

# 一种提高水稻 FISH 检出率的新方法—RFLP 混合标记

金危危<sup>1</sup>, 覃 瑞<sup>1</sup>, 余舜武<sup>2</sup>, 宋运淳<sup>1</sup>

(1. 武汉大学植物发育生物学教育部重点实验室 430072 ;

2. 华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室 430070)

**摘 要** :分别以水稻 1 号染色体上混合标记的 8 个紧密连锁的 RFLP(平均约 1.7 kb)和 5 号染色体的 BAC 克隆 44B4(137 kb),以及 12 号染色体单个 RFLP RG397(约 1.5 kb)为探针,在水稻染色体上进行了荧光原位杂交(FISH)。结果表明,RFLP 混合标记杂交的检出率为 27%,大大高于单个 RFLP 的检出率(7%)。其检出率虽然低于 BAC 克隆 44B4(60%),但它具有程序简单易行的特点,使基因原位定位更加高效。由于水稻中与已知功能基因紧密连锁的 RFLP 标记具有数量丰富、分布密集等优势,揭示了混合标记的 RFLP 在禾本科植物同线性和共线性分析中的广阔应用前景。此外,混合标记的 RFLP 还可以用于染色体的准确识别和核型分析。

**关键词** 荧光原位杂交(FISH) 检出率 RFLP BAC 混合标记

中图分类号 :Q343.1

文献标识码 :A

文章编号 :0253-977X(2001)03-0263-03

## A New Method to Improve Detection Rate of FISH in Rice—RFLP Mix-labeled

JIN Wei-wei<sup>1</sup>, QIN Rui<sup>1</sup>, YU Shun-wu<sup>2</sup>, SONG Yun-chun<sup>1</sup>

(1. Plant Developmental Biology Key Laboratory of the Ministry of Education, Wuhan University, Wuhan 430072 ;

2. National Key Laboratory of Crops Modification, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China)

**Abstract** :Using mix-labeled 8 RFLPs(average length is about 1.7 kb) as a probe, the authors carried out fluorescence in situ hybridization in rice, and detected the single RFLP RZ397(1.5 kb) and the BAC clone 44B4(137 kb) simultaneously. The detection rate of mix-labeled RFLP was 27%, much higher than single-labeled RFLP(7%), though lower than BAC clone(60%). Mix-labeled RFLP is an easy and effective method to locate genes for its simplicity and sufficiency of RFLPs linked with the functional genes. In addition, Mix-labeled RFLP groups can be used as effective markers in karyotype analysis of rice and the analysis of colinearity or synteny among cereals.

**Key words** :fluoresce in situ hybridization(FISH); detection rate; RFLP; BAC; mixed RFLP

水稻是世界上最重要的农作物之一。由于具有基因组小(0.45pg)的特点,不仅一直是植物分子遗传学和植物基因工程的主要研究对象,而且已成为植物基因组分析的模式植物<sup>1</sup>。自 1985 年把非放射性标记原位杂交引入植物研究以来,该技术被广泛应用于水稻基因组作图,并且技术本身也得到不断完善:从 DAB 检出到荧光检出;从单色 FISH 到多色 FISH;从中期染色体制片到减数分裂的粗线期染色体制

片,甚至是伸展 DNA 纤维制片。同时随着 CCD 系统及电脑软件的发展与运用,原位杂交技术的杂交灵敏性和分辨率也都得到了显著提高。

中期染色体 FISH 具有程序简单、制片容易、直观高效等优点,已成为目前最常见、应用最为广泛的方法。在过去,FISH 主要用于对植物 DNA 重复序列和多拷贝基因家族作图。有关单拷贝 FISH 的报道不多,这是因为单拷贝基因大

收稿日期 :2001-01-02;修改日期 :2001-03-28

基金项目 :国家自然科学基金(39900083)和教育部高等学校博士学科点专项科研基金(207980112)资助项目。

作者简介 :金危危(1971-),男,汉族,湖南人,博士生,从事植物分子细胞遗传学研究。

通讯作者 :宋运淳(1938-),男,汉族,湖南人,教授,博导,从事植物分子细胞遗传学研究。Tel:027-87684505。E-mail:ycsong@whu.edu.cn

致 谢 :感谢美国 Cornell 大学 Bald 博士和中国水稻所郑康乐研究员提供所试探针,及美国 Wisconsin-Madison 大学蒋继明教授给予的热情指导。

