

甘蓝 2 号染色体的高分辨率 5S rDNA 荧光原位杂交

王永, 朱利泉, 荣小营, 陈晓丹, 唐章林, 王小佳

(西南大学农学与生物科技学院, 重庆 400716)

摘要: 【目的】羽衣甘蓝 5S rDNA 的染色体定位和拷贝数分析, 为进一步利用 FISH 进行 2 号染色体基因定位和细胞遗传图谱构建奠定基础。【方法】以羽衣甘蓝为材料, 采用荧光原位杂交技术将 DIG 标记的 5S rDNA 探针定位于不同分辨率的绒毡层细胞中期染色体、粗线期染色体以及伸长 DNA 纤维上。【结果】在中期染色体和粗线期染色体上, 都同时获得 3 个杂交信号位点 (a、b、c), 且位于 2 号染色体的长臂近着丝粒区域, 其信号强度为 $b > a > c$; 而在伸长 DNA 纤维上, 出现了 3 种不同长度的念珠状长链 (a、b、c), 其物理大小分别为 257、359 和 134 kb, 这 3 种长链分别与 3 个信号位点形成一一对应关系。【结论】在羽衣甘蓝 2 号染色体上存在 3 个串联重复位点, 粗略估算出 3 个 5S rDNA 位点的拷贝数分别为 510、712 和 266。

关键词: 羽衣甘蓝; 5S rDNA; 荧光原位杂交

Study on High-Resolution 5S rDNA –FISH of *Brassica oleracea* Chromosome 2

WANG Yong, ZHU Li-quan, RONG Xiao-ying, CHEN Xiao-dan, TANG Zhang-lin, WANG Xiao-jia

(College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716)

Abstract: 【Objective】 The aim of this experiment is to localize 5S rDNA on the chromosomes of *Brassica oleracea* var. *acephala* by FISH (fluorescence *in situ* hybridization) and estimate the copy number of 5S rDNA, further provide a basis for the location of genes and the construction of cytogenetic map of chromosome 2 by FISH. 【Method】 *B. oleracea* var. *acephala* was used as the experimental material, 5S rDNA probe was labeled by PCR-DIG(PCR-digoxigenin). By FISH, 5S rDNA probe was located on the metaphase chromosomes of tapetal cell, pachytene chromosomes and extended DNA fibers (EDF). 【Result】 In the metaphase chromosomes of tapetal cell and pachytene chromosomes, it was observed that three closely adjacent 5S rDNA hybridization signal sites (a, b, c) located near the centromere in the long arm of the submetacentric chromosome 2, the intensity of signals is $b > a > c$. In the extended DNA fibers, it was estimated that the physical size of three different stretches of beads-on-string (a, b, c) is of the order of 257 kb, 359 kb, and 134 kb, respectively. 【Conclusion】 It was proved that *B. oleracea* var. *acephala* contains three tandem repeat sites, and estimated that the copies number of three 5S rDNA locus are about 510, 712, and 266, respectively.

Key words: *Brassica oleracea* var. *acephala*; 5S rDNA; fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

0 引言

【研究意义】甘蓝 (*Brassica oleracea*) 是芸薹属植物的 3 个基本种之一, 也是多国芸薹属基因组计划的研究对象之一。5S rDNA 是以串联重复的形式排列在染色体上, 其相对物理位置、位点数目和拷贝数对于基因定位和细胞遗传图谱的构建具有非常重要的意

义。【前人研究进展】5S rRNA 是核糖体大亚基的组成成分之一, 约由 120 个核苷酸组成。5S rDNA 转录区含有 3 个内转录调控区域, 即 Box A、IE (intermediate element) 和 Box C^[1]。在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 等高等植物中, 也存在类似的结构^[2]。5S rDNA 基因高度保守, 以串联重复的方式存在于核基因组中, 基因之间存在非转录间隔区 (non-transcribed spacer,

收稿日期: 2009-03-18; 接受日期: 2009-07-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30671429)、重庆市自然科学基金资助项目 (9266)

作者简介: 王永 (1976—), 男, 四川兴文人, 博士研究生, 研究方向为生化与分子生物学。Tel: 13618226315; E-mail: wangyongswau@126.com。
通信作者朱利泉 (1962—), 男, 四川威远人, 教授, 研究方向为细胞信号传导。Tel: 02368251264; E-mail: zhuliquan@swu.edu.cn。
通信作者王小佳 (1956—), 男, 四川南溪人, 教授, 研究方向为生物遗传育种。Tel: 02368251234; E-mail: wxj@swu.edu.cn

