

文章编号: 100F 1498(2002) 06 0746 05

杉木单染色体的显微分离及体外扩增

李湘阳, 周 坚

(南京林业大学森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037)

关键词: 杉木; 显微分离; PCR 扩增; 单染色体

中图分类号: S791.27

文献标识码: A

染色体微分离及体外扩增是传统细胞生物学和现代分子生物学相结合而发展起来的一项新技术。自 1981 年 Scalenghe 等^[1]首次在果蝇唾腺染色体上取得成功后, 该技术很快在人及动物分子遗传学研究中得到广泛应用, 并取得很多重要的结果。在植物研究中该技术发展相对缓慢。目前, 已应用染色体显微切割和克隆的植物有甜菜(*Beta patellaris*)^[2]、大麦(*Hordeum vulgare* L.)^[3]、小麦(*T. Aestivum* L.)^[4]、黑麦(*Secale cereal* L.)^[5]、蚕豆(*Vicia faba* L.)^[6]、大豆(*Glycine max* L.)^[7]、玉米(*Zea mays* L.)^[8]、水稻(*O. sativa* L.)^[9]、王百合(*Lilium regale* Wilson)^[10]等。在木本植物中, 尚未见到类似的报道。该技术可以建立特定染色体或染色体特定片段的 DNA 文库, 可为 RFLP 图谱提供大量的有效标记, 为分子标记辅助育种、图谱为基础的基因分离乃至染色体遗传图及精细物理图谱构建提供条件。由于林木周期长、杂和度高等原因, 林木遗传图谱构建面临着不少困难。如果从单染色体或染色体片段入手, 将会大大提高工作效率。因此, 在林木中开展染色体微分离及微克隆研究有重要意义。

DOP-PCR 方法是对染色体进行 DNA 克隆的一种快速、高效的方法。此方法由 Telenius 于 1992 年首创, 并成功扩增了微分离所得到的人染色体特异 DNA^[11]。由于该方法无需进行染色体 DNA 限制性酶切及连接接头等步骤, 简捷、方便而有效, 因此得以迅速推广。已有许多学者在人、动物和农作物上采用 DOP-PCR 方法对微分离的染色体进行体外扩增成功。目前在林木上还未曾有人做过尝试。林木细胞分子遗传研究基础薄弱, 而利用 DOP-PCR 方法进行基因克隆能给林木的基础性研究提供一种新的分子研究手段。杉木(*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook.) 具有多种变异类型, 杉木的核型及带型研究在国内早有报道。带型研究主要包括 C 带^[12, 13]、G 带^[14, 15]、N 带^[16]。杉木的分子水平研究相对滞后, 本实验以杉木为材料, 对木本植物染色体微分离与 PCR 体外扩增条件进行了研究, 建立了一套从杉木染色体标本制备到单染色体微分离和 PCR 扩增方法, 为杉木的分子生物学研究提供了一个重要的研究手段。

1 材料和方法

1.1 实验材料

杉木种子由南京林业大学遗传组提供, PCR 试剂购自南京生工生物工程公司。引物设计

收稿日期: 2001-09-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目“杉木染色体的微切割及体外扩增”(批准号 39970626)

作者简介: 李湘阳(1970), 女, 湖南宁远县人, 在读博士。

参照 Telenius 等^[11] 报道序列, 由上海生工生物工程公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 杉木染色体标本制备 杉木种子浸泡 24 h, 用 0.05% 高锰酸钾消毒后于珍珠岩中在 25 °C 催芽。定期用蒸馏水浇灌保持湿润, 待根长至 2 cm 时(约两星期), 用 0.1% 的秋水仙素非离子体处理 12 h, 然后切下根尖用卡诺固定液固定 30 min, 转入 70% 乙醇中, 4 °C 保存待用。制备染色体标本时, 取根尖于 1.5% 纤维素酶与 3% 果胶酶混合液中 37 °C 处理 30 min, 卡宝品红染色, 常规压片, 液氮冰冻去盖片, 稍气干后, 立即用于微分离。

1.2.2 染色体显微分离 在显微镜下找到染色体分散较好的视野, 加滴无菌水, 用制备的 3 μm 左右的微细玻璃管借助于显微操作仪吸取目的染色体, 为防止非目标物质的吸入, 应将玻璃管口边缘放在目标染色体的边缘, 轻轻转动显微操作仪上控制机械臂的注射器, 待染色体一进入玻璃管, 立即升高玻璃管离开载玻片, 迅速将吸入玻璃管中的染色体连同玻璃管一同折断于 0.2 mL Eppendorf 管中。也可用制好的 1 μm 左右的玻璃针挑取或切割目的染色体, 然后将粘在玻璃棒上的染色体及针尖一同折断于 0.2 mL Eppendorf 管中。把装有染色体的 Eppendorf 管高速离心数秒, -20 °C 保存待用。

