普通小麦 7B 染色体的显微分离和低拷贝专化 DNA 序列的克隆

刘 宝 戎均康^④ 董英山 韩方普 刘振兰
何孟元 黄百渠* 郝 水

(东北师范大学遗传与细胞研究所, 长春 130024; ^④Department of Plant Genetics,

The Weizmann Institute of Science, Rehovot 76100, Israel. * 联系人)

摘要 以普通小麦“中国春”7B 单体的花粉母细胞为材料, 显微分离出 7B 染色体. 经蛋白酶 K 和 DNA 拓扑异构酶 iv 处理后进行 1~3 轮 DOP-PCR 扩增, 产生了 150~700 bp 的连续 DNA 片段. 基因组 Southern 杂交证实扩增的 DNA 源自小麦基因组. 将大于 200 bp 的第 3 轮 PCR 扩增产物 (50 μ L) 克隆后, 可产生 20 000 个重组克隆. 对随机选取的 50 个克隆分析表明, 其中 21 个克隆产生了大小为 240~600 bp 的清晰 PCR 产物. 点杂交结果表明, 21 个克隆中 11 个 (~55%) 为低拷贝序列, 10 个 (~45%) 为重复序列. 对“中国春”全套“缺体-四体”基因组 DNA 的 Southern 杂交结果表明, 产生清晰杂交谱带的 6 个低拷贝克隆均为 7B 染色体专化或第 7 部分同源群专化序列; 而随机选取的 3 个重复序列则为没有专化性的弥散型重复序列.

关键词 小麦 染色体显微分离 DOP-PCR 专化 DNA 序列

在重要农作物上建立高密度的 RFLP (restriction fragment length polymorphism) 图谱是实现农艺性状分子标记和利用定位克隆技术分离有用基因的先决条件. 小麦是人类最重要的粮食作物之一, 国内外已对小麦 RFLP 图谱的建立进行了大量工作. 由于普通小麦的核基因组巨大 (其 C 值为 1.7×10^{10} bp) 且含有 80% 以上的重复序列^[1], 利用常规的基因组 DNA 或 cDNA 文库进行随机克隆的方法来丰富某些特定染色体 (或区段) 的 RFLP 探针十分困难, 而建立染色体 (或区段) 专化的 DNA 文库则是解决该问题的一种途径^[2]. 目前分离单个染色体的技术有两种, 即流式细胞仪和显微切割, 其中后者更适合植物染色体的分离. 迄今, 利用染色体显微切割技术已成功地进行了野生甜菜^[3]、燕麦^[4]、大麦^[5]、普通小麦^[6~9]、王百合^[10, 11]、水稻^[12]、大豆^[13]、黑麦^[14, 15] 和蚕豆^[16] 等十种植物染色体的分离、文库构建以及专化序列的克隆工作. 关于小麦上的工作来自两个实验室: 一是 Albani 等人^[6] 对 4D 染色体的分离和 PCR 扩增, 但未指出是否获得专化 DNA 序列; 再就是 Feldman 实验室^[7~9] 关于 5B 长臂 (5BL) 的分离、扩增和染色体专化 DNA 序列的克隆. 本文报道我们成功分离普通小麦 7B 染色体, 构建其基因组 DNA 文库并高效率克隆低拷贝、专化 DNA 序列的实验结果.

1 材料与方法

(1) 染色体显微分离. 以普通小麦“中国春”(CS) 的 7B 单体为实验材料, 取新鲜花药在酒精: 冰醋酸 (3: 1) 中固定 30 s, 然后置于 2 片盖玻片之间在 20% 冰醋酸中压片. 用液氮法揭去上面较小 1 张盖片后, 将较大的 1 张盖片 (附着有染色体) 迅速置于 70%、90% 和 100% 的酒精系列中各 10 min 脱水并保存于 100% 的酒精中. 染色体显微分离在配有显微操作仪 (Eppendorf 5170) 的倒置显微镜下进行 ($\times 400$). 玻璃针用 borosilicate 玻璃棒在拉针仪上拉制而成, 其尖部为 0.5~

1.5 μm , 使用前将玻璃针于紫外线下照射 1h. 在显微操作仪控制下对目标染色体周围进行划割, 由于静电引力使染色体吸附于玻璃针上. 然后将分离的染色体连同玻璃针尖一并放入预先硅化并含有 20 μL 蛋白酶 K (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和拓扑酶 iv (1U) 混合液的 0.5 mL PCR 离心管中 (每管放入 5~6 条染色体).

