

doi: 10.7541/2013.45

用于目标序列染色体定位的镜鲤 BAC-FISH 体系构建

邓海霞^{1,2} 赵紫霞² 徐鹏² 李艳³ 王书² 孙效文²

(1. 大连海洋大学水产与生命学院, 大连 116023; 2. 中国水产科学研究院生物技术研究中心, 北京 100141;
3. 中国科学院国家基因研究中心, 上海 200233)

摘要: 为了构建用于镜鲤(*Cyprinus carpio* var. *specularis*)特定基因组序列染色体定位的实验体系, 在细菌人工染色体(Bacterial Artificial Chromosome, BAC)文库筛选池中对已知短序列基因组片段进行 PCR 扩增, 筛选出包含目标序列的 BAC 克隆, 提取 BAC 质粒进行缺刻平移标记制备探针, 开展荧光原位杂交(Fluorescence *in situ* hybridization, FISH)实验。通过对染色体片前处理、BAC 质粒探针制备、C₀t-1 DNA 封闭基因组重复序列、预杂交、荧光染料选择、信号放大等一系列实验条件和方法的探索优化, 成功实现了目标序列在镜鲤有丝分裂中期染色体上的定位。定位对象既包括在染色体上有单一位点的序列, 如斑马鱼微卫星标记 Z6884 和 Z4268, 也包括在染色体上有多个位点的重复序列, 如黄河鲤性别相关标记 CCmf1。来自斑马鱼同一条染色体上的两个微卫星标记被分别定位于镜鲤不同染色体上, 为鲤鱼染色体数目加倍的进化假设提供了一项直接实验证据, 同时将现有遗传连锁图谱与染色体对应起来, 可作为染色体识别和细胞遗传学图谱构建的依据。黄河鲤性别相关重复序列被定位于不少于四条染色体上, 为性别决定相关基因的筛查提供了研究线索。这一 BAC-FISH 实验体系将成为鲤细胞遗传学图谱构建、基因组进化和比较基因组学研究中的重要研究工具。

关键词: 镜鲤; 细菌人工染色体; 荧光原位杂交; 染色体定位

中图分类号: Q343.1⁺7, S917.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2013)03-0467-06

荧光原位杂交(Fluorescence *in situ* hybridization, FISH)是一种连接分子水平和细胞水平上遗传学研究的技术手段, 将标记后的核酸探针与染色体上的靶序列互补配对进行杂交, 经荧光显微镜显示出目标序列在染色体上的位置。目前 FISH 技术在多个物种, 尤其是人类和植物基因组研究中已经得到了广泛应用, 例如细胞遗传图谱的构建^[1-3], 杂种中亲本染色体的鉴定^[4, 5], 物种进化及亲缘关系的探讨^[6, 7], 转基因材料中外源基因的定位^[8]等。FISH 技术在水生动物中的应用还很有限, 仅有斑马鱼等模式生物开展了较为系统的细胞遗传学研究^[9, 10]。在其他水生生物中以端粒、核糖体 DNA 等重复序列的 FISH 定位研究^[11-14]为主, 但单拷贝基因通常为长度

在几 kb 左右的小片段 DNA, 杂交信号检出率较低, 技术难度较大。

1992 年 Shizuya, *et al.*^[15]以大肠杆菌 F 因子为基础构建细菌人工染色体 (Bacterial artificial chromosome, BAC), 用于构建大片段基因组文库。采用 BAC 克隆作为探针进行染色体原位杂交, 能够有效克服单拷贝杂交信号弱的难题^[16], 已在斑马鱼^[10]、栉孔扇贝^[17]等多个物种中获得了成功应用。2011 年本课题组成功构建镜鲤 BAC 文库^[18], 包含 92160 个克隆, 平均插入片段长度为 141 kb。在该文库基础上, 本研究尝试构建镜鲤(*Cyprinus carpio* var. *specularis*)BAC-FISH 实验体系, 用于特定基因组片段的染色体定位, 在鲤鱼染色体鉴别、细胞遗传学

