

DNA 分子原位杂交 (in situ hybridization) 在植物分子细胞遗传学研究中的应用

别同德,张伯桥,高德荣,程顺和,马谈斌
(扬州农科院国家小麦改良分中心,江苏扬州 225007)

摘要: DNA 分子原位杂交 (*in situ hybridization*, ISH) 是植物分子细胞遗传学研究的重要工具。简要回顾了 DNA 分子原位杂交的起源和发展, 详细综述了基因组原位杂交 (*genomic in situ hybridization*, GISH) 在植物细胞遗传学研究中的应用以及荧光原位杂交 (*Fluorescence in situ hybridization*, FISH) 在植物物理作图和染色体识别中的应用。还介绍了 Fiber-FISH、BAC-FISH 以及 Immuno-FISH 等新兴技术, 最后对 FISH 技术进行了展望。

关键词: FISH; GISH; ISH; 分子细胞遗传学; 植物

中图分类号: Q343.2+2 **文献标识码:** A

Application of *in situ* Hybridization in Plant Molecular Cytogenetics Research

Bie Tongde, Zhang Boqiao, Gao Derong, Cheng Shunhe, Ma Tanbin

(National wheat improvement subcenter, Yangzhou Academy of Agricultural Sciences, Yangzhou 225007)

Abstract: *In situ* hybridization is one of the most important techniques in plant molecular cytogenetics research. In this paper, we briefly introduced the origin and development of *in situ* hybridization, firstly. Then, application of *genomic in situ hybridization* (GISH) in plant cytogenetics research as well as *fluorescence in situ hybridization* (FISH) in plant physical mapping and chromosome identification were detailed reviewed. Some new techniques such as fiber-FISH, BAC-FISH, and immuno-FISH were also introduced in this paper. And a prospect about FISH was given out.

Key words: FISH, GISH, ISH, molecular cytogenetics, plant

DNA 分子原位杂交 (*in situ hybridization*) 是 20 世纪 60 年代末出现并逐步发展起来的一种将 DNA 序列直接定位于染色体上的技术。早期的 ISH 技术用放射性同位素标记探针^[1,2], 其局限性是曝光时间长、分辨率低、安全性较差, 仅对单拷贝 DNA 序列的检测较为适用。为了克服放射性同位素 ISH 技术的局限, 生物素标记探针的技术应运而生, 最初用于果蝇、仓鼠和鸡等动物表达基因的染色体定位^[3-5]。人们将这种利用荧光素标记的 ISH 技术称为荧光原位杂交 (*Fluorescence in*

situ hybridization, FISH)。与放射性标记的 ISH 相比, FISH 具有分辨率高、背景低、快速、稳定等优点。

Rayburn 和 Gill^[6]首次将生物素标记探针的 FISH 技术应用于植物。在这个程序中, 用带有生物素的 dUTP 标记探针 DNA, 杂交位点通过酶信号检测, 通常用辣根过氧化物酶或者碱性磷酸化酶凝集的抗生物素蛋白或者链霉素抗生物素蛋白。后来又出现了利用酶标抗体进行检测的地高辛标记系统。这两种酶检测方法可以将杂交信号放大 50 倍以上, 因此灵敏度极高。

基金项目: 国家自然科学基金项目“小片段小麦易位系的高效诱致和精确鉴定”(30270827); 国家 863 计“划抗病、优质、高产小麦新品种分子设计育种”(2006AA10Z1F6); 国家科技支撑计划项目“优质高产专用小麦育种技术研究及新品种培育”(2006BAD01A02-19)。

第一作者简介: 别同德, 男, 1972 年出生, 江苏涟水人, 助理研究员, 遗传学博士, 主要从事小麦分子细胞遗传学和分子育种研究。已在《Journal of Integrative Plant Biology》、《作物学报》等刊物上发表原始性研究报告多篇。通信地址: 225007 扬州扬子江北路 568 号扬州农科院国家小麦改良分中心, Tel: 0514-87636763, E-mail: bietongde@163.com。

通讯作者: 马谈斌, 男, 1954 年出生, 研究员, 扬州农科院院长, 主要从事麦类遗传育种和栽培研究。通信地址: 225007 扬州扬子江北路 568 号扬州农科院国家小麦改良分中心, Tel: 0514-87636763, E-mail: matanbin@yahoo.com。

收稿日期: 2008-08-28, **修回日期:** 2008-09-09。

Reader 等^[7]直接用荧光素标记探针, FISH 信号可以直接在荧光显微镜下检测, 比酶检测系统更加快捷。此后, Lichter 等^[8]、Leitch 等^[9]和 Mukai 等^[10]又发展了植物的双色或多色荧光原位杂交技术 (di-/multi-color-FISH), 允许在同一条染色体上确定不同探针序列的次序。

利用全基因组 DNA 为探针的 ISH 方法称为基因组原位杂交 (genomic *in situ* hybridization, GISH), 最早被用来检测人—鼠体细胞杂种中的小鼠染色体^[11]。Le 等^[12]和 Schwarzacher 等^[13]成功地将该技术应用于植物远缘杂交的研究中。此后, GISH 被广泛地应用于不同遗传背景中外源染色质的结构、空间组成、减数分裂行为、异源多倍体进化、染色体作图等方面的研究。

下面重点对 GISH 和 FISH 在植物分子细胞遗传学研究中的应用进行综述。

1 GISH 在植物细胞遗传学研究中的应用

Heslop-Harrison 等^[14]、Mukai 和 Gill^[15]通过对小麦 - 外源染色体添加系和易位系间期核的 GISH 发现: 添加系和易位系中的外源染色质并不与小麦染色质交织在一起, 只占据间期核某个独立的区域。Leitch 等^[16]利用 GISH 研究野生大麦 *Hordeum chilense* 与非洲黑麦 *Secale africanum* 杂种的中期和间期核, 发现间期核中来自两个亲本基因组的染色质分别占据不同的核区域而不相互交织。Leitch 等^[17]进一步观察到杂种中双亲基因组在整个细胞周期中都是呈区域分布的。

