

研究简报

稀有 鲫与其他模式实验鱼类基因组大小的比较

童金苟 俞小牧 张菁 游翠红

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

COMPARISON OF GENOME SIZE OF RARE MINNOW (*Gobiocypris rarus*) WITH OTHER MODEL FISHES

TONG Jirr-Gou, YU Xiaor-Mu, ZHANG Jing and YOU Cuir-Hong

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

关键词: 稀有 鲫; DNA 含量; 基因组大小; 实验鱼类

Key words: *Gobiocypris rarus*; DNA content; Genome size; Model fish

中图分类号: Q343.244 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2003)02-0208-003

稀有 鲫(*Gobiocypris rarus* Ye et Fu)是我国特有的小型实验鱼类, 具有性成熟期短、繁殖季节长、产卵频率高等特点^[1], 已在生态毒理和鱼病学等研究中得到应用, 显示了它作为实验鱼类的良好潜力。在稀有 鲫中, 已进行了繁殖和胚胎发育^[1, 2]、生长^[3]、染色体组型^[4]和雌核发育^[5]等研究。有关它的基因组大小或特点的报道尚未见到。这种遗传背景资料的缺乏, 至今不清楚它与现有的模式实验鱼类相比有哪些优势或劣势, 因而无法从基因组水平上评估稀有 鲫在更加广泛的研究领域(特别是遗传学和发育生物学)中作为水生模式实验动物的潜力。

鱼类的染色体(基因组)DNA作为遗传物质的载体, 每个细胞中的DNA含量是基本恒定不变的。因此, DNA含量可以反映一个物种的基因组种质特征, 例如基因组大小、非编码区的相对比例等。20世纪70年代开始有利用流式细胞计数术(Flow cytometry)测定鱼类细胞DNA含量的报道^[6]。目前, 流式细胞仪已成为测定DNA含量准确、快速的常规手段^[7-10]。本文利用流式细胞仪测定了稀有 鲫基因组DNA含量, 作为比较, 同时也对斑马鱼(*Danio rerio* Ham et Buch)和青(*Oryzias latipes* Temminck et Schlegel)这两种已经被广泛认可的模式实验鱼类进行了测量, 为正确认识稀有 鲫基因组的特点提供第一手资料。现将结果简要报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料鱼 稀有 鲫野生群体由本所鱼类室提供。青为武汉本地野生种, 在实验室经过繁殖而保存。斑马鱼购于武汉市花鸟市场, 经过实验室多代繁殖而保存。

1.2 方法 选取健康的个体, 在室内水族箱暂养1周以上。由于三种鱼类体形都较小, 取血困难, 本文采用剪断尾柄的方法直接将微量全血收集于含1%肝素钠的冷生理盐水中, 低速离心(300r/min, 8min), 弃上清液, PBS洗涤红细胞2次, 70%乙醇固定(4℃过夜), 0.5%胃蛋白酶(0.1mol/L HCl)重悬红细胞, 室温温育15min并轻轻震动。用微量吸液器取少量精液, PBS洗涤1次, 余下的处理方法与红细胞相同。PI染色0.5h, 细胞悬液经过50μm尼龙网过滤后, 在Beckman公司Coulter Epics Altra型流式细胞仪上测出相对DNA含量。

每个样本稳定计数至少15000个细胞。本文以鸡红细胞DNA含量为参照。鸡血细胞是国际上公认的对照标准^[7], 但其DNA含量又与稀有 鲫的含量十分接近, 因此, 本研究采用内定标或外定标。内定标是将鸡血细胞处理后按照鸡、鱼血细胞约1:3比例混合后上机测定; 外定标则是流式细胞仪开机稳定后首先测定1次对照鸡血样品, 在每测定4—5个左右鱼样品后再测定1次鸡血样, 如果两次鸡血样的数据无误差, 则数据可靠, 否则, 重新测定。在本实验

收稿日期: 2002-09-05; 修订日期: 2002-10-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(30271011), 淡水生态与生物技术国家重点实验室开放课题

作者简介: 童金苟(1961—)男, 湖北省武汉市人; 博士, 副研究员; 从事鱼类分子遗传与遗传育种研究。王剑伟博士提供稀有 鲫, 魏文辉博士在样品制备和测量中提供帮助, 谨此致谢!

