

杉木第四号染色体特异性 RAPD 片段的获得

李湘阳^{1,2}, 周 坚^{1*}

(1. 南京林业大学森林资源与环境学院, 江苏南京 210037; 2. 中国林科院热带林业研究所, 广东广州 510520)

摘要: 分别分离杉木(*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook) 同一细胞中的第四号具随体染色体及剩余 20 条非随体染色体, 进行 DOP-PCR 扩增, 分别以随体染色体及非随体染色体的 DOP-PCR 产物为模板, 用成对随机引物进行 RAPD 分析。用引物对 OPB07+OPB10 进行扩增, 在 500~250 bp 之间, 随体染色体有 4 条特异扩增带; 用引物对 OPB07+OPB18 在 900 bp 左右获得 1 条随体染色体特异带; 用引物对 OPD07+OPD05 在 250 bp 左右得到随体染色体 1 条特异扩增带。

关键词: 杉木; 染色体; DOP-PCR; RAPD

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2004)05-0418-04

RAPD special fragments of satellite chromosomes from *Cunninghamia lanceolata*

LI Xiang-yang, ZHOU Jian

(1. College of Forest Resources and Environment Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China;

2. The Research Institute of Tropical Forestry, Guangzhou 510520, China)

Abstract: A pair of satellite chromosomes and 20 other non-satellite chromosomes in one cell from *Cunninghamia lanceolata* were isolated. The two kinds of chromosomes were amplified by DOP-PCR. And the DOP-PCR products were analyzed by RAPD-PCR using pairwise combinations of primers. There were four specific fragments between 500~250 bp which belong to satellite chromosomes in the RAPD profile with pairwise primers OPB07 and OPB10. Another specific about 900 bp fragment of satellite chromosomes was obtained in the amplified products with pairwise primers OPB07 and OPB18. And a specific about 250 bp fragment also belonged to satellite chromosomes, which was get in the RAPD profile using pairwise primers OPD07 and OPD05.

Key words: *Cunninghamia lanceolata*; Chromosome; DOP-PCR; RAPD

染色体微分离、微切割及微克隆技术自 1981 年 Scalenghe 等创立至今已经在人和动物的基因组研究中发挥了巨大的作用。该技术在二十世纪 90 年代初应用于植物材料的研究 (Sandery 等, 1991)。目前国内植物材料的染色体微分离、微切割及微克隆技术主要应用于单染色体文库的构建 (党本元等, 1998)、特定染色体上基因的分离 (田毅等, 1997)、B

染色体的进化等方面 (郭歌等, 1998)。马有志等 (1999) 应用氩离子激光分离普通小麦的 1B 染色体及体细胞, 证明以分离的细胞核为模板进行 RAPD 研究与常规 RAPD 反应 (用从幼叶提取的基因组总 DNA 为模板) 扩增式样相同。我们先后进行了有关杉木单染色体的微分离 (李湘阳等, 2002) 以及分离的各单染色体扩增产物的 RAPD 研究 (李湘阳等,

收稿日期: 2004-01-15 修订日期: 2004-03-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970626)

作者简介: 李湘阳 (1970-), 女, 湖南宁远人, 助理研究员, 博士。* 通讯作者

2003)。在此基础上,我们开展了杉木第四号染色体的特异性 RAPD 片段的筛选,并得到了该染色体的特异性片段。

1 材料与方法

1.1 材料

杉木 (*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook) 种子采自贵州省。DOP-PCR 引物设计参照文献 (Telenius 等, 1992) 报道序列, 引物由上海申友生物技术有限责任公司合成。

