

荧光原位杂交在作物遗传育种研究中的应用

冯九焕 卢永根

(华南农业大学农学系, 广州, 510642)

摘要 荧光原位杂交 (FISH) 是一种原位杂交新技术, 具有快速、灵敏、准确和有效等特点, 它采用生物素标记探针, 能够将特定的 DNA 或 RNA 序列直接定位于染色体上。该文就荧光原位杂交技术在作物遗传育种研究中的应用进行综述, 主要包括以下方面: ① 检测重复 DNA 序列及多拷贝基因家族; ② 鉴定异源多倍体物种中的异源染色体或染色体片段; ③ 检测和定位低拷贝或单拷贝 DNA 序列。随着一些新技术的发展, FISH 技术将会在作物遗传育种的更多基础研究 and 应用研究领域起到越来越重要的作用。

关键词 荧光原位杂交; 原位杂交; 作物遗传育种

中图分类号 Q 343; S 33

荧光原位杂交 (fluorescence *in situ* hybridization, 简称 FISH) 技术, 是近年来发展起来的非放射性原位杂交技术, 它被广泛用于动、植物的细胞遗传学研究, 包括基因定位、RNA 定位、染色体鉴别和特定 DNA 或 RNA 片段检测等方面, 本文仅就 FISH 技术的特点及其在作物遗传育种研究中的应用进展进行综述

1 FISH 技术的特点

荧光原位杂交是指用生物素 (biotin) 等物质标记的核苷酸作探针, 与细胞学制片上的 DNA 或 RNA 片段进行杂交, 通过荧光免疫反应检测特异 DNA 或 RNA 序列在染色体上或在细胞内位置的一种新方法 (Langer et al, 1981)。

FISH 技术作为一种分子细胞学方法, 在显微镜下可直接观察、定位特异的 DNA 或 RNA 序列在染色体上的位置, 将显微镜的高度精确性和抗原抗体反应的高度灵敏性结合在一起。所以, 除了与放射性原位杂交同样具有灵敏度较高的特点外 (Gall et al, 1969), 还具有实验周期短, 标记探针可长期保存, 无放射性污染, 不需要特殊实验室等优点。正因为如此, FISH 技术日益受到重视, 迅速得到了应用。在应用的过程中, 方法上不断改进, 主要表现在两个方面: 一是在探针制备上, 已经能够采用各种探针去检测和定位染色体上不同类型的目的 DNA 序列, 包括高度重复 DNA 序列、低拷贝或单拷贝 DNA 序列以及总基因组 DNA。其中以总基因组 DNA 作探针的方法称为基因组原位杂交 (genome *in situ* hybridization, 简称 GISH) 技术。该法主要是直接以总基因组 DNA 酶切后制备探针, 不需要对特异探针进行鉴定、分离和克隆。这就使得对异源染色体及其片段的鉴定方便而有效。二是在检测方法上, 在原来用一种物质标记探针的基础上, 发展到用多种物质分别标记不同的探针, 如用 biotin 或 digoxigenin (洋地黄毒苷) 等分别标记不同的探针, 再让这些探针同时与同一染色体制片杂交, 然后用不同的荧光素 FITC 或 rhodamine (罗丹明) 进行检测, 这样就可

以在同一染色体制片上显示出不同颜色的探针杂交信号。这种方法称为多色荧光原位杂交 (multi-color FISH, 简称 McFISH)。这些方法上的改进和技术上的发展,使 FISH 技术在作物基因组分析、核酸序列定位研究中已成为一种非常有效的手段。

