

水生实验动物剑尾鱼的 DNA 指纹图谱构建

全迎春¹, 刘宇飞^{1,2}, 白俊杰¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广州 510380; 2. 上海靖丽信息科技有限公司, 上海 200235)

【摘要】 目的 剑尾鱼是由原良种委员会审定并由农业部公布的水生实验动物,在遗传学研究、水环境污染监测、细菌性疾病研究方面显示出较好的应用前景。为了对剑尾鱼选育系进行种质资源监测、区分选育系与非选育以及鉴定近交系纯度,本研究采用微卫星 DNA 进行水生实验动物剑尾鱼的指纹图谱构建。方法 根据相关报道设计合成了 50 对微卫星引物,对几个剑尾鱼品系的种质资源进行检测,筛选品系间差异性引物;确立剑尾鱼核心引物,用 EXCEL 散点图绘制 DNA 指纹图谱模式图;并将数字化指纹数据输入珠江水产研究所鱼类种质鉴定软件 V1.0,形成剑尾鱼标准化指纹图谱鉴定数据库。结果 共获得剑尾鱼品系间特异标记 5 个可用于剑尾鱼近交系鉴定,确立 46 个微卫星标记为核心引物,构建剑尾鱼选育系 RR-B 系、RW-H 系和非选育的野生品种的 DNA 指纹图谱。结论 本研究筛选出的微卫星标记与构建的指纹图谱,可用于剑尾鱼 3 个品种间的品种鉴定、纯度检测及遗传监测。

【关键词】 剑尾鱼;DNA 指纹图谱;微卫星;种质鉴定

【中图分类号】 Q953-33; R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)06-0029-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.06.007

DNA Fingerprint Structure of Aquatic Experimental Animal Swrodtail , *Xiphophorus hellerii*

QUAN Ying-chun¹, LIU Yu-fei^{1,2}, BAI Jun-jie¹

(1. Pearl River Fisheries Research Institute of Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

2. Shanghai jing li information technology Co., LTD, Shanghai 200235, China)

【Abstract】 Objective Swrodtail, *Xiphophorus hellerii* was an aquatic experimental animal authorized by the original thoroughbred committee and published by the ministry of agriculture. It shows a good prospect in genetic research experiment, water environment pollution monitoring and bacterial disease research. In order to monitoring the germplasm resources of swordtail, distinguish the inbred lines and wild swordtail and identify the purity of inbred lines, microsatellite DNA fingerprint was used in this study. **Methods** 50 pairs of microsatellite primers were synthesized according to related reports. Among which, train-special primers used to identify the inbred lines of swordtail and core primers used to draw the DNA fingerprinting schema graph were screened. Then we constructed the DNA fingerprint using scatter diagram method with EXCEL 2003 software. Digital fingerprint barcode data had input software of PRIFRI V1.0, which had formed a standardization fingerprint identification database of swordtail. **Results** We together received five pairs of strain-special microsatellite primers and 46 core primers. The DNA fingerprinting of RR-B, RW-H and wild swordtail were constructed. And a fingerprint identification database of swordtail was formed. **Conclusion** Using these microsatellite markers and DNA fingerprinting, we can identify varieties, purity and genetic monitoring of RR-B, RW-H and wild swordtail.

[基金项目] 国家科技基础条件平台建设项目(2006DKA30470-008);广东省科技计划(2005A20301014)。

[作者简介] 全迎春(1981-),女,硕士,研究方向:遗传与育种。

[通讯作者] 白俊杰,男,研究员。E-mail:jjbai@163.net。

【Key words】 *Xiphophorus hellerii*; DNA fingerprint; Microsatellite; Germplasm appraisal

剑尾鱼 (*Xiphophorus hellerii*) 又名青剑、剑鱼, 属花鳉科 (Opecilidae), 是小型热带淡水鱼。具有食性杂、繁殖周期短、适应性强、容易饲养等优点^[1-2]。研究调查结果显示剑尾鱼对多种农药、重金属等毒物较敏感, 还对某些鱼类病原体敏感性高, 以及存在盲眼、畸形等诸多突变性状, 适合作为动物模型^[1-3]。1987 年, 珠江水产研究所开始了剑尾鱼实验动物化研究, 通过定向培育和系统研究, 育成 RR-B (红眼红体)、RW-H (红眼白体)、BY-F (黑眼橘红体) 三个品系^[1-3]。其中代表品系 RR-B 系剑尾鱼近交达 30 代, 通过了全国水产原种和良种审定委员会审定, 农业部第 348 号公告公布: 剑尾鱼 RR-B 系是适用于水环境监测^[4]、水产药物安全性评价^[5]、化学品毒性检测^[6]、动物疾病检验模型^[7]及遗传生物学研究^[8]等领域的水生实验动物。

