

# 杂交鲍染色体 GISH 的优化

刘富江<sup>1,2</sup>, 朱齐春<sup>1,2</sup>, 张健鹏<sup>1,2</sup>, 蔡明夷<sup>1,2</sup>

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 农业农村部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021)

[摘要] 基因组荧光原位杂交 (GISH) 是分析远缘杂交染色体组结构的有力工具。为了提高杂交鲍 GISH 的信号强度, 以皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*) 和杂色鲍 (*H. diversicolor*) 杂交子代为研究对象, 研究了杂交缓冲液中探针质量浓度、封阻 DNA 质量浓度, 以及去离子甲酰胺、硫酸葡聚糖或聚乙二醇 6000 的含量对 GISH 信号强度的影响。结果表明, 杂交缓冲液中, 探针质量浓度应大于 6.25 ng/ $\mu$ L, 封阻 DNA (鲑精 DNA) 的适宜质量浓度约为探针的 10 倍, 去离子甲酰胺的适宜体积分数约为 30%, 硫酸葡聚糖的适宜体积分数为 12.5% ~ 17.5%。此外, 用 7.5% 的聚乙二醇 6000 替代硫酸葡聚糖可以提高杂交信号, 但存在信号噪点多等问题。

[关键词] 基因组原位杂交 (GISH); 杂交鲍; 染色体

[中图分类号] Q23

## Optimization of Genomic *in situ* Hybridization (GISH) for Hybrid Abalone

LIU Fujiang<sup>1,2</sup>, ZHU Qichun<sup>1,2</sup>, ZHANG Jianpeng<sup>1,2</sup>, CAI Mingyi<sup>1,2</sup>

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. The Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Jimei University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** Genomic fluorescence *in situ* hybridization (GISH) is a powerful tool for analyzing the source of chromosomes in distant hybrid cells. In order to improve the signal of GISH, the effect of the probe dosage, blocked DNA concentration, deionized formamide concentration, and dextran sulfate or PEG6000 concentration on the signal intensity of GISH were investigated. The results showed that the appropriate concentration of the probe in the hybridization buffer was not less than 6.25 ng/ $\mu$ L; the concentration of the blocking DNA (salmon sperm DNA) should be 10 times the amount of the probe; and the suitable concentration of deionized formamide was about 30%, the suitable concentration of dextran sulfate is 12.5% to 17.5%. In addition, polyethylene glycol 6000 instead of dextran sulfate can increase the hybridization signal, with a suitable concentration of 7.5%.

**Keywords:** genomic *in situ* hybridization; hybrid abalone; chromosome

## 0 引言

鲍是我国传统的海珍品, 是重要的海水养殖贝类。近年来, 鲍的遗传育种研究发展迅速, 其中杂交育种的成果最为突出。基于杂交, 我国科研工作者已先后育成“大连 1 号”、“东优 1 号”和“西盘鲍”等品种, 推动了我国鲍养殖产业的健康发展<sup>[1-3]</sup>。在鲍的杂交育种中, 杂交后代的遗传分析是结果鉴定的重要内容, 也是深入研究杂种优势机理的基础<sup>[4]</sup>。

[收稿日期] 2018-11-23

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (U1605213)

[作者简介] 刘富江 (1995—), 男, 硕士生, 从事水产遗传育种方向研究。通信作者: 蔡明夷 (1973—) 女, 教授, 博士。E-mail: myicai@jmu.edu.cn

基因组原位杂交 (genomic *in situ* hybridization, GISH) 是分析远缘杂交染色体组结构的有力工具。它以一个亲本的总 DNA 制备杂交探针, 对染色体进行原位杂交, 可以用不同颜色的荧光区别显示染色体的亲本来源<sup>[5]</sup>。目前, GISH 已广泛应用于动植物远缘的杂交结果鉴定、异源多倍体识别, 以及基因流与基因渗入检出等研究中<sup>[6-8]</sup>。在鲍的远缘杂交研究中, GISH 也初步应用于杂交子代的染色体组成及其动态变化<sup>[9-11]</sup>。然而, 前期研究结果显示, 对于亲本亲缘关系较近的杂交鲍, 利用 GISH 分辨父母本染色体的难度仍然较高, 较难得到稳定结果<sup>[11]</sup>。因此, 本文拟以皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*) 和杂色鲍 (*H. diversicolor*) 杂交子代为研究对象, 分析杂交缓冲液中探针、封阻 DNA、去离子甲酰胺 (dFA)、硫酸葡聚糖 (DS) 或聚乙二醇 (PEG)6000 的含量对 GISH 信号强度的影响, 为提高杂交鲍染色体 GISH 的灵敏度与稳定性, 也可为其他探针的荧光原位杂交 (FISH) 提供借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

