



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114058710 A

(43) 申请公布日 2022.02.18

(21) 申请号 202010750160.3

(22) 申请日 2020.07.30

(71) 申请人 中国科学院海洋研究所

地址 266071 山东省青岛市南海路7号

(72) 发明人 周莉 刘清华 李军

(74) 专利代理机构 沈阳科苑专利商标代理有限

公司 21002

代理人 李颖

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6888 (2018.01)

C12Q 1/686 (2018.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种鉴别海水鱼类生殖细胞种间移植生殖细胞嵌合体的方法

(57) 摘要

本发明涉及海水类生殖细胞鉴定,进一步的说鉴别供体生殖干细胞是否在受体内增殖的方法,具体的说是一种鉴别海水鱼类生殖细胞种间移植生殖细胞嵌合体(真伪)的方法。利用PCR技术,以待检测样品的基因为模板,通过引物分别扩增得到含生殖细胞基因特异区域的片段,分析比对获得PCR产物不同个体片段有无和大小,从而鉴定供体与受体生殖细胞嵌合体的真伪;所述引物对通过各类鱼种的生殖细胞内特异表达的基因的特异性片段进行设计。本发明方法可用于快速、准确的鉴定被移植到受体鱼的供体鱼的精原干细胞是否能够发育为成熟配子。该发明为海水鱼类种质资源的鉴定、保护以及新品种的培育提供了新方法。

1. 一种鉴别海水鱼类生殖细胞种间移植生殖细胞嵌合体的方法,其特征在于:利用PCR技术,以待检测样品的基因为模板,通过引物分别扩增得到含生殖细胞基因特异区域的片段,分析比对获得PCR产物不同个体片段有无和大小,从而鉴定供体与受体生殖细胞嵌合体的真伪;所述引物对通过各类鱼种的生殖细胞内特异表达的基因的特异性片段进行设计。

2. 按权利要求1所述的鉴别海水鱼类生殖细胞种间移植生殖细胞嵌合体的方法,其特征在于:所述生殖细胞的特异性片段为鱼类vasa基因3'UTR特异区域。

3. 按权利要求1或2所述的鉴别海水鱼类生殖细胞种间移植生殖细胞嵌合体的方法,其特征在于:所述引物为根据不同鱼种的vasa3'UTR区域的碱基序列约100-700bp设计获得至少一对引物对。

4. 按权利要求1或2所述的鉴别海水鱼类生殖细胞种间移植生殖细胞嵌合体的方法,其特征在于:所述待检测样品中含受体、供体、疑似生殖细胞嵌合体中的至少一种。

5. 按权利要求1或4所述的鉴别海水鱼类生殖细胞种间移植生殖细胞嵌合体的方法,其特征在于:所述扩增产物中含有受体和供体的生殖细胞基因特异性片段即为嵌合体(外源基因(供体)植入至受体中);若产物中仅含有受体的生殖细胞基因特异性片段即为非嵌合体(外源基因(供体)没有植入至受体中)。

6. 按权利要求5所述的鉴别海水鱼类生殖细胞种间移植生殖细胞嵌合体的方法,其特征在于:所述对通过普通PCR或巢氏PCR扩增所得不同个体产物片段,即可分析比对获得PCR产物不同个体片段有无和大小,从而鉴定供体与受体生殖细胞嵌合体的真伪,其中,受体及非嵌合体扩增产物中不含供体生殖细胞特异区域的片段;而供体和嵌合体扩增产物中含供体生殖细胞特异区域的片段。

7. 按权利要求6所述的鉴别海水鱼类生殖细胞种间移植生殖细胞嵌合体的方法,其特征在于:以所述扩增后产物,即分别以所述供体、受体以及疑似嵌合体第一次的扩增产物为模板,根据供体vasa基因3'UTR特异区域设计的第二对引物,分别扩增得到含生殖细胞特异区域的片段,分析比对获得PCR产物不同个体片段有无和大小,从而鉴定供体与受体生殖细胞嵌合体的真伪。

8. 按权利要求1-7任意一项所述的鉴别海水鱼类生殖细胞种间移植生殖细胞嵌合体的方法,其特征在于:所述PCR体系,模板量100-200ng;PCR扩增程序:98℃,30s;35cycles(98℃,5-10s;50-72℃,10-30s;72℃,30s);72℃,2min。

9. 一种权利要求1所述方法的应用,其特征在于:按照权利要求1所述方法可用于鉴定外源移植的生殖细胞是否在受体内发育成成熟的生殖细胞,应用于生殖细胞嵌合体的鉴定。

## 一种鉴别海水鱼类生殖细胞种间移植生殖细胞嵌合体的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及海水类生殖细胞鉴定,进一步的说鉴别供体生殖干细胞是否在受体内增殖的方法,具体的说是一种鉴别海水鱼类生殖细胞种间移植生殖细胞嵌合体(真伪)的方法。