传统的减数分裂配对分析方法很难区分基因组内和基因组间染色体配对, 但是 GISH 可以得到关于基因组间染色体部分同源配对的直接证据^[18,19], 这对于确定物种间亲缘关系, 外源染色体同源群归属是一个有效的途径。

利用各种可能的二倍体种的基因组 DNA 为探针, GISH 可以给出异源多倍体基因组进化和分化的重要信息。利用 GISH 技术, Kenton 等^[20]发现在烟草 (*Nicotiana tabacum*, S5TT) 基因组中存在大量的染色体组间易位; Jellen 等^[21]、Chen 和 Armstrong^[22]分别在异源四倍体和异源六倍体燕麦中发现 A-C 和 A/D-C 染色体组间易位; Jiang 和 Gill^[23]发现提莫菲维小麦 (*Triticum timopheevii*, AtAtGG) 中有一个物种特异的循环易位, 涉及 1G、4G 和 6At3 条染色体, 这与圆锥小麦 (*Triticum turgidum*)、普通小麦 (*Triticum aestivum*) 中涉及的 4A、5A、7B 染色体间循环易位^[24-26]不同, 这种物种特异性染色体易位的存在支持了多倍体小麦起源的二源性学说^[27-30]。

利用 GISH 很容易鉴别植物基因组中异源染色体

(质) 或染色体片段的的存在, 尤其在小麦与近缘种属易位系的选育工作中应用得极为广泛。目前, 应用 GISH 检测筛选已得到大量的小麦与黑麦属、山羊草属、簇毛麦属、大赖草属、偃麦草属、冰草属、披碱草属以及鹅观草属等物种间染色体易位系。小麦 - 异源易位系在小麦育种中的广泛利用, 为拓宽小麦遗传多样性, 尤其在小麦抗病育种工作中发挥了重要作用^[31]。

利用 GISH 结合分子标记作图, 还可以精确定位不同物种间物理重组位点 (physical recombination site), 实现物理图与遗传图的整合^[32,33]。由于这种基于 GISH 和分子标记的物理 - 遗传图不需要太多的 DNA 序列方面的信息, 因此比基于细菌人工染色体 (bacterial artificial chromosome, BAC)、酵母人工染色体 (yeast artificial chromosome, YAC) 文库的物理图的构建要低廉得多。

2 FISH 在物理作图中的应用

2.1 单拷贝或寡拷贝 DNA 序列的 FISH 物理作图

在人类基因组研究报告中, 大到几十 kb~ 几百 kb 的粘粒 (cosmid)、YAC 克隆, 小到只有几百 bp 的基因序列都可以通过 FISH 直接定位到中期染色体上^[8,34-36]。各种间隔在 50~100bp 的 DNA 片段也可以在间期核拉伸的染色质或者前期染色体上进行顺序排列^[37,38]。基因组克隆中的重复 DNA 序列的交叉杂交 (cross-hybridization) 可以通过与未标记的人类基因组 Cot-1 DNA 的竞争性杂交得到抑制。Ried 等^[39]首次将 7 种不同的 DNA 序列定位到人类染色体上。

然而, FISH 在植物中的利用受到很大限制。由于受到植物基因组中高比例的重复序列的影响, 单拷贝或寡拷贝 DNA 序列在染色体上的分布是不连续的, 很难产生清晰可辨的 FISH 信号。20 世纪 90 年代初期, 科学家们致力于提高植物低拷贝或单拷贝序列 FISH 作图的灵敏度。然而, 测评报告认为: 只有那些超过 10kb 的目标 DNA 序列才可能定位到中期染色体上。Jiang 等^[40]发现细菌人工染色体 (BAC) 中的重复序列很容易被基因组 DNA 封阻, 长度在 40kb 以上的 BAC 克隆都可以被成功用于作图, 并成功地将与抗水稻白叶枯病基因 Xa21 紧密连锁的 BAC 克隆 103-7 定位到 11 号染色体长臂中部。此后, BAC-FISH 和 YAC-FISH 技术在植物染色体作图研究中得到广泛应用。

2.2 重复序列和多基因家族的 FISH 物理作图

重复序列在植物基因组中占有很大的比例, 重复序列的扩增和分化导致了植物基因组的进化^[41], 对重复序列进行分离和定性可以更好地理解植物基因组的

组成,也为分子水平上的植物系统进化研究提供了新途径。重复序列包括简单重复序列、中等重复序列和高度重复序列。简单串联重复序列又称为微卫星序列,由于重复单元小,重复次数少,难以用于 FISH 作图。高度重复序列如卫星序列、转座子序列和多基因家族序列大都具有区域特异性,对于这些序列的物理定位无疑有利于对不同物种基因组构成的深入理解和获得进化方面的信息。