NTS), NTS 在物种间, 甚至同一物种内, 都具有较大的差异^[3]。因此, NTS 是研究物种间或物种内进化关系的最佳选择^[4-5]。荧光原位杂交技术 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 是 20 世纪 80 年代末发展起来的一种重要的分子细胞遗传学工具, 它已广泛地应用于动植物基因组结构研究、染色体结构的分析、物理图谱以及细胞遗传图谱的构建^[6-8]。限制 FISH 技术应用的关键因素是靶 DNA 的分辨率, 如何提高 FISH 分辨率是基因定位成功与否的关键所在。随着 FISH 技术的不断发展, 靶 DNA 载体从开始的中期染色体发展为伸长 DNA 纤维 (extended DNA fibers, EDF)^[9-11], 分辨率也不断地提高。伸长 DNA 纤维是裸露的 DNA 分子, 伸展长度理论上应与 Watson-Crick 模型中 B-DNA 的长度接近, 即 $2.97 \text{ kb} \cdot \mu\text{m}^{-1}$, 大量的试验证明了染色体纤维伸展长度为 $2.5 \sim 3.5 \text{ kb} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ ^[12-14]。在十字花科植物中, 5S rDNA 基因在不同的物种基因组中位点数目和分布情况都有一定的研究, 如 Murata 等^[15]和 Fansz 等^[16]利用 FISH 技术将 5S rDNA 定位在拟南芥的 3、4、5 号染色体上; Armstrong 等^[6]和 Howell 等^[7]将 5S rDNA 定位在芥蓝 (*Brassica oleracea* var. *alboglabra*) 的 2 号染色体上; Snowdon 等^[17]和 Hoda 等^[18]利用 5S rDNA 对其它十字花科植物的染色体作了粗略的定位研究。这些研究表明, 5S rDNA 在不同的物种之间位点数目和分布情况是有区别的。【本研究切入点】以往研究中, 5S rDNA 的定位多以 FISH 分辨率较低的中期或粗线期染色体为靶 DNA, 而将 5S rDNA 同时在 3 种不同分辨率的靶 DNA 上, 尤其是在伸长 DNA 纤维上的定位研究尚未见报道。【拟解决的关键问题】本研究以羽衣甘蓝 (*Brassica oleracea* var. *acephala*) 为材料, 以 5S rDNA 为探针, 在绒毡层细胞中期染色体、粗线期染色体和伸长 DNA 纤维上进行 FISH 杂交, 旨在分析 5S rDNA 在羽衣甘蓝染色体上的详细分布情况, 并进一步估算其拷贝数。

1 材料与方 法

1.1 植物材料

典型的自交不亲和和羽衣甘蓝自交系 Ay287, 由挂靠于西南大学的重庆市油菜工程中心提供。

1.2 DNA 的提取和 5S rDNA 基因及间隔序列的克隆

总 DNA 用 CTAB 法从叶子中抽提, 5S rDNA 基因及 NTS 通过 PCR 扩增获得。引物依据 *Sinapis alba* 的 5S rRNA 序列 (No: X56866) 设计, 上游引物: 5'-GGATGGGTGACCTCCCGGGAAGTCC-3'; 下游引

物: 5'-TAGTACTACTCTCGCCCAAGCACGC-3', 由上海英俊生物公司合成。PCR 扩增条件: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 4 min, $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 50 s, 共 35 个循环。PCR 产物经 1% (w/v) 的琼脂糖凝胶电泳检测。切取 PCR 产物目的条带并用胶回收试剂盒 (WATSON BIOTECHNOLOGIES) 纯化, 应用 pMD18-T Vector 连接并转化到大肠杆菌培养。挑取 24 个单斑克隆, 进行 PCR 电泳检测和测序测定 (上海英俊生物公司)。

1.3 羽衣甘蓝绒毡层细胞中期染色体和花粉母细胞粗线期染色体的制备

参照 Wang 等^[8]的方法并稍作改进。材料种植于重庆市油菜工程中心, 于 3 月上旬晴天 9:00—12:00 取幼蕾于卡诺固定液 (乙醇:乙酸=3:1) 中固定 24 h 后, 转入 70% (v/v) 乙醇中, 在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下保存备用。取一个花药采用卡宝品红染色压片, 火焰微烤上色, 用 Nikon 光学显微镜观察, 当观察到绒毡层细胞中期染色体或花粉母细胞粗线期染色体后, 则把其余的 5 个花药放入 1.5 ml 的离心管中, 并分别加 2% (w/v) 的纤维素酶和果胶酶各 50 μl , 在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 的水浴锅中酶解 30~60 min。吸去酶液, 用蒸馏水洗 2 次。取酶解后的 1 个花药, 放在已硅化的载玻片上, 加 45% (v/v) 的醋酸 1 滴。用镊子挤压花药, 并除去花药残骸, 盖上盖玻片, 在火焰上来回烘烤几次。等片子冷却后, 用滤纸垫在盖玻片上, 用力压片后, 放入 $-85 \text{ }^\circ\text{C}$ 超低温冰箱中冷冻 24 h 以上。然后用 70%、90%、100% (v/v) 的乙醇各脱水 5 min, 放入 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 的烘箱中烘 1~2 h。

1.4 伸长 DNA 纤维的制备

参照 Yang 等^[19]的方法进行细胞核的提取。具体步骤如下: (1) 取 2 g 羽衣甘蓝幼叶, 在液氮中研磨叶片至粉末, 将粉末转入一个 50 ml 的烧杯, 置于冰上。(2) 加 20 ml 冰冷的细胞核提取缓冲液 (10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH 9.5, 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA-2Na, 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, 0.5 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, 4.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 亚精胺, 1.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 精胺, 0.1% (v/v) 巯基乙醇), 轻微搅拌 5 min, 然后分别用 1 层、2 层、3 层纱布过滤, 最后用孔径为 30 μm 的过滤网过滤。(3) 向滤液中加入 0.5 ml 10% (v/v) TritonX-100 的细胞核提取缓冲液, 以便除去叶绿体和线粒体。 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下离心 (4 200 r/min) 10 min。除上清液, 将沉淀物悬浮于 100 μl 的细胞核提取缓冲液中 (50% (v/v) 的甘油), $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。(4) 取 2 μl 细胞核悬浮液, 按照 Yang 等^[19]的方法进行 DNA 纤维的制备。(5) 将制备好的样片用 DAPI

