

四个探针产生的家禽 DNA 指纹图谱

孟安明 齐顺章

官桂芬

(北京农业大学生物学院, 北京 100094) (北京市种禽公司, 北京 102209)

提 要

对四个多位点小卫星探针 33.6, 33.15, α 珠蛋白-3'HVR 和 M13 用于家禽的 DNA 指纹分析的可行性进行了探讨, 较详细地报导了用不同探针在鸡、鸭、鹌鹑上产生 DNA 指纹图的方法。结果表明, 用我们所采用的方法, 四个探针都能在鸡、鸭、鹌鹑上产生信息量大、分辨率较高的 DNA 指纹图。

关键词 多位点小卫星探针, DNA 指纹图, 家禽

多位点小卫星探针 (multilocus minisatellite probe) 即多核探针 (polycore probe), 都是由某一寡核苷酸(即核心序列)多次重复而成。这些探针能与多种生物的染色体组 DNA 酶切片段杂交, 产生具有个体特异性的 DNA 指纹图谱 (DNA fingerprint)^[1,2]。DNA 指纹技术已广泛地用于人类医学、法医学、群体遗传学和分类学等领域的有关研究上^[3-5], 越来越受到重视。虽然目前多位点小卫星探针已有数十个之多, 但用得最多的是人源小卫星探针 33.6 和 33.15^[1], 以及噬菌体 M13 (其有效序列为蛋白质 III 的编码区)^[2]。要获得信息量大、分辨力高的 DNA 指纹图, 需根据所研究的物种和采用的探针, 摸索一套合适的实验技术和方法。我们就四个探针——33.6, 33.15, α 珠蛋白-3'HVR (3HVR)^[6,7] 和 M13 产生鸡、鸭和鹌鹑的 DNA 指纹图的技术和方法进行了探讨, 获得了重复性好、清晰的 DNA 指纹图。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

鸡、鸭、鹌鹑的血液样品采自北京市种禽公司, 同种家禽的三个个体从同一品系随机选取。含有探针 33.6, 33.15 和 3HVR 的质粒 pSPT

19.6, pSPT18.15 和 p3'HVR 从英国诺丁汉大学遗传系获得, M13mp19 为本室保存。

各种内切酶及多引物标记盒 Primer-a-Gene® Labeling System 购自 Promega 公司。[α -³²P] dCTP 购自北京福瑞生物工程公司。尼龙膜 Hybond-N 为 Amersham 产品。

1.2 染色体组(核) DNA 的提取

将贮存于-70℃的肝素抗凝全血解冻, 每样品取约 30 μ l 血液溶解于 0.5ml 的 SET 溶液 (15m mol/L NaCl, 50m mol/L Tris · HCl, pH8.0, 1m mol/L EDTA), 加入 8 μ l 25% SDS 和 15 μ l 蛋白酶 K (10mg/ml), 充分混匀后置 55℃水浴中过夜。用等体积 Tris 饱和酚抽提两次, 用酚/氯仿/异戊醇 (24:23:1, V/V/V) 及氯仿/异戊醇 (23:1, V/V) 各抽提一次, 吸取上层水相加 2 倍体积预冷至-20℃的无水乙醇沉淀 DNA。离心后得到的 DNA 沉淀经 70%乙醇冲洗、干燥后, 加入 150—200 μ l TE (10m mol/L Tris · HCl, 1m mol/L EDTA, pH8.0), 于 55℃下溶解(约需 24h)。按此法一般每样品可以得到 100—150 μ g DNA。

1.3 电泳及转移

每样品取约 $8\mu\text{g}$ DNA, 加 10U HinfI 按厂家推荐的条件于 37°C 水浴中过夜. 酶切片段用 22cm 长的 0.8% 琼脂糖凝胶、在 $1\times\text{TAE}$ 缓冲液 (40mmol/L Tris, 1mmol/L EDTA, pH8.0, 5mmol/L 醋酸钠) 和 1.5V/cm 电压条件下电泳分离 48h. 然后将胶依次在 0.2 mol/L HCl 中处理 20 min, 在变性液 (1.5 mol/L NaCl, 0.5mol/L NaOH) 中处理 30 min, 在碱性转移液 (1.5 mol/L NaCl, 0.25 mol/L NaOH) 中处理 15min, 按 Southern 印迹法在碱性转移液中将 DNA 转移到尼龙膜上.(用硝酸纤维膜时不可采用此法.)将膜在 80°C 烘烤 2h 待用.

1.4 探针的制备

含有各种人源小卫星探针的质粒及 M 13 mp 19 按 Sambrook 等介绍的方法扩增和提纯^[12]. 所有质粒 DNA 经 Hind III 和 EcoRI 双酶切和电泳, 回收相应的探针片段. 用 ClaI 酶切双链 M13mp19 DNA 待用.

