

玉米 DNA 纤维的制备及端粒 DNA 的 Fiber-FISH

赵丽娟, 刘良科, 李立家

(1. 怀化学院生物工程系, 湖南怀化 418008; 2. 武汉大学生命科学院植物发育生物学教育部重点实验室, 湖北武汉 430072)

摘要 [目的] 建立了一种快速制备 DNA 纤维的方法, 用端粒 DNA 在玉米纤维上进行物理定位。[方法] 采用刀切法从玉米嫩叶中提取细胞核。以端粒 DNA 为探针, 在玉米 DNA 纤维上进行伸展 DNA 纤维的荧光原位杂交 (Fiber-FISH), 研究端粒 DNA 重复序列在玉米染色体上的拷贝数。[结果] 用刀切法提取玉米细胞核, 提高了核的完整性, 并改善了 DNA 纤维的制备效果。玉米细胞核裂解的最佳时间为 8~9 min。玉米的 Fiber-FISH 试验结果表明, 杂交信号为伸展的念珠状长链, 玉米各条染色体端粒 DNA 的长度为 7~103 μm, 各染色体端粒重复序列的拷贝数存在显著差异 (为 15~230 kb)。[结论] 玉米各染色体中端粒的长度可能不同, 而且随着玉米生长及环境的变化, 各条染色体端粒 DNA 长度的变化也不一致。

关键词 玉米; 端粒 DNA 纤维荧光原位杂交; 拷贝数

中图分类号 S513 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)06-02251-02

Preparation of DNA fiber in Maize and Fiber-FISH of Telomere DNA

ZHAO Li-juan et al (Department of Biological Engineering, Huaihua College, Huaihua, Hunan 418008)

Abstract [Objective] The research aimed to establish a rapid preparation method of DNA fiber and use telomere DNA for physical location on maize fibers. [Method] Cell nucleus were extracted from tender leaves of maize by jackknife method. With telomere DNA as probes, the extended DNA fiber fluorescence in situ hybridization (Fiber-FISH) was made on DNA fiber in maize to study the copy number of the repeated sequences of telomere DNA on maize chromosome. [Result] Extracting cell nucleus from maize by jackknife method increased the integrity of nucleus and improved the preparation effects of DNA fibers. The optimum time for the cracking of cell nucleus in maize was 8~9 min. The results of Fiber-FISH test in maize indicated that the hybridization signal was the extended念珠状长链, the length of telomere DNA in each chromosome of maize was 7~103 μm and the copy numbers of the repeated sequences of telomere among each chromosome had significant differences (15~230 kb). [Conclusion] The telomere length in each chromosome of maize was possibly different. With the growth of maize and the changes of the environment, the changes of telomere DNA in each chromosome were also inconsistent.

Key words Maize; Telomere DNA; Fiber-FISH; Copy number

自从 Heng 等^[1-3] 在制备出的 DNA 纤维 (Extended DNA fiber) 上进行原位杂交获得成功以来, 伸展 DNA 纤维原位杂交 (Fiber fluorescent in situ hybridization, Fiber-FISH) 技术已在人类基因组研究、物理图谱构建、染色体畸变研究等方面得到了广泛的应用^[4-9]。

植物细胞与人类和动物细胞具有不同的结构特点, 所以 DNA 纤维技术在植物中的应用滞后于在人类和动物上的发展^[1-4]。与人类和动物 DNA 纤维上进行原位杂交时用游离单细胞作为制备 DNA 纤维的材料不同^[5], 植物细胞 DNA 纤维制备的最大障碍是细胞壁的存在以及染色体 DNA 的降解和细胞器 DNA 对基因组的污染。1996 年, Frasz 等^[10] 首先将这一技术引入植物拟南芥和番茄的小重复序列和 cosmid 连接群 (contig) 研究, 之后人们在水稻、玉米、小麦、甜菜和油菜等多种植物中都成功地进行了应用^[10-13]。

目前的研究主要采用液氮研磨法制备 DNA 纤维, 但此法需用到有毒物 - 巯基乙醇, 而且研磨的时间也很难掌握。该研究参照彭莉莉等^[6] 的方法并加以改进, 以玉米的黄化苗为材料用刀切的方法分离出细胞核, 通过 SDS (十二烷基硫酸钠) 破坏细胞核膜并使 DNA 分子与复合的蛋白质分离而形成游离的 DNA 纤维, 从而避免了 - 巯基乙醇的使用, 建立了从嫩叶中制备 DNA 纤维的简易、安全、快速的方法。并用端粒 DNA 在玉米纤维上进行了物理定位。