中,流式细胞仪性能稳定,每次前后测定的鸡血样品的消光值无明显变化,因此对照值可信。

2 结果与讨论

2.1 稀有 鲫二倍体基因组的大小

以鸡血细胞DNA含量为对照,11尾稀有 鲫的体细胞DNA含量测量结果见表1。总共计数超过了210000个细胞。结果显示,稀有 鲫的二倍体基因组大小为 2.660 ± 0.026 pg/细胞核。

2.2 稀有 鲫单倍体基因组大小

为了较为精确地估计单倍体基因组大小,随机取4尾稀有 鲫雄鱼的精子测量。共计数超过了60000个细胞,其

DNA含量平均为 1.338 ± 0.007 pg/单倍体基因组,验证了精子DNA为体细胞含量的一半的假设。

2.3 稀有 鲫与其他实验鱼类基因组大小的比较

本研究同时也测量了青 鱼和斑马鱼的红细胞DNA含量。稀有 鲫与目前被广泛认可的模式实验鱼类基因组大小的比较结果见表2。红鳍东方 (*Fugu rubripes*)的数据仅引用文献报道^[11]。在本实验条件下,所测得的斑马鱼DNA含量值与最近的文献报道相近^[9],所测得的青 鱼DNA含量值与Uwa和Iwata^[10]的报道一致,但与早期的报道不同^[12]。若不考虑体型较大的红鳍东方,很显然,在三种小型实验鱼类中,青 鱼的DNA含量最小,稀有 鲫次之,斑马鱼最大。

表1 稀有 鲫的体细胞DNA含量

Tab. 1 DNA content of somatic cell in *G. rarus*

样本号 Sample No.	消光值 Absorption values	对照(鸡)值 Control(chicken) absorption values	鱼:鸡比 Fish: chicken ratios	DNA含量 DNA content(pg/nucleus)
1	251.6	244.8	1.028	2.678
2	247.3	245.5	1.007	2.626
3	250.2	243.0	1.029	2.675
4	249.8	244.3	1.023	2.659
5	249.7	247.2	1.010	2.626
6	247.5	245.6	1.008	2.621
7	254.2	246.0	1.033	2.686
8	252.0	246.4	1.023	2.659
9	252.1	244.8	1.029	2.675
10	253.6	244.4	1.038	2.699
11	251.5	246.0	1.022	2.657

DNA含量平均值±标准差(Mean DNA content±SD)= 2.660 ± 0.026

表2 稀有 鲫与斑马鱼、青 鱼和红鳍东方 基因组大小的比较(单位:pg/细胞核)

Tab. 2 The comparison of genome sizes among *G. rarus*, *D. rerio*, *O. latipes* and *F. rubripes*

种名 Species name	体细胞DNA平均含量(SD) Mean somatic DNA contents	对照 Control blood	单倍体基因组大小估计 Haploid genome size estimation	文献来源 References
稀有 鲫 <i>Gobiocypris rarus</i>	2.660(0.026)	鸡血 Chicken	1.3	本研究 This paper
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	3.357(0.074)	人血 Human	1.6—1.7	Ciudad et al, 2002
青 <i>Oryzias latipes</i>	3.223(0.048)	鸡血 Chicken	1.6	本研究 This paper
	1.70	鸡血 Chicken	0.8—0.85	Uwa & Iwata, 1981
	2.2	鸡血 Chicken	1.1	Hinegardner & Rosen, 1972
	1.703(0.018)	鸡血 Chicken	0.85	本研究 This paper
红鳍东方 <i>Fugu rubripes</i>	0.8—1.0	鸡血 Chicken	0.4—0.5	Hinegardner et al, 1968

据报道,青 二倍体染色体数目为 48^[13],稀有 鲫和斑马鱼均为 50^[4,4]。有趣的是,本文结果表明,与作为脊椎动物新的模式实验动物的斑马鱼相比,稀有 鲫尽管有相同的染色体数目,但基因组更小,约比斑马鱼小 0.5—0.6pg/二倍体基因组。

除了一些有证据显示经过多倍化的种类(如鲤和鲤鱥鱼类)以外,DNA 含量的变化可以反映鱼类基因组的进化关系^[11,12]。DNA 含量的高低,也可以较为直观地反映某种鱼类基因组大小或复杂程度^[6]。这方面最有名的例子是东方属(*Fugu*)鱼类。红鳍东方的单倍体 DNA 含量仅 0.4—0.5pg,是鱼类中最小的基因组,只相当于人类的大约 1/6—1/8^[15]。随后的随机序列测定和分子杂交证实,红鳍东方为脊椎动物中迄今发现的最小基因组,大小为 400 Mb,重复 DNA 少于 10%,并证明它与人类有非常相近的基因数目和基因组结构^[16]。现在,红鳍东方小巧而致密的基因组已成为人类后基因组研究中探查基因结构和功能的重要实验材料。一般认为斑马鱼的基因组大约为人类的 2/3(即 1.8—1.9Gb)^[9],目前在斑马鱼中已基本完成的大规模测序工作已证实其基因组可能不超过 1.8Gb。东方和斑马鱼中的事实表明,通过 DNA 含量的测量,可以较为准确地反映一种鱼类的基因组大小和初步的性质。由此推测,稀有 鲫较为精确的基因组大小可能为 1.3Gb 左右,并相信它可能具有比斑马鱼更加紧凑的基因组结构,或可能具有更少的非编码区(或重复 DNA)。当然,这些推测还需要进一步的分子生物学证明。

