠,克服了用放射性元素标记探针制作鱼类DNA指纹图谱的限制和不足,拓宽了鱼类DNA指纹图谱的应用范围。9种鱼类的非放射性DNA指纹图谱研究也表明不同的DNA指纹探针在不同的鱼类上揭示的遗传信息不同,对鱼类的DNA指纹图谱研究应选择数个适宜的限制酶/探针组合。

关键词:鱼类;非放射性;DNA指纹图谱

中图分类号:Q78

文献标识码:A

1985年,Jeffreys创立了DNA指纹图谱技术^[1]。之后,这一先进的遗传标记系统被迅速广泛应用于动植物的遗传育种研究中,对动植物种群遗传变异、进化分类、血缘关系及物种鉴定等研究做出了突破性的贡献。鱼类DNA指纹的研究也已逐步发展起来。目前,国外对于鱼类DNA指纹图谱的研究主要是运用非鱼源性探针与各种鱼类基因组杂交,观察是否可产生高度多态的DNA指纹图谱^[2-9];也有部分鱼类研究者已成功地将这一技术用于鱼类遗传育种等研究中^[10-14]。然而,我国鱼类DNA指纹的研究及应用还基本处于空白^[15,16]。因此,本文尝试建立了9种鱼类的非放射性安全可靠的DNA指纹图谱,为这一技术成熟运用于我国鱼类遗传育种研究作出探索。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验鱼 青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)、

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙(*Aristichthys nobilis*)、鲤(*Cyprinus carpio*)、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)、鳊鱼(*Siniperca chuatsi*)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aureus*)均为从中国水产科学研究院淡水渔业研究中心实验渔场养殖鱼群体随机采样获得,每种鱼各采样10尾。

1.1.2 实验用探针 人源小卫星33.6和33.15由英国莱斯特大学Jeffreys教授惠赠。

1.1.3 实验用限制性内切酶 *Hinf*I、*Hae*III均为华美公司产品。

1.1.4 实验用DIG标记及检测试剂盒 为德国宝灵曼公司产品。

1.1.5 实验用尼龙膜 *N⁺-Hybond* nylon membrane为英国Amersham公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 人源小卫星探针33.6和33.15的DIG标记方法 同地高辛标记及检测试剂盒说明。

