

文章编号: 1000-0615(2003)04-0295-05

## 微卫星 DNA 鉴别克隆香鱼

董仕<sup>1</sup>, 谷口顺彦<sup>2</sup>

(1. 天津师范大学化学与生命科学学院, 天津 300074; 2. 东北大学大学院农学研究科, 日本 仙台 981-8555)

**摘要:** 实验应用微卫星 DNA 检测技术, 分析了 I 至 VII 组共 42 尾香鱼的 *Pal-1*<sup>\*</sup> 和 *Pal-2*<sup>\*</sup> 两个基因座位的基因型。结果显示 II、III、IV 和 VII 组共 22 尾在两个基因座位上均为纯合, 是基因型完全相同的克隆鱼, 并且 VII 组 10 尾为人工诱导成功的雌核发育二倍体, 而 I 为混入本克隆的其它类型的香鱼; V 组 9 尾为 I 与海产香鱼的子代; VI 组 10 尾为 II 或 III 与海产香鱼的子代。

**关键词:** 香鱼; 克隆; 微卫星 DNA

中图分类号: S917 文献标识码: A

### Identification of clonal *Plecoglossus altivelis* using microsatellite DNA marker

DONG Shi<sup>1</sup>, TANIGUCHI Nobuhiko<sup>2</sup>

(1. Department of Biology, Tianjin Normal University, Tianjin 300074, China;

2. Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Miyagi 981-8555, Japan)

**Abstract:** The specimen used in this study was 42 fish of seven groups of ayu, *Plecoglossus altivelis*, and they should be one clone induced artificially or samples obtained from the eggs of amphidromous form inseminated by the sperm of the individuals of the same clone. The genomic DNA were extracted from caudal fin of adult or all fish of larva and microsatellite DNA were amplified by PCR. The genotypes of individuals were identified according to electrophoretic patterns of the products of PCR. The results suggest 22 fish of II, III, IV and VII groups be one clone, because they have the same genotypes at two loci of *Pal-1*<sup>\*</sup> and *Pal-2*<sup>\*</sup> respectively. 10 fish of VII group were gynogenetic diploids induced successfully and one clone. 1 fish of I is other type fish. 19 fish of V and VI groups were offspring of I, II or III and amphidromous form.

**Key words:** *Plecoglossus altivelis*; clone; microsatellite DNA

应用染色体组工程技术可以人工诱导鱼类的雌核发育和雄核发育二倍体、三倍体和四倍体<sup>[1-2]</sup>。人工诱导的雌核发育二倍体, 依据人工处理受精卵的方法, 又可将其分为阻止第二极体放出的雌核发育二倍体和阻止第一次卵裂的雌核发育二倍体。由于卵在减数分裂时有染色体的交叉与交换现象, 前者的母本只要在所有的基因座位上不是完全纯合的个体, 其子代也不会出现完全纯合的个体, 后者的子代应为完全纯合的个体<sup>[1, 3-4]</sup>。有些鱼类的卵, 既使是用失去遗传活性的精子受精, 不经任何处理, 由于发生自然抑制第二极体放出的现象, 也会有部分卵发育成能正常存活的二倍体<sup>[5]</sup>。

红细胞的大小、DNA 含量、染色体计数等检测方法, 可以区别二倍体、三倍体和四倍体<sup>[6-11]</sup>。而鉴

收稿日期: 2002-06-21

作者简介: 董仕 (1959-), 男, 天津市人, 研究员, 博士, 主要从事水产动物遗传育种和养殖研究。Tel: 022-23540996, E-mail: tjtk185

别同种鱼不同类型的二倍体鱼应使用分子遗传标记等检测技术进行鉴别。核 DNA 的小卫星 (minisatellite DNA) 和微卫星 (microsatellite DNA) 是新的遗传标记。广泛应用在个体的识别、群体遗传组成的分析以及染色体组工程成功与否的判别等生物学领域,也是鉴别克隆鱼的有效手段<sup>[12-22]</sup>。

本试验应用微卫星 DNA 检测技术鉴别日本和歌山县内水面渔业中心提供的香鱼 (*Plecoglossus altivelis*) 是否是克隆鱼,为下一步育种工作的展开提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验鱼