1.2 染色体标本的制备

详细过程参见文献 (李湘阳等, 2003)。

1.3 染色体微分离

将制好的玻片放入液氮中冰冻, 揭去盖玻片, 风干, 立即用于染色体微分离。在显微操作仪上用玻璃针 (尖端直径为 1~3 μm) 从一个处于中期分裂相的细胞中将一对带随体的第四号染色体轻轻挑起, 折断粘有染色体的玻璃针尖于 0.2 mL 的 Eppendorf 管中。再将该已除去一对随体染色体的剩余 20 条染色体挑起, 同样将粘有染色体的玻璃针尖折断于另一 0.2 mL 的 Eppendorf 管中, 高速离心数秒, 立即用于 PCR 扩增或 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用。在 40 \times 10 倍光学显微镜下, 随体的形态很清楚, 因此不会造成误分离。在挑 2 条随体染色体以外剩余部分染色体时, 如需用玻璃针分批挑起放入同一 Eppendorf 管中, 则必须每次换用新的无菌的玻璃针。染色体的分离空间在进行染色体分离前需在紫外灯下照射至少 2 h 以上, 所用器皿需经严格灭菌处理。后续扩增反应均在 PE 9600 基因扩增仪上进行。

1.4 随体染色体及非随体染色体的体外扩增

将分离的随体染色体及非随体染色体分别用 0.05 mg/mL 蛋白酶 K 液 20 μL (用 1 \times Taq 酶缓冲液 (Promega) 配制) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 90 min 后, 于 95 $^{\circ}\text{C}$ 下保温 10 min 以灭活蛋白酶 K。同时设置严格的阴性对照反应管 (不加任何底物)。样品与对照同时进行 PCR 扩增。采用引物为一可随机扩增的简并引物 (5'-CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-3') (Telenius 等, 1992)。在经蛋白酶 K 消化的 Eppendorf 管中加入以下成分:

10 \times Taq buffer (Promega) 3 μL , 25 mmol/L MgCl₂ 5 μL , 25 $\mu\text{mol/L}$ 的引物 3 μL , 10 mmol/L dNTP 1 μL , Taq 酶 2.5 U (5 U/ μL), 无菌水补至 50 μL 。

反应条件根据文献 (Telenius 等, 1992) 略有改动。第一轮 PCR: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min, 随之进行 5 个低退火温度循环: 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min \rightarrow 30 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min \rightarrow 30~72 $^{\circ}\text{C}$ 缓慢升温 (3 min) \rightarrow 72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min。然后在下列条件下进行 25 个高退火温度循环扩增: 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min \rightarrow 57 $^{\circ}\text{C}$ 1 min \rightarrow 72 $^{\circ}\text{C}$ 2.5 min; 循环结束后, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

第二轮 PCR: 取初次 PCR 扩增产物 5 μL 做模板, 其余反应试剂成分的浓度与第一轮 PCR 扩增相同, 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 然后进入 25 个循环: 每个循环 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min \rightarrow 57 $^{\circ}\text{C}$ 1 min \rightarrow 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min。循环结束后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

取第二轮 DOP-PCR 产物 5 μL 于 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 在天能 UV-2000 系列紫外分析仪 300 nm 紫外灯下观察并照相。扩增效果见图 1。

1.5 扩增产物 Southern 杂交分析

用常规 CTAB 法从杉木种子萌发的幼苗中提取杉木总基因组 DNA, 用随机引物法, 根据 Roche 公司产品 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 说明书所提供的方法将杉木总基因组 DNA 进行地高辛标记。将分离的杉木随体染色体及非随体染色体的 DOP-PCR 第二轮扩增产物进行琼脂糖电泳及 Southern 转膜, 然后与标记的杉木基因组 DNA 探针杂交、洗膜、显色并拍照。杂交结果见图 2。

1.6 PCR 扩增产物的纯化

将 DOP-PCR 第二轮扩增产物经酚抽提纯化。

1.7 染色体扩增产物的 RAPD 分析及特异片段的筛选

1.7.1 RAPD 反应条件 RAPD 反应程序根据文献 (李湘阳等, 2003) 而略有改动:

94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 4 min, 38 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s, 共一个循环; 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 38 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s, 共 40 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 结束扩增并保存。反应体系 (20 μL) 组成: 模板浓度: 20 ng 左右 (以非随体染色体 DOP-PCR 产物为模板进行单引物筛选) 25 ng 左右 (以非随体染色体及随体染色体 DOP-PCR 产物为模板进行双引物扩增时); 10 倍反应缓冲液: 2 μL (promega); MgCl₂ 浓度: 2.5 mmol/L; 4 种 dNTP 浓度: 各为 200 $\mu\text{mol/L}$; 引物浓度: 1 $\mu\text{mol/L}$ (单引物扩增时), 1.5 $\mu\text{mol/L}$ (双引物扩增时, 每种引物浓度各为 0.75 $\mu\text{mol/L}$); Taq 聚合酶: 1 U。

