

葎草单染色体的显微分离及 DOP-PCR 技术体系建立

秦瑞云, 李双双, 李书粉, 袁金红, 高武军, 邓传良

(河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007)

摘要:葎草是具有 XX/ XY_1Y_2 性染色体系统的雌雄异株植物, 是研究植物性染色体演化的模式材料之一。利用染色体显微分离技术从葎草根尖有丝分裂中期分裂相中将单条染色体进行了显微分离及 DOP-PCR(Degenerate oligonucleotide primer-PCR)扩增, 并构建了单染色体 DOP-PCR 扩增产物的荧光探针, 对葎草根尖有丝分裂中期分裂相染色体进行了荧光原位杂交, 其结果表明荧光信号分布在所有的染色体上, 表明所建立的技术体系能够成功分离葎草单染色体并进行 DNA 扩增。本研究结果为进一步进行葎草 X、Y 染色体的细胞及分子生物学研究提供了技术支持。

关键词:葎草; 单染色体; 显微分离; DOP-PCR

中图分类号:Q37

文献标志码:A

葎草(*Humulus japonicus* L.)为桑科(Moraceae)葎草属(*Humulus*)一年生或多年生枝蔓性草本雌雄异株植物, 其性别由 X 性染色体/常染色体平衡控制: 当 X 性染色体/常染色体比率为 1 时为雌性, 当比率为 0.5 时为雄性^[1], 基因组大小为 1.7 pg^[2]。葎草雌株为 $2n=16=14+XX$, 雄株为 $2n=17=14+XY_1Y_2$ ^[3], 其性染色体非常容易辨认, X 染色体是最大的染色体, Y 染色体比最大的常染色体要大^[4]。葎草性染色体演化处于性染色体演化非常重要的阶段, 因此是研究性染色体演化的模式材料之一^[1]。荧光原位杂交技术和改良 C 带技术相结合, 以 5SrDNA, 45S rDNA、末端重复序列 HJSR 为探针的研究表明, X 染色体短臂上有一个富含 AT 序列的区域, Y_1 含有两个富含 AT 序列的区域, Y_2 则是完全没有信号; Y_1 染色体两条臂亚末端部区域均分布有 HJSR 荧光信号, 而 Y_2 染色体上无荧光信号分布。因此, 我们通过这些荧光信号分布, 在细胞形态学上能够轻易地分辨出性染色体与常染色体^[5]。借助激光切割技术, Yakovin 等在葎草花粉母细胞减数分裂中分离出 XY_1Y_2 性染色体, 并进行了 DOP-PCR 扩增、涂染及 DNA 文库的构建^[6]。性染色体连锁分子标记的获得不但可以用于葎草早期的性别鉴定, 而且有助于葎草性染色体演化的研究, 前期, 许多学者在这方面做了大量工作^[7-11]。

自从 Scalenghe 第一次建立染色体微分离和微克隆技术到目前已经发展了将近 30 多年^[12]。经过许多学者的改进^[13-16], 染色体微分离和微克隆已经成为从特定染色体和/或染色体特异区域分离 DNA 的有效和直接的方式^[17]。分离的 DNA 在基因组研究中具有许多作用, 包括(1)构建遗传连锁和物理图谱, (2)筛选进行染色体涂染的探针, 和(3)组装染色体特异表达序列标签(EST)库^[18-19]。显微分离技术已经被应用于菠菜(*Spinacia oleracea*)、芦笋(*Asparagus officinalis*)、白麦瓶草(*Silene latifolia*)、酸模(*Rumex acetosa*)、葎草等雌雄异株植物性染色体的分离、鉴定、DNA 文库构建及特异重复序列获得等方面的研究^[6, 20-24]。

在前期研究中, 葎草 XY_1Y_2 性染色体是作为一个整体从葎草花粉母细胞减数分裂相中分离出来, 而要分离 X, Y_1 , Y_2 性染色体特异序列, 一种非常重要的方式是分别将 X, Y_1 , Y_2 性染色体分别进行分离和克隆。

收稿日期:2016-04-07;修回日期:2016-10-01.

