

## 莲 *C<sub>0</sub>t-1* DNA 的荧光原位杂交分析

刁英<sup>1,2</sup>, 余朝文<sup>1\*</sup>, 胡中立<sup>1</sup>, 宋运淳<sup>1</sup>

(1. 武汉大学 发育生物学教育部重点实验室, 湖北 武汉 430072; 2. 重庆文理学院 生命科学系, 重庆 402168)

**摘要:** 为分析中国莲 *C<sub>0</sub>t-1* DNA 在其中期染色体上的分布, 从中国莲基因组 DNA 中分离出 *C<sub>0</sub>t-1* DNA, 将基因组和所分离的 *C<sub>0</sub>t-1* DNA 用生物素标记后作探针, 对中国莲染色体进行原位杂交。杂交结果用耦联有荧光素 Cy3 的生物素抗体检测, 发现在每对染色体上均显示出特定的荧光原位杂交带。同时分析了 FISH 和 GISH 信号分布的异同。基于 *C<sub>0</sub>t-1* DNA 荧光原位杂交带型及染色体型, 构建了中国莲核型。

**关键词:** 中国莲; *C<sub>0</sub>t-1* DNA; 荧光原位杂交; 基因组荧光原位杂交; 核型

**中图分类号:** Q943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2006)05-0459-05

## Study on *C<sub>0</sub>t-1* DNA of *Nelumbo nucifera* L. by fluorescence *in situ* hybridization

DIAO Ying<sup>1,2</sup>, SHE Chao-wen<sup>1\*</sup>, HU Zhong-li<sup>1</sup>, SONG Yun-chun<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of MOE for Plant Developmental Biology, Wuhan University, Wuhan 430072, China;

2. Department of Life Sciences, Chongqing University of Arts and Sciences, Chongqing 402168, China)

**Abstract:** In order to study the distribution of *C<sub>0</sub>t-1* DNA in *Nelumbo nucifera*, *C<sub>0</sub>t-1* DNA was extracted from its genomic DNA, labeled with biotin-11-dUTP and *in situ* hybridized. So did the genomic DNA. The hybridized locations were detected with streptavidin Cy3. Specific fluorescence *in situ* hybridization (FISH) signals were detected on all individual chromosome pairs. The differences of the signals between *C<sub>0</sub>t-1* DNA FISH and GISH were discussed. The karyotype has been constructed, on the basis of both *C<sub>0</sub>t-1* DNA FISH banding patterns and chromosome morphology.

**Key words:** *Nelumbo nucifera* L.; *C<sub>0</sub>t-1* DNA; fluorescence *in situ* hybridization (FISH); genomic *in situ* hybridization (GISH); karyotype

莲 (*Nelumbo nucifera*) 是一种古老的植物, 是被子植物中起源最早的种属之一。现代莲属植物仅存一种, 即莲; 其下具有两个亚种即开粉红色花和白花的中国莲和开黄花的美国莲。莲在中国是一种著名的文化植物, 被视为佛教的四大圣物之一。莲具有较高的经济利用价值, 人们常根据功能将莲分为花莲、籽莲和藕莲。在园艺上, 莲因其株型美丽已经成

为了不可缺少的水景植物, 通过人们长期的选育已经有上百种观赏品种 (倪学明, 1987)。莲还是一种重要的药用植物, 全身都可入药, 目前对于莲的药用价值的开发正日益受到重视。对莲的研究主要集中在优良品种的选育等应用型研究上, 其遗传学基础研究还相对滞后, 大部分停留在传统的核型分析上 (王宁珠等, 1985), 比较粗放, 而揭示出的信息量较

收稿日期: 2006-05-11 修回日期: 2006-06-20

**基金项目:** 国家科技攻关项目 (2002BA546C); 湖南省科技攻关重大项目 (2002AA205A); 武汉市科技攻关重点项目 (20022005132) [Supported by National Key Technologies Research and Development Program of China (2002BA546C); Key Technologies Research and Development Program of Hunan Province (2002AA205A); Key Technologies Research and Development Program of Wuhan City (20022005132)]

**作者简介:** 刁英 (1978-), 女, 重庆市永川人, 博士生, 从事植物分子细胞遗传学与植物转基因研究。

\* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: huzhongli@whu.edu.cn)

少,目前已经有研究者将分子生物学技术引进到莲的研究中来,并且取得了一定的进展,如将先进的荧光原位杂交技术引进了对莲的分子细胞遗传学研究(Diao等,2005),利用分子标记对莲进行遗传作图,克隆莲中氧化途径中的重要代谢酶类的基因等。