Dvořák 等^[42]最早对小麦及其亲缘物种的 5SrRNA 基因家族的组成和进化进行研究。Mukai 等^[43]利用普通小麦中国春的一套缺失系对 5S rRNA 多基因家族进行物理作图,将 5S rRNA 位点分别定位于小麦第 1、5 部分同源群的 6 条染色体上(1AS12, 1BS32, 1DS22, 5AS22, 5BS22, 5DS22),认为 5S rRNA 位点与染色体上 C-带位置没有必然的联系。18S•26SrRNA 多基因家族与细胞分裂核仁组成区(NOR)的形成密切相关。Mukai 等^[44]通过缺失作图将 18S•26SrRNA 多基因家族定位到普通小麦中国春的 1AS、5DS、7DL 的端部以及随体染色体 1B 和 6B 的次缢痕部位,重复程度从大到小依次为 6B>1B>5D>1A>7D,其中 7DL 上的 18S•26SrRNA 位点为首次发现。Jiang 和 Gill^[45]通过对 18S•26SrRNA 基因在不同倍性小麦中的染色体定位认为:1GL 和 1BL 在进化中可能涉及染色体重排;栽培一粒小麦亚种乌拉尔图小麦(*Triticum monococcum subsp. urartu*)是多倍体小麦 A 和 At 基因组的原始供体;斯卑尔脱山羊草(*Aegilops speltoides*)基因组比高大山羊草(*Aegilops longissima*)更接近于多倍体小麦中的 B 和 G 基因组,是 B、G 基因组最可能的供体。Li 等^[46]从簇毛麦中分离到一个物种特异的重复序列 pHvNAU62,该序列存在于簇毛麦 1V~6V 染色体的端部和亚端部,利用该序列研究簇毛麦与小麦亚族其它几个种属的关系,发现百萨偃麦草、大赖草与簇毛麦的亲缘关系较近。

2.3 间期-FISH、粗线期-FISH 和 fiber-FISH 在物理作图中的应用

在人类和植物中期染色体上进行 FISH,两个 DNA 序列间距离大于 1Mb 时,它们的次序才可以确定^[37,47]。因此,中期染色体对于建立高精度的物理图谱的作用有限。鉴于此,科学家们尝试用不同的制片方法来提高 FISH 作图的精度^[47,48]。

2.3.1 间期-FISH 作图 不同的研究报告显示,间期染色质可以用于较高精度的 FISH 作图,两个信号之间的分辨率(可以分辨的两个 FISH 信号间的最小距离)最高可达到 50kb^[37,49]。Jiang 等^[40]首次将间期作图应用到

植物基因组研究中,并成功确定了多个水稻 BAC 克隆在染色体上的排列次序以及它们之间的物理距离。但是间期作图也有自身的局限:(1)染色质的分布并不总是均匀的;(2)染色质在细胞核物理空间中的变化很大;(3)线性染色质的形态经常难以分辨。

2.3.2 减数分裂粗线期-FISH 作图 在植物中,粗线期作图广泛应用于小基因组植物如拟南芥、水稻、马铃薯、番茄、洋葱等的研究,粗线期作图有如下特点:粗线期染色体具有良好的空间构型,因此比间期染色质更容易观察;在不同植物中,粗线期染色体伸展的长度可达中期染色体的 7~40 倍并与基因组大小呈反相关;在常染色质和异染色质上 FISH 的分辨率分别可达 60kb 和 140kb,因此作图精度较高。Cheng 等^[47]利用水稻粗线期 FISH 作图,成功确定了 4 个 BAC 之间的物理距离(112~145kb),甚至还确定了具有部分重叠区域的 BAC 克隆的物理顺序。

2.3.3 Fiber-FISH 在作图中的应用 Heng 等^[50]首次将游离的 DNA 纤丝(DNA fiber)用于哺乳动物 FISH 作图,成功地确定了 4 个粘粒克隆在染色体上的位置,将 FISH 的分辨率提高到 10kb。Fransz 等^[51]首先将 fiber-FISH 技术用于植物拟南芥和番茄的粘粒重叠群(contig)作图。此后,该技术在拟南芥、番茄、水稻、小麦、甜菜、油菜等多种植物中得到应用^[47,52-55]。Cheng 等^[47]通过对 7 个已知序列的水稻 BAC 克隆在 DNA 纤丝上的 FISH,确定了信号长度与物理距离之间的关系(3.21kb/μm),并确定了 7 个 BAC 克隆在 DNA 纤丝上的分布次序和物理距离。

Fiber-FISH 技术的高精度和高分辨率使得它在基因组研究中有着强大的功能,主要应用于:(1)DNA 序列的物理定位和排序^[47,48,50];(2)重叠群的构建^[47,51,52];(3)弥合遗传图中的“gap”^[52];(4)重复序列大小及拷贝数的分析^[51,55];(5)比较作图^[53];(6)转基因植物中基因座位的大小及拷贝数的研究^[56]。

Jim 等^[57]将双色 fiber-FISH 与免疫沉降法(immunoprecipitation)相结合,证明在燕麦-玉米染色体添加系中,玉米染色体着丝粒专化卫星序列 *CenC* 与着丝粒专化反转录转座子序列 *CRM* 高度交织在一起,重叠区域从 ~300kp 到 >2800kb 不等;着丝粒组蛋白 *CENH3* 总是与 *CenC* 和 *CRM* 交织在一起,但是有这两种序列的区域并不总是存在 *CENH3*;玉米着丝粒进入燕麦背景后并不出现着丝粒组成上的变化;燕麦的着丝粒组蛋白 *CENH3* 与玉米着丝粒组合到一起而玉米 *CenH3* 基因在燕麦背景中不表达。免疫沉降法与 fiber-FISH 技术的结合为 FISH 在表达水平上的研究