染色, 在荧光显微镜下检查 DNA 纤维的质量。

1.5 5S rDNA 探针标记

模板为 5S rDNA 的胶回收产物, 采用 PCR 法对探针进行标记。试剂盒为 PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche, Cat No 1636090), 按照说明书的操作进行标记, 并电泳检测其标记效果。

1.6 原位杂交及图像的获取

1.6.1 中期染色体和粗线期染色体的原位杂交 参照 Wang^[8]的方法并稍作改进。具体步骤: (A) 片子的预处理 (加 30 μl /片 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ RNase A 于载玻片上, 37 $^{\circ}\text{C}$, 30 min, 2 \times SSC 中洗 3 次, 每次 5 min; 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 胃蛋白酶, 37 $^{\circ}\text{C}$, 60 min, 2 \times SSC 中洗 3 次, 每次 5 min); (B) 染色体的预变性 (70% 去离子甲酰胺, 2 \times SSC, 72 $^{\circ}\text{C}$, 2 min, 冷 70%、90%、100% (v/v) 的乙醇各脱水 5 min, 风干); (C) 探针的变性 (杂交混合液: 60% (v/v) 去离子甲酰胺, 2 \times SSC, 10% (w/v) 硫酸葡聚糖, 0.2% (w/v) SDS, 5 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ 探针, 0.5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ 鲑鱼精 DNA; 85 $^{\circ}\text{C}$, 10 min, 迅速在冰上冷却); (D) 共变性和杂交 (把探针加到已经变性的片子上, 85 $^{\circ}\text{C}$, 10 min, 迅速冷却后, 放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中, 杂交 16~24 h, 在保湿盒中进行); (E) 杂交后洗脱 (2 \times SSC, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 4 \times SSCT, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 2 \times SSC, 室温, 2 次, 每次 5 min); (F) 加检测液及洗脱 (Anti-Digoxigenin-Fluorescein, Fab fragments, Roche, Cat No 11207741910; 20 μl /片 DIG 检测液, 37 $^{\circ}\text{C}$, 30 min; 2 \times SSC, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 4 \times SSCT, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 2 \times SSC, 室温, 2 次, 每次 5 min); (G) DAPI 复染 (10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ DAPI, 30 μl /片, 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min; 2 \times SSC, 3 次, 每次 2 min; 70%、90%、100% (v/v) 乙醇 \times 2 min); (H) 加抗淬灭剂 (甘油: 1 \times PBS=1:1)。洗脱条件始终保持一致, 以确保实验结果的严谨性。

1.6.2 伸长 DNA 纤维的原位杂交及图像获取 制备的 DNA 纤维样片, 不通过胃蛋白酶处理和预变性, 直接用 RNase A 处理后, 即可用来进行荧光原位杂交, 按照 1.6.1 的方法进行。用 Nikon 显微镜观察荧光原位杂交信号, 用 CCD 照相, 用 NIS-Elements Br2.20 和图片处理软件 (Photoshop) 对图片进行处理和测量。

2 结果与分析

2.1 羽衣甘蓝 5S rDNA 的克隆及 PCR-地高辛标记

完整的 5S rDNA 序列包括高度保守的转录区和变异较大的非转录间隔区, 并且 5S rDNA 是以串联的

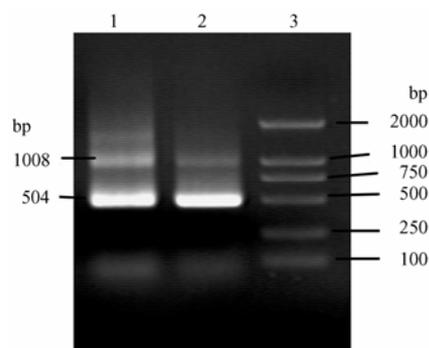
形式排列在染色体上^[2]。因此, 本试验设计的上游引物和下游引物同时位于高度保守的转录区, 预计 PCR 产物大小为 500 bp 左右, 实际的 PCR 产物经测序确定为 504 bp (图 1)。除 504 bp 的主要目的条带外, 也出现大小为 1008 bp 的次要条带, 且大小为 504 bp 的 2 倍, 经测序证明此序列为两个完整的 5S rDNA 拷贝。1008 bp 带比 504 bp 主带更弱, 是同一 PCR 引物扩增更大区段的必然结果。泳道上面还有更大更弱的 5S rDNA 扩增产物。这从一个方面佐证了 5S rDNA 的确是串联的形式排列在染色体上。

