

• 遗传快报 •

玉米 *cyclin* III 基因的染色体原位杂交物理定位^①

任南^② 宋运淳 毕学知 刘立华

(武汉大学生命科学院, 武汉 430072)

摘要 本文首次报道了玉米低拷贝基因 *cyclin* III (B-类) 生物素标记的染色体原位杂交定位结果。供试探针为该基因的 cDNA 克隆, 其长度仅为 1.6kb。结果表明, 探针的信号分布在第 6 染色体短臂和第 9 染色体长臂, 与着丝粒的百分距离分别为 70.05 ± 3.31 和 86.86 ± 1.64 , 检出率分别为 8.29% 和 6.83%。文中对基因的物理位置与功能间的关系等作了讨论。

关键词 玉米, *cyclin* III 基因, 染色体原位杂交, 生物素标记

The Physical Location of the Maize *cyclin* III Gene by *in situ* Hybridization

Ren Nan Song Yunchun Bi Xuezhi Liu Lihua

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract A biotin-labelled *in situ* hybridization technique was used to physically map a low copy gene *cyclin* III in maize. The cDNA clone was 1.7 kb in size. The probe was hybridized onto the short arm of chromosome 6 and the long arm of chromosome 9. The percent distances from centromere to detection site were 70.05 ± 3.31 and 86.86 ± 1.64 respectively. The detection rates of *in situ* hybridization were 8.29 and 6.83 respectively. The relationship between the position and function of the genes is discussed in this paper.

Key words Maize, Gene *cyclin* III, Chromosome *in situ* hybridization, Biotin labeling

自从 1983 年由 T. Hint 实验室在海胆卵中发现细胞周期蛋白(cyclin)以来, 有关酵母、爪蟾和其他动物的细胞周期蛋白的研究得到广泛的报道。它是一类随细胞周期变化周而复始出现和消失并参与细胞周期调控的蛋白质, 它和 *cdc2* 基因(Cell division cycle gene)表达产物 p34^{cdc2} 蛋白激酶(*ser/ thr* 蛋白激酶)组成复合体, 构成“成熟促进因子”(Maturation promoting factor, MPF), 是细胞周期调控的关键因子^[1,2]。目前, 在胡萝卜^[3]、烟草^[4]、拟南芥^[5]等植物中均发现细胞周期蛋白的存在。对玉米该基因结构和功能方面的分析已有一些报道^[2], 然而它在染色体上的物理位置仍是不确定的。深入了解这个基因的调控机理以及它与相邻基因或遗传成份间关系的分析, 对其进行染色体定位显然是十分重要和紧迫的。

玉米小于 5kb 低拷贝和单拷贝基因的原位杂交比较困难, 据我们所知, 除我们报道过的 *cdc2* 基因的定位结

①国家自然科学基金和国家教委博士点基金资助项目。

美国冷泉港实验室 J. Colasanti 博士为本研究赠送 *cyclin* III 基因 cDNA 探针并提供资料, 谨此致谢。

②任南, 男, 28岁, 博士研究生, 专业方向: 植物分子细胞遗传学。

果⁽⁶⁾外,尚无这方面的成功报道。在本研究中定位采用的探针长度仅为 1.6kb 的低拷贝细胞周期蛋白 III 基因的 cDNA 克隆获得了原位杂交的定位结果。

1 材 料 和 方 法

1.1 实验材料

供试材料为玉米自交系黄早四。玉米细胞周期蛋白 III 基因的 cDNA 探针由美国冷泉港 J. Colasanti 博士克隆⁽²⁾赠送,长度为 1.6kb,克隆于 pBluescript 质粒 *EcoRI*/*XhoI* 位点。

1.2 植物染色体制片

取长至 1~2cm 的玉米根尖, α -溴萘室温处理 3 小时, 甲醇:冰醋酸(3:1)室温固定 2~3 小时,充分水洗后,在 30℃ 下用 2% 纤维素酶和 2% 果胶酶等体积混合酶解 3 小时,接着采用火焰干燥法制片。

