

纵纹腹小鸮 DNA 指纹谱探针的筛选和初步应用*

凌桦^{①②} 杨绍清^① 雷富民^{①**}

(^①中国科学院动物研究所 北京 100080; ^②中国科学院研究生院 北京 100039)

摘要:以人工合成的微卫星序列(GTG)₅, (GT)₈, (CAC)₅和人造小卫星 33.15 作引物,扩增纵纹腹小鸮的基因组 DNA,产生多态性 DNA 片段,回收了 8 个表现个体特异性的片段。当用小鸮的基因组总 DNA 探针与它们杂交时,其中 2 个表现阳性,说明 PCR 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 PCR 产物作探针,与无关个体小鸮基因组 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。且通过对京白鸡家系分析表明,用小鸮基因组 DNA 的 PCR 产物分离制备的探针所获得的 DNA 指纹图谱能够稳定的遗传。因此,高变异的 PCR 产物可以有效地用作 DNA 指纹探针。

关键词:纵纹腹小鸮; Polymerase Chain Reaction (PCR); Southern 杂交; DNA 指纹图谱

中图分类号: Q953 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2002)01-12-06

Probe Selection and Application of DNA Fingerprinting in the Little Owl

LING Hua^{①②} YANG Shao-Qing^① LEI Fu-Min^①

(^①Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences Beijing 100080;

^②Graduate School of Chinese Academy of Sciences Beijing 100039, China)

Abstract: We used microsatellite sequence (GTG)₅, (GT)₈, (CAC)₅ and minisatellite sequence 33.15 as primers, amplify the genome DNA of the Little Owl (*Athene noctua*). Eight individual-specific fragments were recovered and probed with labeled whole genome of the Little Owl. Positive signal was detected in two of the fragments, suggesting that hypervariable fragments generated by PCR contain repetitive sequences. Highly variable DNA fingerprints were generated when such repetitive sequence containing fragments was used as a probe to hybridize to *Hae* III-digests DNA of random little owls. Moreover, by analyzing the DNA fingerprints of Jingbai Chicken strain, the identifiable polymorphism bands can be inherited stably. Therefore, PCR products that are highly variable among individuals can be used as DNA fingerprinting probes.

Key words: Little Owl (*Athene noctua*); Polymerase Chain Reaction (PCR); Southern blotting; DNA fingerprinting

* 国家自然科学基金(No. NSFC39770092),中国科学院分类区系特支费资助项目;

** 联系作者, E-mail: leifm@panda.ioz.ac.cn;

第一作者介绍 凌桦,女,25岁,硕士研究生;研究方向:分子进化与系统学。

收稿日期:2001-03-02,修回日期:2001-10-20

传统的鸟类分类和亚种分化建立在外部形态学的基础上,但对于趋同现象等问题,以上方法就出现了一定困难。随着分子生物学的发展,利用 DNA 分子遗传标记的方法进行个体和种群水平的遗传变异分析,在一定程度上弥补了传统方法的不足。DNA 指纹技术因其有广泛的适用性而在多种动植物、微生物的群体遗传和进化,以及重要性状的遗传连锁分析中得到应用。获得适合于研究目的的探针是成功地进行 DNA 指纹谱研究的关键。常规的 DNA 指纹分析需要采用特定的 DNA 指纹探针,它们主要为多位点小卫星探针和微卫星探针。目前通用的 DNA 指纹探针数量很有限,且制备起来也很烦琐。因此有必要寻求更加简便易行的制备探针的方法。本实验用纵纹腹小鸮基因组 DNA 的 PCR 产物作探针,获得了变异性较高的小鸮的 DNA 指纹图,为今后小鸮甚至整个鸮类的分子遗传和种群分子分化研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料 实验所用纵纹腹小鸮 (*Athene noctua*) (简称小鸮) 的血液由本实验室提供,共 10 只,采自陕西省岐山县、新疆吐鲁番和青海天峻, -20℃ 冷冻保存的全血。各种内切酶购自华美公司。四种脱氧核苷酸 (dNTPs) 购自上海生工公司, α -³²P dCTP 购自北京亚辉公司,随机引物标记盒 Prime-a-Gene Labeling System 为 Promega 公司产品,玻璃奶回收 Kit 购自北京原平生物技术有限公司,微卫星引物和小卫星引物购自赛百盛 (Cyber Syn) 公司。尼龙膜为 Boehringer Mannheim GmbH 公司产品。