5S rDNA 的 PCR 产物测序结果经 VectorNTI10.3 整理后, 其序列如图 2。总长度为 504 bp, 1-119 为转录区, 120-504 为非转录间隔区。转录区内部具有 3 个转录调控区域: Box A、IE、Box C; 5S rDNA 基因的 3' 末端含有 Poly[T] 尾巴, 转录起始点上游 23 bp 处有 TATAT 转录起始调控元件。

5S rDNA 探针采用 PCR 法进行地高辛标记, 其扩增模板为 5S rDNA 的 PCR 胶回收产物 (504 bp), 其标记结果如图 3。对照的大小与模板 5S rDNA 的大小一致, 均为 504 bp, 而带有 DIG 标记的条带大于 504 bp, 主要是因为含 DIG 标记的探针比未标记的探针大, 电泳速度变慢。由图 2 可以看出, 此探针标记成功, 可以用作荧光原位杂交。

2.2 不同分辨率的中期染色体的 5S rDNA-FISH 分析

参照 Wang^[8]的方法进行荧光原位杂交, 中期染色体来自于绒毡层细胞, 其杂交结果见图 4。在图 4-A 中, 中期染色体浓缩度较高, 染色体较粗短, 平均长度为 5.1 μm ; 而图 4-B 的中期染色体浓缩程度较低, 染色体较细长, 平均长度为 10.3 μm 。由此, 后者的



1, 2: 5S rDNA 的 PCR 扩增产物; 3: DL2000 DNA marker
1, 2: PCR products of 5S rDNA; 3: DL2000 DNA marker

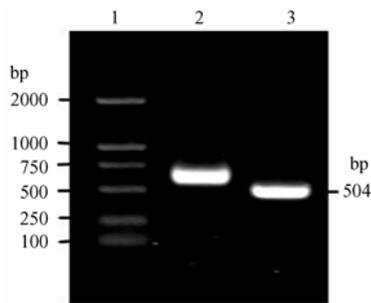
图 1 羽衣甘蓝 5S rDNA 的克隆

Fig. 1 Cloning of 5S rDNA in *B.oleracea* var. *acephala*

```
(1)GGGTGCGATCATAACCAGCACTAATGCACCGGATCCCATCAGAAGTCCGCAGTTAAGCGTGCTTGGGCG
Box A
AGAGTAGTACTAGGATGGGTGACCTCCCGGAAGTCTCTCGTGTGCACCCC (119) TTTTATTATTATTTTA
IE Box C Poly T
TTTTTCGGCCTAAAACGAGTCTAAACTTGGAAACCTAATAACTTTTGAACCGTGAGGAACTACGTCGCC
ATAGCACCATTTCGGAAAGGCCAGAACTATAAAGCGGTGAATATGGGTGGCAATTTTTCGGGCCCA
AATTCAGCCGTTTCGACCTCAAACGGGCTGCAGAAAGTTAAGGGACTTAAAAAGGATCCCAAATCAG
ATTTTCAGGTTGTTTTGATGCTTTCTTAACGCCACTAACCTCGATGCACTATTCGCTGAAAAAACAGT
AAGAAAATCATGTGGGCCCCACGGCCTTACACTTGGATTGGCCGAAACAAATGATATATGGAAACGCGAG
TGA TGTACTAAC (504) TATAT motif
```

图 2 羽衣甘蓝 5S rDNA 基因及其 NTS

Fig. 2 Sequence of 5S rDNA gene and NTS in *B. oleracea* var. *acephala*



1: DL2000 DNA marker; 2: 5S rDNA 探针的地高辛标记; 3: 5S rDNA 探针的未标记对照
1: DL2000 DNA marker; 2: DIG-labeled of 5S rDNA probe; 3: Unlabeled control 5S rDNA probe

图 3 5S rDNA 的 PCR-地高辛标记的电泳检测

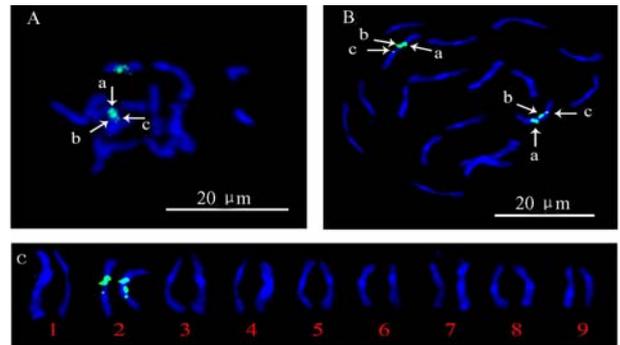
Fig. 3 Evaluation of PCR-DIG-labeled of 5S rDNA probe by gel electrophoresis

FISH 分辨率较前者要高。在图 4-A 中，5S rDNA 的杂交信号位于一对同源染色体的长臂上，每条染色体上出现 3 个信号位点 (a、b、c)，信号与信号之间相距较近，信号位点之间不易区分，一条染色体上同时出现 3 个信号位点的几率较小；在图 4-B 中也出现类似的结果，相比较而言，信号位点之间相距较大，信号位点清晰可辨，一条染色体上同时出现 3 个信号位点的几率较大。

按照 Armstrong 等^[6]和 Fukui 等^[21]对甘蓝的核型分析方法，利用图 4-B 构建了羽衣甘蓝绒毡层细胞中期染色体的核型图 (图 4-C)。5S rDNA 位于羽衣甘蓝 2 号染色体的长臂上，7 号染色体上出现随体，这与 Armstrong^[6]绘制的核型图基本一致。