1 材料与方

(1) 植物材料: 玉米 (遗单六号)。

(2) 染色体及 rDNA 序列的制备。大麦根尖染色体制片

按火焰干燥的方法。碱裂解法提取端粒 DNA。

提取细胞核: 参照 Li 等^[13] 的方法, 取健康的幼嫩叶片 (黄化苗, 3~4 d), 加冰冷细胞核提取缓冲液 (MgSO₄ Buffer 5.760 μl, DTT 6 μg, 10% Triton-100 150 μl) 用锋利的手术刀将叶片切碎至极细小的匀浆状, 将此匀浆混合液在 33 μm 孔径的尼龙膜上过滤到 1.5 ml 离心管中, 13 200 r/min 高速离心 40 s, 沉淀重悬, 此时得到的分散均一的重悬液即是浓度适中的细胞核提取液, 冰上直接用于 DNA 纤维的制备, 或者加等体积的甘油于 -20℃ 保存。

(3) 伸展核 DNA 纤维。吸取 1~2 μl 核悬浮液, DNA 纤维制备采用钟筱波等^[5] 的方法, 稍作改进。具体步骤如下: 吸取 1~2 μl 细胞核提取液置于经处理的干净载玻片的一端, 用枪头均匀地涂成一条直线, 空气中室温下晾至半干状态, 大约 3 min, 在细胞核提取液的痕迹上覆盖 40 μl 核裂解缓冲液 STE (0.5% SDS, 5 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris, pH 值 7.0), 室温下 (冬季一般放在 25℃ 水中预热) 在载玻片上充分裂解细胞核 8~9 min; 用干净玻片侧斜 45°, 其边缘刚好与进行裂解细胞核的原载玻片表面接触, 使核裂解液缓慢平稳地从载玻片的一端铺展地拉到另一端, 游离的 DNA 分子便会形成平行 DNA 纤维, 室温干燥 10 min; 甲醇 (乙醇: 冰乙酸 3:1) 固定 2 min; 60℃ 烘干 30 min, 选样片 PI 染色, 在荧光显微镜下检查 DNA 纤维的质量。制片可马上用于杂交, 也可贮于 -20℃ 下干燥保存备用。

(4) 探针标记。用生物素 11-dUTP 标记探针, 均采用随机引物法标记。完成后进行原位杂交, 并在荧光显微镜上检测原位杂交信号并在相关软件上进行图像检测分析。

2 结果与分析

核提取的质量对 DNA 纤维的制备有重要的影响, 当前

作者简介 赵丽娟 (1979-), 女, 湖南溆浦人, 硕士, 讲师, 从事植物分子细胞遗传学研究。

收稿日期 2007-12-20

主要采用液氮研磨法制备 DNA 纤维,而且不同的物种研磨的时间不同,需要不断重复。但核的完整性低,特别是对基因组较大、重复序列较多的物种,用液氮研磨对核损耗大,严重影响了实验结果。

玉米基因组在植物中属于较大的,约含28 亿个碱基对,与人类基因组的大小相当,比拟南芥基因组大21 倍。其基因组复杂,80% 以上的基因组 DNA 由重复序列组成,只有约15% 为编码基因。由于大量重复序列的存在,使得玉米 DNA 纤维的制备中有许多需要解决的问题,例如:如何保证核的提取产量,纤维的完整性,及后续的 Fiber-FISH 杂交的可行性等。所以,用液氮研磨法提核制备玉米 DNA 纤维的成功率极低,更不能保证 Fiber-FISH 杂交的进行。

该研究中,根据文献[6 - 7]所述的实验方法制备玉米(遗单六号) DNA 纤维,核的提取采用刀切法代替了液氮研磨,提高了核的完整性,DNA 纤维制备的效果也大大提高,如图1-a,1-b 所示(用 PI 染色),从图1-a 中可以清楚地看到 DNA 纤维或平行或交织,这可能是由于核的密度较大造成的,图1-b 中纤维从玉米细胞核中拉出,图中右下是着色深的核,呈放射状的是从核中拉出的 DNA 纤维。

