

# 巴西橡胶树*HbMyb1*基因的原位PCR物理定位

高和琼<sup>1,2</sup>, 庄南生<sup>2\*</sup>, 王英<sup>2</sup>, 邱海燕<sup>2</sup>

(1. 中国热带农业科学院橡胶研究所, 海南 儋州 571737; 2. 海南大学农学院, 海南 儋州 571737)

**摘要:** 为探讨巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)死皮病抗性相关 *HbMyb1* 基因的定位, 采用所建立的橡胶树染色体原位 PCR 技术体系进行研究。结果表明, *HbMyb1* 基因初步定位于巴西橡胶树‘热研 7-33-97’的第 5 号染色体长臂上, 信号位点到着丝粒的百分距离为 15.21, 并观察到在巴西橡胶树‘热研 7-33-97’叶片细胞核的不同分裂时期均扩增到 1~2 个信号。同时对染色体标本的制备、保存、预处理等方面进行了探讨。

**关键词:** 橡胶树; *HbMyb1* 基因; 原位 PCR; 染色体定位

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2012.04.007

## Chromosome Location of *HbMyb1* Gene from *Hevea brasiliensis* by *in situ* PCR

GAO He-qiong<sup>1,2</sup>, ZHUANG Nan-sheng<sup>2\*</sup>, WANG Ying<sup>2</sup>, QIU Hai-yan<sup>2</sup>

(1. Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China; 2. College of Agriculture, Hainan University, Danzhou 571737, China)

**Abstract:** The *in situ* PCR technical system on chromosomes of *Hevea brasiliensis* was developed successfully. The *HbMyb1* gene related with Tapping Panel Dryness (TPD) resistance was physically located in the long arm of chromosome No. 5 of ‘Reyan 7-33-97’ by *in situ* PCR and the fraction-length, the percentage of the distance from detection site to the centromere, was 15.21. One or two signals were detected during cell division at different phases. The chromosome preparations, preservation, and pretreatment were also discussed.

**Key words:** *Hevea brasiliensis*; *HbMyb1* gene; *in situ* PCR; Chromosomes location

巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)因胶乳产量高、质量好和易于获取, 具有很高的商业开发价值, 是天然橡胶的唯一来源, 为四大工业原料之一。然而, 橡胶树死皮病(Tapping Panel Dryness, TPD)在世界各橡胶园普遍发生, 严重影响橡胶产业的发展<sup>[1]</sup>。近年来, 随着分子生物学的迅速发展, 加快了 TPD 病因的探索和机理的研究。Chen 等<sup>[2]</sup>从巴西橡胶树中克隆了橡胶树抗死皮病相关基因 *HbMyb1*, 彭世清等<sup>[3]</sup>对该基因进行了结构和功能方面的分析, 为弄清橡胶树死皮病致病机理打下基础。但该基因在染色体上的物理定位, 尚未见报道, 而要深入

了解该基因的调控机理及其与相邻基因或遗传成分间的关系, 对其进行染色体物理定位非常必要。

原位 PCR (*in situ* PCR)技术具有高度敏感、高效扩增、分子杂交精细定位的特点, 它在原位检测低拷贝至单个拷贝基因及基因低水平的表达方面有着独特的优越性。本研究采用原位 PCR 技术对橡胶树死皮病抗性相关基因 *HbMyb1* 进行染色体物理定位, 以揭示该基因在染色体上的位置和分布特点, 为橡胶树遗传育种及基因工程等提供分子细胞遗传学依据。

收稿日期: 2011-09-26

接受日期: 2011-12-19

基金项目: 国家天然橡胶产业技术体系(CARS-34); 海南省自然科学基金项目(80658)资助

作者简介: 高和琼(1970~), 硕士, 高级实验师, 主要从事植物分子遗传学方面研究。E-mail: hqgao307@163.com

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: Zhuangns@163.com

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试植物材料巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*) ‘热研 7-33-97’幼叶采自海南大学儋州校区农学院基地及中国热带农业科学院橡胶所橡胶种质圃。

### 1.2 染色体标本制备

染色体标本制片参考李懋学等<sup>[4]</sup>的方法,采用酶解去壁低渗法和悬液法制片。取幼嫩叶片,在对二氯苯与 $\alpha$ -溴代萘混合的饱和水溶液(100 mL 对二氯苯饱和液加 1 滴 $\alpha$ -溴代萘,现用现配)中预处理 1.5~2 h(4℃),用新鲜固定剂(无水乙醇:冰乙酸=3:1)固定 12~20 h(4℃),用双蒸水充分洗净,在 25℃的蒸馏水(或 0.075 mol L<sup>-1</sup> KCl 溶液)中前低渗 30 min;用 3.5% 的纤维素酶和 1.75% 的果胶酶混合酶液于 37℃酶解 5~7 h,去掉酶液,洗净,在双蒸水中后低渗 70 min。用包被好的玻片进行染色体制片。