基金项目:国家自然科学基金项目(31000165);河南省高校科技创新团队(17IRTSTHN017);河南省高等学校青年骨干项目资助(2014GGJS-050).

第1作者简介:秦瑞云(1976-),女,山东菏泽人,河南师范大学实验师,主要从事植物分子遗传学研究。

通信作者:邓传良(1975-),男,山东菏泽人,教授,博士,主要从事植物分子遗传研究, E-mail: DCL75@163.com.

基于此,本研究将菴草单条染色体进行了显微分离、DOP-PCR 扩增及 FISH 验证,建立了相应的技术体系,研究结果为进一步分离菴草 X,Y 染色体奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

本研究所用的材料为野生菴草萌发的不定根。在八月中旬,等菴草雌、雄花绽放,鉴别雌、雄株,分别选取菴草雌、雄茎段进行水培,萌发不定根用于本实验研究。

1.2 菴草单条染色体的显微分离及 DOP-PCR 扩增

参考 Kato 等^[25]的方法进行菴草单条染色体的制备、微分离及微克隆。待水培茎段不定根萌发长到 1.0~2.0 cm 长。切断的根尖用笑气处理 2 h,然后用冰冷的 90% 乙酸固定 10 min,于 70% 乙醇中 -20 °C 保存备用。在冰上对根尖进行清洗,生长点部分用 1% 果胶酶 Y23(Yakult Pharmaceutical Tokoyo)和 2% 纤维素酶 Onozuka R-10(Yakult Pharmaceutical Tokoyo)混合液于 37 °C 酶解 50 min。酶解后,根尖用 70% 乙醇清洗一次,然后用 100% 乙醇再清洗一次。用大头针将根生长点部分仔细捣碎,用 100% 乙醇将溶液室温重旋 30 s 以分离细胞。通过离心将细胞收集在离心管底部,用 90% 乙酸进行重旋。将细胞悬浮液滴再放在湿盒内的玻璃制片上,慢慢展片。根尖细胞立即用于微分离。用固定在倒置显微镜(奥林巴斯 1M,日本)上显微操作仪(Leitz)上的玻璃针将菴草中单条染色体进行分离。

分离的单条染色体被收集在 Eppendorf 管中,用蛋白酶 K(Roche,Mannheim,Germany)进行消化。参考 Telenius 等^[26]的方法,利用简并寡核苷酸引物 5'-CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-3'对单条染色体进行 PCR 扩增。在所有的操作过程中,执行严格的阴性对照试验。

1.3 单染色体 DOP-PCR 扩增产物验证

为了进一步验证单条染色体 DOP-PCR 扩增产物来源于菴草基因组,利用 Han 等^[27]的方法对菴草中期分裂相染色体进行制备。借助切口平移方法,用 Chroma Tide Alexa Fluor 488-5-dUTP 对微分离单条染色体第二轮扩增产物进行荧光标记并作为探针。探针混合液(20 ng/ μ L,用 2×SSC 和 1×TE 混合液进行稀释)首先在沸水中变性 5 min,然后放置在冰上。每一张制片用 6 μ L 探针溶液。杂交时,制片先在 100 °C 处理 5 min,接着 55 °C 于湿盒里放置过夜。杂交后,制片用 2×SSC 溶液进行清洗,然后用 Vectashield 防淬灭剂(包含 1.5 μ g/mL DAPI,Vector Laboratories,Burlingame,CA,USA)进行处理。用蔡司荧光显微镜(Zeiss,Germany)上的 Magnafire CCD 相机对图像进行捕捉,用 Photoshop 7.0 软件对图像进行处理。