1.3 质粒探针的转化及扩增

采用“热休克法”转化质粒,“碱裂解法”提取扩增探针,参照 Sambrook 等(1989)方法进行,稍有改进⁽⁷⁾。受体菌为大肠杆菌 TG-1。

1.4 探针的标记及标记效果检测

采用“缺刻平移法”标记探针。反应混合液为: 5 μ l 变性质粒探针, 3 μ l Bio-11-dUTP, 10 μ l dNTP 混合物(dATP, dGTP, dCTP), 5 μ l polymerase I DNA 聚合酶和 DNase I 混合酶液及适量灭菌无离子水至终体积 50 μ l, 15℃ 反应 2.5 小时后,加 2 μ l EDTA(0.2mol/L pH8.0)终止反应。试剂盒购自华美公司。Sephrose 微柱纯化探针“点印迹”法检测标记效果。

1.5 原位杂交及其检测

参照 Gustafson 和 Dille (1992)的方法⁽⁸⁾略有改进。杂交液包含 25 μ l 探针 6、2.5 μ l 去离子甲酰胺、25 μ l 硫酸葡聚糖、12.5 μ l 20 \times SSC 和 1.25 μ l ssDNA, 100℃ 变性。染色体制片在 60℃ 下烤片 1 小时, 37℃ 下用 RNase A(1 μ g/ml)处理 1 小时, 70℃ 下在 70% 甲酰胺中变性 3.5 分钟, 后经 70%、95% 和 100% 酒精系列脱水, 37℃ 杂交 6~21 小时。在检测中首先用 42℃ 10% 去离子甲酰胺、2 \times SSC 和 0.1 \times SSC 系列浸洗, 室温下 0.1% Triton 浸洗。依次加羊抗生物素抗体、兔抗羊抗体生物素偶联物和 SA-HRP 37℃ 下各反应 30 分钟。室温下采用 HRP-DAB 显色系统显色 5 分钟, 1% Giemsa 染色 5 分钟。

1.6 杂交信号观察及统计分析

使用 Olympus BH-2 相差显微镜观察杂交结果, 选择信号清晰、染色体形态好的分裂相进行显微摄影。通过装配在图像转化装置上的电视荧光屏进行臂比及杂交位点与着丝粒距离的测量, 并进行统计分析。

2 结 果 和 讨 论

2.1 染色体原位杂交结果

观察表明, 在玉米有丝分裂相中第 6 染色体短臂和第 9 染色体长臂, 分别检出细胞周期蛋白 III 基因 cDNA 探针的杂交信号(图版 I, a 和 b)。它们与着丝粒的百分距离分别为 70.05 ± 3.31 和 86.86 ± 1.64 (表 1)。显微观察可以看出, 信号呈深紫红色, 和 Giemsa 染色的蓝紫色染色体区别明显。观察的 205 个晚前期或早中期的分裂相中, 30 个具有杂交信号, 检出率为 14.63%。第 6 和第 9 染色体上的检出杂交信号的比例分别为 8.29% 和 6.83%。对 100 个间期细胞统计结果表明, 53 个间期细胞检出了杂交信号。同时出现 3 个信号的间期细胞数为 20(图版 I, c), 2 个的为 18, 1 个的为 14, 仅在 1 个间期细胞中同时检出了 4 个杂交信号, 同一间期细胞中检出 3 个以上的杂交信号, 说明该基因在玉米基因组中是多座位的。第 6 和第 9 染色体同时检出杂交信号, 而且信号检出率十分接近, 分别为 8.29% 和 6.83%, 说明二者不是一般同源片段, 也不是非特异性污染, 而应是同一个基

因的两个座位。玉米是异源多倍体, 水稻和玉米比较作图证明, 水稻的单拷贝基因在玉米中 72% 以上都是多位点⁽⁹⁾。此外, 间期细胞中 DNA 分子螺旋程度低, 浓缩程度小, 利于探针和靶 DNA 序列的杂交结合, 因而检出率大大高于分裂中期检出率。在对照实验中, 基本上没有发现杂交信号(图版 I, d), 说明上述杂交信号并不是非特异污染, 实验结果是可信的。

表 1 供试探针杂交位置及出现信号染色体臂比

探 针	染 色 体	检出细胞数	臂 比 (%)	信号距着丝粒百分距离
<i>cyclin III</i>	6	17	2.05 ± 0.15	70.05 ± 3.31
	9	14	1.93 ± 0.09	86.86 ± 1.64