所用试验用香鱼分为以下 7 部分。I 至 IV 为 1996 年秋季人工繁殖获得的应属于同一克隆的试验鱼, I 至 III 在 1997 年秋季作为亲鱼使用。香鱼 I: 1 尾, 雄性, 精巢发育完全。香鱼 II: 1 尾, 雌雄同体, 一侧生殖腺为发育完全的卵巢, 另一侧约 1/4 为精巢。香鱼 III 1 尾, 雌雄同体, 一侧生殖腺为发育完全的卵巢, 另一侧约 3/4 为精巢。人工传代的克隆鱼中约有 1% 为雌雄同体。香鱼 IV: 10 尾, 1996 年秋季人工传代的克隆鱼。香鱼 V 至 VII 为 1997 年秋季人工繁殖的仔鱼。香鱼 V: 9 尾, 由香鱼 I 与海产香鱼 (♀) 人工繁殖获得。香鱼 VI 10 尾, 用香鱼 II 和 III 混合的精子使海产香鱼卵受精获得。香鱼 VII 10 尾, 用人工失去遗传活性的海产香鱼的精子, 使取自与香鱼 IV 同水槽饲养的雌性克隆鱼的卵受精, 阻止第二极体放出而获得的雌核发育二倍体。

### 1.2 DNA 的提取

参照中山一郎<sup>[23]</sup>和董仕等<sup>[17]</sup>的方法, 略有改动。取 -80℃ 冷冻鱼 5mm × 10mm 左右的尾鳍或无水乙醇保存的仔鱼 (全长约 15mm) 放入已加入 700μL TNES-Urea (10 mmol·L<sup>-1</sup> Tris/HCl, pH 7.5; 1.5 mol·L<sup>-1</sup> NaCl; 10 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA·2Na, pH 7.5; 0.5% SDS; 4 mol·L<sup>-1</sup> Urea) 的 1500μL 离心管中。再加入 50μg 蛋白酶 K, 37℃ 过夜。用酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1) 提取两次, 氯仿: 异戊醇 (24: 1) 提取一次, 醋酸钠、乙醇沉淀, 70% 乙醇洗净一次, 空气干燥后, 加入 200μL 左右的 TE 缓冲液 (10 mmol·L<sup>-1</sup> Tris/HCl, pH 8.0, 1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA·2Na, pH 8.0), 紫外分光光度计测定浓度后待用。

### 1.3 微卫星 DNA 的扩增

本试验检测的微卫星 DNA 为 Takagi 等<sup>[24]</sup>报导的香鱼的 *Pal-1*\* 和 *Pal-2*\* 两个基因座位。两者均为 (GT) 的重复排列。扩增 *Pal-1*\* 基因座位的两个引物分别为 (5' - 3'): TGTGGGAAAGTGGGTGCGGG 和 AGAAATCCACATCAACATCC, 扩增 *Pal-2*\* 基因座位的两个引物分别为 (5' - 3'): TCACACTCCCTCACTGGCAC 和 TTCAGCACACACATTATCTCAC。检测过程参照 Takagi 等<sup>[24]</sup>报导的方法进行。用 T4 多核苷酸激酶将 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP 连接到引物上后, PCR 扩增微卫星 DNA。PCR 反应液共 6μL, 内含 10 ng 模板 DNA 以及 dNTP、PCR 缓冲液、两种引物和 TaqDNA 聚合酶。94℃、1min 变性, 52℃、30s 退火, 72℃、30s 引物延伸, 7 次循环后, 90℃、30s 变性, 52℃、30s 退火, 72℃、30s 引物延伸, 33 次循环。PCR 扩增后, 聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳后, 获取放射自显影照片, 判断每一个试验鱼的基因型。电泳时, 加入 M13 Sequence ladder, 作为计算扩增 DNA 片段长度 (碱基数) 的标准。