1.2.3 染色体 DNA 的 PCR 扩增 将装有杉木染色体的微量离心管加入 2 μL 蛋白酶 K (0.5 mg·mL⁻¹)、18 μL 水, 37 °C 保温 1 h 后, 于 90 °C 下 10 min, 然后进行 PCR 扩增。采用引物为一可随机扩增的简并引物(5'-CCG ACT CGA GNNNNNN ATG TGG 3')。PCR 条件基本根据 Vega 等^[17] 略有改动。向含 DNA 水溶液中加入引物 15 μmol·L⁻¹ 5 μL, 4 种 dNTP 各 2 mmol·L⁻¹ 5 μL, MgCl₂ 20 mmol·L⁻¹ 5 μL, 10×Taq buffer 5 μL, Taq 酶 2.5 u, 无菌水补至 50 μL, 矿物油封盖; 先在 90 °C 下 5 min, 随之进行 5 个低退火温度循环: 94 °C 1 min, 30 °C 1.5 min, 30 ~ 72 °C 缓慢升温(1 °C/min), 72 °C 3 min; 然后在下列条件下进行 30 个高退火温度循环的扩增: 94 °C 1 min, 62 °C 1 min, 72 °C 2.5 min; 72 °C 下延伸 10 min。对照中除不加染色体外, 其余成分及反应过程均相同。

1.2.4 琼脂糖凝胶电泳 取 PCR 产物 5 μL 于 1.7% 琼脂糖凝胶电泳, 在天能 UV-2000 系列紫外分析仪 300 nm 紫外灯下观察并照相。

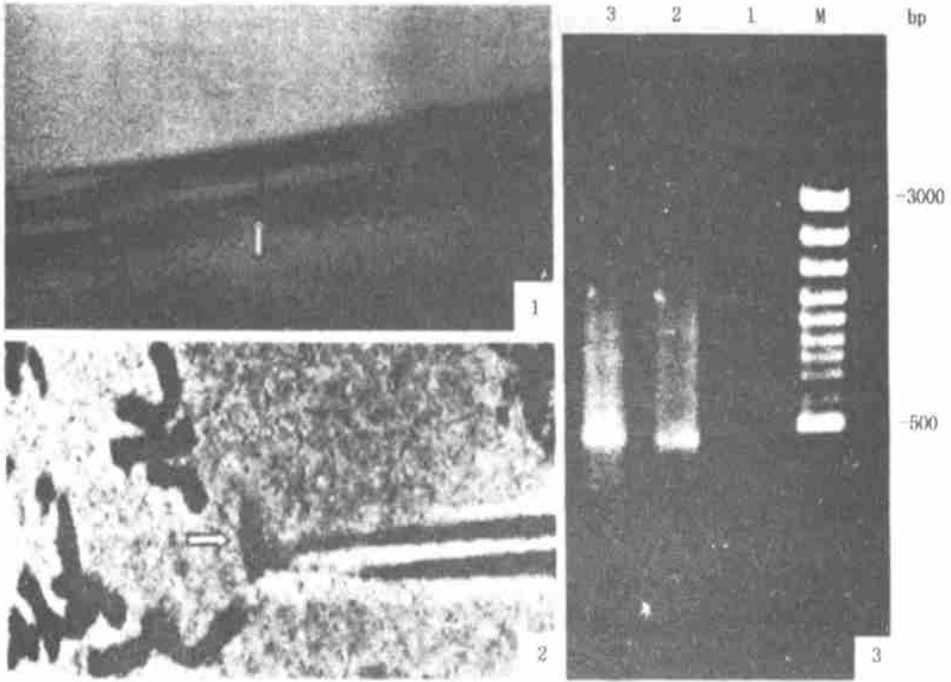
2 结果和讨论

2.1 单染色体的显微分离

染色体的整个分离过程都是在显微操作仪上进行的, 在杉木单染色体的显微分离过程中, 在玻璃针尖上可明显看到已粘附其上的单条染色体(图版 I-2)。也可在微细玻璃管中看见吸入的染色体(图版 I-1)。

染色体标本的制备、玻璃针和微细玻璃管的制作是染色体分离成功与否的重要因素。因此, 在制备染色体标本时, 力求染色体分散好, 收缩程度适中, 染色清晰。在制作玻璃针时, 通过适当调整拉针仪的电流强度制作出适合挑取或切割染色体所需的细而短的针尖。在制备微细玻璃管时, 则采用先用拉针仪拉成针状, 再用毛细管切割仪根据所需管口径大小进行切割, 最后用磨针仪将管口磨成一定角度。就操作而言, 用微细玻璃管吸取染色体相对较容易, 但不能对染色体进行切割, 且在操作时容易把非目标物质也吸入玻璃管中。用微细玻璃针挑取染色体方法的操作难度相对较大, 往往需要训练一段时间才能熟练进行, 但此方法不但可以挑取

