

番木瓜单染色体的显微分离与克隆

陈晓静, 申艳红, 卢秉国

(福建农林大学园艺学院, 福州 350002)

摘要:用玻璃针显微分离出番木瓜 (*Carica papaya* L.) 单染色体, 经过 LA-PCR 扩增得到 80-700 bp 的 DNA 片段。Southern 杂交表明, 扩增片段与番木瓜基因组 DNA 之间有同源性, 从而证明番木瓜单染色体 DNA 已经被成功扩增。将扩增产物克隆到 pGEM-T-Easy 载体中, 约获得 1.18×10^5 个克隆, 酶切鉴定插入片段大小为 100-400 bp。

关键词:番木瓜; 微分离; 微克隆; 单染色体 DNA 文库

中图分类号: Q813.4

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2005)04-0310-05

Microdissection and Microcloning of Single Chromosome of Papaya

CHEN Xiao-jing, SHEN Yan-hong, LU Bing-guo

(College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Single chromosome of papaya (*Carica papaya* L.) was isolated by glass needles, and the chromosomal DNA was amplified by LA-PCR (Linker Adapter PCR). The PCR products were a smear ranged from 80 to 700 bp. Southern blot showed that the PCR products were homogeneous with the papaya genomic DNA, indicating that DNAs from the single chromosome had been successfully amplified. The PCR products were cloned into pGEM-T-Easy vector and about 1.18×10^5 recombinant clones were obtained. The size of the inserted fragments of clones ranged from 100 to 400 bp.

Key words: *Carica papaya*; Microdissection; Microcloning; Single chromosome DNA library

染色体微分离、微切割与微克隆技术是细胞遗传学和分子遗传学结合的桥梁, 通过与荧光原位杂交 (Florescence *in situ* hybridization, FISH)、DNA 测序、文库筛选、比较基因组杂交等分子生物学技术相结合, 已经在人类和动物进化、基因组结构的研究、基因分离与定位及物理图谱构建等方面有广泛的应用, 并取得了令人瞩目的成绩。由于植物细胞有细胞壁而且细胞分裂同步化困难, 因此该技术在植物上的应用起步较晚。直到 1991 年, Sandery 等^[1]将黑麦 (*Secale cereale*) B 染色体片段克隆到了 λ 载体 DNA 上, 仅获得了一个重组克隆。近几年, 已相继进行了水稻 (*Oryza sativa*)^[2]、大豆 (*Glycine max*)^[3]、柚 (*Citrus grandis*)^[4]、蝇子草 (*Silene latifolia*)^[5] 等多种植物的染色体微分离、微切割与微克隆。至今未见番木瓜染色体显微分离及体外扩增的报道。本文

在本实验室建立起来的染色体分离系统基础上^[6], 探讨番木瓜单染色体微分离及体外克隆技术, 为具有小型染色体植物的染色体微分离与微克隆奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

供试番木瓜 (*Carica papaya* L.) 种子 (红妃品种) 取自福建省漳州市农业科学研究所。

1.2 染色体标本制备

将种子用 1% NaHCO₃ 浸泡 5 h, 然后置于 35℃ 培养箱中催根, 待胚根长到 0.5-1.0 cm 时切取新根 (0.5-1.0 cm) 放于 0.002 mol/L 8-羟基喹啉溶液中预处理 2.5-3 h, Carnoy 固定液 (无水乙醇:冰醋酸 =

收稿日期: 2005-01-06 接受日期: 2005-04-11

基金项目: 福建省科技厅重点项目 (2004N032) 资助

3:1) 4℃下固定 10 min, 然后放入 70% 乙醇中 4℃保存备用。将已固定的根尖用 ddH₂O 洗后, 0.075 mol/L KCl 低渗 30 min, 移入酶液(2%纤维素酶和 0.5%果胶酶混合液), 37℃浸泡 40–50 min, 洗去酶液, 用卡宝品红染色, 常规压片。镜检看到分散良好的中期细胞分裂相, 用记号笔做好标记, -80℃速冻接盖片, 气干, 用于显微分离操作。

