

整体荧光原位杂交用于检测水稻 特异 DNA 程序的研究^{*}

刘向东 卢永根

(华南农业大学植物分子育种研究中心, 广州, 510642)

摘要 文章报道了整体荧光原位杂交应用于检测水稻特异 DNA 的实验程序. 利用该实验方法, 以经地高辛(digoxin, DIG)标记的 rDNA 作为探针, 成功地在水稻根尖和花药内部组织检测到与探针互补的片段. 对于实验方法, 结果表明, 整体荧光原位杂交的成功与否受到多种因素的影响, 包括组织的种类、固定剂的种类以及固定后的处理方法(主要是酶解与否)等. 检测根尖 DNA 可以采用 φ (福尔马林)=1% 固定加上酶解; 检测花药(花粉发育处于单核期)DNA 也可以采用 φ (福尔马林)=1% 固定, 但无需酶解.

关键词 水稻; 整体荧光原位杂交(WFISH); rDNA 探针

中图分类号 Q 343; S 33

近年来, 荧光原位杂交被广泛应用于植物基因的表达、远缘杂交后代检测、基因转化检测和染色体物理图谱制作等研究(冯九焕等, 1997). 整体荧光原位杂交是从荧光原位杂交发展起来的又一种新技术, 其优点是无需经过切片或染色体制片, 只通过特殊的预处理, 让探针直接进入组织内, 与组织特定部位互补的 DNA 片段杂交, 借助荧光抗体的放大, 在共焦激光扫描显微镜下能观察到特异 DNA 片段所在的部位. 此方法用于研究特异基因的时空分布或表达具有独特的优越性. 整体荧光原位杂交技术应用于检测动物中特异 DNA 片段的研究已十分成功, 但植物由于存在细胞壁的障碍, 研究难度较大, 目前仅限于一些容易操作的模式植物, 如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)等(Bauwens et al, 1994). 本文采用 rDNA 作为标记探针, 研究利用整体荧光原位杂交技术检测水稻根尖和花药内部组织细胞中 rDNA 的实验程序, 目的是为进一步开展水稻其他特异基因时空表达研究提供方法的依据.

1 材料与方法

1.1 材料的固定

分别选催芽后长至 5 mm 左右的根尖, 以及花粉发育处于单核期和二核期的花药作为材料. 每种材料都采用 2 种不同固定剂固定: 一是 A 固定剂, 内含 φ (福尔马林)=1% 和 φ (二甲亚砷)=10%. 固定剂用 1.1×PBS/0.067 mol/L EGTA 固定缓冲液配制(pH 7.5); 二是 B 固定液, 内含 0.4 g/L 聚甲醛 + φ (二甲亚砷)=10% (PEMG 缓冲液配制, PEMG 内含 50 mmol/L Pipes, 5 mmol/L EGTA, 2 mmol/L MgSO₄ 和 φ (甘油)=4%, (pH 6.9). 固定时间分别为 A 固定液固定 25 min, B 固定液固定 45 min. 固定后各自分别进行 2 种处理: (1)用甲醇洗 2 次, 每次停

留 2 min, 接着用无水乙醇洗 4 次, 每次停留 2 min, 最后换新鲜的无水乙醇, 存放于 -20°C 冰箱中 4 d. (2) 用各自固定缓冲液洗 2 次, 每次 5 min, 吸去缓冲液加入酶液 [0.2 g/L 纤维毒酶 (cellulase R-10), 0.2 g/L 果胶酶 I (pectinase, SIGMA), 0.03 g/L 果胶酶 II (pectobyase, SIGMA), 0.03 g/L 胍胍质酶 (Nov 234), 固定缓冲液配制在 37°C 下酶解 45 min (摇动). 酶解后用相应固定缓冲液洗 3 次, 每次 3 min, 用与第一次固定相同的固定剂进行 2 次固定 25 min, 以后的处理同“(1)”的.