开辟了新的途径。

3 FISH 在染色体识别中的应用

3.1 建立基于重复序列的染色体分子核型

利用重复序列 ISH 的分子核型的建立对于识别物种各别染色体非常有效。GAA 卫星序列被较早用于植物分子核型的建立^[58],但是早期的基于放射性同位素标记的分子核型图质量低劣,难以应用。Rayburn 和 Gill^[6,59]首次将生物素标记的黑麦重复序列克隆 pSc119 用于染色体识别,结果显示 pSc119 在普通小麦 4A、2D、3D、5D 和全部 B 组染色体上可以产生特征性 FISH 带纹。他们根据 pSc119 探针得到的普通小麦 4A 染色体分子核型与 B 组可能供体斯卑尔脱山羊草 (*Aegilops speltoides*) 和沙融山羊草 (*Aegilops sharonensis*) 的一个染色体分子核型的一致性,提出多倍体小麦中 4A 染色体应为 4B,且 4A 染色体在多倍体小麦的进化过程中没有发生大的变异,支持了 Dvořák^[28]、Chen 等^[29]关于 4A 染色体的起源学说。Gill 和 Chen^[30]后来进一步肯定了该学说。Rayburn 和 Gill^[60,61]发现来自粗山羊草的重复序列克隆 pAs1 可以特异地与普通小麦 D 组染色体进行杂交,并据此建立了普通小麦中 D 组和其它 D 组物种的分子核型。

Jones 和 Flavell^[62]、Mukai 等^[63]对植物染色体 C-带和重复 DNA 序列之间的关系进行系统分析,发现来自黑麦的一个 480-bp 重复序列家族^[64,65]在黑麦染色体上产生的 FISH 带纹与大部分 C-带的主带相一致。Mukai 等^[10]根据 pSc119.2 和 pAs1 两个重复序列的双色原位杂交,建立了普通小麦的分子核型,可以识别全部 21 条染色体中的 17 个。Pedersen 等^[66]发现来自大麦的 pHvG38 克隆 (GAA- 卫星序列)可以在大麦和小麦、黑麦以及其它小麦族物种染色体上产生与 N-带完全一致的核型图谱。利用 pHvG38 和 pAs1 的双色原位杂交,Pedersen 和 Langridge^[67]建立了可以区分普通小麦全部 21 条染色体的分子核型。在人类细胞学研究中,Schröck 等^[68]利用多个标记不同荧光的探针结合激光扫描质谱分离技术建立了可以区分人类全部染色体的多色色谱核型 (multicolor spectral karyotype),在临床医学领域有着重要实用价值,但是这种技术在植物中的应用还处于探索阶段。

利用重复序列的染色体识别技术是分带技术的有益补充。分带大多只能在组成性异染色质区产生带纹,对于异染色质少的染色体的鉴定往往成效不大。而利用基因组专化的重复序列探针一般都可以产生杂交位点,不同的重复序列探针还可以产生不同的分子核型,

多个重复序列探针相结合的双色或多色 FISH (di- or multi-color FISH) 技术可以更加高效地鉴别染色体的身份。

3.2 多种技术相结合的染色体鉴定方法

分带技术经济简单,能够区分大染色体物种如普通小麦的全部染色体^[69,70],但是难以用于小染色体物种的遗传研究,对于易位等结构变异的断裂位点的确定也较为粗放。分子核型虽然可以在一定程度上弥补分带的不足,但是用于建立分子核型的重复序列的分离和克隆是一项繁冗的工作,而且重复序列种类繁多,真正适于染色体作图的仅为少数。GISH 技术可以高效检测外源染色体的存在,并可精确定位缺失、易位等结构变异的断裂位点,但一般难以确定特定染色体身份。因此,单一的细胞学或分子遗传学技术往往不足以对染色体尤其是结构变异体的身份进行高效、精确地鉴定。而通过两个或多个技术的适当组合,往往可以减少鉴定工作的难度。

3.2.1 顺次 ISH- 分带技术 在人类细胞学研究中,将 ISH 与不同的染色体分带技术在同一个程序中进行整合可以将特定 DNA 序列直接定位到染色体的专门区域。但是在植物中,这种基于放射自显影的顺次 ISH 和分带技术分辨率很低,少有成功的报道^[71]。

3.2.2 顺次分带 -FISH/GISH 技术 Jiang 和 Gill^[72]将 N/C 分带与 FISH/GISH 技术相结合,成功地鉴定出数个小麦 - 黑麦染色体易位,这是顺次分带 -FISH/GISH (sequential banding-FISH/GISH) 技术应用于植物的首次报道。利用顺次 N/C 分带 -FISH 技术,Jiang 和 Gill^[23,45]在普通小麦染色体上检测到 3 个 18S·26SrDNA 基因家族新位点,并在提莫菲维和圆锥小麦中检测到物种特异的染色体易位,支持了多倍体小麦进化的二源性学说。利用顺次 C 分带 -GISH 方法,Zhong 等^[73]成功地将小麦 - 簇毛麦杂种后代中的簇毛麦各别染色体鉴别出来。目前,在小麦异源易位系的选育工作中,顺次分带 -FISH/GISH 技术已成为鉴定小麦 - 亲缘物种易位染色体身份的一种常规方法^[74]。

3.2.3 顺次 GISH-FISH 技术 GISH 可以精确检测易位断裂位点,而基于重复序列的 FISH 技术可以确定特定的染色体身份。结合二者的优点,顺序 GISH-FISH 或 GISH- 双色 FISH 技术逐渐发展起来,在鉴定物种间染色体易位的研究中发挥了重要作用^[75-77]。利用顺次 GISH- 双色 FISH 技术并结合 SSR 遗传图谱,Nagy 等^[78]成功鉴定了小麦 - 大麦易位系中的小麦和大麦易位染色体片段的身份,并对小麦 - 大麦易位断裂点进行了分子标记定位。

3.2.4 利用 BAC-FISH 位标识别各别染色体 当分带和分子核型都不足以区分物种中各别染色体时, 建立各别染色体专化的 FISH 位标(landmark)无疑对确定染色体身份和 DNA 序列的染色体作图有实践意义。