1.2 小鸮基因组 DNA 的提取 小鸮的基因组 DNA 从全血中提取,方法按文献 [2] 所述。加入蛋白酶 K (10 mg/ml)、20% SDS 的量分别为 10 μ l 和 12.5 μ l。预冷无水乙醇沉淀时加 50 μ l 3 mol/L 的醋酸钠 (pH 4.51)。DNA 溶解于 30 μ l TE 中。

1.3 探针的筛选

1.3.1 从基因组 DNA 中筛选特异性条带 分别以 (GTG)₅, (GT)₈, (CAC)₅ 和 33.15 (AGAGGT-

GGGCAGGTGG)₂₉ 作引物^[9-13], 任取 7 只小鸮的基因组 DNA 为模板作 PCR 进行随机扩增,用玻璃奶回收试剂盒,按生产厂家的说明回收特征性条带。

1.3.2 以基因组 DNA 作探针进行反向杂交^[3]

将扩增所得的 DNA 样品 200 ng 按 Southern 转移法转移到尼龙膜上。从 1.3.1 的 7 个个体中任选编号为 5、6、7 这 3 个不同个体小鸮的基因组 DNA,等体积混合在一起,作为探针。取 200 ng 按随机引物标记法标记探针*。然后进行 Southern 杂交,所有膜的预杂交、杂交和洗脱都在 55℃ 下进行。将与探针杂交的印记膜用 10 ml 2 × SSC, 55℃ 预热 20 min, 然后换成杂交液 (0.5 mol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.2; 7% SDS; 1 mmol/L EDTA) 预杂交 1 h 左右。然后按 1 × 10⁶ cpm/ml 加入标记过的探针进行杂交 16 h; 分别用 2 × SSC, 0.1% SDS, 30 min; 1 × SSC, 0.1% SDS, 30 min; 0.5 × SSC, 0.1% SDS, 20 min; 0.1 × SSC, 0.1% SDS, 10 min 洗脱。洗脱完毕后,用保鲜膜包好杂交滤膜,于 -70℃ 下放射自显影 3 ~ 5 d 不等。根据放射自显影的结果,选出产生特征性条带的 DNA 多态性片段,保存待用。

1.4 DNA 指纹图谱 将所选 DNA 多态性片段作探针,用 3 个无关个体小鸮 (不同于 1.3.1 中的 7 只) 及 6 只同一家系的京白鸡的基因组 DNA 为样品,用 *Hae* III 酶切^[3]。酶切产物和电泳分离及转移至尼龙膜按文献 [2] 所述。所有膜的预杂交、杂交和洗脱都在 50℃ 下进行。

1.5 图谱及数据统计分析 PCR 扩增产物在原始照片上分析那些清晰可辨图带。Southern 杂交结果在原始 X 光片上进行分析。图片上那些位置相同 (即分子量相同)、显影强度基本一致的图带被看作是完全相同的带。将 DNA 指纹谱的 X 光片的谱带根据分子量的大小形成的梯度变成 1 ~ 0 数据 (分别表示特定带的有无),按公式 $F = 2N_{AB} / (N_A + N_B)$, 计算共享带率 F , 其中 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。然后计算两两个

* 孟安明, 畜禽 DNA 指纹分析讲义, 1994 年 7 月。

体具有相同 DNA 指纹图的概率 F^n (F 为平均相似系数, n 为平均条带数), 作为反映遗传多样性的指标。

2 结果

2.1 基因组 DNA 的提取 本实验提取 7 个无关个体小鸮基因组 DNA, 编号为 1~7。血源采自野外, 向新鲜血液中加入等体积的 SDS-EDTA 缓冲液 (10 mmol/L Tris-Cl, pH 8.0, 100 mmol/L

EDTA, 2% SDS), 混匀后可在 0~30℃ 的条件下贮存 4 个月之久。

2.2 探针的筛选

2.2.1 从基因组 DNA 中筛选特异性条带 分别以 $(GTC)_5$, $(GT)_8$, $(CAC)_5$ 和 33.15 为单一引物, 用 7 个无关个体小鸮的基因组 DNA 做模板, 在最适条件 (见下述) 下进行扩增。取 12 μ l 样品在 1.0% 琼脂糖凝胶中电泳, 结果见图 1、2。

