

水稻中期染色体和 DNA 纤维的高效制备技术

彭莉莉, 赵丽娟, 宋运淳, 李立家*

(武汉大学教育部植物发育生物学重点实验室, 武汉 430072)

摘要: 水稻中期染色体和 DNA 纤维制备是水稻分子细胞遗传学研究中的关键技术。目前,这两个技术还有很多不足,该研究建立了高效制备水稻中期染色体和 DNA 纤维的方法。该方法制备的染色体,分裂相多、杂质少、背景清晰、染色体分散且形态好,水稻根尖分生组织细胞的分裂指数高达 25%。植物细胞的细胞壁是制备 DNA 纤维的最大障碍,所以必须先提取细胞核,然后裂解细胞核释放出 DNA 纤维。在这个研究中,还建立了一个用刀切法分离细胞核,进而用 SDS 裂解核膜,用载玻片拖出 DNA 来制备水稻 DNA 纤维的方法。该方法制备的 DNA 纤维多呈平行的细线,背景清晰,伸展的程度均匀,适合于原位杂交。

关键词: 水稻; 中期染色体; DNA 纤维; 高效制备

中图分类号: S511, Q813.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2004)04-0364-04

The Highly Efficient Methods for Preparation of Rice Metaphase Chromosomes and DNA Fibres

PENG Li-Li, ZHAO Li-Juan, SONG Yun-Chun, LI Li-Jia*

(Key Laboratory of MOE for Plant Developmental Biology, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: The preparation of metaphase chromosomes and DNA fibres of rice is the key technique in the research of rice genome structure. However these techniques are still in deficiency at present. In this study, a method to prepare metaphase chromosomes with high efficiency was developed in rice. In the chromosome slides prepared using this method, there were mass of metaphase cells, less impurity, clear background, well dispersed chromosomes and well preserved chromosome morphologies. The mitotic index of root cells is up to 25%. We also established a DNA fibres preparing method. Since cell wall is a main abstacle in the preparation of DNA fibres, thus nuclei were isolated by chopping first, then lysed by SDS to release DNA, and DNA fibers were prepared by drawing DNA using a cover slide. DNA fibres prepared by this method showed equally spread parallel thread with clear background, and were suitable for *in situ* hybridization analysis. The highly efficient methods to prepare rice metaphase chromosomes and DNA fibres will surely accelerate rice genome mapping and organization analysis.

Key words: Rice; Metaphase chromosomes; DNA fibres; High efficiency

水稻是世界上最重要的粮食作物之一。在我国其总面积、总产量和单位面积产量均居各类粮食作物的首位^[1]。水稻还是公认的禾谷类作物、遗传和分子生物学研究中的模式植物。

如何制备出分裂相多、杂质少、背景清晰、染色体分散且形态好的染色体标本,一直是分子细胞遗传学研究者关注的问题。植物细胞与动物细胞不同,它含有纤维素的细胞壁,细胞壁间还有果胶质,这给

收稿日期: 2003-11-05, 修回日期: 2003-12-30。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30270678, 30270740)。

作者简介: 彭莉莉(1982—), 女, 武汉大学生命科学学院学生, 主要从事植物分子细胞遗传学研究。

* 通讯作者(Author of correspondence. E-mail: lljia88@yahoo.com.cn)。

获得分裂相多、杂质少、中期染色体分散且形态好的染色体带来了困难。目前在各种植物中染色体制片使用较广的方法是压片法和去壁低渗火焰干燥法, 使用根尖压片法观察植物染色体并不困难, 但获得染色体分散好、分裂相多的细胞频率比较低, 染色体易丢失, 特别是对染色体数目较多, 形态又小的植物, 如水稻(*Oryza sativa* L., $2n=24$)。而去壁低渗火焰干燥法则是以酶消化细胞壁而获得无壁的裸体细胞, 以低渗液使细胞膜吸胀和火焰干燥吸水表面张力而使染色体自行展开, 本研究就是在此方法的基础上, 建立了一套高效制备水稻染色体分裂相的技术。

由于植物细胞与人类和动物细胞有不同的结构特点, DNA 纤维技术在人类和动物上发展应用 4 年后^[2-4]才引入植物中^[5]。与人类和动物 DNA 纤维上进行原位杂交时用游离单细胞作为制备 DNA 纤维的材料不同^[6], 植物细胞的细胞壁是制备 DNA 纤维的最大障碍, 还应尽可能地减少染色体 DNA 的降解和避免细胞器 DNA 对基因组 DNA 的污染。