2.2 植物染色体原位杂交技术探讨

目前, 许多学者都采用了检出位置到着丝粒距离百分比的计算和分析来确定信号在染色体上的位置⁽¹⁰⁾。在本研究中我们也采用了这种方法, 由于观察的各分裂相所处的分裂时期不尽相同, 染色体浓缩程度不同, 这样便会造成观测结果的差异, 通过对多个分裂相的上述计算分析和标准差的测定, 可以有效地减少误差。

然而, 我们在实验中发现, 酶解和制片过程处理适度, 经过杂交和检测一系列处理过程后的分裂相, 染色体依然会有特异带纹的显现。可以看出(图版 I, a), 在同一分裂相中不同的染色体上分别显出较明显的 G-带和 C-带。原位杂交和显带特别是 G-显带的结合, 可以更为精确地定位目的基因, 可将靶序列定位到染色体的特定区段。人类和动物遗传学研究中同步 G-显带和原位杂交技术已较为成熟, 但植物中的应用尚属摸索阶段。目前仅有同步 C-显带和原位杂交成功的报道⁽¹¹⁾, 还有一些研究中将 G-显带和原位杂交分两步进行, 在每一步中对同一分裂相分别拍照, 然后确定信号所在带区, 这一方法有许多局限和不便。本实验室对这一技术的尝试和改进, 证明在植物中同步 G-显带和原位杂交技术是可行的⁽¹²⁾。然而, 该技术在植物中的应用还有待进一步完善和提高。毫无疑问, 通过发展 G-显带原位杂交, 将能为基于图谱的基因克隆(map-base cloning)、显微切割和构建微基因组 DNA 文库创造有利条件, 促进它们的发展。

由于植物有细胞壁使其染色体制片和原位杂交都比动物和人中困难。单或低拷贝基因原位杂交的检出难度大, 特别是小于 2kb 片段杂交的检出率相当低。和我们其他的实验结果比较我们发现, 所采用的探针片段长度越短, 信号检出率则越低。因而在植物中定位小片段单拷贝 DNA 序列, 如何解决检出率低的问题是技术关键之一。我们在实验中采用 2% 纤维素酶和 2% 果胶酶处理, 充分酶解去壁, 较好地消除了杂交的障碍, 并且通过改进涂片方法使分裂细胞充分分散, 因而有更多的染色体能得到暴露和展示, 这也弥补了检出率低的不足。本实验中所采用的是生物素标记的探针及相应的检测系统。与放射性同位素标记方法相比, 非放射性标记及检测系统更加安全、稳定、实验周期短, 而且实验结果易于长期保存。近年来发展的免疫联接级连放大检测法即本研究所采用的方法, 通过多级抗体的放大, 使很短的杂交序列都能被检出和观察到。这在一定的程度上使攻破这一难关获得了进展。