### 背景技术

[0002] 鱼类精巢中精原干细胞属于生殖干细胞,既可自我更新、增殖,又具有分化的全能型,可以分化形成各阶段的生殖细胞直至成熟配子。生殖干细胞移植已在一些鱼类获得成功,可以使受体产生供体的功能性配子。因此建立了鱼类生殖干细胞移植的方法对于海洋种质资源的保存、保护以及海水养殖鱼类的可持续发展具有重要意义。但是对于异种移植,移植后干细胞是否真正在受体中增殖、分化发育成熟以及如何检测和鉴定外源的生殖细胞,是建立该技术极为重要的环节。因此本发明将建立一个鉴定鱼类生殖干细胞移植嵌合体真伪的快速、高效的方法。

### 发明内容

[0003] 本发明目的在于提供一种鉴别海水鱼类生殖细胞种间移植生殖细胞嵌合体的方法。

[0004] 为实现上述目的,本发明采用技术方案为:

[0005] 一种鉴别海水鱼类生殖细胞种间移植生殖细胞嵌合体的方法,利用PCR技术,以待检测样品的基因为模板,通过引物分别扩增得到含生殖细胞基因特异区域的片段,分析比对获得PCR产物不同个体片段有无和大小,从而鉴定供体与受体生殖细胞嵌合体的真伪;所述引物对为通过各类鱼的生殖细胞内特异表达的基因的特异性片段进行设计。

[0006] 所述生殖细胞的特异性片段为鱼类 $vasa$ 基因3'UTR特异区域。

[0007] 所述引物为根据不同鱼种的 $vasa$  3'UTR区域的碱基序列约100-700bp设计获得至少一对引物对。

[0008] 引物设计在同源性较低的 $vasa$  3'UTR区域,引物序列具有种特异性,与其它种结合概率几乎为零,不能有连续5个以上碱基与2个种都有结合,尤其是引物3'端尽量避开有连续碱基与2个种都有结合,本申请可作为通用方法,并且由实施例可见不同鱼类之间 $vasa$  3'UTR区域存在不同,依据此设计引物。

[0009] 所述待检测样品中含受体、供体、疑似生殖细胞嵌合体中的至少一种。

[0010] 所述扩增产物中含有受体和供体的生殖细胞基因特异性片段即为嵌合体(外源基因(供体)植入至受体中);若产物中仅含有受体的生殖细胞基因特异性片段即为非嵌合体(外源基因(供体)没有植入至受体中)。

[0011] 所述对通过普通PCR或巢氏PCR扩增所得不同个体产物片段,即可分析比对获得PCR产物不同个体片段有无和大小,从而鉴定供体与受体生殖细胞嵌合体的真伪,其中,受体及非嵌合体扩增产物中不含供体生殖细胞基因特异区域的片段;而供体和嵌合体扩增产

物中含供体生殖细胞基因特异区域的片段。

[0012] 如果第一次扩增后,供体的第一对引物在疑似嵌合体中扩增的片段不明显,需进行一次巢式扩增,以所述扩增后产物,即分别以所述供体、受体以及疑似嵌合体第一次的扩增产物为模板,根据供体 $vasa$ 基因3'UTR特异区域设计的第二对引物,分别扩增得到含生殖细胞基因特异区域的片段,进一步提高PCR扩增产物浓度,分析比对获得PCR产物不同个体片段有无和大小,从而鉴定供体与受体生殖细胞嵌合体的真伪。

[0013] 所述PCR体系,模板量100-200ng,;PCR扩增程序:98°C,30s;35cycles (98°C,5-10s;50-72°C,10-30s;72°C,30s);72°C,2min

[0014] 一种所述方法的应用,按照所述方法可用于鉴定外源移植的生殖细胞是否在受体发育成成熟的生殖细胞,应用于生殖细胞嵌合体的鉴定。

[0015] 本发明所具有的优点:

[0016] 本发明鉴定不同鱼种生殖细胞的方法,该方法可用于快速、准确的鉴定被移植到受体鱼的供体鱼的精原干细胞是否能够发育为成熟配子;其为海水鱼类种质资源的鉴定、保护以及新品种的培育提供了新方法;具体为:

[0017] 1.本发明方法以性腺组织或配子DNA为模板可直接检测发育成熟的生殖细胞是否来源于供体;

[0018] 2.本发明利用生殖细胞特异的标记基因( $vasa$ ),作为鉴定的基础,并根据 $vasa$ 基因3'UTR的碱基序列区域内特殊性设计特异性引物,进而可进一步用于检测鱼类生殖细胞,并且还可以用它直接检测精子的来源;