一般来说, 重复序列往往在一个物种的不同染色体上都有分布位点, 很难作为各别染色体特异性位标。而低于 10-kb 的单拷贝或寡拷贝序列探针很难在植物染色体上获得清晰可靠的杂交信号。因此, 利用含有大片段插入序列的细菌或酵母人工染色体克隆(BAC 或 YAC)开发染色体特异性 FISH 位标的方法应运而生。

在建立马铃薯 BAC 文库^[79]的基础上, Dong 等^[80]开发了一整套(12 个)马铃薯“染色体特异性细胞遗传学 DNA 标记”(chromosome-specific cytogenetic DNA marker, CSCDM), 利用这种 CSCDM 标记成功地对 5S rRNA 基因、45S rRNA 基因和一个马铃薯晚疫病基因进行了染色体定位。结合 CSCDM 位标, Dong 等^[79]还发展了顺次 GISH 和 BAC-FISH 方法, 该技术不仅可以确定外源染色体的身份, 还可以确定内源特定染色体的数目以及缺失、易位等结构变异。由于每条染色体只需要一个 CSCDM 位标来确定, 而“火焰干燥法”制片允许多次 FISH 操作(可达 5 次), 因此尤其适用于小染色体物种的细胞学研究。

3.2.5 基于基因组专化序列 FISH 的结合技术 在小麦育种中, 鉴定外源染色体来源和易位染色体的身份对于育种实践非常重要。外源染色体或染色体片段在小麦背景中往往由于二者带型的相似或缺少特征带型而难以识别。顺次分带-GISH 技术能够辨别涉及结构变异的小麦和外源染色体片段的身份。但是, 当小麦与外源物种关系很近时, GISH 的效率将受到影响。Mukai 等^[10]利用分别以 A、D 基因组 DNA 为探针的双色 GISH 将普通小麦的 3 个染色体组区分开来, 并观察到位于 4A 与 7B 染色体上的物种特异性易位。但是由于 A、D 染色体组亲缘关系较近, 双色 GISH 的效果并不理想, 此后很少有这方面的报道。

在植物基因组中存在大量的各种类型的重复序列, 这些序列往往具有区域特异性, 常位于着丝粒区和端粒区, 有时也会散布于整个基因组上, 这类序列多为反转录转座子(retrotransposon)序列。利用全身性散布重复序列进行 FISH 可以产生类似 GISH 的杂交信号, 可以很好地解决 GISH 技术封阻不易掌握的局限。

Lapitan 等^[81]最早将生物素标记的 *pSc119* 探针用来检测小麦-黑麦易位系中黑麦染色体片段的大小和易位断裂位点。此后, McIntyre 等^[82]对 *pSc119.2* 和 *pSc119.1* 进行了重新定位, 发现探针 *pSc119.1* 在黑麦

染色体上形成很强的杂交信号, 且呈离散型分布, 在小麦染色体上无杂交信号, 表明 *pSc119.1* 为黑麦染色体专化序列, 可以用来追踪小麦-黑麦杂种后代和易位系中的黑麦染色质。Ko 等^[83]也从黑麦基因组中分离出 Tyl-*copia* 家族反转录转座子序列 *pSc20H*, 产生的 FISH 信号遍布除端粒区、核仁组成区以外的全部黑麦染色体, 能够高效检测小麦-黑麦易位染色体的断裂位点。

但是, 对于基因组庞大的普通小麦, 要获得 A、B、D 基因组专化的全身性散布重复序列相对困难。Zhang 等^[84]利用来自粗山羊草(DD)的 BAC 克隆 *9M13* 和来自栽培一粒小麦(AA)的 BAC 克隆 *676D4* 进行双色 FISH, 同时区分了小麦的 3 个染色体组, 两个 BAC 克隆分别与小麦 D 组和 A 组染色体特异地结合, 产生分别遍布 D、A 组染色体的杂交信号。利用 *676D4* 还检测到了六倍体、四倍体小麦中的 A-B、A-G 基因组间易位。这种技术最大的好处是无需封阻, 不同基因组来源的染色体清晰可辨。在小麦-外源易位系的鉴定中, 将这种基于基因组专化的 BAC-FISH 技术与 GISH、分带、双端二体或端二体测交以及分子标记等细胞遗传学、分子遗传学技术相结合, 可以大大加快鉴定工作的进程。

4 展望

原位杂交技术经过近 40 年的发展, 在植物基因组研究中发挥了重要作用, 而基于 DNA 荧光标记的原位杂交技术已成为研究植物基因组组成、构建物理图和染色体识别的常规工具。随着各类植物基因组测序工作的展开, 大量的遗传信息将会被解读出来。但是, 由于测序技术的局限, 植物染色体着丝粒区、端粒区以及其它高度重复序列区域不可避免地会产生大量的物理“gap”, 而弥合这些“gap”在未来的一段时间里仍然离不开 FISH 技术。免疫沉降法与 FISH 的结合衍生了“Immuno-FISH”技术, 该技术在解释组蛋白修饰与基因组特异区域的关系、着丝粒专化蛋白与特异重复序列的关系、染色质结构与基因表达细胞分化的关系已取得重要进展^[85], 预示着 FISH 在表达水平上的应用有着广阔空间。

参考文献

- [1] Gall JG, Pardue ML. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1969, 63:378-383.
- [2] John HA, Birstiel ML, Jones KW. RNA-AND hybrids at the cytological level. *Nature*, 1969, 223:582-587.
- [3] Langer-Safer PR, Levine M, Ward DC. Immunological method for mapping genes on Drosophila polytene chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79:4381-4385.