1.3 染色体的显微分离

自制玻璃针及染色体分离参照黄代青等^[4]的方法, 略有改动。玻璃针在酒精灯微火上用 Leitz 拉针仪控制, 针尖直径小于 1 μm。进行染色体分离时, 在制备好的根尖标本盖片上滴加一滴无菌水, 借助于显微操作系统(NT-188NE)及 Nikon 倒置显微镜(TMS-F), 在 10(目镜)×40(物镜)明视野中挑取染色体, 将粘附染色体的针尖轻轻移出液面, 折断于含 20 μl 反应缓冲液(5 ng μl⁻¹ 蛋白酶 K, 1×T4 DNA连接酶缓冲液)的 0.2 ml PCR 管中。高速离心数秒钟, -20℃存放待用或立即用于扩增。

1.4 *Sau* 3A 接头的制备

制备接头所用的两个引物, 由上海生物工程有限公司合成, 分别为 P₁: 5'GATCCTGAGCTCGA-ATTCGACCC3'; P₂: 5'GGGTCGAATTCGAGCTC-AG3'。接头制备过程参照 Albani^[6]和 Chen 等^[7]的方法。为今后克隆的方便, 接头中包含 *Sau* 3A、*Eco*R I 及 *Sac* I 的酶切位点。制备好的接头稀释至 5 ng μl⁻¹ 后, 经紫外线处理 30 min, -20℃保存。

1.5 单染色体的体外扩增

将上述含单染色体的 0.2 ml PCR 管置于 50℃水浴 2 h 后, 75℃ 20 min 使蛋白酶 K 失活。在 PCR 管中加入 0.02 U *Sau* 3A (在 1×T4 DNA 连接酶缓冲液中配制), 37℃酶切染色体 DNA 2 h, 70℃ 20 min 失活 *Sau* 3A (Promega)。加入 2 μl 前面制备好的 *Sau* 3A 接头(5 ng μl⁻¹), 1.5 U T4 DNA 连接酶(Takara 公司), 连接反应终体积为 24.5 μl, 16℃过夜, 在 70℃ 20 min 失活连接酶。

此后进行 PCR 扩增, PCR 扩增分两步进行。第一步在反应体系中加入 5 μl 10×*Taq* DNA 酶缓冲液; 4 μl MgCl₂ (25 mmol/L); 4 μl dNTPs (10 mmol/L, Takara 公司); 0.6 μl 引物 P₂ (250 ng μl⁻¹); 2.5 U *Taq* DNA 聚合酶 (Promega); 用紫外线处理过的无菌 ddH₂O 补至 50 μl 混匀。用 MJ100 型 PCR 仪进行扩增, 程序如下: 94℃ 变性 5 min; 35 个循环的 94℃ 1 min, 50℃ 1.5 min, 72℃ 3 min; 最后 72℃ 延伸

15 min。第二步 PCR 扩增是从第一步 PCR 产物中取 4 μl 作为模板, 其它反应成分不变, PCR 反应程序基本相同, 只是将 35 个循环降至 30 个循环。

为有效避免外源 DNA 的污染, 上述各步骤应在无菌条件下进行。载玻片及盖玻片先在盐酸:乙醇=1:9 溶液中浸泡 1 d 以上, 双蒸水冲洗干净后再置于 95%乙醇中, 120℃烘烤 2 h 待用。将载玻片、滤纸、刀片、镊子高压灭菌, 卡宝品红染液经抽滤灭菌后, 紫外灯下照射 1 h 以上, 压片过程在超净工作台中进行。PCR 扩增使用的 PCR 管、Tip 头等均须高压灭菌再经紫外线照射 30 min 以上。用到的无菌水、酶解混合液、人工接头、蛋白酶 K 等溶液也要进行抽滤或紫外线灭菌处理。同时设两种严格的对照: 阳性对照加入番木瓜基因组 DNA 为初始底物, 阴性对照中不加任何底物, 其它所有反应过程同上。

1.6 Southern 杂交分析

番木瓜基因组 DNA 是以水培黄化苗为材料, 按照 CTAB (Cetyrimethyl ammonium bromide) 方法^[8]提取的。*Eco*R I 37℃消化适量番木瓜基因组 DNA 过夜, 然后和番木瓜单染色体的第二轮扩增产物一起, 在 1.2%琼脂糖凝胶上电泳, 之后通过常规的 Southern 毛细管转移, 将 DNA 转至尼龙膜 (Milipore 公司) 上。烤膜后, 进行 DIG (Didoxigenin) 标记系统的非同位素杂交。探针为 DIG 标记的经 *Eco*R I 酶切的番木瓜基因组 DNA。具体过程参见 DIG DNA Labeling and Detection Kit (Roche) 说明。