2.3 羽衣甘蓝粗线期染色体 5S rDNA-FISH 分析

按照试验方法 1.6.1，将 5S rDNA 定位于羽衣甘



A: 中等浓缩度的中期染色体 5S rDNA-FISH; B: 低浓缩度的中期染色体 5S rDNA-FISH(字母 a, b, c 表示信号位点); C: 羽衣甘蓝基于 5S rDNA-FISH 的图像核型图 (1~9 表示染色体编号)，5S rDNA 位于 2 号染色体上，7 号染色体具有随体。绿色为杂交信号，染色体用 DAPI(10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)复染
A: 5S rDNA-FISH to metaphase chromosomes of middling condensation; B: 5S rDNA-FISH to metaphase chromosomes of low condensation (a, b and c represent signal sites); C: Karyotype based on 5S rDNA FISH, showing the location of 5S rDNA (green) in chromosome 2 and a satellite in chromosome 7. Green shows hybridization signal; Chromosomes counterstain with DAPI(10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)

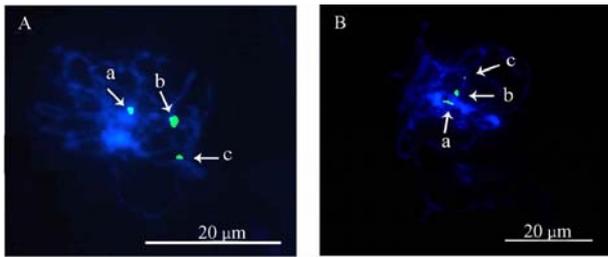
图 4 不同浓缩度的羽衣甘蓝中期染色体的 5S rDNA-FISH 及核型图

Fig. 4 5S rDNA-FISH on metaphase chromosomes of different condensation of *B. oleracea* var. *acephala* and karyotype

蓝减数分裂粗线期染色体上。结果表明，信号 a、b 和 c (图 5) 分别与中期染色体的 a、b 和 c (图 4) 相对应，信号位点之间的距离较中期染色体明显增大，其信号强度 $b > a > c$ 。粗线期染色体上检出 3 个杂交信号位点的比率较中期染色体明显提高，79% 的被检分裂相内都能观察到 3 个信号位点。

2.4 羽衣甘蓝伸长 DNA 纤维的 5S rDNA-FISH 分析

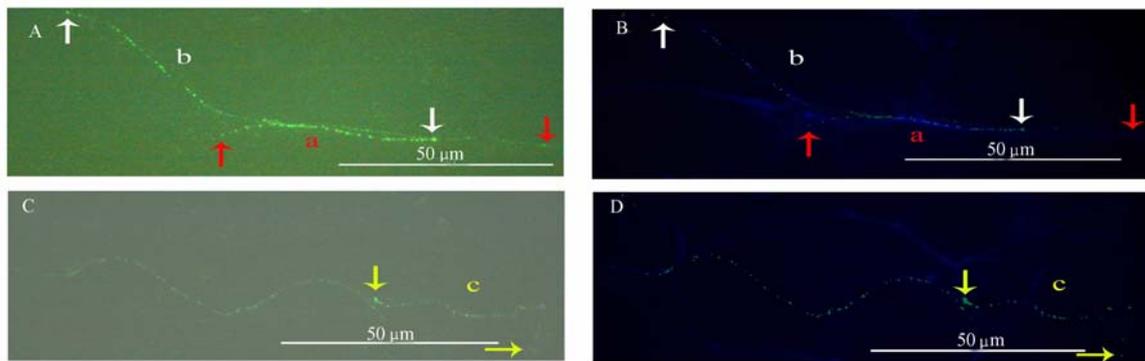
如图 6 所示，5S rDNA 在羽衣甘蓝伸长 DNA 纤维上的杂交信号呈念珠状长链。统计分析表明，5S



5S rDNA 定位于部分粗线期染色体。a, b, c 指示信号位点, 染色体用 DAPI 复染
FISH with 5S rDNA on pachytene chromosome. a, b, c represent signal sites, Chromosomes counterstained with DAPI

图 5 羽衣甘蓝粗线期染色体上的 5S rDNA-FISH

Fig. 5 5S rDNA-FISH on pachytene chromosomes of *B. oleracea* var. *acephala*



绿色念珠状信号表示串联重复的 5S rDNA; 蓝色表示 DAPI 复染; A、C 和 B、D 分别代表图像合成前和合成后; a,b,c 代表不同长度的念珠状长链
Green near-linear stretches of beads-on-string fluorescence signals represent 5S rDNA of tandem arrays; Slides were counterstained with DAPI (blue); A, C and B, D indicate unsynthesizing image and imerged image respectively; a, b, c represent the different long beads-on-string

图 6 羽衣甘蓝伸长 DNA 纤维的 5S rDNA-FISH

Fig. 6 5S rDNA-FISH to extended DNA fibers of *B. oleracea* var. *acephala*

列与其它芸薹属植物的序列具有完全一样的结构特征, 并且在转录区高度保守, 几乎没有变异位点, 其长度均为 119 bp。即使在易变异的非转录间隔区, 相似性也能达到 70%以上, 其长度在 368~385 bp。在同一个物种中, 其相似性高达 95%以上。由此可见, 在同一物种中 5S rDNA 的变异对于杂交过程和杂交信号均无影响。