2 实验结果

2.1 单条染色体的鉴定、微分离及扩增

在菴草中期分裂相中,随机选择一条单染色体(图 1a),利用玻璃针将该条染色体进行分离(图 1b)。每一个分离的染色体单独放在一个管中,被用来进行 DOP-PCR 扩增。经过两轮连续扩增后,用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,可以看到所扩增的 DNA 分子量在 500~2000 bp(图 2 泳道 2)范围内呈现弥散量的条带。作为控制可能 DNA 污染的阴性对照,无模板 DNA 的阴性对照试验在微分离和扩增的所有过程中均同步执行。如图 2 泳道 1 所示,阴性对照没有扩增出 DNA 产物。

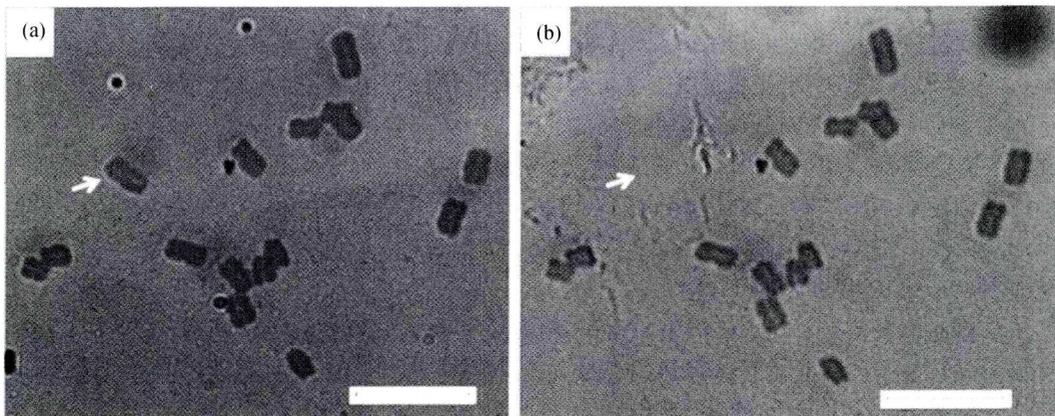
2.2 单染色体 DOP-PCR 扩增产物验证

借助切口平移方法,用 Chroma Tide Alexa Fluor 488-5-dUTP 对单染色体 DOP-PCR 扩增产物进行荧光标记,在没有封阻的情况下,与菴草根尖中期分裂相染色体进行杂交,荧光信号分布在所有染色体的所有区域(图 3)。

3 讨论

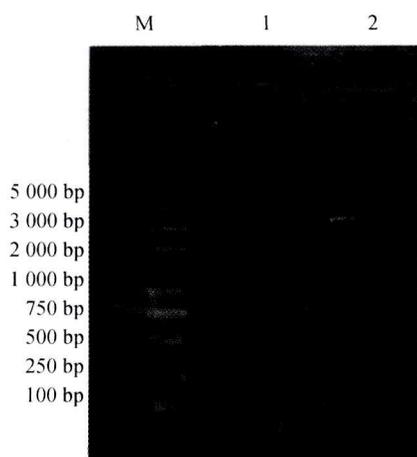
对于 X/A 比率决定性别的雌雄异株植物(如酸模),X 染色体对于雌雄株都是必需的。多个 Y 染色体系统可能来源于两种方式:一种是来源于常染色体与 X 染色体的易位(由于易位的发生,同型的 X、Y 染色体