实验所用杂色鲍足部肌肉组织采自福建省晋江福大鲍鱼水产有限公司, 固定于无水乙醇中  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。取性腺成熟的雌性杂色鲍和雄性皱纹盘鲍, 采用阴干、流水刺激和经过紫外照射的海水刺激等手段催产, 获得杂色鲍卵子与皱纹盘鲍精子。按蔡明夷等描述的方法获得杂色鲍  $\times$  皱纹盘鲍的杂交鲍幼体<sup>[12]</sup>。杂交鲍幼体在秋水仙素液体中培养后经低渗、固定等处理, 然后置于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存<sup>[13]</sup>。

### 1.2 GISH 探针和封阻 DNA 的制备

用杂色鲍足部肌肉组织提取 DNA, 具体操作参照血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒 (天根生化有限公司) 说明书。采用切口平移法制备生物素标记的杂色鲍基因组 DNA 探针, 操作方法参考试剂盒说明书 (Roche)。将鲑精 DNA (厦门海琪生物技术有限公司) 用高压灭菌剪切法剪切成合适片段 (100~200 bp)。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测探针和封阻 DNA 的质量。将符合要求的探针和鲑精 DNA 混合后采用乙醇沉淀法进行纯化, 再用不同体积的 TE 缓冲液溶解沉淀,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.3 染色体制片的准备

取杂交鲍担轮幼体, 采用蒸汽滴片法进行染色体制片, 具体操作方法参考蔡明夷等<sup>[13]</sup>的描述, 滴好的制片经空气干燥后于  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  恒温箱中老化 30 min。

### 1.4 基因组荧光原位杂交

GISH 的一般程序包括探针变性、染色体制片变性、杂交、杂交后洗涤和信号放大等 5 个步骤, 操作程序与蔡明夷等<sup>[13]</sup>的 FISH 方法描述相同。除特殊说明外, 研究所用杂交缓冲液各成分组成为: 30% (体积分数) dFA、10% (体积分数)  $2\times\text{SSC}$ 、12.5% (体积分数) DS、6.25 ng/ $\mu\text{L}$  探针、62.5 ng/ $\mu\text{L}$  鲑精 DNA。杂色鲍探针杂交信号预期显示为绿色荧光。

1) 探针含量试验 各试验组探针的终质量浓度分别为 1.56 ng/ $\mu\text{L}$ 、3.13 ng/ $\mu\text{L}$ 、6.25 ng/ $\mu\text{L}$ 、12.50 ng/ $\mu\text{L}$ 、25.00 ng/ $\mu\text{L}$ 。

2) 鲑精 DNA 含量试验 各试验组鲑精 DNA 的质量浓度分别为探针的 0 倍 (0 ng/ $\mu\text{L}$ )、5 倍 (31.3 ng/ $\mu\text{L}$ )、10 倍 (62.5 ng/ $\mu\text{L}$ )、20 倍 (125.0 ng/ $\mu\text{L}$ )、40 倍 (250.0 ng/ $\mu\text{L}$ )。

3) dFA 含量试验 各试验组杂交缓冲液中 dFA 的体积分数分别为 10%、20%、30%、40% 和 50%。

4) DS 含量试验 各试验组 DS 的体积分数分别为 2.5%、7.5%、12.5%、17.5%、25.0%。

5) PEG6000 替代 DS 试验 用 PEG6000 替代杂交缓冲液中的 DS, 各试验组 PEG6000 的体积分数分别为 2.5%、7.5%、12.5%、17.5%、25.0%。