小常为 1 至几 kb,其探针与靶序列相遇的机会较小,杂交信号检出率较低。Gustafson 等以 0.7kb 的单拷贝 DNA 序列作探针,检出率只有 6% 左右,并且染色体上是单点检出<sup>[2-3]</sup>。在如此低的检出率条件下,如果没有大量的样本群体和仔细分析统计,很难区分信号点与背景杂点。另外,水稻的染色体非常小,分裂中期只有 1~2 $\mu$ m,染色体间形态相似,从难以区分<sup>[4]</sup>。所以在目前水稻染色体的显带研究相对滞后的情况下,不可能像其他植物那样通过 FISH 结合显带来提高其结果的有效性和可靠性。

随着水稻基因组研究和分子生物学的发展,数以千计的 RFLP 标记被遗传定位于水稻染色体上。水稻酵母人工染色体(YAC)和细菌人工染色体(BAC)文库也得以成功的构建。BAC 克隆通常为几十至几百 kb 的 DNA 片段,用它作探针从根本上解决了单拷贝基因物理定位检出率低的问题,而且还可大大提高水稻染色体核型分析的可靠性<sup>[5]</sup>。如果将其应用在多色原位杂交中,将更为方便有效。但是 BAC-FISH 的程序比较繁琐,首先要制备杂交封阻用的高质量的 Cot-1 DNA,其次,每个 BAC 克隆的长度和重复序列的含量不同,杂交时 Cot-1 DNA 的封阻比例也很难把握,太高,杂交困难,不能提高检出率,太低,封阻不足,将出现大量的假阳性信号,使杂交很难得出理想的实验结果。另外,与水稻重要的农艺及生物学性状基因紧密连锁的 BAC 克隆非常有限,这也限制了 BAC-FISH 在水稻物理定位中的广泛应用<sup>[6]</sup>。

我们在既充分利用丰富的 RFLP 资源,同时又结合国外最新发展起来的 BAC-FISH 的高检出率原理的基础上,首次采用紧密连锁的多个 RFLP 混合标记进行共杂交,同时进行了单个 RFLP 及 BAC 的 FISH 染色体杂交对比。

## 1 材料和方法

### 1.1 植物材料

供试材料为水稻(*Oryza sativa* L. subsp. indica)广陆矮 4 号。染色体制片参照 Song 等 1993 年的程序<sup>[7]</sup>略有修改。取生长旺盛的根尖,用新鲜固定液(甲醇:冰乙酸=3:1)4℃过夜,双蒸水(ddH<sub>2</sub>O)充分洗净,1%的纤维素酶和 1%的果胶酶(SERVA),28℃条件下酶解约 3h。水洗并固定后采用火焰干燥法制片。

### 1.2 原位杂交的 DNA 探针

探针分别用 RFLP 标记 RZ397;BAC 克隆 44B4;混合 RFLP(RZ739,RZ538,RZ92,RG109B,CDO251,CDO345,CDO215,RG227)。用切口平移法对供试 DNA 探针进行标记。15 $\mu$ l dNTP(dATP,dCTP,dGTP 等量混合),5 $\mu$ l 10 $\times$ 缓冲液,4 $\mu$ l 探针 DNA(约 1 $\mu$ g),5 $\mu$ l Bio-11-dUTP,5 $\mu$ l DNaseI/DNA polymerase I 混合酶液,加 ddH<sub>2</sub>O 至终体积 50 $\mu$ l,混匀后于 15℃下反应 1h,0.5mol/L Na<sub>2</sub>EDTA 终止液终止。Sephacrose CL-6B(Sigma)凝胶柱离心纯化,点印迹检测标记效果。

### 1.3 原位杂交及荧光检出(FISH)

原位杂交及信号检出参照 Song 等(1995)的程序<sup>[8]</sup>的方法,并加以适当修改。每张染色体制片所用的杂交混合液(42 $\mu$ l)含约 1.0 $\mu$ l 标记的 DNA 片段(0.2 $\mu$ g/ $\mu$ l),50% 去离子甲酰胺(Sigma),10% 硫酸葡聚糖(Sigma)A,2 $\mu$ g ssDNA,2 $\times$  SSC。对 BAC 克隆,在每片所用杂交液中加入 4 $\mu$ g Cot-1 DNA(100~400 bp),Cot-1 制备参见鄢慧民等的程序<sup>[9]</sup>。杂交混合液在沸水中煮 10min 后,迅速置于冰上放置 10min 以上。杂交在 37℃下进行,约 16~24h。荧光检出程序(1)杂交后的片子依次在 42℃下于 20% 的甲酰胺、2 $\times$  SSC 溶液、0.1 $\times$  SSC 溶液中各漂洗 15 min,0.1% TritonX-100 室温下处理 5 min;PBS 室温下处理 2 $\times$  5min。之后每张加 30 $\mu$ l(10ng/ $\mu$ l) FITC-羊抗生物素抗体耦联物(Sigma),37℃于保湿皿中温育 30min 后,室温下 PBS 溶液洗 3 $\times$  5min(2)每张制片加 30 $\mu$ l(11ng/ $\mu$ l)兔抗羊生物素抗体耦联物(Sigma),37℃于保湿皿中温育 30min 后,室温下 PBS 溶液洗 3 $\times$  5min(3)重复步骤(1)(4)PBS 洗 3 $\times$  5min 后,每张制片加 40 $\mu$ l(10 $\mu$ g/ml)PI(propidium iodide)复染。制片在 Olympus BX60 荧光显微镜下观察。

