

# 不同染色技术和双色荧光原位杂交技术对宽翅菘蓝 (*Isatis violascens* Bunge)的细胞遗传学分析

戚大石<sup>1</sup> 汤佳立<sup>2</sup>

(1 徐州医学院 江苏 徐州 221121; 2 中国药科大学生命科学与技术学院 江苏 南京 210009)

**摘要:** 为了解十字花科菘蓝属植物宽翅菘蓝(宽翅菘蓝, *Isatis violascens* Bunge)的染色体结构, 本文利用 45S rDNA 和 5S rDNA 双色荧光原位杂交、银染技术和 CMA3 对宽翅菘蓝进行分子细胞遗传学研究。45S rDNA 和 5S rDNA 荧光原位杂交结果显示宽翅菘蓝染色体上有 1 对 45S rDNA 信号和 1 对 5S rDNA 信号; 银染结果显示其中期染色体有 1 对银染点; CMA3 染色结果发现宽翅菘蓝中期染色体存在 1 对 CMA3 信号。

**关键词:** 宽翅菘蓝; 银染; 45S rDNA; 双色荧光原位杂交; CMA3 染色

**中图分类号:** Q343, Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2011)03-485-04

## Cytogenetic Analysis of *Isatis Violascens* Bunge by Different Staining Techniques and D-Fluorescent in Situ Hybridization

QI Da-Shi<sup>1</sup>, TANG Jia-Li<sup>2</sup>

(1 Xuzhou Medical college, Xuzhou, 221116, China;

2 School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

**ABSTRACT:** Objective In order to understand the chromosome structure of *I. violascens* Bunge, 45S rDNA and 5S rDNA dual-fluorescence in situ hybridization (45S rDNA and 5S rDNA D-FISH), silver staining and CAM3 staining were used to study the chromosomes of *I. violascens* Bunge. In the silver stained metaphase chromosomes of *I. violascens* Bunge, there were two positive regions; fluorochrome Chromomycin A3 (CMA) staining showed two positive regions; D-FISH with 45S rDNA and 5S rDNA probes revealed one 18S-5.8S-26S rDNA loci and one 5S rDNA loci with different intensity.

**Key words:** *Isatis violascens* Bunge; Silver staining; 45S rDNA; D-fluorescence in situ hybridization; CMA3 staining

**Chinese Library Classification(CLC):** Q343, Q943 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2011)03-485-04

菘蓝属(*Isatis* L), 属于十字花科(Brassicaceae), 有 30 多个种, 含多种早生植物, 在热带、亚热带以及温带地区广为栽培。目前在我国有 6 种和 1 个亚种<sup>[1]</sup>, 主要分布在新疆、内蒙古、陕西、甘肃、河北、山东、江苏、浙江、安徽、贵州等地, 新疆的物种最丰富, 其中有些物种是非常重要的药用植物及经济作物。

目前国内外对于菘蓝属植物的研究主要集中在几种药用植物的生药学、胚胎学、化学成份、栽培技术、组织培养、提取物的再利用等方面, 而对于菘蓝属植物染色体的基础研究比较薄弱, 目前仅有对于菘蓝属中菘蓝核型的报道。因此, 对于菘蓝属植物的染色体研究是非常有必要的。但大多数植物染色体鉴定是非常困难的, 因为染色体形态之间的差异甚小, 如果染色体的臂长、着丝点位置、异染色质等很难被确定时, 就会严重阻碍对于植物染色体的研究<sup>[2]</sup>。幸运的是, 分子细胞遗传技术, 包括各种显带技术和原位杂交技术, 才使得我们可以更好的了解植物染色体, 从而进一步推动对植物研究进展。通过各种染色体显带技术可以识别人类及大多数动植物的染色体, 再加以利用原位杂交技术, 根据不同的带型、不同探针的位置, 进而得到更

多有关染色体组的信息, 从而有利于更好的研究物种染色体组的结构和功能<sup>[3]</sup>。Thomas K. Wolfgruber 等通过染色质纤维原位杂交技术来研究玉米着丝点的结构和进化<sup>[4]</sup>。