扩增产物于 1.6% 琼脂糖凝胶电泳,在天能 UV-2000 系列分析仪 300 nm 紫外灯下观察并照相。

1.7.2 引物筛选及特异片段的获得 先用单细胞的

非随体染色体扩增产物对 OPA、OPB、OPC、OPD1-12 共 72 个备选引物进行初筛,然后从中挑选出重复性好、扩增谱带清晰的引物组合成任意引物对,再

表 1 随机引物序列
Table 1 Arbitrary 10 bp primers

引物名称 Primer	OPB07	OPB10	OPB18	OPD05	OPD07
引物序列 Sequence	GGTGACGCAG (5'→3')	CTGCTGGGAC (5'→3')	CCACAGCAGT (5'→3')	TGAGCGGACA (5'→3')	TTGGCACGGG (5'→3')

将随体染色体扩增产物和非随体染色体扩增产物对组合引物对进行复筛。最后筛选出多态性强的三对引物组合 OPB07 + OPB10、OPB07 + OPB18 和 OPD07 + OPD05 对杉木随体染色体扩增产物和非随体染色体扩增产物进行正式扩增。表 1 是用于扩增的随机引物序列。图 3 显示了扩增结果。

PCR 产物片段大小约在 250~900 bp 之间;非随体染色体的 DOP-PCR 产物片段大小约为 200~1100 bp。同时还可可见同一细胞的非随体染色体的扩增信号比随体染色体的扩增信号强得多,这可能是非随体染色体的模板量大(有 20 条染色体)的原因(图 1)。阴性对照无扩增信号。以杉木总 DNA 为探针的 Southern 杂交图表明,随体染色体与非随体染色体的扩增产物都是来自于杉木基因组 DNA(图 2)。

2.2 染色体 DOP-PCR 产物纯化与否对 RAPD-PCR 的影响

一般情况下,从植物中提取的总 DNA 并不需要进行氯化铯梯度离心或使用任何纯化试剂盒就可以用做 RAPD-PCR 反应的模板,然而以分离的染色体 DOP-PCR 扩增产物为模板时,必须考虑到该模板是经过两次 PCR 反应的产物,其中残留的 Taq 酶、dNTP、Mg²⁺ 以及引物有可能会对后续的 RAPD-PCR 反应产生不良影响。本实验对纯化和非纯化模板进行比较,发现非纯化模板的扩增信号弱且带数少,因此,对 DOP-PCR 产物先进行纯化,再进行 RAPD-PCR 是必要的。

2.3 杉木第四号染色体 RAPD 特异片段的获得

RAPD 扩增结果表明,用随机组合的成对引物对杉木随体染色体(杉木第四号染色体)扩增产物和非随体染色体扩增产物进行扩增时,约有 50% 的引物组合对表现出一定的多态性,但所得到的扩增谱带稳定、清晰且重复性好的引物组合对并不多。图 3 显示的是用三对引物组合 OPB07 + OPB10、OPB07 + OPB18 和 OPD07 + OPD05 对杉木同一细胞中一对随体染色体及其余 20 条染色体的 DOP-PCR 产物分别进行扩增的结果。在引物对 OPB07 + OPB10 的扩增中可见带随体的第四号染色体在 500、450、350、280 bp 左右处有 4 条特异带是非随体染色体扩增产物中没有的;以 OPB07 + OPB18 为引物的扩增中,随体染色体在 900 bp 处有一明显的