许多植物基因组中含有很高比例的重复序列,例如水稻基因组中重复序列占到50%(McCouch等,1991),而柠檬中则占到95%(Flavell等,1974)。亲缘关系较近的物种的特异性重复序列可能有很大的不同,亲缘关系较远的物种能有相似的特异性重复序列。 $C_0t-1$  DNA 仅仅含有高度和中度 DNA 重复序列,不含有单及低拷贝序列。Yan 等人(1998)研究表明在 BAC 等大片段克隆的 ISH *in situ* hybridization) 中使用  $C_0t-1$  DNA 封阻是非常必要的,封阻的使用保证了试验结果更为精确可靠。荧光原位杂交技术(FISH)是分子细胞遗传学研究的一种主要的技术。它可以直观进行物理作图以及进行物种进化的研究。目前 BAC-FISH、YAC-FISH 在植物中的运用越来越多,植物  $C_0t-1$  DNA 的使用随之增多。由于重复序列在植物进化研究中的广泛运用,因此本实验室制备了莲的  $C_0t-1$  DNA,并在莲的中期染色体上进行了原位杂交,试图对重复序列在莲染色体上的分布状况进行研究,同时探讨  $Cot-1$  DNA 作为研究分类进化的一种方法的可行性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

中国莲由武汉大学莲藕中心提供。其幼嫩根尖用于染色体标本制作,嫩叶用于基因组 DNA 的提取。

### 1.2 实验方法

1.2.1 植物总 DNA 的提取 取新鲜嫩叶,总 DNA 提取采用 CTAB 法(Doyle 等,1988)。

1.2.2 莲基因组 DNA 的打断及  $C_0t-1$  DNA 制备 将纯化的莲的基因组 DNA 用超声波打断至 100bp 至 1 000 bp 的长度,根据 DNA 动力学公式  $Cot=1 = \text{mol/L} \times Ts$ ,计算所需  $C_0t-1$  DNA 完全复性的时间,利用 S1 核酸酶特异性地切除尚未复性的单或低拷贝序列,可得到所需的  $C_0t-1$  DNA。具体方法参见 Zwick 等(1997)。

1.2.3 莲中期染色体标本的制备 参照 Dillé 等(1990)的方法并略作修改。取生长旺盛的根尖,在水饱和的  $\alpha$ -溴萘溶液中于 25℃ 处理 2.5 h,切取 1

mm 左右根尖,0.075 mol/L KCl 前低渗处理 30 min,甲醇:冰醋酸(3:1)固定,双蒸水充分清洗根尖,2%的果胶酶及纤维素酶 1:1 混合 28℃ 下酶解 3~4 h,双蒸水后低渗 30 min 火焰干燥制片,-20℃ 贮存备用。

1.2.4 探针标记 用生物素标记莲基因组和  $C_0t-1$  DNA,采用切刻平移的方法(nick translation),15℃ 下反应 2.5 h,加 5  $\mu$ L 终止液(0.5M EDTA)终止反应。具体参照 Promega 公司生产的切口平移标记试剂盒。

1.2.5 杂交及信号的检出 参照 Hans 等(1999)的方法略加修改,具体为:将制好的片子 65℃ 烤 30 min,RNA 酶(0.1 mg/mL)37℃ 处理 30 min,用  $2 \times$  SSC(0.3 mol/L 氯化钠 0.03 mol/L 柠檬酸钠混合缓冲液)洗  $3 \times 5$  min,然后用胃蛋白酶(5  $\mu$ g/mL)37℃ 处理 15 min,用  $2 \times$  SSC 洗  $3 \times 5$  min,1%的福尔马林处理 10 min,用  $2 \times$  SSC 洗  $3 \times 5$  min,70%、95%和 100%梯度酒精脱水(各 2 min),干燥。用随机引物法标记的探针,配成杂交液(杂交液为 25  $\mu$ L 20%硫酸葡聚糖,6  $\mu$ L 探针,18  $\mu$ L 50%甲酰胺 50 mmol/L 磷酸缓冲液混合溶液),50  $\mu$ L/片,80℃ 共变性 2.5 min,然后 37℃ 杂交过夜。20%的甲酰胺(用  $2 \times$  SSC 稀释)42℃ 处理  $3 \times 5$  min,依次用  $2 \times$  SSC 和  $1 \times$  TN(0.1 mol/L Tris-Cl,0.15 mol/L NaCl 缓冲液)洗,然后用 100  $\mu$ L/片 TNB(TN + 0.5% blocking)37℃ 处理 30 min,接着对于生物素标记的探针用链抗亲和素-Cy3(Streptavidin-Cy3)和生物素化链抗亲和素(Biotinylated-anti-streptavidin)检测。观察时,载玻片用 1  $\mu$ g/mL DAPI 复染。制片在 Olympus BX60 荧光显微镜下观察。利用 Sensys CCD 1400E 系统和 V++ 软件合成图象,Photoshop 软件处理图片。