收稿日期: 2012-05-08; 修订日期: 2013-02-01

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(中国水产科学研究院本级)项目(2010C019, 2012C014); 国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(2011AA100401)资助

作者简介: 邓海霞(1987—), 女, 甘肃天水人; 硕士研究生; 主要从事水产生物细胞遗传学研究。E-mail: dhx_123@yeah.net

通信作者: 孙效文, E-mail: sunxw2002@163.com

图谱构建和鲤科鱼类比较基因组研究中具有广泛的应用前景。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用鱼采自中国水产科学研究院黑龙江水产研究所松浦实验基地, 包括一龄镜鲤 5 尾, 体长 14.7—19.2 cm, 体重 42—106 g。

1.2 有丝分裂中期染色体制备

实验鱼在 25℃ 恒温水族箱内暂养 48h 以上后, 腹腔注射植物血凝素(上海世泽生物科技有限公司), 剂量为 60 $\mu\text{g/g}$ 鱼体重。18h 后腹腔注射秋水仙素(Sigma-Aldrich), 剂量为 6 $\mu\text{g/g}$ 鱼体重。2h 后剪尾鳍放血, 取体肾组织, 空气干燥法制备有丝分裂中期染色体, 保存于-80℃冰箱。

1.3 包含目标序列的 BAC 克隆筛选

使用 PCR 法在本课题组已构建的 BAC 文库筛选池^[20]中筛选包含目标序列的 BAC 克隆, 目标序列包括斑马鱼微卫星标记 Z6884 (GenBank: G41132.1)、Z4268 (GenBank: G41493.1)以及黄河鲤雄性特异性 RAPD 标记 CCmf1 (GenBank: FJ151368.1)。使用 GenBank 序列信息中所提供的引物。

根据筛选池筛选结果, 从原始 BAC 文库中挑取包含目标序列的克隆, 涂布 LB 平板挑取单克隆并 PCR 验证, 避免保存过程中的菌株污染影响 FISH 定位结果。

1.4 BAC 质粒探针制备

目标 BAC 克隆接种于 2×YT 液体培养基, 37℃ 培养过夜。碱裂解法提取质粒, BamH I (NEB)和 EcoR I (NEB)双酶切处理 20min, 乙醇沉淀纯化。使用 Nick Translation Kit (Roche)试剂盒对质粒 DNA 进行生物素或地高辛缺刻平移标记, 标记试剂分别使用 Biotin-11-dUTP (MBI)和 Digoxin-16-dUTP (Roche)。标记后加入 DNA 封闭剂大肠杆菌 tRNA (Roche)和鲑精 DNA (Sigma-Aldrich), 再次进行乙醇沉淀纯化, 溶于去离子甲酰胺(上海生工)。

1.5 C₀t-1DNA 制备

酚氯仿抽提法制备镜鲤基因组 DNA, 配制包含 0.3 mol/L NaCl 的工作液, 0.1 MPa 高压处理 3min 使 DNA 片段大小下降到 100—1000 bp 范围内。DNA 置 94℃变性 10min, 冰上 10S 后转移到 65℃复性, 调整复性时间使 C₀t=1。本例中 DNA 浓度为

210 ng/mL, 故 65℃复性 27min。复性结束后加入 S I 核酸酶(MBI)消化尚未复性的单链 DNA, 用量为 1 U/ μg DNA, 37℃保温 10min, 加入 10 μL 0.5 mol/L EDTA, 70℃ 10min 终止反应, 酚仿醇抽提纯化, 溶于去离子甲酰胺。

1.6 染色体荧光原位杂交

染色体片 65℃老化 6h 以上, 用 0.5 mg/mL RNA 酶 37℃处理 30min, 卡诺氏固定液固定 5min, 置于含 70%甲酰胺的 4×SSC 中 72℃变性 2min, 迅速转入-20℃梯度乙醇脱水。

