

栉孔扇贝 NDPK 基因的 BAC-FISH 定位研究

黄超^{1,2}, 郇聘¹, 张晓军¹, 相建海¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100049)

摘要: 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)是我国北部沿海一个非常重要的养殖种类。核苷二磷酸激酶(NDPK)是一类广泛存在、高度保守,在细胞能量和信息传递中具有重要作用的酶。作者利用 BAC-FISH 技术将两个包含栉孔扇贝 NDPK 基因的 BAC 克隆定位到染色体同一位置上,该结果验证了物理图谱相关 contig 组装的可靠性,同时 NDPK 基因的染色体定位将对深入研究该基因的结构、功能以及应用于生产实践提供理论支撑。本研究结果将对栉孔扇贝染色体的深入研究以及染色体鉴别、图谱整合等工作提供重要参考。

关键词: 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*); 核苷二磷酸激酶; 荧光原位杂交; BAC; 染色体鉴别

中图分类号: Q23

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2012)01-0001-05

栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)是中国最重要的海水养殖品种之一。近年来,病害问题成为栉孔扇贝养殖业发展的制约因素。人们逐渐认识到加强遗传学基础、免疫机制等研究是解决栉孔扇贝病害问题的关键。在此基础上,许多栉孔扇贝的功能基因得到了克隆并开展了一系列深入研究^[1-9]。

核苷二磷酸激酶(NDPK)基因在进化中高度保守,却又呈现复杂多样的生物学功能。NDPK 基因编码的核苷二磷酸激酶是一类广泛存在的酶,它通过一种乒乓机制将结合在蛋白质上的二磷酸核苷(5'NDP)磷酸化为三磷酸核苷(5'NTP),调节细胞内的能量池大小,进而活化蛋白质。该酶除了催化 ATP 和 NDP 之间高能磷酸基团的转移外,还具有 NDP 激酶活性和蛋白磷酸转移酶活性,并参与包括免疫反应在内的转录调控和信号转导^[10]。

荧光原位杂交技术(Fluorescence *in situ* hybridization, FISH)是利用核酸探针直接在染色体上定位特定靶 DNA 序列的技术,它可将基因组的 DNA 序列和染色体直接关联起来,在宏观的细胞学和微观的分子生物学之间架起一座桥梁^[11]。在栉孔扇贝中,通过 FISH 技术已经成功定位了一些多拷贝基因,包括 18S 核糖体 RNA 基因、组蛋白基因等^[12-13]。然而对于包括 NDPK 基因在内的大多数低拷贝功能基因,常规的 FISH 技术难以实现定位。其原因在于,用常规的 FISH 方法这些低拷贝序列难以产生足够强的信号^[14]。对于这些低拷贝序列,一些大片段克隆如

fosmid、BAC 等,可以提供足够长的探针来产生可检测的信号^[15]。2008 年, Zhang 等^[16]构建了栉孔扇贝细菌人工染色体(BAC, Bacterial Artificial Chromosome)基因组文库,使得以 BAC 质粒为探针的 FISH 技术(BAC-FISH)的应用成为可能,为低拷贝功能基因的染色体定位提供了可靠的探针来源。在对 BAC 文库的筛选中,获得了两个包含栉孔扇贝 NDPK 基因的阳性克隆^[16]。最近,作者构建了基于 BAC 指纹的栉孔扇贝物理图谱,从该图谱上看,这两个包含 NDPK 基因的 BAC 克隆位于同一个 contig(重叠群)上的,可以推测这两个克隆在染色体上是临近或重叠的,因此可以通过 FISH 技术在实现 NDPK 基因染色体定位的同时,验证该物理图谱 contig 组装结果的可靠性。

本研究以包含栉孔扇贝 NDPK 基因的两个 BAC 克隆为探针,利用 BAC-FISH 技术将 NDPK 基因定位到栉孔扇贝细胞核和有丝分裂中期分裂相上,初步验证物理图谱的组装,为栉孔扇贝 NDPK 基因的后续深入研究提供了基础,同时可以为栉孔扇贝染色体的鉴别工作提供了一种特异性探针。