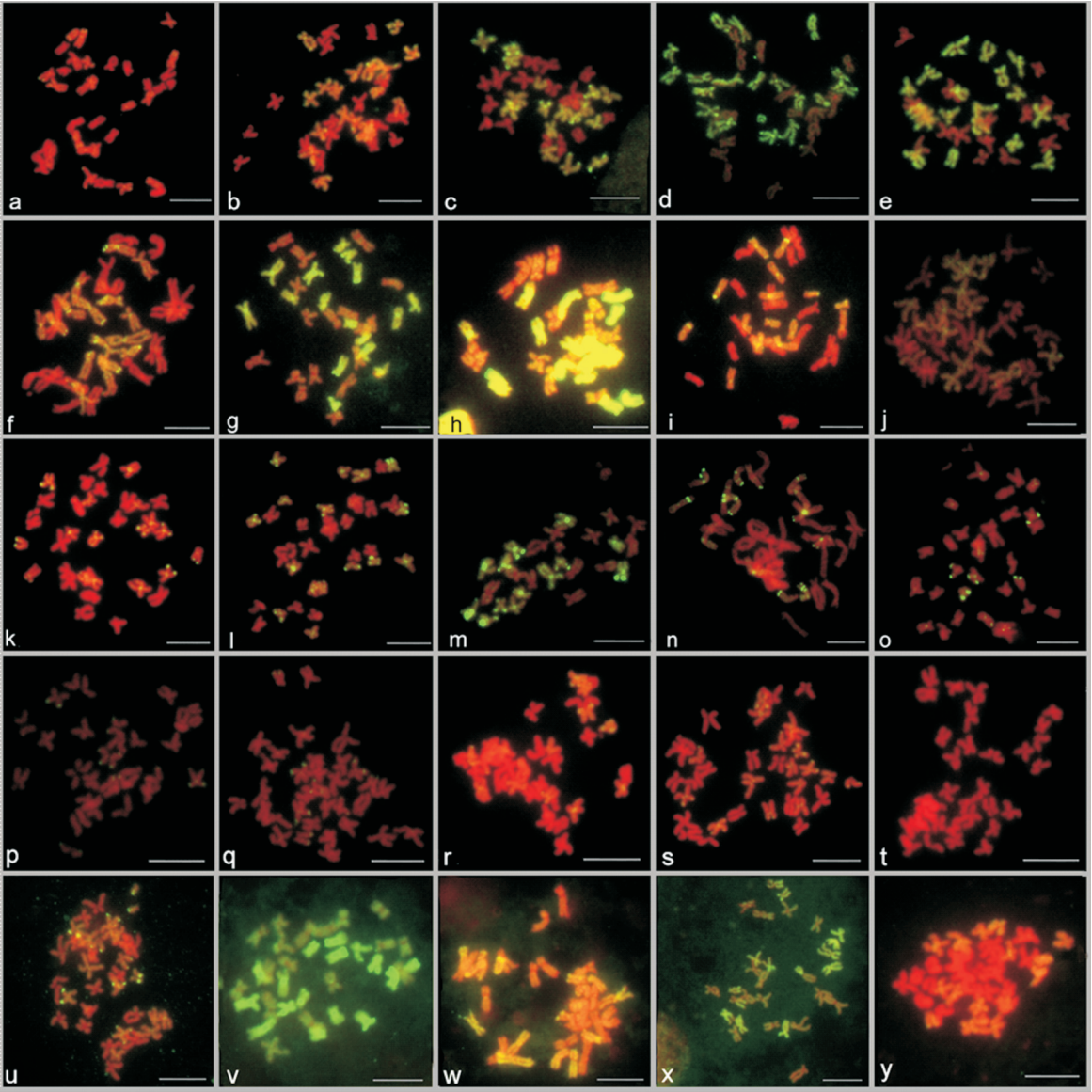
### 1.5 显微观察、测量与数据处理

在荧光显微镜下, 用固定条件拍照, 获取分散良好、形态清晰且数目完整的杂交鲍的中期分裂相。每个试验选取 5 个分裂相, 利用 Image-pro plus 6.0 软件测量有阳性信号 (绿色荧光) 染色体的平均荧光强度, 计算平均值与标准差, 并作折线图。用 SPSS 21.0 作单因素方差分析。

2 实验结果

2.1 探针含量对杂交信号的影响

探针含量单因素试验中, 在其不同质量浓度下的 GISH 图像如图 1a ~ 图 1e 所示, 其中绿色荧光为杂色鲍探针杂交信号, 红色为负染的 PI 信号。



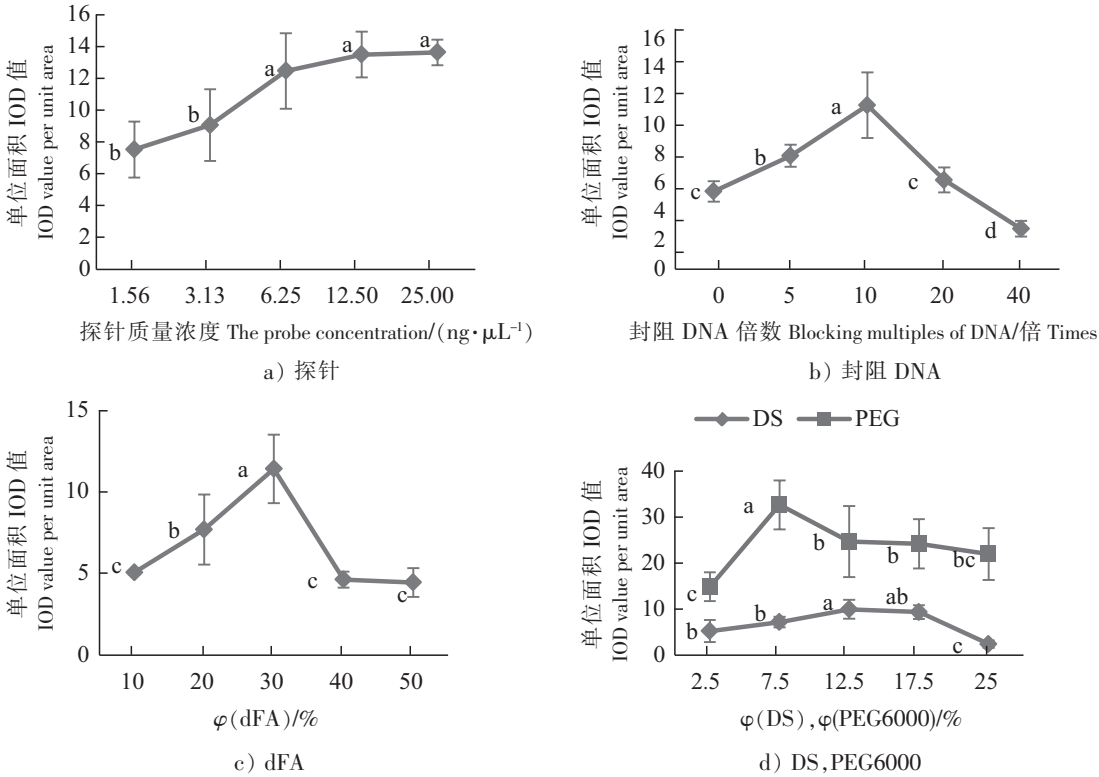
说明: a~e 依次表示杂色鲍基因组 DNA 探针质量浓度为 1.56、3.13、6.25、12.50、25.00 ng/μL 的 GISH 图; f~j 依次表示 0、5、10、20、40 倍鲑精 DNA 封阻质量浓度下 GISH 图; k~o 依次表示去离子甲酰胺体积分数为 10%、20%、30%、40%、50% 的 GISH 图; p~t 依次表示 DS 体积分数为 2.5%、7.5%、12.5%、17.5%、25.0% 的 GISH 图; u~y 依次表示 PEG6000 体积分数为 2.5%、7.5%、12.5%、17.5%、25.0% 的 GISH 图; 标尺=10 μm。