1.7 单染色体 PCR 扩增产物的克隆

单染色体 PCR 产物经 DNA Fragment Purification Kit (Takara 公司) 纯化, 溶于 20 μl 双蒸水中。取 4 μl 与 pGEM-T-Easy vector (Promega) 在 4℃下连接 16 h。将连接产物转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞。然后取 100 μl 涂于含 IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactoside) 和 X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) 的 Amp (Ampicillin) LB 平板上, 37℃培养过夜。挑选白斑, 用碱裂解法小量制备质粒 DNA。*Eco*R I 酶切释放克隆片段, 1%琼脂糖电泳分离克隆片段。

2 结果和分析

2.1 番木瓜单染色体的显微分离

番木瓜染色体为典型的小染色体, 染色体绝对长度变化范围是 1.15–1.66 μm^[9], 所以在倒置显微镜高倍镜 10×40 下无法辨认个别染色体(图 1a),

只能随机挑取某一染色体。所选择的分裂相一般是某条染色体离其它染色体稍远,容易下针的分裂相(图 1a)。使用微调小心调节玻璃针尖轻轻碰触目标染色体,使其粘到针尖上,将粘有染色体的针尖(图 1c)轻轻移出无菌水面。玻璃针尖离开液面时,

因受到溶液表面张力牵引容易使针尖上的染色体飘走,因此当针尖移出液面后,再用显微镜观察染色体是否还粘在针尖上(图 1d)。确定还粘在针尖上后,将粘有染色体的针尖折断于准备好的 PCR 管中。

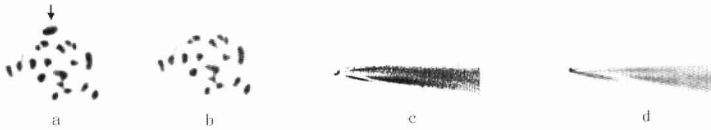


图 1 番木瓜染色体分离过程

Fig. 1 The process of papaya chromosome isolation

a. 分离染色体之前的根尖细胞中期分裂相; b. 染色体被分离之后的中期分裂相; c. 分离出的一条染色体吸附在针尖上; d. 移出液面后吸附在针尖上的染色体。a. Mitotic metaphase chromosomes before chromosome isolation; b. Metaphase chromosomes after isolation; c. An isolated chromosome was adhered to the glass needle; d. An isolated chromosome was adhered to the glass needle out of water

2.2 单染色体的体外扩增

图 2 显示了番木瓜单染色体 PCR 扩增结果。番木瓜单染色体扩增片段为 80~700 bp 连续的 DNA 带。从图 2 可以看出阴性对照未出现任何信号,说明没有外源 DNA 污染。

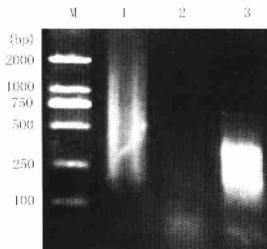


图 2 PCR 扩增产物的凝胶电泳

Fig. 2 The gel electrophoresis of PCR amplification products

M. DL2000 DNA marker; 1. 阳性对照 Positive control; 2. 阴性对照 Negative control; 3. 番木瓜单染色体 DNA 扩增产物 PCR products of a papaya chromosome.

2.3 Southern 杂交分析

为了验证微分离番木瓜单染色体扩增产物的来源,将适量番木瓜基因组 DNA 用 *EcoR* I 完全酶切,用 DIG 标记为探针,与阴性对照、单染色体的 PCR 扩增产物及阳性对照进行杂交,结果见图 3。可以看出,番木瓜基因组 DNA 与番木瓜单染色体的扩增产物出现了明显的杂交信号,而阴性对照则无任何杂交信号,说明该单染色体的扩增产物确实来自于番木瓜基因组。

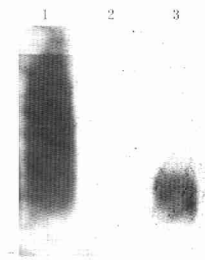


图 3 Southern 杂交结果

Fig. 3 Southern blot result

1, 2 和 3 同图 2。1, 2 and 3 are the same as in Figure 2.

