

·研究简报·

鲮鱼 DAF 和 DNA 谱带的快速银染检测

郑光明, 朱新平, 刘毅辉, 罗建仁

(中国水产科学研究院珠江水产研究所; 中国水产科学研究院热带亚热带鱼类选育与养殖重点实验室, 广东广州 510380)

摘要:利用 20 个高 GC 含量的 8 bp 的随机引物开展野生鲮鱼(*Cirrhina molitorella*) DNA 扩增指纹的研究, 以建立鲮鱼 DNA 扩增指纹(DAF)技术, 包括引物设计、PCR 反应条件的设置。结果显示, DAF 引物浓度相对较高, 最佳引物浓度为 3.5 $\mu\text{mol/L}$ 。DAF 引物 pn-16(GCGACCTG)扩增表明, DAF 有好的重复性, 引物 pn-16 扩增特征性谱带可用于鉴定鲮鱼。DAF 扩增产物可揭示鲮鱼 DNA 的多态性。同时建立了 DNA 尿素-聚丙烯酰胺凝胶银染快速检测技术和最佳银染参数。银染检测大约需要 1 h, 建立包括固定、漂洗、染色、显色、停显色的银染程序和尿素-聚丙烯酰胺凝胶凝胶法与干法的保存方法。

关键词:鲮; DNA 扩增指纹; 银染

中图分类号:Q959.46 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2005)03-0336-04

鲮鱼(*Cirrhina molitorella*)是我国南方重要的经济鱼类之一, 其产量约占广东、广西两池塘养鱼总产量的 20%。鲮鱼具有产量高、抗病力强、肉质鲜美等特点, 是驰名中外的鱼类加工产品。有关其基础研究的报道较多^[1-4], 但遗传方面的研究偏少, 所以作者曾利用随机扩增产片断长度多态性 DNA(RAPD)开展了鲮鱼遗传多样性研究^[5-7], 结果表明鲮鱼遗传多样性偏低, 珠江不同江段鲮鱼生长变慢。DNA 扩增指纹(DNA amplification fingerprinting, DAF)可揭示植物和细菌等遗传精细结构, 确立与经济性状点紧密连锁的遗传标记^[8-10], 比 RAPD 能揭示更多的遗传多样性和更精密的遗传结构, 也更灵敏。本研究对鲮鱼 DAF 技术进行探讨, 以期开展鲮鱼遗传结构和生长相关的数量性状位点(QTL)研究。

1 材料与方法

1.1 材料

鲮鱼样本 19 尾, 采自珠江野生群体, 体重 100~700 g, 体长 15~30 cm。血液用无菌注射器从尾动脉采集, 每 6 mL 血液用 1 mL ACIX/ACD 成分为 0.48 g 的柠檬酸、1.32 g 柠檬酸钠和 1.47 g 的葡萄糖, 加蒸馏水至 100 mL 灭菌抗凝, 血液样品或加 2 倍体积无水乙醇的血液样品保存于 -20℃。

1.2 基因组 DNA 的提取

鲮鱼基因组 DNA 的提取按郑光明等的方法^[5-7], 利用上海生工公司的 SK1252 经典的基因组 DNA 提取试剂盒提取, 为了便于 DAF 分析, 将 DNA 稀释至 10 ng/ μL 。

1.3 DAF 引物和试剂

DAF 引物由上海生工公司合成, 根据作者先前研究的 RAPD 引物设计合成了 20 个 8-mer 的引物用于 DAF 分析(表 1), Taq DNA 聚合酶, Taq DNA 聚合酶 plus I 和 10 $\times$ PCR 扩增缓冲液, 25 mmol/L MgCl_2 , 尿素, 聚丙烯酰胺, N, N'-甲叉双丙烯酰胺, 三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐等为试剂, 其他化学试剂为分析纯。