[0019] 3.本发明方法中利用设计的特异性引物特异扩增不同鱼种生殖细胞 $vasa$ 基因的3'UTR特异片段,进而即可特异检测待检测样品中外源生殖细胞(嵌合体)的是否移植成功并发育成熟,进而可直接检测受体鱼的生殖细胞中是否有供体的生殖细胞,及嵌合体的真伪;采用本发明方法可高效、迅速鉴定出是否为嵌合体,为海水鱼类种质资源的鉴定、保护以及新品种的培育提供了新方法。

## 附图说明

[0020] 图1A为本发明实施例提的以受体牙鲆(受体) $vasa$  3'UTR区域设计引物扩增的电泳图。

[0021] 图1B为本发明实施例提的以供体大菱鲆(供体) $vasa$  3'UTR区域设计引物扩增的电泳图。

[0022] 上述图中,M:DNA marker,Sm+:大菱鲆,Po+:牙鲆,1-5:5尾疑似牙鲆与大菱鲆嵌合体,NC为水。

## 具体实施方式

[0023] 以下结合实例对本发明的具体实施方式做进一步说明,应当指出的是,此处所描述的具体实施方式只是为了说明和解释本发明,并不局限于本发明。

[0024] 实施例1

[0025] 鉴定大菱鲆生殖细胞移植入牙鲆获得的生殖细胞嵌合体:

[0026] 1) 特异性引物的获得:比对大菱鲆和牙鲆的 $vasa$  3'UTR碱基序列差异,选择差异

明显碱基序列差异大于30%的区域,依据此分别设计扩增 $vasa$  3'UTR的各自上下游引物,引物对参见表1;

[0027] 具体为:引物设计在同源性较低的 $vasa$  3'UTR区域,引物序列在供体(大菱鲂)和受体(牙鲆)具有特异性,引物序列不能有连续5个以上碱基能分别分别与供体(大菱鲂)和受体(牙鲆) $vasa$  3'UTR有结合,尤其是引物3'端尽量避免有连续碱基与供体(大菱鲂)和受体(牙鲆) $vasa$  3'UTR区域都有结合,详细见表1。

[0028] 2) 采集大菱鲂、牙鲆、5尾疑似牙鲆与大菱鲂嵌合体的精液,分别提取DNA作为模板。以上述牙鲆(受体) $vasa$  3'UTR区域设计引物,分别以上述提取获得精液DNA为模板,Q5聚合酶,进行PCR扩增(参见表1), $T_m$  61°C,扩增可获得长度为567bp的片段,而以相同的引物在大菱鲂上不可扩增出片段。以5尾疑似牙鲆与大菱鲂嵌合体精液为模板时,除了大菱鲂以外,都可获得567bp的片段;结果说明精液中除了大菱鲂个体都含有牙鲆精子(参见图1A);

[0029] 3)

[0030] ①分别以步骤2)获得大菱鲂、牙鲆、5尾疑似牙鲆与大菱鲂嵌合体精液的DNA为模板,并利用步骤1)根据大菱鲂 $vasa$ (供体)基因3'UTR设计的引物中的第1对引物进行(参见表1)扩增,0.5ul大菱鲂精液DNA(100-200ng)为模板,用第一对引物进行扩增30s, $T_m$  52°C,扩增获得片段大小为436bp,但是在5尾疑似牙鲆嵌合体,有2尾鱼条带亮度较弱。而以牙鲆精液DNA为模板无扩增产物;

[0031] ②分别利用上述步骤①中大菱鲂、牙鲆、5尾疑似牙鲆与大菱鲂嵌合体的第1次扩增产物为模板(100-200ng),以大菱鲂第2对引物扩增(常规PCR体系)在大菱鲂扩增获得片段长度149bp;在3号,5号疑似个体中获得同样大小的片段。结果说明3号,5号个体的精液含有大菱鲂精子(参见图1B);

[0032] 由上述步骤3)可精确的5尾疑似鉴定嵌合体的真伪;其中,该步骤采用两次扩增,第二次扩增为巢式扩增,由于第一次扩增时因为疑似的5尾嵌合体中含有的外源生殖细胞即大菱鲂的生殖细胞比较少甚至没有,所以第一次扩增出来的结果会很弱或者没有,因此再以第一次扩增的产物位模板,以设计的第二对引物进行扩增,这样就可以扩增出更多的产物,条带更清晰。若第一次扩增后结果就很明显,就不需要第二次扩增。