目前人们主要用液氮研磨法制备 DNA 纤维, 但此法需用到有毒物疏基乙醇, 而且研磨的时间也很难掌握。本研究参照 Li 等的方法(《Chromosome research》, 待发表, 2004)加以改进, 以水稻嫩叶为材料用刀切的方法分离出细胞核, 然后用 SDS 破坏细胞核膜并使 DNA 分子与复合的蛋白质分离而形成游离的 DNA 纤维。实验中省去了疏基乙醇的使用, 建立了从水稻嫩叶中制备 DNA 纤维的简易、安全快速的方法。

1 材料和方法

植物材料 水稻(*Oryza sativa* L.)由中国科学院国家基因研究中心提供。

材料培养 水稻种子在通气情况下用自来水浸泡过夜。培养皿中垫湿滤纸 3 层, 种子分散其上, 间留间隔, 勿堆积, 种子上层覆盖一层水浸湿的滤纸, 置于 28℃恒温暗箱中培养, 每天水洗一二次, 当根尖长至 1 cm 左右时, 切取生长旺盛的根尖约 2 mm 用于染色体制备; 取完根的水稻放入 28℃恒温暗箱中用泥沙种植, 2~3 d 后取水稻幼嫩子叶, 用于 DNA 纤维的制备。

染色体制备 采用宋运淳等的方法^[7], 稍作修改。刚取下的水稻根尖立即置于新鲜卡诺固定液(甲醇:冰乙酸=3:1(体积比))中 4℃下固定过夜, 充分水洗后用柠檬酸缓冲液(pH4.2)配制的 2% 纤维

素酶、0.3% 果胶酶、1.5% *macerozyma* 的混合酶液于 28℃ 酶解 3~4 h, 吸去酶液, 用蒸馏水洗 2~3 次, 在双蒸水中后低渗 30 min; 再用尖嘴吸管吸 4~5 个根尖置于经处理的干净载玻片中央, 滴半滴固定液, 用解剖针先敲至浆状, 再滴上 2~3 滴固定液使材料分散, 于酒精灯上火烤至着火。玻片经显微镜镜检后, -20℃ 保存备用。

提取细胞核及制备水稻核 DNA 纤维 参照 Li 等的方法(《Chromosome research》, 待发表, 2004), 取健康水稻的幼嫩叶片(黄化苗), 越嫩越好, 加冰冷细胞核提取缓冲液(Mgsou 4 Buffer 5 760 μL, DTT 6 μg, 10% Triton-100 150 μL)用锋利的手术刀将叶片切碎至极其细小的匀浆状, 将此匀浆混合液在 33 μm 孔径的尼龙膜上过滤到 1.5 mL 离心管中, 13 200 r/min 高速离心 40 s, 沉淀重悬, 此时得到的分散均匀的重悬液即是浓度适中的细胞核提取液, 置于冰上直接用于 DNA 纤维的制备, 或者加等体积的甘油于-20℃ 保存。DNA 纤维制备采用钟敲波的方法^[6]稍作改进, 具体步骤如下: 吸取 2 μL 细胞核提取液置于经处理的干净载玻片的一端, 用枪头轻轻地均匀地涂成一条直线, 空气中室温下晾至半干状态, 约 3 min, 在细胞核提取液的痕迹上覆盖 35 μL 核裂解缓冲液 STE (0.5% SDS, 5 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris, pH 7.0), 室温下(冬季一般放 25℃ 水中预热)在载玻片上充分裂解细胞核 8~9 min; 用干净玻片侧斜 45°, 其边缘刚好与进行裂解细胞核的原载玻片表面接触, 使核裂解液缓慢地、平稳地从载玻片的一端一直铺展到另一端(注意不应用压力), 游离的 DNA 分子便会形成平行 DNA 纤维, 室温干燥 10 min; 甲醇:冰乙酸(3:1)固定 2 min; 60℃ 烘干 30 min, 选样片 DAPI 染色, 在荧光显微镜下检查 DNA 纤维的质量, 制片可贮于-20℃ 下干燥保存备用。

照相 制片经 DAPI 和 PI 染色后, (每张制片加 40 μL(10 μg/mL)含 20% 抗灭剂 Vectashield 的 DAPI 和 PI。在荧光显微镜下用 UV 滤片, 20 倍和 60 倍镜头观察, 并用 V⁺ 软件照相。Photoshop 软件进行图片处理。