将 BAC 探针和 C₀t-1DNA 混合, 78℃变性 10min, 迅速置于冰上。配制杂交液, 组分为 5 ng/ μL BAC 质粒探针, 50 ng/ μL C₀t-1DNA, 125 ng/ μL 大肠杆菌 tRNA, 125 ng/ μL 鲑精 DNA, 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 小牛血清白蛋白(上海生工), 10%硫酸葡聚糖(Amresco), 50%去离子甲酰胺和 4×SSC, 37℃预杂交 30min。

每张染色体片滴加 50 μL 杂交液, 37℃杂交 18h, 杂交结束后用含 50%甲酰胺的 2×SSC 溶液 42℃洗涤 20min, 依次移入 2×SSC、1×SSC 和 4×SSC 洗涤。

1.7 荧光染色及信号放大

对于生物素标记的探针杂交片, 依次加入 FITC 标记的亲合素(Sigma-Aldrich)、生物素标记的亲合素抗体(Vector)、FITC 标记的亲合素进行反应; 对于地高辛标记的探针杂交片, 依次加入鼠抗地高辛抗体(Sigma-Aldrich)、TRITC 标记的兔抗鼠抗体(Sigma-Aldrich)、TRITC 标记的羊抗兔抗体(Sigma-Aldrich)进行反应, 使用各产品说明书推荐剂量。每次 37℃避光反应 1h, 反应结束用含有 1% Triton 的 4×SSC 三次洗脱, 洗去未结合试剂。

1.8 杂交信号的荧光观察

每张载玻片滴加 50 μL 含有 5 ng/ μL DAPI (或 PI), 20 mg/mL DABCO, 100 mmol/L Tris(pH8.0), 90 %甘油的荧光染色剂, 室温 3min 后盖片, 指甲油封片, 4℃染色 8h 后使用 Imager.M2 荧光显微镜(Zeiss)观察。

2 结果

2.1 包含目标序列的 BAC 克隆筛选

在 BAC 克隆池中筛选包含斑马鱼微卫星标记 Z6884 的 BAC 克隆, 板池中 P61 位置、行池中 R05 位置和列池中 C07 位置显示扩增阳性, 表示阳性克隆位于第 61 板第 5 行第 7 列, 克隆号为 CYC061E07。

在原始文库中挑取该克隆 PCR 验证, 证实该克隆包含目标序列斑马鱼微卫星标记 Z6884。

用同样方法筛选获得包含斑马鱼微卫星标记 Z4268 的 BAC 克隆 CYC024C12, 含黄河鲤雄性特异性随机扩增片段长度多态性(Randomly Amplified Polymorphic DNA, RAPD)标记 CCmf1 的 BAC 克隆 CYC010F24、CYC031A10、CYC036M11。值得注意的是 CCmf1 在筛选池中出现了不少于 6 个阳性信号, 本研究仅在信号最强的三块板 CYC010、CYC031 和 CYC036 中进行了二次筛选获得 3 个克隆, 其实际克隆数应更多。

2.2 微卫星标记 Z6884 的 FISH 定位

使用地高辛标记镜鲤 BAC 克隆探针 CYC061E07, 经红色荧光染料 TRITC 显色和信号放大, 显微镜照片表明该克隆定位于镜鲤一对近中着丝粒染色体长臂中部(图 1A)。

2.3 微卫星标记 Z4268 的 FISH 定位

使用地高辛标记镜鲤 BAC 克隆探针 CYC024C12, 经红色荧光染料 TRITC 显色和信号放大, 显微镜照片表明该克隆定位于镜鲤一对端着丝粒染色体着丝粒附近(图 1B)。

2.4 RAPD 标记 CCmf1 的 FISH 定位

使用地高辛标记镜鲤 BAC 克隆探针 CYC010F24, 经红色荧光染料 TRITC 显色和信号放大; 使用生物素标记镜鲤 BAC 克隆探针 CYC031A10, 经绿色荧光染料 FITC 显色和信号放大。显微镜照片表明 CCmf1 定位于镜鲤的不少于四对同源染色体上, 且四对同源染色体之间形态和定位位置有明显差异(图 1D、F)。

