

黑麦 1R 染色体的微切微克隆研究*

江赐忠 宋文芹 李秀兰 陈瑞阳**

(南开大学生物系 天津 300071)

摘要 显微分离出黑麦(*Secale cereale* L.) 1R 染色体,用 Cohesive adapters single primer PCR (CASP-PCR) 方法进行体外扩增,以 DIG-11-dUTP 标记扩增产物为探针,进行 Southern 分子杂交,结果表明扩增产物来自黑麦 1R 染色体。用 1/10 体积的连接物转化 *E. coli* DH5 α , 获得 10 000 多个重组菌落。经酶切分析,克隆子的插入片段为 250~500 bp,为进一步筛选 1R 染色体的分子标记打下了基础。

关键词 黑麦, 1R 染色体, 微切微克隆, Cohesive adapters single primer-PCR

STUDIES ON MICRODISSECTION AND MICRO-CLONING OF THE RYE CHROMOSOME 1R *

JIANG Ci-Zhong SONG Wen-Qin LI Xiu-Lan CHEN Rui-Yang**

(Department of Biology, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract Two 1R chromosomes of *Secale cereale* L. were isolated from one metaphase cell by means of chromosome micro-isolation, and the chromosomal DNA was amplified adopting the cohesive adapters single primer polymerase chain reaction (CASP-PCR) technique. The CASP-PCR products were labeled as probes. The results of Southern blot hybridization confirmed that the CASP-PCR products derived from the chromosome 1R were homologous with the genomic DNA of *S. cereale*. The clones of PCR products were obtained with high efficiency. Over 10 000 recombinant clones were obtained from one-tenth of the ligation mixture which was transferred into the competent *E. coli* DH5 α . The size of the inserted fragments of clones ranged from 250 bp to 500 bp. This research has established the foundation for further selection of chromosome 1R markers.

Key words *Secale cereale*, Chromosome 1R, Microdissection and microcloning, Cohesive adapters single primer polymerase chain reaction

染色体微切微克隆技术,最早由 Scalenghe 等^[1]提出,并首次在果蝇唾腺多线 X 染色体上取得成功。由于该技术操作复杂,不容易掌握,因此该技术在当时没有得到推广和应用。1989 年 Lüdecke 等^[2]将 PCR 技术应用到染色体显微切割中来,使收集的染色体从 100~200 条减少到数个染色体 DNA 片段。随后,该项技术被广泛应用于人类与动物的染色体上。随着核酸分子标记技术的发展,不少研究者利用此项技术制备整条染色体绘画探针和构建探针池,尤其在人类遗传疾病有关的特异染色体区带的微切微克隆方面有多篇报道^[3~6]。由于植物染色体同步化和染色体制片比较困难,从而限制了染色体微切微克隆技术在植物染色体上的应用。目前只有在甜菜中与抗线虫有关的染色体^[7]、大麦 1HS 染色体^[8]、小麦染色体^[9]及黑麦 B 染色体^[10]上有报道。我国目前在蚕豆染色体方面

* 国家自然科学基金资助项目(39470343)。The project supported by the National Natural Science Foundation of China.

** 通信联系人。Author for correspondence.

收稿日期:1997-08-11 接受日期:1998-03-17

开展了研究^[11]。黑麦 1R 染色体上具有许多抗病基因,例如在育种上具有重要意义的抗霉粉病基因 *Pm8*、抗秆锈病基因 *Sr31*、抗叶锈病基因 *Lr26*、抗黄锈病基因 *Yr9* 和抗绿病菌基因 *Gb* 等^[12],但与这些基因紧密连锁的分子标记很少。人们期待通过筛选与目的基因紧密连锁的分子标记,以便在 1R 染色体上定位和克隆出这些基因。本文以黑麦 1R 染色体为材料,显微分离出完整的 1R 染色体并进行 PCR 扩增与微克隆,初步构建 1R 染色体探针库,建立了一种简捷的植物染色体微切微克隆方法。为进一步筛选 1R 染色体上控制重要农艺性状基因的分子标记或单拷贝探针(SCP)和增加 1R 染色体 RFLP 图谱密度奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 染色体标本的制备和染色体显微分离