Note: a~e successively represents the public map at the concentrations of 1.56, 3.13, 6.25, 12.50, 25.00 ng/μL probes. f~j, in turn, stands for the blocking concentration of 0, 5, 10, 20 and 40 times of salmon. k~o stands for 10%, 20%, 30%, 40% and 50% of the deionized formamide concentration. p~t stands for 2.5%, 7.5%, 12.5%, 17.5%, 25.0% of the DS concentration respectively. u~y indicates 2.5%, 7.5%, 12.5%, 17.5%, 25.0% PEG 6000 respectively. scale bar=10 μm.

图 1 不同探针、封阻 DNA、去离子甲酰胺、DS 或 PEG6000 含量下的 GISH 图

Fig.1 The results of GISH under different probes, blocking DNA, deionized formamide, DS or PEG6000 concentrations

当探针质量浓度为 1.56 ng/μL（见图 1a）和 3.13 ng/μL（见图 1b）时，杂交信号均较弱，不能明显区分杂交子代中染色体的亲本来源。当探针质量浓度高于 6.25 ng/μL 时，杂交信号强，染色体亲本来源明显区别为红绿两色。定量分析结果表明：当探针质量浓度从 1.56 ng/μL 增加至 6.25 ng/μL 时，靶染色体的平均荧光强度由  $(7.53 \pm 1.76)$  上升至  $(12.46 \pm 2.38)$ ；当探针质量浓度从 6.25 ng/μL 增加至 25.00 ng/μL 时，染色体平均荧光强度依然有所增强，但是增强趋势已趋于平缓，平均值间的差异不显著（ $P > 0.05$ ，见图 2a）。



说明:数据为平均值±标准差( $n=5$ );不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )。  
Notes: data in the figure are mean ± standard deviation( $n=5$ ), different letters indicate significant differences( $P<0.05$ ).

图 2 不同探针、封阻DNA、dFA、DS 和 PEG6000 的含量对染色体单位面积 IOD 值的影响  
Fig.2 Effects of different concentrations of probes,blocked DNA,dFA,DS and PEG6000 on the IOD value per unit area of chromosome

2.2 封阻 DNA 含量对杂交信号的影响

封阻 DNA 含量单因素试验中，在其不同质量浓度下的 GISH 图像如图 1f ~ 图 1j 所示，其中绿色荧光为杂色鲍探针杂交信号，红色为负染的 PI 信号。各试验组间均可明显区别染色体亲本来源，当鲑精 DNA 质量浓度为探针 10 倍时信号最强。定量分析结果表明：当封阻 DNA 质量浓度由 0 倍增加至 10 倍过程中，靶染色体的平均荧光强度由  $(5.41 \pm 0.71)$  逐渐增强到  $(11.39 \pm 2.28)$ ；当封阻 DNA 质量浓度由 10 倍增加至 40 倍过程中，荧光强度又逐步减弱至  $(2.81 \pm 0.55)$ ，各处理水平间荧光强度差异显著（ $P < 0.05$ ，见图 2b）。

2.3 dFA 含量对杂交信号的影响

dFA 含量单因素试验中，在其不同体积分数下的 GISH 图像如图 1k ~ 图 1o 所示，其中绿色荧光为杂色鲍探针杂交信号，红色为负染的 PI 信号。当 dFA 体积分数为 30% 时，染色体亲本来源的区分度最明显，探针杂交信号涂布的完整性最好（见图 1m）；当 dFA 体积分数高于 40% 时，探针杂交的涂布均一性变差，杂交信号只出现于某些异染色质区域，无法明确区分染色体的亲本来源（见图 1n，图 1o）。定量分析结果表明：当 dFA 体积分数由 10% 增至 30% 时，靶染色体的平均荧光强度由  $(5.07 \pm$