变成了异型的 X, Y 染色体, 后来为了保持一个平衡的核型, 正常常染色体与原始 Y 染色体共分离, 从而导致两个 Y 染色体的产生; 另一种来源于 XY 性染色体的断裂事件(Y 染色体着丝粒区域的断裂形成了两个具端着丝粒的性染色体(Y_1 和 Y_2)), 后来两个具端着丝粒染色体形成等臂染色体, 最后两个新形成的 Y 染色体在臂的一端缺失了同源区域的部分^[28]. 目前, 不清楚易位事件是否在酸模中发生, 因为同种类型的重复序列分布在所有的 Y 染色体上(Y_1 和 Y_2), 表明 Y_1 和 Y_2 染色体具有共同的起源^[24, 29]. 因此, 对于 XX/ XY_1Y_2 性染色体系统的雌雄异株植物, Y 染色体起源问题仍是一个悬而未决的事件. 作为 XX/ XY_1Y_2 性染色体系统代表植物菹草, 本研究借助染色体显微分离技术, 成功的将其单条染色体进行显微分离及 DOP-PCR 扩增(图 1, 图 2). 当将荧光标记的单条染色体 DOP-PCR 扩增产物与菹草根尖中期分裂相进行杂交时, 荧光信号分布在所有染色体上(图 3), 这一结果表明微分离的单条染色体 DOP-PCR 扩增产物来源于菹草基因组. 同时, 我们可以看到单染色体扩增产物荧光标记没有特异的杂交到某条染色体上, 这可能是由于植物染色体上具有许多同源的重复序列. 不过, 我们可以借助一些技术手段如单染色体差减杂交、单染色体 EST 序列快速克隆等来获得单染色体特有的序列, 从而为研究单染色体的起源演化奠定基础.



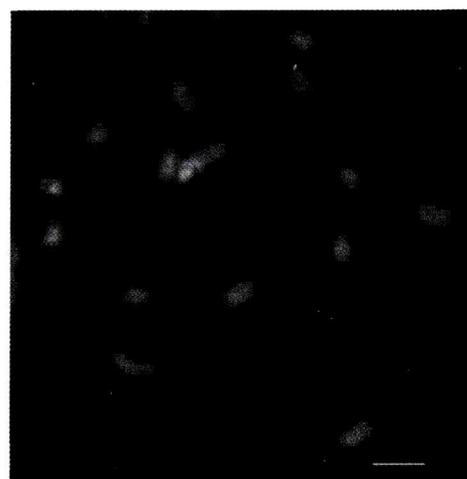
(a) 显示单条染色体显微分离前根尖有丝分裂中期分裂相(箭头示单染色体); (b) 显示单条染色体分离后根尖有丝分裂中期分裂相(箭头示单染色体分离后的位置). 标尺为10 μm .

图1 菹草单染色体的显微分离过程



泳道1显示阴性对照; 泳道2显示单个染色体扩增结果.

图2 显微分离单染色体的DOP-PCR扩增结果
M显示分子量标准



标尺为10 μm
图3 单染色体扩增产物与菹草雌株根尖有丝分裂中期分裂相FISH杂交结果

本研究结果建立了菹草单染色体显微分离技术体系, 为进行 X, Y 染色体的细胞及分子生物学研究提供了技术支持, 同时也为探讨 Y 染色体可能的演化方式提供了新的思路.