黑麦(*Secale cereale* L.) 1R 染色体的标本制备参考宋文芹等^[11]报道的方法,略加修改。种子经 70% 酒精消毒后,在 25 °C 条件下培养。待根尖长到 0.1 cm 时,用 Hu(羟基脲)处理 18 h,水培养 4 h,最后用 APM(甲基氨基草磷)处理 4 h,70% 酒精固定备用。

将染色体标本置于载物台上,用自制的玻璃针,通过显微操作器的螺旋杆,对准待分离的染色体,在显微镜目镜视野的监视下进行显微切取,小心地放入 Eppendorf 管中。

1.2 1R 染色体的体外扩增

PCR 方法参照邓汉湘等^[5]的报道,略加修改。

1.2.1 1R 染色体 PCR 前的预处理 将 1R 染色体收集到 Eppendorf 管中,加入 2 μ L *Sau3A* I、1 \times Multibuffer (Promega) 和 0.5 μ L 10 g/L 蛋白酶 K 溶液。同时取一干净的空 Eppendorf 管做同样操作,作为阴性对照。在 37 °C 下消化 4 h,78 °C 保温 15 min,灭活蛋白酶 K。接着加入 0.3 μ L 10 \times 缓冲液 B 和 0.2 μ L *Sau3A* I (共 2 U, Promega)。37 °C 下酶切 4 h,78 °C 保温 15 min,灭活 *Sau3A* I。然后加入预先制备好的 20 μ mol/L 接头 2 μ L,0.6 μ L *T₄* DNA 连接酶 10 \times 缓冲液和 1 μ L *T₄* DNA 连接酶(共 6 Weiss units, New England)。在 12 ~ 14 °C 下,连接 14 ~ 16 h。接头的制备是用 DNA 合成仪合成的 24 碱基(引物)、10 碱基两个寡聚核苷酸片段,按摩尔比 1:1 混合,58 °C 下退火 1 h。

↓ *Eco*R I

5'CGG GAATTCTGGCTCTGCCACATG 3'———Primer (24 base)

3'CTGTACCTAG 5'

1.2.2 Cohesive adapters single primer PCR (CASP-PCR) 完成连接反应后,按下列步骤向连接混合液中加入 PCR 反应液(10 μ L 10 \times PCR 缓冲液,6 μ L *MgCl₂* (25 mmol/L),10 μ L dNTPs (2 mmol/L),10 μ L 引物(2 μ mol/L),5 U *Taq* DNA 聚合酶(Promega),用无菌双蒸水补齐至 100 μ L)。在 70 °C 下延伸 10 min,补平接头 3'末端的 18 碱基。随后在 96 °C 下变性 1 min,56 °C 下退火 1.2 min,72 °C 下延伸 1.3 min,共进行 35 个循环。最后在 72 °C 下延伸 5 min。取 2 μ L 初级 PCR 产物作为模板,再次扩增 20 个循环,作为次级 PCR 产物。

1.3 探针的标记与纯化

次级 PCR 产物经酚、氯仿抽提,乙醇沉淀,三蒸水溶解后,用随机引物法标记探针。具体过程参见 Direction of DIG DNA Labeling and Detection Kit (Boehringer Mannheim)。

1.4 Southern 印迹杂交及杂交信号检测

Southern 印迹参见《分子克隆实验指南》^[13]。杂交过程及杂交信号的检测参见 Direction of DIG DNA Labeling and Detection Kit (Boehringer Mannheim)。