- [4] Manuelidis L, Langer-Safer PR, Ward DC. High-resolution mapping of satellite DNA using biotin-labeled DNA probes. *J Cell Biol*, 1982, 95:619-625.
- [5] Singer RH, Ward DC. Actin gene expression visualized in chicken muscle tissue culture by using *in situ* hybridization with a biotinylated analog. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79:7331-7335.
- [6] Rayburn AL, Gill BS. Use of biotin-labeled probes to map specific DNA sequences on wheat chromosomes. *J Hered*, 1985, 76:78-81.
- [7] Reader SM, Abbo S, Purdie KA. Direct labeling of plant chromosome by rapid *in situ* hybridization. *Trend Genet*, 1994, 10:265-266.
- [8] Lichter P, Tang CC, Call K, et al. High-resolution mapping of human chromosome 11 by *in situ* hybridization with cosmid clones. *Science*, 1990, 247:64-69.
- [9] Leitch IJ, Leitch AR, Heslop-Harrison JS. Physical mapping of plant DNA sequences by simultaneous *in situ* hybridization of two differently labelled fluorescent probes. *Genome*, 1991, 34:329-333.
- [10] Mukai Y, Nakahara Y, Yamamoto M. Simultaneous discrimination of the three genomes in hexaploid wheat by multicolor fluorescence *in situ* hybridization using total genomic and highly repeated DNA probes. *Genome*, 1993, 36:489-494.
- [11] Durnam DM, Gelinas R, Myerson D. Detection of species specific chromosomes in somatic cell hybrids. *Somatic Cell Mol Genet*, 1985, 11:571-577.
- [12] Le HT, Armstrong KC, Miki B. Detection of rye DNA in wheat-rye hybrids and wheat translocation stocks using total genomic DNA as a probe. *Plant Mol Biol Rep*, 1989, 7:150-158.
- [13] Schwarzacher T, Leitch AR, Bennett MD. *In situ* localization of parental genomes in wide hybrid. *Ann Bot*, 1989, 64: 315-324.
- [14] Heslop-Harrison JS, Leitch AR, Schwarzacher T, et al. Detection and characterization of 1B/1R translocations in hexaploid wheat. *Heredity*, 1990, 65:385-392.
- [15] Mukai Y, Gill BS. Detection of barley chromatin added to wheat by genomic *in situ* hybridization. *Genome*, 1991, 34:448-452.
- [16] Leitch AR, Mosgöller W, Schwarzacher T, et al. Genomic *in situ* hybridization to sectioned nuclei shows chromosome domains in grass hybrids. *J Cell Sci*, 1990, 95:335-341.
- [17] Leitch AR, Schwarzacher T, Mosgöller W, et al. Parental genomes are separated throughout the cell cycle in a plant hybrid. *Chromosoma*, 1991, 101:206-213.
- [18] Le HT, Armstrong KC. *In situ* hybridization as a rapid means to assess meiotic pairing and detection of alien DNA transfers in interphase cells of wide crosses involving wheat and rye. *Mol Gen Genet*, 1991, 225:33-37.
- [19] Yu MQ, Deng GB, Zhang XP, et al. Effect of the ph1b mutant on chromosome pairing in hybrids between *Dasypyrum villosum* and *Triticum aestivum*. *Plant Breed*, 2001, 120:285-289.
- [20] Kenton A, Parokony AS, Gleba YY, et al. Characterization of the *Nicotiana tabacum* L. genome by molecular cytogenetics. *Mol Gen Genet*, 1993, 240:159-169.
- [21] Jellen EN, Gill BS, Cox TS. Genomic *in situ* hybridization differentiates between A/D- and C-genome chromatin and detects intergenomic translocations in polyploid oat species (genus *Avena*). *Genome*, 1994, 37:613-618.
- [22] Chen Q, Armstrong K. Genomic *in situ* hybridization in *Avena sativa*. *Genome*, 1994, 37:607-612.
- [23] Jiang J, Gill BS. Different species-specific chromosome translocations in *Triticum timopheevii* and *T. turgidum* supports diphyletic origin of polyploidy wheats. *Chromosome Res*, 1994, 2:59-64
- [24] Naranjo T, Roca A, Goicoechea A, et al. Arm homoeology of wheat and rye chromosomes. *Genome*, 1987, 29:873-882.
- [25] Naranjo T. Chromosome structure of durum wheat. *Theor Appl Genet*, 1990, 79:397-400.
- [26] Liu CJ, Atkinson MD, Chinoy CN, et al. Nonhomoeologous translocations between group 4, 5 and 7 chromosomes within wheat and rye. *Theor Appl Genet*, 1992, 83:305-312.
- [27] Tsunewaki K, Ogihara Y. The molecular basis of genetic diversity among cytoplasm of *Triticum* and *Aegilops*. II. On the origin of polyploid wheat cytoplasm as suggested by chloroplast DNA restriction fragment patterns. *Genetics*, 1983, 104:155-171.
- [28] Dvořák T. The origin of wheat chromosomes 4A and 4B and their reallocation. *Can J Genet Cytol*, 1983, 25:210-214.
- [29] Chen PD, Gill BS. The origin of chromosome 4A and genomes B and G of tetraploid wheats. In: Sakamoto S (Ed). Proceedings of the 6th international wheat genetics symposium, Kyoto, Japan, November 28-December 3, 1983. Plant Germ-Plasm Institute, Faculty of Agriculture, Kyoto University, Kyoto, Japan, 1984:39-48.
- [30] Gill BS, Chen PD. Role of cytoplasm-specific introgression in the evolution of the polyploid wheats. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84:6800-6804.
- [31] Friebe B, Jiang J, Raupp WJ, et al. Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to disease and pests: current status. *Euphytica*, 1996, 91:59-87.
- [32] King J, Armstead IP, Donnison IS, et al. Physical and genetic mapping in the grasses *Lolium perenne* and *Festuca pratensis*. *Genetics*, 2002, 161:315-324.
- [33] Khurstaleva LI, de Melo PE, van Heusden AW, et al. The integration of recombination and physical maps in a large-genome monocot using haploid genome analysis in a trihybrid *Allium* population. *Genetics*, 2005, 169:1673-1685.
- [34] Landegent JE, Jensen de Wal N, Dirks RW, et al. Use of whole cosmid cloned genomic sequences for chromosomal localization by non-radioactive *in situ* hybridization. *Hum Genet*, 1987, 77:366-370.
- [35] Sella L, Hermanson G, Eubanks JH, et al. Chromosomal *in situ* hybridization using yeast artificial chromosomes. *Genet Anal Tech Appl*, 1991, 8:59-66.
- [36] Viegas-Pé quignot E, Berrard S, Brice A, et al. Localization of a 900-bp-long fragment of the human choline acetyltransferase gene to 10q 11.2 by non-radioactive *in situ* hybridization. *Genomics*, 1991, 9:210-212
- [37] Lawrence JB, Singer RH, McNeil JA. Interphase and metaphase resolution of different distance within the human dystrophin gene. *Science*, 1990, 249:928-932.
- [38] Inazawa J, Ariyama T, Tokino T, et al. High resolution ordering of DNA markers by multi-color fluorescent *in situ* hybridization of prophase chromosomes. *Cytogenet Cell Genet*, 1994, 65:130 - 135.