### 1.3 原位PCR

原位 PCR 程序参照王英<sup>[5]</sup>和 Dieffenbach 等<sup>[6]</sup>的方法,略有修改。采用彭世清等<sup>[3]</sup>的 *HbMyb1* 基因特异性引物(上游引物 5'-TTACTGGCGTTG-CATCGGTTG-3', 下游引物 5'-ATGGATCGGGG-AATTGAAATCCTCTCT-3'),由上海英俊生物技术公司合成。首先预处理:染色体标本在 0.01 mol L<sup>-1</sup> HCl 中处理 4~5 min;0.5×TBS 洗涤 10 min;用灭菌水漂洗玻片 2×5 min;玻片依次经 -20℃乙醇脱水:75%→90%→100%,每次 2 min;空气干燥。其次进行原位扩增:将 50  $\mu$ L PCR 反应液加在标本上,滴加 20  $\mu$ L 矿物油,密封。反应液组成:1×buffer, 4.5 mmol L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mg mL<sup>-1</sup> BSA, 200  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> 的 dATP、dCTP、dGTP, 72  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> 的 dTTP, 4  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> DIG-11-dUTP, 1 U  $\mu$ L<sup>-1</sup> 的 *Taq* DNA 聚合酶, 2.4  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> 的 Primer;以不加 *Taq* 酶或引物为阴性对照。开始热循环:95℃预变性 10 min;94℃变性 30 s;53℃退火 1 min;72℃延伸 70 s,共 25 个循环;最后,72℃延伸 7 min。最后荧光检测:扩增后,揭开原位克隆框及塑料盖片,将玻片置于 0.1×PBS, 37℃洗脱 4~5 min;每载片加 5% BSA (0.1×SSC/吐温 20) 100  $\mu$ L,盖上塑料盖片孵育 20 min, 37℃;去盖片,去除 BSA 溶液,每片加 20  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> Anti-DIG-Fluorescein 50  $\mu$ L,

盖上塑料盖片孵育 1 h, 37℃;每片加 1  $\mu$ g  $\mu$ L<sup>-1</sup> PI 50  $\mu$ L, 盖上压膜盖片孵育 15 min, 37℃;0.1×SSC/吐温 20 漂洗 2×5 min;空气干燥;用抗褪色剂 Vectashield 封片;4℃,黑暗中显色过夜。

### 1.4 信号检出

使用荧光显微镜 BX51TR-32FA1-A03 进行观察,选择 WBV 荧光激发块。选择信号清晰、染色体形态好的分裂相,用 Penguin/Proseries Camera systems 软件进行拍照,发黄绿色为扩增位点,无扩增信号的核酸呈红色。

## 2 结果和分析

用 *HbMyb1* 基因的特异引物对巴西橡胶树 ‘热研 7-33-97’ 叶片(2n=36)细胞核染色体标本进行原位 PCR 扩增,在 ‘热研 7-33-97’ 叶片细胞核不同分裂时期的染色体上都可检测出 1~2 个扩增信号(图 1)。在中期细胞核的 36 条染色体中有 1 对染色体有杂交信号,观察到其中一条同源染色体上有信号(图 2)。结合核型分析<sup>[7]</sup>(图 3),初步将橡胶树 *HbMyb1* 基因定位于 ‘热研 7-33-97’ 的中期细胞核第 5 号染色体长臂上,扩增位点到着丝粒的百分距离是 15.21(黑色的区域)。