1.4 DNA 扩增指纹(DAF)

DAF 分析根据 Caetano-Anollés 等稍作修改^[8]。取 8-mer 引物扫描而言, 50 μL 的 PCR 混合液含 1 $\times$ PCR 反应缓冲液(上海生工公司), 200 $\mu\text{mol/L}$ dNTPs, 2.5 mmol/L MgCl_2 , 3.5 $\mu\text{mol/L}$ 8-mer 引物, 2.5 u Taq DNA 聚合酶或 Taq DNA 聚合酶 plus I(不加 MgCl_2), 20 ng 基因组 DNA。DAF 程序在 Sprint PCR 热循环仪上进行。扩增条件如下: 94℃变性 5 min, 然后 94℃变 30 s, 36℃退火 1 min 20 s, 72℃延伸 1 min 30 s, 共 36 个循环, 72℃延伸 7 min。

1.5 凝胶电泳

用 SE400 垂直电泳系统(Amersham pharmacia biotech)进行 DNA 片断分离。凝胶与电泳缓冲液为 1 $\times$ TBE (100 mmol/L Tris-HCl, 83 mmol/L 硼酸, 1 mmol/L EDTA 钠盐(pH 8.0))。凝胶制备如下: 加 4 mL 去离子水, 4 mL 5 $\times$ TBE, 5.4 mL 30%的聚丙烯酰胺, N, N'-甲叉双丙烯酰胺(29:1)混合液和 9.4 g 尿素至一个干净的烧杯中, 摇匀, 加 160 μL 10% (mg/L) 过硫酸铵, 再加 7 μL TEMED, 混匀, 立

收稿日期: 2003-12-29; 修订日期: 2004-03-12。

基金项目: 国家自然科学基金面上基金(30271022); 广东省自然科学基金(001159)。

作者简介: 郑光明(1964-), 男, 硕士, 副研究员, 研究方向: 水产种质资源学和水产生物技术。Tel: 020-81616309 E-mail: ZGMZYL@scm.com

表1 DAF 引物序列和扩增片段

Tab.1 Details of DAF primer sequence and amplified fragments

编号 No.	DAF 引物序列 Primer sequence	GC/AT GC/AT	扩增片段数 Nos. of amplified fragments	编号 No.	DAF 引物序列 Primer sequence	GC/AT GC/AT	扩增片段数 Nos. of amplified fragments
PN-01	CACGTTGG	5:3	14	PN-11	GCCGCAAA	5:3	16
PN-02	CAGGGGCA	6:2	40	PN-12	CAGACACC	5:3	23
PN-03	TACTCCCC	5:3	23	PN-13	CGTCACTC	5:3	17
PN-04	CCGACCCA	6:2	50	PN-14	GTGCGGGT	6:2	20-33
PN-05	GACGCACA	5:3	20-29	PN-15	GCGACTGT	5:3	8
PN-06	TGAACGCC	5:3	14-16	PN-16	GCGACCTG	6:2	28
PN-07	GCCCAGAG	6:2	6-11	PN-17	TTGGGGAG	5:3	—
PN-08	CTCAGCTC	5:3	8-14	PN-18	CCGTACTG	5:3	9
PN-09	CCGGCTTG	6:2	10-20	PN-19	GTGAGGTC	5:3	26
PN-10	AACTGGGG	5:3	20-23	PN-20	TGCTCCGT	5:3	36

即加入 18 cm×16 cm 的 0.75 mm 凝胶槽中,在凝胶顶端插入梳子,让其充分固定。DNA 扩增产物的分离用 8% 聚丙烯酰胺-7 mol/L 尿素在 SE400 垂直电泳系统中进行,加 12 μ L 等体积的载样缓冲液(10 mol/L 尿素和 0.000 8% 二甲苯青 FF)和扩增产物于点样孔中,在 200 V 下电泳,电泳 5 h 30 min-6 h 后,当染料到达凝胶底部中停止电泳。

1.6 银染检测 DNA

电泳后的凝胶用 Bessam 等银染方法稍作修改后进行银染^[11]:①固定 15~20 min;②漂洗 3 次,每次 1~2 min;③染色 30 min;④漂洗 20~30 s;⑤显色 5~15 min 至最佳谱带获得止;⑥停显色。

1.7 凝胶的保存

凝胶的保存分干法和湿法保存。①湿法保存。将凝胶用 10% 冰乙酸固定后保存于-4℃冰箱中,这种方法保存的凝胶保存 1 年多也不影响谱带的变化。②干法保存。将凝胶用 10% 冰乙酸固定后,轻轻平铺于用胶片支撑的二层聚酯膜中间,封存四边,晾干 24 h,可长期保存 1 年多或更长时间。