(2) 染色体 DNA 的 PCR 扩增. 上述含染色体的离心管分别在 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 50 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1 h (分别使拓扑酶 iv 和蛋白酶 K 起作用) 后, 置于 90 $^{\circ}\text{C}$ 下 10 min 以灭活两种酶. 然后, 以该染色体 DNA 为模板, 利用 Telenius 等人^[17] 设计的 DOP-PCR (degenerate oligonucleotide primed PCR) 技术, 即用一个在较低退火温度 (30 $^{\circ}\text{C}$) 下可随机扩增的简并引物 (5'-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3'), 进行 PCR 扩增. PCR 条件基本根据 Vega 等人^[17] 的报道. 第 1 轮 PCR 扩增时加入简并引物 1.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 4 种 dNTP 各 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$, MgCl_2 2 mmol/L, 10 $\times$ Taq buffer (Promega) 5 μL , Taq 酶 (Promega) 2.5U, 经紫外线处理的无菌水至 50 μL . 矿物油 (Sigma) 封盖后, 先在 90 $^{\circ}\text{C}$ 下 5 min, 随之进行 5 个循环的 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min, 30~72 $^{\circ}\text{C}$ 过渡 3 min; 然后, 在下列条件下进行 25 个循环的扩增: 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 62 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2.5 min, 最后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 下延伸 10 min. 为增加产量以第 1 轮 PCR 产物 (2 μL) 为模板, 用第 1 轮中高退火温度 (62 $^{\circ}\text{C}$) 循环, 进行第 2 轮扩增, 之后同样条件下又用第 2 轮 PCR 产物 (2 μL) 为模板进行第 3 轮扩增 (阴性对照亦如此). 由于 DOP-PCR 具有可随机扩增的特性, 因此保证无外源 DNA 污染是实验成功的关键. 为此, 我们采取了下列预防措施: () 几乎所有实验操作包括显微分离、溶液配制和 PCR 扩增均在超净台上进行; () 所有玻璃器皿均在 200 $^{\circ}\text{C}$ 下烘烤 3 h 以上, 而塑料器皿则高压灭菌 30 min 以上; () 预先对超净台、手套等用 1 mol/L HCl 进行多次擦洗; () 所有实验用具、器皿 (包括 PCR 离心管) 均在紫外线下处理 1 h 以上; () 每次 PCR 扩增均设置阴性对照 (即不加入目的染色体).

(3) DNA 片段的克隆和分析. 将第 3 轮 PCR 产物 (50 μL) 中大于 200 bp 部分用 Wizard PCR-纯化试剂盒 (Promega) 纯化后溶于 50 μL 无菌水中. 取 2 μL 按载体/DNA 片段 1:3 (摩尔比) 比例在 10 μL 反应液中与 pGEM-T 载体 (Promega) 连接. 用 2 μL 连接产物转化 JM109 *E. coli* 感受态细胞, 然后均匀涂在 LB/Amp/X-gal/IPTG 平板上, 培养过夜后挑选白色菌落. 随机选取 50 个白色菌落于 2 mL LB/Amp 液体培养基中振荡过夜, 并离心收集于 1.5 mL Eppendorf 管中. 弃去上清培养基后加入 500 μL 无菌水并煮沸 10 min, 离心后于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下保存. 取 5 μL 上清液为模板利用载体上的 M13 正/反向通用引物进行常规 PCR 扩增. 用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 产物, 对呈阳性的克隆按上述方法进行纯化, 并与已知浓度和大小的 DNA 标准 (pUC19/ *Msp* iv 比较, 估算出 DNA 浓度和片段大小. 取等量 (20 ng) 产物按常规方法吸附至硝酸纤维素膜上. 用 ^{32}P 标记的 CS 基因组 DNA 为探针进行点杂交, 并据此判断 DNA 片段的重复或低拷贝性质.