收稿日期: 2011-03-12; 修回日期: 2011-06-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(30730071, 30972245); 农业部农业科技成果转化资金项目(2010GB24910700)

作者简介: 黄超(1986-), 男, 山东枣庄人, 硕士研究生, 主要从事海洋生物基因组学及细胞遗传学研究, 电话: 0532-82898570, E-mail: zosdubc@126.com; 张晓军, 通信作者, 副研究员, 电话: 0532-82898786, E-mail: xjzhang@qdio.ac.cn

1 材料与amp;方法

1.1 BAC 克隆的来源和验证

在前期本实验室对栉孔扇贝 BAC 文库的筛选过程中, 获得了两个包含 NDPK 基因的阳性克隆 CBE068E24 和 CBE099F20^[16]。进一步根据其 cDNA 序列设计引物组合 NDPKF (5'-GTAAAGATGTCCG-ACCCTTT-3')和 NDPKR (5'-TTAATCTTATGCCAG-ATTTTCT-3')以 BAC 克隆 CBE068E24 和 CBE099F20 为模板进行 PCR 反应验证。PCR 扩增产物转化入宿主菌, 测序分析。

1.2 栉孔扇贝染色体制备

成体栉孔扇贝购自青岛市小港市场。在繁殖期, 选取性腺发育饱满的个体, 阴干刺激后分别排出精子和卵子, 控制精卵的比例进行受精。第 2 天取孵化出的担轮幼虫, 在 0.01% 的秋水仙素溶液中孵育 2.5 h, 转移到 0.075 mol/L 的 KCl 溶液中低渗 15 min, 低渗后使用新鲜配制的 Canoy 氏固定液(甲醇:乙醇为 3:1)固定 2 次, 每次 15 min, 然后转入甲醇:乙醇为 1:1 的储存液中, -20℃ 保存备用。

取固定好的单轮幼虫样品中加入 50%乙酸解离组织, 从约 50 cm 高的地方将细胞悬液滴至预热 50 的载玻片上, 空气干燥。

1.3 探针合成及杂交缓冲液制备

BAC 质粒的提取使用 Machery-Nagel 公司的 NucleoBond AX 100 kit 完成。取 1 μg 质粒, 利用缺口平移法制备地高辛或生物素标记的探针 (Digoxigenin Nick Translation Mix, Biotin Nick Translation Mix, Roche), 在试剂盒提供的预混合溶液中(包含反应缓冲液、dNTP、地高辛或生物素标记的 dUTP、DNase I)加入 1 μg BAC 质粒, 37℃ 保温 90 min 使地高辛或生物素标记的 dUTP 掺入产物分子中, 反应结束后加入 1 μL EDTA 65℃ 保温 10 min 以停止反应, 合成好的探针用琼脂糖凝胶电泳的方法检测片段大小及分布。

在 BAC 探针杂交的过程中, 使用 *Cot-1* DNA 封闭探针中可能存在的重复序列。*Cot-1* DNA 的制备按照 Zwick 描述的方法完成^[17]。

制备好的探针与 10 倍的 *Cot-1* DNA 及 50 倍的鲑精 DNA 共沉淀, 溶于杂交缓冲液(50%去离子甲酰胺, 2×SSC, 10%硫酸葡聚糖, 50 mmol/L 的磷酸缓冲液, pH7.0)中, 使探针终质量浓度为 16.67 μg/L, 即

得到可用于 BAC-FISH 的杂交缓冲液。

1.4 荧光原位杂交

染色体片先用 0.16% pepsin 预处理 37℃ 30 min, 去除多余的蛋白成分, 之后转入 2×SSC 中漂洗 2 min。将染色体片置于 70%去离子甲酰胺中, 68℃ 2 min 使 DNA 变性, 立即转入冰冻的梯度乙醇中脱水, 脱水后自然干燥。