1.8 凝胶的扫描

用 ScanMaker X12USL, MICROTE.K 扫描仪将显色后的凝胶扫描记录。

2 结果与讨论

2.1 DNA 扩增谱带

用 20 个 GC 含量相对高的 8 bp 的引物扩增获得了鲢鱼 DNA 扩增指纹图谱,这些用线性引物得到了其特征性指纹类型(表 1 和图版 I-A,B,C,D),DAF 的扩增片段数(6~50)比我们以前的 RAPD 片段数(1~9)多^[7],DAF 的引物终浓度较高,约 3.5 μ mol/L。由 8-mer,高 GC 的线性 DAF 引物扩增揭示的多态性谱带多于 10-mer RAPD 引物扩增结果。用同一引物 pn-16(GCGACCTG)和同样的 DNA 样本重复扩

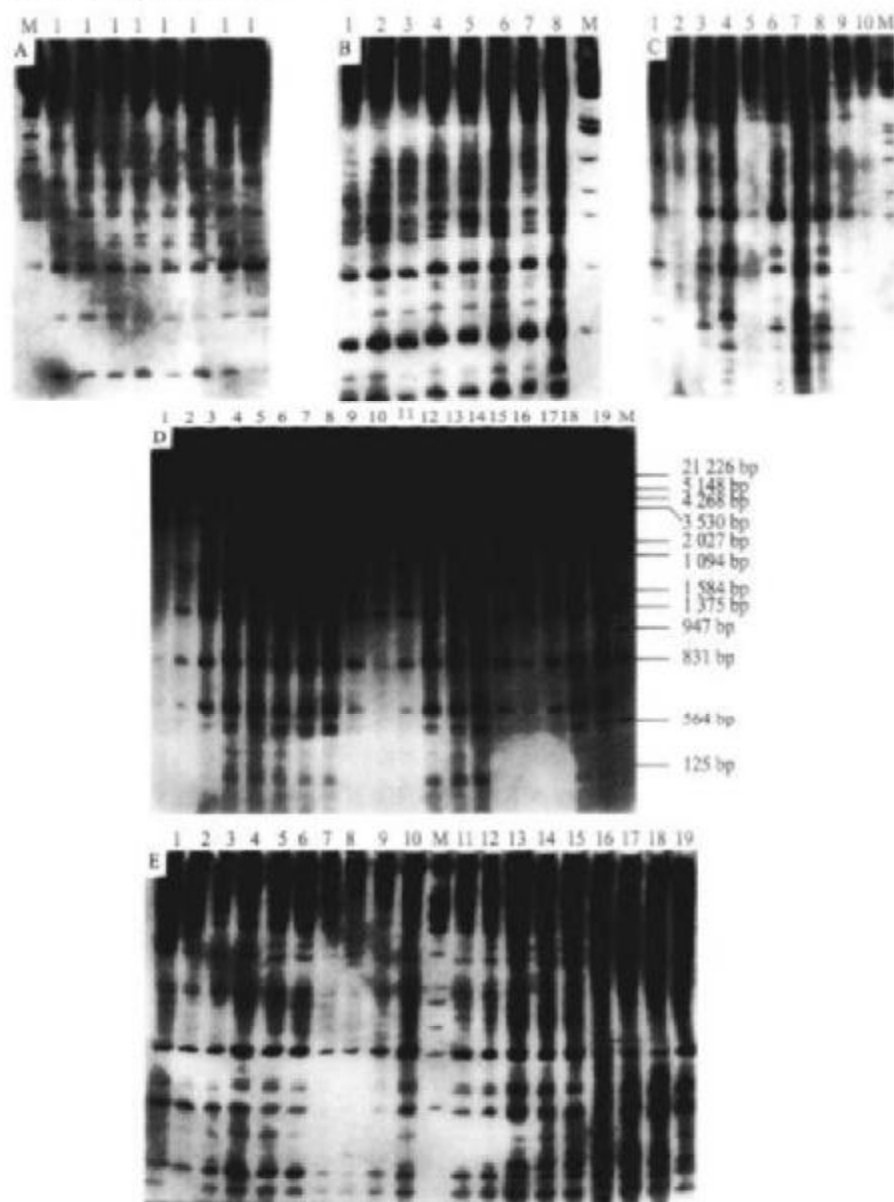
增得到同样的 DNA 谱带(图版 I-A),这种结果表明 DAF 有好的重复性。其他条件不变时,用 Taq DNA 聚合酶和 Taq DNA 聚合酶 plus I(不加 MgCl₂)扩增鲢基因组 DNA 时,发现用 Taq DNA 聚合酶 plus I 扩增的 DNA 谱带(图版 I-B,D)比用 Taq DNA 聚合酶扩增的 DNA 谱带明显(图版 I-A,C)。这表明 Taq DNA 聚合酶 plus I 比 Taq DNA 聚合酶有更好的扩增效果。同时,引物 pn-16(GCGACCTG)对 8 个不同的 DNA 样品扩增片段(<2 kb)没有显示多态性(图版 I-B),所以由此引物扩增的片段可作为鲢鱼特征性扩增片段用于鲢鱼的鉴定。而引物 pn-14(GTGCGGGT)图版 I-C,D),pn-05,pn-06,pn-07,pn-08,pn-09,pn-10(表 1),和 RAPD 引物 opm-19(CCTTCAGGCA)(图版 I-E)表明其具有多态性。