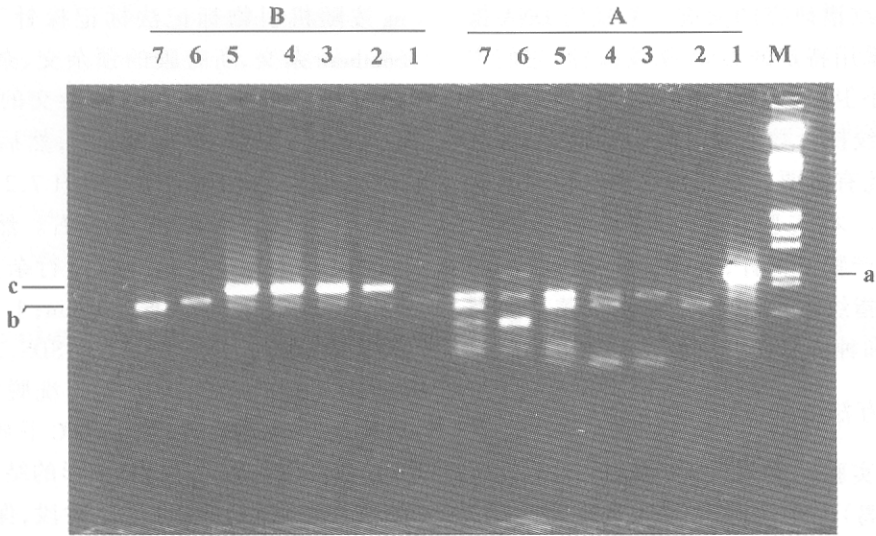


图 1 以微卫星 $(GTC)_5$ 和 $(GT)_8$ 为引物扩增 1~7 个体基因组 DNA 的结果

A 中的 1~7 是以 $(GT)_8$ 为引物, B 中的 1~7 是以 $(GTC)_5$ 为引物;

扩增产物中的特异性带: a 为个体 A1 的条带; b 为个体 B7 的条带; c 为个体 B2~B5 的条带

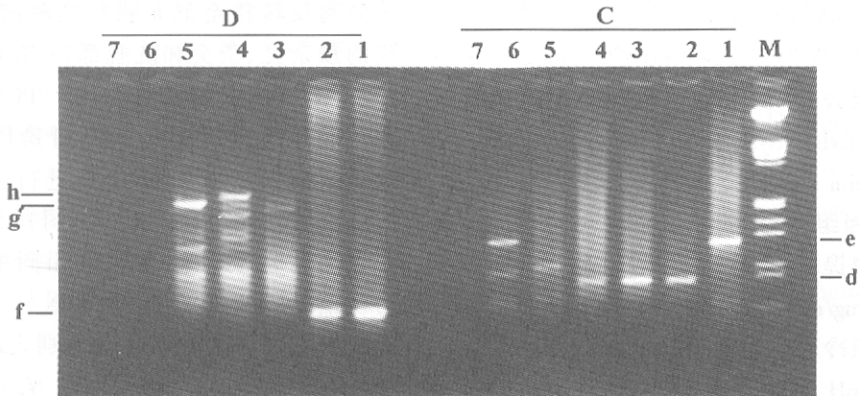


图 2 以小卫星 33.15 和微卫星 $(CAC)_5$ 为引物扩增 1~7 个体基因组 DNA 的结果

C 中的 1~7 是以 $(CAC)_5$ 为引物, D 中的 8~14 是以 33.15 为引物;

d 为个体 C2~C4 的条带; e 为个体 C1, C6 的条带; f 为个体 D1, D2 的条带; g 为个体 D5 的条带; h 为个体 D4 的条带

回收其中 a~h 条带,编号为:

a (GT)₈ b (GTG)_{SS} c (GTG)_{SL} d (CAC)_{SS} e (CAC)_{SL} f 33.15_S g 33.15_M h 33.15_L