2.3 细胞周期蛋白 III 基因在玉米基因组中位置分析及启示

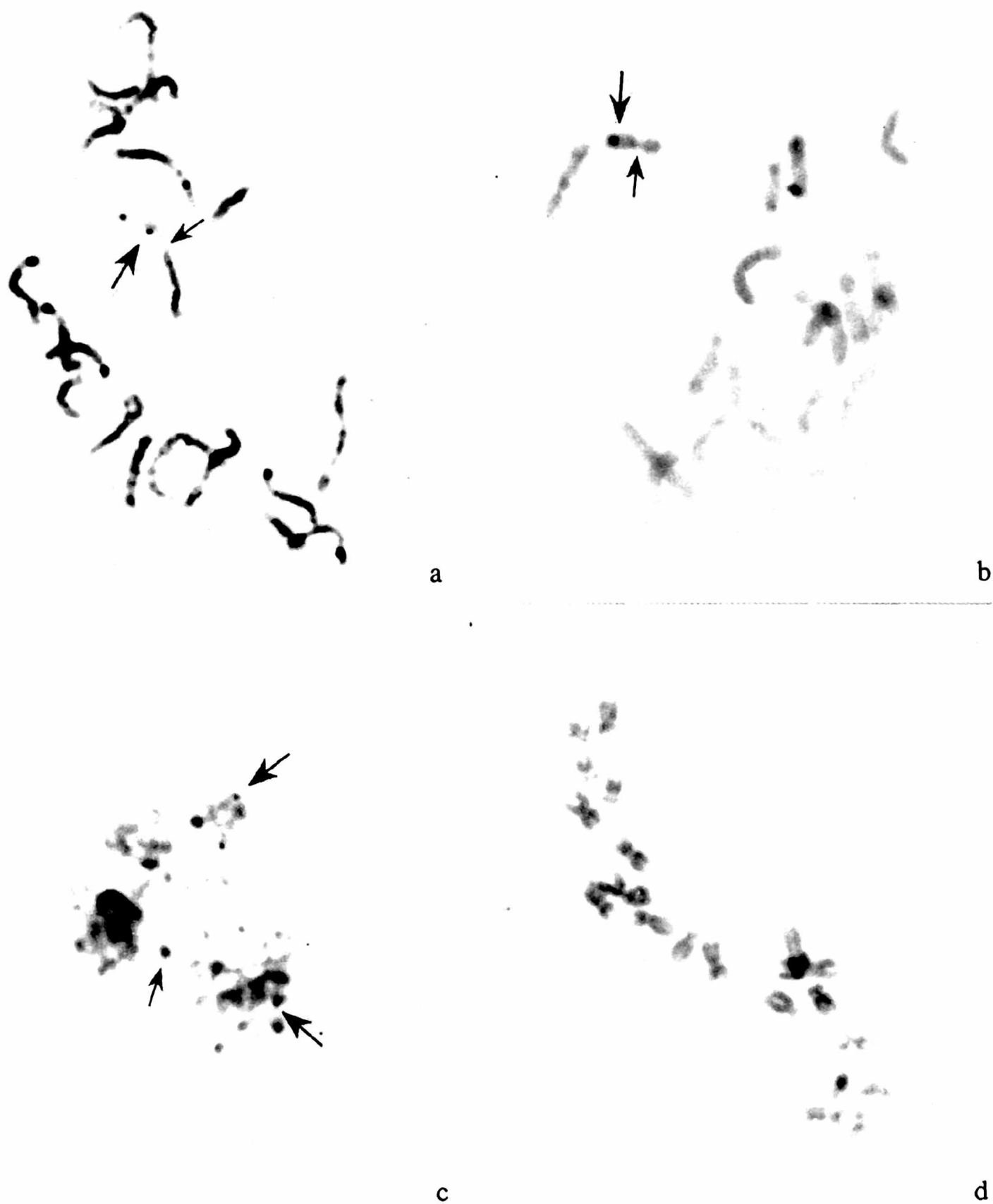
染色体原位杂交所确定的位置是基因在染色体上实际的物理位置。因而, 所绘制出的基因图是细胞遗传学图。遗传图仅代表基因在染色体上的相对位置和相对距离, 许多研究结果都说明遗传图和物理图存在很大差异⁽¹⁰⁾。而细胞遗传学图除能反映基因或分子标记在染色体上的实际位置外, 还可以深入认识基因间的相互关系、染色体不同区域的突变和重组特点以及基因组的结构。

十分有意义的是, 本实验室原位杂交发现第 9 染色体上同时存在 *cdc2* 基因⁽⁶⁾, 而且它和细胞周期蛋白 III 基因的位置彼此十分靠近。植物细胞周期蛋白就现已发现的植物细胞周期蛋白可分为 I、II 和 III 型⁽²⁾, 其中 I 和