参 考 文 献

- [1] Ming R, Bendahmane A, Renner S S. Sex chromosomes in land plants[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2011, 62:485-514.
- [2] Grabowska-Joachimiak A, Sliwinska E, Pigula M, et al. Genome size in *Humulus lupulus* L. and *H. japonicus* Siebold & Zucc. (Cannabaceae)[J]. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 2006, 75:207-214.
- [3] Winge O. On the nature of sex chromosome in *Humulus*[J]. *Hereditas*, 1929, 12:53-63.
- [4] 王连军, 邓传良, 卢龙斗, 等. 葎草的核型和性染色体研究[J]. *河南农业科学*, 2007, 10:61-63.
- [5] Grabowska-Joachimiak A, Mosiolek M, Lech A, et al. C-Banding/DAPI and in situ hybridization reflect karyotype structure and sex chromosome differentiation in *Humulus japonicus* Siebold & Zucc [J]. *Cytogenet Genome Res*, 2011, 132:203-211.
- [6] Yakovin N A, Divashuk M G, Razumova O V, et al. Use of laser microdissection for the construction of *Humulus japonicus* Siebold et Zuccarini, 1846 (Cannabaceae) sex chromosome-specific DNA library and cytogenetics analysis[J]. *Comp Cytogenet*, 2014, 8(4):323-336.
- [7] 肖理慧, 高武军, 张小莉, 等. 葎草 DNA 的提取及 AFLP 标记反应体系的建立[J]. *分子植物育种*, 2008, 6(2):393-398.
- [8] 高武军, 孙富从, 尹为治, 等. 葎草雄性连锁的 RAPD 标记的克隆与 SCAR 标记的建立[J]. *分子细胞生物学报*, 2009, 6(2):212-215.
- [9] 高武军, 沙涛, 姬艳克, 等. 葎草雄-性连锁的 ISSR 标记克隆及 SCAR 标记的建立[J]. *热带亚热带植物学报*, 2010, 18(3):283-387.
- [10] Aleksandrov O S, Divashuk M G, Karlov G I. Development of a sex specific molecular marker for Japanese Hop *Humulus Japonicus* Siebold & Zucc[J]. *Russ J Genet*, 2011, 47(8):1145-1149.
- [11] 邓传良, 任映雪, 张卫丽, 等. 葎草性别相关 SRAP 分子标记的鉴定[J]. *植物研究*, 2014, 34(6):798-802.
- [12] Scalenghe F, Turco E, Ederström J E, et al. Microdissection and cloning of DNA from a specific region of *Drosophila melanogaster* polytee chromosomes[J]. *Chromosoma*, 1981, 82:205-216.
- [13] Röhme D, Fox H, Herrmann B, et al. Molecular clones of the mouse complex derived from microdissected metaphase chromosomes[J]. *Cell*, 1984, 36:783-788.
- [14] Bates G P, Wainwright B J, Williamson R, et al. Microdissection and microcloning from the short arm of human chromosome 2[J]. *Mol Cell Biol*, 1986, 6:3826-3830.
- [15] Lüdecke H J, Senger G, Claussen U, et al. Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification[J]. *Nature*, 1989, 338:348-350.
- [16] Kao F T, Yu J, Qi J, et al. A region specific microdissection library for human chromosome 2p23→p21 and the analysis of an interstitial deletion of 2p21[J]. *Cytogenet Cell Genet*, 1995, 68:17-18.
- [17] Yu J W, Tong S H, Feng T Y, et al. Construction and characterization of a region-specific microdissection library from human chromosome 2q35-q37[J]. *Genomics*, 1992, 14:769-774.
- [18] Zhou R N, Hu Z M. The development of chromosome microdissection and microcloning technique and its applications in genomics research[J]. *Curr Genomics*, 2007, 8:67-72.
- [19] Zhou R N, Shi R, Jiang S M, et al. Rapid EST isolation from chromosome 1R of rye[J]. *BMC Plant Biol*, 2008, 8:28-41.
- [20] Deng C L, Qin R Y, Cao Y, et al. Microdissection and painting of the Y chromosome in spinach (*Spinacia oleracea*)[J]. *J Plant Res*, 2013, 126:549-556.
- [21] Deng C L, Qin R Y, Zhang W L, et al. Microdissection and painting of asparagus L5 chromosome[J]. *Caryologia*, 2014, 67:185-190.
- [22] Deng C L, Zhang W L, Cao Y, et al. Rapid cloning and bioinformatic analysis of spinach Y chromosome-specific EST sequences[J]. *J Genet*, 2015, 94:705-713.
- [23] Hobza R, Lengerova M, Cernohorska H, et al. FAST-FISH with laser beam microdissected DOP-PCR probe distinguishes the sex chromosomes of *Silene latifolia*[J]. *Chromosome Res*, 2004, 12:245-250.
- [24] Shibata F, Hizume M, Kuroki Y. Chromosome painting of Y chromosome and isolation of a Y chromosome-specific repetitive sequence in the dioecious plant *Rumex acetosa*[J]. *Chromosoma*, 1999, 108:266-270.
- [25] Kato A, Lamb J C, Birchler J A. Chromosome painting using repetitive DNA sequences as probes for somatic chromosome identification in maize[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101:13554-13559.
- [26] Telenius H, Carter N P, Bebb C E, et al. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: General amplification of target DNA by a single degenerate primer[J]. *Genomics*, 1992, 13:718-725.
- [27] Han F P, Lamb J, Birchler J. High frequency of centromere inactivation resulting in stable dicentric chromosomes of maize[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103:3238-3243.
- [28] Vyskot B, and Hobza R. Gender in plants: sex chromosomes are emerging from the fog[J]. *TRENDS Genet*, 2004, 20(9):432-438.