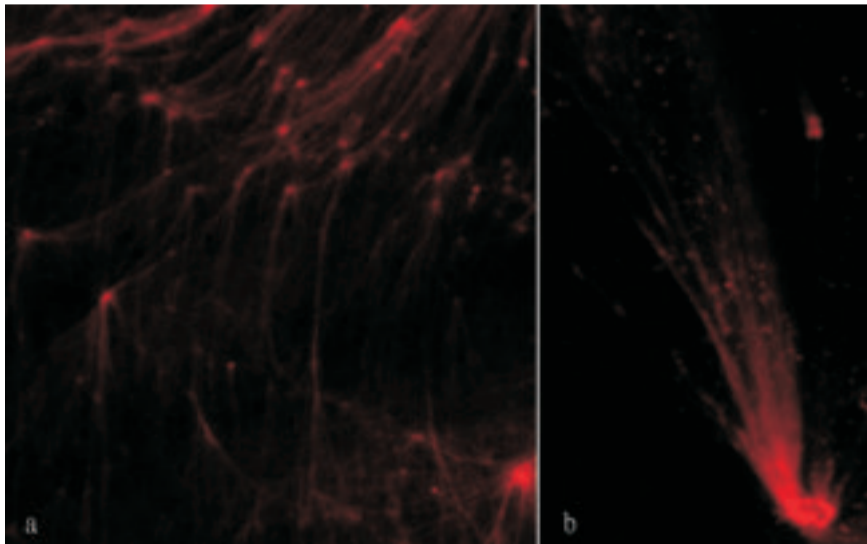


图1 PI(3 µg/ml) 染色的玉米 DNA 纤维

Fig.1 DNA fiber of corn staining with PI(3 µg/ml)

在 DNA 纤维的制备中,要注意核裂解的时间,不同物种裂解时间不同。就玉米而言,8 ~9 min 即可,时间过长则核的破坏程度大,影响纤维的完整;时间过短,则核未裂解,纤维不易拉出,影响纤维的产量。

该实验中除了获得大量的玉米 DNA 纤维,还以端粒 DNA 为探针,在玉米 DNA 纤维上进行了纤维原位杂交,杂交信号为伸展的念珠状长链。这与已报道的动物和植物的伸展 DNA 纤维杂交结果相似,但其原因目前尚不完全清楚。有学者认为,两念珠之间的间隙是由于 DNA 变性过程中靶 DNA 部分丢失的结果。此外,在杂交过程中探针 DNA 片段与靶 DNA 是随机相遇并进行结合的,靶 DNA 有的区域得到了充分的结合,另一些区域则很少或没有结合。因此,念珠的大小是不一致的,念珠之间的间隙区域就是没有得到结合的部分,这些解释还有待于进一步验证。不管形成念珠状信号的原因如何,毫无疑问,它们所代表的是 Fiber-FISH 的真实结果,相反,在显微镜下有时可见到连续的与念珠信号颜色相同的线条,这些线条光滑,不同部位的大小和亮度几乎没有差别,这不可能由 DNA 杂交形成,多半是荧光染料污染的结果。鉴定 Fiber-FISH 成功与否,或杂交信号是否真实,信号

是否连续,形状如何是关键的标准。

3 结论和讨论

端粒 DNA 在染色体上的组成及变化一直都是生物研究的一个重要方面,在植物中 Zhong 等^[12] 在番茄 DNA 纤维上以端粒 DNA 为探针进行 Fiber-FISH,根据杂交结果对番茄的端粒序列及亚端粒序列的结构、组成及变化作了比较精确的分析。该实验中为了确定拷贝数,需要知道显微镜下一定长度 DNA 纤维所含碱基对数,为此,测量了两个已知碱基对数 DNA 序列的伸展纤维在显微镜的长度,所用数据参考文献[7,14],即以2.51 kb/µm 为标准,测定图2 中各段端粒 DNA 杂交纤维的长度(已知重复序列约为132 bp^[15],亚端粒结构的长度为几个kb),结果见表1。

表1 检测到的带荧光信号的 DNA 纤维长度及数目

Table 1 The length and number of DNA fiber marked with fluorescence signal detected

长度 µm Length	条数 条 Number
10 ~20	5(11,14,5,15,13)
20 ~30	2(7,12)
30 ~40	4(3,4,6,18)
40 ~50	2(1,8)
50 ~60	5(9,10,16,17,2)