开始杂交前, 将探针杂交液置 PCR 中 78℃ 变性 3 min, 然后 37℃ 孵育 1 h, 进行预退火, 以封堵探针中的重复序列。预退火结束后, 将探针杂交液加到染色体片上, 盖上硅烷化处理的盖玻片, 石蜡油封片, 置黑暗湿盒中, 37℃ 杂交 14~22 h。杂交完成后, 将染色体片在 45℃ 下, 依次在 2×SSC-50%甲酰胺和 0.2×SSC 中洗脱各 2 次, 每次 5 min, 以洗去非特异杂交的探针。洗脱完成后, 依次使用 mouse-anti-digoxigenin、FITC-rabbit-anti-mouse 和 FITC-goat-anti-rabbit (生物素标记的使用 Rhodamine-Avidin、Biotin-anti-Avidin、Rhodamine-Avidin) 进行免疫荧光检测和信号扩增, 使用 DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole)对染色体进行复染, Nikon 80i 荧光显微镜观察, NIS-element(Nikon)冷 CCD 照相, 所得照片用 Photoshop(Adobe)进行合成及对对比度调整。

1.5 BAC-FISH

首先作者对 CBE068E24 和 CBE099F20 克隆分别进行了单色 BAC-FISH 的定位(如 1.4 所述)。为了进一步研究包含同一个基因的阳性克隆是否来自于基因组上同一的位点, 必须进行双色甚至多色 BAC-FISH 的实验, 以便提供多个克隆之间的相对位置关系。为此作者对包含栉孔扇贝 NDPK 基因的两个阳性克隆进行了双色 FISH 的试验。在双色 BAC-FISH 中对其中一个进行地高辛标记, 另一个用生物素标记, 将这两个探针混合进行双色 BAC-FISH 实验, 验证是否共定位。将不同标记的两个探针等量添加, 探针杂交液的成分为: 50%去离子甲酰胺, 2×SSC, 10%硫酸葡聚糖, 50 mmol/L 磷酸缓冲液, 833 μg/L 鲑精 DNA, 166 μg/L *Cot-1* DNA, 16.67 μg/L Dig- CBE068E24, 16.67 μg/L Biotin-CBE099F20。实验过程同 1.4 所述。

2 结果与分析

2.1 BAC 克隆的验证

由引物组合 NDPKF 和 NDPKR 分别以 BAC 克

隆 CBE068E24 和 CBE099F20 为模板进行 PCR 反应, 得到同样的片段, 大小在 500~750 bp 之间。测序分析该片段长约 600 bp, 经过 Blast 比对属于栉孔扇贝

NDPK 基因(图 1), 进一步证实了 BAC 克隆 CBE068E24 和 CBE099F20 中含有栉孔扇贝 NDPK 基因。

```

GTAAAGATGTCGACCCAAAAAATGAAGTATCGTTCATAATGGTGAACCC 50
CGATGGGGTCCAGCGAGGGCTTGTGGCGAGATTATAAAGCGGTTTCGAGA 100
ACAGGGGTTTCAAGCTTGTCCGATGTAATAATGATGTCGCCATCCAAGGAC 150
CTGTTGGAGACGCATTATGTAGACCTGAAAAGCAAACCTTCTTCCCTGG 200
TCTTATCAAATACATGTCTGGTGGACCACTTGTGTCATGGCATGGCAAG 250
GAAAGAATGTTGTAAAGACAGGACGTAGTATGCTGGGTGCGACCAACCCC 300
CTTGACTCTAATCCTGGTACCATTCTGGTGACCTCTGTATAGACGTTGG 350
AAGGAATATATGTCATGGTAGTGATTCCGTTGAAAAGTGAAAAGCGTGAGG 400
TGAAACTCTGGTTTGGAGACAGTACAGAAGACTACAGTCTATGTACAGAA 450
AACATGATCTATGAATGAACCATACACAATAAGAAGTTCATGTGGCCAAG 500
ACTTGGAAATCAAGAAGGAACAGTGATCTGGAGGGTTGTACAAATCTGTGAT 550
AAAATCATGACGTTATAACATTTTGATAATGTTCTTCTATTTTGACCAAC 600
AAAAACATGACCATGTATACATTTAACGCAGAAGTGCTGACCTAATTTAA 650
CTCTCATGTATATGCTGTAGAAAATCTGGCATAAGATTAA 690
    
```