本研究首次首次采用 Ag-NOR、CMA3 染色和 rDNA 双色荧光原位杂交等技术 (rDNA-DFISH) 综合研究宽翅菘蓝染色体, 为宽翅菘蓝品种的遗传改良提供细胞及分子遗传学基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 供试材料 供试材料栽培种宽翅菘蓝 (*Isatis violascens* Bunge) 购于新疆。

1.1.2 供试质粒探针 45S rDNA 和 5S rDNA 探针由美国 Nebraska 大学的 Arumuganathan 教授提供。45S rDNA 片段长度为 9.1 kb, 包括非转录的间隔区和 18S、5.8S 和 25S 亚单位, 以 pUC18 为其克隆载体, 酶切位点为 Kpn I; 长度为 450 bp 的 5S rDNA 片段, 为 pUC18 为克隆载体, BamH I 为其酶切位点。

#### 1.2 方法

1.2.1 植物染色体制备技术 参照汤佳立<sup>[5]</sup>的方法并略加修改制备宽翅菘蓝染色体。步骤为: 剪取生长旺盛的根尖(1-2mm), 25 °C, α-溴萘饱和溶液处理 2.5 h, 用 0.075 mol/L KCl 前低渗

作者简介: 戚大石(1982-), 男, 硕士, 助教, 研究方向: 细胞遗传学。

Tel: 15351677826; E-mail: qidashi@yahoo.com.cn

(收稿日期: 2010-10-18 接受日期: 2010-11-15)

处理 30 min,乙醇:冰醋酸(3:1)固定,双蒸水充分清洗根尖,2%纤维素酶和 2%果胶酶 1:1 混合,29 °C 酶解 5-6 h,用双蒸水后低渗 30 min,火焰干燥制片,-20 °C 贮存备用。

**1.2.2 植物 Ag-NOR 染色技术** 参照 Hellmer 的快速银染法并略作修改对宽翅菘蓝中期染色体和间期核进行染色,制片放在空气干燥 5h 的,在 25 °C 下,用 0.2 mol/L HCl 处理 10~15 min,空气干燥 3 h,滴加 70% AgNO<sub>3</sub> 水溶液,50~60 °C 染色过夜,然后镜检照相。

**1.2.3 植物 CAM<sub>3</sub> 染色技术** 参照 Arun Kumar Sharma 等并略作修改。先用含 10mmol/L MgCl<sub>2</sub> 的 McIlvaine 缓冲液(pH6.9~7.0) 浸泡 10~15min,然后用含有 10mmol/L MgCl<sub>2</sub> 和 0.12mg/mL CMA 的 McIlvaine 缓冲液染色 25~30min,然后镜检照相。

**1.2.3 质粒 DNA 的提取和探针标记技术** 参照萨姆布鲁克丁等(1992)采用"碱裂解法"并略作修改提取质粒的。按照 Singh M 等<sup>[6]</sup>的方法通过切刻平移法用 Biotin-11-dUTP 和 Digoxigenin-11-dUTP 分别标记 5S rDNA 和 45S rDNA 探针。标记反应混和物(50μL)中含 5 μL dNTP (dATP, dGTP 和 dCTP 等量混合), 10× Buffer 5 μL, 所需标记探针 DNA 5 μL, Biotin-11-dUTP 0.6 μL 或者 Digoxigenin-11-dUTP 0.6 μL, Enzyme 5μL (含 polymerase I、Dnase I), 加 ddH<sub>2</sub>O 至终体积 50 μL, 15 °C 反应 3 h, 2 μL 0.5 mol/L EDTA 终止反应。

**1.2.4 原位杂交和信号检测** 参照汤佳立<sup>[9]</sup>方法并略作修改进行原位杂交。在 60 °C,对染色体制片干燥 1 h,后用 RNaseA 37 °C 处理 2 h,接着用 70% 甲酰胺 70 °C 处理 3.5 min,分别在 -20 °C 70%、95%、100% 乙醇中各脱水 5 min,放置于室温下约 20 min,直到染色体制片完全干燥。按照 50%甲酰胺、8%硫酸葡聚糖、10% 20 × SSC、0.1 % SDS、2 μg ssDNA 配置杂交液,放置在沸水中变性 10 min,迅速放于冰上 5 min。将 50μL 杂交液加到染色体制片,90 °C,共变性 10 min,37 °C 保湿皿孵育 18~24 h。