## 2 结果

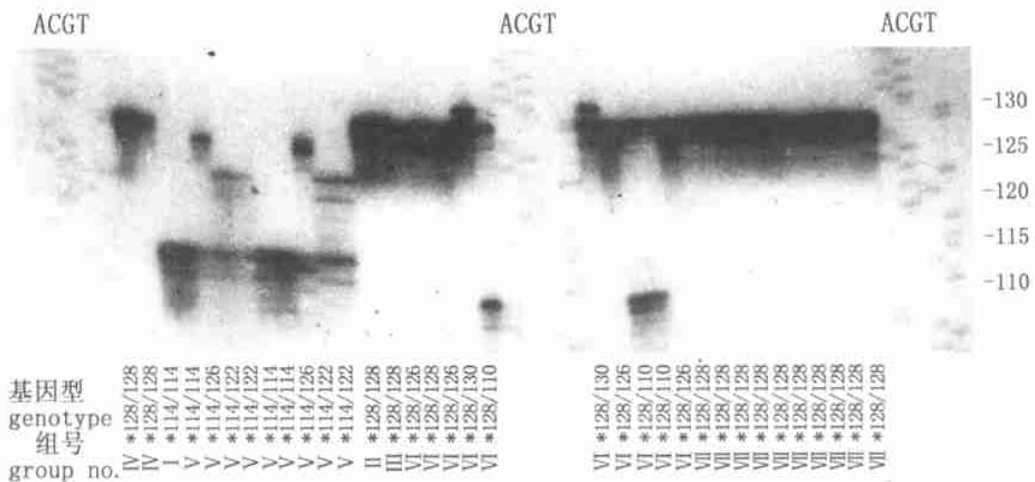
全部 42 尾试验鱼的 *Pal-1*\* 和 *Pal-2*\* 两个基因座位的基因型见表 1, 部分试验鱼的微卫星 DNA 的电泳结果见图 1。香鱼 II、III、IV 和 VII 试验鱼的 *Pal-1*\* 基因座位上的基因型均为 \*128/128, *Pal-2*\* 基因座位上的基因型均为 \*160/160。香鱼 I 试验鱼的基因型不同于以上 4 种试验鱼, *Pal-1*\* 基因座位上的基因型为 \*114/114, *Pal-2*\* 基因座位上的基因型为 \*166/166。香鱼 V 的试验鱼的每一个基因

座位上均含有来自于香鱼 I 的一个基因, *Pal-1*\* 基因座位上的另一个基因为\* 114、\* 122 和\* 126 三种, *Pal-2*\* 基因座位上的另一个基因为\* 166 和\* 170 两种。香鱼 VI 试验鱼的每一个基因座位上均含有来自于香鱼 II 或 III 的一个基因, *Pal-1*\* 基因座位上的另一个基因为\* 110、\* 126、\* 128 和\* 130 四种。 *Pal-2*\* 基因座位上的另一个基因为\* 162、\* 164、\* 166、\* 170 和\* 186 五种。

表 1 香鱼微卫星 DNA 的基因型

Tab. 1 Genotypes at microsatellite DNA loci of *Plecoglossus altivelis*

组号 group no.	由来 origin	个体号 individual no.	基因型 genotype	
			<i>Pal-1</i> * 座位 <i>Pal-1</i> * locus	<i>Pal-2</i> * 座位 <i>Pal-2</i> * locus
I	-	1	* 114/ 114	* 166/ 166
II	克隆鱼 clone	1	* 128/ 128	* 160/ 160
III	克隆鱼 clone	1	* 128/ 128	* 160/ 160
IV	传代克隆 clone of next generation	1~ 10	* 128/ 128	* 160/ 160
		1	* 114/ 114	* 166/ 170
		2	* 114/ 126	* 166/ 170
		3	* 114/ 122	* 166/ 166
V	海产雌鱼与 I 的子代 offspring of amphidromous form female and I	4	* 114/ 122	* 166/ 170
		5	* 114/ 114	* 166/ 170
		6	* 114/ 114	* 166/ 170
		7	* 114/ 126	* 166/ 170
		8	* 114/ 122	* 166/ 170
		9	* 114/ 122	* 166/ 170
		10	* 128/ 126	* 160/ 166
VI	海产雌鱼与 II 或 III 的子代 offspring of amphidromous form female and II or III	2	* 128/ 128	* 160/ 166
		3	* 128/ 126	* 160/ 162
		4	* 128/ 130	* 160/ 162
		5	* 128/ 110	* 160/ 170
		6	* 128/ 130	* 160/ 166
		7	* 128/ 126	* 160/ 162
		8	* 128/ 110	* 160/ 186
		9	* 128/ 110	* 160/ 164
		10	* 128/ 126	* 160/ 166
		VII	克隆鱼的雌核发育子代 gynogenetic diploid of clone	1~ 10