## 2 实验结果

### 2.1 莲基因组 DNA 的提取、打断及 $C_0t-1$ DNA 制备

莲基因组 DNA 提取结果见图 1,超声波打断的基因组 DNA 结果见图 2,其片段集中在 250~1 000 bp 之间,制备的  $C_0t-1$  DNA 结果见图 3,其片段主要也集中在 250~1 000 bp。其中打断的基因组 DNA 和制备的  $C_0t-1$  DNA 的片段长度在 100~1 000 bp 之间。调整  $C_0t-1$  DNA 的浓度至 1  $\mu$ g/ $\mu$ L。

## 2.2 荧光原位杂交

在间期核上,红色信号呈弥散状分布于整个核上,其中可见有个别较强的信号点(图4,A),说明基因组探针除了个别区域外分布较均匀;而  $C_0t-1$  DNA 探针在间期核上的红色信号明显没有基因组探针的信号多,但是也有较强的信号区域出现(图4,B)。以莲的基因组为探针对莲的中期染色体进行自杂交的结果显示,荧光信号在整个染色体上呈现出涂染的状态,而且在染色体的着丝粒,端粒及随体区域等位置信号更强(图4,C)。莲  $C_0t-1$  DNA 探针在莲的中期染色体上呈现出了红色的明亮的荧

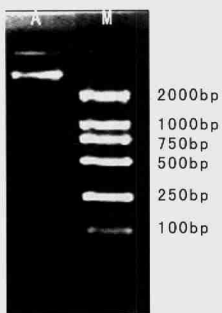


图1 莲基因组 DNA 电泳结果  
Fig. 1 Preparation of total genomic DNA of *N. nucifera* L.  
A 为莲基因组 DNA; M 为 DL2000 marker.

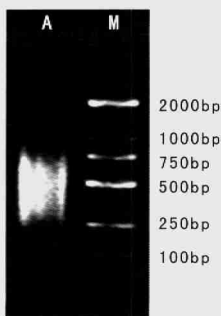


图2 超声波打断莲基因组后电泳结果  
Fig. 2 Autoclave shearing of total genomic DNA of *N. nucifera* L.  
A 为打断的 DNA; M 为 DL2000 marker.

光信号,主要集中在端粒,着丝粒及随体区域。在 1 号染色体的长臂上也出现了两对明显的红色荧光信号(图4,D)。

## 2.3 莲的基于 $C_0t-1$ DNA FISH 的核型及基于 GISH 的核型

将莲的同源染色体按照其相对长度依次排列,其中随体染色体放在最后分别定为第 7 号和第 8 号染色体(图4:E,F)。从排列的核型上可以见到,基因组和  $C_0t-1$  DNA 探针的杂交信号在同源染色体

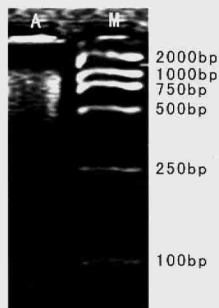


图3 莲的  $C_0t-1$  DNA 电泳结果  
Fig. 3 Preparation of  $C_0t-1$  DNA  
A,  $C_0t-1$  DNA; M, DL2000 marker.

上的分布较为一致。

## 3 讨论

莲基因组 DNA 探针在整个间期核及染色体上都有杂交信号分布,只是信号的强弱有差异。以莲的  $C_0t-1$  DNA 为探针对莲的中期染色体进行荧光原位杂交的结果显示出了较为恒定的杂交信号。两者相似的结果是在染色体末端,次缢痕以及着丝粒等区域有较强的信号分布。植物染色体的重要组成元件包括了端粒,着丝粒以及次缢痕,这些结构在保证染色体的结构的完整性和正常的复制分裂行为上起着重要作用,这些区域主要是由各种高度或中度重复序列组成,虽然目前这些重复序列的功能并未完全了解,但是可以肯定的是重复序列在保证染色体正常发挥功能上是必需的(Lima-de-Faria, 1983)。同时,以前的研究结果表明莲的异染色质区主要集中在着丝粒、端粒及次缢痕处,在 1 号染色体的长臂上也有异染色质中心(刁英等, 2004),目前  $C_0t-1$

