

用随机扩增多态性 DNA 产物做探针 产生鸡的 DNA 指纹图*

杨绍清

孟安明¹⁾

(中国科学院动物研究所, 北京 100080)

(清华大学生物科学与技术系, 北京 100084)

摘要 我们用 12 个随机扩增多态性 DNA (RAPD) 引物对来自不同品系的 4 只鸡进行了 RAPD 分析, 在扩增出的共 99 条带中, 表现多态性的带为 38 条, 占总带数的 38%。回收了 4 个表现个体特异性的 RAPD 产物, 当用鸡的基因组总 DNA 探针与它们杂交时, 其中 3 个表现阳性, 说明 RAPD 方法扩增出的高变异产物含有重复序列。用含重复序列的个体特异性 RAPD 产物作探针, 与无关个体鸡基因组 DNA 的 *Hae* III 酶切产物进行 DNA 印迹, 获得了变异性较高的 DNA 指纹图谱。因此, 高变异的 RAPD 产物可以有效地用作 DNA 指纹探针。

关键词 鸡, 探针, DNA 指纹图谱, 随机扩增多态性 DNA

学科分类号 Q38, S813.2

由于 DNA 指纹图谱具有高度的变异性, 因而已广泛应用于动植物及微生物的群体遗传分析。传统的 DNA 指纹分析需要采用特定的 DNA 指纹探针, 目前应用较多的探针类型有小卫星探针和微卫星探针^[1,2]。获得这些探针需要建立基因文库, 然后从中筛选, 实验过程比较繁琐^[3]。而人工合成的某些微卫星序列如 (CAC)_n 等, 因其较短 (小于 20 bp), 需采用末端标记, 杂交信号通常较弱。目前通用的 DNA 指纹探针数量有限, 使该技术的应用受到限制。因此, 有必要寻找一种快速简便的获取 DNA 指纹探针的途径。随机扩增多态性 DNA (randomly amplified polymorphic DNAs, RAPD) 是用随机引物与基因组 DNA 混和, 在低严谨条件下 (通常采用较低的退火温度), 引物与基因组中的两个反向重复序列结合形成双链, 当两个结合区之间的间距在 Taq DNA 聚合酶延伸能力之内, 就会被有效扩增。经电泳分离后, 如果以不同基因组为模板获得的扩增产物的长度不同, 则表明被扩增的区域具有多态性^[4]。我们以 RAPD 引物扩增 4 个不同品系鸡个体基因组 DNA, 回收个体特异性产物, 以其作探针与鸡基因组 DNA 的 *Hae* III 酶切产物进行 DNA 印迹实验, 获得了高变异性的 DNA 指纹图。

1 材料与方法

1.1 材料

用于 PCR 分析的鸡血样由北京市种禽公司提

供, 用于 DNA 印迹的 6 个无关个体购自集贸市场。

同位素 [α -³²P] dCTP 购自北京市福瑞生物工程公司。其他主要试剂购自华美和 Promega 等公司。RAPD 引物购自 Operon 公司。

P01: TACAACGAGG;	P02: TGGATTGGTC;
P03: TCGGTCATAG;	P04: TACCTAAGCG;
P05: GATCATAGCG;	P06: CCGAATTCCC;
P07: GGGAATTCCG;	P08: CGATATCCCC;
P09: CAAGCTTCCC;	P10: GGTGCATCTG;
P11: AGCAGCGCAC;	P12: GGGTCTCGGT.

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取、酶切、电泳及 DNA 印迹: 按文献 [5] 方法提取染色体 DNA, 用 *Hae* III 酶切 DNA, 每样品 8 μ g。按文献 [6] 的方法将胶中的 DNA 转移到尼龙膜上。

1.2.2 RAPD-PCR 反应: 在每 25 μ l 反应体积中加入 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μ l, 20 mmol/L dNTP 2 μ l, 引物 50 ng, 模板 DNA 40 ng, Taq DNA 聚合酶 1.5 U, 用水补充至 25 μ l。反应条件是: 先在 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 然后进行下列温度循环: 94 $^{\circ}$ C 1 min, 36 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 共循环 42 次。最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。以 1.4% 的琼脂糖电泳分离 PCR 产物, 回收特异性产物作探针。

* 国家自然科学基金资助项目 (39570386)。

¹⁾ 通讯联系人。

Tel: (010) 62772256, E-mail: mengam@mail.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 1999-07-19, 修回日期: 1999-11-24

1.2.3 探针制备: 用 Promega 公司的随机引物标记试剂盒标记: 先将 50 ng 模板 DNA (鸡基因组 DNA 或回收的个体特异性 RAPD 产物) 放入一个新的 0.5 ml 离心管中, 于沸水中煮 5 min, 取出插入冰中, 然后依次加入 5× 标记缓冲液 10 μl、未标记的 dATP/dGTP/dTTP 混合液 2 μl, 10 g/L 乙酰化 BSA 2 μl, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP (3.7×10^5 Bq/μl) 5 μl, Klenow 酶 (3 U/μl) 1 μl, 加灭菌双蒸水至终体积 50 μl. 混合后在 37℃ 保温 2~4 h, 然后加入等体积的标记反应终止液终止反应. 标记的探针直接用于杂交反应.