(4) 低拷贝 DNA 克隆的染色体定位. 按 CTAB 法提取 CS 整套“缺体-四体”系列的基因组 DNA. 每样品取 10 μg 经 *Eco*R iv *Bam*H iv 或 *Hind* iv 消化后, 用碱转移法转至 Hybond N⁺ 尼龙膜 (Amersham) 上. 分别用 ^{32}P 标记由点杂交结果筛选出的低拷贝 DNA 克隆中的片段, 进行 Southern 杂交. 探针标记、预杂交、杂交、杂交后洗脱和放射自显影均同前述^[9].

2 结果和分析

2.1 染色体显微分离和 DOP-PCR 扩增

由于普通小麦单价体和二价体在减数分裂行为上的差异, 使得单价体在中期 iv 常以较高频率处于赤道板的边缘. 这使从固定时间较短的花粉母细胞中分离单价体成为可能. 对小麦花药

进行不同固定时间比较发现, 固定 30 s 即可制成适宜的制片进行目标染色体(7B 单价体)的显微分离. 对独立的 2 个离心管(各含有 3~5 条 7B 染色体)进行第 1 轮 DOP-PCR 扩增, 均产生了 150~700 bp 的连续 DNA 片段, 而阴性对照中无扩增产物. 分别对 2 个管进行 2 轮和 3 轮扩增时发现, 2 号管在 2 轮扩增时其阴性对照中出现了少量扩增产物, 而 1 号管在 2 轮扩增的阴性对照中均无扩增产物. 因此, 以后工作只用 1 号管产物进行. 为证实 1 号管中 PCR 产物源自小麦基因组, 将 1~3 轮 PCR 产物转至硝酸膜上, 以³²P 标记的 CS 基因组 DNA 为探针进行 Southern 杂交. 结果表明, 1 号管 1~3 轮 PCR 扩增产物均源自小麦基因组(图 1).

2.2 DNA 片段克隆及特性分析

将第 3 轮 DOP-PCR 扩增产物中大于 200 bp 部分从琼脂糖凝胶中抽提纯化后制备连接混合物, 然后转化细菌. 每次仅以第 3 轮 DOP-PCR 扩增产物(50 μ L)的 1/200 即可获得约 100 个白色重组克隆. 据此推算, 50 μ L 第 3 轮 DOP-PCR 产物可产生 20 000 个重组克隆, 而每管第 1 轮 DOP-PCR 产物(50 μ L)可预期产生约 500 000 个重组克隆(其中包括一定频率的克隆重复). 随机选取 50 个白色克隆, 利用载体上的 M13 正/反向通用引物进行 PCR 扩增发现, 这些 DNA 片段分布在 240~600bp 之间(图 2). 以³²P 标记的 CS 基因组 DNA 为探针对其中 21 个克隆的点杂交结果说明, 有 11 个克隆(~55%)为低拷贝序列, 10 个克隆(~45%)为重复序列(图 3).

图 1 以³²P 标记 CS 基因组 DNA 为探针对 1 号管 1~3 轮 DOP-PCR 产物及第 3 轮阴性对照的 Southern 杂交结果

说明扩增 DNA 源自 CS 基因组

图 2 以 M13 正/反向通用引物对随机选取的 50 个重组克隆的 PCR 扩增获得 21 个大小不等(240~500 bp)的清晰片段
DNA 标准为 pUC19/ *Msp* IV

2.3 低拷贝 DNA 序列的染色体定位

分别以 11 个低拷贝克隆为探针, 与经内切酶消化的 CS 整套“缺体-四体”非整倍体系列的基因组 DNA 进行 Southern 杂交. 结果表明, 其中 5 个序列只给出较弱或弥散的杂交信号; 另 6 个序列则产生了不同的清晰杂交带型, 其中 5 个为 7B 染色体专化序列, 即只定位于 7B 染色体上(图 4(a)), 1 个为第 7 部分同源群专化序列, 即定位于 7A, 7B, 7D 染色体上(图 4(b)). 随机选取 3 个重复克隆为探针对 CS 整套“缺体-四体”非整倍体系列基因组 DNA 的 Southern 杂交发现, 这 3 个克隆均产生弥散且较强的杂交信号, 未见明显的染色体专化性.