## 3 讨论

彭世清等<sup>[3]</sup>采用 Southern 杂交方法,报道巴西橡胶树抗死皮病基因 *HbMyb1* 在巴西橡胶树基因组中有 2 个拷贝。本研究进一步阐述了巴西橡胶树抗死皮病基因 *HbMyb1* 在巴西橡胶树中期染色体上的具体位置,从而证实低拷贝 *HbMyb1* 基因定位的可靠性。同时在进行巴西橡胶抗死皮病 *HbMyb1* 基因的原位 PCR 定位时, *HbMyb1* 基因在 ‘热研 7-33-97’ 叶片不同分裂时期的细胞核中可检测到 1~2 个扩增信号,这可能是由于核酸在不同时期呈现的松散程度不同,从间期到中期,染色体不断凝缩,高度螺旋化,使得扩增的难度越来越大。前人在原位杂交研究上有类似现象,如 Andrew 等<sup>[8]</sup>采用原位杂交技术并以 pTa71、pXVI、PCR 产物合成的探针,对巴西橡胶树 5S rDNA 进行原位杂交,结果分别定位于巴西橡胶树第 6 号、第 7 号染色体的次缢痕区 NOR-1、NOR-2,同时也观察到不同时期细胞核中均有扩增信号。因此,在细胞核间期相对能扩增到信号,而在中期很难观察到。

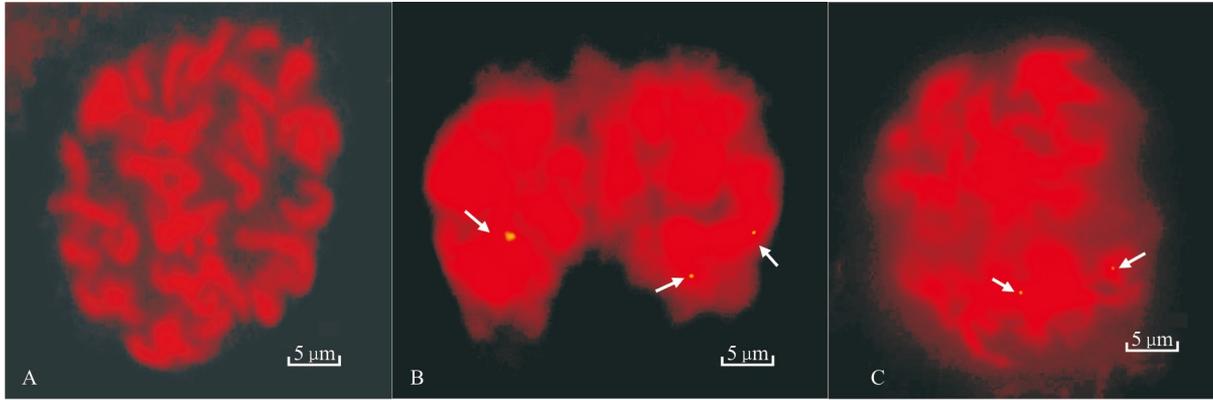


图1 *HbMyb1* 在热研 7-33-97 细胞分裂不同时期的 ISPCR 结果。箭头所指为信号位点。染色体为 PI 染色。A: 中期(框外作阴性对照); B: 间期(2 个细胞); C: 前期。

Fig. 1 *HbMyb1* detected by ISPCR on Reyan 7-33-97 cells in different phases. Arrows indicate signal spots of ISPCR. Chromosomes were stained with PI. A: Metaphase (outside of the EasiSeal as netnegative control); B: Interphase; C: Prophae.

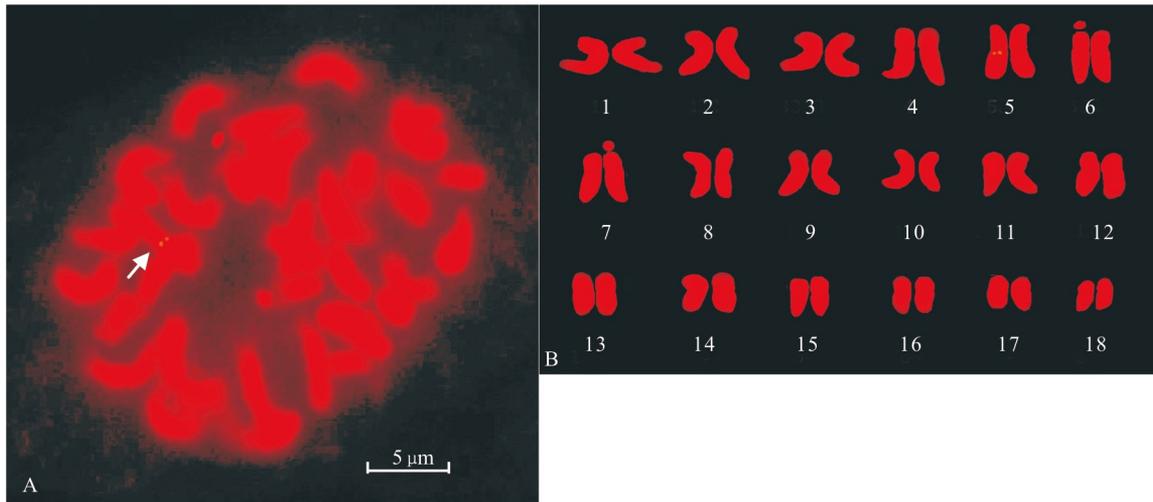


图2 ‘热研 7-33-97’ (2n=36)的核型。箭头示信号位点。

Fig. 2 Karyotype of ‘Reyan 7-33-97’ (2n=36). The arrows indicate signal spots.

