

DNA 指纹图谱法在哺乳动物和鸟类遗传研究中的应用

刘 德 立

(华中师范大学生物系, 武昌 430070)

DNA 指纹图谱法 (DNA fingerprinting) 是 1980 年中期发展起来的一种新的实验方法。短暂的几年, 该方法得到迅速发展和完善, 并在鸟类、人类和其它哺乳动物的遗传研究中得到广泛应用。

在人类染色体中, 含有许多分散的具有串联重复单位的微小卫星区 (minisatellite)。在这些区域中, 由于重复单位的数目和重复拷贝数的等位性不同, 所以许多卫星区表现出高度多态性 (high polymorphism)^[4]。1985 年, Jeffreys 等人发现, 这些区域可通过一种 10—15 碱基对的核心序列来检测。他们从人肌红蛋白基因的卫星区分离出单一重复单位, 该重复单位由 33 对碱基组成。并由此制备出 8 种卫星 DNA 探针, 其代号分别为 33.1, 33.3, 33.4, 33.5, 33.6, 33.10, 33.11 和 33.15。这些探针可用于人类 DNA 杂交和其它动物 DNA 杂交。其中探针 33.6 和 33.15 在与哺乳类和鸟类 DNA 杂交中特别有效。其结构如图 1 所示。这些卫

探针 33.6 [(AGGGCTGGAGG)_n]₁₁

探针 33.15 (AGAGGTGGGCAGGTGG)₂

图 1 探针 33.6 和 33.15 的序列

星 DNA 探针能同时检测到许多高度可变的位点(即卫星区), 产生相应的 DNA 图谱。不同物种, 同一物种的不同品种, 甚至同一品种的不同个体, 其所含卫星区各异。因此, 杂交产生的 DNA 图谱各不相同, 就象人的指纹一样。所以, 把这种具有个体特征和种属特性的 DNA 图谱称为 DNA 指纹图谱 (DNA fingerprints)。这

种利用人体卫星区 DNA 作为探针, 探测不同物种的卫星区, 产生相应的 DNA 指纹图谱的杂交方法叫 DNA 指纹图谱法。

这一发现对确定亲缘关系十分有用。1985 年, Jeffreys 小组使用 DNA 指纹技术, 成功地解决了一起涉及母子血缘关系的鉴定案例^[5], 即一个出生在英国的加纳男孩, 在离开多年后重返英国, 有关部门要求鉴定他与居住在英国的母亲、兄弟姐妹之间是否有血缘关系。Jeffreys 等从这些受检者及一个与之无血缘关系的人身上取血样, 分离出 DNA, 用限制性内切酶 Hinf I 消化, 然后用卫星 DNA 探针 (33.15 和 33.6) 杂交, 得到 DNA 指纹图谱(见图 2)。结果发现受检男孩 DNA 指纹图谱中的 61 条带完全被母亲和至少一个兄弟姐妹的带所包含。虽然, 男孩的生父未被检测, 但是, 根据母亲不具有的、而男孩的兄弟姐妹具有的带必定来自生父的道理, 证明男孩的 DNA 指纹与母亲、父亲完全吻合。而与作为对照的无血缘关系者的指纹图谱, 则有多处不一致。因此, 断定母亲确是男孩的生母。最近的研究表明: 人体卫星 DNA 探针在与鼠、狗和猫的 DNA 杂交时, 表现出相似的超变性^[3,6]。Wetton 小组和 Burke 小组报道, 用同样的方法可获得鸟类的 DNA 指纹图谱, 并能用于鉴定人工饲养的麻雀的亲缘关系^[1,7]。卫星 DNA 探针提供了一种有效的手段, 似乎可以广泛地用于研究许多野生物种和家养物种的家族关系、数量统计和连锁图谱分析^[3]。

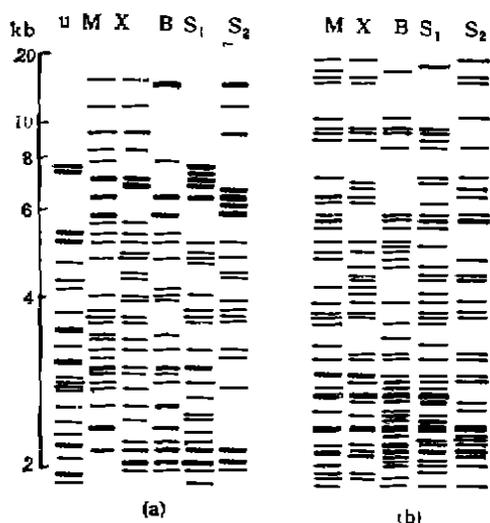


图2 母子血缘关系鉴定案例的 DNA 指纹图谱

(a) *Hinf*I, X 与探针 33.15 杂交产生的 DNA 指纹图谱; (b) *Hinf*I 与探针 33.6 杂交产生的 DNA 指纹图谱; U: 与其无血缘关系的人; M: 母亲; X: 被鉴定的男孩; B: X 的兄弟; S₁ 和 S₂: X 的姐妹。