0.15) 逐渐增强到  $(11.40 \pm 2.09)$ ; 而当 dFA 体积分数由 30% 增至 40%, 靶染色体的平均荧光强度急剧变弱至  $(4.63 \pm 0.49)$  (见图 2c)。

#### 2.4 DS 或 PEG6000 含量对杂交信号的影响

DS 含量单因素试验中, 在其不同体积分数下的 GISH 图像如图 1p ~ 图 1t 所示, 其中绿色荧光为杂色鲍探针杂交信号, 红色为负染的 PI 信号。结果直观显示, DS 体积分数为 12.5% 和 17.5% 时信号最强, 涂布均匀, 亲本来源区分度较高 (见图 1q, 图 1s)。定量分析结果表明: DS 试剂的体积分数由 2.5% 增加至 12.5% 的过程中, 靶染色体的平均荧光强度由  $(5.25 \pm 2.41)$  逐渐增强到  $(9.96 \pm 2.05)$ ; 当其体积分数由 12.5% 增加至 17.5% 时荧光强度略略下降; 当其体积分数由 17.5% 增加至 25.0% 时, 荧光强度骤减至  $(2.45 \pm 0.80)$  (见图 2d)。

在 PEG6000 不同体积分数下的 GISH 图像如图 1p ~ 图 1y 所示, 其中绿色荧光为杂色鲍探针杂交信号, 红色为负染的 PI 信号。图像显示: 7.5% PEG6000 荧光信号极强, 但亲本来源区分度并不高 (见图 2v)。定量分析结果表明: 当 PEG6000 的体积分数由 2.5% 增加至 7.5% 时, 染色体单位面积上的荧光强度由  $(14.91 \pm 3.13)$  剧增到  $(32.65 \pm 5.31)$ ; 当 PEG6000 的体积分数继续增加至 12.5%, 荧光强度反而减弱到  $(24.7 \pm 7.71)$ , 并随着 PEG6000 的体积分数继续增加而略微下降, 但差异不显著 ( $P > 0.05$ , 见图 2d)。

DS 和 PEG6000 两组试验结果比较说明, 使用 PEG6000 组荧光强度明显高于用 DS 组。

### 3 讨论

#### 3.1 探针含量的影响

核酸杂交的反应速度与溶液中参与杂交的互补链核苷酸质量浓度的乘积成正比<sup>[14]</sup>。染色体 GISH 中, 染色体制片上固定的 DNA 量基本稳定, 因此探针质量浓度是影响核酸杂交效率的关键因素<sup>[15]</sup>。本研究结果显示, 当探针的质量浓度为  $1.56 \text{ ng}/\mu\text{L}$  时, GISH 信号强度微弱, 且对异源染色体的区分度差; 随探针的质量浓度的升高, 信号强度和染色体区分度均相应提高; 当探针的质量浓度升高到  $6.25 \text{ ng}/\mu\text{L}$  时荧光强度达到平台, 但继续提高探针的质量浓度也不再显著提升 GISH 信号强度。可见, 杂交鲍 GISH 试验中, 探针的质量浓度应大于  $6.25 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。综合考虑试验的成本控制和稳定性, 本研究建议杂交鲍的 GISH 探针用量为  $6.25 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。

不同研究所使用探针的质量浓度并不相同。Bi 等<sup>[16]</sup>在运用 GISH 鉴定两种异源三倍体蝶螈 (*A. laterale-2 jeffersonianum*, *A. 2 laterale-jeffersonianum*) 的核基因组组成中所使用的蓝点钝口螈 (*A. laterale*) 基因组探针的质量浓度为  $5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。Sczepanski 等<sup>[17]</sup>在运用 FISH 研究两种海洋鲶鱼 (*Genidens genidens*, *Aspistor luniscutis*) 细胞分类和核型进化中所使用银色鲢脂鲤 (*Prochilodus argenteus*) 18S rDNA 探针的质量浓度为  $2.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。Jowett<sup>[18]</sup>用双色 FISH 研究斑马鱼 (*Barchydanio rerio* var) 胚胎基因表达模式时所使用的反义探针的质量浓度为  $0.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。Zhang 等<sup>[19]</sup>在运用 FISH 研究栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 的染色体定位与鉴定中所使用的 Fosmid DNA 探针的质量浓度为  $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。探针种类、染色体结构差异、探针标记效率、杂交后洗涤严谨度等因素均可能影响探针检出下限, 导致 GISH 试验信号太弱甚至无法检出。因此, 不同实验室在进行荧光原位杂交实验时, 有必要结合自身条件优化探针使用的质量浓度。