图 1 香鱼微卫星 DNA 的 *Pal-1*\* 基因座位的电泳图谱及基因型Fig. 1 Electrophoretic patterns and genotypes at *Pal-1*\* locus of microsatellite DNA in *Plecoglossus altivelis*

### 3 讨论

#### 3.1 香鱼 II、III、IV和 VI应为来自于同一克隆的克隆鱼

据 Takagi 等<sup>[24]</sup>报导, 24 尾海产香鱼的  $Pal-1^*$  基因座位上的等位基因数为 15 个, 杂合度观察值为 1.000,  $Pal-2^*$  基因座位上的等位基因数为 14 个, 杂合度观察值为 0.921。本试验中的香鱼 V 和香鱼 VI 试验鱼的母本为海产香鱼, 这些仔鱼中在  $Pal-1^*$  基因座位和  $Pal-2^*$  基因座位上没有一个均为纯合的个体。香鱼 II、III、IV 和 VI 4 种试验鱼在两个基因座位上的基因型均为纯合, 并且基因型相同, 所以可以断定这 4 种试验鱼与预期的结果一致, 应为来自于同一克隆的克隆鱼。

#### 3.2 微卫星 DNA 的多态性以及鉴别染色体组工程鱼类的必要性

同一种鱼类不论是哪一种类型的二倍体, 其红细胞大小、DNA 含量和染色体数等应是相同的。雄性或雌性遗传物质是否失活, 人工诱导的雌核发育二倍体或雄核发育二倍体是否成功以及试验鱼中是否混入了其它类型的鱼等, 应该应用同工酶、核 DNA 等遗传标记进行鉴别。应用染色体组工程技术, Tabata 等<sup>[25]</sup>诱导了牙鲆, Taniguchi 等<sup>[26]</sup>诱导了香鱼的阻止第一次卵裂的雌核发育二倍体。两者经同工酶检测证明阻止第一次卵裂的雌核发育二倍体试验鱼的基因型不同于对照组, 与阻止第二极体的雌核发育二倍体组试验鱼的基因型也不一样, 均为纯合的个体。但同工酶与核 DNA 的小卫星和微卫星相比, 多态性基因座位少, 变异程度低<sup>[27]</sup>。Tabata 等<sup>[25]</sup>检测 246 尾牙鲆, Taniguchi 等<sup>[26]</sup>检测 128 尾香鱼的同工酶的结果显示, 每个基因座位上的等位基因只有 2 个, 基因型只有 3 种。而在本试验中共检测了 42 尾试验鱼, 其中香鱼 II、III、IV 和 VI 的 22 尾试验鱼属于同种克隆, 其基因型完全相同, 香鱼 V 和 VI 试验鱼的父本分别是 1 尾纯合的个体。尽管如此, 在香鱼 V 和 VI 的 19 尾试验鱼的  $Pal-1^*$  与  $Pal-2^*$  两基因座位上分别检测出 6 种和 5 种等位基因。

试验中的香鱼 I 是与香鱼 II、III、IV 同水槽饲养的, 本应属于相同来源的克隆鱼。但试验结果显示它的基因型不同于香鱼 II、III 和 IV, 应是混入饲养香鱼 II、III、IV 水槽中的其它类型的鱼。