在研究野生群体的种属关系时, 需要确定亲缘关系。例如: 麻雀在饲养观察时, 给出特定的标记, 以帮助确定谱系关系。但仍有一半不能确定。在家畜中, 亲缘关系的鉴定也很重要。常常要花许多钱进行人工授精, 或者检测子代的来源。例如牛可通过高度多态的血液型标志 (highly polymorphic blood-group markers) 进行鉴定。但是, 对大多数品种来说, 这种抗血清不易制备, 或者其位点的多态性不够。现已证明: 这些由 Jeffreys 小组制备的人体卫星 DNA 探针在大多数其它动物中也是有效的标记。Wetton 等人应用探针 33.6 与麻雀 DNA 杂交, 鉴别出约 60 条不同的带。每一条带代表能与核心序列杂交的不同长度的 DNA 片段^[7]。实验是用 1 只雄鸟 A 与 4 只无血缘关系的雌鸟 B、C、D、E 交配, 分别产生 B₁、B₂、B₃、C₁、C₂、D₁、D₂、D₃、D₄ 和 E₁、E₂、E₃, 共 12 只 F₁ 代子鸟。然后, 采血并制备微量 DNA, 再与人的卫星 DNA 探针 33.6 杂交, 得到 DNA 指纹图谱。其中大约有 60 条不同的带, 这是由 4 只非亲缘关系的雌鸟引起的。所以, 每只雌鸟平均产生 14.25 条不同的带。而一条带同

时存在两个非亲缘关系的个体中的可能性是 0.086, 那么, 14.25 条带同时存在于两个个体中的可能性为 $0.086^{14.25} (<10^{-14})$ 。由此可见, DNA 指纹图谱具有典型的个体特征。虽然被检测的个体数目有限, 但推测对鸟类具有普遍性。两种探针(即 33.6 和 33.15) 分别杂交后, 两个不同的个体具有相同谱型的可能性很小。即使对完全同族的个体也一样(见表 1)。另一方面, 通过比较两个体的 DNA 指纹图谱, 可确定其血缘关系。根据统计学公式 $D = 2N_{AB} / (N_A + N_B)$ 这里 D 为相似系数, N_A 为个体 A 具有的谱带数, N_B 为个体 B 具有的谱带数, N_{AB} 为二者共有的谱带数。当 D = 0 时, 两个体完全不一样, 无血缘关系。当 D = 1 时, 两个体完全一样, 为同种同属的双胞胎。D 值越大, 血缘关系越近。D ≈ 0.5 时, A 与 B 血缘关系最近,

表 1 用卫星 DNA 探针 33.6 和 33.15 进行遗传分析*

项目	探针	麻雀	狗	猪
个体杂交带的平均数	33.6	6	16	8
	33.15	15	19	13
a.		0.22	0.46	0.47
b.		6×10^{-34}	2×10^{-21}	3×10^{-14}
c.		4×10^{-23}	5×10^{-20}	7×10^{-7}

- * a. 无血缘关系的个体具有相同谱带的可能性。
- b. 两种探针与两个不同种属的个体的 DNA 杂交后, 具有相同谱型的可能性。
- c. 两种探针与两个同种同属的个体的 DNA 杂交后, 具有相同谱型的可能性。

如父子、母子关系。D ≈ 0.25 时, A 与 B 可能是祖孙关系。D 值越小, 血缘关系越远(见表 2)。

表 2 由 DNA 指纹图谱*计算出的相似系数 D

项目	A × B	A × C	A × D	A × E	
	♂ × ♀	♂ × ♀	♂ × ♀	♂ × ♀	
F ₁	B ₁ -B ₃	C ₁ -C ₂	D ₁ -D ₄	E ₁ -E ₃	
成鸟	A	0.577	0.453	0.535	0.615
	B	0.628	0.144	0.175	0.169
	C	0.027	0.697	0.156	0.092
	D	0.044	0.247	0.480	0.172
	E	0.201	0.066	0.160	0.506

注: DNA 图谱没有画出, 详见参考文献[7]中图 1。它包括成鸟 A、B、C、D、E 和子代 B₁-B₃、C₁-C₂、D₁-D₄、E₁-E₃ 的 DNA 指纹图谱。