用 streptavidin-Cy3 和地高辛检测杂交信号。用 DAPI (3μg/mL) 复染染色体。在 LEICA DMRA2 荧光显微镜下观察制片拍照,Photoshop 软件进行图片处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 宽翅菘蓝间期核和中期染色体的银染

图 1A-B 显示了宽翅菘蓝间期核以及中期染色体的银染的结果。由图 1 可见,在宽翅菘蓝间期核中,有 1-2 个 Ag-NORs 区域,而且 Ag-NORs 区域的大小相近似;在中期染色体中,可以看到 1 对 Ag-NORs 区域。

### 2.2 宽翅菘蓝间期核和中期染色体的 CAM<sub>3</sub> 的染色

图 1C-D 显示了宽翅菘蓝间期核和中期染色体的 CAM<sub>3</sub> 的染色结果。由图 1 可见,宽翅菘蓝间期核中 CAM<sub>3</sub> 信号区域有 1-2 个,区域的大小相近似;在中期染色体中,可以看到 1 对 CAM<sub>3</sub> 信号。

### 2.3 45S rDNA 和 5S rDNA 在宽翅菘蓝间期核和中期染色体定位

图 1 E-F 显示了在宽翅菘蓝间期核和中期染色体上 45S rDNA 和 5S rDNA 序列的双色荧光原位杂交结果;染色体通过 DAPI 复染为蓝色;45S rDNA 杂交信号为绿色;5S rDNA 的杂交信号为红色。通过对宽翅菘蓝的 50 个中期和前期分裂相的杂交结果进行分析表明,宽翅菘蓝 14 条染色体上显示有 1 对 45S rDNA 信号,位于 1 号染色体短臂的端部和随体上,几乎覆盖整个短臂,并且信号较强,在基因组内,我们同样发现了 1 对 5S rDNA,位于 2 号染色体的着丝粒处,信号强。

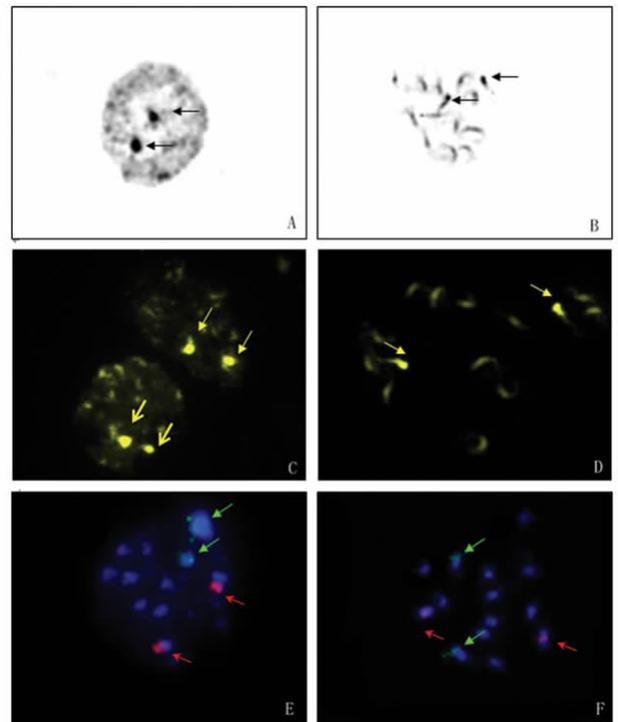


图 1 宽翅菘蓝银染、CAM<sub>3</sub> 染色、45S rDNA 和 5S rDNA 双色荧光原位杂交结果蓝色为 DAPI 复染的染色体,红色为 5S rDNA 杂交信号,绿色为 45S rDNA 杂交信号。A:间期核银染结果;B:显示 1 对银染点;C:间期核 CAM<sub>3</sub> 染色结果;D 显示 1 对 CAM<sub>3</sub> 染点;E:45S rDNA 和 5S rDNA 双色荧光原位杂交结果;F: 45S rDNA 和 5S rDNA 双色荧光原位杂交中期染色体图。

Figure 1 Silver (A, B), CMA<sub>3</sub> (C, D) and Localization of 45S rDNA and 5S rDNA gene loci on some phases of cell cycle of *I. violascens* Bunge by D-FISH (E, F)

