

末端标记限制性片段的基因组 DNA 指纹法

宋 平 胡珈瑞¹⁾ 熊全洙

(武汉大学生命科学学院, 武汉 430072)

1) (湖北医科大学附属二医院, 武汉 430071)

摘要 报道了分析基因组 DNA 多态性的方法: 末端标记限制性片段的基因组 DNA 指纹法 (RFEL-DNA Fingerprinting)。通过此方法对莫桑比克非鲫核 DNA 进行了初步的分析。结果表明, 此方法是一种简单、灵敏、稳定、可变换谱带复杂程度和有着广泛应用前景的一种鉴定生物基因型的方法。

关键词 DNA 指纹, DNA 末端标记 RFEL-DNA 指纹, 莫桑比克非鲫

一种用 DNA 测序凝胶分离末端标记的核 DNA 的 RFLPs 分析方法。选用合适的限制性内切酶, 此方法能产生稳定的、灵敏的、分离很好的和可用于遗传 DNA 指纹分析的 DNA 谱带。如选用不同的限制切酶或双酶切, 产生可变的、较复杂的 DNA 谱带。采用此方法对莫桑比克非鲫进行了初步的试验。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 莫桑比克非鲫 (*Oreochromis mossambicus*) 购自市场。DNA 末端标记酶盒为 Promega 公司产品。

1.2 DNA 提取 用肝素浸润过的注射器从活鱼鳃动脉抽取 6ml 血液, 加入等体积的 0.03mol / L Tris-HCl (pH8.0) / 0.05mol / L EDTA / 0.05mol / L NaCl 溶液混匀后移入 -70℃ 放置 1h。然后取出立即放入 65℃ 温浴 10min。保温后离心 20min (10,000r / min / 4℃), 去上清后加入 5ml 0.075mol / L NaCl / 0.002mol / L EDTA 溶液进行匀浆。匀浆液加入 RNase A (最终浓度 200μg / ml) 和 SDS (最终浓度为 1%) 于 37℃ 温浴 30min。然后加入蛋白酶 k (最终浓度 0.1mg / ml) 继续在 37℃ 保温 4h。保温后依次进行等体积的饱和酚 pH8.0 抽提 10min 10,000r / min / 4℃ 离心 20min。离心完毕再依次将上层液相用等体积的饱和酚 (pH8.0): 氯仿 (1:1) 抽提 10min 10,000r / min / 4℃ 离心 20min。最后用等体积氯仿抽提 10min 并进行 20min 离心。上层水相加入 2 倍体积的异丙醇置于 0℃ 静置 10min。然后将白色 DNA 沉淀吸进 1.5ml 微型离心管, 先用 70% 酒精洗两次, 最后用无水酒精洗一次。倒尽酒精后置于真空下干燥。干燥后的 DNA 溶于适量的 TE (0.01mol /

LTTris-HCl / 0.001mol / L EDTA / pH8.0) 中。

1.3 限制性内切酶酶解 在三种酶切反应中(BstN I, EcoR I, Hinf I)每 25 μ l 反应体积含有 7 μ g DNA、一种 21 单位限制性内切酶,在生产厂家推荐的条件下完全酶解 10h。酶解完后用 0.9% 的水平琼脂糖凝胶(10 \times 7cm)、TAE 缓冲液(0.004mol / L Tris-HCl / pH8.0 / 0.004mol / L 乙酸 / 0.004mol / L EDTA)60V 电泳 3-4h,然后经 15min 溴化乙锭染色,在紫外光下检查 DNA 消化情况。

1.4 末端标记 在 25 μ l 反应体积内含有适量的粘性末端 DNA 片段(分为不同的组,其 DNA 含量依次为:2 μ g,1 μ g 和 0.5 μ g),加入 1 μ l [α -³²P]dATP(10 μ Ci)1 μ l dTTP(0.01mol / L)以及 5 单位大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 片段,置于 37 $^{\circ}$ C 水浴内保温 2h。反应完毕后加入 2 μ l 0.05mol / L EDTA 终止反应,然后加入 2 μ l 3mol / L NaAc (pH5.8)和 200 μ l 无水酒精沉淀标记的 DNA 片段;经 10min 离心(4,000r / min)后用 70% 的酒精洗三次(去掉游离的 [α -³²P] dATP 及无机离子)。干燥后的样品溶于适量的 TE 内。