Ⅲ型功能类似于动物中的 B 型, 已证明玉米的Ⅲ型细胞周期蛋白和 p34^{cdc2} 蛋白激酶一起组成 MPF, 在 G₂/M 期的转换细胞进入有丝分裂中起决定作用。因而, 它们在细胞周期调控中功能是密切相关的。还有报道表明, 我们定位的 *cyclinⅢ* 还和第 6 染色体上的另一细胞周期调控中起作用基因 *cdc48* 位置靠近⁽¹²⁾, 而且在第 9 染色体长臂上也有 *cdc48* 基因的座位。这一方面表明, 基因在染色体上的位置次序具有一定的功能含义。最近的报道表明, 在低等真核生物线虫(*Caenorhabditis elegans*) 基因组中至少有四分之一基因是组成操纵子的, 线虫基因成簇存在于操纵子中, 代谢相关的基因协同表达⁽¹³⁾。果蝇、鼠和人等动物的发育调控的同源异形基因, 在染色体上不仅成簇分布, 而且排列的位置顺序和它们在发育不同时期的表达次序一致, 具有共线性⁽¹⁴⁾。这些都证明, 基因的分布不是随机的, 而是和它们的功能间有一定的关系。代谢功能密切相关的基因和它们在染色体上分布位置有彼此靠近的趋势, 在一定的程度上反映了生物体中所共同具有的结构和功能的统一特性。我们的研究结果所表明的 *cyclinⅢ* 基因和 *cdc2* 基因这一位置上的分布特点提示我们, 在高等真核生物基因组中是否也具有操纵子或类似的基因表达调控模式值得进一步研究。另一方面表明, 玉米多倍体基因组中基因的双重顺序并不是简单的重复, 有可能是同一基因在不同的位置上与不同基因配合, 在代谢过程中发挥不同的作用。我们定位的细胞周期调控关键基因 *cdc2* 和一个与它功能上相关的 *ser/ thr* 特异蛋白磷酸酶基因 *prh1* 的结果表明, *cdc2* 不仅在第 4 和第 9 染色体上都存在座位, 而且在第 4 染色体上位置彼此接近⁽⁶⁾。上述这几个基因的多座位性, 和它们虽分布在不同的染色体, 但在附近或同一条染色体臂上都存在其他细胞周期调控或代谢相关的基因的特点, 启示我们玉米基因的多座位并不是简单的加倍, 因而也应存在功能上的进化。

参 考 文 献

- Colasanti J. *et al.* Isolation and Characterization of cDNA clones encoding a functional p34^{cdc2} homologue from *Zea mays*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88: 3377~3381
- Renaudin J. P. *et al.* Cloning of four cyclins from maize indicates that higher plants have three structurally distinct groups of mitotic cyclins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91: 7375~7379
- Hata S. *et al.* Isolation and characterization of cDNA clones for plant cyclins. EMBO J., 1991, 10: 2681~2688
- Hirt H. *et al.* Alfalfa cyclins—differential expression during the cell cycle and in plant organs. Plant Cell, 1992, 4: 1531~1538
- Hemerly A. *et al.* Genes regulating the plant cell cycle: Isolation of a mitotic-like cyclin from *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89: 3295~3299
- 任南等. 玉米(*Zea mays* L.) *cdc2* 和 *prh1* 基因的染色体原位杂交物理定位. 遗传学报, 1997, 24(): 待发表
- 萨姆布鲁克 J. 等(金冬雁等译). 分子克隆. 北京: 科学出版社, 1989, 16~34, 49~55
- Gustafson J. P. *et al.* Physical mapping of a low copy DNA sequence in rye (*Secale cereale* L.) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87: 1899~1902
- Ahn S. *et al.* Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90: 7980~7984
- Song Y. C. *et al.* The physical location of fourteen RFLP markers in rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet., 1995, 90: 113~119
- Jiang J. *et al.* Sequential chromosome banding and *in situ* hybridization analysis. Genome, 1993, 36: 792~795
- Song Y. C. *et al.* Simultaneous chromosome G-banding and *in situ* hybridization of RFLP markers in maize. Maize Genet. Coop. Newsl., 1996, 70: 70~71
- Hirsh D. Operons in eukaryotes follow the spliced leader. Nature, 1994, 372: 222~223
- Graham A. *et al.* The murine and *Drosophila* home boxes gene complexes have common features of organization and expression. Cell, 1989, 57: 367~378
- Coe E. H. Gene list and working maps. Maize Genet. Coop. Newsl., 1996, 70: 123~132



cyclinIII 基因 cDNA 探针杂交信号位置: 图中大箭头示杂交信号, a 和 b 图小箭头示着丝粒位置, c 图小箭头示染色中心。
a. 杂交信号在早中期分裂相第 6 染色体短臂检出; b. 杂交信号在晚前期分裂相在第 9 染色体长臂检出; c. 检出 3 个杂交信号的间期细胞, 说明该基因是多座位; d. 对照实验分裂相中未发现信号点。