用多引物标记盒和 $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ dCTP, 按生产厂家的说明标记探针. 每个标准反应用 50ng DNA. 用离心柱层析法除去未掺入的脱氧核苷酸. 我们的标记产物的放射比活性一般为 $5\times$

$10^8\text{--}1\times 10^9\text{ cpm}/\mu\text{g}$ DNA. 制备的探针置于沸水中煮 5min 变性, 然后放在冰水中待用.

1.5 杂交和洗脱

对于各种探针, 杂交和洗脱都在 65°C 下进行.

1.5.1 M 13 和 3HVR: 将膜浸入预杂交液 [1% 脱脂牛奶粉、0.02% 叠氮钠、 $5\times\text{SSC}$ ($1\times\text{SSC}$ 为: 150mmol/L NaCl, 15mmol/L 柠檬酸钠, pH7.0), 1% SDS] 中, 预杂交 6—8h. 然后弃去预杂交液, 加入预热至 65°C 的杂交液 ($5\times\text{SSC}$, 1% SDS) 和变性的探针 ($2.5\text{--}3.0\times 10^5\text{ cpm}/\text{ml}$), 杂交 13—15h. 弃去杂交液, 用 $5\times\text{SSC}$, 0.1% SDS 洗脱两次, 各 30 min; 再用 $2\times\text{SSC}$, 0.1% SDS 洗脱 45min. 将膜凉干, 用保鲜膜包好.

1.5.2 33.6 和 33.15: 基本同上. 不同之处为预杂交液含 1% 脱脂牛奶粉, 0.02% 叠氮钠, $1\times\text{SSC}$, 1% SDS, 杂交液为 $1\times\text{SSC}$, 1% SDS; 用探针 33.6 时, 以 $1\times\text{SSC}$, 0.1% SDS 洗脱三次, 各 30min; 用 33.15 时, 先用 $1\times\text{SSC}$, 0.1% SDS 洗脱两次各 30 min, 再用 $0.6\times\text{SSC}$, 0.1% SDS 洗脱 45min.

将膜和 X 光片放入有两张增感屏的暗盒

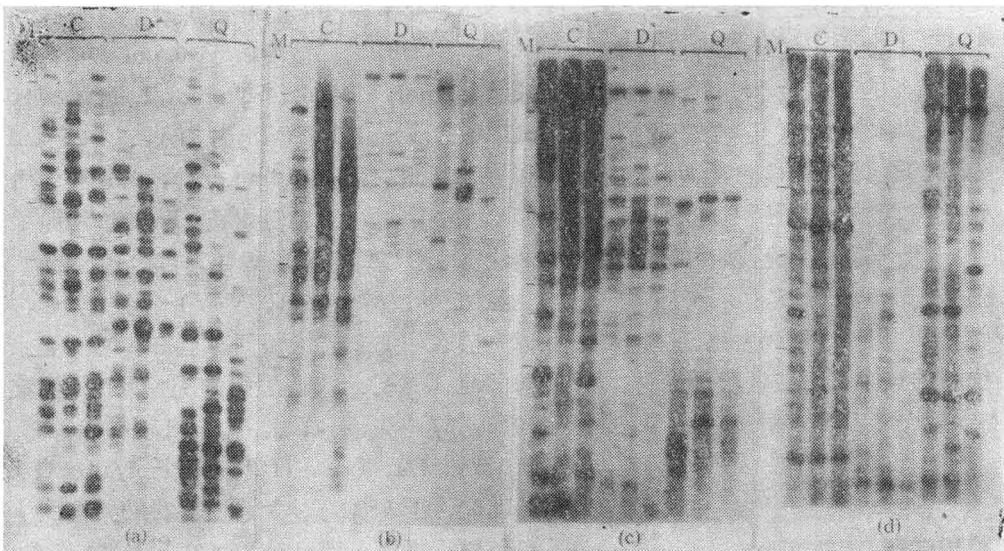


图 1 四个探针产生的家禽 DNA 指纹图

四幅照片所用探针分别为: (a) 33.6; (b) 33.15; (c) M13; (d) 3HVR

每种家禽选三个个体. C: 鸡; D: 鸭; Q: 鹌鹑. M 注明的是分子量标志, 为 λDNA HindIII 酶切片段; 从上至下分别为 23.1kb, 9.4kb, 6.6kb, 4.4kb