2 结果与讨论

2.1 中期染色体的制片

由于水稻染色体小, 植物细胞有细胞壁和较为浓厚的细胞质对染色体严重覆盖, 笔者在去壁低渗火焰干燥法——涂片法的基础上, 建立了一套高效

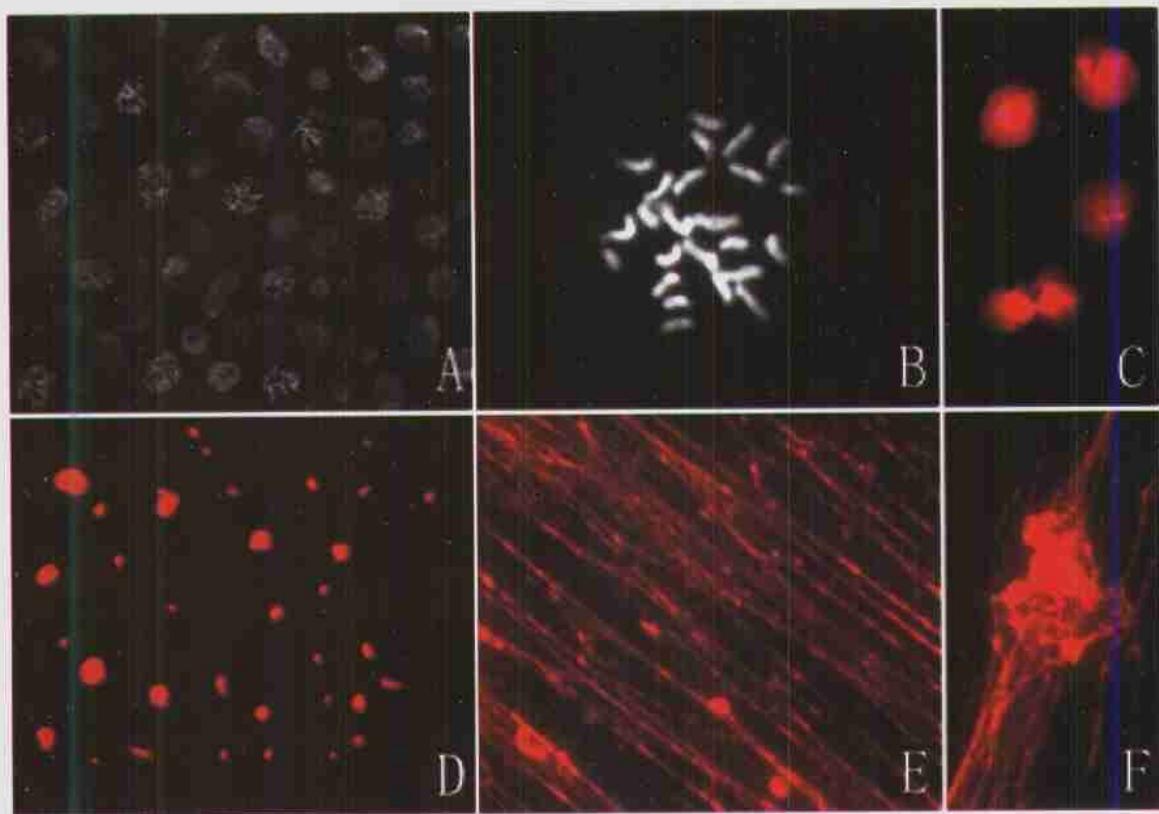
的制备水稻中期染色体的方法。传统的酶解法仅仅使用 1% 纤维素酶和 1% 果胶酶。在本研究中, 通过反复摸索比较, 我们发现使用 2% 纤维素酶、0.3% 果胶酶、1.5% *macerozyma* 混合酶能充分酶解去壁和去膜, 使大量分裂相得以裸露, 使染色体分裂指数高达 25% (如图 1:A)。去壁低渗火焰干燥法另一个关键点是酶解去壁时间是否适宜, 他直接影响染色体制片的质量。酶解时间太短达不到处理效果, 使细胞壁不易破裂, 染色体不易分散, 细胞不容易分散, 细胞碎片较多; 酶解时间过长则会造成染色体形态的破坏和分裂相不完整, 甚至染色体完全丢失。固定对保持染色体完好形态很重要, 并能使染色体核蛋白保持原有结构, 使染色体更接近活体状态。常选用的固定液为卡诺固定剂 (甲醇: 冰乙酸 = 3: 1) 应在使用前临时配制。甲醇使蛋白质凝固, 组织收缩; 冰乙酸则渗透能力强, 能固定核蛋白, 易使组织膨胀, 二者混合能起到拮抗作用。取材后应尽快将材料放入固定液中固定, 若不固定则可因细胞内蛋白质分

解而导致结构变化。低渗直接关系到染色体分散的质量, 低渗时间过长, 则细胞膜过早破裂, 造成染色体丢失; 如低渗处理不够, 细胞尚未胀开, 则染色体往往分散不好, 仍成团, 不利于观察计数分析。我们采用蒸馏水进行后低渗处理 30 min 效果最佳。据我们的经验, 在制片时, 敲得越碎越好, 敲至固定液干后, 再滴半滴固定液, 迅速涂开, 火焰干燥, 干燥后肉眼观察应为规则干净的小雨点状, 若小雨点上象有一层不透明的薄层, 说明酶解时间不够。