2.4 单染色体文库的初步分析

用番木瓜单染色体 PCR 扩增产物,进行质粒文库的构建。转化菌培养过夜后,每个平板上约得到 393 个白色菌落。将其中 20 个克隆提取质粒,进行 *EcoR* I 酶切分析克隆片段大小。图 4 显示了部分重组克隆的 *EcoR* I 酶切结果。可见该文库克隆的插入片段大小为 100~400 bp,平均大小为 275 bp。

3 讨论

番木瓜染色体很小,长度在 1.15~1.66 μm^{H} 之间,染色体间差异很小,而且都是中间着丝粒染色体,在倒置显微镜高倍镜 10 \times 40 下很难区分不同的染色体,因此只能随机挑取某一染色体。周奕华等^[9]曾对大豆染色体进行微分离和微克隆,但因大豆染色体小(1.4~2.8 μm)而无法辨认个别染色体,只能

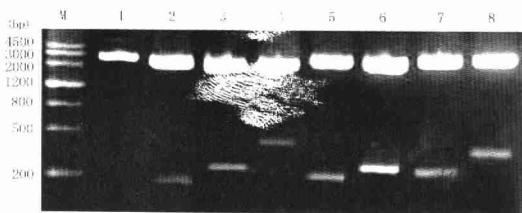


图4 部分重组克隆子的酶切结果

Fig. 4 Results of enzymatic digestion of plasmid DNAs of several recombinant clones
M: DNA marker III; 1: 空载体 Empty vector; 2-8: 克隆片段 Cloning fragments

随机挑取一条染色体。黄代青等^[20]成功地分离了柚第一染色体,柚的染色体也较小,但是柚的第一染色体为近中部着丝粒染色体,明显不同于中部着丝粒的第二染色体,比较容易辨认。而对于番木瓜可以用下述方法鉴定所挑取的染色体:把单染色体PCR产物标记为探针,与染色体标本进行原位杂交,结合详细的核型分析,确定所挑取的是哪一条染色体;或者用染色体特异探针来确定扩增的是哪条染色体。

目前主要采用 LA-PCR 和 DOP-PCR 对单染色体进行扩增。魏建华等^[20]以水稻为材料将 LA-PCR 和 DOP-PCR 两种方法进行比较发现,LA-PCR 比 DOP-PCR 扩增更为稳定,并且 LA-PCR 对染色体扩增的 DNA 片段大于 DOP-PCR,而对细胞质残留碎片扩增的 DNA 片段较小。由于大片段的扩增产物更有利于构建覆盖率高的 DNA 文库及建库以后的标记筛选和应用,因此认为在进行类似水稻的植物染色体微分离和微克隆时,应首选 LA-PCR。再者,随机引物扩增需要较低的退火温度,否则极易造成污染 DNA 的扩增,而 LA-PCR 可以采取相对较高的退火温度(50℃),所以只要加接头之前没有污染,在以后的步骤中即使有污染也不会被大量扩增。胡赞民等^[21]也认为虽然 DOP-PCR 法比 LA-PCR 法简单快捷,但是却极易造成污染。因此我们选择 LA-PCR 进行番木瓜单染色体扩增。

PCR 扩增片段大小直接关系到染色体文库的完整性。在本研究中,PCR 扩增及 Southern 杂交分析表明,扩增片段不是很大,在 80-700 bp 之间。由于番木瓜染色体小加之染色体的自身序列结构、*Sau3A* 的酶切程度、*Taq* 酶的活性及果胶酶、纤维素酶解离时间长短等因素可能导致扩增片段较小。番木瓜基因组为 372 Mbp^[22],则每条染色体包含

2.07×10^7 bp, 如按插入片段为 275 bp 计算,对其覆盖率大于 99% 的 DNA 文库应包含 3.47×10^5 个克隆子,而我们推断能得到的实际克隆为 1.18×10^5 个重组克隆。因此,单从克隆子数量、插入片段大小来看,本研究所建番木瓜单染色体微克隆文库还是较为理想的。