传统的品种鉴定方法存在很多不足, 且易受环境影响、不能鉴定基因混杂程度等, 而 DNA 指纹图谱直接反映品种之间以及个体之间基因组序列的差异, 具有多位点性、高变异性、简单而稳定的遗传性, 近年来引起人们的重视, 表现出巨大的实用价值^[9]。剑尾鱼作为一种重要的水生实验动物, 其种质资源的鉴定方法仍有待完善, 因此, 本研究应用扩增稳定、清晰的 46 个微卫星位点, 对 RR-B 系 (红眼红体)、RW-H 系 (红眼白体)、野生种三个品系剑尾鱼进行 DNA 指纹图谱构建, 并将形成的数字化指纹输入珠江水产研究所鱼类种质鉴定软件 V1.0 形成种质鉴定数据库。该图谱不仅能呈现出剑尾鱼的遗传概貌, 用于剑尾鱼选育系及其野生品种的鉴定, 而且也能为水生实验动物剑尾鱼的品种选育和知识产权保护提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验鱼

RR-B 系剑尾鱼 30 尾 (雌雄各 15 尾), 从珠江水产研究所水生实验动物培育基地随机抽取; RW-H 系剑尾鱼 30 尾 (雌雄各 15 尾), 取自珠江水产研究所水生实验动物培育基地, 已选育至 15 代; 野生型剑尾鱼 (非选育群体) 购自广州观赏鱼市场。

1.2 基因组 DNA 样品的制备

取剑尾鱼背鳍约 10 mg, 参考《分子克隆试验指南》^[10]方法提取基因组 DNA。0.8% 琼脂糖电泳检测 DNA 的完整性和纯度并用紫外分光光度计

(Eppendorf BioPhotometer) 检测其浓度, -20℃ 冰箱保存备用。

1.3 微卫星引物合成、PCR 扩增及电泳

参考已报道的文献^[11-12]及剑尾鱼中心网站中有关微卫星的数据 (www.xiphophorus.org/microsats/microsat.htm), 选取有多态性的微卫星引物 50 对, 由上海英骏公司合成。PCR 反应总体体系为 10 μL, 含有 10 × Buffer 1.0 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 0.3 ~ 0.6 μL, dNTPs (10 mmol/L) 0.2 μL, 上、下游引物 (20 mmol/L) 各 0.5 μL, Taq 酶 0.5 U, 模板 DNA 50 ng 左右。PCR 反应程序为 94℃ 预变性 3 min 后进入循环体系, 94℃ 变性 30 s, 各引物退火温度 48 ~ 60℃, 退火时间 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 25 个循环, 最后 72℃ 延伸 7 min。以 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 取 3 μL 产物电泳, 硝酸银染色, 染色方法参照文献^[13]。

1.4 微卫星位点的筛选

以 8 尾野生剑尾鱼的 DNA 样本为模板, 调节 PCR 的温度 (48℃ ~ 60℃)、镁离子浓度 (终浓度 0.5 ~ 1.5 mmol/L), 使 PCR 达到最佳扩增效果。挑选扩增效果稳定, 电泳条带清晰的微卫星位点用于剑尾鱼 DNA 指纹图谱的构建。

1.5 数据统计与分析

PCR 产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳, 银染显带后用扫描仪扫描, 根据凝胶上 DNA 泳动距离, 用 Gel-pro analyzer 4.5 软件分析条带大小。统计剑尾鱼个体在各个位点的条带大小, 用 Excel 软件绘制散点图, 从而形成 3 个群体的指纹图谱模式图。选取在 3 个剑尾鱼品系中具有特异扩增条带的 5 对微卫星引物形成数字化指纹, 以便于 3 个品系及其杂交种的鉴定。

2 结果

2.1 剑尾鱼 RR-B 系、RW-H 系及野生群体的微卫星扩增结果

用 8 尾剑尾鱼个体进行预实验, 筛选合成的 50 对引物, 经 PCR 条件优化, 选取扩增结果稳定、条带清晰的引物, 共筛选出 46 对引物。然后使用这些微卫星标记对剑尾鱼 RR-B 系、RW-H 系及野生群体进行基因组扫描, 46 个位点在 3 个群体中共找到等位基因 106 个, 平均每个位点 2.3 个, 部分扩增结果见图 1。