1.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳 上样前标记的样品经 85 $^{\circ}$ C 变性 10min。采用 8mol / L 尿素的 6% 垂直板(14 \times 16cm)聚丙烯酰胺 DNA 测序凝胶(0.089mol / L Tris-硼酸 / pH8.0 / 0.002mol / L EDTA)在 160V 下电泳 6h。电泳完毕,将凝胶转移到 3 号 Whatman 滤纸上加盖 Saran 包装膜在 80 $^{\circ}$ C 真空下干燥。干燥后的凝胶进行放射自显影。

2 结果与讨论

核 DNA 经三种不同的内切酶完全酶解后产生不同范围平均分子量的 DNA 片段:

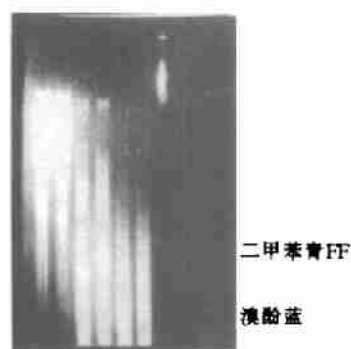


图1 核 DNA 经 Ecor I(1,2), BstN I(3,4),...Hinf I(5,6)酶解后 0.9% 琼脂糖凝胶电泳。

Fig.1 Genomic DNA of *Oreochromis mossambicus* was digested completely with Ecor I(1,2), BstN I(3,4), Hinf I(5,6) and the restriction fragments were electrophoresed in a horizontal 0.9% agarose gel in TAE buffer.

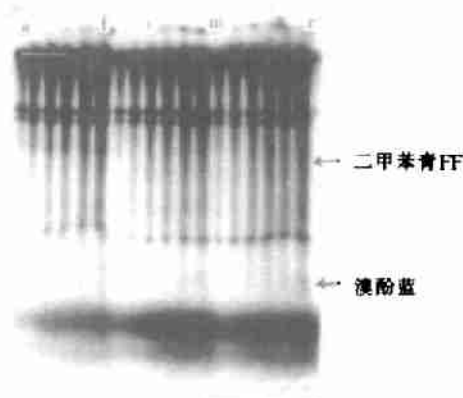


图2 核 DNA 依次经 EcoR I 酶解, [α -³²P]dATP 末端标记, 6% 聚丙烯酰胺测序凝胶电泳和放射自显影图。

图 上三条 DNA 带为卫星 DNA; ※: 二甲苯青 FF 的迁移率相当于约 130bp DNA 的迁移率; 溴酚蓝的迁移率相当于约 26bp DNA 的迁移率

Fig.2 6% polyacrylamide gel(sequencing gel) electrophoresis of restriction endonuclease fragments (EcoR I) of genomic DNA end-labeled with [α -³²P] dATP.

上样量 (μ g): 1-0.16(a), 0.32(b), 0.48(c), 0.64(d), 0.80(e), 0.96(f)
2-0.08(g), 0.16(h), 0.24(i), 0.32(j), 0.40(k), 0.48(l)
3-0.04(m), 0.08(n), 0.12(o), 0.16(p), 0.20(q), 0.24(r).

EcoR I 酶解后所产生的 DNA 片段平均分子量最大,而 Hinf I 最小(图 1)。这样可以根据实际情况选用不同的内切酶对 DNA 进行消化而产生不同大小范围的 DNA 片段。

对 3 组不同浓度的 DNA ($2\mu\text{g}$, $1\mu\text{g}$ 和 $0.5\mu\text{g}$) 进行末端标记,其放射自显影结果基本上没有差别(图 2)。因此,在上述相同的条件下 DNA 标记量至少可以在 $2\text{--}0.5\mu\text{g}$ 之间变化而对标记效果无影响。在 3 组里 DNA 上样量最少的仅为 $0.04\mu\text{g}$,而卫星 DNA 带却仍然很清楚,这表明本方法的灵敏度非常高。根据作者的经验,只要适当延长自显影时间,上样量减至 $0.03\mu\text{g}$ 左右仍可产生同样的效果。低分子量卫星 DNA 带在 1 组处有点弯曲,这是由于制胶时胶浓度梯度部分不够均匀引起的。存在 DNA 拖尾现象,这可能是由于一系列分子量呈梯度变化的非卫星 DNA 片段未能分离所造成的。如果采用测序电泳条件(胶板 $20 \times 40\text{cm}$ 、 1700V 和 50°C 恒温),这些片段可望分离并可展现出更复杂的谱带(类似于 DNA 测序中所展现出的大小不同的 DNA 片段谱带)。不过在现有条件下并不影响对卫星 DNA 带的分析。