图 1C 为地高辛标记 CYC010F24, 杂交液中不含 C_0t-1 DNA 的染色结果照片, 染色体上存在大量未被封闭的杂交信号; 图 1E 为生物素标记 CYC031A10, 亲和素-FITC 单次染色, 不经信号放大的显微镜照片, 杂交信号不可见。

3 讨论

3.1 BAC-FISH 实验条件优化

在本研究中 BAC-FISH 实验体系以冷泉港实验操作手册^[19]中提供的方法为基础, 针对具体实验对象和研究目的, 结合其他文献方法, 对实验条件做了以下探索和优化调整。

染色体片的前处理 按照原有方法, 染色体

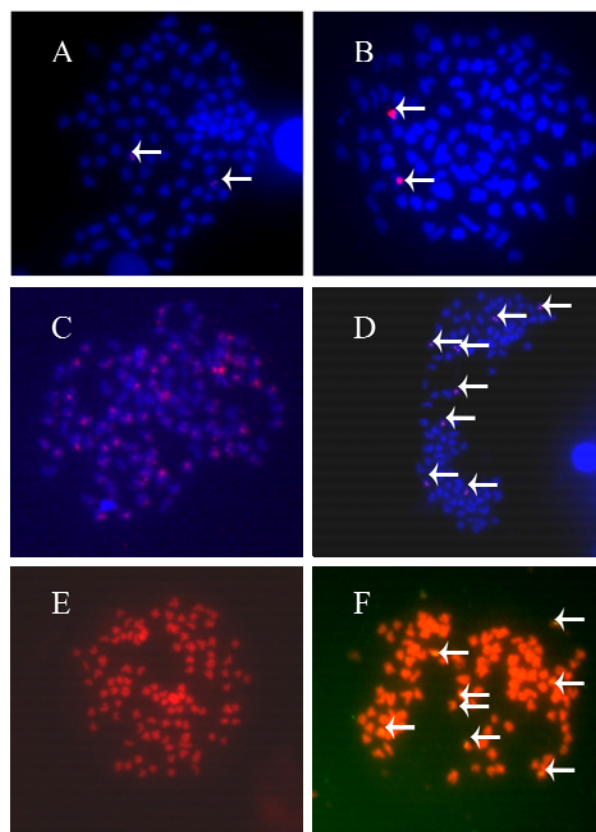


图 1 镜鲤 BAC 克隆 CYC061E07、CYC024C12(B)、CYC010F24 (C、D)和 CYC031A10 (E、F)的 FISH 定位

Fig. 1 FISH localization of mirror carp BAC clone CYC061E07 (A, containing zebrafish microsatellite marker Z6884), CYC024C12 (B, containing zebrafish microsatellite marker Z4268), CYC010F24 (C, D, containing Yellow River carp male-specific RAPD marker CCmf1) and CYC031A10 (E, F, containing Yellow River carp male-specific RAPD marker CCmf1)

片固定后直接变性杂交, 视野中染色体之外的区域也出现了大量的染色信号, 可能由于制片材料头肾细胞中 RNA 含量丰富, 对结果造成了干扰。参考文献[1]中的方法使用 RNaseA 和蛋白酶预处理, 结果视野中染色体数量明显减少, 染色体在盖玻片边缘聚集, 可能是因为蛋白酶破坏了染色体在玻片上的附着。最终确定仅用 0.5 mg/mL RNAase A 处理, 能够明显降低染色体区域外的杂信号干扰。在杂交染色和信号放大等一系列反应和洗脱处理之后, 染色体形态往往变得模糊, 在染色体片前处理阶段增加 65℃老化处理步骤, 能够有效维持染色体形态。