1.5 克隆和重组子的鉴定

次级 PCR 产物纯化后用 *EcoR* I 酶切,低熔点胶回收,连到 100 ng 预先用 CIP(牛小肠碱性磷酸酶)去磷酸化的 pUC19 质粒上(先经 *EcoR* I 酶切),取出 1/10 体积的连接物转化感受态菌 *E. coli* DH5 α 。在含氨苄青霉素、IPTG 和 X-gal 的 LB 平板上涂布。37 °C 倒置培养过夜。随机挑取白色重组菌落于少量 LB 液过夜培养,煮沸 5 min,离心,取 5 μ L 上清液进行 PCR 扩增。两引物为 pUC19 多克隆位点两侧的序列: 5' ACAGGAAACAGC-TATGACCA3'和 5'CGTTGTAACGACGGCCAG3'^[16]。电泳检测插入片段大小。

2 实验结果

2.1 黑麦 1R 同源染色体的显微分离

黑麦 1R 染色体是次中部着丝点具随体的染色体。由于具有随体,因此很容易识别。图 1 是黑麦一个完整的体细胞染色体(2n = 14 + 2B)和分离 1R 染色体的过程。箭头所示为分离的 1R 染色体。

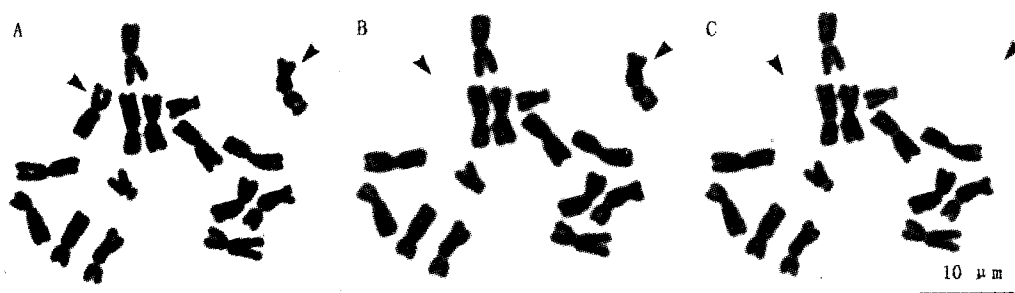


图 1 黑麦 1R 染色体(箭头所指)的显微分离过程

Fig. 1 Microdissection of two chromosomes 1R (arrowhead) from a metaphase cell of *Secale cereale*
A. Chromosome 1R before microdissection; B. One chromosome 1R has been removed from the metaphase plate;
C. The other one has been removed.

2.2 1R 染色体的 PCR 扩增产物分析

2%琼脂糖凝胶电泳结果显示,初级和次级扩增产物分布均匀,片段大小在 250 ~ 2 000 bp,主要在 250 ~ 700 bp 以内,并未发现有特异带(图 2A)。另外,取 2 μ L 初级产物进行次级 PCR 扩增,可获得大量 1R 染色体的扩增产物(图 2A),保证了足够量探针的获得,也为将来的克隆研究提供充足的外源 DNA。

2.3 Southern 印迹杂交

在以 1R 染色体 PCR 产物为探针的 Southern 杂交图上,初级和次级 PCR 产物及黑麦基因组 DNA 上都有明亮的杂交信号,而初级和次级 PCR 负对照未检测到杂交信号(图 2B)。此外,我们在以 DIG 标记的黑麦基因组 DNA 为探针的 Southern 杂交时,也得到了类似的结果。这表明 PCR 产物与黑麦基因组 DNA 之间具有同源性。

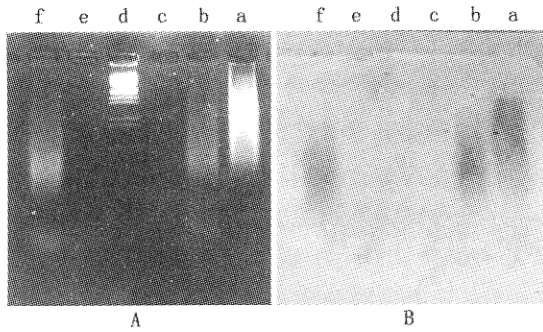


图 2 1R 染色体 PCR 产物的 Southern 印迹杂交分析(以 1R 染色体次级 PCR 产物为探针)
Fig.2 Southern blot analysis of the PCR products of chromosome 1R (using the secondary PCR product as the probe)