## 2 实验结果

BAC 克隆 44B4,RFLP 标记 RZ397 和混合 RFLP(RZ739,RZ538,RZ92,RG109B,CDO251,CDO345,CDO215,RG227)作探针针对水稻的原位杂交结果见表 1 和图 1。

BAC 克隆 44B4 和 RFLP RZ397 分别在 5 号和 12 号染色体检出了信号(图 1 B 和 C),信号距着丝粒百分距离分别为 1.80 $\pm$ 0.5 和 35.45 $\pm$ 1.85,信号检出率分别为 60% 和 7%,而且 44B4 的 FISH 中姐妹染色单体及同源染色体同时

表 1 三种探针对水稻的杂交结果

Table 1 The detected results of FISH of three kinds of probes on rice

探针 probe	观察的细胞数 the number of the cells detected	检出率 % Detection rate %	臂比 Arm ratio	信号距着丝粒 百分距离 Percent distances %	检出信号的 染色体臂 The arms detected signals
44B4	82	60	1.73 $\pm$ 0.07	1.80 $\pm$ 0.50	S
RZ397	88	7	1.07 $\pm$ 0.04	35.45 $\pm$ 1.85	L
MIX	82	27	1.24 $\pm$ 0.05	46.55 $\pm$ 2.80	L

L:长臂 S:短臂。

检出了信号(三点),而 RZ397 只检出单点。混合标记探针在第 1 号染色体检出了信号(图 1A),其信号距着丝粒百分距离为  $46.55 \pm 2.80$ , 检出率为 27% (双点),大大高于 RZ397,