BAC 质粒探针制备 碱裂解法提取 BAC 质粒后直接进行缺刻平移标记制备探针, 杂交后信号检出率较低; 本研究在标记探针前对 BAC 质粒进行双酶切处理, 信号检出率有明显提高。可能是因为双酶切处理后质粒 DNA 被片段化, 尤其是原来处于

闭环超螺旋状态的质粒被切断,同时探针长度变短,使标记效率和杂交效率都有所提高,从而提高了信号检出率。

C₀t-1 DNA 封闭基因组重复序列 C₀t-1 DNA 是富集了本物种重复序列的 DNA 混合制品。将基因组 DNA 物理打断至 100—1000 bp 的范围内,94℃变性后控制复性时间使 C₀t=1,此时大部分重复序列复性为双链,非重复序列仍维持单链状态,使用 S I 核酸酶消化单链 DNA,则 C₀t-1 DNA 主要成分为基因组中的重复序列^[20]。在杂交液中加入 10 倍于 BAC 质粒探针含量的 C₀t-1 DNA,能够封闭探针中可能存在的重复序列,并与基因组 DNA 进行竞争性杂交,使探针仅与染色体上实际对应位点发生杂交反应。使用 BAC 探针进行 FISH 定位的部分文献中无需使用 C₀t-1 DNA 封闭即可实现成功定位^[21, 22],也有文献指出不使用 C₀t-1 DNA 封闭会导致整个基因组均匀着色,从而使杂交信号无法识别^[17]。而在镜鲤 BAC 探针 CYC010F24 的定位过程中我们则发现,不使用 C₀t-1 DNA 封闭时,染色体上会出现与杂交信号形态相似的着色点(图 1C)。如果杂交效率较低,着色点数量不多,或预期目标序列为重复序列时,这些着色点非常容易与真正的杂交信号混淆,形成误导性的假阳性结果,因此 C₀t-1 DNA 封闭对镜鲤 BAC-FISH 实验体系是不可或缺的步骤。

预杂交 本研究在变性的探针与染色体杂交之前,增加了探针 37℃预杂交 30min 的步骤,目的是使探针中的重复序列先行复性为双链,避免与基因组 DNA 杂交。预杂交操作需要与 C₀t-1 DNA 封闭配合进行,当杂交液中不存在大量 C₀t-1 DNA,仅有探针、鲑精 DNA 和 tRNA 时,预杂交操作并不能获得明显效果。

荧光染料的选择 本研究使用了两种杂交信号荧光染料,分别为呈绿色荧光的 FITC 和呈红色荧光的 TRITC;使用了两种染色体荧光染料,分别为呈蓝色荧光的 DAPI 和呈红色荧光的 PI,这些荧光染料各具优缺点。在显微镜下 FITC 的信号较强,无论在 DAPI 的蓝色背景下,还是在 PI 的红色背景下都容易辨认,但缺点是拍摄的照片双色叠加后不易辨识,FITC 的绿色与 DAPI 的蓝色本身对比不强烈,当杂交信号较弱时容易被照片上蓝色的染色体所掩盖,而 FITC 的绿色与 PI 的红色叠加呈黄色,在红色的染色体照片上更不易分辨(图 1F)。红色的 TRITC

与蓝色的 DAPI 对比鲜明,二者叠加后呈桃红色,在蓝色染色体照片上也容易辨识,缺点是信号较弱,猝灭也很快,在显微镜下查找杂交信号较难。在后续研究中需要寻找更适合杂交信号染色和放大的红色荧光染料。DAPI 与 PI 的染色效果没有明显优劣差别,DAPI 的实用性更高,因为它能够与红色和绿色的荧光染料共用,从而实现两种不同探针的双色 FISH 共定位,使用 PI 对染色体着色后则无法再使用红色荧光染料对杂交信号进行染色。

信号放大 不少 FISH 实验中用荧光染料直接标记探针,或用荧光染料对标记探针进行单次染色,无需信号放大^[3, 23, 24]。本研究在信号较强的 FITC 染色系统中尝试单次染色,但未观察到荧光信号(图 1E)。这表明在现有镜鲤 BAC-FISH 实验体系中,加入抗体进行信号放大仍然是必要的步骤。