A. Agarose electrophoresis before Southern blot hybridization; B. Southern blot hybridization. a. The rye genomic DNA (digested by *Sau3A I*); b. Primary PCR product of chromosome 1R; c. Primary PCR product of the control; without DNA; d. λ DNA (*EcoR I*/*Hind III*); e. Secondary PCR product of the control; f. Secondary PCR product of chromosome 1R.

2.4 克隆

用 1/10 连接物转化 *E. coli* DH5 α , 获得 10 000 多个重组菌落。随机挑出 100 个克隆子进行分析。电泳结果显示克隆子的 PCR 扩增片段长度不到 650 bp。而克隆进的外源片段的实际长度为 PCR 扩增片段减去 108 bp(40 bp 的两引物序列长度和 68 bp 的 pUC19 多克隆位点序列长度)。所以,插入片段实际长度大约为 250 bp 到 500 bp(图 3)。

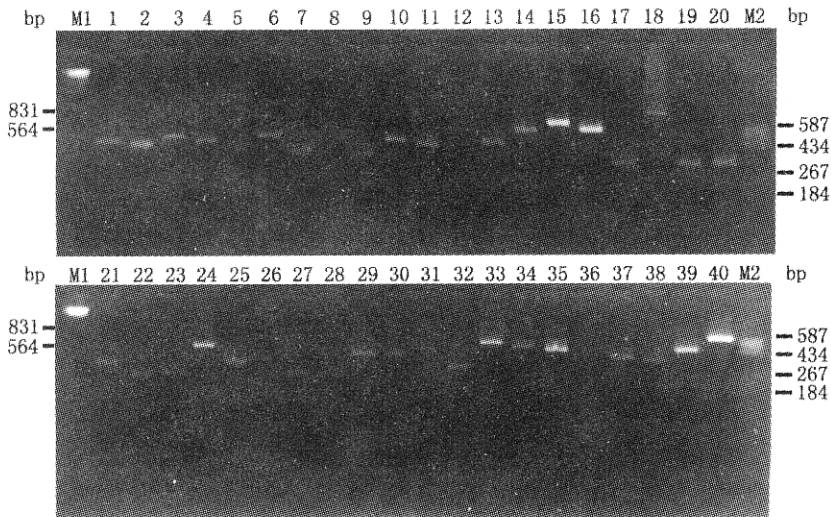


图 3 克隆子插入片段电泳图

Fig.3 Inserted fragments of 40 clones

M1. λ DNA (*EcoR I*/*Hind III*); M2. pBR322(*Hae III*); 1~40. Inserted fragments of clones.

3 讨论

本文以黑麦 1R 染色体为材料,将 CASP-PCR 方法引入植物染色体微切微克隆的研究,并结合本实验室的条件对该方法进行了改进。经典的微切微克隆将微切到的染色体或特异片段收集于油室进行处理^[2,5]。而我们对显微分离到的染色体处理时不用建立油室,将分离到的染色体直接收集于微量离心管中,避免了油室所要求的一系列复杂显微操作。并且对收集到的染色体 DNA 进行蛋白酶 K 消化、*Sau3A I* 酶切和连接反应,由原来油室中的纳升级操作变为微升级操作,简化了操作程序,使得该技术在常规实验室条件下