试验结果还显示, 香鱼 VI 的试验鱼不含有来自于海产香鱼父本的遗传物质, 母本是与香鱼 II、III 和 IV 为同一来源的克隆鱼。

日本和歌山县渔业中心的山崎公男先为本研究提供试验鱼, 特此表示感谢。

#### 参考文献:

- [1] Lou Y D. Artificial gynogenesis and its application in genetics and aquaculture[J]. J Fish China, 1986, 10(1): 111- 123. [楼允东. 人工雌核发育及其在遗传学和水产养殖上的应用[J]. 水产学报, 1986, 10(1): 111- 123.]
- [2] Suzuki R. Chromosome manipulation and its application for aquaculture[M]. Tokyo: Koseisha Koseikaku, 1989. 21- 29. [铃木亮. 水产增殖与染色体操作[M]. 东京: 恒星社厚生阁, 1989. 21- 29.]
- [3] Taniguchi N. Chromosome manipulation and its application for aquaculture[M]. Tokyo: Koseisha Koseikaku, 1989. 104- 117. [谷口顺彦. 水产增殖与染色体操作[M]. 东京: 恒星社厚生阁, 1989. 104- 117.]
- [4] Seki S, Taniguchi N. The frequency of second division segregation of some isozyme loci in gynogenetic diploid of ayu, *Plecoglossus altivelis* [J]. Fish Genetics and Breeding Science, 1989, 14: 43- 48. [关伸吾, 谷口顺彦. 雌核发生 2 倍体における A N 第 2 分裂分离比[J]. 水产育种, 1989, 14: 43- 48.]
- [5] Chefas N, Gomelsky B, Ben-Dom N, et al. Evidence for the heritable nature of spontaneous diploidization in common carp, *Cyprinus carpio* L., eggs[J]. Aquac Res, 1995, 26: 289- 292.
- [6] Sezaki K, Kobayasi H, Nakamura M. Size of erythrocytes in the diploid and triploid specimens of *Carassius auratus langsdorfi* [J]. Japanese Journal of Ichthyology, 1977, 24(2): 135- 140. [瀬崎启次郎, 小林弘, 中村守纯. 2 倍体および 3 倍体 Ó N 赤血球径の比较[J]. 鱼类学杂志, 1977, 24(2): 135- 140.]
- [7] Sezaki K, Kobayasi H. Comparison of erythrocytic size between diploid and tetraploid in spinous loach, *Cobitis biwaensis* [J]. Bull Jap Soc Sci Fish,