2.2 银染快速检测 DNA 谱带和银染条件

银染快速检测 DNA 谱带需 1 小时多,其程序共有 6 个步骤:固定,漂洗,染色,漂洗,显色与停止显色。银染条件包括银离子浓度与 AgNO₃ 染色时间,甲醛与硫离子浓度的作用,显色温度。研究表明,AgNO₃ 质量浓度为 1 mg/mL 和染色时间为 30 min 时可获得最佳灵敏度。最佳甲醛(37%~40%)体积分数为 1.5 μ L/mL,如果增加甲醛浓度灵敏度增加,但背景也增加,甲醛浓度高产生暗棕色带,相反低浓度的甲醛产生浅褐色带。使用高浓度的甲醛染色与显色时间相对减少,同时很难控制精确的显色,容易产生大的暗棕色 DNA 片段(>3 kb),这些大片断分析时不能用于计算。硫复合物形式溶解性的银盐,将银盐从凝胶表去掉,减少非特异性背景污染。为了增加银染灵敏度,用现配的显色液(冰冷)或显色液在-4℃放置 15 min 在室温下浸泡凝胶显色,增加胶表面与显色液的接触面,而不用像 Bessam 等使用支撑胶片,也不用在 10℃下显色^[11]。这种银染检测技术也适用于 RAPD 的扩增产物的检测(图版 I-E),扩增的片段比作者以前研究中 EB 染色的片段多^[3-7]。

郑光明等:鲢鱼 DAF 和 DNA 谱带的快速银染检测

ZHENG Guang-ming et al; DNA amplification fingerprinting of mud carp (*Cirrhina molitorella*) and fast silver staining of DNA profiles



图版 I DAF 谱带

A: 用引物 pn-16(GCGACCTG)和 *Taq* DNA 聚合酶对样本 1 重复扩增的谱带。B: 用引物 pn-16 和 *Taq* Plus I DNA 聚合酶对样本 1-8 扩增谱带。C: 用引物 pn-14(GTGCGGGT)和 *Taq* DNA 聚合酶对样本 1-10 扩增谱带,呈多态性。D: 用引物 pn-14 和 *Taq* Plus I DNA 聚合酶对样本 1-19 扩增谱带,也是多态性。E: RAPD 引物 opm-19 对样本 1-19 用银染技术扩增的谱带。M: λ DNA/*Eco*RI + *Hind* III marker。

Plate I DAF profiles

A: Repetition amplification profiles of Sample 1 with Primer pn-16(GCGACCTG), using *Taq* DNA Polymerase. B: Amplification profiles of Samples 1 to 8 with Primer pn-16, using *Taq* Plus I DNA Polymerase (not to add $MgCl_2$). C: Amplification profiles of Samples 1 to 10 with Primer pn-14(GTGCGGGT), using *Taq* DNA Polymerase, revealing polymorphism. D: Amplification profiles of Samples 1 to 19 with Primer pn-14, using *Taq* DNA Plus I Polymerase (not to add $MgCl_2$), revealing polymorphism too. E: Amplification profiles of Samples 1 to 19 with RAPD Primer opm-19, using silver staining protocol. M: λ DNA/*Eco*RI + *Hind* III marker.