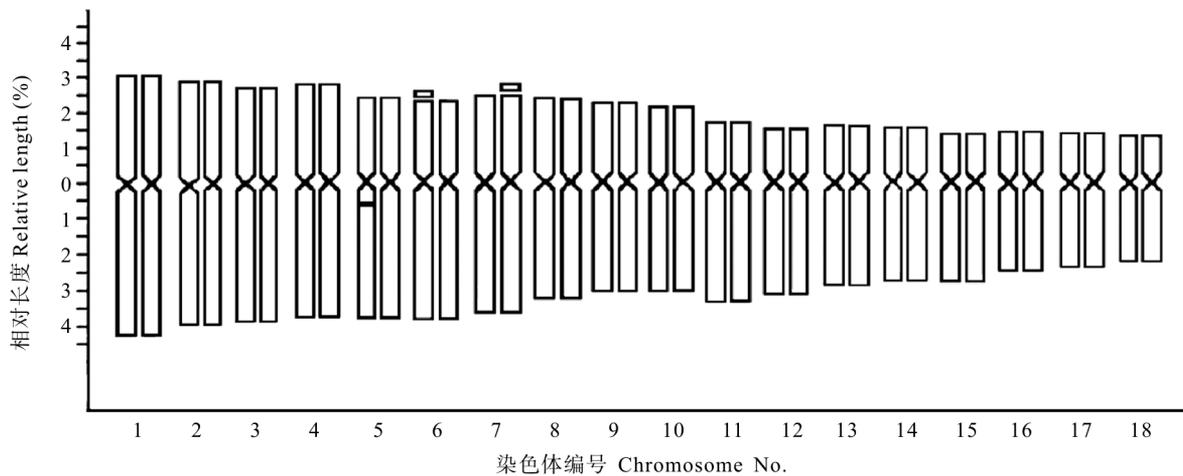


图3 ‘热研 7-33-97’ (2n=36)的核型模式图。黑色部分表示原位 PCR 扩增到的 *HbMyb1* 信号所在位点。

Fig. 3 Idiogram of ‘Reyan7-33-97’ (2n=36). The black part stand for *HbMyb1* signal spots of ISPCR.

原位 PCR 技术用于低拷贝序列植物基因组定位的报道较少,主要是由于植物细胞壁的阻碍影响到抗体的渗透,且低拷贝序列检出信号太弱,难以辨别杂交信号和背景信号。本研究通过对 *HbMyb1* 基因进行定位研究,认为高质量的染色体标本是原位 PCR 成功的关键,优化技术体系中的某些步骤,特别是严格的预处理和洗脱强度能降低背景,保证信号精确检出。

本研究从以下几方面进行了优化:

(1) 染色体标本制备及其保存。为保证高质量的染色体标本,在制备橡胶树染色体标本时,用多聚赖氨酸(PLL)包被玻片,可有效防止染色体在位 PCR 操作过程中脱落,有利于特异 DNA 序列的原位 PCR 检测。叶片预处理、固定、酶解时间一定要控制好,染色体标本置于  $-20^{\circ}\text{C}$  的冰箱中保存,最好不要超过一个月,避免反复冻融。本研究在标本的保存过程中用抗褪色剂 Vectashield 封片,有一定防止 ISPCR 产物荧光信号衰退的作用。为防止原位 PCR 产物荧光信号衰退,一般情况下要求原位 PCR 的标本在  $4^{\circ}\text{C}$  黑暗中保存,及时镜检。本研究曾将原位 PCR 标本在  $4^{\circ}\text{C}$  黑暗保存 24~48 h,结果表明,扩增信号弱的原位 PCR 标本在保存 24 h 以内进行镜检不会产生明显的信号衰退现象,而保存 24~48 h 的信号明显衰退,此时镜检到的信号在染色体上呈弥散状,48 h 后信号完全衰退,已无法镜检到信号。