番木瓜是热带亚热带重要水果之一。国内外对番木瓜的研究已经相当深入,但都是从番木瓜的整个基因组入手,如用 RAPD 等分子标记建立基因连锁图谱^[23]、寻找性连锁基因^[24]、用染色体步行来定位性别基因^[25]、寻找性染色体^[26]等,因为技术程序相当冗长繁杂,所以性别基因至今还未准确定位到染色体上,并且利用 RAPD 标记构建的遗传连锁群也并未定位于对应的染色体上,遗传图谱饱和度也较低。构建番木瓜单染色体 DNA 文库,可在单染色体特异文库中筛选出特异性分子标记,以填补遗传连锁图的空白区,加大特异染色体或染色体特定区段的分子标记密度。同时,由于染色体片段特异性 DNA 文库的克隆效率高,针对性强,对辅助基因组的物理作图也极为有利。而且,番木瓜单染色体 DNA 文库的建立还会大大提高番木瓜性别、ACC 氧化酶等重要基因的定位与分离。

致谢 本文承蒙福建农林大学吕柳新教授和吴菁华老师指导,谨致谢忱。

参考文献

- [1] Sandery M J, Forster J, Macadam S R, et al. Isolation of a sequence common to A- and B-chromosomes of rye (*Secale cereale*) by microcloning [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1991, 9:21-30.
- [2] Song W Q (宋文芹), Li X L (李秀兰), Qi Z X (祁仲夏), et al. Microdissection and microcloning of rice chromosome [J]. *Acta Sci Nat Univ Nankai* (南开大学学报自然科学版), 2000, 33(3): 83-88. (in Chinese)

- [3] Zhou Y H(周奕华), Dang B Y(党本元), Hu Z M(胡赞民), et al. Microdissection and PCR amplification of single soybean chromosome [J]. Acta Bot Sin(植物学报), 1998, 40(2):144-150. (in Chinese)
- [4] Huang D Q(黄代青), Lü L X(吕柳新), Zhou Y H(周弈华). Microdissection of the first chromosome in pomelo (*Citrus grandis* Osbeck) [J]. J Agri Biotechn(农业生物技术学报), 2002, 10(1): 53-54. (in Chinese)
- [5] Matsunaga S, Kawano S, Michimoto T, et al. Semi-automatic laser beam microdissection of the Y chromosome and analysis of Y chromosome DNA in a dioecious plant, *Silene latifolia* [J]. Plant Cell Physiol, 1999, 40(1):60-68.
- [6] Albani D, Cote M J, Armstrong K C, et al. PCR amplification of microdissected wheat chromosome arms in a simple single tube reaction [J]. Plant J, 1993, 4:889-903.
- [7] Chen Q, Armstrong K. Characterization of a library from a single microdissected oat (*Avena sativa* L.) chromosome [J]. Genome, 1995, 38:706-914.
- [8] Ming R, Moore P H, Zee F, et al. Construction and characterization of a papaya BAC library as a foundation for molecular dissection of a tree-fruit genome [J]. Theor Appl Genet, 2001, 102:892-899.
- [9] Shen Y H(申艳红), Chen X J(陈晓静), Lu B G(卢秉国). Study on karyotype and meiosis of *Carica papaya* [J]. Subtrop Plant Sci(亚热带植物科学), 2004, 33(4):27-30. (in Chinese)
- [10] Wei J H(魏建华), Sun C Q(孙传清), Chen Z H(陈正华), et al. Comparison of LA-PCR and DOP-PCR *in vitro* amplification for microisolated chromosome in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. J Agri Biotechn(农业生物技术学报), 1999, 7(4):343-347. (in Chinese)
- [11] Hu Z M(胡赞民), Dang B Y(党本元), Zhou Y H(周奕华), et al. Isolation of single chromosome and amplification *in vitro* in *Zea mays* [J]. Acta Genet Sin(遗传学报), 1998, 25(6):544-550. (in Chinese)
- [12] Sondur S N, Manshardt R M, Stiles J I, et al. A genetic linkage map of papaya based on randomly amplified polymorphic DNA markers [J]. Theor Appl Genet, 1996, 93:547-553.
- [13] Ma H, Moore P H, Stiles J I, et al. Towards map-based cloning of a sex determination gene in papaya [A]. In: Plant & Animal Genome IX Conference [C]. San Diego, CA, 2001.
- [14] Liu Z Y, Moore P H, Ma H, et al. Chromosome walking towards the sex determination gene in papaya [A]. In: Plant, Animal & Microbe Genomes X Conference [C]. San Diego, CA, 2002.
- [15] Liu Z Y, Moore P H, Ma H, et al. A primitive Y chromosome in papaya marks incipient sex chromosome evolution [J]. Nature, 2004, 427:348-352.