微卫星标记遵循孟德尔遗传法则, 呈共显性遗

传,因此能很好的区分纯合子和杂合子。如图 1 中,微卫星位点 Msc036 具有 3 种等位基因型,纯合个体仅扩增出其中一条带型,杂合个体则可扩增出其中二条带型,图中 RR-H 系剑尾鱼在位点 Msc036 为纯合。结果发现剑尾鱼 RR-B 系在 42 个微卫星位点

上表现为纯合、单态性,等位基因纯合率为 91.3%; RW-H 系则为 43 个位点纯合、单态性,等位基因纯合率为且为 93.5%;而这些野生群体在这些位点(除位点 Msb030 外)则表现为杂合,反映出这 2 个选育系已经具有了很高的遗传纯度。

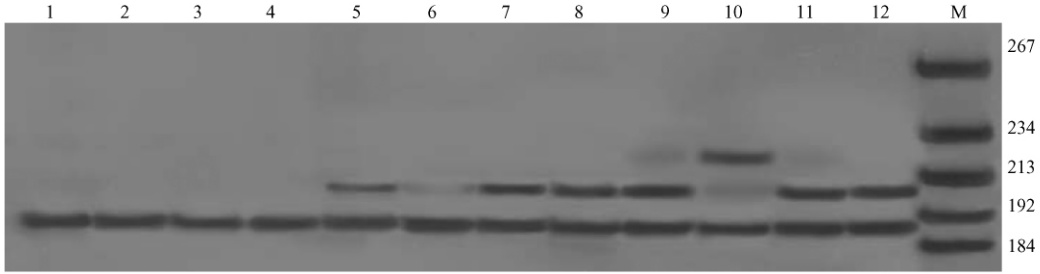


图 1 剑尾鱼 3 个群体在微卫星位点 Msc036 的扩增产物电泳图

Fig. 1 Electrophoregram of locus Msd036 in three swordtail fish populations

注:1-4,剑尾鱼 RR-B 系个体;5-8,剑尾鱼 RW-H 系个体;9-12 野生剑尾鱼个体;M 为 DNA Marker.

Note: 1-4, RR-B strain; 5-8, RW-H strain 9-12, wild swordtail fish; M is pBR322 DNA/ BsuRI(HaeIII) Marker

2.2 剑尾鱼微卫星 DNA 指纹图谱模式图构建

采用 Excel 软件,根据 46 对微卫星引物在 3 个

剑尾鱼群体中 PCR 扩增条带的大小,绘制剑尾鱼微

卫星 DNA 指纹图谱模式图(见图 2~4)。

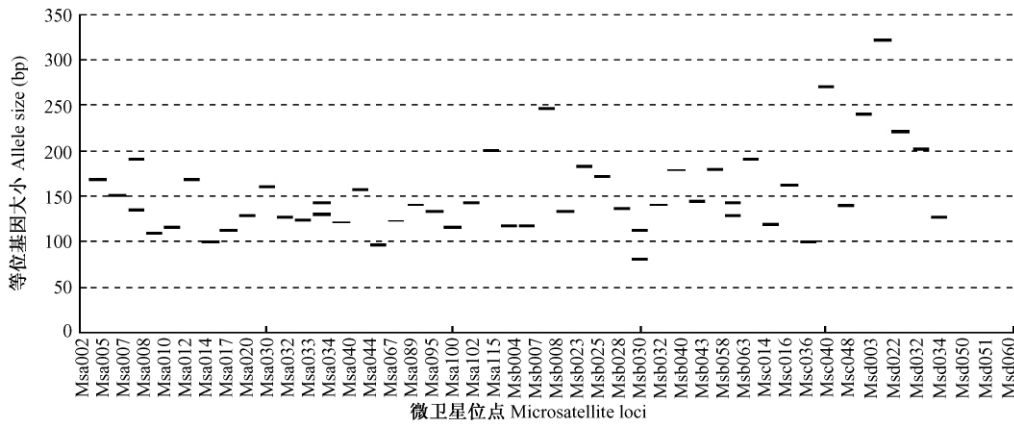


图 2 剑尾鱼 RR-B 系的微卫星 DNA 指纹图谱

Fig. 2 DNA fingerprinting of RR-B strain of Xiphophorus helleri using Microsatellites