2 FISH 技术在作物遗传育种研究中的应用概况

2.1 高度或中度重复的 DNA 序列的鉴定

由于重复 DNA 序列的拷贝数多,探针杂交信号强,检测的灵敏度和准确性较高,所以 FISH 技术在鉴定这些高度重复序列方面较为成功。Rayburn 等 (1985) 最早将 FISH 技术应用于植物领域,他用一个来自黑麦的 120 bp 的重复序列作探针,检测该序列在小麦染色体上的分布情况。以后许多学者在不同作物上也开展类似的研究。Fukui 等 (1994) 和 Ohmido 等 (1995) 用 17S rDNA 作探针,对稻属 9 个种的 rDNA 位点进行 FISH 定位。结果表明,其中来自中国或日本的 3 个粳稻品种均具有 1 个 45S rDNA 位点,3 个籼稻品种和 3 个爪哇稻品种分别都有 2 个 45S rDNA 位点,而野生稻种则含有第 3 个位点,这个位点在栽培稻中不存在。Fukui 还结合三体材料作进一步分析,将籼稻中的两个 45S rDNA 位点具体定位于第 9 和第 10 染色体的末端。以上的结果与 RFLP 作图的结果是一致的 (Matsuura et al, 1991)。Wang 等 (1995) 在粳稻品种 Nipponbare 和籼稻品种 Kasalath 中,用来自 YAC (酵母人工染色体) 文库的特定的重复 DNA 序列作探针 (G1043) 进行 FISH 定位,并同时进行了 RFLP 作图分析,结果表明 RFLP 遗传图谱与 FISH 的物理图谱定位高度一致,并将该特定 DNA 序列定位于第 1 染色体的长臂近着丝点异染色质区。Vahedian 等 (1995) 在大豆中利用 FISH 技术对 SB92 卫星序列进行定位分析,检测该重复序列在染色体上的分布情况,对了解基因组的组成和来源以及物种的进化关系提供了有价值的参考。此外,一些学者在普通小麦 (Mukai et al, 1990; 1991)、大麦 (Leitch et al, 1992) 和玉米 (Aledo et al, 1995) 等作物中也利用 FISH 技术进行了重复 DNA 序列的定位研究。

2.2 异源染色体及其片段的鉴定

进行荧光原位杂交首要的是获得特定的探针,然而在目前情况下,制备含目的基因的 DNA 探针还有一定的困难。而基因组原位杂交 (GISH) 技术由于不需要对其中的某一特定序列进行分离和克隆,尤其是 GISH 和 McFISH 技术的结合,使得在多倍体物种中异源染色体及其片段的鉴定得到广泛应用。Schwarzacher 等 (1992) 利用几种不同的小麦近缘野生种的总基因组 DNA 作探针,同时用小麦的基因组 DNA 作封阻 DNA 进行荧光原位杂交,结果表明,凡含有探针序列的异染色质部分,显示了黄绿色荧光杂交信号,而小麦本身的染色体则由于 DAPI 和 propidium iodide (碘化丙锭) 对 DNA 的复染作用呈现桔红色,这种颜色上的不同,使小麦中所含的异源染色体直观地分辨出来。Mukai 等 (1993) 用总基因组 DNA 制备探针,采用 McFISH 方法鉴定普通小麦的 3 个不同基因组 (即 A B D 组) 的来源,他们采用 biotin 和 digoxigenin 相应地标记栽培一粒小麦 (AA) 及节节麦 (DD) 的总基因组 DNA,而对拟斯卑尔脱小麦 (小麦 B 组染色体的可能供体) 的总基因组 DNA 则不进行标记,然后用含有这 3 种基因组 DNA 的混合液与普通小麦染色体杂交。用不同荧光物质进行检测,结果在同一细胞内的不同染色体上分别显示了黄色、桔黄色和褐色荧光,对应于 A、D 和 B 组染色体,证实了异源多倍体小麦基因组的不同来源。此外,作者还在一个含有重双端体 (double ditelosomic) 小麦品系中检测到了一个 A 组和 B 组染色体相互易位,并显示出易

位断裂点的位置。Islam-Faridi 和 Mujeeb-Kazi (1995) 用黑麦的总基因组 DNA 作探针, 通过 FISH 技术鉴定了两个中国春小麦种质中含有二体黑麦附加系 (AABBDD+ 1R1R AABBDD+ 6R6R), 两个小麦/黑麦纯合的相互易位系 (1AL/1RS 或 1BL/1RS), 并显示了易位断裂点的位置。张辉和贾继增 (1996) 用 dig- II- dUTP 标记黑麦总 DNA 作探针检测了小黑麦和黑麦附加系中含有的黑麦染色体。