通过条件优化调整,本研究构建的 BAC-FISH 实验体系能够成功实现已知基因组片段在镜鲤染色体上的准确定位。定位对象既包括在染色体上有单一定位位点的序列,如微卫星标记 Z6884 和 Z4268,也包括在染色体上有多个定位位点的序列,如 RAPD 标记 CCmf1。

3.2 斑马鱼微卫星标记在镜鲤染色体上的定位

大多数鲤科鱼类的染色体数目为 50 条(以斑马鱼为典型代表)或 48 条(以草鱼为典型代表)^[25],而鲤鱼、鲫鱼等部分物种染色体数目达到 100 条,即具有 50 对同源染色体。因此不少研究者推测,鲤科鱼类原始类群在进化过程中经历了一次染色体数目整体加倍事件,在此基础上进一步演化形成了鲤鱼等现代物种^[26]。

在这一假设之下,每条斑马鱼染色体应当与两条鲤鱼染色体相对应。我们选取了位于斑马鱼 17 号染色体上的两个微卫星标记 Z6884 和 Z4268,在镜鲤染色体上开展了 BAC-FISH 定位,结果显示二者各自定位于一对同源染色体上,两对同源染色体之间有明显形态差异。在已发表的鲤鱼遗传连锁图谱上^[27],这两个微卫星标记也位于不同的连锁群(Linkage Group, LG),Z6884 位于 LG3,而 Z4268 则位于 LG20。

两个斑马鱼微卫星标记在镜鲤染色体上的 BAC-FISH 定位结果为鲤鱼染色体数目加倍的进化假设提供了一项直接实验证据,同时也将现有的遗传连锁图谱与具体的染色体对应起来,可作为染色

体识别和细胞遗传学图谱构建的依据。

3.3 黄河鲤性别相关标记在镜鲤染色体上的定位

常重杰课题组 2009 年报道了一个黄河鲤雄性特异性 RAPD 标记 CCmf1, 并推测其为与性染色体进化早期阶段相关的重复序列^[28, 29]。本研究在 BAC 文库筛选过程中发现多个包含该片段的克隆, 进一步证实了该序列在基因组中拷贝数较多, 属于重复序列。通过 CYC010F24 和 CYC031A10 两个克隆的 BAC-FISH 定位, CCmf1 标记被定位于不少于四对同源染色体上, 这些染色体的鉴别可能为性别决定基因筛查指引方向, 同时也可能为性染色体进化研究提供重要线索。

参考文献:

- [1] Speicher M R, Ballard S G, Ward D C. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH [J]. *Nature Genetics*, 1996, **12**(4): 368—375
- [2] Koo D H, Jo S H, Bang J W, et al. Integration of cytogenetic and genetic linkage maps unveils the physical architecture of tomato chromosome 2 [J]. *Genetics*, 2008, **179**(3): 1211—1220
- [3] Luo M C, Ma Y, You F M, et al. Feasibility of physical map construction from fingerprinted bacterial artificial chromosome libraries of polyploid plant species [J]. *BMC Genomics*, 2010, **11**: 122
- [4] Schwarzacher T, Leitch A R, Bennett M D, et al. In situ localization of parental genomes in a wide hybrid [J]. *Annals of Botany*, 1989, **64**(3): 315—324
- [5] Leitch A R, Mosgöller W, Schwarzacher T, et al. Genomic in situ hybridization to sectioned nuclei shows chromosome domains in grass hybrids [J]. *Journal of Cell Science*, 1990, **95**(3): 335—341
- [6] Han Y H, Zhang Z H, Liu J H, et al. Distribution of the tandem repeat sequences and karyotyping in cucumber (*Cucumis sativus* L.) by fluorescence in situ hybridization [J]. *Cytogenetic and Genome Research*, 2008, **122**(1): 80—88
- [7] Giannuzzi G, D'Addabbo P, Gasparro M, et al. Analysis of high-identity segmental duplications in the grapevine genome [J]. *BMC Genomics*, 2011, **12**: 436
- [8] Salvo-Garrido H, S Travella, L J Bilham, et al. The distribution of transgene insertion sites in barley determined by physical and genetic mapping [J]. *Genetics*, 2004, **167**(3): 1371—1379
- [9] Phillips R B, Amores A, Morasch M R, et al. Assignment of zebrafish genetic linkage groups to chromosomes [J]. *Cytogenetic and Genome Research*, 2006, **114**(2): 155—162
- [10] Freeman J L, Adeniyi A, Banerjee R, et al. Definition of the zebrafish genome using flow cytometry and cytogenetic mapping [J]. *BMC Genomics*, 2007, **8**: 195
- [11] Alcivar-Warren A, Meehan-Meola D, Wang Y, et al. Isolation and mapping of telomeric pentanucleotide (TAACC)_n repeats of the Pacific Whiteleg Shrimp, *Penaeus vannamei*, using fluorescence in situ hybridization [J]. *Marine Biotechnology*, 2006, **8**(5): 467—480
- [12] Singh M, Kumar R, Nagpure N S, et al. Chromosomal localization of 18S and 5S rDNA using FISH in the genus *Tor* (Pisces, Cyprinidae) [J]. *Genetica*, 2009, **137**(3): 245—252
- [13] Huan P, Zhang X, Li F, et al. Chromosomal localization and molecular marker development of the lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein gene in the Zhikong scallop *Chlamys farreri* (Jones et Preston) (Pectinoida, Pectinidae) [J]. *Genetics and Molecular Biology*, 2010, **33**(1): 36—43
- [14] Lü Z M, Yang A G, Wang Q Y, et al. Preliminary study on fish identification of chromosomes in hybrids from cross between *Patinopecten yessoensis* and *Chlamys farreri* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(4): 709—715 [吕振明, 杨爱国, 王清印, 等. FISH 技术在栉孔扇贝和虾夷扇贝杂交子代染色体识别中的运用初探. 水生生物学报, 2010, **34**(4): 709—715]
- [15] Shizuya H, Birren B, Kim U J, et al. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, **89**(18): 8794—8797
- [16] Zhang X J, Huan P. Fluorescence in situ hybridization mapping [A]. In: Sun X W, Xu P (Eds.), *Technologies and Research Progresses in Aquatic Genomics* [C]. Beijing: Ocean Press. 2011, 62—86 [张晓军, 郇聘. 荧光原位杂交作图. 见: 孙效文, 徐鹏. 水产基因组技术与研究进展. 北京: 海洋出版社. 2011, 62—86]
- [17] Huan P. Application of Fluorescence in situ hybridization (FISH) in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* and Zhikong scallop, *Chlamys farreri*: Gene mapping and map integration [D]. Thesis for PhD of Science. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao. 2009 [郇聘. 利用荧光原位杂交技术(FISH)对中国明对虾和栉孔扇贝若干重要基因定位的研究. 博士学位论文, 中国科学院海洋研究所, 青岛. 2009]
- [18] Li Y, Xu P, Zhao Z, et al. Construction and characterization of the bac library for common carp *Cyprinus carpio* L. and establishment of microsynteny with zebrafish *Danio rerio* [J]. *Marine Biotechnology*, 2011, **13**(4): 706—712
- [19] Spector D L, Goldman R D, Leinwand L A. A Laboratory Manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1998, 111.26—111.36
- [20] Zwick M S, Hanson R E, Islam-Faridi M N, et al. A rapid procedure for the isolation of C₀t-1 DNA from plants [J]. *Genome*, 1997, **40**(1): 138—142
- [21] Shoguchi E, Kawashima T, Satou Y, et al. Chromosomal mapping of 170 BAC clones in the ascidian *Ciona intestinalis*

