

原位杂交技术在植物遗传育种上的应用

吴刚 崔海瑞 夏英武

(浙江大学核农所诱变遗传育种中心 杭州 310029)

摘要 本文在简要介绍原位杂交技术的基础之上,重点介绍了该技术在植物遗传育种领域,即在(1)异源染色质及染色体畸变检测;(2)植物基因工程及基因表达研究;(3)构建植物基因物理图谱;(4)染色体RNA研究等方面的应用现状,并对原位杂交技术在提高检出率,与染色体显带技术结合,PCR-原位杂交等方面提了一些见解。

关键词 原位杂交,遗传育种

Application of *in Situ* Hybridization in Plant Genetics and Breeding

WU Gang CUI Hai-Rui XIA Ying-Wu

(Mutation Breeding and Genetics Center, Institute of Nuclear-Agricultural Science,
Zhejiang University, Hangzhou 310029)

Abstract A brief introduction to the *in situ* hybridization technique is followed by a review of its current application status in plant genetics and breeding: (1) monitoring of alien chromatin and chromosome distortion; (2) gene engineering and gene expression; (3) construction of plant DNA physical map; (4) study on chromosome RNA and some other fields. Opinions on the development of the *in situ* hybridization technique in the future, especially with respect to the improvement of resolution, combination of *in situ* hybridization with chromosome banding, and PCR *in situ* hybridization are put forward as well.

Key words *In situ* hybridization, Plant genetics and breeding

原位杂交技术(*in situ* hybridization)自 Gall 和 Pardue 及 John 等于 1969 年分别独自建立以来,在遗传学及分子生物学等研究领域发挥了极大的作用。近几年来,由于染色体显带技术、荧光标记技术、检测技术及电镜技术的发展和完善,原位杂交技术在生物学研究上展示了更加广阔的应用前景。本文就原位杂交技术的发展及在植物遗传育种上的应用作一个回顾。

1 原位杂交技术简介

1.1 同位素原位杂交技术

同位素原位杂交技术的基本原理是利用核酸分子碱基顺序配对的互补性,用同位素标记的外源核酸(探针)与染色体上经过变性后的 DNA(RNA)杂交,结合形成专一性的核酸杂交分子,用放射自显影方法显示其在染色体上的位置,即把各种具有特定碱基顺序的

基因在染色体上原位地确定下来。同位素原位杂交技术的基本操作程序如下:体细胞或小孢子母细胞→固定(乙醇:乙酸=3:1)→压片(鉴别合适分裂期)→DNA-DNA(RNA-RNA, RNA-DNA)杂交→洗脱液洗脱→涂感光乳剂(暗箱中感光)→显影、定影→Giemsa 染料染色观察。随着酶学技术的发展和运用,人们普遍使用纤维素酶及果胶酶先获得原生质体,而后再进行原位杂交。同位素原位杂交技术自 1969 年建立以来,在现代生物学研究中发挥了重要的作用。由于它所用的放射性探针敏感性强,对于单拷贝 DNA 序列的检测非常有用(McNeil 等,1991),但由于其实验周期较长,乳胶层上的同位素信号只能产生有限的分辨率,而且需要记录和统计分析大量处于分裂中期细胞的银颗粒,这些缺点限制了同位素原位杂交技术的广泛应用(Jiang 等,1994)。随着荧光原位杂交技术的出现、完善和发展,同位素原位杂交技术的缺点逐渐被克服。

1.2 荧光原位杂交技术(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)

荧光原位杂交技术是 80 年代才发展起来的一种非放射性原位杂交技术。它的基本原理是将 DNA 探针用生物素、毛地黄毒苷等荧光染料标记,然后将标记的探针直接原位杂交到染色体上或 DNA 纤维切片上,再用与荧光素分子藕联的单克隆抗体与探针分子特异结合来检测 DNA 序列在染色体上或 DNA 纤维上的定位。荧光原位杂交技术操作程序与同位素原位杂交技术基本相同(除放射自显影步骤)。FISH 技术除了实验周期短,检测灵敏度高优点以外,还由于它可以用不同修饰核苷酸分子标记不同的 DNA 探针,再用不同的荧光素分子检测不同的探针分子,因此可以在荧光显微镜下在同一张切片上同时观察几种 DNA 探针的定位,直接得到它们的相关位置和顺序。目前,FISH 技术已得到了广泛的应用。