本试验利用羽衣甘蓝绒毡层细胞中期染色体和粗线期染色体进行 5S rDNA 的 FISH 杂交。结果显示, 在 2 号染色体上均出现 3 个信号位点, 这个结果与 Armstrong 等^[6]和 Fukui 等^[21]的结果不一致。前人研究中甘蓝体细胞中期染色体的长度约为 2.4~3.8 μm, 平均长度为 2.97 μm^[23]; 而本研究利用羽衣甘蓝绒毡层细胞制备的中期染色体的平均长度约为 10.30 μm, 最

rDNA 在伸长 DNA 纤维上主要呈现 3 种长度的信号长链 (a、b、c), 其平均长度分别为 (78.6±4.76) μm、(109.8±5.45) μm、(41.1±3.70) μm。按照 B-DNA 伸展度的标准值 3.27 kb·μm⁻¹^[19] 估算, a、b 和 c 的大小分别为 257、359 和 134 kb。羽衣甘蓝 5S rDNA 序列的单拷贝大小为 504 bp, 由此推算, a、b 和 c 的拷贝数分别为 510、712 和 266。

3 讨论

在绝大多数生物中, 5S rDNA 都以串联重复的形式存在于染色体上, 每一个位点都由数目不等的 5S rDNA 单元串联重复组成, 每个 5S rDNA 单元包括 120 bp 左右的转录区和 100~700 bp 的非转录区^[22]。通过序列比对发现, 本试验克隆的羽衣甘蓝 5S rDNA 的序

长可达 14.66 μm (图 4-B)。由此可见, 绒毡层细胞中期染色体的平均长度约为根尖细胞中期染色体的 3.5 倍, 所以前者的浓缩度较后者要明显降低, 而在决定 FISH 分辨率的因素中, 最重要的是所使用靶染色体的浓缩度, 浓缩度越低, 分辨率越高。因此, 本研究所用的绒毡层细胞中期染色体的 FISH 分辨率较一般根尖中期染色体有较大幅度的提高, 而 FISH 分辨率越高, 则意味着更容易区分出两个紧密相连的位点。研究表明, 在高分辨率的绒毡层细胞中期染色体上能够检出 3 个 5S rDNA 位点, 而在羽衣甘蓝粗线期染色体上的检出率更高。当绒毡层中期染色体的平均长度低于 4 μm 时, 就只能观察到 2 个、甚至 1 个信号位点, 而前人利用根尖中期染色体对 5S rDNA 的定位也大多只能检出 1 个位点^[6]。由此推断, FISH 分辨率的

高低对邻近探针位点的区分有直接的影响, 从而导致在不同分辨率的靶 DNA 载体上 5S rDNA 位点数产生一定的差异。

据研究, 粗线期染色体的长度是体细胞中期染色体的 10~20 倍^[20], 染色体的浓缩度更低, 因而分辨率更高。并且同源染色体联会形成一个二价体, 处于同一位点的基因具有 4 个拷贝, 这对于距离较近的基因有更高的分辨率。Armstrong 等^[6]利用的正是粗线期染色体作为杂交靶 DNA, 因此, 其在粗线期染色体上只观察到两个信号位点不应该是分辨率过低造成的。前人研究表明, 5S rDNA 在不同物种染色体上的分布情况差异非常明显, 即使是同一物种不同亚种间也有差别。白菜 (*Brassica campestris*) 有 6 个 5S rDNA 信号位点分布^[17,24], 而 Hasterok^[25]检测出 10 个信号位点; 在不同的油菜 (*Brassica napus*) 品种中 5S rDNA 位点数也有明显的变化^[26], 即使在同一品种的不同群体之间位点数也有差异^[27]。在其它物种中, 5S rDNA 位点数也存在变化^[12,24]。本研究是以羽衣甘蓝为实验材料, 而前人的研究多以芥蓝为材料, 这两种甘蓝应分别属于不同的亚种^[28]。因此, 可能正是由于试验材料的不同导致了 5S rDNA 位点数的差异。另外, 出现 5S rDNA 位点数变异也可能是染色体重排、不等价交换、基因转化等使受试材料的染色体上多出一个 5S rDNA 串联重复位点, 从而在染色体水平上多呈现出一个信号位点^[29]。

研究发现, 5S rDNA 在羽衣甘蓝伸长 DNA 纤维上的杂交信号呈念珠状长链 (图 6)。由于受到显微镜视野的限制以及 5S rDNA 位点之间的距离过大, 导致在同一视场下不能同时观察到 3 条信号长链。由于制备 EDFs 所用的细胞核密度较大以及 DNA 纤维拉伸时多成束存在, 因而在同一视野下观察到的信号长链可能位于同源染色体上, 也可能出自另一细胞核^[30]。因此, 图 6 中出现的 3 条信号长链并非属于同一条染色体。通过分析发现, 5S rDNA 在 DNA 纤维上主要存在 3 种长度的信号长链 (a、b、c), 其长度为 $b > a > c$, 5S rDNA 信号链长度与其拷贝数呈正相关。而粗线期染色体上信号位点 (a、b、c), 信号强度为 $b > a > c$, 其信号越强, 拷贝数越多。因此, 染色体纤维上出现的信号长链 (a、b、c) 与粗线期染色体上出现的信号位点 (a、b、c) 形成一一对应的关系。伸长染色体纤维的形成过程类似于细胞周期中染色体与染色质之间的转换过程, 染色质缩短浓缩足够程度将导致图 6 中 (a、b、c) 串联杂交点变为图 4 和图 5