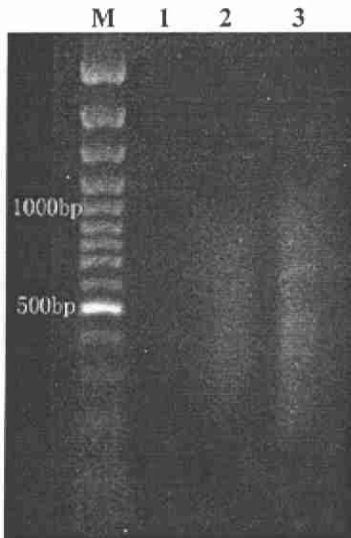


图 1 杉木随体染色体及非随体 20 条染色体 DOP-PCR 扩增产物

Fig. 1 DOP-PCR products from satellite chromosome and 20 non-satellite chromosomes of *Cunninghamia lanceolata*

M: 分子量; 1. 阴性对照; 2. 随体染色体 DOP-PCR 产物;
3. 20 条非随体染色体 DOP-PCR 产物。

M: Mark; 1. negative control; 2. DOP-PCR products of
satellite chromosome; 3. DOP-PCR products
of 20 non-satellite chromosomes

2 结果与分析

2.1 DOP-PCR 扩增结果及 Southern 杂交分析

从电泳结果图可看出,随体染色体的 DOP-

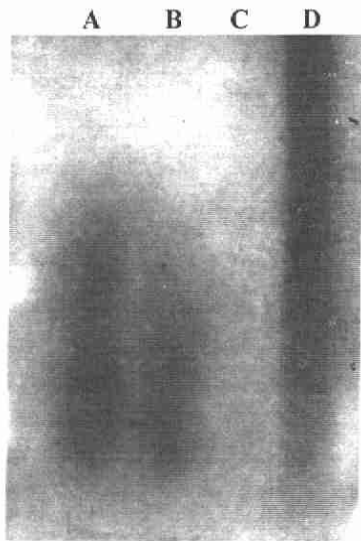


图 2 DOP-PCR 产物 Southern 杂交分析图

Fig. 2 Southern blot analysis of DOP-PCR products

- A. 20 条非随体染色体 DOP-PCR 产物; B. 随体染色体 DOP-PCR 产物; C. 阴性对照; D. EcoRI 酶切杉木基因组 DNA.
A. 20 non-satellite chromosomes DOP-PCR products; B. Satellite chromosome DOP-PCR products; C. Negative control;
D. *Cunninghamia lanceolata* genomic DNA digested by EcoRI.

特异扩增带;而在引物对 OPD07 + OPD05 的扩增结果中可见随体染色体在 250 bp 左右有一特异扩增带。在多次重复的情况下,实验结果稳定不变。因此,用任意组合的成对引物对随体染色体扩增产物和非随体染色体扩增产物进行 RAPD 扩增并筛选出属于随体染色体特异性带是可行的。在后续工作中,可将特异带分离出来,进行测序分析,然后再以 PCR 的方式重新定回到随体染色体上。

3 讨 论

RAPD-PCR 的灵敏度极高,Williams 等(1990)以大豆基因组 DNA 为例证明,在被试引物的 3' 端依次改变一个碱基即引起扩增式样的完全不同,因而产生的多态性很高。人们相信在模板中因为一个核苷酸变化也会引起同样效应。因此,在理论上,RAPD 能检测出单个核苷酸顺序的变异。本实验用 RAPD-PCR 检测随体染色体和非随体染色体之间的多态性,正是基于该技术极高灵敏度的特点。不过,考虑到本实验所用的随体染色体和非随体染色体都是来自同一个体的同一个细胞,他们的遗传差异有可能会很小而难以找到属于随体染色体特异性片段,而使用双引物会有效增加多态性位点,从而