2.3 低拷贝或单拷贝 DNA 序列的鉴定

在植物方面, 目前探针的灵敏度还很难检测低拷贝或单拷贝 DNA 序列, 但已有一些报道 (Ambros et al, 1986; Mouras et al, 1987; Huang et al, 1988; Gustafson et al, 1990)。陈建民等 (1994) 利用普通小麦第 7 染色体上已经定位的部分 RFLP 标记作为探针进行物理学定位, 结果原位杂交信号出现于 7A、7B 和 7D 染色体上, 这与 RFLP 遗传图所示的顺序基本一致。Lehfer 等 (1993) 在端体三体 (telotrisomic) 和双端体四体 (ditelotetrasomic) 大麦品系中, 对低拷贝的大麦醇溶蛋白基因 (B-hordein) 进行 FISH 分析, 将该基因定位于染色体 1H 短臂远端, 这与遗传定位于短臂的 9P 远端区是一致的。以上报道采用的多是已知的探针, 然而实际上这类小的单拷贝序列探针制备困难, 且检测的可靠性低, 因此, 有的研究改用克隆于大的插入载体的基因组 DNA 为探针, 作为单拷贝基因作图的替代途径。如 Jiang 等 (1995) 详细报道了在籼稻品系 DV8 和 IR-BB21 (Xa2 的近等基因系) 中采用水稻 BAC (细菌人工染色体) 文库所进行的原位杂交分析, 该实验采用了 10 个不同的 BAC 克隆, 5 个与 Xa2 连锁的和 5 个随机克隆, 同时用水稻的基因组 DNA 作封阻以消除 BAC 克隆中重复 DNA 序列的影响。FISH 结合 McFISH 分析结果显示: 与 Xa2 紧密连锁的 3 个 BAC 克隆杂交信号, 位于染色体 1 的长臂中部, 其中的两个 BAC 克隆中期染色体信号相互重叠。这一结果与脉冲电场凝胶电泳 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) 结果相吻合。该实验说明了 FISH 技术对单拷贝 DNA 序列定位的可行性。

3 FISH 技术在作物遗传育种研究中的应用前景

根据 FISH 技术的特点及已有的研究结果可以看出, FISH 技术至少在以下几方面将得到更广泛的应用:

a. 基因及遗传标记的物理定位: 限制性片段长度多态性 (RFLP) 为构建作物的遗传图谱提供了非常有效的方法。水稻 (McCouch et al, 1988; Tanksley et al, 1989)、玉米 (Helentjaris et al, 1986)、大麦 (Graner et al, 1991; Heun et al, 1991) 和黑麦 (Wang et al, 1991) 等作物的 RFLP 遗传图已相继建立, 并且标记的数目日益增多。这种 cM 表示的遗传图距与 bp 表示的物理图距并不相同, 那么如何在遗传图谱与物理图谱之间建立起一个对应关系, 将遗传图中的标记直接定位于相应的染色体上, 构建出基因的物理图谱, 这是作物遗传育种的染色体操作实践的迫切需要。利用单拷贝的 DNA 片段或 RFLP 标记作为探针进行荧光原位杂交就可以获得 RFLP 标记在染色体上互补的物理学位置。因此 FISH 技术对遗传图谱和物理图谱的相互沟通将会起到重要的桥梁作用。

b. 进一步检测和定位大量的重复序列: 核酸复性动力学实验表明, 植物基因组包含大量的重复 DNA 序列 (Flavell et al, 1974)。而对有关重复序列在基因组中的结构与功能了解得还很少, 利用 FISH 技术分析重复序列在基因组中的分布, 将有助于了解植物染色体结构和基因组组成, 有助于阐明重复 DNA 序列的生物学意义。

c. 远缘杂交及染色体工程育种中检测异源染色体: 利用近缘野生种的优良基因, 丰富和扩大栽培品种的遗传信息量, 使之具有更高的产量、质量和抗性, 这是染色体工程育种的主要目标。因此, 通过染色体工程选育含有异源染色体或染色体片段的优良品种是一个重要的研究领域。而在这些工作中, 首要的是快速而准确地鉴别这些异源染色体或片段, FISH 尤其是 GISH 技术将会是最有效的鉴别手段之一。

d. 检测转基因结果: 在目前广泛开展的转基因育种研究中, FISH 技术提供了直观简便的鉴定方法, 它可以用该基因作探针, 直接检测所转基因是否存在于受体细胞核内, 是否整合到染色体上, 甚至整合在哪个染色体上等等。并且它可以用适当的 cDNA 制备探针, 检查目的 RNA 的存在, 并推测相应基因的转录和表达情况。