1.2.2 实验鱼基因组DNA的提取 同文献^[16]提取鱼血DNA的方法。

1.2.3 鱼类基因组DNA指纹图谱制作 同文献

收稿日期:1999-05-19

基金项目:国家自然科学基金(No.39670583);农业部科学基金(渔95-生-96-04)资助

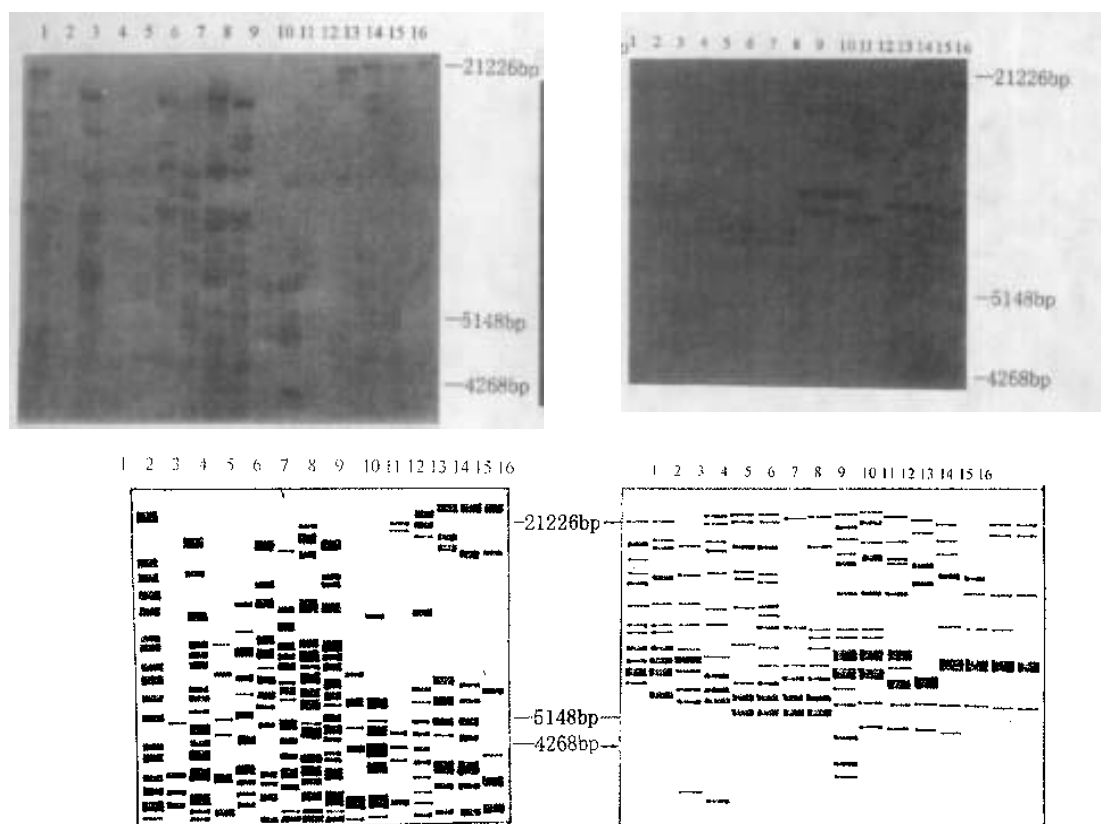
作者简介:王进科(1969-),男,甘肃人,南京师范大学生命科学学院讲师,博士,从事鱼类遗传育种及生物技术研究。

[16]及地高辛标记及检测试剂盒说明。

2 结果

运用小卫星探针 33.15 和 33.6 与 9 种鱼类基因组 DNA 杂交, 获得高度多态性和个体特异的 DNA 指纹图谱, 其中, Hae III/33.6、Hinf I/33.6 组合产生的 DNA 指纹图谱信息含量高(图 1); 在罗非鱼中, Hae III/33.6 组合、Hae III/33.15 组合时, Hae III/33.6 组合揭示更多位点的多态性(图 2)。9 种鱼获得的 DNA 指纹图谱带大小居于 4.2~21 kb 之间。当 Hae III/33.6 组合时, 获得的条带平均为青

鱼 11.5 条、草鱼 6.4 条、鲢 7.8 条、鳙 7.7 条、鲤 15.6 条、团头鲂 13.2 条、鳊 8.4 条; 而 Hinf I/33.6 组合时, 获得的条带平均为青鱼 11.2 条、草鱼 12.7 条、鲢 6.4 条、鳙 10.1 条、鲤 12.1 条、团头鲂 9.2 条、鳊 5.7 条。在罗非鱼上, Hae III/33.6 组合时, 奥利亚罗非鱼的平均条带数为 4.5 条、尼罗罗非鱼 6.6 条; Hae III/33.15 组合时, 奥利亚罗非鱼的平均条带数为 4.2 条、尼罗罗非鱼 4.4 条; Hinf I/33.6 组合时, 奥利亚罗非鱼的平均条带数为 3.9 条、尼罗罗非鱼 6.7 条; Hinf I/33.15 组合时, 奥利亚罗非鱼的平均条带数为 4.7 条、尼罗罗非鱼 4.5 条。



1- 青鱼 Black carp; 2- 鳊 Mandarin fish; 3-4- 鲤 Common carp; 5-9- 团头鲂 Bream; 10-11- 草鱼 Grass carp; 12- 鲢 Silver carp; 13-16- 鳙 Bighead carp.

图 1 Hae III/33.6 组合产生的鱼类 DNA 指纹图谱

Fig.1 Fingerprints produced by Hae III/33.6

1-4- Hae III 消化尼罗罗非鱼 DNA Hae III digested DNA of *O. niloticus*; 5-8- Hae III 消化奥利亚罗非鱼 DNA Hae III digested DNA of *O. aureus*; 9-12- Hinf I 消化尼罗罗非鱼 DNA Hinf I digested DNA of *O. niloticus*; 13-16- Hinf I 消化奥利亚罗非鱼 DNA Hinf I digested DNA of *O. aureus*.