本方法的优点之一是,一次标记、多次酶解来变换复杂程度不同的谱带,这样可对核 DNA 进行更大范围的扫描式分析。按照此方法,先可采用酶切位点稀少的(如 Xho I)或较少的(如 EcoR I)限制性酶对核 DNA 进行完全酶解和末端标记,然后取部分标记样品进行电泳分析。再对上述部分标记过的样品进行不同单酶(酶切位点较多的)酶解和电泳分析,这样可以检测出更多的不同大小分子量的卫星 DNA 片段。如改用 $20 \times 40\text{cm}$ 胶板、 1700V 电压和在 50°C 恒温下进行电泳可展现出更复杂的 DNA 谱带。

本方法的另一个优点是,根据仅经第一次酶解、标记后而展现出的 DNA 带的强弱可估算其卫星 DNA 片段的相对分子数量,因为 DNA 片段的末端标记机会是均等的,这样其所带的放射性强度与其 DNA 片段的浓度成正比关系;然而, DNA 杂交(DNA 印迹法)所产生的谱带强度与结合上的 DNA 探针多少和重复序列的结构有关,而与待测片段分子数无此比例关系。可以预测如果能分辨出外卫星 DNA 片段的谱带,那么所有外卫星 DNA 谱带的强度将是相同的,同样是因为每个 DNA 片段是以等体积浓度进行末端标记的。但是,放射性标记后的片段经第二种限制性内切酶酶解、电泳后所产生的谱带,其 DNA 带的强弱与 DNA 片段分子数间的关系就变复杂了;但可以肯定,除卫星 DNA 谱带外,其他谱带间的强弱程度差别不太大。因此,只要选用适当的分子量标准,可以很方便地和准确地在不同实验或实验室内、甚至在不同凝胶浓度条件下都可以进行结果比较,从而克服了 PCR 方法不够稳定的弱点。由于有了上述这些优点,根据其酶切位点数和 RFLPs,利用计算机可以很方便地进行亲缘关系的相似系数等分析。

采用此方法对莫桑比克非鲫的 RFLPs 进行了初步检测,得出的结果却清楚地表明了此方法具有广泛的应用前景。初步检测了一些种类鱼类,本法不仅可以评估种群间的差异,并且可以分析个体间的变异。若采用适当的限制性内切酶,本法可应用到所有真核生物的品种鉴定、种群遗传及进化等方面的研究中去。

总之,末端标记的核 DNA 指纹法对于生物基因型鉴定是一种简单、灵敏、稳定、可变换谱带复杂程度和有着广泛应用前景的一种检测核 DNA 的方法。

参 考 文 献

- [1] 宋 平等. 鲢、鳙线粒体 DNA 的九种限制性内切酶图谱的比较. 水产学报, 1994, **18**(3): 221—230
- [2] 宋 平等. 团头鲂线粒体 DNA 的限制性内切酶图谱. 水生生物学报, 1996, **20**(2): 119—126
- [3] Masuda R, et al. Mitochondrial DNA differentiation between two sympatric morphs of striped jack near Japan, *Journal of Fish Biology*, 1995, **46**: 1003—1010
- [4] Seutin G, et al. Historical biogeography of the bananaquit in the caribbean region: a mitochondrial DNA assessment. *Evolution*, 1994, **48**: 1041—1061

GENOMIC DNA FINGERPRINTING BY RESTRICTION
FRAGMENT END LABELING

Song Ping, Hu Jiarui and Xiong Quanwei

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract A typical method, genomic fingerprinting by restriction fragment end labeling (RFEL-DNA Fingerprinting) for fish was developed and applied to *Oreochromis mossambicus*. Total genomic DNA was digested with a restriction endonuclease. The fragments were end labeled with [α -³²P] dATP by using the klenow fragment of DNA polymerase and separated by electrophoresis in 6% polyacrylamide / 8M urea (sequencing gel). Depending on the different restriction endonuclease, this method produced well-separated fragments (satellite DNA). The method described is a simple, sensitive, steady and powerful technique for genotyping fish species.

Key words DNA fingerprinting, DNA end labeling, RFEL-DNA fingerprinting, *Oreochromis mossambicus*.