至于 FISH 技术在具体操作过程中存在的一些问题, 如特异探针制备和单拷贝序列检测灵敏度不高等, 相信随着一些新技术的发展将会逐步得到解决。如流式细胞术 (flow cytometry) (Arumuganathan et al, 1991; Dolezel et al, 1995) 和植物染色体的微切割 (microdissection) (Fukui et al, 1992) 等技术将有助于提高制备特异探针的效率; 高分辨率的显微镜和图像分析系统的结合, 将进一步提高检测的灵敏度。

可以预料, 今后 FISH 技术将会使细胞遗传学和分子遗传学密切结合起来, 在更多的基础研究和应用研究中起到越来越重要的作用。

参 考 文 献

- 陈建民, Gustafson J P. 1994. 普通小麦第 7 部分同源染色体组的物理学图谱. 江苏农学院学报, 15 (4): 1~ 9
- 张 辉, 贾继增. 1996. 用荧光原位杂交技术检测黑麦染色质. 中国农业科学, 29(2): 90~ 93
- Aledo R, Raz R, Monfort A, et al. 1995. Chromosome localization and characterization of a family of long interspersed repetitive DNA elements from the genus *Zea*. Theor Appl Genet, 90: 1094~ 1100
- Ambros P F, Matzke M A, Matzke A J M. 1986. Detection of a 17kb unique sequence (T-DNA) in plant chromosomes by *in situ* hybridization. Chromosoma, 94: 11~ 18
- Arumuganathan K, Slaterry J, Tanksley S D, et al. 1991. Preparation and flow cytometric analysis of metaphase chromosome of tomato. Theor Appl Genet, 82: 101~ 111
- Dolezel J, Lucetti S. 1995. High-resolution flow karyotyping and chromosome sorting in *Vicia faba* lines with standard and reconstructed karyotypes. Theor Appl Genet, 90: 797~ 802
- Flavell R B, Bennett M D, Smith J B, et al. 1974. Genome size and the proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants. Biochem Genet, 12: 257~ 269
- Fukui K, Minezawa M, Kamisugi Y, et al. 1992. Microdissection of plant chromosomes by argon ion laser beam. Theor Appl Genet, 84: 787~ 791
- Fukui K, Ohmido N, Khush G S. 1994. Variability in rDNA loci in the genus *Oryza* detected through fluorescence *in situ* hybridization. Theor Appl Genet, 87: 893~ 899
- Call J G, Pardue M L. 1969. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. Proc Natl Acad Sci USA, 63: 378~ 383
- Graner A, Jahoor A, Schondelmaier J, et al. 1991. Construction of an RFLP map of barley. Theor Appl Genet, 83: 250~ 256
- Gustafson J P, Butler E, McIntyre C L. 1990. Physical mapping of a low copy DNA sequence in rye (*Secale cereale* L.). Proc Natl Acad Sci USA, 87: 1899~ 1902