尽管水稻染色体数目较多, 形态又小, 但使用我们建立的这个技术, 制备的水稻染色体中获得的染色体分散好, 除了分裂相多外, 在荧光显微镜下, 可清晰地观察到中期染色体的形态完好 (如图 1:B)。这些制备的染色体分裂相能很好地适合于 DNA 原位杂交的细胞学定位。

2.2 DNA 纤维制备

DNA 纤维是将间期细胞核里染色质 DNA 拉出来。在动物和人的 fiber-FISH 实验中可以直接破



A. 水稻染色体 ($\times 200$)；B. 水稻染色体 ($\times 600$)；C. 水稻细胞核 ($\times 600$)；D. 水稻细胞核 ($\times 200$)；E. 显示拉出的平行且细小的 DNA 纤维；F. 显示水稻 DNA 纤维从核中拉出来
 A. Rice chromosomes ($\times 200$)；B. Rice chromosomes ($\times 600$)；C. Rice cell nuclei ($\times 600$)；D. Rice cell nuclei ($\times 200$)；E. High quality of rice DNA fibres；F. Rice DNA fibres released from nuclei

图 1 水稻中期染色体、间期细胞核和 DNA 纤维
 Fig. 1 Rice metaphase chromosomes, interphase nucleus and DNA fibres

裂细胞的原生质体,释放出DNA纤维,但是植物细胞有细胞壁,阻碍了直接提取DNA纤维。所以先提取细胞核,然后裂解细胞核放出DNA纤维就成为很多学者的首选了。提取好的细胞核用甘油就可以长期保存。间期细胞核中的染色质是6个核小体绕成一圈的一级折迭包装结构,直径20~30 nm,但是这个数量级在显微镜下是看不见的,可以看见的是纠缠在一起的染色质束。使用我们建立的技术从水稻细胞核中拉出的DNA纤维(图1:F),制备出的DNA纤维伸展程度均匀,多呈平行的细线(图1:E)。更重要的是,这个技术重复性高,核的纯度适中(图1:D),完整性好(图1:C),成功率几乎是百分之百。这个技术应该也能通过简单的改进以适合于其他植物种。

在进行DNA纤维制片的过程中应注意以下几点:

(1) DNA纤维制片所采用的是新鲜幼叶,应尽量用黄化苗,这样就避免了植物细胞中的叶绿体对制备DNA纤维产生的障碍,而且幼叶越嫩越好。

(2) 空气干燥。核悬浮液置于载玻片一端干燥时,核悬浮液应是半干半湿的状态,悬浮液太干或太湿,会对核的形态产生很大的影响。

(3) STE裂解。这一步骤极为重要,它直接关系到DNA纤维的质量。用STE裂解时,应控制在8~9 min之内,裂解时间不够,则细胞核破裂不理想,难以释放出DNA纤维,DNA纤维形态不好;裂解时间过长,则细胞核中的DNA散出,造成DNA纤维缠绕。

(4) 细胞核的浓度。浓度太低拉出来的DNA纤

维就少,浓度太高则纤维交联在一起。

我们正在利用制备出的DNA纤维进行水稻基因组DNA的细胞遗传学定位分析。

致谢:在研究的过程中,得到了刘静宇,熊志勇等博士的大力帮助,特此表示感谢。

参考文献:

- [1] 林世成,闵绍楷.中国水稻品种及其系谱[M].上海:上海科学技术出版社,1991.
- [2] Heng H H, Squire J, Tsui L C. High-resolution mapping of mammalian genes by *in situ* hybridization to free chromatin[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(20): 9 509~9 513.
- [3] Wiegant J, Kalle W, Mullenders L, Brookes S, Hoovers J M, Dauwerse J G, van Ommen G J, Raap A K. High-resolution *in situ* hybridization using DNA halo preparations[J]. *Human Mol Genet*, 1992, 1: 587~591.
- [4] Parra I, Windle B. High resolution visual mapping of stretched DNA by fluorescent hybridization[J]. *Nat Genet*, 1993, 5(1): 17~21.
- [5] Fransz P F, Alonso-Blanco C, Libarska T B, Peeters A J, Zabel P, de Jong J H. High-resolution physical mapping in *Arabidopsis thaliana* and tomato by fluorescence *in situ* hybridization to extended DNA fibres[J]. *Plant J*, 1996, 9(3): 421~430.
- [6] 钟筱波, Fransz P F, Wennekes J, Kammen A, de Hans J J, Zabel P. 在植物粗线期染色体和DNA纤维上的荧光原位杂交技术[J]. 遗传学报, 1998, 25(2): 142~149.
- [7] 宋运淳,刘立华,谭晓岚.玉米染色体G-带ASG法显带研究[J].遗传学报,1987,14:424~428.