3 讨论

对普通小麦 21 条染色体的每一条进行显微分离和文库构建的意义是显而易见的. 因为

图3 以 ^{32}P 标记的CS基因组DNA为探针对21个克隆的点杂交结果
其中11个产生较弱的杂交信号,推测为低拷贝序列;
10个产生较强的杂交信号,可能为重复序列.杂交和
洗脱条件同文献[9].放射自显影-80℃下4d

图4 低拷贝DNA序列的染色体定位
(a) 克隆WC7B-13与*Bam*HI消化的CS第7部分同源群“四体-缺体”的Southern杂交结果,N7BT7D中杂交片段的消失说明为7B染色体专化序列.N7AT7B为7A缺体-7B四体;N7BT7D为7B缺体-7D四体;N7DT7A为7D缺体-7A四体.(b) 克隆WC7B-5与*Bam*HI消化的CS第7部分同源群“四体-缺体”的Southern杂交结果.据杂交片段的有无和信号的相对强度可知该克隆为第7部分同源群专化序列

我们可以根据不同的目的和用途选择不同的染色体文库进行操作,这比针对整个基因组的操作要有效得多.我们已成功进行了5BL染色体的显微分离、文库构建和低拷贝专化DNA序列的克隆^[8,9].本文在染色体7B上的工作进一步证实染色体显微分离、DOP-PCR扩增和直接克隆是获得低拷贝专化序列的有效途径.而且,本工作中采用更短的固定时间和拓扑酶I处理可能进一步提高了克隆效率(与文献[9]比较).DOP-PCR扩增优于其他PCR技术的特点之一就是它具有选择性扩增低拷贝序列的倾向.比如,虽然普通小麦含80%以上的重复序列,但本文中随机分析的21个克隆中就有11个克隆(~55%)为低拷贝序列,这与我们在小麦染色体5BL上的结果相似^[9].这是我们选择第3轮PCR产物作为克隆原材料的主要原因.不过,随扩增次数的增加,外源DNA污染的机会也会增加.但本文的结果证明,只要严格实验操作并设置阴性对照,污染问题是可以克服的.DOP-PCR扩增的另外一个优点是所获得的低拷贝序列多数为染色体专化类型,如本文中克隆到的6个低拷贝序列中就有5个为染色体专化序列.这类序列不同于部分同源群专化序列在于它们不受部分同源染色体的干扰,因此是理想的分子标记^[8,9].

虽然目前已有较多关于植物染色体显微分离的报道,但克隆出专化序列的工作尚不多见.此外,多数报道中仅用基因组Southern杂交方法证明扩增产物来自该物种的基因组,却很少有证据证实扩增的产物仅来自分离的目标染色体.目前国内的工作只有程祝宽等人^[12]的报道中用STS和微卫星序列扩增方法初步证实扩增产物的来源.本文共获得6个产生清晰杂交谱带的低拷贝序列.与CS整套“缺体-四体”非整倍体系列的Southern杂交结果表明,这6个序列均为7B或第7部分同源群专化序列.这说明我们所建立的7B染色体亚基因组DNA文库不仅没有外源DNA污染,也没有小麦其他染色体的污染.这些专化序列将可能成为小麦7B染色体或第7部分同源群上的有用分子标记.

致谢 本工作作为国家自然科学基金(批准号:39870425)和教育部留学回国人员基金资助项目.