(2) 预处理。本研究采用的叶片标本,内含物较多会影响反应液扩增。使用  $0.01\text{ mol L}^{-1}$  HCl 溶液,目的在于解离碱性蛋白又不损坏核酸,这样有利于原位 PCR 扩增。 $0.01\text{ mol L}^{-1}$  HCl 溶液过度处理,会降解 DNA,严重影响细胞形态甚至使染色体变薄、变淡,引物扩增结合位点受损,可能导致扩增后无产物。处理不充分,碱性蛋白依附于核酸上,影响原位扩增,导致假阳性。本研究认为采用  $0.01\text{ mol L}^{-1}$  HCl 处理 4~5 min 比较适宜。

(3) 洗脱强度。根据对照中核酸被 PI 负染的程度和非特异性结合 Anti-DIG-Fluorescein 的荧光背景情况进行洗脱强度的优化。对于染色体原位 PCR 来说,无扩增信号出现时,需要考虑的因素很多。首要考虑的应是洗脱强度,因洗脱过度易导致 ISPCR 扩增信号丢失,甚至将 PI 洗脱,镜检时核酸呈现自发荧光。原位 PCR 需要遵守较严格的洗脱强度,洗脱强度应从最低强度开始,当在低强度下

出现扩增信号后,再相应提高洗脱强度,降低背景。

(4) 原位 PCR 技术中的非特异性问题。原位 PCR 技术中的非特异性问题主要是假阳性和假阴性结果。如果出现假阳性结果,必需优化 PCR 反应液中  $\text{Mg}^{2+}$  浓度、引物特异性、热循环中的退火温度、退火时间等等。另外也可加强洗脱强度来减少假阳性的产生;原位 PCR 的扩增效率低下、扩增障碍或 PCR 产物的丢失均可产生假阴性结果。目前解决原位 PCR 扩增效率低下的办法之一是玻片一定要清洗干净,并用多聚赖氨酸(PLL)包被防止靶细胞脱落。为了保证原位 PCR 的灵敏性和特异性,降低非特异性扩增,可尽量减少循环次数,一般 20~30 个循环为宜。

## 参考文献

- [1] Jiang J S, Zhou Z Y. Prediction of rubber production, consumption and trade of China in early 21 century [J]. Trop Agri Sci, 1999(6): 63-71.  
蒋菊生, 周钟毓. 21世纪初中国天然橡胶生产、消费、贸易预测 [J]. 热带农业科学, 1999(6): 63-71.
- [2] Chen S C, Peng S Q, Huang G X, et al. Association of decreased expression of a Myb transcription factor with the TPD (tapping panel dryness) syndrome in *Hevea brasiliensis* [J]. Plant Mol Biol, 2003, 51(1): 51-58.
- [3] Peng S Q, Fu X H, Wu K X, et al. Structural analysis and expression of *HbMyb1* gene associated with tapping panel dryness of *Hevea brasiliensis* [J]. J Plant Physiol Mole Biol, 2003, 29(2): 147-152.  
彭世清, 傅相辉, 吴坤鑫, 等. 巴西橡胶树死皮病相关基因 *HbMyb1* 的结构分析及表达 [J]. 植物生理与分子生物学学报, 2003, 29(2): 147-152.
- [4] Li M X, Zhang X F. Plant Chromosome Research Technology [M]. Harbin: Northeast Forestry University Publishing House, 1991: 31-46.  
李懋学, 张学方. 植物染色体研究技术 [M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 1991: 31-46.
- [5] Wang Y. PCR detection and in situ PCR location of specific DNA from sugarcane parental species [D]. Danzhou: South China Tropics Agricultural College, 2007: 34-39.  
王英. 甘蔗亲本专一性DNA的PCR检测和原位PCR定位 [D]. 儋州: 华南热带农学院, 2007: 34-39.
- [6] Dieffenbach C W, Lowe T M J, Dveksler G S. General concepts for PCR primer design [J]. Genome Res, 1993, 3(3): S30-S37.
- [7] Gao H Q, Zhuang N S, Wang Y, et al. Karyotype analysis of two varieties in *Hevea brasiliensis* [J]. J Wuhan Bot Res, 2009, 27(5): 537-540.  
高和琼, 庄南生, 王英, 等. 橡胶树两个品种的核型分析 [J]. 武汉植物学研究, 2009, 27(5): 537-540.
- [8] Leitch A R, Lim K Y, Leitch I J, et al. Molecular cytogenetic studies in rubber, *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. (Euphorbiaceae) [J]. Genome, 1998, 41(3): 464-467.