- [12] Valenti S, Neri F, Cucchiarelli A. An Overview of Current Research on Automated Essay Grading[J]. *Journal of Information Technology Education*, 2012(2): 319-330.
- [13] Xu J, Jia Y. BFSU Sentence Segmenter[M]. Beijing: Foreign Language Teaching and Research Press, 2012.
- [14] Wackerly D, Mendenhall W, Scheaffer R. *Mathematical Statistics with Applications* [M]. 10th ed. Honolulu: University of Hawaii Press, 2014: 10-28.
- [15] Cohen J. Cohen P. *Applied Multiple Regression/Correlation Analysis for Behavioral Sciences*[M]. Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates, 1983: 58.
- [16] Valenti S, Neri F, Cucchiarelli A. An Overview of Current Research on Automated Essay Grading[J]. *Journal of Information Technology Education*, 2003(2): 319-330.
- [17] 江进林. 中国学生英译汉机器评分模型的研究与构建[M]. 北京: 外语教学与研究出版社, 2010: 88-92.
- [18] 梁茂成. 中国学生英语作文自动评分模型的构建[M]. 北京: 外语教学与研究出版社, 2010: 28-32.
- [19] Suri L, McCoy K, De Cristofaro J. A methodology for extending focusing frameworks[J]. *Computational Linguistics*, 1999, 25(2): 173-194.
- [20] 洪明. 向心理论在英语写作质量评价中的应用[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2011: 40-48.

Automatic Evaluation of Local Coherence in Chinese EFL Learners' Essays with WordNet

LIU Guobing

(School of International Studies; The Corpus Research Center, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: We selected 80 essays with the same title and extracted the coherence predicting factors with WordNet; then we built an automatic local coherence evaluating model of learners' essays. The result of confirmatory test shows there is significant linear relation between the predicting scores by the evaluating model we built and the human-made scores.

Keywords: WordNet; learners' essays; local coherence; evaluating model

(上接第 129 页)

- [29] Rejon C R. Cytogenetics and molecular analysis of the multiple sex chromosome system of *Rumex acetosa* [J]. *Heredity*, 1994, 72: 209-215.

Establishment of DOP-PCR Amplification System for Microdissecting Single Chromosome in *Humulus japonicus*

QIN Ruiyun, LI Shuangshuang, LI Shufen, YUAN Jinhong, GAO Wujun, DENG Chuanliang

(College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China.)

Abstract: *Humulus japonicus* is dioecious plants with XX/X₁Y₂ sex chromosome system, which is one of model materials for studying sex chromosome evolution. In this study, the single chromosome of *Humulus japonicus* was microdissected and amplified from roots tip on mitosis metaphases. Then, the DOP-PCR products amplified from the single chromosome were labeled with Alexa Flour-488 by nick translation method and hybridized to the chromosomes of female *Humulus japonicus* plants. The fluorescence signals were distributed on all chromosomes. The results showed that the single chromosome of *Humulus japonicus* was successfully microdissected and amplified, which found a basis for microdissect the X or Y chromosome of *H. japonicus*.

Keywords: *Humulus japonicus*; single chromosome; microdissection; degenerate oligonucleotide primer-PCR