1.2 整体原位杂交

1.2.1 预处理 取出在 -20°C 下保存的材料, 吸去乙醇, 加新鲜纯乙醇洗 2 次, 每次 3 min, 加入适当体积 (依材料多少而定) 1:1 乙醇和二甲苯混合液, 静置 30 min, 分别用乙醇和甲醇各洗 2 次, 每次 3 min, 加入 1:1 甲醇和 PF [PBT + φ (福尔马林) = 1%, PBT: 1 \times PBS/ φ (Tween-20) = 0.1%], 放置 5 min, PF 固定 25 min, PBT 洗 5 次, 每次 2 min, 2 \times SSC 洗 3 次, 每次 5 min, 吸去 2 \times SSC, 加入 200 μL RNaseA (0.1 g/L, 用 2 \times SSC 配制) 在 37°C 下酶解 3 h (摇动), 酶解后 PBT 洗 3 次, 每次 5 min, 加入 200 μL 蛋白酶 K (40 g/L, PBT 配制) 在 37°C 下消化 15 min, PBT 洗 5 次, 每次 10 min, PF 后固定 25 min, PBT 洗 5 次, 每次 10 min, 加入 1:1 PBT 和杂交液 [用 20 \times SSC 配制, 其中含 φ (甲酰胺) = 50%, SSC 终浓度为 2 \times SSC] 混合液停留 10 min, 更换纯的杂交液 2 次, 每次停留 20 min. 以后取 3/4 的材料 (根尖与花药分开) 作为制备预吸收抗体用, 1/4 的材料作杂交用.

1.2.2 杂交 先配制 200 μL 杂交混合液 (100 μL 纯甲酰胺、40 μL 20 \times SSC、20 μL 用地高辛标记初质量浓度为 40 g/L 的探针和 40 μL 消毒蒸馏水). 探针标记采用缺口合成试剂盒的方法, 探针为 9 kb 的 PTA71 [由香港大学植物系蔡美丽博士提供, 探针性质详见 Gerlach 等 (1979)]. 将混匀的杂交液加入含有材料的离心管中, 混合后在沸水浴中变性 6 min, 变性后立即将离心管放到冰上 4 min. 转入 37°C 恒温水浴锅, 摇动保温 12 h, 静置 5~7 h. 以不加标记的探针作为对照.

1.2.3 杂交后冲洗 先用新鲜配制的杂交液在 37°C 恒温摇动 1 h, 再用杂交液洗 2~3 h, 其中每 30 min 换一次新鲜的杂交液. 之后按照不同比例 (3:1、1:1 和 1:3) 加入杂交液和 4 \times SSC 混合液洗, 每级停留 20 min, 最后用 4 \times SSC 洗 4 次, 每次 10 min.

1.2.4 检测 首先制备预吸收的抗地高辛 (Anti-DIG) 的抗体 (必须于杂交前制备, 根尖与花药分开制备). 制备方法是取以上留下的根尖或花药, 先用不同比例 (3:1、1:1 和 1:3) 的杂交液和 4 \times SSC 混合液洗 10 min, 最后一次用 4 \times SSC 洗 20 min, 洗后吸干 (但不要失水), 将材料放入干净的研钵, 加入液氮研磨, 研细后倒入适量的丙酮悬浮抽提, 静置 2 min 后吸取上清液放入蒸发皿中过夜, 待丙酮蒸发干后, 放入含 100 μL 抗地高辛抗体 (10 g/L, 用溶于 PBS 中的 0.5 g/L BSA 配制) 的离心管中, 混匀, 先在室温下放置 4 h, 每隔 30 min 混合 1 次, 之后放入 15°C 恒温箱中过夜, 第 2 d 吸取上清液即得预吸收的地高辛抗体.

将杂交后根尖和花药分别转入含各自预吸收抗地高辛抗体的离心管中, 混合, 先在室温下摇动 3 h, 后在 15°C 恒温下摇动 12 h, 最后在 15°C 下静置 6 h. 4 \times SSC [内含 φ (Tween-20) = 0.05%] 洗 4 次, 每次 20 min, 4 \times SSC/0.1 g/L BSA 洗 4 次, 每次 20 min. 加入 100 μL 抗羊结合有 FITC 的抗体 [anti-sheep FITC, 25 g/L, 用溶于 PBS 的 φ (兔抗原) = 5% 溶液配制], 保温、摇动和结合的时间同抗体 1 的 (即抗地高辛抗体). PBS 洗 4 次, 每次 60 min. 将材料夹出

用镊子将表皮撕开, 取里面的组织(目的是证实探针是否进入组织)放在凹面载玻片上, 滴上 25 μ L Vectashield/DAPI 包埋剂(0.1 μ g DAPI 溶于 1 mL Vectashield 中), 盖上盖玻片, 在共聚焦激光显微镜下观察. 图像处理在 Leica QFISH 系统中完成.