但低于 44B4。由于混合标记探针在遗传图中覆盖约 1~2cM 的范围,所以有的检出的信号点较大,见图 1A。

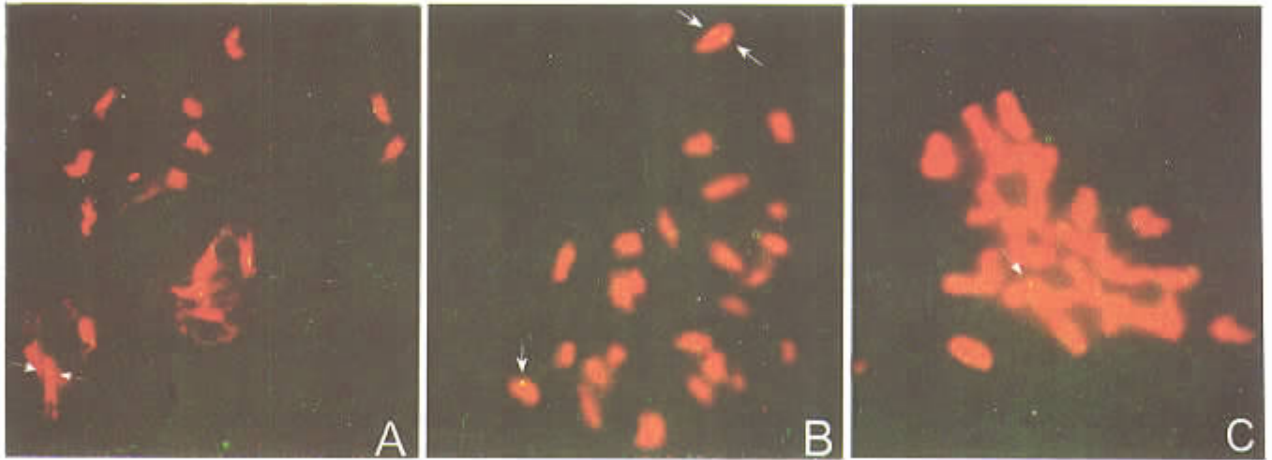


图 1 FISH 杂交结果

A. 以 RFLP 混合标记为探针。B. 以 BAC 克隆 44B4 为探针。C. 以 RZ397 为探针。

Fig. 1 Results of FISH in rice

A. Mixed RFLP as probe. B. 44B4 as probe. C. RZ397 as probe.

### 3 讨论

与单个 RFLP 比较,混合标记能大大提高杂交信号的检出率。这样,在水稻 FISH 中,混合的 RFLP 可作为一种有效的界标。一方面,选取水稻遗传图上紧密连锁的一组 RFLP (1~2cM 以内) FISH 的杂交信号显示是其所在连锁群号。例如,选用第 1 连锁群(染色体)的分子标记(RFLP 混合)进行水稻的 FISH 定位,检出信号的染色体即可认定为 1 号染色体。另一方面,RFLP 在水稻染色体的具体位置是固定的,所以根据遗传图选用的某一染色体不同区域的多组 RFLP 群,就可以它们作为该染色体分区的界标,即相当于人为进行染色体“显带”。这样,可有效地解决由于水稻染色体小,染色体间差异形态不大,而且不同分裂时期同一染色体差异明显而难以进行核型分析的问题。特别是在多色 FISH 中,RFLP 群作为特定界标将发挥越来越重要的作用。

到目前为止,水稻的 RFLP 分子连锁图日趋饱和<sup>[10]</sup>,而且许多水稻重要的农艺及生物学性状基因与其紧密连锁。由于单个功能基因定位通常检出率很低,所以利用与功能基因紧密连锁的一组 RFLP 同样可以进行染色体定位。尽管紧密连锁的两个 RFLP 基因在物理图中不一定就紧密靠在一起。但因为作探针的是一组 RFLP,即使有少数 RFLP 有偏离,通过统计分析基本上可消除其影响。从理论上讲,多个 RFLP 探针混合后定位不如单个基因定位精确,但在细胞

水平上的染色体 FISH 定位,在显微镜下,1cM 的 DNA 只是很细小的一个点,所覆盖的范围为几百 kb 至 1Mb 左右。所以,这种方法在一定程度上是可行的。但此方法不能代替单个基因来进行精细的物理作图。

尽管 RFLP 混合标记的检出率低于 BAC 克隆,但 RFLP 为基因组中的特异性的单拷贝序列,杂交中就省略了制备过程相当复杂的封阻 Cot-1 DNA 的制备过程。由于每个 BAC 克隆的长度和重复序列的含量不同,杂交过程中 Cot 1 DNA 的用量难以把握的问题也得以解决。尤为重要的是,目前已存在大量与水稻功能基因连锁的 RFLP,而与水稻重要的农艺及生物学性状基因紧密连锁的 BAC 克隆非常有限。新的 BAC 克隆需要经过 RFLP 对 BAC 文库筛选、验证等大量工作才能应用于 FISH 中<sup>[11]</sup>。与 BAC 克隆相比,RFLP 标记存在着资源上的优势。

### 参考文献(References):

- [1] 闵绍楷,等.水稻育种学[M].北京:中国农业出版社,1996:354~406.
- [2] Gustafson J P, Dille J E. Chromosome location of *Oryza sativa* recombination linkage groups[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 8646~8650.
- [3] Gustafson J P, et al. Physical mapping of a low-copy DNA sequencer in rye (*Secale cereale* L.) [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 1899~1902.

- [ 4 ] 程祝宽,颜辉煌,顾铭洪,等.水稻染色体的长度顺序和编号问题[J].遗传,1999,21(91):46~49.
- [ 5 ] 覃瑞,魏文辉,宋运淳,等.BAC-FISH在植物基因组研究中的应用[J].生物化学与生物物理进展,2000,20(1):20~23.
- [ 6 ] Jiang J, et al. Metaphase and interphase fluorescence *in situ* hybridization mapping of rice genome with bacterial artificial chromosomes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92:4487~4491.
- [ 7 ] Song Y C, Gustafson J P. Physical mapping of the 5srDNA gene complex in rice Takano (*Oryza sativa*) [J]. Genome, 1993, 36: 658~661.
- [ 8 ] Song Y C, Gustafson J P. The physical location of fourteen RFLP markers in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Theor Appl Genet, 1995, 90:113~119.
- [ 9 ] 鄢慧民,宋运淳,李立家,等.水稻 *Xa-21* 基因在水稻和玉米中的比较物理定位[J].植物学报,1999,41(93):249~253.
- [ 10 ] Nakamura S, et al. Construction of an 800-kb contig in the near-centromeric region of the rice blast resistance gene *pi-ta<sup>2</sup>* using a highly representative rice BAC library[J]. Mol Gen genet, 1997, 254(6):611~620.
- [ 11 ] Jiang J, Gill B S. Nonisotopic *in situ* hybridization and plant genome mapping: the first 10 years [J]. Genome, 1994, 37:717~725.