1.2.4 杂交和放射自显影: 将待杂交的膜放入杂交管中, 每管加入 15 ml 预冷的杂交液 (0.5 mol/L 磷酸盐缓冲液 pH 7.2, 7% SDS, 1 mmol/L EDTA) 中, 于 55℃ 下预杂交 1 h, 加入变性的标记探针于 55℃ 下杂交 15 h 左右. 然后弃去杂交液, 用 0.5× SSC, 0.1% SDS 洗膜 2 次, 每次 20 min. 将膜取出晾干, 用保鲜膜包好于 -70℃ 放射自显影 2 d.

1.2.5 统计方法: 根据显影胶片, 计算相似系数 (F)、变异系数 (D)^[7], 其中 $F = N_{ab} / (N_a + N_b)$, N_a 和 N_b 分别为个体 A 和 B 的条带数, N_{ab} 为二者共有的条带数. 该值反映个体间 DNA 指纹图的相似程度. 变异系数 $D = 1 - F$, 反应个体间的变异程度.

2 结 果

2.1 通过 RAPD 扩增寻找个体特异性 DNA 片段

我们对来自不同品系鸡的 4 个个体, 以 12 个 RAPD 引物对其进行了扩增分析. 12 个引物在 4 个个体中得到了不同程度的扩增, 共扩增出 99 条带. 其中多态性带 38 条, 占总带数的 38%; 其余 61 条带在所测试的 4 个个体间无变异性. 用大多数引物扩增后的产物在 4 个个体中没有带型差异, 只有带的强弱之分. 表现多态性的带中只有 4 条具有个体特异性, 其他多态性带出现于 2~3 个个体中. 我们回收了 4 个个体特异性产物, 分别命名为 P0801、P0901、P1201、P1221, 如图 1a 所示.

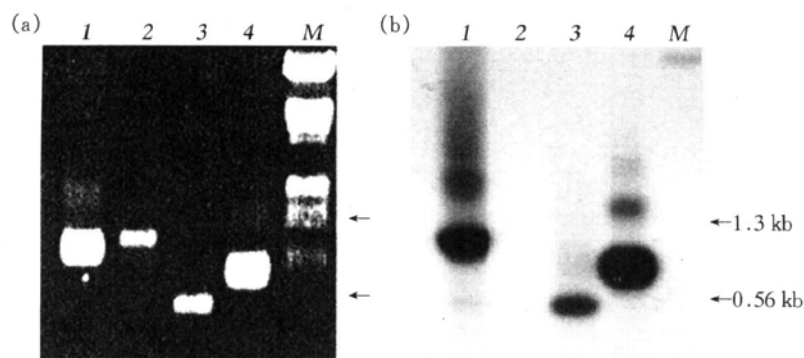


图 1 个体特异性 RAPD 产物

(a) 回收的 4 个个体特异性 RAPD 产物的凝胶电泳图; (b) 凝胶上的 DNA 片段与鸡的基因组总 DNA 探针的杂交图.

1: P0901; 2: P0801; 3: P1221; 4: P1201; M: M (Eco RI + $Hind$ III) 分子质量标准.

2.2 个体特异 DNA 片段与基因组探针杂交

将图 1a 中的 4 个个体特异性产物转移到尼龙膜上, 以标记的鸡基因组 DNA 作探针进行杂交, 除 P0801 外, P0901、P1201、P1221 都出现了信号, 见图 1b.

2.3 四个探针产生的 DNA 指纹图

以回收的 P0801、P0901、P1201、P1221 作探针, 与随机选取的 6 只鸡的基因组 DNA 的 Hae III 酶切产物进行 DNA 印迹实验. 如图 2 所示, 除 P0801 外, 其余 3 个含重复序列探针均获得了带数

多、变异性高的杂交图谱, 就像 DNA 指纹图谱一样. 不同探针在不同个体上产生的图谱的带数、带的深浅和带的分布上有不同的特点. 变异程度较高的带主要分布在 4.4~23 kb 范围, 而小于 4.4 kb 的带尽管较多, 但变异性小. 在统计分析时, 我们只统计了信号较强的带, 而弱带不予统计. 这样 P0901、P1201、P1221 在不同个体上产生图谱的相似系数分别为 0.283、0.4、0.25, 变异系数分别为 0.717、0.6、0.75. P0801 在 6 个个体中均只检测到一条带, 而且分子质量是一致的.