- [39] Ried T, Baldini A, Rand TC, et al. Simultaneous visualization of seven different DNA probes by *in situ* hybridization using combinatorial fluorescence and digital imaging microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89:1388-1392.
- [40] Jiang JM, Gill BS, Wang GL, et al. Metaphase and interphase fluorescence *in situ* hybridization mapping of the rice genome with bacterial artificial chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92:4487-4491.
- [41] Flavell RB. Repeated sequences and chromosome evolution in plants. *Trans R Soc Lond B*, 1986, 312:227-242.
- [42] Dvořák T, Zhang HB, Kota RS, et al. Organization and evolution of the 5S ribosomal RNA gene family in wheat and related species. *Genome*, 1989, 32:1003-1016.
- [43] Mukai Y, Endo TR, Gill BS. Physical mapping of the 5S rRNA multigene family in common wheat. *J Hered*, 1990, 81:290-295.
- [44] Mukai Y, Endo TR, Gill BS. Physical mapping of the 18S.26S rRNA multigene family in common wheat: Identification of a new locus. *Chromosoma*, 1991, 100:71-78.
- [45] Jiang J, Gill BS. New 18S-26S ribosomal RNA gene loci: chromosomal landmarks for the evolution of polyploid wheats. *Chromosoma*, 1994, 103:179-185.
- [46] Li WL, Chen PD, Qi LL, et al. Isolation, characterization and application of a species-specific repeated sequence from *Haynaldia villosa*. *Theor Appl Genet*, 1995, 90:526-533.
- [47] Cheng ZK, Buell CR, Wing RA, et al. Resolution of fluorescence *in situ* hybridization mapping on rice mitotic prometaphase chromosomes, meiotic pachytene chromosomes and extended DNA fibers. *Chromosome Res*, 2002, 10:379-387.
- [48] De Jong JH, Fransz P, Zabel P. High resolution FISH in plants - techniques and applications. *Trends Plant Sci*, 1999, 4:258-263.
- [49] Trask BJ, Massa HF, Burmeister M. Fluorescence *in situ* hybridization establishes the cen - DXS28(C7) - DXS67(B24) - DXS68(L1) - tel in human chromosome Xp21.3. *Genomics*, 1992, 13:455-457.
- [50] Heng HHQ, Squire J, Tsui LC. High resolution mapping of mammalian genes by *in situ* hybridization to free chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89:9509 - 9513.
- [51] Fransz PF, Alonso-Blanco C, Liharska TB, et al. High-resolution physical mapping in *Arabidopsis thaliana* and tomato by fluorescence *in situ* hybridization to extended DNA fibres. *Plant J*, 1996, 9(3):421-430.
- [52] Jackson SA, Wang ML, Goodman HM, et al. Application of fiber-FISH in physical mapping of *Arabidopsis thaliana*. *Genome*, 1998, 41:566-572.
- [53] Jackson SA, Cheng ZK, Wang ML, et al. Comparative fluorescence *in situ* hybridization mapping of a 431-kb *Arabidopsis thaliana* bacterial artificial chromosome contig reveals the role of chromosomal duplications in the expansion of the Brassica rape genome. *Genetics*, 2000, 156:833-838.
- [54] Mesbah M, Eden JW, de Jong JH, et al. FISH to mitotic chromosomes and extended DNA fibres of beta procumbens in a series of monosomic addition to beet (*B.vulgaris*). *Chromosome Res*, 2000, 8:285-293.
- [55] Ohmido N, Kijima K, Akiyama Y, et al. Quantification of total genomic DNA and selected repetitive sequences reveals concurrent changes in different DNA families in indica and japonica rice. *Mol Gen Genet*, 2000, 263:388-394.
- [56] Wolters A-MA, Trindade LM, Visser J. Fluorescence *in situ* hybridization on extended DNA fibers as a tool to analysis complex T-DNA loci in potato. *Plant J*, 1998, 13(6):837-847.
- [57] Jin WW, Melo JR, Nagaki K, et al. Maize centromeres: organization and functional adaptation in the genetic back ground of oat. *Plant Cell*, 2004, 16:571-581.
- [58] Appels R, Driscoll C, Peacock WJ. Heterochromatin and highly repeated DNA sequences in rye (*Secale cereale*). *Chromosoma*, 1978, 70:67-89.
- [59] Rayburn AL, Gill BS. Molecular evidence for the origin and evolution of chromosome 4A in polyploid wheats. *Can J Genet Cytol*, 1985, 27:246-250.
- [60] Rayburn AL, Gill BS. Molecular identification of the D-genome chromosomes of wheat. *J Hered*, 1986, 77:253-255.
- [61] Rayburn AL, Gill BS. Isolation of a D-genome specific repeated DNA sequence from *Aegilops squarrosa*. *Plant Mol Biol Rep*, 1987, 4:102-109.
- [62] Jones JDG, Flavell RB. The mapping of highly-repeated DNA families and their relationship to C-bands in chromosomes of *Secale cereale*. *Chromosoma*, 1982, 86:595-612.
- [63] Mukai Y, Friebe B, Gill BS. Comparison of C-banding patterns and *in situ* hybridization sites using highly repetitive and total genomic rye DNA probe of 'Imperial' rye chromosomes added to 'Chinese Spring' wheat. *Jpn J Genet*, 1992, 67:71-83.
- [64] Bedbrook JR, Jones J, O'Dell M, et al. A molecular description of telomeric heterochromatin in *Secale* species. *Cell*, 1980, 19:545-560.
- [65] Appels T, Dennis ES, Smyth DR, et al. Two repeated DNA sequences from the heterochromatin regions of rye (*Secale cereale*) chromosomes. *Chromosoma*, 1981, 84:265-277.
- [66] Pedersen C, Rasmussen SK, Linde-Laursen I. *Genome* and chromosome identification in cultivated barley and related species of the Triticeae (Poaceae) by *in situ* hybridization with the GAA-satellite sequence. *Genome*, 1996, 39:93-104.
- [67] Pedersen C, Langridge P. Identification of the entire chromosome complement of bread wheat by two-color FISH. *Genome*, 1997, 40:589-593.
- [68] Schröck E, du Manoir S, Veldman T, et al. Multicolor Spectral Karyotyping of Human Chromosomes. *Science*, 1996, 273:494-497.
- [69] Endo TR. Complete identification of common wheat chromosomes by means of the C-banding technique. *Jpn J Genet*, 1986, 61:89-93.
- [70] Gill BS, Friebe B, Endo TR. Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome bands and structural aberrations in wheat (*Triticum aestivum*). *Genome*, 1991, 34:830-839.
- [71] Hutchinson J, Seal AG. A sequential *in situ* hybridization and C-banding technique. *Heredity*, 1983, 51:507-509.
- [72] Jiang J, Gill BS. Sequential chromosome banding and *in situ* hybridization analysis. *Genome*, 1993, 36:792-795.
- [73] Zhong SB, Zhang DY, Li HB, et al. Identification of *Haynaldia villosa* chromosomes added to wheat using a sequential C-banding and