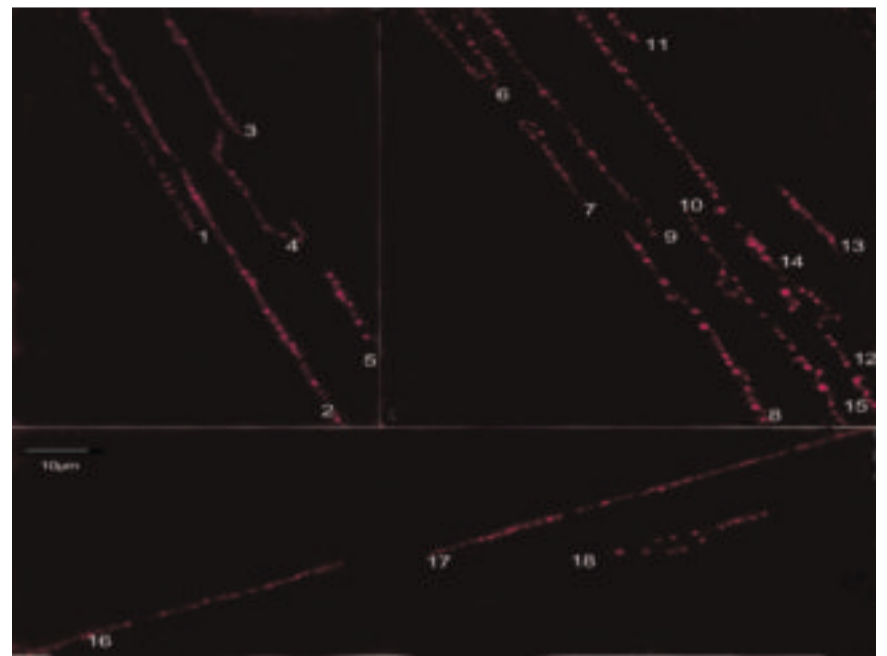


图2 Fiber-FISH

Fig 2 Fiber-FISH

从表1 及图2 虽然还不能肯定地判断出各条纤维来自第几号染色体,但可以明显地看出玉米各条染色体端粒 DNA 的长度不同(7 ~103 µm),因而从 DNA 纤维的长度及杂交信号的强弱可以初步了解各条染色体端粒重复序列的拷贝数存在显著的差异(15 ~230),当然不完全排除实验中 DNA 纤维长度的不稳定性,这也从另一个方面反映了玉米各染色体中端粒的长度很可能是不同的,而且随着玉米生长及环境的变化,各条染色体端粒 DNA 长度的变化不一致,与端粒 DNA 在人类及动物的研究意义相比较,在植物中的研究过程要复杂,而该过程与植物寿命的长短到底存在怎样的联系,还有待进一步研究。

参考文献

- [1] HENG H H, SQUIRE J, TSU L C. High resolution mapping of mammalian genes by in situ hybridization to free chromatin[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(20): 9509-9513.

性炭,能有效降低外植体的褐变(表3)。由表3可知,加入活性炭后,基本未褐变,但苗的增殖率有所下降。

表2 不同激素浓度对褐变的影响

Table 2 Effects of different hormone concentration on browning

培养基 编号 No. of medium	BA 浓度 ng/L BA conc- entration	NAA 浓度 ng/L NAA concen- tration	芽的生 长状况 Growth status	褐变 程度 Browning degree
A ₁	1.0	0.1	分化少,生长缓慢,芽暗绿 With a little of buds differentiated, assumed sap green and slow growth	+++
A ₂	1.5	0.1	分化较少,芽暗绿 With less buds differentiated and assumed sap green	++
A ₃	2.0	0.1	分化较多,芽鲜绿、细长 With more buds differentiated, assumed fresh green and slightness	+
A ₄	3.0	0.1	分化多,芽短粗、绿 With many buds differentiated, assumed green, short and thick	+
A ₅	4.0	0.1	分化较少,芽暗绿 With less buds differentiated and assumed sap green	++

表3 活性炭对褐变的影响

Table 3 Effects of active carbon on browning

处理 Treatment	芽的生长状况 Growth status	褐变程度 Browning degree
加活性炭 With active carbon	生长健壮,分化出苗数有所下降 Buds assumed robust growth, No. of differentiated seedling declined slightly	N
不加活性炭 Without active carbon	分化较多,芽鲜绿、细长 With more buds differentiated, assumed fresh green and slightness	+

注:N代表不发生褐变。

Nte: N means no browning.