参 考 文 献

- 1 Bennett M D, Smith J B. Nuclear DNA content in angiosperms. *Philos Trans R Soc Lond (Biol)*, 1991, 334: 309~ 345
- 2 Moor G, Gale M D, Kurata N, et al. Molecular analysis of small grain cereals: current status and prospects. *Bio/Technology*, 1993, 11: 584~ 589
- 3 Jung C, Clasussen U, Horshenke B, et al. A DNA library from an individual *Beta patellaris* chromosome conferring nematode resistance obtained by microdissection of meiotic metaphase chromosomes. *Plant Molecular Biology*, 1992, 20: 503~ 511
- 4 Chen Q F, Armstrong K C. Characterization of a library from a single microdissected Oat (*Avena sativa* L.) chromosome. *Genome*, 1995, 38: 706~ 714
- 5 Schondelmaier J, Martin R, Jahoor A, et al. Microdissection and microcloning of the barley (*Hordum vulgare* L.) chromosome 1HS. *Theor Appl Genet*, 1993, 86: 629~ 636
- 6 Albani D, Cote M J, Armstrong K C, et al. PCR amplification of microdissected wheat chromosome arms in a simple single tube reaction. *Plant J*, 1993, 4: 899~ 903
- 7 Vega J M, Abbo S, Feldman M, et al. Chromosome painting in plants: *In situ* hybridization with a DNA probe from a specific microdissected chromosome arm of common wheat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 12041~ 12045
- 8 Liu B, Segel G, Vega J M, et al. Isolation and characterization of chromosome specific DNA sequences from a chromosome arm genomic library of common wheat. *Plant J*, 1997, 11: 959~ 965
- 9 Segal G, Liu B, Vega J M, et al. Identification of a chromosome-specific probe that maps within the Ph1 deletions of common and durum wheat. *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 968~ 970
- 10 胡赞民, 崔丽华, 王兰岚, 等. 王百合单条染色体和染色体片段的分离. *遗传学报*, 1997, 24: 278~ 281
- 11 党本元, 胡赞民, 周弈华, 等. 王百合单条染色体 DNA 文库的构建. *科学通报*, 1998, 43(2): 194~ 199
- 12 程祝宽, 颜辉煌, 党本元, 等. 水稻第5染色体短臂端四体在染色体臂分离中的应用. *科学通报*, 1998, 43(3): 272~ 276
- 13 周弈华, 党本元, 胡赞民, 等. 大豆单染色体的显微分离及体外扩增. *植物学报*, 1998, 40: 144~ 150
- 14 崔丽华, 胡赞民, 王兰岚, 等. 黑麦 1R 染色体的显微分离与回收. *植物学报*, 1997, 39: 697~ 700
- 15 宋文芹, 李秀兰, 许文胜, 等. 黑麦染色体的显微分离与 PCR 扩增. *植物学报*, 1998, 40: 158~ 162
- 16 宋文芹, 李秀兰, 许文胜, 等. 蚕豆最大染色体长臂的显微切割与 PCR 扩增. *科学通报*, 1996, 41(4): 360~ 363
- 17 Telenius H, Carter N P, Berr C E, et al. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*, 1992, 13: 718~ 725

(1998-05-07 收稿, 1998-09-07 收修改稿)

反义技术分离筛选抑制 Vero 细胞非定标性突变的 cDNA 片段

胡文蔚 余应年 陈星若 宋 韬 谢海洋

(浙江医科大学病理生理教研室, 杭州 310031)

摘要 甲基硝基亚硝基胍(MNNG)可诱发猴肾 Vero 细胞的遗传不稳定, 在发生表达改变的表达序列标识(EST)中, 筛选到 1 个片段(片段 9), 它的相关基因表达被阻断后, MNNG 诱发的非定标突变率显著增高($P < 0.05$). 表明其相关基因的编码产物具有维持遗传稳定性, 抑制哺乳类细胞非定标突变发生的功能.

关键词 反义 RNA 突变 非定标性 遗传不稳定

本实验室曾应用一携带 *SupF* tRNA 基因的穿梭质粒 pZ189, 转染在 24h 前经受过烷化剂

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1999-44-4-389>