

利用原位杂交技术鉴定大麻花粉管导入材料的研究

张利国

(黑龙江省农业科学院 经济作物研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:应用基因组原位杂交(Genomic in situ hybridization, GISH)技术,采用花粉管通道法将亚麻黑亚 14 基因组导入大麻五常 40 并进行鉴定。结果表明:在减数分裂和有丝分裂时期通过分析所导入的 7 份材料的染色体状态,鉴定出成功导入的材料为 1 份。

关键词:大麻;原位杂交;花粉管通道

中图分类号:S563.3

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2010)08-0014-02

染色体原位杂交技术(GISH)是分子细胞遗传学建立的基础,具有其它分子生物学和细胞方法无法比拟的直观性和准确性,在检测外源渗入染色体或染色体片段上具有独特的优势^[1-2]。花粉管通道法就是利用开花植物授粉后形成的花粉管通道,直接导入外源 DNA,来转化尚不具备正常细胞壁的卵、合子或早期胚胎细胞,进而实现目的基因转移的技术。该技术由周光宇等人发明^[3],因其具有适用范围广、转化速度快、方法简便等诸多优点,而深受植物育种学家的青睐,已成为创造植物新品种的常用方法。为研究花粉管通道法的转化途径和转化机制,许多学者对外源 DNA 进行了跟踪观察,已初步揭示了花粉管通道法的转化途径。目前,研究者利用荧光原位杂交等技术,已能检测转移结果,如检查外源基因是否存在于受体细胞核内,是否整合于染色体上,整合在哪一条染色体上,以及外源基因是否表达等^[4-5]。

该研究以亚麻基因组采用花粉管通道法导入大麻的株系为材料,在减数分裂期以及体细胞染色体中期,采用基因组原位杂交技术鉴定导入材料。

1 材料与方法

1.1 材料

供试亚麻品种为黑亚 14,大麻品种为五常 40。2008 年采用花粉管导入法将黑亚 14 导入五常 40。2009 年经大田鉴定,获得形态变异明显的导入试验材料 7 份,并取其花药保存。

1.2 染色体制片

采用植物染色体去壁低渗法^[6]。种子用蒸馏水浸泡 24 h,在 25℃ 恒温保湿培养,等待根尖长

出 1 cm 左右,切取放入 1.5% 的对二氯苯溶液中,在 10℃ 条件下预处理 5 h,卡诺溶液固定 12 h,转入 70% 酒精中 4℃ 备用,制片前,将根尖置于双蒸水中低渗 20 min,用混合酶液(4% 纤维素酶与 1% 果胶酶)37℃ 处理 30 min,不染色,采用火焰干燥法制片,在相差显微镜下镜检,将分散良好清晰的染色体标本置于液氮中 15 min,用于原位杂交试验。

1.3 总基因组 DNA 的提取与探针的标记

采用常规 CTAB 法提取黑亚 14 和五常 40 基因组,通过切口平移方法进行标记。

1.4 原位杂交

载片在 60℃ 恒温箱中处理 3 h 或过夜,每张载片加 100 μ L Rnase,200 μ L 胃蛋白酶。在 4% 的多聚甲醛中放置 10 min,70% 乙醇和无水乙醇系列脱水,各 3 min,气干。按每张标本加 20 μ L 配置杂交液,在冰上制备,含封阻 DNA。将杂交混合液加在已变性的载片上(预热 37℃)。置于 80℃ 下共变性 6 min。将载片放入湿盒中,37℃ 下杂交过夜。

1.5 检测和观察

用洗液 1、洗液 2 依次冲洗,然后用蒸馏水快速冲洗,在每张载片上滴加 40 μ L DABCO 和 PI 的混合液,暗处保存 30 min;用蒸馏水冲洗干净,滴加 18 μ L 抗褪变剂。

Leica DM6000 荧光显微镜观察。FITC 和 PI 的荧光信号分别采用 B 激发滤光片和 G 激发滤光片组检测。将观察到的信号输入计算机数字化系统,用相应的计算机软件调节对比度和亮度,进行图像处理。

2 结果与分析

在荧光显微镜下,用 PI 反染的染色体呈红色荧光,地高辛 dUTP 标记的探针经用抗地高辛抗体-荧光剂 FITC 检测之后呈现出黄绿色。

使用亚麻探针与亚麻染色体杂交,亚麻染色体均呈现出黄绿色信号,而对照(杂交液中不含探

收稿日期:2010-05-27

基金项目:国家科技攻关资助项目(2005DKA21001-19-03);哈尔滨市科技局科技创新资助项目(2008RFXYN031)

作者简介:张利国(1978-),男,黑龙江省哈尔滨市人,硕士,研究实习生,从事麻类分子细胞遗传学方面的研究。E-mail:zlg86@yahoo.com.cn.