- genomic *in situ* hybridization technique. *Theor Appl Genet*, 1996, 92:116-120.
- [74] 别同德,汪乐,何华纲,等.一个花粉辐射诱导的小麦-簇毛麦相互易位染色体系的分子细胞遗传学研究. *作物学报*, 2007, 33(9): 1432-1438.
- [75] Castilho A, Miller TE, Heslop-Harrison JS. Physical mapping of translocation breakpoints in a set of wheat-Aegilops umbellulata recombinant lines using *in situ* hybridization. *Theor Appl Genet*, 1996, 93:816-825.
- [76] Dong FG, McGrath JM, Helgeson JP, et al. The genetic identity of alien chromosomes in potato breeding lines revealed by sequential GISH and FISH analyses using chromosome-specific cytogenetic DNA markers. *Genome*, 2001, 44:729-734.
- [77] Ribeiro-Carvalho C, Guedes-Pinto H, Heslop Harrison JS, et al. Introgression of rye chromatin on chromosome 2D in the Portuguese wheat landrace 'Barbela'. *Genome*, 2001, 44:1122-1128.
- [78] Nagy ED, Moinar-Lang M, Linc G, et al. Identification of wheat-barley translocations by sequential GISH and two-colour FISH in combination with the use of genetically mapped barley SSR markers. *Genome*, 2002, 45:1238-1247.
- [79] Song J, Dong F, Jiang J. Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library for potato molecular cytogenetics research. *Genome*, 2000, 43:199-204.
- [80] Dong F, Song J, Naess SK, et al. Development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato. *Theor Appl Genet*, 2000, 101:1001-1007.
- [81] Lapitan NLV, Sears RG, Rayburn AL, et al. Wheat-rye translocations: detection of chromosome breakpoints by *in situ* hybridization with a biotin-labeled DNA probe. *J Hered*, 1986, 77:415-419.
- [82] McIntyre CL, Pereira S, Moran ZB. New *secale cereale* rye DNA derivatives for the detection of rye chromosome segments in wheat. *Genome*, 1990, 33:635-640.
- [83] Ko JM, Do GS, Suh DY, et al. Identification and chromosomal organization of two rye genome-specific RAPD products useful as introgression markers in wheat. *Genome*, 2002, 45:157 - 164.
- [84] Zhang P, Li W, Friebe B, et al. Simultaneous painting of three genomes in hexaploid wheat by BAC-FISH. *Genome*, 2004, 47: 979-987.
- [85] Jiang J, Gill BS. Current status and the future of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome*, 2006, 49: 1057-1068.