图 1 BAC 克隆验证 PCR 的的测序结果
Fig.1 The sequenc of PCR product of NDPK BAC

2.2 探针制备

提取高纯度 CBE068E24 和 CBE099F20 的 BAC 质粒 DNA 为模板, 缺口平移法制备地高辛和生物素标记的探针。经琼脂糖凝胶电泳检测, 反应产物片段分布于 200~500 bp(图 2)。

2.3 荧光原位杂交

在由栉孔扇贝担轮幼虫制得的分散良好的中期分裂相上, 用来自于 BAC 克隆 CBE068E24 和 CBE099F20 的两个探针分别进行了染色体定位研究。结果如图 3(a, b)示, 克隆 CBE068E24 和 CBE099F20 都定位于一对同源染色体的长臂上, 杂交信号明亮, 没有发现信号数量和位置的明显变化。

在分别用地高辛和生物素标记的两个克隆的同时杂交的结果中显示, 含有 NDPK 基因的这两个 BAC 克隆定位在细胞核的同一个位置(图 4a,b,c), 可以判断它们是共定位的。

3 讨论

本研究利用 BAC-FISH 技术在栉孔扇贝染色体上首次定位了包含 NDPK 基因的 BAC 克隆, 确定了两个 BAC 克隆定位在染色体上同一位置上, 验证了物理图谱中相关 contig 组装结果的可靠性, 同时也为 NDPK 基因的后续基因组结构和功能研究打下了基础。

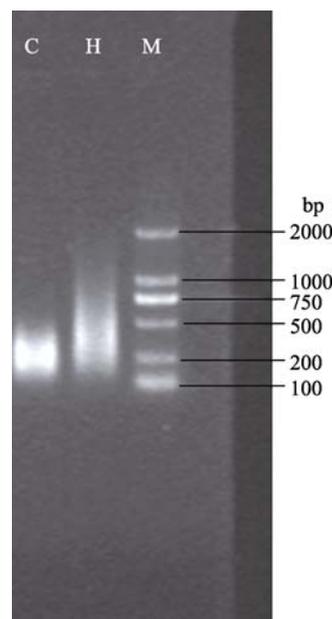


图 2 以 BAC 质粒为模板, 缺口平移法制备的地高辛标记的探针

Fig. 2 Preparation of DIG-labeled probe by nick-translation using BAC DNA as the template
泳道 H.生物素标记的 CBE068E24 克隆探针; 泳道 C.地高辛标记的 CBE099F20 克隆探针; 泳道 M.分子质量标准
Lane H.Biotin-labeled CBE068E24 cloning probe. Lane C. DIG-labeled CBE099F20 clone probe. Lane M. molecular weight marker

20 世纪 90 年代初, 王梅林等^[18]报道了栉孔扇贝的核型, 栉孔扇贝的染色体研究由此开始。到了 90 年代末, 随着分子生物学和荧光原位杂交技术逐渐

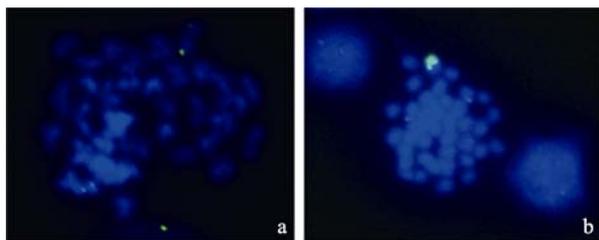


图3 单色 FISH 地高辛标记 CBE068E24(a)和地高辛标记 CBE099F20(b)

Fig.3 Monocolor FISH DIG-labeled CBE068E24(a) and DIG-labeled CBE099F20(b)

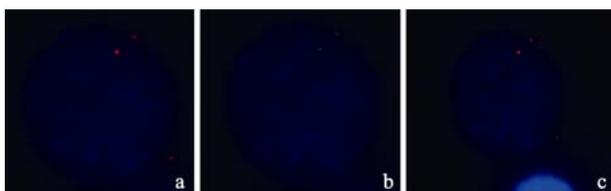


图4 含有 NDPK 基因的这两个 BAC 克隆的共定位

Fig. 4 Colocalization of the two BAC clones containing NDPK gene

a. 生物素标记 CBE068E24, b. 地高辛标记 CBE099F20, c. 融合图像, 显示杂交部位红色覆盖绿色

a. Biotin-labeled CBE068E24, b. DIG-labeled CBE099F20, c. colocalized picture, indicated that the green part was covered by the red part