中, 于 -70°C 放射自显影 10h—3d, 经显影和定影后得到 DNA 指纹图谱。

2 结果和讨论

2.1 不同探针的杂交和洗脱条件

如图 1 所示, 四个探针在低强度的杂交和洗脱条件下, 能与三种家禽的核 DNA 的众多 HinfI 酶切片段杂交, 产生高度变异的 DNA 指纹图。由于四个探针的核心序列 (core sequence) 不同 (表 1), 被测家禽小卫星与各个探针在序列上的同源性程度不同, 因此不同的探针要求不同的杂交和洗脱强度。为了找到合适的杂交和洗脱强度, 较简单的办法是逐渐降低预杂交和杂交溶液的离子强度。我们发现, 用 3 HVR 和 M13 产生家禽的 DNA 指纹图需较低强度的杂交和洗脱条件, 即杂交时用 $5 \times \text{SSC}$, 洗脱用 $2 \times \text{SSC}$, 说明这两个探针与家禽小卫星的同源性较低。而探针 33.6 和 33.15 在较高的杂交和洗脱强度 (即较低的离子强度) 下能够产生带数相当的图谱, 说明它们与家禽小卫星的同源性相对较高。

表 1 四个探针的核心序列

探针	核 心 序 列
33.6	(5'-AGGGCTGGAGG-3'),
33.15	5'-AGAGGTGGGCAGGTGG-3'
3HVR	5'-GNGGGG(N)ACAG-3'
M13	5'-GAGGGTGGNGGNTCT-3'

2.2 不同家禽的 DNA 指纹图的特点和变异程度

我们从图 1 可看到, 同一探针在不同家禽上产生的 DNA 指纹图在带数、带的深浅和带的分布上有不同的特点, 因而 DNA 指纹图有一定的物种特异性。另一方面, 用不同探针获得的同一个体的 DNA 指纹图在很大程度上是不一样的, 仅有很少的带相同, 说明不同探针与家禽基因组中不同家族的小卫星有同源性, 用几个探针所获得的信息是可以累加的。

2.2.1 鸡: 不同探针产生的 DNA 指纹图在带数 (n) 上差异不大 (表 2), 带的分布及带

的深浅都比较均匀。两个个体具有同一条带的概率, 即相似系数 (F), 因探针引起的变化不大 (表 2)。用探针 33.6, 33.15, 3HVR 和 M13 时, 两个个体具有相同 DNA 指纹图的概率 (F^*) 分别为 2.3×10^{-8} , 4.0×10^{-9} , 1.5×10^{-8} , 8.0×10^{-9} 。由此可见, 无论用何种探针, 得到的 DNA 指纹图都具有个体特异性。这里需要说明的是, 实验所用的三只鸡来源同一个经过选择的品系, 系内个体之间的遗传变异性显著地低于市场上的商品鸡 (另文在准备之中)。

表 2 四个探针产生的家禽 DNA 指纹图的比较

探针		33.6	33.15	3HVR	M13
鸡	带 数	30.3	31.3	31.0	31.0
	相似系数	0.56	0.54	0.56	0.55
	相同图谱概率	2.3×10^{-8}	4.0×10^{-9}	1.5×10^{-8}	8.0×10^{-9}
鸭	带 数	32.0	26.0	29.7	32.7
	相似系数	0.43	0.42	0.42	0.44
	相同图谱概率	1.9×10^{-12}	1.6×10^{-10}	6.5×10^{-12}	2.2×10^{-12}
鹌鹑	带 数	31.3	26.7	29.7	27.0
	相似系数	0.31	0.27	0.38	0.36
	相同图谱概率	1.2×10^{-16}	6.6×10^{-16}	3.3×10^{-13}	1.1×10^{-12}

带数和相似系数为平均数。相似系数 (F) = $\frac{2N_{AB}}{N_A + N_B}$,

其中 N_{AB} 为个体 A 和 B 所共有的带数, N_A 和 N_B 分别为个体 A 和 B 的总带数。相同图谱概率 = F^n , 式中 $\bar{n}$ 为平均带数, F 为平均相似系数。

2.2.2 鸭: 用 33.6 和 M13 获得图的带数较多, 带也较深。而探针 33.15 产生的 DNA 指纹图在 $<4.5 \text{ kb}$ 的区域只有很少的浅带, 探针 3HVR 产生的 DNA 指纹图的绝大部分带都极浅。用不同探针产生的鸭的 DNA 指纹图的平均相似系数为 0.42—0.44, 差异不大。

2.2.3 鹌鹑: 用 33.6 和 3HVR 获得图的带数较多, 带分布较均匀, 带的深浅差异不大。用 33.15 和 M13 产生的 DNA 指纹图, 总的带数较少, 浅带占多数。各种探针产生的 DNA 指纹图的变异性很高, 但用 33.15 得到的图谱的变异性明显地高于其它三个探针产生的图谱。