#### 3.2 鲑精 DNA 含量的影响

在杂交缓冲液中加入鲑精 DNA 的目的是封闭普遍同源性的重复序列, 以此降低非特异杂交信号<sup>[20-21]</sup>。Mukai 等<sup>[22]</sup>通过加入鲑精 DNA, 在小麦背景下成功检测到大麦染色体。本研究结果显示, 最佳的鲑精 DNA 的质量浓度约为探针质量浓度的 10 倍, 过高或过低均会显著影响 GISH 信号强度和异源染色体的区分度。可能的原因是质量浓度过低不足以封闭同源序列造成微小的跨基因组杂交, 质量浓度过高会影响探针在整个目标染色体长度上的均匀杂交。

不同研究中, 鲑精 DNA 的使用量有所差异。Hu 等<sup>[23]</sup>在运用 GISH 研究紫扇贝 (*Argopecten purpuratus*) 和海湾扇贝 (*A. irradians irradians*) 杂交种基因组时所用鲑精 DNA 的质量浓度为探针的 100 倍。Bi 等<sup>[24]</sup>在运用 GISH 研究蝾螈 (*Ambystoma* (Amphibia: Caudata)) 的基因组交换减数分裂机制时所用鲑精 DNA 的质量浓度为探针的 100 倍。Rampin 等<sup>[25]</sup>在运用 GISH 研究鲤科鱼杂交 (*Squalius alburnoides complex*) 的亲本染色体和基因组重排时所用鲑精 DNA 的质量浓度为探针的 25 倍。即在不同研究中, 鲑精 DNA 质量浓度的使用范围为探针的 25 ~ 100 倍。鲑精 DNA 的适宜用量的差异可能与研究对象的基因组结构不同有关。

### 3.3 dFA 含量的影响

变性的探针和染色体 DNA 的复性是荧光原位杂交的关键步骤。已有研究证明, 特定 DNA 复性的适宜温度约为  $T_m - 25^\circ\text{C}$ <sup>[26]</sup>。然而, 为了避免长时间高温孵育破坏染色体形态, 探针与靶序列的复性通常在  $37^\circ\text{C}$  中完成<sup>[27]</sup>。因此, 研究人员一般在杂交缓冲液中添加适量 dFA 来调整 DNA 的  $T_m$ , 以降低复性温度<sup>[28]</sup>。目前已知, dFA 的体积分数每提高 1%, 溶液中 DNA 的  $T_m$  约下降  $0.60 \sim 0.73^\circ\text{C}$ <sup>[29]</sup>。本文研究了杂交缓冲液中 dFA 的体积分数对杂交鲍幼体 GISH 信号的影响。结果显示, GISH 信号强度相对 dFA 体积分数的变化曲线为单峰曲线, 峰值对应的 dFA 体积分数为 30% (见图 1c); dFA 体积分数过高或过低均会同时导致杂交信号强度和均一性的下降 (见图 2k ~ 图 2o)。这一曲线的特征与 Mcconaughey<sup>[28]</sup>在研究 dFA 体积分数对膜结合枯草芽孢杆菌 DNA 杂交效率的影响所得的结果相符。可见, 杂交缓冲液中 dFA 的含量高低是影响分子杂交效率的重要因素, 其含量过低或过高均会严重影响杂交信号的强度与均匀性。

不同研究报道中, 杂交缓冲液中 dFA 的含量可能不同。例如, Barranger 等<sup>[30]</sup>在运用 rDNA 基因 (5S rRNA, 18 - 5.8 - 28S rRNA) 做探针, 用胚胎细胞核染色体制片的 FISH, 研究太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 的胚胎染色体受敌草隆胁迫而导致非整倍性时所用的 dFA 的体积分数为 50%; Rampin 等<sup>[25]</sup>在用 *S. alburnoides* 的 AA 基因组做探针, 用 *S. alburnoides* 的二倍体和三倍体细胞悬液制片的 GISH 研究鲤科杂交鱼 (*Squalius alburnoides complex*) 的亲本染色体和基因组重排, 其所用的 dFA 的体积分数为 75%; Bi 等<sup>[24]</sup>用蓝点钝口螈 (*A. laterale*) 基因组做探针, 用火蜥蜴 (*Salamandra salamandra*) 卵母细胞做染色体制片的 GISH, 研究蝾螈的基因组交换减数分裂机制, 其所用的 dFA 的体积分数为 50%。本研究结果显示, 杂交鲍 GISH 中 dFA 的适宜体积分数约为 30%, 低于多数研究报道。DNA 的  $T_m$  值受 GC 含量、长度、复杂性、构像等因素的影响, 也受缓冲液中变性剂种类和含量、一价阳离子浓度、pH 等因素的影响<sup>[31-32]</sup>, 这些都可能导致 dFA 的适宜含量的变化。因此, 在 GISH 试验中出现杂交信号太弱或不均匀的问题时, 在保证探针含量充分的前提下, 需检查杂交缓冲液中 dFA 的含量是否适宜。