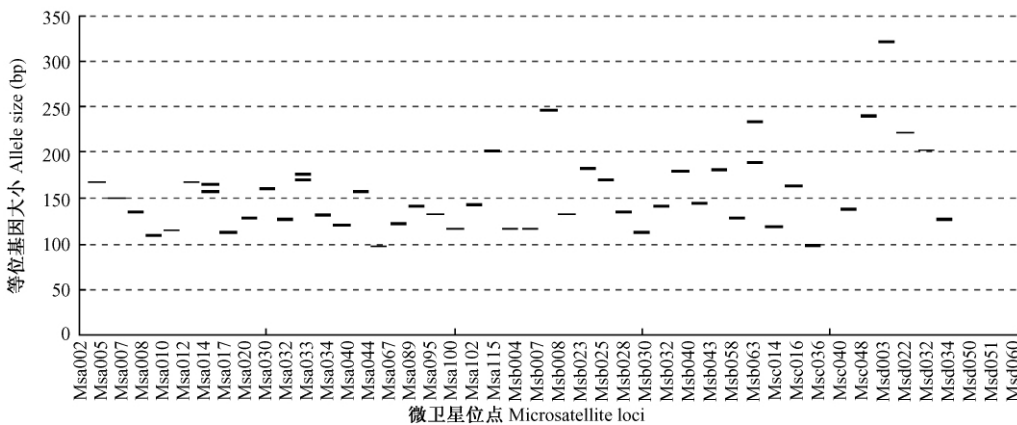


图 3 剑尾鱼 RW-H 系的微卫星 DNA 指纹图谱

Fig. 3 DNA fingerprinting of RW-H strain of Xiphophorus helleri using Microsatellites

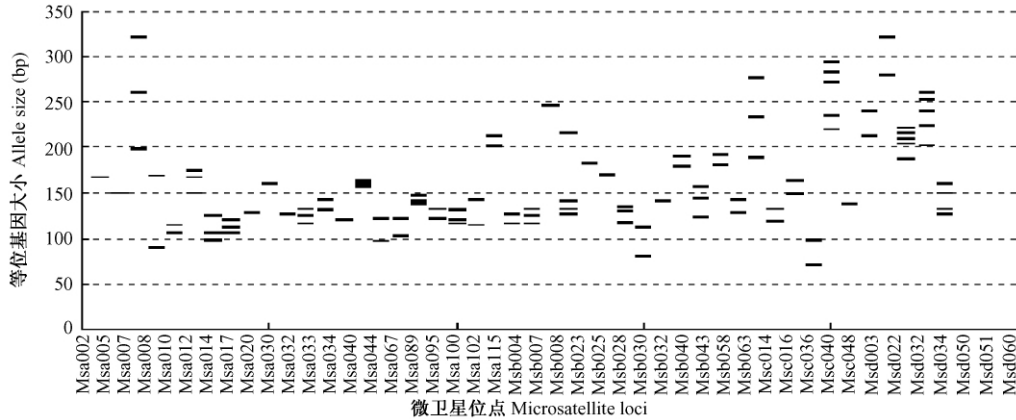


图 4 剑尾鱼非选育系的微卫星 DNA 指纹图谱

Fig. 4 DNA fingerprinting of wild *Xiphophorus helleri* using Microsatellites

2.3 剑尾鱼品系鉴定标记及其数字化指纹

选取在剑尾鱼 RR-B 系、RW-H 系和非选育系中具有特异扩增条带的 5 对微卫星引物,根据扩增条带的大小,有带的记为 1,无带的记为 0,形成每个品系对应的数字化指纹,具体数据见表 1。

表 1 剑尾鱼特异微卫星标记的数字化指纹

Tab. 1 The digital fingerprint of *Xiphophorus helleri* on strain-special microsatellite loci

微卫星 Microsatellites	条带大小 (bp) Length	数字化指纹 Digital fingerprint		
		RR-B 系	RW-H 系	非选育系
Msa007	134、190、198、260、320	11000	10000	00111
Msa014	98、106、124、156、164	10000	00011	11100
Msa033	116、124、132、170、176	01000	00011	11100
Msc036	189、203、217	100	110	111
Msd003	219、235、271、283、295	00100	00000	11111

2.4 剑尾鱼 DNA 指纹图谱鉴定数据及软件应用

珠江水产研究所鱼类种质鉴定软件 V1.0 (PRIFRI1.0) 是由珠江水产研究所根据鱼类 DNA 指纹数据特点开发的鱼类种质鉴定软件,已获得软件著作权(证书号 2010SR026776)。将剑尾鱼数字化指纹数据根据软件要求整理成 DNA 指纹图谱数据库(如图 5 所示),该软件可从已建立的剑尾鱼指纹图谱数据库中挑选任意几个位点所形成的数字化指纹作为标准,以 EXCEL 形式导入软件,应用软件中已嵌入的计算公式,经基因频率、遗传相似度等计算,快速准确的鉴定的某一未知个体与各已知品系的相似度并确定其种群分类归属。