整条染色体,还可以对染色体进行切割,并且也不容易被其它非目标物质污染。在染色体分离的整个过程中,无论是用微细玻璃管吸取染色体,还是用玻璃针挑取染色体都要求在尽可能短的时间内完成,否则就容易被非目标物质所污染。



图版 I 杉木单染色体显微分离及体外扩增产物

1. 玻璃管吸取一条染色体($\times 400$); 2. 玻璃针挑取一条染色体($\times 400$); 3. 杉木单染色体 PCR 扩增产物。

2.2 单染色体的体外扩增

图3(图版 I-3)是将显微分离所得两条杉木单染色体分别经 DOP-PCR 扩增后,用 1.7% 琼脂糖凝胶电泳检测的结果(泳道 2、3)。从图中可以看出扩增产物的分子量在 500 bp 处信号最强,有一明显的扩增带,而相应的阴性对照没有任何信号(泳道 1),证明扩增产物是可靠的(图版 I-3)。说明经 PCR 扩增后,来自单染色体的某一片段 DNA 含量已大大增加,可以进行电泳检测。

植物材料的固定一般都采用卡诺固定液,已有研究资料证明^[18],固定液中酸可诱导 DNA 脱嘌呤,从而导致克隆的 DNA 每 100 bp 即有一个碱基缺失。因此,有的研究者提出用 70% 或 95% 的乙醇代替卡诺固定液。杉木的染色体直接用乙醇固定很难获得分散良好的染色体。本实验采用卡诺固定液,将固定时间尽可能缩短。试验证明固定 30 min,仍可扩增出染色体 DNA。发现长时间酶解会对 DNA 造成损伤,因而尽可能缩短酶解时间。同时在染色体显微分离和扩增过程中,应尽量减少中间环节及避免污染。吸入染色体的玻璃管或粘有染色体显微切割针尖应直接折断于用于扩增的 Eppendorf 中,以避免染色体丢失。操作过程应尽可能在超净工作台上进行。这些对保证 PCR 扩增的准确性是至关重要的。

本实验所用底物仅为一条显微分离的染色体,且只经初次 PCR 扩增就可获得较强的扩增

信号, 这将大大减少显微分离的工作量。到目前为止, 在用单染色体进行体外扩增的报道中都需要在初次扩增的基础上, 采用初次扩增中的高退火温度循环进行次级或三级 PCR 扩增才能获得较强的信号^[7, 8, 10]。不过本次实验的扩增产物虽然在接近 500 bp 处有一明显扩增带, 但在其上下均有明显的杂带存在。如要进一步研究该片段, 可能仍需要再次扩增。

在杉木的早期细胞学研究中, 无论是核型研究还是带型研究, 不同研究者的研究结果都存在差异, 可能是处理方法及参照的分类标准不一致所致。由于杉木分布环境条件的多样性和长期人工栽培使杉木种源的遗传变异变得复杂。细胞学方法只能从染色体水平上提示它们的遗传变异规律, 而分子遗传学却能从分子水平上揭示其变异的实质。因此, 展开杉木分子水平研究势在必行。目前, RAPD 技术在杉木遗传变异研究和构建连锁图谱以及杉木基因组文库方面得到广泛应用。然而利用 RAPD 标记构建的遗传连锁群并未定位于对应的染色体, 遗传图谱的饱和度也较低。随着染色体显微切割技术的发展, 利用显微操作仪分离杉木单染色体或染色体片段, 进行 PCR 扩增, 构建杉木单染色体 DNA 文库, 可在单染色体特异文库中筛选出特异性分子标记, 以填补遗传连锁图的空白区, 加大特异染色体或染色体特定区段的分子标记密度。同时, 由于染色体片段特异性 DNA 文库的克隆效率高、针对性强, 对辅助基因组的物理作图也极为有利。因此, 进行杉木单染色体的分离和克隆将为杉木分子标记的染色体定位研究和林木基因组研究提供新的研究策略和技术手段。

自从 Sandery 等^[19]首次将染色体微切割、微分离与微克隆技术用于植物染色体以来, 已在多种植物中展开了这项工作。但研究者主要的注意力还是在一些重要的农作物上, 如水稻、小麦、大豆、玉米等, 目前国内尚未见在林木中展开这项工作的报道。在杉木遗传图谱构建中使用染色体和染色体片段的分离和扩增技术, 可使得作图工作集中在与杉木经济性状(如生长、分枝或材性)有关的重要染色体或染色体片段上, 在短期内用较少的代价获得局部的、较高精度的遗传图。本实验已成功显微分离杉木单条染色体并完成体外扩增工作, 将对杉木分子育种研究工作有重要推动作用。