在贝类染色体研究上得到应用, 栉孔扇贝染色体研究进入到分子细胞遗传学阶段。近年来, Wang 等^[19]利用 FISH 技术在栉孔扇贝上定位了 18S-5.8-28S 和 5S rDNA 序列, Huang 等^[12]和 Zhang 等^[13]在栉孔扇贝染色体上成功定位了 18S rDNA 和组蛋白基因。这些基因的定位不仅显示了它们在染色体上的位置, 更重要的是这些位置信息有助于单个染色体的鉴别, 这对于染色体微切割、非整倍体鉴定及全基因组测序安装等均具有重要的应用价值。利用大片段克隆的 FISH 定位技术开发染色体特异性探针是一种很有前途的染色体鉴别方法, 与高度重复序列和多拷贝基因探针相比, 大片段克隆由于具有序列独特和来源丰富的优点成为染色体特异性探针最好的来源。Wang 等^[20]利用 9 个 P1 克隆以及染色体的形态特点成功地同时鉴别了东方牡蛎(*Crassostrea virginica*)的 10 条染色体; Zhang 等^[14]利用 8 个 Fosmid 克隆鉴别了栉孔扇贝的 8 条染色体; Huan 等^[21]利用 BAC-FISH 技术对栉孔扇贝 18S rDNA、组蛋白基因 *h3* 以及包含免疫相关基因的 3 个 BAC 克隆共 5 个探针进行了同时定位, 可以同时鉴定 5 条栉孔扇贝染色体。本研究结果显示包含 NDPK 基因的 BAC 克隆定位到栉孔

扇贝的 1 对同源染色体上, 这使其成为一个理想的染色体特异性探针; 同时本研究使用的 BAC 克隆具有明显的功能基因标签-NDPK 基因, 因此在鉴别染色体的同时也起到了定位基因的作用。

目前本实验室已经构建了栉孔扇贝高密度物理图谱, 作者通过 FISH 技术实现了两个包含 NDPK 基因的 BAC 克隆的染色体共定位, 从细胞学的角度直观地验证了物理图谱上两个克隆组装结果的正确性。如果能开发出与 NDPK 基因连锁的分子标记, 并将其定位到遗传连锁图上, 则可实现该基因在遗传连锁图谱、物理图谱和染色体上的同时定位。随着这种同时定位的标记不断增加, 从而实现物理图谱、遗传连锁图谱和细胞遗传图谱的整合, 这对于栉孔扇贝基因组结构研究、全基因组测序组装和重要经济性状图位克隆具有重要的意义。

参考文献:

- [1] 吴龙涛, 宋林生, 胥炜, 等. 栉孔扇贝热休克蛋白 70 基因 cDNA 的克隆与分析[J]. 高技术通讯, 2003, 13: 75-79.
- [2] Su J, Ni D, Song L, et al. Molecular cloning and characterization of a short type peptidoglycan recognition protein(CfPGRP-S1)cDNA from Zhikong scallop *Chlamys farreri* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2007, 23: 646-656.
- [3] Gao Q, Song L, Ni D, et al. cDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 90 gene in the haemocytes of Zhikong scallop *Chlamys farreri* Comp[J]. Biochem Physiol B, Biochem Mol Biol, 2007, 147: 704-715.
- [4] Qiu L, Song L, Xu W, et al. Molecular cloning and expression of a Toll receptor gene homologue from Zhikong Scallop, *Chlamys farreri*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2007, 22: 451-466.
- [5] Qiu L, Song L, Yu Y, et al. Identification and characterization of a myeloid differentiation factor 88(MyD88)cDNA from Zhikong scallop *Chlamys farreri*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2007, 23: 614-623.
- [6] Wang H, Song L, Li C, et al. Cloning and characterization of a novel C-type lectin from Zhikong scallop *Chlamys farreri*[J]. Mol Immunol, 2007, 44: 722-731.
- [7] Yu Y, Qiu L, Song L, et al. Molecular cloning and characterization of a putative lipopolysaccharide-induced TNF-alpha factor (LITAF)gene homologue from Zhikong scallop *Chlamys farreri*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2007, 23: 419-429.