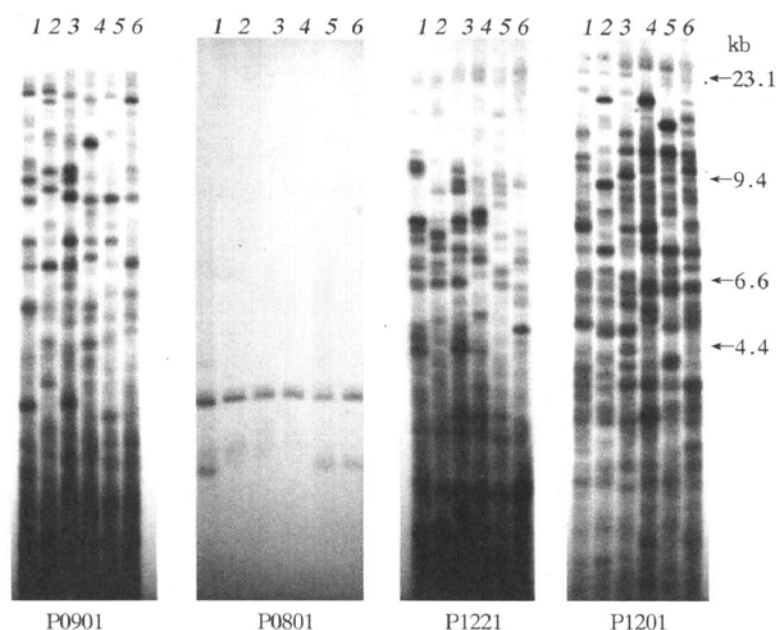


图2 个体特异性 RAPD 产物作探针产生的 6 个无关个体鸡的 DNA 指纹图

3 讨 论

用一定量的基因组 DNA 作探针与 RAPD 产物进行杂交时, 在相同的杂交条件下, 根据复性动力学, 探针中的重复序列将会优先与含重复序列的 RAPD 产物杂交, 产生很强的杂交信号; 而能够识别 RAPD 单拷贝序列的探针分子占总探针的分子比很小, 因此杂交的信号是很弱的, 相关的原理已为许多研究者所证实^[8~10]。从图 1b 可以看出, 在个体间表现高度变异性的 RAPD 产物大多 (3/4) 可以被基因组 DNA 探针检测到, 从而可推测它们含有重复序列; 进一步以它们作探针进行 DNA 印迹实验, 获得了多位点、高变异的 DNA 指纹图谱, 从而说明它们确实含有高变异的重复序列。

从图 1a 可以看出, P0801 与 P1221 的量相差不多, 但在图 1b 中 P0801 没有杂交信号, 而 P1221 出现较强的杂交信号, 从而可以排除 DNA 量的差异对杂交信号的影响。P0801 RAPD 产物与鸡的基因组 DNA 探针杂交没有信号, 推测它不含高变异的重复序列, 进一步以其自身为探针进行 DNA 印迹实验时在 6 个个体中仅检测到分子质量一致的一条带, 说明它不含高变异的重复序列。RAPD 分析时, P0801 RAPD 产物只出现在 1/4 的鸡个体中, 但用它作探针进行 DNA 印迹实验时却只检测到一条毫无变异性的带, 其可能的原因是变异性发生在引物结合区的个别碱基上。

迄今为止, DNA 指纹分析都依赖于特定 DNA

指纹探针, 而目前通用的 DNA 指纹探针数量有限, 在对一些尚未测试的物种进行 DNA 指纹分析时, 如果从其基因组中分离探针, 耗时长且成本高, 而选用通用的探针未必有较强的同源性。RAPD 方法因其快速简便而被广泛用于基因组 DNA 的多态性分析, 但很少有人对其产物进行分析和利用。我们的研究表明, 从鸡基因组中得到的 RAPD 产物, 经与基因组探针杂交后, 将出现较强杂交信号的 RAPD 产物用作 DNA 指纹探针, 可以产生在个体间表现高度变异性的 DNA 指纹图。用类似的方法, 我们制备了棉铃虫和泉的 DNA 指纹探针, 应用于种群遗传结构分析, 已取得了很好的结果 (另文发表)。

参 考 文 献

- 1 孟安明. 家畜家禽 DNA 指纹图的研究进展. 北京农业大学学报, 1993, **19** (增刊): 32~38
Meng A M. Acta Agriculturae Universitatis Pekinensis, 1993, **19** (suppl.): 32~38
- 2 刘树俊, 程光潮. DNA 指纹技术中所用的探针及其发展. 遗传, 1994, **16** (2): 40~43
Liu S J, Cheng G C. Hereditas, 1994, **16** (2): 40~43
- 3 孟安明. 鸡的多位点小卫星 DNA 的克隆. 见: 中国科协第二届青年学术年会执行委员会. 中国科学技术协会第二届青年学术年会论文集 (农业科学分册): 农业科学技术研究进展与展望. 北京: 中国科学技术出版社, 1995. 493~497
Meng A M. Cloning of multilocus minisatellite DNA in chicken. In: China Association for Science and Technology ed. Proceedings of the Second Academic Conference of Young Scientists. Beijing: China Science and Technology Press, 1995. 493~497
- 4 Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl Acids Res, 1990, **18** (22): 6531~6535