2.4 培养温度对褐变率的影响 库拉索芦荟培养过程中温

度应恒定。温度过低或过高,都不利于其生长,从而导致褐变的发生。研究认为,培养温度25 可降低褐变程度(表4)。

表4 不同培养温度对褐变的影响

Table 4 Effects of different temperature in tissue culture on browning

培养温度 Culture temperature	芽的生长状况 Growth status	褐变程度 Browning degree
18	芽暗绿,生长慢 Buds assumed sap green and growth slowly	++
25	芽鲜绿、细长 Buds assumed fresh green and slightness	+
30	芽暗绿,生长缓慢 Buds assumed sap green and growth slowness	+++

3 结论与讨论

从库拉索芦荟不同外植体类型的褐变情况来看,几种类型的外植体材料均有不同程度的褐变,特别是随着时间的积累,外植体的褐变程度无一例外地加深,轻则抑制材料的生长,重则导致死亡。由于茎尖具有较强的分生能力,整个外植体生长较旺盛,其褐变程度较低,因此,茎尖是最佳外植体。培养基中适宜的细胞分裂素浓度可以减轻或抑制褐变,这在很多植物的组培研究中都得到证实^[2-3],该试验也表明,适宜的6-BA浓度(2.0 ng/L)对库拉索芦荟的褐变现象有较好的抑制作用。研究还发现,在培养基中添加500.0 ng/L的活性炭,采用适宜的培养温度(25),均能较好地防止库拉索芦荟褐变死亡的发生。

参考文献

- [1] 阙国宁,郭达初,李金田. 树木组织培养[M]. 北京: 中国林业出版社, 1988.
- [2] 罗士韦,许智宏. 经济植物组织培养[M]. 北京: 科学出版社, 1988.
- [3] 容世清,曾少玲. 桉树无性系——湛江6号的工厂化微繁研究初报[J]. 桉树科技, 1995(2): 58-60.

(上接第2252页)

- [2] WEGANT J, KALLE W, MULLENDERS L, et al. High resolution in situ hybridization using DNA halo preparations[J]. Human Mol Genet, 1992, 1: 587-591.
- [3] PARRAI, WINDLE B. High resolution visual mapping of stretched DNA by fluorescence hybridization[J]. Nature Genet, 1993, 5: 17-21.
- [4] FRANZ P F, ALONSO BLANCO C, IIHARSKA T B, et al. High resolution physical mapping in Arabidopsis thaliana and tomato by fluorescence in situ hybridization to extend DNA fibers[J]. The Plant J, 1996, 9(3): 421-430.
- [5] 钟筱波, FRANZ P F, DE JONG J H. 在植物粗线期染色体和DNA纤维上的荧光原位杂交技术[J]. 遗传学报, 1998, 25(2): 142-149.
- [6] 彭莉莉, 赵丽娟, 宋运淳, 等. 水稻中期染色体和DNA纤维的高效制备技术[J]. 武汉植物学研究, 2004, 22(4): 364-367.
- [7] II ZONGYUN, HUANG SILUO, JIN WEI WEI, et al. Determination of copy number for 5S rDNA and centromeric sequence RCS2 in rice by fiber-FISH[J]. Chinese Science Bulletin, 2002, 47(3): 214-217.
- [8] BRUNNER R M, GOLDAMMER F T R. Genomic organization of the bovine aromatase encoding gene and a homologous pseudogene as revealed by DNA fiber

FISH[J]. Cytogenet cell Genet, 1998, 82(1/2): 37-40.

- [9] SUTO Y, ISHIKAWA Y, HYODO H, et al. Gene organization and rearrangements at the human Rhesus blood group locus revealed by fiber-FISH analysis[J]. Hum Genet, 2000, 106(2): 164-171.
- [10] FRANZ P F, ALONSO BLANCO C, IIHARSKA T B, et al. High resolution physical mapping in Arabidopsis thaliana and tomato by fluorescence in situ hybridization to extend DNA fibers[J]. The Plant J, 1996, 9(3): 421-430.
- [11] DE JONG J H, FRANZ P F, ZABEL P. High resolution FISH in plants - techniques and applications[J]. Trends in Plant Science, 1999, 4(7): 258-263.
- [12] ZHONG X B, FRANZ P F, JANIE WENNEKES VAN EDEN J, et al. FISH studies reveal the molecular and chromosomal organization of individual telomere domains in tomato[J]. The Plant J, 1998, 13(4): 507-517.
- [13] II JIA II, JINING YANG, QIONG TONG, et al. A novel approach to prepare extended DNA fibers in plants[J]. Cytometry Part A, 2005, 63: 114-117.
- [14] MESBAH M, WENNEKES VAN EDEN J, DE JONG J H, et al. FISH to mitotic chromosomes and extend DNA fibers of Beta Vulgaris in a series of non-sonic addition to beet (B. vulgaris) [J]. Chromosome Research, 2000, 8: 285-293.