以剑尾鱼 RR-B 系的第一个个体在其中 5 个微卫星位点 (Msa007、Msa008、Msa010、Msa012 和 Msa014) 的数据“11000 010 01 010 10000”为例,输入该软件后,运行软件,结果如下图所示:

微卫星位点 Loci 等位基因大小 Allele size (bp)	Msa007	Msa008	Msa010	Msa012	Msa014	Msa017
	134 190 198 260 320	89 109 169	106 114	149 167 175	98 106 124 156 164	106 112 120
剑尾鱼 RR-B 系	1 1 1 0 0 0	0 1 0	0 1	0 1 0	1 0 0 0 0	0 1 0
	2 1 1 0 0 0	0 1 0	0 1	0 1 0	1 0 0 0 0	0 1 0
	3 1 1 0 0 0	0 1 0	0 1	0 1 0	1 0 0 0 0	0 1 0
	4 1 1 0 0 0	0 1 0	0 1	0 1 0	1 0 0 0 0	0 1 0
	5 1 1 0 0 0	0 1 0	0 1	0 1 0	1 0 0 0 0	0 1 0
	6 1 1 0 0 0	0 1 0	0 1	0 1 0	1 0 0 0 0	0 1 0
	7 1 1 0 0 0	0 1 0	0 1	0 1 0	1 0 0 0 0	0 1 0
	8 1 1 0 0 0	0 1 0	0 1	0 1 0	1 0 0 0 0	0 1 0
	9 1 1 0 0 0	0 1 0	0 1	0 1 0	1 0 0 0 0	0 1 0
	10 1 1 0 0 0	0 1 0	0 1	0 1 0	1 0 0 0 0	0 1 0
	11 1 1 0 0 0	0 1 0	0 1	0 1 0	1 0 0 0 0	0 1 0
	12 1 1 0 0 0	0 1 0	0 1	0 1 0	1 0 0 0 0	0 1 0

图 5 剑尾鱼 DNA 指纹数据库示意图

Fig. 5 Part of the DNA fingerprinting database of *Xiphophorus helleri*

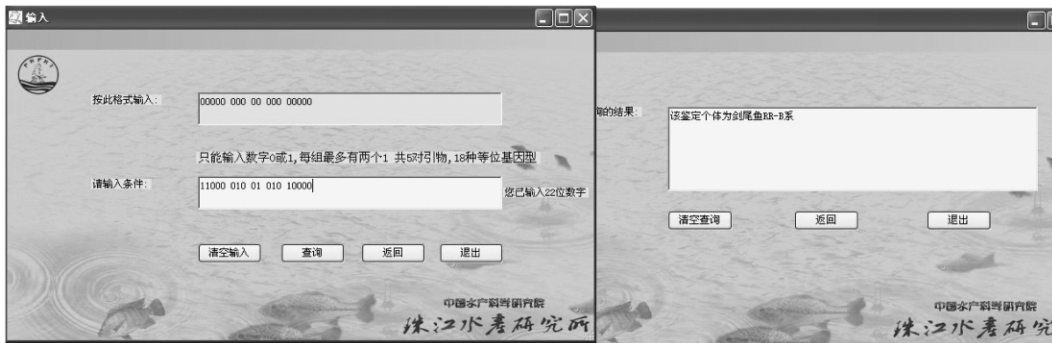


图 6 剑尾鱼种质资源鉴定软件的运行示意图

Fig. 6 The software operation schematic of *Xiphophorus* germplasm resources appraisal software, PRIFRII. 0

3 讨论

实验动物是医学、生命科学的基础和重要支撑条件,在疾病模型的构建、药物安全性评价、环境污染监测、发育生物学、分子生物学等众多领域发挥着越来越重要的作用,剑尾鱼在应用中具有明显的特色与优势,具有广阔的应用前景。近交系动物中微卫星长度变化发生率很低,近交系实验动物的显著特征是基因纯合性及遗传稳定性,用于实验重复性好,可比性强,微卫星位点的等位基因则可作为某一近交系动物的恒定参数^[14-15]。