再分别以所回收条带为模板,用相应引物在最适条件下(见下述)扩增。取 12 μl 样品在 0.8% 的琼脂糖凝胶中电泳,结果如图 3 所示。

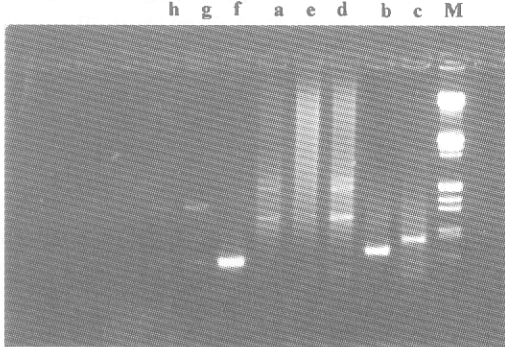


图 3 回收的特异性片段的 PCR 扩增结果
a~h 的顺序如上述; M. λ DNA *Eco* R I / *Hin* d III

为了找到最适反应条件,作者对反应体系中的模板浓度、引物浓度和退火温度进行了摸索。结果表明,33.15 核心序列和 (CAC)₅ 两个引物的最适退火温度为 50℃; (GTG)₅ 和 (GT)₈ 两个引物的最适退火温度为 54℃。其中 (CAC)₅ 和 (GTG)₅ 扩增的多态性片段较少(一般少于 5 条),其它两个引物扩增出的带数较多(一般多于 5 条)。在用相应引物再做 PCR 扩增回收条带时,所用退火温度要比原用的高 4℃,以减少非特异性扩增产物。

2.2.2 以基因组 DNA 作探针进行反向杂交
由图 4 可看出, (GTG)_{SL} 和 (GTG)_{SS} 两个片段的杂交信号很强,且清晰,说明这两个片段含有高度重复序列,与该物种基因组 DNA 的多态位点同源性很高,可用作探针。而 33.15_S, 33.15_M 和 33.15_L 这三个片段的信号极弱,以至肉眼不可见,说明这三个片段只含有极低拷贝数的重复序列或单拷贝序列,因此不适宜作探针。(GT)₈、(CAC)_{SS} 和 (CAC)_{SL} 这几个片段由于扩增结果不好,所以在此不予讨论。

在 Southern 杂交中,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。同时,杂交温度越高,其严谨程度就越高,对探针与 DNA 链的同源性要求也越高,因此本实验在筛选探针时,用了 55℃ 的较高温度,而在用所选探针作指纹图时(方法 1.4),杂交温度为 50℃ 就可得到较好的结果。

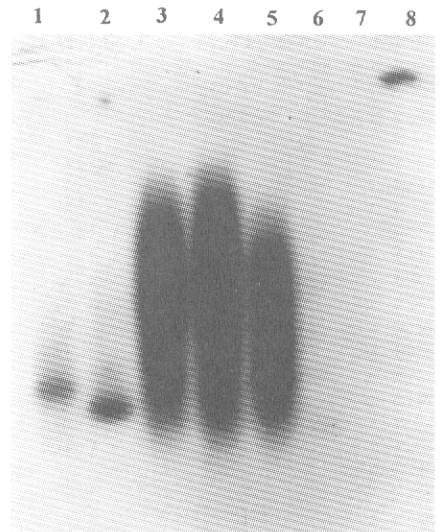


图 4 以基因组 DNA 作探针的杂交结果

1. (GTG)_{SL}; 2. (GTG)_{SS}; 3. (CAC)_{SS}; 4. (CAC)_{SL}; 5. (GT)₈;
6. 33.15_S; 7. 33.15_M; 8. 33.15_L

在洗脱时,采用不同的洗脱条件,逐渐降低溶液的离子强度,依次提高严谨程度,最终洗脱条件为 1 × SSC, 0.1% SDS, 55℃, 20 min。

2.3 DNA 指纹图谱 用 (GTG)_{SS} 作探针,对 3 个无关个体小鸮及 6 只同一家系的京白鸡作 DNA 指纹图谱,结果如图 5、6 所示。

由图 5 可见,在 3 只无关个体小鸮中, (GTG)_{SS} 产生的清晰图带集中在 6.5 kb 以上,带数在 20 条以上。3 个个体的特异性条带占各自条带数的比例分别为 46%, 30%, 45%, 总特异性条带占总条带数的比例为 37%。且在两两个体 1~2, 1~3, 2~3 之间的相似系数分别