## 3 讨论

通过荧光显带技术,我们可以更好的研究宽翅菘蓝染色体。CAM<sub>3</sub> 是对 GC 富含区进行着色,结合的序列为存在于 DNA 小沟中的 5' - dGpC - 3' 序列,大于 4 bp。通过 CAM<sub>3</sub> 的染色,GC 富含区显示出明亮的荧光条带,相反,AT 富含区就表现为较浅的条带<sup>[6]</sup>。在对宽翅菘蓝进行 CAM<sub>3</sub> 染色,发现有 2 个明亮的区域,这意味着 GC 富含区主要集中在 1 号染色体的短臂以及其随体上,而在其他染色体上分布均匀。在其它物种中,还出现其他类型的 CAM 染色条带,如在远志,CAM 条带存在于在次缢痕处<sup>[7]</sup>。

核仁组织区代表着染色体所在的区域,有大量的 rDNA 基因(5.8S, 18S and 28S rDNA)。

在细胞间期,核仁的大小与 rDNA 基因活性有关系,并且通常可以通过硝酸银染色来观察其所在位置,换句话说,即表达的 rDNA 基因可以被定位,看做为染色体所在区域<sup>[6]</sup>。为了检测 GC 富含区是否与核仁组织区存在关系,通常通过检验硝酸银染色结果,以 45S rDNA 为探针的原位杂交结果,以及 CAM<sub>3</sub> 染色结果加以判断。目前,已经有许多通过 CMA<sub>3</sub>, 银染以及 45S rDNA 的定位来确定核仁组织区的报道, Saranya Srisuwan<sup>[8]</sup>等人在对甘薯属巴西牵牛, 三裂野牵牛等多种植物进行的银染、CMA<sub>3</sub> 以及 45SrDNA 的定位,精准的确定了核仁组织区的数量和位置。本实验发现宽翅菘蓝间期中 Ag-NORs 和 CAM<sub>3</sub> 区域各有 1-2 个;在中期染色体中,可以看到 1 对 Ag-NORs 信号和 1 对 CAM<sub>3</sub> 信号,说明在宽翅菘蓝基因组中具有转录活性的核仁组织区有 1~2 个。

45S rDNA 和 5S rDNA 组成了高等植物 rDNA。45S rDNA 又是由 5.8 S rRNA、18 S rRNA、28 S (25 S) rRNA 组成,而 18S、5.8S 和 28S 又是通过 ITS-1、ITS-2 将其分隔开。研究表明,45S rDNA 通常被定位在核仁组织区<sup>[9]</sup>,而 5S rDNA 在物种基因组上的位置变化很大<sup>[10]</sup>。通过以 45S 和 5S rDNA 为探针,在多个物种进行荧光原位杂交以及物种间 ITS 序列差异,不仅可以用以讨论 rDNA 的起源进化,而且可以有效地反映种、属间的分化程度,物种染色体精细结构分析,从而为染色体的识别和在分子水平上研究基因组的进化提供线索。研究结果表明,宽翅菘蓝中有 1 个 45S rDNA 位点,位于 1 号染色体短臂的端部和随体上,几乎覆盖整个短臂,1 对 5S rDNA 信号,位于 2 号染色体的着丝粒处。通过 45S 和 5S rDNA 位点的定位,有利于我们更好识别宽翅菘蓝染色体,对宽翅菘蓝的进化研究提供有用的信息。

在对宽翅菘蓝进行原位杂交时,我们发现 rDNA 杂交信号大小和强弱在染色体不同位点上表现出差异。在对栎属的研究中,同源位点间信号大小和强度也表现出一定的差异<sup>[11]</sup>,汤佳立等还发现在徐薯 18 基因组中,还发现了一个 45S rDNA 信号无法稳定出现的现象<sup>[7]</sup>。造成位点拷贝数目改变的原因可能是由于染色体重排,不等交换,由转座子引起的隐蔽 rDNA 拷贝数的扩增有关系。Mantovani<sup>[12]</sup>等认为 45S rDNA 分布在染色体端部的特点也可能是 45S rDNA 数目改变的原因之一,因为位于染色体端部位置的 DNA 更容易发生交换。虽然,我们无法通过原位杂交来直接给出基因的实际拷贝数,但是可以通过杂交信号的大小以及强度间接估评基因拷贝数的多少,所以 FISH 被认为是一种半定量分析技术<sup>[9]</sup>。