都可进行。另外,从显微分离到 PCR 整个实验流程,都始终在一个 Eppendorf 管中进行,减少反应混合液的转移次数,操作方便,减少了污染。

前人在进行染色体微切微克隆时,常常微切染色体多达几十条甚至上百条,或是微切染色体特异区域几十段^[2,3,5]。而本文只用 2 条 1R 染色体为起始 DNA 模板进行体外扩增就获得了足够量的扩增产物(图 2A)。从而把底物 DNA 的量降低到 2 条 1R 染色体。而在染色体标本的同一个分裂相细胞中便可分离得到 2 条同源染色体。这不但减少显微操作工作量,而且避免了从不同细胞中显微分离染色体时由于识别错误所带来的污染。

从扩增产物的电泳图(图 2A)可见,Eppendorf 管中显微分离到的染色体确实得到了扩增。由于黑麦 1R 染色体为次中部着丝点具随体染色体,在形态上与其它染色体有明显差别,保证识别上不会出错,保证 Eppendorf 管中收集的染色体肯定只有 2 条 1R 染色体,这可初步推断 PCR 产物来自 1R 染色体。

为进一步验证扩增产物是否真正来源于微切染色体,我们用 DIG-11-dUTP 分别标记 PCR 产物和黑麦基因组 DNA,作为探针与扩增产物和总体 DNA 进行 Southern 杂交。扩增产物与总体 DNA 泳道上杂交信号显著,对照则未检测到杂交信号(图 2B)。两次杂交实验都证明了 PCR 产物与黑麦染色体的同源性,表明 PCR 产物来自显微分离收集到的 2 条 1R 染色体,也表明该方法的可靠性及其在植物染色体上的适用性。

正如预期结果那样,扩增产物电泳图(图 2A)中未检测到特异带,表明 CASP-PCR 不会优先扩增某特异结构的 DNA 序列。Southern 印迹杂交结果(图 2B)也没有特异带信号出现。而在研究植物染色体 DNA 中应用较多的 DOP-PCR 则会优先扩增低拷贝序列^[14],所扩增的产物不能代表整条染色体,也就不能制备用于整条染色体绘画的探针池。虽然 CASP-PCR 产物为“涂片状”,但是否扩增出整条染色体序列,则有待进一步的研究来证明。

接头中含有的限制性内切酶酶切位点提高了克隆效率。我们随机挑出 100 个克隆子进行分析。图 3 为其中 40 个克隆子的插入片段的 PCR 电泳图。由此分析出:有的菌落(如图 3 中 8.36)质粒空载,不含插入片段。在所分析的 100 个菌落中空载体约占 5%。随机挑出的 100 个克隆子的插入片段大小比较接近,在 250 bp 到 500 bp 之间。看来没克隆到大片段或者大片段的克隆效率极低。这可能是由于小片段含量比大片段多许多,在与载体连接时竞争载体所致。克隆所得的这种长度的 DNA 片段适合作为 DNA 分子标记物。从这些克隆中筛出含单拷贝序列的克隆,制成 SCP 池,结合 RFLP、CISS(染色体原位抑制性)杂交技术,可以筛选与特定基因连锁的分子标记,促进 STS(sequence-tagged site)的筛选、目的基因的定位和克隆,还将为其它植物材料染色体特异区域分子水平的研究提供有效方法。

在目前所构建的较详细的黑麦 1R 染色体的 RFLP 图谱^[15]中,只有 16 个分子标记,其中的 12 个位点都集中于着丝粒附近的 15 cM 的区域上,而且着丝粒在图谱中的具体位置也没有确定下来。在标记这 16 个基因位点时,所用的探针均来自小麦的 cDNA 或 gDNA 克隆。这就迫切需要筛选出能用作分子标记又来自黑麦 1R 染色体本身的 SCP。此外,在目前所构建的黑麦 1R 染色体的 RFLP 图谱中,长、短臂远端区没有分子标记的区域还很大,所以有待分离更多的探针来增加图谱的密度。从传统的 cDNA 或基因组文库中筛选分子标记耗资大、需时长,而应用染色体显微切割技术从特定染色体区域 DNA 文库中获