- [8] Zhang H, Song L, Li C, et al. Molecular cloning and characterization of a thioester- containing protein from Zhikong scallop *Chlamys farreri*[J]. Mol Immunol, 2007, 44: 3492-3500.
- [9] Zhang H, Song L, Li C, et al. A novel C1q-domain-containing protein from Zhikong scallop *Chlamys farreri* with lipopolysaccharide binding activity[J]. Fish Shellfish Immunol, 2008, 25: 281-289.
- [10] 任世英, 肖天. 海洋聚磷菌中核苷二磷酸激酶基因的克隆及序列分析[J]. 海洋科学, 2008, 9: 61-63.
- [11] Friebe B, Tuleen N A, Badaeva E D, et al. Cytogenetic identification of *Aegilops peregrinum* chromosomes added to common wheat[J]. Genome, 1996, 39: 272-276.
- [12] Huang X, Bao Z, Bi K, et al. Chromosomal localization of the major ribosomal RNA genes in scallop *Chlamys farreri* [J]. Acta Oceanologica Sinica, 2006, 25: 108-115.
- [13] Zhang L, Bao Z, Wang S, et al. FISH Mapping and Identification of Zhikong Scallop(*Chlamys farreri*) Chromosomes[J]. Mar Biotechnol (NY), 2007, 10: 151-157.
- [14] 郇聘, 张晓军, 李富花, 等. 栉孔扇贝热休克蛋白70(HSP70)基因的 BAC-FISH 定位[J]. 海洋科学, 2009, 33: 10-15.
- [15] 王永平, 郭希明. FISH 技术在贝类分子生物学研究中的应用[J]. 生命科学研究, 2001, 5: 283-289.
- [16] Zhang Y, Zhang X, Scheuring C, et al. Construction and characterization of two bacterial artificial chromosome libraries of Zhikong scallop, *Chlamys farreri* Jones et Preston, and identification of BAC clones containing the genes involved in its innate immune system[J]. Marine Biotechnology, 2008, 10: 358-365.
- [17] Zwick M, Hanson R, Islam-Faridi M, et al. A rapid procedure for the isolation of *Cot-1* DNA from plants [J]. Genome, 1997, 40: 138-142.
- [18] 王梅林, 郑家声, 余海. 栉孔扇贝 *Chlamys farreri*(Jones & Preston, 1904)染色体核型[J]. 青岛海洋大学学报, 1990, 20: 81-85.
- [19] Wang Y, Guo X. Chromosomal rearrangement in pectinidae revealed by rRNA loci and implications for bivalve evolution[J]. Biol Bull, 2004, 207: 247-256.
- [20] Wang Y, Xu Z, Pierce J, et al. Characterization of Eastern Oyster (*Crassostrea virginica* Gmelin) Chromosomes by Fluorescence In situ Hybridization with Bacteriophage P1 Clones[J]. Mar Biotechnol(NY), 2005, 7: 207-214.
- [21] 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[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2009.

Chromosomal localization of NDPK gene in Zhikong scallop *Chlamys farreri* using BAC-FISH

HUANG Chao^{1,2}, HUAN Pin¹, ZHANG Xiao-jun¹, XIANG Jian-hai¹

(1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Science, Qingdao 266071, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China)

Received: Mar., 12, 2011

Key words: Zhikong scallop, *Chlamys farreri*, NDPK gene, BAC-FISH, Chromosomal identification

Abstract: Zhikong scallop(*Chlamys farreri*) is one of the most economically important aquaculture species in China. Using the technology of BAC-FISH, we localized the BAC clones containing NDPK gene in a pair of homologous chromosomes. This result proved the reliability of the contig assembling of the *C. farreri* physical map, at the same time, the localization of NDPK gene in chromosome provided further support for research of structures, functions and the application of the gene. This research is the practice of localizing genes of low copies. The result will provide reference to further research and characterization of *C. farreri* chromosomes, and will facilitate the integration of the physical map, linkage map and cytogenetics map of this species.

(本文编辑: 梁德海)