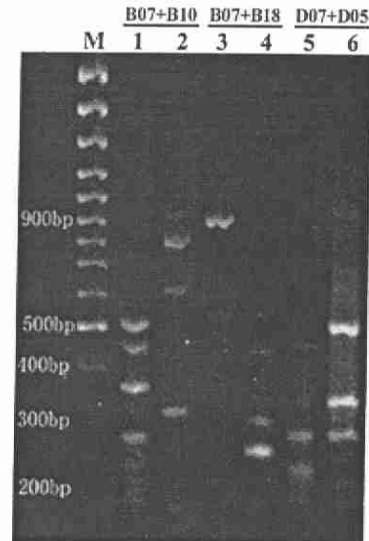


图 3 用引物对 OPB07 + OPB10, OPB07 + OPB18, OPD07 + OPD05 对随体染色体和非随体 20 条染色体 DOP-PCR 产物进行扩增

Fig. 3 RAPD profile of DOP-PCR products from satellite chromosome and 20 non-satellite chromosomes using pairwise primers of OPB07 + OPB10, OPB07 + OPB18 and OPD07 + OPD05

- M: 分子量; 1, 3, 5: 模板为随体染色体 DOP-PCR 产物; 2, 4, 6: 模板为 20 条非随体染色体 DOP-PCR 产物。
M: Mark; 1, 3, 5: Templates of satellite chromosome; 2, 4, 6: templates of 20 non-satellite chromosomes.

获得更丰富的 DNA 指纹信息(Welsh 和 McClelland, 1991)。故实验中采用双引物进行 RAPD 分析。另外,本实验中还发现用单个随机引物进行 PCR 扩增时,实验结果的重复性较差,而用双引物却能得到较稳定的实验结果。实验结果表明在随体染色体和非随体染色体之间的确存在多态性,并获得了属于随体染色体特异性片段。所得到的这些特异性片段可做为随体染色体的特异性标签,用于该染色体的鉴定或该染色体上特定基因的分离以及高密度物理图谱的构建等相关分子生物学研究。另外,在获得杉木随体染色体特异性片段的基础之上,可进一步将该技术扩展到杉木其它染色体,从而有望实现在分子水平上对杉木染色体进行编号,这将极大推动杉木染色体的研究。也为植物染色体的研究提供了新的研究思路。不过,考虑到 RAPD 反应的退火温度低(38 °C),且 RAPD 的引物序列短(只有 10 个碱基),所以获得的 RAPD 特异片段是否为稳定的特异片段还存有疑问。因此,要得到稳定的属于杉木第四号染色体(随体染色体)的特异性片(下转第 425 页 Continue on page 425)

References:

- Arano H. 1963. Cytological studies in subfamily Carduoideae (Compositae) of Japan IX[J]. *Bot Mag(Tokyo)*, **76**: 32—39.
- Chen RY. 1988. G-Band staining of chromosomes in some higher plants with special reference to *Lilium davidii*[J]. *Kromosomo*, **50**: 1 635—1 651.
- Chen RY. 1989. A further research of plant chromosome G-banding. In: Hong DY(ed). *Plant Chromosome Research* [M]. Beijing: Science Press, 187—193. (in Chinese).
- Fedorov A. 1974. Chromosome numbers of flowering plants[M]. Koenigstein: Otto Koeltz Science Publishers, 418—419.
- Hong DY. 1990. *Plant cytotaxonomy*[M]. Beijing: Science Press. (in Chinese).
- Hong DY, Zhang SZ. 1990. Observations on chromosomes of some plants from Western Sichuan[J]. *Cathaya*, **2**: 191—197.
- Hu CC, Tsui HP, Li ZY. 2002. Flora Reipublicae Popularis Sinicae[M]. Beijing: Science Press, **70**: 318—319. (in Chinese)
- Levan A, Fredge K, Sandberg AA. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes[J]. *Hereditas*, **52**: 201—220.
- Matsuo K, Noguchi J. 1989. Karyotype analysis of several *Plantago* species in Japan, with special reference to the taxonomic status of *Plantago japonica* [J]. *Journal of Phyto-geography and Taxonomy*, **37**: 27—35.
- Nishikawa T. 1990. Chromosome counts of flowering plants of Hokkaido (13)[J]. *Journal of Hokkaido University of Education, Section IIB*, **40**: 19—30.
- Probatova NS, Rudyka EG, Sokolovskaya AP. 1996. Chromosome numbers in synanthropic plants from the Russian Far East[J]. *Botaničeskij Žurnal(Moscow & Leningrad)*, **81**(5): 98—101.
- Stebbins GL. 1971. *Chromosomal evolution in Higher Plants* [M]. London: AddisonWesley.
- Stebbins GL. 1979. Polyploid in plant: unsolved problems and prospects[M]. In: Lewis WH(ed). *Polyploidy*. New York & London: Plenum press, 495—528.
- Tanaka R. 1971. Types of resting nuclei in Orchidaceae[J]. *Bot Mag(Tokyo)*, **84**: 118—132.
- Tanaka R. 1977. Recent karyotype studies. In: Ogawa K *et al.* (eds). *Plant Cytology*[M]. Tokyo: Asakura Shoten.
- Zhao ZE, Wu JQ, Wang Y. 2002. New taxa of *Lysimachi* and *Plantago* in the Three-Gorge Reservoir Area[J]. *Journal of Wuhan Botanical Research*, **20**: 263—264. (in Chinese, English abstr)
- Zheng TK, Tanaka T, Kang TG. 1992. Studies on the *Plantago* Plants in China[J]. Shengyang: Liaoning Publishing House of Science and Technology. (in Chinese)
- 段, 还有待于进一步将 RAPD 标记转换成更稳定、可靠的 SCAR 标记。
- 参考文献:
- Da 党本元, 胡赞民, 周奕华, 等. 1998. 王百合单染色体 DNA 文库构建[J]. *科学通报*, **43**(3): 272—276.
- Guo G(郭 歌), Chen CB(陈成彬), Li XL(李秀兰), *et al.* 1998. Cloning of the telomere associated sequences of rye B-chromosomes(黑麦 B 染色体端粒相关序列的克隆)[J]. *Acta Botanica Sinica(植物学报)*, **40**(12): 1 123—1 128.
- Li XY(李湘阳), Zhou J(周 坚). 2002. Microdissection and PCR amplification of single *Cunninghamia lanceolata* chromosome(杉木单染色体的显微分离及体外扩增)[J]. *Forest Research(林业科学研究)*, **15**(6): 746—750.
- Li XY(李湘阳), Zhou J(周 坚), Yuan HS(袁汉升), *et al.* 2003. RAPD Studies on the amplified product of single microdissected *Cunninghamia lanceolata* chromosome(杉木单染色体扩增产物的 RAPD 分析)[J]. *Journal of Nanjing University(Natural Sciences Edition)(南京林业大学学报)(自然科学版)*, **27**(3): 55—58.
- Ma YZ(马有志), Xu QF(徐琼芳), Xin ZY(辛志勇), *et al.* 1999. Isolation of wheat chromosome by argon-ion laser beam(小麦染色体显微激光分离)[J]. *Acta Genetic Sinica(遗传学报)*, **26**(1): 43—48.
- Sandery MJ, Forster JW, Macadam SR, *et al.* 1991. Isolation of a sequence common to A and B-chromosomes of rye(*Secale cereale*) by microcloning[J]. *Plant Mol Biol Rep*, **9**: 21—30.
- Tian C(田 毅), Liu GT(刘广田). 1997. The cloning of wheat HMW-GS1Dx5 gene fragment using chromosome microdissection(小麦染色体显微切割和微克隆方法的建立及 HMW-GS1D5 亚基因克隆)[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology(农业生物技术学报)*, **5**(4): 307—312.
- Telenius H, Carter NP, Bebb CE, *et al.* 1992. Degerate oligonucleotide primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenrate primer[J]. *Genomic*, **13**: 718—725.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, *et al.* 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucleic Acida Res*, **18**: 6 531—6 535.
- Welsh J, McLelland M. 1991. Genomic fingerprinting with AP-PCR using pairwise combination of primers: Application to genetic mapping of the mouse[J]. *Nucleic Acids Res*, **19**: 5 275—5 279.

(上接第 421 页 Continue from page 421)