中相应的单一杂交点。进一步说明了羽衣甘蓝染色体上存在 3 个 5S rDNA 串联重复位点。此外, DNA 纤维的伸展程度都在 $2.5 \sim 3.5 \text{ kb} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ ^[12-14], 这与 Watson 和 Crick 的 DNA 双螺旋结构的理论值 $2.97 \text{ kb} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ 相近。通过在 EDF 上进行 5S rDNA-FISH 分析, 主要得到 3 种长度不同的 EDF (图 6), 初步估算出 3 个 5S rDNA 位点的拷贝数, 这个结果比拟南芥 5S rDNA 的总拷贝数多^[31], 准确拷贝数有待于进一步研究。杂交信号为念珠状长链, 这与已报道的动物和植物的伸展 DNA 纤维杂交结果相似, 其原因可能是变性过程中 DNA 部分丢失, 也可能是杂交过程中探针与靶 DNA 随机结合时, 靶 DNA 有的区域充分结合, 另一些区域很少或没有结合^[32]。

4 结论

本研究通过 3 种不同的靶 DNA 载体, 都同时证明了在羽衣甘蓝 2 号染色体上存在 3 个 5S rDNA 串联重复位点, 并且这 3 个位点都位于 2 号染色体的长臂靠着丝粒处; 并将 5S rDNA 定位在 DNA 纤维上, 获得了 3 种不同长度的 DNA 纤维, 并通过信号长度估算其拷贝数分别为 510、712 和 266。

References

- [1] Liao X B, Clemens K R, Tennant L, Wright P E, Gottesfeld J M. Specific interaction of the first three zinc fingers of TFIIIA with the internal control region of the *Xenopus* 5S RNA gene. *Journal of Molecular Biology*, 1992, 223: 857-871.
- [2] Cloix C, Tutois S, Mathieu O, Cuvillier C, Espagnol M C, Picard G, Tourmente S. Analysis of 5S rDNA arrays in *Arabidopsis thaliana*: physical mapping and chromosome-specific polymerPhisMs. *Genome Research*, 2000, 10: 679-690.
- [3] Gerlach W L and Dyer T A. Sequence organization of the repeating units in the nucleus of wheat which contain 5S rRNA genes. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8: 4851-4865.
- [4] Baum B R and Appels R. Evolutionary change at the 5S rDNA loci of species in the *Triticea*. *Plant Systematics and Evolution*, 1992, 183: 195-208.
- [5] Yang Y W, Tseng P F, Tai P Y, Chang C J. Phylogenetic position of *Raphanus* in relation to *Brassica* species based on 5S rRNA spacer sequence data. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 1998, 39: 153-160.
- [6] Armstrong S J, Fransz P, Marshall D F and Jones G H. Physical mapping of DNA repetitive sequences to mitotic and meiotic chromosomes of *Brassica oleracea* var. *alboglabra* by fluorescence in situ hybridization. *Heredity*, 1998, 81: 666-673.
- [7] Howell E C, Barker G C, Jones G H, Kearsey M J, King G J, Kop E P,