综上所述, 四种探针都适合做鸡的 DNA

指纹分析,而分析鸭时,用 33.6、33.15 和 M13 较好。分析鹌鹑时,用 33.6 和 3HVR 最好。

2.3 DNA 指纹图的重复性

我们在实验中发现:同一样品从酶切开始分成几份平行处理,同胶或不同胶电泳,同次或不同次杂交,得到的 DNA 指纹图谱几乎是一致的(如图 2)。主要差异表现在同一条带在不同胶中的迁移率不同(但相对位置不变),以及个别极浅的带的增减。影响前者的因素是电泳条件(如缓冲液的浓度、温度、电压、时间),影响后者最主要因素是杂交条件。我们建议:

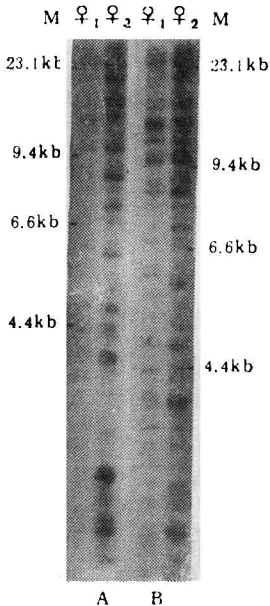


图 2 DNA 指纹图的重复性

将两只鸡(♀1 和 ♀2)的 DNA 各取两份,每份约 8 μ g,用 *Hinf*I 酶切后,在不同胶(A, B)上电泳,胶浓度和电泳的电压及时间相同。DNA 片段转移到膜上后,将膜放在同一杂交盒中与探针 33.6 杂交。M 注明的是分子量标志,为 λ DNA *Hind*III 酶切片段

当用 DNA 指纹技术进行群体分析时,所有样品应同次杂交;在计算 DNA 指纹图的带数时,图中太浅的带不应计数。由于不同批次杂交和洗脱时的温度和离子强度很难控制到完全一致,采取上述措施可以降低实验误差。

参 考 文 献

- 1 Jeffreys A J, Wilson V, Thein S L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 1985; 314: 67
- 2 Jeffreys A J, Wilson V, Thein S L. Individual specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature*, 1985; 316: 76
- 3 Jeffreys A J, Brookfield J F Y, Semeonoff R. Positive identification of an immigration test-case using DNA fingerprints. *Nature*, 1985; 317: 818
- 4 Thein S L, Jeffreys A J, Gooi H C *et al.* Detection of somatic changes in human cancer DNA by DNA fingerprint analysis. *British J Cancer*, 1987; 55: 353
- 5 Kuhnlein U, Dawe Y, Zadwony D *et al.* DNA fingerprinting: a tool for determining genetic distances between strains of poultry. *Theor Appl Genet*, 1989; 77: 669
- 6 Gilbert D A, Lehman N, O'Brien S J *et al.* Genetic fingerprinting reflects population differentiation in the California Channel Island fox. *Nature*, 1990; 344: 764
- 7 Reeve H K, Westneat D F, Noon W A *et al.* DNA "fingerprinting" reveals high levels of inbreeding in colonies of the eusocial naked mole rat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; 87: 2496
- 8 李伯龄,倪锦堂,叶健等. α -珠蛋白-3'HVR 探针 DNA 指纹图法医应用的研究. *遗传学报*, 1991; 18(3): 200
- 9 Vassart G, Georges M, Monsieur R *et al.* A sequence of M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA. *Science*, 1987; 235: 683
- 10 Higgs D R, Goodbourn S E Y, Wainscoat J S *et al.* Highly variable regions flank the human alpha-globin genes. *Nucleic Acids Res*, 1981; 9: 4213
- 11 Fowler S J, Gill P, Werrett D J *et al.* Individual specific DNA fingerprints from a hypervariable region probe: alpha-globin 3'HVR. *Human Genetics*, 1988; 79: 142
- 12 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; 1.21

(上接第 145 页)

参 考 文 献

- 1 Nagata S, Taira H, Hall A *et al.* Synthesis in *E. coli* of a polypeptide with human leukocyte interferon activity. *Nature*, 1980; 284: 316
- 2 McCandless R, Sloma A, Pestka S. Use of DNA bound to filters for selection of interferon-specific nucleic acid sequence. *Methods Enzymol*, 1981; 79: 618

- 3 Lubbert H, Hoffman B J, Snutch T P *et al.* cDNA cloning of a serotonin 5-HT_{1c} receptor by electrophysiological assays of mRNA injected xenopus oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84: 4332
- 4 Thomas D, Surdin-Kerjan Y. An improved strategy for generating a family of unidirectional deletions on large DNA fragments. *GATA*, 1990; 7(4): 87
- 5 徐 洵,刘震乾主编. DNA 重组技术. 北京: 科学出版社, 1990: 63—64