### 3.4 DS 或 PEG6000 含量的影响

在核酸杂交中, 常常在杂交缓冲液中加入适量 DS 以促进杂交速度<sup>[14]</sup>。DS 是一种大分子多聚化合物, 具有极强的水合作用。它在杂交缓冲液中的作用可以归纳为两点: 一是, 增加探针含量; 二是, 增加溶液的粘稠度<sup>[33]</sup>。本研究结果显示, 杂交鲍 GISH 杂交缓冲液中 DS 最适宜的体积分数约为 12.5%。其体积分数太低, 探针浓缩不充分; 其体积分数太高, 溶液过于粘稠, 导致分子扩散速度降低。因此, 其体积分数太低或太高均会影响杂交效率。不同研究中 DS 的使用量差别不大。Bi 等<sup>[24]</sup>在利用 GISH 研究蝾螈的基因组交换减数分裂机制时, 所用的 DS 的体积分数为 10%; Yang 等<sup>[34]</sup>在利用 FISH 研究虾夷扇贝 (*Patinopekten yessoensis*) 免疫相关基因定位时, Feng 等<sup>[35]</sup>在用 FISH 研究栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 微卫星标记的细胞遗传图谱时, 他们所用的 DS 的体积分数都为 10%; Rampin 等<sup>[25]</sup>在利用 GISH 研究鱼类 (*Squalius alburnoides complex*) 的亲本染色体和基因组重排时, Boonanuntanasarn 等<sup>[36]</sup>在利用 FISH 研究石斑鱼 (*Epinephelus fuscoguttatus*) *vasa* 基因表达时, 他们所用的 DS 的体积分数都为 10%。可见, 与其他因素相比, 杂交缓冲液中 DS 含量的作用相对独立且相

对稳定,在不同的研究中无需特别优化。然而值得注意的是,DS 液体比较粘稠,精确量取较困难,在配液中要注意准确量取。

Amasino<sup>[37]</sup>在 Southern 杂交中用 PEG6000 替代核酸杂交缓冲液中的 DS,发现 PEG6000 具有信号强、粘度低和价格低等优势。因此,本研究尝试用 PEG6000 替代 GISH 杂交缓冲液中的 DS。结果显示,PEG6000 组的信号强度总体高于 DS 组,适宜的体积分数为 7.5%。但研究结果也显示,PEG6000 组存在杂交信号不稳定、信号噪点多、制片标本易“掉片”等问题。

## 4 结论

本文提出一种染色体荧光强度定量测量方法,并利用该方法研究了杂交缓冲液中探针深度、鲑精 DNA 用量、DS 含量对杂盘杂交鲍染色体 GISH 信号的影响,同时尝试用 PEG6000 替换缓冲液中的 DS。研究结果为提高杂交鲍 GISH 的分辨率提供了依据,也为其他 FISH 相关研究提供了借鉴。

## [参考文献]

- [1] 赖龙玉,严正凛. 鲍遗传育种研究进展 [J]. 福建农业学报, 2013, 28(12): 1303-1309.
- [2] 柯才焕,骆轩,游伟伟,等. 西盘鲍 [J]. 中国水产, 2016(3): 53-55.
- [3] 张国范. 杂交鲍“大连1号” [J]. 农民科技培训, 2010(7): 30.
- [4] DI G, LUO X, HUANG M, et al. Proteomic profiling of eggs from a hybrid abalone and its parental lines: *Haliotis discus hannai* Ino and *Haliotis gigantea* [J]. Animal Genetics, 2015, 46(6): 646-654.
- [5] 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.
- [6] 王燕,陈清,陈涛,等. 基因组原位杂交技术及其在园艺植物基因组研究中的应用 [J]. 西北植物学报, 2017, 37(10): 2087-2096.
- [7] 周贺,庄子昕,查荒源,等. 杂交三倍体泥鳅 GISH 技术反应体系的建立及应用 [J]. 大连海洋大学学报, 2018, 33(1): 1-6.
- [8] PIPERIDIS N. GISH: resolving interspecific and intergeneric hybrids [M] // BESSE P. Molecular Plant Taxonomy: Methods and Protocols. Totowa, N J: Humana Press, 2014: 325-36.
- [9] CAI M Y, KE C H, LUO X, et al. Karyological studies of the hybrid larvae of *Haliotis diversicolor supertexta* female and *Haliotis discus discus* male [J]. Journal of Shellfish Research, 2010, 29(3): 735-740.
- [10] 刘圆圆. 杂色鲍与皱纹盘鲍及其杂交子代的分子细胞遗传学研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2016.
- [11] 王海山. 三种鲍种间杂交的细胞遗传学研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2014.
- [12] 蔡明夷,柯才焕,王桂忠,等. 杂色鲍与盘鲍种间杂交受精率的影响因素 [J]. 中国水产科学, 2006, 13(2): 230-236.
- [13] 蔡明夷,刘贤德,陈紫莹,等. 皱纹盘鲍染色体 C 带和 rDNA 定位 [J]. 水产学报, 2013, 37(7): 1002-1008.
- [14] WETMUR J G. Acceleration of DNA renaturation rates [J]. Biopolymers: Original Research on Biomolecules, 1975, 14(12): 2517-2524. DOI:10.1002/bip.1975.360141208.
- [15] ROCHA R, SANTOS R S, MADUREIRA P, et al. Optimization of peptide nucleic acid fluorescence *in situ* hybridization (PNA-FISH) for the detection of bacteria: the effect of pH, dextran sulfate and probe concentration [J]. Journal of Biotechnology, 2016, 226: 1-7.
- [16] BI K, BOGART J P. Identification of intergenomic recombinations in unisexual salamanders of the genus *Ambystoma* by genomic *in situ* hybridization (GISH) [J]. Cytogenetic and Genome Research, 2006, 112(3/4): 307-312.
- [17] SCZEPANSKI T S, NOLETO R B, CESTARI M M, et al. A comparative study of two marine catfish (Siluriformes, Ariidae): cytogenetic tools for determining cytotaxonomy and karyotype evolution [J]. Micron, 2010, 41(3): 193-197.
- [18] JOWETT T. Double *in situ* hybridization techniques in zebrafish [J]. Methods, 2001, 23(4): 345-358.
- [19] ZHANG L, BAO Z, WANG S, et al. FISH mapping and identification of Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) chromosomes [J]. Marine Biotechnology, 2008, 10: 151-157.