图 2 33.15 探针产生的罗非鱼 DNA 指纹图谱

Fig.2 DNA fingerprints of Tilapia produced by 33.15

3 讨论

(1)本研究采用人源小卫星探针 33.15 和 33.6 与 9 种鱼类基因组 DNA 杂交, 获得高度多态和个体特异的 DNA 指纹图谱, 证明运用这两个人源小卫星制作鱼类 DNA 指纹图谱、进行鱼类遗传育种的研究是可行的。该研究是国内首次在多种鱼上用非同源小卫星探针建立 DNA 指纹图谱, 为 DNA 指纹图谱技术应用于我国鱼类遗传育种研究作出探索。

(2)本研究采用 DIG 标记探针, 经过一系列严密的实验设计及检测手段, 在国内首先建立安全可靠的鱼类非放射性 DNA 指纹图谱, 为这一技术更加广泛地应用于鱼类遗传育种研究作出成功探索。国内畜禽 DNA 指纹研究都采用放射性元素标记探针, 这种标记方式需要特殊的保护设备, 放射性容易造成对环境的污染及实验人员的危害; 而且放射性标记的探针半衰期短, 限制了探针的使用寿命。而用 DIG 标记探针时, 探针使用寿命长, -20°C 保存 1 年仍可使用。

(3)本研究实验鱼品种多, 而且为我国主要淡水养殖品种。用人源小卫星探针在 9 种鱼上检出多个位点的高度多态性, 获得的 DNA 指纹图谱具有个体特异性及种特异性, 这为运用 DNA 指纹图谱技术研究我国淡水养殖鱼类的种群遗传结构、进化关系、血缘关系、品种鉴定及遗传育种操作效应的监测提供了优秀的遗传标记系统。人源小卫星探针与多种鱼类基因组 DNA 杂交获得 DNA 指纹图谱, 说明多种鱼类的基因组中广泛存在与人源小卫星相关的重复序列, 对鱼类这些重复序列的进一步克隆分析, 可以开发出鱼类同源性 DNA 指纹图谱探针和鱼类分子遗传标记。

(4)本研究在 DNA 指纹图谱制作中发现, 运用 33.6 和 33.15 人源小卫星探针, 在四大家鱼及团头鲂上可检测出更多位点的遗传变异, 获得高度多态的 DNA 指纹图谱; 而在罗非鱼上检测出的位点较少。说明这 2 个小卫星探针对于四大家鱼及团头鲂的基因组进行 DNA 指纹图谱研究更适宜, 在四大家鱼及团头鲂的基因组中开发鱼类分子遗传标记材料更丰富。在罗非鱼上, 33.6 探针较 33.15 探针揭示更多位点的多态性, 获得的 DNA 指纹图谱信息含量高。因此, 33.6 更适合于罗非鱼群体的研究, 这和 Bentzen 等^[4]及 Harris 等^[6]运用 33.6 及 33.15 对罗非鱼进行 DNA 指纹研究的结果相同。

(5)本研究在 DNA 指纹图谱制作中, 对罗非鱼的 DNA 指纹图谱研究设计了 Hae III/33.6、Hae III/33.15、Hinf I/33.6 和 Hinf I/33.15 共 4 种酶/探针组合。结果表明, 4 种酶/探针组合在相同鱼上获得的 DNA 指纹图谱各不相同, 证明运用不同的酶/探针组合检测的是基因组中不同位点小卫星的多态性。因此, 在鱼类 DNA 指纹图谱的研究中应采用数个酶/探针组合进行实验, 可得到累加的全面反映基因组遗传变异的信息。

参考文献:

- [1] Jeffreys A J, et al. Individual specific 'fingerprints' of human DNA [J]. Nature, 1985, 316: 76-79.
- [2] Bentzen P, et al. A novel synthetic probe for DNA fingerprinting salmonid fishes [J]. J Fish Biology, 1993, 43: 313-316.
- [3] Bosworth B G. Restriction enzyme/multi locus probe combinations useful for DNA fingerprinting of the striped bass and their F_1 hybrid [J]. Aquaculture, 1994, 123: 205-215.
- [4] Bentzen P, et al. Cloning of hypervariable minisatellite and simple sequence microsatellite repeats for DNA fingerprint of important aquacultural species of salmonids and Tilapia [A]. T Burke, G Doli, A J Jeffreys & R Wolff eds. DNA fingerprinting: Approaches and Applications [C]. Switzerland: Birkhauser Verlag Basel, 1991.
- [5] Georges M, et al. DNA fingerprinting in domestic animals using four different minisatellites probes [J]. Cytogenet Cell Genet, 1988, 47: 127-131.
- [6] Harris A S, et al. DNA fingerprinting of Tilapia, *Oreochromis niloticus*, and its application to aquaculture genetics [J]. Aquaculture, 1991, 92: 157-163.
- [7] Majumdar V C, et al. DNA fingerprinting in indian major carps and Tilapia by Brin 2(8) and M13 probe [J]. Aquaculture Research, 1997, 28: 129-138.
- [8] Taggart J B, et al. Minisatellite fingerprints of salmonid fishes [J]. Animal Genetics, 1990, 21: 377-389.
- [9] Wright J M. DNA fingerprinting of fishes [M]. Hochachka P W & Mommsen T eds. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes [C]. Amsterdam: Elsevier, 1993. 2.
- [10] Carter R E, et al. The application of DNA fingerprinting in the analysis of gynogenesis in Tilapia [J]. Aquaculture, 1991, 95: 41-52.
- [11] Progh P A, et al. Genetically monomorphic brown trout (*Salmo trutta* L.) populations as revealed by mtDNA, multilocus and single-locus minisatellite (VNTR) analysis [J]. Heredity, 1997, 79: 208-213.
- [12] Rico C, et al. Spawning patterns in the three-spine stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) an evaluation by DNA fingerprinting [J]. J fish Biology, 1991, 39(supplement A): 151-158.
- [13] Gross M L, et al. Nest-specific DNA fingerprinting of small

- mouth bass in lake Opeongo, Ontario[J]. Transactions of the American Fisheries Society, 1994, 123:449 - 459.
- [14] Heath D D, et al. DNA fingerprinting used to test for family effects on precocious sexual maturation in two population of *Oncorhynchus tshawytscha* (chinook salmon) [J]. Heredity, 1994, 73:616 - 624.
- [15] 方盛国,等. 鱼类 LZFI DNA 指纹探针的制作[J]. 遗传学报, 1997, 24(1):7 - 14.
- [16] 简纪常. 鳙鱼小卫星 DNA 的克隆及特性分析[D]. 南京:南京农业大学, 1998.

Nonradioactive DNA fingerprints of 9 fishes

WANG Jin-ke, XIA De-quan

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

Abstract: The Hae III or Hinf I digested genomic DNA of black carp, mandarin fish, common carp, bream, grass carp, silver carp, bighead carp, *O. aureus* and *O. niloticus* were hybridized with DIG labeled human minisatellite 33.15 and 33.6. The results show that the DNA fingerprints with high polymorphism and individual distinctivity can be established. This suggests that nonradioactive DNA fingerprint can be used as an excellent molecular genetic marker in fish studies. The nonradioactive DNA fingerprints with DIG labelled minisatellites probe provides secure and convenient experimental operation and widens the usage of fish DNA fingerprinting. It is possible to develop fish homologous DNA fingerprinting probes and fish molecular genetic marker from genomic DNA of many kinds of fishes. The studies on DNA fingerprints of 9 fishes also show that different DNA fingerprinting probe discovers different genetic information in different fishes and it will be reasonable to select several proper restriction enzyme/probe combinations in fish DNA fingerprinting.

Key words: fish; nonradioactive; DNA fingerprint