为 0.44, 0.33, 0.34, 它们具有相同 DNA 指纹图的概率分别为 4.7×10^{-10} , 2.45×10^{-10} , 1.06×10^{-10} 。由此可见, 用此方法产生的 DNA 指纹图谱都具有较高的个体特异性。因此, 作者初步认为 $(GTG)_{55}$ 可用于小鸮的 DNA 指纹分析。

因实验材料所限, 作者以 $(GTG)_{55}$ 对一京白鸡家系做了分析, 图 6 结果表明, 其子代 4 个个体 1、2、3、4 所产生的图带都能在亲代中找到, 说明以 $(GTG)_{55}$ 为引物产生的 DNA 指纹谱的图

带能稳定遗传。

同一种探针与不同物种的基因组 DNA 进行杂交时, 其洗脱条件是不同的。由于不知探针的序列结构及其在基因组中的拷贝数, 所以, 本实验也用了不同的洗脱条件。与小鸮杂交的最终洗脱条件是 $0.5 \times \text{SSC}$, $0.1\% \text{SDS}$, 50°C , 10 min ; 与鸡杂交的最终洗脱条件是 $1 \times \text{SSC}$, $0.1\% \text{SDS}$, 50°C , 10 min 。

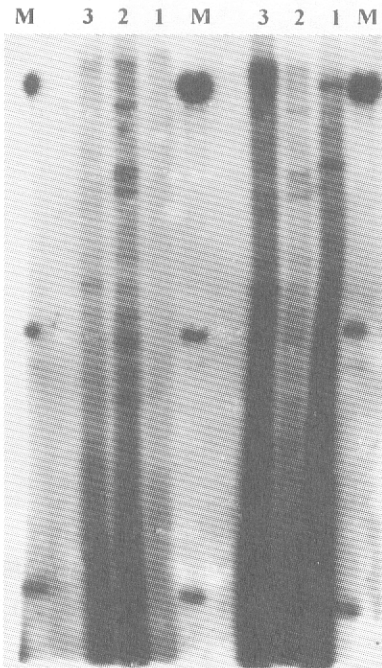


图 5 $(GTG)_{55}$ 作探针产生的 3 个无关个体小鸮的杂交图谱

M. λ DNA *Eco* R I / *Hin* d III

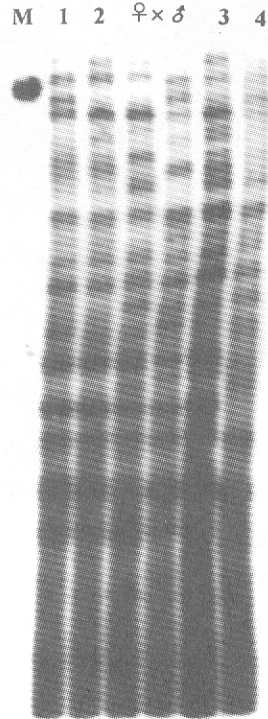


图 6 $(GTG)_{55}$ 作探针产生的京白鸡家系的杂交图谱

M. λ DNA *Eco* R I / *Hin* d III

3 讨论

研究自然种群的遗传结构需要较大的信息量才能得到比较可靠的结论。应用 DNA 指纹法以多个探针对基因组 DNA 的不同位点的变异性进行检测是必要的。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, 找到合适的探针。目前, 用于鸟类 DNA 指纹研

究的探针主要为人源小卫星 33.6, 33.15^[14-16, 18] 和噬菌体 M13 (其有效序列为蛋白质 III 的编码区)^[17, 20], 数量有限。本实验用 PCR 产物回收片段制备 DNA 指纹谱探针, 避免了常规方法从基因库筛选的烦琐步骤, 简便易行。而且考虑到有很多简单重复序列 (微卫星) 和小卫星核心序列可以用作单一引物扩增出多态性片段, 不同个体产生的片段有所不同, 因而用这种方法