在对宽翅菘蓝的间期细胞核银染、CMA<sub>3</sub> 染色以及原位杂交时,我们发现不同间期细胞核出现 1-2 个信号,这可能与细胞核处于不同的分裂时期有关,如在 G<sub>1</sub> 期,是 DNA 复制的早期,染色体并没有开始复制,由于同源染色体的位置,可能会出现 1-2 个信号,细胞分裂的 S 期和 G<sub>2</sub> 期,染色体已近复制甚至复制完成,此时由于染色单体的存在,就有可能出现 2 个

信号,同时也有可能是由于 rDNA 合成量的变化造成的。

有关宽翅菘蓝染色体的研究还处于起步阶段,更多的工作需要开展,通过传统的细胞遗传学研究方法与染色体荧光原位杂交等研究方法相结合,可以更好的为我们区分和鉴别宽翅菘蓝不同种及品种,为研究宽翅菘蓝种及品种间亲缘关系及新品种选育等奠定基础。随着相关研究成果的不断积累,必将为规范宽翅菘蓝染色体核型提供帮助,同时也为宽翅菘蓝的研究提供细胞和分子遗传学基础,对其新品种的培育有重要的意义。

#### 参考文献(References)

- [1] 李国强, 庄重, 刘庆华, 等. 资源植物菘蓝属引种栽培及利用的现状与前景[J]. 植物学通报, 1996,13(3):37-39  
Li Guo-qiang, Zhuang Zhong, Liu Qing-hua, et al. Actuality and foreground of resource plant *Isatis L* cultivate and utilize [J]. Bulletin of Botany, 1996,13(3):37-39
- [2] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典 [S]. 广州:广东科技出版社,1995( I ):171  
P.R.C. Ministry of Public Health pharmacopoeia committee. Pharmacopoeia of People's Republic of China [S]. Guangzhou: Guangdong Science Press,1995( I ):171
- [3] 李宗芸, 栗茂腾, 黄荣桂, 伍晓明, 宋运淳. 基因组原位杂交鉴别芸薹属异源四倍体 AA、BB、CC 基因组研究 [J]. 中国油料作物学报, 2002,24(1):10-14  
Li Zong-yun, Shu Mao-teng, Huang Rong-gui, Wu Xiao-ming, Song Yun-chun. Genomic in situ hybridization (GISH) discriminates the A, B and C genomes in Brassica allotetraploid species [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2002,24(1):10-14
- [4] Hellmer A. Replication banding studies in two cyprinid fishes. *chromosoma*, 1991,100:524-531
- [5] Nakamura R, Kitamura S, Inoue M, Ohmido N and Fukui K. Karyotype analysis of *Nicotiana kawakamii* Y. Ohashi using DAPI banding and rDNA FISH[J]. *Theor Appl Genet.* 2001,102, 810-814
- [6] Chaowen She, Jingyu Liu, Ying Diao, Zhongli Hu, Yunchun Song. The distribution of repetitive DNAs along chromosomes in plants revealed by self-genomic in situ hybridization . *J Genet Genomics*, 2007,34 (5):437-448
- [7] Zong-Yun Li, Rui Qin, Wei-Wei Jin, Zhi-Yong Xiong, Yun-Chun Song. FISH analysis of pachytene chromosome and DNA fiber of telomere sequence in Rice (*Oryza sativa L. indica*). *Acta Genetica Sinica*, 2005,32(8):832-836
- [8] Stebbins GL. *Chromosomal evolution in higher plants* [M]. London: Edward Arnold, 1971,85-104
- [9] Li MX, Chen RY. A suggestion on the standardization of Karyotype analysis in plants[J]. *J Wuhan Bot Res*, 1985,3:297-302
- [10] 刘丽莎, 张西玲. 菘蓝的染色体核型分析 [J]. 甘肃中医学院学报, 1991,8(1)  
Liu Li-sha, Zhang Xi-ling. *Isatis L* chromosome karyotype analysis[J]. *Journal of Gansu College of Traditional Chinese Medicine*, 1991,8(1)
- [11] 肖成汉, 赵建伟, 何凤仙. 3 种十字花科植物的核型研究[J]. 武汉植物学研究, 1995.13(3):283-286