所以, DNA 指纹图谱又可用于血缘关系的确定。在一组麻雀家谱研究中,有 2 只成鸟和 11 只后代养在四个巢里, Burke 和 Bruford 发现有 1 只鸟有 6 条带在它父母的 DNA 指纹图谱中都不存在。一般来说, F_1 代的每一条谱带都能在其父本或母本体找到。如果出现新带, 则有两种可能。一是由于突变引起, 其机率很低。二是由于非配偶交配引起。显然, 这只鸟与其它后代可能是异父同母。进一步的研究发现邻近巢里的 1 只雄鸟很可能是它的“亲生父亲”。

1989 年, Burke 等人又将 DNA 指纹技术成功地用于鉴别岩鹳的血缘关系^[2]。在岩鹳的生活习性中, 大多是混合交配和重复交配, 即 1 只雌鸟同时与多只雄鸟交配, 或者是几只雌鸟同时与多只雄鸟混合交配。这种交配方式可使岩鹳获得最大的繁殖效率。然而确定子鸟的血缘关系则相当困难。传统的方法只能靠观察成鸟喂养子鸟的情形来推测它们的血缘关系。一般认为: 雄鸟只喂养自己的后代, 同一窝幼鸟由不同的雄鸟喂养。但这种观察法不能给出肯定的答案。Burke 等人应用探针 33.15 与岩鹳 DNA 杂交, 获得了岩鹳的 DNA 指纹图谱, 从而很方便地鉴别出它们的血缘关系。通过比较传统的观察法和 DNA 指纹图谱法的鉴定结果, 发现岩鹳雄鸟不能区分亲生后代与重复交配(即多只雄鸟同时交配)产生的后代。也就是说, 雄鸟喂养的子鸟包括自己的亲生后代和雌鸟与其它雄鸟交配产生的后代。这种喂养方式无疑有助于提高子鸟的存活率。

Jeffreys 和 Morton 等人发现, 卫星 DNA 探针与猫、狗 DNA 杂交时(实验动物是 8 个不同品种的狗和 5 只短毛猫), 猫、狗类同一品种的谱带的相似性高于麻雀和人类^[3]。在已经分析的相同品种中, 仅有 2 只赛狗没有明显的相似性。如果进一步研究, 将会证明它们不是同一品种。

与血型分析法、电泳定位和 DNA 限制性片段长度多态性(DNA restriction fragment length polymorphisms, RFLPs)不同, DNA

指纹图谱法不能简单地确定其等位性, 因为同一胶板出现的谱带太多。没有等位性, 尽管可以判断配对的父母不全是某一后代的亲生父母, 但推测的生父或生母不能肯定, 而只具有可能性。由于具有相同迁移率的片段不一定是同源等位的, 所以广泛进行群体数量统计分析还不现实。标记基因的连锁分析表明: 有害基因来自不同群体, 而这些“家族”不能近亲结合。

鼠类和鸟类的最近研究表现出等位性迹象, 而且证明等位基因遵循孟德尔的分离规律。用已知的标记基因可进行染色体基因定位。在鼠类, 实验所用的 13 种标记定出了 8 个位点。由于有些基因能产生多条带, 而另一些基因非常邻近, 表现出共分离现象, 所以, 判定结果必须谨慎。

虽然这些探针如 33.6 和 33.15 通常是定出多个位点, 但它们仍能用于寻找杂交单一基因的探针。White 小组正在人体进行研究。用于哺乳动物和鸟类的特定基因的探针会很快发展起来。如果成功, 将对确定基因连锁十分有用。特别是对那些控制重要性状, 如生长率和牛奶产量等的基因。在饲养方面也很有用。还可能有助于某些基因的定位, 并可能阐明其机制。总之, 卫星 DNA 探针的应用将越来越广泛, DNA 指纹图谱的应用前景将十分诱人。

参 考 文 献

- [1] Burke T. and M. W. Bruford 1987 DNA fingerprinting in birds. *Nature* 327: 149—152.
- [2] Burke T. et al. 1989 Parental care and mating behaviour of polyandrous dunnocks *Prunella modularis* related to paternity by DNA fingerprinting. *Nature* 338: 249—251.
- [3] Hill W. G. 1987 DNA fingerprints applied to animal and bird populations. *Nature* 327: 98—99.
- [4] Jeffreys A. J. et al. 1985 Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 314: 67—73.
- [5] ———— 1985 Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature* 317: 618.
- [6] ———— 1987 Mouse DNA 'fingerprints': analysis of chromosome localization and germ-line stability of hypervariable loci in recombinant inbred strains. *Nucleic Acids Res.* 15: 2823—2826.
- [7] Wetton J. H. et al. 1987 Demographic study of a wild house sparrow population by DNA fingerprinting. *Nature* 327: 147—149.