可以获得的探针的数目是很多的。由于时间有限,本实验只选用一个 PCR 产物片段作探针,进行初步的指纹分析。基因组 DNA 的 PCR 扩增产物可能是单拷贝 DNA 序列,也可能是重复序列,这与选用的引物密切相关。应用单个简单重复序列为引物,扩增出的条带多为微卫星序列,并且由于这些引物能与微卫星序列特异性结合,因此扩增的重复性好,结果稳定^[19]。本实验所用的 PCR 产物探针能与酶切后的基因组 DNA 杂交产生指纹图谱,且探针与基因组的反向杂交也产生阳性信号,说明它含有重复序列。对于不同个体来说,用此探针所产生的 DNA 指纹图在带数、带的深浅和带的分布上有不同的特点,表明所得图谱有一定的物种特异性。同时在合适的条件下也能与京白鸡家系的 DNA 酶切片段杂交,产生具有高度变异性的 DNA 指纹图,且能稳定遗传。应用类似方法,已经找到了一些用于畜禽的 DNA 指纹探针^①。因此,应用该方法可以较快地制备探针,并可应用于整个鸭类及其它鸟类的 DNA 指纹分析。

致谢 陈晓峰博士对实验过程提供了宝贵意见,并允许在其分子生物学实验室从事所有实验工作。谭声江博士在修改文稿时提出了宝贵意见,在此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 孟安明,齐顺章. 用基因组总 DNA 作探针产生动物 DNA 指纹图. 科学通报, 1993, 38(22): 2 092 ~ 2 095.
- [4] Hillel J *et al.* DNA fingerprints of poultry. *Anim Genet*, 1989, 20: 145 ~ 155.
- [5] Wetton J H *et al.* Demographic study of wild house sparrow population by DNA fingerprinting. *Nature*, 1987, 327: 147 ~ 149.
- [6] Jeffery A J *et al.* Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 1985, 314: 67 ~ 72.
- [7] 李庆伟等. 鸭形目 8 种鸟类线粒体 DNA 多态性研究. 动物学报, 1998, 44(1): 94 ~ 101.
- [8] 雷富民等. 纵纹腹小鸱在中国的分布、栖息地及各亚种的梯度变异(鸱形目: 鸱鸃科). 动物分类学报, 1997, 22(3): 327 ~ 334.
- [9] Ali S, Muler C R, Epplen J T. DNA fingerprinting by oligonucleotide probes specific for simple repeats. *Human Genetics*, 1987, 74: 239 ~ 243.
- [10] Bolt R, Davies W, Fries R A. Polymorphic microsatellite at the RYR1 locus in swine. *Anim Genet*, 1991, 24: 72.
- [11] Braithwaite K S, Manners J M. Human Hypervariable minisatellite probes detect DNA polymorphisms in the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. *Current Genetics*, 1989, 16: 473 ~ 476.
- [12] Burke T, Bruford M W. DNA fingerprinting in birds. *Nature*, 1987, 327: 149 ~ 152.
- [13] Caetano-Anolles G, Bassam B J, Gresshoff P M. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio/Technology*, 1991, 9: 553 ~ 557.
- [14] Wetton Jon H, Royston E, Carter David T Parkin *et al.* Demographic study of a wild house sparrow population by DNA fingerprinting. *Nature*, 1987, 327: 147 ~ 149.
- [15] Yamagishi S, Nishiumi I, Shimoda C. Extrapair fertilization in monogamous bull-headed shrikes revealed by DNA fingerprinting. *Auk*, 1992, 109(4): 711 ~ 721.
- [16] Jones David A, Lisle Gibbs H *et al.* The use of DNA fingerprinting to determine the possible mating system of an obligate brood parasitic bird, the Cuckoo *Cuculus canorus*. *Ibis*, 1997, 139: 560 ~ 572.
- [17] Longmire Jonathan L, George F Gee, Cathy L. Hardekopf & Graham A. Mark. Establishing paternity in whooping cranes (*Grus americana*) by DNA analysis. *Auk*, 1992, 109(3): 522 ~ 529.
- [18] Burke T, Bruford M W. DNA fingerprinting in birds. *Nature*, 1987, 327: 149 ~ 152.
- [19] Meyer W, Mitchell T G. Polymerase chain reaction fingerprinting in fungi using single primers specific to minisatellites and simple repetitive DNA sequences: strain variation in *Cryptococcus neoformans*. *Electrophoresis*, 1995, 16: 1 648 ~ 1 656.
- [20] Vassart G, Georges M, Monsieur R *et al.* A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA. *Science*, 1987, 235: 683 ~ 684.

① 杨绍清. 利用 PCR 技术筛选鸡的分子遗传标记. 中国农业大学硕士学位论文, 1996.