根尖细胞染色体的制备和原位杂交参照 Leitch 等(1996)的方法.

2 结果

2.1 非整体原位杂交检测 rDNA

为了验证所用探针的可靠性和 rDNA 在染色体以及间期核中的位置. 首先进行染色体和间期核制片的原位杂交. 染色体原位杂交结果如图版 1. 从图版 1 可以看出, rDNA 是多拷贝的重复序列, 位于 4 条染色体上. 这一结果与 Fukui 等(1994)的结果基本一致. 间期核原位杂交结果如图版 2. 图版 2 表明, rDNA 分散在核的不同部位, 每个核上至少有 2 个点. 以上结果说明本文采用的 rDNA 探针是可靠的.

2.2 DNA (rDNA)探针与 DNA (互补 DNA)整体原位杂交

首先观察不同固定剂对根尖和花药形态的影响, 结果表明, 2 种固定剂[φ (福尔马林)=1%和 0.4 g/L 聚甲醛]对根尖和花药形态的保持效果都较好, 说明采用这 2 种固定剂所得到原位杂交结果能真实反映 rDNA 片段所在的位置.

对采用 2 种不同固定剂以及配合酶解与否的原位杂交结果观察表明, 不同固定剂和酶解与否的不同组合对杂交成功与否存在影响. 采用 φ (福尔马林)=1%固定单核期花药, 不管有无酶解, 都可观察到杂交的荧光点(图版 3), 说明探针可进入花药并和细胞核内的 rDNA 互补杂交. 但对二核期的花药, 2 种处理(即酶解和无酶解)均未杂交成功. 利用 φ (福尔马林)=1%固定根尖, 只有固定后加上酶解才能观察到明显的杂交荧光点(图版 4), 固定后不酶解的则观察不到杂交荧光点. 采用 0.4 g/L 聚甲醛固定根尖和花药, 不管有无酶解均未观察到杂交荧光点, 说明聚甲醛固定可能不适用 DNA 与 DNA 的整体原位荧光杂交.

在 2 种固定剂所有的处理中, 凡是杂交时不加标记探针的, 不管是在花药还是根尖中均观察不到有杂交信号, 说明以上杂交结果是真实的.

3 结论

本研究说明整体荧光原位杂交技术可应用于检测水稻特异基因所在的部位. 至于实验方法, 本文的结果表明, 整体荧光原位杂交的成功与否受到多种因素的影响, 包括组织的种类、固定剂的种类以及固定后的处理方法等. 其中固定剂采用 φ (福尔马林)=1%, 酶解时间以 37 $^{\circ}$ C 1 h 左右为理想, 杂交后激烈摇动以增加渗透.

致谢 实验工作在香港大学植物系徐是雄教授实验室完成. Leica 公司赞助本文彩色图版的版面费.

参 考 文 献

冯九焕, 卢永根. 1997. 荧光原位杂交在作物遗传育种研究中的应用. 华南农业大学学报, 18(2): 111~116

- bridization of interphase nuclei on *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal, 6(1): 123 ~ 131
- 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
- Gerlach W L, Bedbrook J R. 1979. Cloning and characterization of ribosomal genes from wheat barley. Nucleic Acids Res, 7: 1 869 ~ 1 886
- Leitch I J, Kenton A Y, Parokony A S et al. 1996. Plant molecular biology—A laboratory manual. Berlin: Springer, 461 ~ 485

STUDY ON THE PROCEDURE OF WHOLE MOUNT FLUORESCENCE *IN SITU* HYBRIDIZATION FOR DETECTING SPECIFIC DNA IN RICE

Liu Xiangdong Lu Yonggen

(Plant Molecular Breeding Research Center, South China Agric. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

A procedure of whole mount fluorescence *in situ* hybridization (WFISH) for detecting specific DNA in rice was reported. The technique was demonstrated on root and anther of rice with rDNA as probe, labelled by DIG. It was found that the hybridization efficiency depended on the methods further used after fixation, types of tissue and of fixative. Fixation in 1% formalin plus enzyme digestion could yield excellent results of DNA; DNA in root tips. Fixation in 1% formalin (no need enzyme digestion) yielded the excellent results with respect to morphology and hybridization efficiency in rice anther.

Key words rice; whole mount fluorescence *in situ* hybridization (WFISH); rDNA

【责任编辑 李玲】