- Ryder C D, Teakle G R, Vicente J G, Armstrong S J. Integration of the cytogenetic and genetic linkage maps of *Brassica oleracea*. *Genetics*, 2002, 161: 1225-1234.
- [8] Wang C R, Harper L, Cande W Z. High-resolution single-copy gene fluorescence in situ hybridization and its use in the construction of a cytogenetic map of maize chromosome 9. *The Plant Cell*, 2006, 18: 529-544.
- [9] Franz P F, Alonso-Blanco C, Liharska T B, Peeters A J M, Zabel P, de Jong J H. High resolution physical mapping in *Arabidopsis thaliana* and tomato by fluorescence in situ hybridization to extended DNA fibers. *The Plant Journal*, 1996, 9: 421-430.
- [10] Lavania U C, Yamamoto M, Mukai Y. Extended chromatin and DNA fibers from active plant nuclei for high-resolution FISH. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2003, 51: 1249-1253.
- [11] Lavania U C, Basu S, Srivatava S, Mukai Y, Lavania S. *In situ* chromosomal localization of rDNA sites in "Safed Musli" chlorophytum Ker-Gawl and their physical measurement by Fiber FISH. *Journal of Heredity*, 2005, 96(2): 155-160.
- [12] Li Z Y, Huang S L, Jin W W, Song Y C, Li L J. Determination of copy number for 5S rDNA and centromeric sequence RCS2 in rice by Fiber-FISH. *Chinese Science Bulletin*, 2002, 47(3): 214-217.
- [13] Li Z Y, Qin R, JW W, Xiong Z Y, Song Y C. FISH analysis of pachytene chromosome and DNA fiber of telomere sequence in rice (*Oryza sativa* L. *indica*). *Acta Genetica Sinica*, 2005, 32(8): 832-836.
- [14] Valarik M, Bartos J, Kovarova P, Kubalakov M, de Jong J H, Dolezel J. High-resolution FISH on super-stretched flow-sorted plant chromosomes. *The Plant Journal*, 2004, 37: 940-950.
- [15] Murata M, Heslop-Harrison J S, Motoyoshi F. Physical mapping of the 5S ribosomal RNA genes in *Arabidopsis thaliana* by multicolor fluorescence in situ hybridization with cosmid clones. *The Plant Journal*, 1997, 12: 31-37.
- [16] Franz P, Armstrong S J, Alonso-Blanco C, Fisher T C, Torres-Ruiz R A, Jones G. Cytogenetics for the model system *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 1998, 13: 867-876.
- [17] Snowdon R J, Friedrich T, Friedt W, Kohler W. Identifying the chromosomes of the A- and C-genome diploid *Brassica* species *B. rapa* (syn. *campestris*) and *B. oleracea* in their amphidiploid *B. napus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 104: 533-538.
- [18] Hoda B M, Martin A, Schubert. Chromosomal localization of rDNA in the Brassicaceae. *Genome*, 2005, 48: 341-346.
- [19] Yang K, Qi H Y, Zhu L Q, Wang X J. Localization of S genes on Extended DNA Fibers (EDFs) in *Brassica oleracea* High-Resolution FISH. *Acta Genetica Sinica*, 2006, 33 (3): 277-284.
- [20] de Jong J, Franz P, Zabel P. High resolution FISH in plants - Techniques and applications. *Trends in Plant Science*, 1999, 4: 258-263.
- [21] Fukui K, Nakayama S, Ohmido N, Yoshiaki H, Yamabe M. Quantitative karyotyping of three diploid *Brassica* species by imaging methods and localization of 45 s rDNA loci on the identified chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 96: 325-330.
- [22] Appels R, Baum B. Evolution of the NOR and 5S DNA loci in the Triticeae. *Molecular Systematics of Plants*, 1992, 92: 116.
- [23] Wang X H, Luo P. Studies on the karyotypes and C-banding patterns of Chinese kale (*Brassica albolabra*) and cabbage (*B. oleracea* var. *capitata*). *Acta Botanica Sinica*, 1987, 29(2): 149-155.
- [24] 轩淑欣, 申书兴, 赵建军, 张成合, 陈雪平, 鄯丽娟. 25S rDNA 和 5S rDNA 在大白菜中期染色体上的 FISH 定位. *中国农业科学* 2007, 40(4): 782-787.
- Xuan S X, Shen S X, Zhao J J, Zhang C H, Chen X P, Qie L J. Location of 25S rDNA and 5S rDNA in Chinese Cabbage-pe-tsai Metaphase Chromosome. *Scientia Agricultura Sinica*, 2007, 40(4): 782-787. (in Chinese)
- [25] Hasterok R, Wolny E, Kulak S, Zdziechiewicz A, Maluszynska J, Heneen W. Molecular cytogenetic analysis of *Brassica rapa*-*Brassica oleracea* var. *albolabra* monosomic addition lines. *Theoretical and Applied Genetics*, 2005, 111: 196-205.
- [26] Schrader O, Budahn H, Ahne R. Detection of 5S and 25S rRNA genes in *Sinapis alba*, *Raphanus sativus* and *Brassica napus* by double fluorescence in situ hybridization. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 100: 665-669.
- [27] Hasterok R, Maluszynska J. Nucleolar dominance does not occur in root tip cells of allotetraploid *Brassica* species. *Genome*, 2000, 43: 574-579.
- [28] 刘 英, 王 超. 简述甘蓝类植物的起源及分类. *北方园艺*, 2006, 4: 58-60.
- Liu Y, Wang C. Origin classification and evolution of *Brassica oleracea* L. *Northern Horticulture*, 2006, 4: 58-60. (in Chinese)
- [29] Liao D. Gene conversion drives within genic sequences: concerted evolution of ribosomal RNA genes in bacteria and archaea. *Journal of Molecular Evolution*, 2000, 51: 305-317.
- [30] 荣小营, 朱利泉, 王 永, 高启国, 陈晓丹, 杨 洋, 王小佳. 甘蓝自交不亲和基因 MLPK 与 SSP 的 FISH 定位. *作物学报*, 2009, 35(5): 802-808.
- Rong X Y, Zhu L Q, Wang Y, Gao Q G, Chen X D, Yang Y, Wang X J. Localization of MLPK and SSP genes for self-incompatibility of *Brassica oleracea* by fluorescence in situ hybridization. *Acta Agronomica Sinica*, 2009, 35(5): 802-808. (in Chinese)
- [31] Campell B R, Song Y, Posch T E, Cullis C A, Town C D. Sequence and organization of 5S ribosomal RNA-encoding genes of *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 1992, 112: 225-228.
- [32] Frans M, Florijn R J, Tanke H J, Raap A K. DNA Fiber-FISH staining mechanism. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2000, 48: 743-746.

(责任编辑 曲来娥)