- Xiao Cheng-han, Zhao Jian-wei, He Feng-xian. Nuclear type research of 3 kinds crucifer[J]. Journal of Wuhan Botanical Research, 1995.13 (3):283-286
- [12] Saranya Srisuwan, Darasinh Sihachakr, Sonja Siljak-Yakovlev The origin and evolution of sweet potato (Ipomoea batatas Lam.) and its wild relatives through the cytogenetic approaches Plant [J]. Science 171,2006, 424-433
- [13] 白文林, 马力. Ag-NORs 多态性及其在动物遗传育种研究中的应用[J]. 西南民族学院学报·自然科学版, 2000,26(3)
- Bai Wen-lin, Ma Li. Ag-NORs Polymorphism and Its Applications in Studies of Animal Genetics and Breeding [J]. Journal of Southwest University for Nationalities(Natural Science Edition), 2000,26(3)
- [14] 徐延浩, 杨飞, 程有林, 马璐, 王建波, 李立家. 45S rDNA 和 5S rDNA 在南瓜、丝瓜和冬瓜染色体上的比较定位 [J]. 遗传,2007,29(5): 614-620
- Xu Yan-hao, Yang Fei, Cheng You-lin, Ma Lu, Wang Jian-bo, Li Li-jia. Comparative analysis of rDNA distribution in metaphase chromosomes of Cucurbitaceae species[J]. Hereditas, 2007,29(5): 614-620
- [15] Liu Bo, Chen Cheng-Bin, Li Xiu-Lan, Qi Li-Wang, Han Su-Ying. Karyotype analysis and physical mapping of 45S rDNA in eight species of Sphora, Robinia and Amorpha[J]. Acta Botanica Yunnanica, 2005, 27(3):261-268
- [16] 徐川梅, 别同德, 王春梅, 周波, 陈佩度. 45S rDNA 在小麦及其近缘物种染色体上的分布[J]. 遗传,2007,29(9):1126-1130
- Xu Chuan-mei, Bie Tong-de, Wang Chun-mei, Zhou Bo, Chen Pei-du. Distribution of 45S rDNA sequence on chromosomes of Triticum aestivum and its relative species [J]. Hereditas,2007,29(9): 1126-1130
- [17] Hutchinson J, Miller TE. The nucleolus organizers of tetraploid and hexaploid wheats revealed by in situ hybridization [J]. Theor Appl Genet, 1982, 61: 285-288
- [18] Liu Z L, Zhang D, Hong D Y, Wang XR. Chromosomal localization of 5S and 18S-5.8S-25S ribosomal DNA sites in five Asian Pines using fluorescence in situ hybridization [J]. Theor Appl Genet, 2003,106 (2):198-204
- [19] Bode-Böger SM, Martens LJ, Täger M, et al. Aspirin reduces endothelial cell senescence [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005,334(4):1226-32
- [20] Chae YM, Heo SH, Kim JY, et al. HUpreulation of smpd3 via BMP2 stimulation and Runx2.M, Cho JY [J]. BMB Rep, 2009, 42(2): 86-90
- [21] Fonseca JE. Rebalancing bone turnover in favour of formation with strontium ranelate: implications for bone strength. [J]. Rheumatology (Oxford), 2008,47,4: 17-19

(上接第 451 页)

- [16] Kovacic N, Grcevic D, Katavic V, et. al. Fas receptor is required for estrogen deficiency-induced bone loss in mice. [J]. Lab Invest, 2010, 90(3):402-13
- [17] Krishnan V, Bryant HU, Macdougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. [J]. Clin Invest, 2006, 116(5):1202-9
- [18] Songtao S, Takayoshi Y, Kentaro A. Is aspirin treatment an appropriate intervention to osteoporosis [J]. Fut Rheumatol, 2008, 3 (6): 499-502

- [19] Bode-Böger SM, Martens LJ, Täger M, et al. Aspirin reduces endothelial cell senescence [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005,334(4):1226-32
- [20] Chae YM, Heo SH, Kim JY, et al. HUpreulation of smpd3 via BMP2 stimulation and Runx2.M, Cho JY [J]. BMB Rep, 2009, 42(2): 86-90
- [21] Fonseca JE. Rebalancing bone turnover in favour of formation with strontium ranelate: implications for bone strength. [J]. Rheumatology (Oxford), 2008,47,4: 17-19