参考文献:

- [1] Scalenghe F, Turco E, Edstrom J E, et al. Microdissection and cloning of DNA from a specific of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes [J]. *Chromosome*, 1981, 82: 205-216
- [2] Jung C, Claussen U, Horsthemk B, et al. A DNA library from an individual *Beta patellaris* chromosome conferring nematode resistance obtained by microdissection of metaphase chromosomes [J]. *Plant Mol Biol*, 1992, 20: 503-511
- [3] Schondelmaier R M, Jahoor A, Houben A, et al. Microdissection and microcloning of the barley (*Hordeum vulgare* L.) chromosome HIS [J]. *Theor Appl Genet*, 1993, 86: 629-636
- [4] 刘宝, 戎均康, 董英山, 等. 普通小麦 7B 染色体的显微分离和低拷贝专化 DNA 序列的克隆 [J]. *科学通报*, 1999, 44: 389-393
- [5] 郭歌, 陈成彬, 李秀兰, 等. 黑麦 B 染色体末端粒相关序列的克隆 [J]. *植物学报*, 1998, 40(12): 1123-1128
- [6] 宋文芹, 崔香芹, 许文胜, 等. 蚕豆大 M 染色体长臂端部的显微切割与 PCR 扩增 [J]. *科学通报*, 1996, 41(4): 361-363
- [7] 周奕华, 党本元, 胡赞民, 等. 大豆单染色体的显微分离及体外扩增 [J]. *植物学报*, 1998, 40(2): 144-150
- [8] 胡赞民, 党本元, 周奕华, 等. 玉米单染色体分离和体外扩增 [J]. *遗传学报*, 1998, 25(6): 545-550
- [9] 程祝宽, 颜辉煌, 党本元, 等. 水稻第 5 染色体短臂端四体在染色体臂微分离中的应用 [J]. *科学通报*, 1998, 43(3): 272-276
- [10] 党本元, 胡赞民, 周奕华, 等. 王百合单染色体 DNA 文库的构建 [J]. *科学通报*, 1998, 43(2): 194-199

- [11] Telenius H, Cartar N P, Bebb C E, et al. Degenerate oligonucleotide primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer [J]. *Genomics*, 1992, 13: 718-725
- [12] 董本群, 郝忠颖. 裸子植物染色体 Giemsa C-带技术的研究[J]. *林业科学*, 1986, 22(2): 116-122
- [13] 湖北杉木种源染色体研究协作组. 杉木不同地理种源染色体组型和带型的研究[J]. *江西林业科技*, 1994, (3-4): 413-424
- [14] 夏晓敏, 廖舫林. 杉木染色体 HSAG 分带法的研究[J]. *林业科学*, 1986, 22(2): 169-171
- [15] 李占林, 宋运淳, 刘立德. 杉木染色体 G-带的研究[J]. *林业科学*, 1990, 26(5): 452-456
- [16] 李占林, 宋运淳, 刘立华. 八个杉木地理种源的 N-带型研究[J]. *中南林学院学报*, 1994, 14(1): 40-43
- [17] Vega J M, Abbo S, Feldman M, et al. Chromosome painting in plants: *In situ* hybridization with a DNA probe from a specific microdissected chromosome arm of common wheat [J]. *Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 12041-12045
- [18] Brown S D M, Greenfield A J. A model to describe the size distribution of mammalian genomic fragments recovered by microcloning [J]. *Gene*, 1987, 55: 327-333
- [19] Sandery M J, Forster J W, Macadam S R, et al. Isolation of a sequence common to A and B chromosomes of rye (*Secale cereale*) by microcloning [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1991, 9: 21-30

Microdissection and PCR Amplification of Single *Cunninghamia lanceolata* Chromosome

LI Xiang-yang, ZHOU Jian

(College of Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Jiangsu 210037, Nanjing, China)

Abstract: The single chromosome of *Cunninghamia lanceolata* was successfully dissected by “glass needles” under the micromanipulator in this research. The dissected *Cunninghamia lanceolata* chromosomes were digested by proteinase K in Eppendorf respectively. After degenerate oligonucleotide-primed-PCR amplification (DOP-PCR), DNA fragments were acquired. The suitable method of making chromosome specimens for the microdissection and PCR amplification has been discussed.

Key words: *Cunninghamia lanceolata*; microdissection; PCR amplification; single chromosome