[0033] 由上述图1A和图1B可见利用供体 $vasa$ 基因3'UTR设计的引物进行扩增可以快速准确的鉴定出疑似的5尾嵌合体牙鲆的精液中是否有大菱鲂的精子,进而可以看出3号,5号个体的精液既含有牙鲆大的精子又含有大菱鲂的精子,表明外源移植的大菱鲂精原干细胞在牙鲆体内发育成熟。

[0034] 表1牙鲆与大菱鲂PCR引物序列以及相应的PCR退火温度和延伸时间

	上游引物	下游引物	退火温度	延伸时间
牙鲆 (受体)	TCAATGCCCCAGTAGTA	GTCTTTGCTTGGAACACA	61°C	30s
[0035] 大菱鲂 (供体)	第1对: AGTTGGCTCAGTCCTTGG	GCTTGGAACACATTTATT	52°C	30s
	第2对: ACACCTCGTTGTAGTTTT	GAAGAAGTCAAGAGATT A	52°C	15s

[0036] 注:PCR扩增基本程序:98℃,30s;35cycles(98℃,5-10s;50-72℃,30s);72℃ 2min。

[0037] 实施例2

[0038] 鉴定夏鲮生殖细胞移植入牙鲮获得的生殖细胞嵌合体:

[0039] 1) 特异性引物的获得:比对夏鲮和牙鲮的vasa 3'UTR碱基序列差异,选择差异明显碱基区域,在此例中夏鲮在110bp左右缺失了11个碱基,由此设计引物(参见表2);

[0040] 2) 采集夏鲮、牙鲮、5尾疑似牙鲮与夏鲮嵌合体的性腺组织,分别提取DNA,待用。

[0041] 3) 以上述步骤2) 所获得的DNA分别作为模板,以夏鲮vasa3'UTR区域(夏鲮缺失11bp)(供体)设计引物(参见表2),或以牙鲮vasa 3'UTR区域(受体)设计引物(参见表2),分别进行PCR扩增,常规PCR体系,DNA模板(200ng);可分别获得长度为231bp牙鲮片段、106bp的夏鲮片段,且引物特异性良好,同时,牙鲮引物对夏鲮没有扩增,反之夏鲮引物亦如此。并且以上述引物(参见表2)对5尾疑似嵌合体在相同条件下进行扩增,5条嵌合体均监测出231bp的牙鲮片段,其中有4条检测出106bp的夏鲮片段,并进行测序进一步确定。

[0042] 可见检测结果说明性腺组织中均含有牙鲮生殖细胞DNA,其中4尾还含有供体夏鲮生殖细胞DNA,因此4尾鱼性腺生殖细胞为牙鲮与夏鲮的嵌合体。

[0043] 表2牙鲮与夏鲮PCR引物序列以及相应的PCR退火温度和延伸时间

	上游引物	下游引物	退火温度	延伸时间
[0044] 夏鲮(供体)	CAATGGAAAACAGTGAGA	ATAAAACACAACAAAAAC	50℃	30s
牙鲮(受体)	GCTGCTCTTATTTGCTGT	ATTTATTGTTCTCTCTTC	50℃	30s

[0045] 注:PCR扩增基本程序:98℃,30s;35cycles(98℃,5-10s;50-72℃,30s);72℃ 2min。

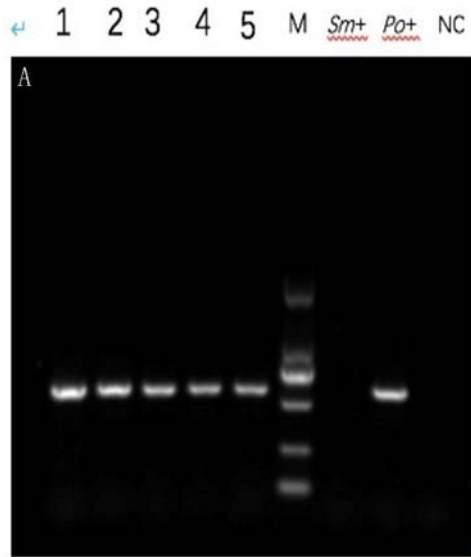


图1A

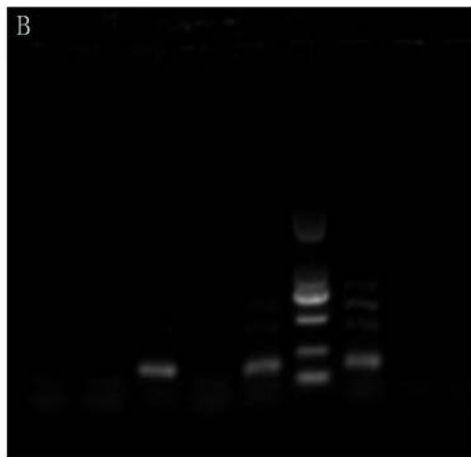


图1B