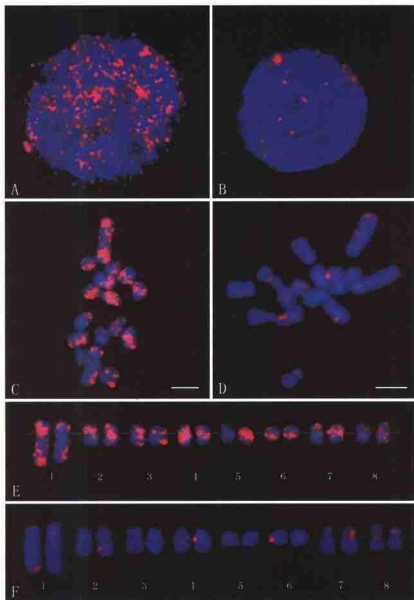


图4 莲  $C_0t-1$  DNA FISH 及 GISH 结果

Fig. 4 FISH of the  $C_0t-1$  DNA probe and GISH to the metaphase chromosomes and nuclei of *N. nucifera* L.

A, C, E 为莲基因组 DNA 为探针分别在间期核、中期染色体上的荧光原位杂交的结果及排列的核型,其中红色为杂交信号。B, D, F 为莲  $C_0t-1$  DNA 为探针分别在间期核、中期染色体上的荧光原位杂交的结果及排列的核型,其中红色为杂交信号。标尺为 5  $\mu\text{m}$ 。

A, C, E showed the location of probe of genomic DNA in interphase nuclei, metaphase chromosomes and the karyotype of lotus, respectively, the red indicated the hybridization signals. B, D, F showed the location of probe of  $C_0t-1$  DNA in interphase nuclei, metaphase chromosomes and the karyotype of lotus, respectively, the red indicated the hybridization signals. Scale bars = 5  $\mu\text{m}$ .

高度和中度重复的序列,因此杂交信号相对于基因组杂交的信号少而且更突出。用  $C_0t-1$  DNA 作探针更容易判断出高度和中度重复序列在染色体上的分布状况。在莲中,1 号染色体的长臂上就有相对明显的重复序列的分布,而其他染色体上就主要是端粒、着丝粒和核糖体 DNA 的重复序列的分布。对于

1 号染色体长臂上的重复序列的信号,有部分可能是端粒信号(Diao 等,2005),但其余的信号的重度序列的组成则需要进一步研究。

$C_0t-1$  DNA 仅含有高度和中度重复的 DNA,不同的植物重复序列所占的比例不同,从而导致  $C_0t-1$  DNA 的产量不同,一般  $C_0t-1$  DNA 占植物总 DNA 的

$C_0t-1$  DNA 仅含有高度和中度重复的 DNA, 不同的植物重复序列所占的比例不同, 从而导致  $C_0t-1$  DNA 的产量不同, 一般  $C_0t-1$  DNA 占植物总 DNA 的 1/10 至 1/20 (Bennett 等, 1991)。因为莲的基因组较小, 从莲的  $C_0t-1$  DNA FISH 的结果看来, 信号分布的范围占整个染色体不多的区域, 所以其重复序列在基因组中的总量不多。

$C_0t-1$  DNA FISH 结果显示, 同源染色体上的信号相对一致, 目前在人类中已经成功的进行了  $C_0t-1$  DNA 显带分析 (Wang 等, 1995), 因此对于那些染色体较小或是染色体形态相近较难区分的植物, 可以通过  $C_0t-1$  DNA FISH 的结果进行同源染色体的识别, 为有效识别同源染色体, 建立准确的核型提供了一种较为新颖的方法。

目前  $C_0t-1$  DNA 主要应用在 ISH 上, 通过其所含的高度和中度重复序列与标记探针中的重复序列产生竞争性杂交, 起到“封阻”的作用, 从而避免探针中重复序列与基因组 DNA 非特异性结合, 避免了许多假阳性信号的产生, 在较大片段的探针如 BAC 和 YAC 的染色体原位杂交中得到了广泛的运用 (覃瑞等, 2000; Rajyashri 等, 1998)。 $C_0t-1$  DNA 作为基因组的重要组成成分, 对其自身的研究和应用研究开展的非常有限。在人类的中期染色体上  $C_0t-1$  DNA 带纹的发现, 为染色体结构研究提供了一种新的思路。重复序列由于所受的选择压力较小因此具有相对较高的可变性, 其在近缘或远缘物种的基因组之间的分布和组成存在着一定的差异, 因此重复序列在研究植物基因组结构和功能的关系, 以及提示植物基因组在进化上的关系上有重要作用 (柴守诚等, 1999; Kato 等, 1998; Britten, 等, 1968)。由此看来, 研究  $C_0t-1$  DNA 及其在基因组中的分布可以成为研究植物基因组组成和进化的一种有效的手段。莲是一种介于单子叶和双子叶之间的植物, 通过研究比较莲的  $C_0t-1$  DNA 在其近缘种属及品种间的差异, 能够为分类学和进化研究提供新的手段和证据。