- [20] KATO A, VEGA J M, HAN F, et al. Advances in plant chromosome identification and cytogenetic techniques [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2005, 8(2): 148-154.
- [21] 余舜武, 宋运淳. 基因组原位杂交的新进展及其在植物中的应用 [J]. *植物科学学报*, 2001, 19(3): 248-254.
- [22] MUKAI Y, GILL B S. Detection of barley chromatin added to wheat by genomic *in situ* hybridization [J]. *Genome*, 1991, 34(3): 448-452.
- [23] HU L, HUANG X, MAO J, et al. Genomic characterization of interspecific hybrids between the scallops *Argopecten purpuratus* and *A. irradians irradians* [J]. *PLOS ONE*, 2013, 8(4): e62432.
- [24] BI K, BOGART J P. Probing the meiotic mechanism of intergenomic exchanges by genomic *in situ* hybridization on lampbrush chromosomes of unisexual *Ambystoma* (Amphibia: Caudata) [J]. *Chromosome Research*, 2010, 18(3): 371-382.
- [25] RAMPIN M, BI K, BOGART J, et al. Identifying parental chromosomes and genomic rearrangements in animal hybrid complexes of species with small genome size using genomic *in situ* hybridization (GISH) [J]. *Comparative Cytogenetics*, 2012, 6(3): 287-300.
- [26] MARMUR J, DOTY P. Thermal renaturation of deoxyribonucleic acids [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1961, 3(5): 585-594.
- [27] BRAHIC M, HAASE A T. Detection of viral sequences of low reiteration frequency by *in situ* hybridization [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1978, 75(12): 6125-6129.
- [28] MCCONAUGHY B L, LAIRD C D, MCCARTHY B J. Nucleic acid reassociation in formamide [J]. *Biochemistry*, 1969, 8(8): 3289-3295.
- [29] SADHU C, DUTTA S, GOPINATHAN K P. Influence of formamide on the thermal stability of DNA [J]. *Journal of Biosciences*, 1984, 6(6): 817-821.
- [30] BARRANGER A, BENABDELMOUNA A, DEGREMONT L, et al. Parental exposure to environmental concentrations of diuron leads to aneuploidy in embryos of the Pacific oyster, as evidenced by fluorescent *in situ* hybridization [J]. *Aquatic Toxicology*, 2015, 159: 36-43.
- [31] BLAKE R D, DELCOURT S G. Thermodynamic effects of formamide on DNA stability [J]. *Nucleic Acids Research*, 1996, 24(11): 2095-2103.
- [32] BLAKE R D, DELCOURT S G. Thermal stability of DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26(14): 3323-3332.
- [33] HRABOVSKY E, PETERSEN S L. Increased concentrations of radioisotopically-labeled complementary ribonucleic acid probe, dextran sulfate, and dithiothreitol in the hybridization buffer can improve results of *in situ* hybridization histochemistry [J]. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2002, 50(10): 1389-1400.
- [34] YANG Z, LI X, LIAO H, et al. Physical mapping of immune-related genes in Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*) using fluorescent *in situ* hybridization [J]. *Comparative Cytogenetics*, 2016, 10(4): 529-541.
- [35] FENG L, HU L, FU X, et al. An integrated genetic and cytogenetic map for Zhikong scallop, *Chlamys farreri*, based on microsatellite markers [J]. *PLOS ONE*, 2014, 9(7): e92567.
- [36] BOONANUNTANASARN S, BUNLIPATANON P, ICHIDA K, et al. Characterization of a vasa homolog in the brown-marbled grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) and its expression in gonad and germ cells during larval development [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2016, 42(6): 1621-1636.
- [37] AMASINO R M. Acceleration of nucleic acid hybridization rate by polyethylene glycol [J]. *Analytical Biochemistry*, 1986, 152(2): 304-307.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)