- nalis [J]. *Genome Research*, 2006, **16**(2): 297—303
- [22] Wang K, Zhang Y J, Guan B, *et al.* Fluorescence in situ hybridization of bacterial artificial chromosome in cotton [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2007, **34**(11): 1216—1222 [王凯, 张燕洁, 关兵, 等. 棉花细菌人工染色体的荧光原位杂交(BAC-FISH)技术. *生物化学与生物物理进展*, 2007, **34**(11): 1216—1222]
- [23] Huang X T. Cytogenetic characterization of scallop chromosomes [D]. Thesis for PhD of Science. Ocean University of China, Qingdao. 2009 [黄晓婷. 扇贝染色体的细胞遗传学研究. 博士学位论文, 中国海洋大学, 青岛. 2009]
- [24] Huan P, Zhang X, Li F, *et al.* Chromosomal localization of 5S rDNA in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*): a chromosome-specific marker for chromosome identification [J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2010, **28**(2): 233—238
- [25] Yu X J, Zhou T, Li Y C, *et al.* Chromosomes of Chinese Fresh-water Fishes [M]. Beijing: Science Press. 1989, 13 [余先觉, 周瞰, 李渝成, 等. 中国淡水鱼类染色体. 北京: 科学出版社. 1989, 13]
- [26] David L, Shula B, Marcus W F, *et al.* Recent duplication of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) Genome as revealed by analyses of microsatellite loci [J]. *Molecular Biology Evolution*, 2003, **20**(9): 1425—1434
- [27] Sun X, Liang L. A genetic linkage map of common carp (*Cyprinus carpio* L.) and mapping of a locus associated with cold tolerance [J]. *Aquaculture*, 2004, **238**(1—4): 165—172
- [28] Chen J, Wang Y, Yue Y, *et al.* A novel male-specific DNA sequence in the common carp, *Cyprinus carpio* [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2009, **23**(5): 235—239
- [29] Charlesworth D, Charlesworth B, Marais G. Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes [J]. *Heredity*, 2005, **95**(2): 118—128

CONSTRUCTION OF A BAC-FISH EXPERIMENTAL SYSTEM FOR LOCALIZING SPECIFIC SEQUENCES ON MIRROR CARP CHROMOSOMES

DENG Hai-Xia^{1, 2}, ZHAO Zi-Xia², XU Peng², LI Yan³, WANG Shu² and SUN Xiao-Wen²

(1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

2. The Center for Applied Aquatic Genomics, Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China;

3. National Center for Gene Research, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233, China)

Abstract: An experimental system has been constructed for localizing specific genomic sequences on mirror carp (*Cyprinus carpio* var. *specularis*) chromosomes. In order to obtain individual BAC clones containing the target sequences, short genomic sequences were amplified by PCR in bacterial artificial chromosome (BAC) screening pools. BAC plasmid DNA was isolated and labeled by nick translation to prepare fluorescence *in situ* hybridization (FISH) probes. Via optimizing a series of protocols for chromosome slides pre-treatment, BAC plasmid probe preparation, repetitive sequences blocking by C₀t-1 DNA, pre-hybridization, candidate fluorescence dyes evaluation, signal amplification and so on, the BAC-FISH system has been successfully established for mirror carp metaphase chromosomes, which is able to localize both single-copy markers and repetitive sequences. As supporting evidence to the genome duplication hypothesis of carp evolution, two microsatellite markers from zebrafish chromosome 17, namely Z6884 and Z4268, have been localized on two separate mirror carp chromosomes, with one marker on each chromosome. A male-specific marker CCMf1 from Yellow River carp has been localized on at least four chromosomes of mirror carp, suggesting that it might be a repetitive sequence useful for sex determining gene searching. The established mirror carp BAC-FISH experimental system would serve as a powerful tool for carp cytogenetic mapping, genome evolution and comparative genomics research.

Key words: Mirror carp; Bacterial artificial chromosome; Fluorescence in situ hybridization; Chromosome localization