- Helentjaris T, Slocum M, Wright S, et al. 1986. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. *Theor Appl Genet*, 72: 761~ 769
- Heun M, Kennedy A E, Anderson J A, et al. 1991. Construction of a restriction fragment length polymorphism map for barley (*Hordeum vulgare*). *Genome*, 34: 437~ 447
- Huang P L, Hahlbrock K, Somssich I. 1988. Detection of a single-copy gene on plant chromosomes by *in situ* hybridization. *Mol Gen Genet*, 211: 143~ 147
- Islam-Faridi N, Mujeeb-Kazi A. 1995. Visualization of secale cereale DNA in wheat germ plasm by fluorescent *in situ* hybridization. *Theor Appl Genet*, 90: 595~ 600
- Jiang J M, Gill B S, Wang G L, et al. 1995. Metaphase and interphase fluorescence *in situ* hybridization mapping of the rice genome with bacterial artificial chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 4487~ 4491
- Langer P R, Waldrop A A, Ward D C. 1981. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides. Novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78: 6633~ 6637
- Lehner H, Busch W, Martin R, et al. 1993. Localization of the B-hordein locus on barley chromosomes using fluorescence *in situ* hybridization. *Chromosoma*, 102: 428~ 432
- Leitch I J, Heslop-Harris J S. 1992. Physical mapping of the 18S-5.8S-26S rRNA gene in barley by *in situ* hybridization. *Genome*, 35: 1013~ 1018
- Matsuura S, Yano M, Saito A. 1991. Location of two rDNA genes by linkage analysis in rice. *Rice Genetic Newsletter*, 8: 136~ 139
- McCouch S R, Kochert G, Yu Z H, et al. 1988. Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor Appl Genet*, 76: 815~ 829
- Mouras A, Saul M W, Essad S, et al. 1987. Localization by *in situ* hybridization of a low copy chromosomal resistance gene introduced into plants by direct gene transfer. *Mol Gen Genet*, 207: 204~ 209
- Mukai Y, Endo T R. 1990. Physical mapping of the 5S rRNA multigene family in common wheat. *J Hered*, 81: 290~ 295
- Mukai Y, Endo T R, Gill B S. 1991. Physical mapping of the 18S-26S rRNA multigene family in common wheat. Identification of a new locus. *Chromosoma*, 100: 71~ 78
- Mukai Y, Nakahara Y, Yamamoto M. 1993. Simultaneous discrimination of the three genome in hexaploid wheat by multicolor fluorescence *in situ* hybridization using total genomic and highly repeated DNA probes. *Genome*, 36: 489~ 494
- Ohmido N, Fukui K. 1995. Cytological studies of African cultivated rice, *Oryza glaberrima*. *Theor Appl Genet*, 91: 212~ 217
- Rayburn A L, Gill B S. 1985. Use of biotin-labelled probes to map specific DNA sequences on wheat chromosome. *J Hered*, 76: 78~ 81
- Schwarzacher T, Amamthawat-Jönsson K. 1992. Genomic *in situ* hybridization to identify a alien chromosome and chromosome segments in wheat. *Theor Appl Genet*, 84: 778~ 786
- Tanksley S D, McCouch S R, Yu Z H, et al. 1989. RFLP map of rice chromosomes. *Rice Genetics Newsletter*, 5: 128~ 130
- Vahedian M, Shi L, Zhu T, et al. 1995. Genomic organization and evolution of the soybean SB92 satellite sequence. *Plant Mol Biol*, 29: 857~ 862
- Wang Z X, Kurata N, Saji S, et al. 1995. A chromosome 5-specific repetitive DNA sequence in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 90: 907~ 913

Wang M L, Atkinson M D, Chinoy C N, et al. 1991. RFLP- based genetic map of rye (*Secale cereale* L.) chromosome 1R. Theor Appl Genet, 82: 174- 178

THE APPLICATION OF FLUORESCENCE *in situ* HYBRIDIZATION IN CROP GENETICS AND BREEDING RESEARCHES

Feng Jiahuan Lu Yonggen

(Dept. of Agronomy, South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH), characterized to be fast, sensitive, accurate and effective, is a new technique of *in situ* hybridization which can directly locate specific DNA or RNA sequence on chromosomes by using biotin labelling probes. This article summarized the application of fluorescence *in situ* hybridization in crop genetics and breeding researches, including: 1) screening repetitive DNA sequences and multicopy gene families; 2) identifying the alien chromosomes and chromosome segments in allopolyploids; 3) detecting and locating low or single copy DNA sequence. With some new techniques developed, the FISH method will play important roles in much more fields of basic and applied researches in crop genetics and breeding.

Key words fluorescence *in situ* hybridization (FISH); *in situ* hybridization (ISH); crop genetics and breeding