我国有许多特有的鱼类,它们的基因组大小和特征等方面研究资料的严重缺乏,对后续研究和开发利用很不利。本研究通过对稀有 鲫基因组大小的测定及其与斑马鱼等模式鱼类的比较,提示稀有 鲫在基因组结构上可能有值得注意的特点,作为一种我国特有的小型实验鱼类,值得进一步深入研究和开发,以使它能早日成为得到国际认可的实验鱼类之一。

参考文献:

- [1] Wang J W. Reproductive biology of *Gobiocyrus rarus* [J]. *Acta Hydrobiologia Sinica*, 1992, **16**(2): 165—174[王剑伟. 稀有 鲫的繁殖生物学. 水生生物学报, 1992, **16**(2): 165—174]
- [2] Chang J B, Wang J W, Cao W X. The embryonic development of *Gobiocyrus rarus* [J]. *Acta Hydrobiologia Sinica*, 1995, **19**(2): 97—103[常剑波, 王剑伟, 曹文宣. 稀有 鲫胚胎发育研究. 水生生物学报, 1995, **19**(2): 97—103]
- [3] Wang J W, Song T X, Cao W X. Postembryonic development and growth of cultured rare minnow, *Gobiocyrus rarus* [J]. *Acta Hydrobiologia Sinica*, 1998, **22**(2): 128—134[王剑伟, 宋天祥, 曹文宣. 稀有 鲫胚后发育和幼鱼生长的初步研究. 水生生物学报, 1998, **22**(2): 128—134]
- [4] Jia F J, Wei Y. A preliminary study of the karyotype of *Gobiocyrus rarus* [J]. *Acta Hydrobiologia Sinica*, 2001, **25**(4): 425—426[贾方钧, 魏芸. 稀有 鲫的染色体核型初报. 水生生物学报, 2001, **25**(4): 425—426]
- [5] Jia F J, Wang J W, Wu Q J. Gynogenetic rare minnow (*Gobiocyrus rarus*) induced by heterogeneous spems [J]. *Acta Hydrobiologia Sinica*, 2002, **26**(3): 246—251[贾方钧, 王剑伟, 吴清江. 异源精子诱导稀有 鲫的雌核发育. 水生生物学报, 2002, **26**(3): 246—251]
- [6] Kraemer P M. DNA constancy despite variability in chromosome numbers [A]. In: DuPrav E J (ed) *Advances in Cells and Molecular Biology* [M]. New York: Academic Press, 1972, **12**: 47—108
- [7] Tiersch T R, Chandler R W, Wachtel S S et al. Reference standards for flow cytometry and application in comparative studies of nuclear DNA content [J]. *Cytometry*, 1989, **10**(6): 706—710
- [8] Cui J, Ren X, Yu Q. Nuclear DNA content variation in fishes [J]. *Cytologia*, 1991, **56**: 425—429
- [9] Ciudad J, Cid E, Velasco A et al. Flow cytometry measurement of the DNA contents of G0/ G1 diploid cells from three different teleost fish species [J]. *Cytometry*, 2002, **48**(1): 20—25
- [10] Uwa H, and Iwata A. Karyotype and cellular DNA content of *Oryzias latipes* (Oryziatidae, Pisces) [J]. *Chromosome Inf. Serv.*, 1981, **31**: 24—26
- [11] Hinegardner, R. Evolution of cellular DNA content in teleost species, *Am. Nat.*, 1968, **102**: 517—523
- [12] Hinegardner R., and Rosen D E. Cellular DNA content and the evolution of teleostean fishes [J]. *Am. Nat.*, 1972, **106**: 621—644
- [13] Iriki S. Preliminary note on the chromosomes of the pisces, *Aplocheilus latipes* and *Lebistes reticulatus* [J]. *Proc. Imp. Acad. Jpn.*, 1932, **8**: 262—263
- [14] Daga R R, Thode G, Amores A. Chromosome complement, G banding, Ag NOR and replication banding in the zebrafish *Danio rerio* [J]. *Chromosome Res.*, 1996, **4**: 29—32
- [15] Elgar G, sandford R, Aparicio S, et al. Small is beautiful: comparative genomics with the pufferfish (*Fugu rubripes*) [J]. *Trends Genet.*, 1996, **12**: 145—150
- [16] Brenner S, Elgar G, Sandford R, et al. Characterization of the puffer fish (*Fugu*) genome as a compact model vertebrate genome [J]. *Nature*, 1993, **366**: 265—268