剑尾鱼种质资源监测及近交系纯度鉴定是剑尾鱼作为实验动物的基础。微卫星 DNA 是对 DNA 的直接反应,要比生化标记更准确、可靠,已经广泛应用到大小鼠、仓鼠、沙鼠、家兔、犬、猴和猪等常用实验动物的遗传监测当中^[16-17]。本研究构建的微卫星 DNA 指纹图谱可以用作剑尾鱼品种鉴定,这几个品系间具有特异扩增条带的 5 个微卫星标记将较好的用于区分剑尾鱼的不同品系,同时 PRIFRII.0 软件的应用也将简化种质鉴定步骤。另一方面微卫星 DNA 指纹也可用于剑尾鱼品系的纯度检测。欧阳兆和等^[18]用 14 个微卫星 DNA 对 10 个近交系小鼠多态分析表明,这些微卫星 DNA 在同一品系不同个体间表现为单态性,在不同品系间表现为多态性,可快速、经济的对近交系小鼠进行遗传检测和纯度鉴定。本研究中 46 个微卫星标记扩增的结果显示,在野生型剑尾鱼中表现为多态性的 46 个微卫星 DNA 标记,在 RR-B 系和 RW-H 系中分别有 42 和 43 个标记表现为单态,基因纯合率为 91.3%、93.5%。这与李凯彬用生化标记方法检测出结果一致^[8],也证明了微卫星标记在实验动物遗传监测中应用的可行性。

参考文献:

[1] 吴淑勤,黄志斌.水生实验动物——剑尾鱼[M].北京:中国

农业出版社 2005.
 [2] 黄志斌,吴淑勤,石存斌,等.剑尾鱼的若干生物学特性研究[J].中国水产科学,2000,7(3):107-109.
 [3] Wu S, Huang Z, Yu R, et al. Approach for the application of *Xiphophorus helleri* as experiment animal [C]. Proceeding of the Fourth Asian Fisheries Forum, 1995. 101-107.
 [4] 王春风,方展强.汞和硒对剑尾鱼的急性毒性及其安全浓度评价[J].环境科学与技术,2005,28:32-35.
 [5] 聂湘平,王翔,李凯斌,等.抗生素药物环丙沙星对剑尾鱼的毒性效应[J].中山大学学报(自然科学版),2007,46(5):70-73.
 [6] 常藕琴,石存斌,潘厚军,等.剑尾鱼硫酸铜急性中毒的病理学研究[J].动物医学进展,2005,26(7):82-85.
 [7] 潘厚军,吴淑勤,李凯彬,等.剑尾鱼在检测细菌毒力方面的应用[J].水产学报,2000,24(5):467-471.
 [8] 李凯彬,姜兰,潘厚军,等.RR-B 系剑尾鱼 LDH 和 GDH 同工酶的分析[J].中国比较医学杂志,2004,13(3):46-50.
 [9] 王忠华.DNA 指纹图谱技术及其在作物品种资源中的应用[J].分子植物育种,2006,4(3):425-430.
 [10] 萨姆布鲁克,弗里奇,曼尼阿蒂斯.分子克隆实验指南:第 2 版[M].北京:科学出版社,1999.
 [11] 李霞,白俊杰,吴淑勤,等.剑尾鱼 RW-H 近交系的遗传结构分析[J].水产学报,2004,28(4):365-370.
 [12] 李霞,白俊杰,吴淑勤,等.剑尾鱼微卫星 DNA 的筛选[J].中国水产科学,2004,11:196-201.
 [13] 张春雷,佟广香,匡友谊,等.微卫星产物变性与非变性 PAGE-银染方法比较[J].水产学杂志,2010,23(1):11-14.
 [14] Dallas JF. Estimation of microsatellite mutation rates in recombinant inbred strains of mouse [J]. Mammalian Genome, 1992, 3: 452-456.
 [15] Martinez AM, Delgado JV, Roder A. Genetic structure of the Iberian pig breed using microsatellites [J]. Animal Genetics, 2000, 31: 295-301.
 [16] 李瑞生,胡娟峰,曾林,等.微卫星 DNA 标记在常用实验动物遗传多态性的研究进展[J].中国比较医学杂志,2008,10:81-81.
 [17] 李瑞生,陈振文,李娟娟,等.微卫星 DNA 标记在常用实验动物遗传监测中的分析[J].中国比较医学杂志,2010,10:75-76.
 [18] 欧阳兆和,陈振文,李瑞生等.微卫星 DNA 多态性在十种近交系小鼠遗传监测中的应用研究[J].中国比较医学杂志,2004,14(2):71-74.

(修回日期)2011-01-11