#### 参考文献:

- 倪学明. 1987. 中国莲[M]. 北京: 科学出版社: 1-163.
- Bennett M D, Smith J B. 1991. Nuclear DNA amounts in angiosperms[J]. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **334**: 309-345.
- Britten R J, Kohne D E. 1968. Repeated sequences in DNA [J]. *Science*, **161**: 529-540.
- Chai SC (柴守诚), Yuan HY (员海燕). 1999. Characteristics of various repeated DNA sequences in higher plants (高等植物 DNA 重复序列的主要类型和特点) [J]. *Acta Bot Borea l-Occident Sin* (西北植物学报), **19**(3): 555-563.
- Diao Y (刁 英), Liu JY (刘静宇). 2004. Quantitative chromosome map of *Nelumbo nucifera* Gaertn (中国莲的定量染色体图) [J]. *J Wuhan Univ (Nat Sci Edi)* (武汉大学学报 (理学版)), **50**(4): 505-510.
- Diao Y, Liu JY, Yang GX, et al. 2005. Karyotype analysis of *Nelumbo nucifera* and *Nelumbo lutea* by chromosome banding and fluorescence *in situ* hybridization [J]. *Korean J Genetics*, **27**(2): 187-194.
- Dillé J E, Bittel D C, Ross K, et al. 1990. Preparing plant chromosomes for scanning electron microscopy [J]. *Genome*, **33**: 333-339.
- Doyle J J, Doyle J I. 1988. Isolation of plant DNA from fresh tissue [J]. *Focus*, **12**(1): 13-15.
- Flavell R B, Bennett M D, Smith J B, et al. 1974. Genome size and the proportion of repeated sequence DNA in plants [J]. *Biochem Geht*, **12**: 257-269.
- Hans de Jong, J H, Franz P F, Zabel P. 1999. High resolution FISH in plant-techniques and applications [J]. *Trend in Plant Science*, **4**(7): 258-263.
- Kato S, Fukui K. 1998. Condensation pattern (CP) analysis of plant chromosomes by an improved chromosome image analysing system, CHIAS III [J]. *Chromosome Res*, **6**(6): 473-479.
- Lima-de-Faria A. 1983. Molecular evolution and organization of the chromosome [M]. Amsterdam, Elsevier Science Publishers B. V.
- McCouch S R, Smyth S D. 1991. The world rice economy challenges ahead [M] // Rice biotechnology; biotechnology in agriculture No. 6. Edited by G. S. Khush and G. H. Toennissen. Commonwealth Agricultural Bureaux International, Wullingford. U. K.
- Qin R (覃 瑞), Wei WH (魏文辉), Song YC (宋运淳). 2000. Application of BAC-FISH in plant genome research (BAC-FISH 在植物基因组研究中的应用) [J]. *Prog Biochem Biophys* (生物化学与生物物理进展) **20**(1): 20-23.
- Rajyashri K R, Nair S, et al. 1998. Isolation and FISH mapping of yeast artificial chromosomes (YACs) encompassing an allele of the Gm2 gene for gall midge resistance in rice [J]. *Theor Appl Genet*, **97**: 507-514.
- Wang Y, Minoshima S, Shimizu N. 1995. *Cot-1* banding of human chromosomes using fluorescence *in situ* hybridization with Cy3 labeling [J]. *Jpn J Hum Genet*, **40**(3): 243-252.
- Wang NZ (王宁珠), Ma FL (马芳莲), Li XL (李细兰). 1985. Analysis of respective chromosome numbers and karyotypes of 20 varieties of genus *Nelumbo* (莲属 20 个品种染色体数目及其核型分析) [J]. *J Wuhan Bot Res* (武汉植物学研究), **3**(3): 209-217.
- Yan HM, Song YC, Li LJ, et al. 1998. Physical location of the rice Pi-5(t), Glh and RTSV gene by ISH of BAC clones [J]. *Wuhan Univ J Nat Sci*, **3**(2): 226-230.
- Zwick M S, Hanson R E, Mcknight T D. 1997. A rapid procedure for the isolation of  $C_0t-1$  DNA from plants [J]. *Genome*, **40**: 138-142.