- 5 孟安明, 齐顺章, 宫桂芬. 四个探针产生的家禽 DNA 指纹图谱. 生物化学与生物物理进展, 1993, **20** (2): 139~142
Meng A M, Qi S Z, Gong G F. Prog Biochem Biophys, 1993, **20** (2): 139~142
- 6 Meng A. Simplified downward alkaline transfer of DNA. Biotechniques, 1994, **17**: 72~73
- 7 Wetton J H, Carter R E, Pakin D T, *et al.* Demographic study of wild house sparrow population by DNA fingerprinting. Nature, 1987, **327**: 147~149
- 8 孟安明, 齐顺章. 用基因组总 DNA 做探针产生动物的 DNA 指纹图. 科学通报, 1993, **38**: 2092~2095
Meng A M, Qi S Z. Chinese Science Bulletin, 1994, **39** (3): 240~244
- 9 Tautz D, Renz M. Simple sequence are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. Nucleic Acids Res, 1984, **12** (10): 4127~4137
- 10 Sulaiman I M, Hasmain S E. DNA polymorphism analysis in five endangered species of Meconopsis (Himalayan poppy) using multi-copy sequence-based probes. Electrophoresis, 1995, **16** (9): 1746~1749

DNA Fingerprinting in Chicken with Probes Derived from Randomly Amplified Polymorphic DNAs-PCR Products. YANG Shao-Qing (*Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China*); MENG An-Ming (*Department of*

Biological Sciences and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China).

Abstract Four chickens, each from a different strain, were analyzed using randomly amplified polymorphic DNAs (RAPD) technique with 12 primers. 38 of 99 (38%) detected fragments showed polymorphic. Four individual-specific fragments were recovered and probed with labeled whole genome of chicken. Positive signal was detected in three of the fragments, suggesting that hypervariable fragments generated by RAPD contain repetitive sequences. Highly variable DNA fingerprints were generated when such repetitive sequence containing fragments were used as probe to hybridize to *Hae* III digests of random chickens' DNA. Therefore, RAPD products that are highly variable among individuals can be used as DNA fingerprinting probes.

Key words chicken, probe, DNA fingerprints, randomly amplified polymorphic DNAs

鞘氨醇-1-磷酸的定量测定 ——一种新的竞争性结合方法

屠振兴 龚燕芳

(第二军医大学长海医院消化实验室, 上海 200433)

J. R. van BROCKLYN S. SPIEGEL

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Georgetown University Medical Center, Washington DC 20007, USA)

摘要 鞘氨醇-1-磷酸 (SPP) 是重要的细胞第二信使, 影响细胞的生长和死亡. 通过培养和收集转染 SPP 受体 EDG-1 的 HEK293 细胞, 与标记及非标记 SPP 共孵育, 利用它们与 HEK293 细胞的竞争性结合, 测定细胞、血清和组织中 SPP 含量. 该法无需特殊仪器, 可以测到皮摩尔水平的低含量, 批间差异小于 15% (6 次).

关键词 鞘氨醇-1-磷酸, 受体, 测定

学科分类号 Q2-33

鞘氨醇-1-磷酸 (sphingosine 1-phosphate, SPP) 是在鞘氨醇激酶催化下由鞘氨醇磷酸化而生成, 经磷酸吡哆醛溶解酶分解为磷酸乙醇胺和十六烷, 或经鞘氨醇-1-磷酸磷酸酶脱磷酸再生成鞘氨醇^[1,2]. SPP 具有重要的生理功能, 它激活多个信息传递途径, 如增加细胞内贮存钙和毒蕈碱 K 的释放, 激活磷脂酶 D, 激活 P125 FAK、paxillin 和 Crk 的酪氨酸磷酸化以及转译因子 AP-1 的 DNA

结合活性^[3,4]. SPP 同样参与各种细胞功能, 包括刺激细胞增殖, 抑制细胞凋亡, 诱导血小板形态改变和凝集, 抑制细胞的迁移及肿瘤细胞的侵袭^[5]. 因此要阐明 SPP 在各种生理、病理环境中的作用, 定量分析 SPP 的含量是必要的.

Tel: (021) 25070556, E-mail: xiaohua@smmu.edu.cn

收稿日期: 1999-08-02, 修回日期: 1999-12-21