针)只有红色荧光,表明标记的探针是有效的。同时,使用亚麻探针与正常大麻染色体杂交,均只呈现出红色荧光信号,说明试验体系是稳定的。

对 7 份材料的花药进行染色体分析,发现其中 6 份材料的减数分裂行为正常,材料 08-67 出现了较多的减数分裂异常行为(微核、落后染色体、单价体、多价体、染色体桥、染色体断片等),比例达到了 7.3%,使用原位杂交技术做进一步检测,只有 08-67 出现了黄绿色信号(见图 1,图 2),同时,图 1 显示为减数分裂前期出现的提前分离染色体,图 2 显示出减数分裂中期出现了落后染色体,分析其原因,可能与亚麻 DNA 导入大麻染色体,造成部分大麻染色体错配有关。

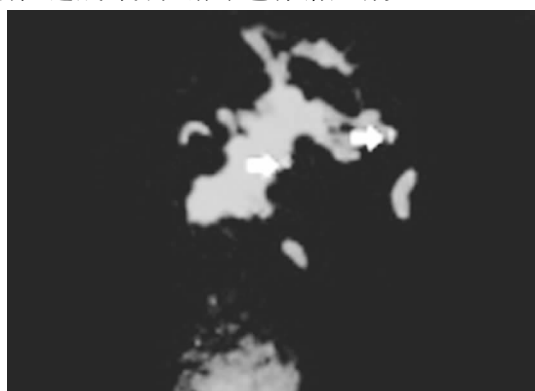


图 1 亚麻探针与减数分裂时期的大麻染色体杂交(染色体提前分离)

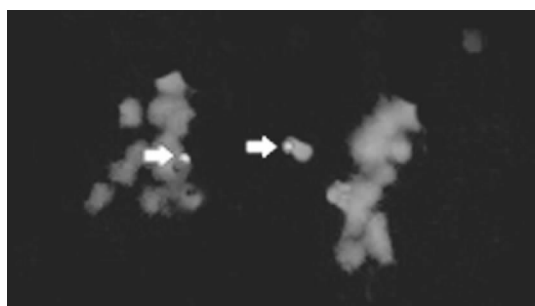


图 2 亚麻探针与减数分裂时期的大麻染色体杂交(染色体落后)

对 7 份材料的有丝分裂中期染色体进行分析,其中 6 份只显示红色荧光信号,只有 08-67 的 2 条染色体上出现了黄绿色信号(见图 3)。

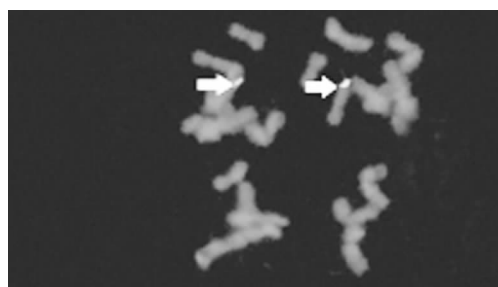


图 3 亚麻探针材料 08-67 的检测

3 结论与讨论

试验结果表明将亚麻黑亚 14DNA 导入大麻五常 40 的 7 份材料中,有 1 份材料含有亚麻的遗传物质,并且导入部位是染色体端部,这可能与大麻的基因多集中在染色体端部有关。

花粉管通道法以总 DNA 片段或重组 DNA 分子为源基因供体,该技术虽能引起后代发生变异,但最初由于对转化途径和整合机理都缺乏足够的认识,利用原位杂交进行 DNA 序列的定位具有试验周期短、灵敏度高、分辨率高、直观可见等优点,对研究花粉管通道法的整合位点和整合机理,提高转化效率上都将发挥重要作用。

染色体原位杂交,影响的因素较多,染色体制片是最重要的影响因素之一。制片时要保证染色体从细胞膜中分散出来并可以计数,以便去除残余细胞质和细胞壁对染色体的遮盖。此外,染色体长度及凝聚状态是影响原位杂交分辨率的又一重要因素,在决定原位杂交分辨率的因素中,最重要的是所使用的靶 DNA 在染色体或 DNA 纤维上的浓缩,今后研究重点之一就是如何进一步提高染色体的伸展程度。

参考文献:

- [1] Choi Y A, Tao R, Yonemori K, et al. Multi-color genomic in situ hybridization identifies parental chromosomes in somatic hybrids of *Diospyros kaki* and *D. glandulosa* [J]. Hort-Science, 2002, 37: 184-186.
- [2] 陈春丽, 郭文武, 邓秀新. 染色体原位杂交技术与植物体细胞杂种遗传鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2002, 21(2): 189-194.
- [3] Zhou G J, Weng Y Z. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos [J]. Methods Enzymol, 1983, 101: 433-442.
- [4] 洪义欢, 钱凯, 秦秋琳, 等. 东乡野生稻重复序列的克隆分析及染色体定位 [J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2006, 27(3): 56-61.
- [5] Santos A P, Wegel E, Allen G C, et al. In situ methods to localize transgenes and transcripts in interphase nuclei: a tool for transgenic plant research [J]. Plant Methods, 2006(2): 18.
- [6] 朱徽. 植物染色体及染色体技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1982.

Research of Identifying Transformed Hemp with Pollen Tube Pathway Method by GISH

ZHANG Li-guo

(Industrial Crops Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: The research identified 7 hemp materials which was transformed with pollen tube pathway by using GISH (Genomic in situ hybridization), and analysed chromosome behavior in period of meiosis and mitosis. The experiment successfully identified 1 hemp material by transforming, the research was very important for learning transformed position and transformed mechanism of tube pathway method and improving transformed efficiency.

Key words: hemp; GISH; pollen tube pathway