参考文献:

- [1] 吴力钊,王祖熙. 鲢鱼和二代混精鲢鱼低温时耐受能力的差异[J]. 水生生物学报, 1993, 17(3): 206-210.
- [2] 朱新平,刘家照,夏仕玲,等. 外源 DNA 对鲢鱼脑乙酰酯酶的影响[J]. 淡水渔业, 1996, 26(6): 7-8.
- [3] 朱新平,夏仕玲,张跃,等. 转抗冻蛋白基因鲢鱼的初步研究[J]. 中国水产科学, 1997, 4(2): 79-80.
- [4] 朱新平,夏仕玲,刘家照,等. 鲢鱼总 DNA 对鲢鱼抗寒性能的影响[J]. 淡水渔业, 1996, 26(3): 14-16.
- [5] 郑光明,朱新平,张跃,等. RAPD 鉴定 3 种鲢的研究[J]. 华中农业大学学报, 1999, 18(4): 371-374.
- [6] 郑光明,张跃,朱新平,等. 鲢、鳊和野鲮之 RAPD 的遗传标记[J]. 上海水产大学学报, 1999, 8(3): 215-220.
- [7] 郑光明,朱新平,张跃,等. 珠江流域不同江段鲢鱼遗传差异性研究[J]. 农业生物技术学报, 2001, 9(2): 178-182.
- [8] Caetano-Anollis G, Bassam B J, Gresshoff P M. DNA amplification fingerprinting: A strategy for genome analysis[J]. Plant Mol Biol Reporter, 1991, 9(4): 294-307.
- [9] Caetano-Anollis G, Bassam B J, Gresshoff P M. Enhance detection of polymorphic DNA by multiple arbitrary amplification of endonuclease-digested DNA: identification of markers tightly linked to the supernodulation locus in soybean[J]. Mol Gen Genet, 1993, 241: 57-64.
- [10] Caetano-Anollis G, Trigiano R N, Windham M T. Sequence signatures from DNA amplification fingerprintings reveal fine population structure of the dogwood pathogen *Discula destructiva*[J]. FEMS Microbiol Lett. 1996, 145(3): 337-383.
- [11] Bassam B J, Caetano-Anollis G, Gresshoff P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels[J]. Anal Biochem, 1991, 196(1): 80-83.

DNA amplification fingerprinting of mud carp (*Cirrhina molitorella*) and fast silver staining of DNA profiles

ZHENG Guang-ming, ZHU Xin-ping, LIU Yi-hui, LUO Jian-ren

(Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishes of Breeding and Cultivation, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: DNA amplification fingerprinting of genome DNA of wild mud carp (*Cirrhina molitorella*) were obtained using 20 8-mer primers with high GC content. The DNA amplification fingerprinting technique was established, including primer device, and PCR reaction condition. In the condition, primer concentration was relatively high, and 3.5 $\mu\text{mol/L}$ was the maximum. DAF had good repetition using primer pn-16 (GCGACCTG); the characteristic DNA amplification profiles of Primer pn-16 were identified in mud carp. DNA amplification fingerprinting of some primers revealed DNA polymorphic. Mean while, fast silver staining of DNA profiles in urea-polyacrylamide gel was applied in DNA amplification fingerprinting. The best silver staining condition parameters was obtained, including the silver concentration and length of AgNO_3 impregnation, the effects of formaldehyde and thiosulfate concentration, and the imaging development temperature. The concentration of AgNO_3 1 g/L and impregnation of 30 min could get optimal sensitivity. The optimal formaldehyde (37% - 40%) concentration was 150 $\mu\text{L/L}$. 2 mg/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ was optimal concentration for reducing nonspecific background staining. The silver staining technique was also applied to the identification of mud carp by RAPD Primer. The silver staining procedure included fixing, rinsing, impregnating, developing and stopping. The method of wet and dry preserved gels was established.

Key words: mud carp; DNA amplification fingerprinting; silver staining