- 1978, 44(8): 851- 854.
- [ 8 ] Liu S Y, Li S W. On the erythrocyte nucleus size and DNA contents of *Ctenopharyngodon idellus*, *Megalobrama terminalis* and F<sub>1</sub> hybrid of the triploid[J]. Acta Genetica Sinica, 1987, 14(2): 142- 148. [ 刘思阳, 李素文. 三倍体草鲂杂种及其双亲的红细胞(核)大小和 DNA 含量 [J]. 遗传学报, 1987, 14(2): 142- 148. ]
- [ 9 ] Arai K, Matsubara K, Suzuki R. Karyotype and erythrocyte size of spontaneous tetraploidy and triploidy in the loach *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1991, 57(12): 2167- 2172.
- [ 10 ] Zhu L F, Gui J F, Liang S C, et al. Observation on erythrocyte in artificial autotriploid and allotriploid of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) [J]. Acta Hydrobiol Sin, 16(1): 84- 86. [ 朱蓝菲, 桂建芳, 梁绍昌, 等. 人工同源和异源三倍体鲢的红细胞观察 [J]. 水生生物学报, 1992, 16(1): 84- 86. ]
- [ 11 ] Tao B C, Dong S, Qiao X T. Erythrocyte size, haematology and DNA content of diploid and triploid in carp, *Cyprinus carpio* [A]. [ 陶秉春, 董仕, 乔秀亭. 二、三倍体鲤鱼的红细胞(核)大小、DNA 含量及血液性状的比较研究 [A]. 全国首届青年水产学术研讨会论文集 [C]. 上海: 同济大学出版社, 1995. 354- 361. ]
- [ 12 ] Jeffreys A J, Wilson V, Thein S L. Hypervariable minisatellite regions in human DNA [J]. Nature, 1985, 314: 67- 73.
- [ 13 ] Taggart J B, Ferguson A. Minisatellite DNA fingerprinting of salmonid fishes [J]. Animal Genetics, 1990, 21: 377- 389.
- [ 14 ] Taggart J B, Ferguson A. Hypervariable minisatellite DNA single locus probes for the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. [J]. J Fish Biol, 1990, 37: 991- 993.
- [ 15 ] Mannen H, Tsuji S, Goto N. DNA fingerprint using bacteriophage M13 probe in chickens [J]. Jan J Zootech Sci, 1990, 61(12): 1957- 1062. [ 万年英之, 庄一, 后藤信男. M13 フ - r 用いたヨ ス 核 DNA のフ - ・ È Ó 〃 [J]. 日本畜产学会报, 1990, 61(12): 1057- 1062 ]
- [ 16 ] Han H S, Mannen H, Tsujimura, et al. Application of DNA fingerprinting to confirmation of clone in ayu [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1992, 58(11): 2027- 2031.
- [ 17 ] Dong S, Taniguchi N, Tsuji S. Identification of clones of ginbuna *Carassius langsdorfii* by DNA fingerprinting and isozyme pattern [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1996, 62(5): 747- 753. [ 董 仕, 谷口顺彦, 庄一. DNA フ - ・ È Ó 〃 H À ± 4 による テホ 4 の识别 [J]. 日本水产学会志, 1996, 62(5): 747- 753. ]
- [ 18 ] Dong S, Ohara K, Taniguchi N. Introduction of sperm of common carp *Cyprinus carpio* into eggs of ginbuna *Carassius langsdorfii* by heat shock treatment and its confirmation by DNA markers [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1997, 63(2): 201- 206. [ 董 仕, 大原健一, 谷口顺彦. 高水温处理による Ó ¶ ª 卵 の 精子の导入と DNA ¼ - - による确认 [J]. 日本水产学会志, 1997, 63(2): 201- 206. ]
- [ 19 ] Umino T, Arai K, Maeda K, et al. Natural clones detected by multilocus DNA fingerprinting in gynogenetic triploid ginbuna *Carassius langsdorfii* in Kurose River, Hiroshima [J]. Fisheries Science, 1997, 63(1): 147- 148.
- [ 20 ] O'Connell M, Dillon M C, Wright J M, et al. Genetic structuring among Alaskan Pacific herring population identified using microsatellite variation [J]. J Fish Biol, 1998, 53: 150- 163.
- [ 21 ] Aliah R S, Takagi M, Dong S, et al. Isolation and inheritance of microsatellite markers in the common carp *Cyprinus carpio* [J]. Fisheries Science, 1999, 65(2): 235- 239.
- [ 22 ] Ohara K, Dong S, Taniguchi N. High proportion of heterozygotes in microsatellite DNA loci of wild clonal silver crucian carp, *Carassius langsdorfii* [J]. Zoological Science, 1999, 16: 909- 913.
- [ 23 ] Nakayama I. Application of genomic DNA analysis on fisheries science [J]. Bull Natl Res Inst Aquaculture, 1995, 24: 1- 15. [ 中山一郎. トル DNA 解析の水产分野への应用 [J]. 养殖研报, 1995, 24: 1- 15. ]
- [ 24 ] Takagi M, Shoji E, Taniguchi N. Microsatellite DNA polymorphism to reveal genetic divergence in ayu *Plecoglossus altivelis* [J]. Fisheries Science, 1999, 65(4): 507- 512.
- [ 25 ] Tabata K, Goñe S. Induction of gynogenetic diploids in *Paralichthys olivaceus* by suppression of the 1st cleavage with special reference to their survival and growth [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 54(11): 1867- 1872 [ Tabata K, 五利江重阳. 第 1 卵割阻止による 2 È Å N 雌性发生 2 倍体の诱起と飼育特性 [J]. 日本水产学会志, 1988, 54(11): 1867- 1872. ]
- [ 26 ] Taniguchi N, Hatanaka H, Seki S. Genetic variation in quantitative characters of meiotic and mitotic gynogenetic diploid ayu, *Plecoglossus altivelis* [J]. Aquac, 1990, 85: 223- 233.
- [ 27 ] Taniguchi N, Takagi M. DNA of fish [M]. Tokyo: Koseisha Koseikaku, 1997. 117- 137. [ 谷口顺彦, 高木基裕. 鱼类の DNA [M]. 东京: 恒星社厚生阁, 1997. 117- 137. ]