2 原位杂交技术在植物遗传育种上的应用

2.1 异源染色质及多种染色体畸变检测

通过远缘杂交把有用基因的异源染色质渐渗到植物中,这对植物育种是一个很有价值的方法。如带有几种抗病基因的黑麦 1R 染色体已被整合到许多高产的小麦品种中(Raaiaram 等,1983)。要知道外源基因的有效转移与否极大地依赖于对外源染色体(质)的准确鉴定,而原位杂交技术则是鉴定外源染色体(质)的有效手段。

在国内,利用 FISH 技术对宁麦 8026 和 Apollo 易位系(钟少斌等,1997),八倍体小黑麦附加系(张辉等,1996),抗白粉病小麦品系 GN22(硬粒小麦×簇毛麦)代换系(马渐新等,1997)等进行了广泛的研究,有效地对异源染色质进行了鉴定。

染色体显带和原位杂交技术相结合能够正确估计所加入的异染色体片段的大小和缺失的染色体片段。Jiang 等人(1993)采用改进的 N 显带技术和 ISH (*in situ* hybridization) 技术(用 18s、26s 核糖体基因作为探针)及 N 显带-GISH(genomic *in situ* hybridization)技术均取得了较高的分辨率,证实了最小的 18s、26s-核糖体基因簇位于中国春小麦(CS)的 7D 染色体上,同时他们结合 C-显带和 GISH 技术,定位了小麦-黑麦易位系中的断裂点和特殊的染色体。显带技术和基因组原位杂交技术在植物方面的应用国外报道较少(Jiang, 1994)。在国内,钟少斌等人(1997)首次采用 C-显带和 GISH 技术结合来检测小麦背景中的簇毛麦染色体,证明 94009-5-4 株系中含簇毛麦的 2V、3V 和 4V 染色体。这种在同一个细胞样本

上把染色体显带分析与 DNA 原位杂交技术结合起来的方法大大提高了麦类作物远缘杂种异源染色体检测的准确性和可靠性。特别是由于 C-显带技术是在植物上应用最广泛的显带技术(Gill, 1988),因此 C-显带技术和 FISH 技术结合将在染色体结构和功能的细胞遗传和分子分析上得到广泛的应用。

近年来,随着 BAC(bacterial artificial chromosome)及 YAC(yeast artificial chromosome)文库的建立,BAC 及 YAC 结合 FISH 技术得到了广泛的应用。对某染色体特定的 BAC 及 YAC 克隆能从文库中分离出来并作为染色体专一的 FISH 标记,采用这些探针结合多彩色 FISH 技术,能同时检测染色体结构和数目畸变,尤其是检测染色体复杂易位、微小缺失以及检测间期细胞和单倍体细胞的染色体断裂、非整倍体和超二倍体发生,同时能对相近物种的染色体结构作出分析。这方面的研究已取得了许多新发现。

2.2 在植物基因工程及基因表达研究上的应用

用根癌农杆菌(发根农杆菌)进行细胞转化时,部分 T-DNA 转移到细胞中并和细胞基因稳定结合(Tomashow 等,1980;De Vos 等,1981)。转化过程中的大部分的研究都集中在转化因子上(De Vos 等,1981)或者集中在转化细胞的生理变化上(Wullems 等,1981b; Yang 等,1981)。然而,对转化过程如何发生,特别是 T-DNA 如何整合,T-DNA 的整合位置等一系列问题都没有得到很好的验证(Mouras 等,1989)。对于真核细胞基因的表达和调控机理的了解需要确定这些基因在基因组中的位置。近几年来,转基因技术突飞猛进,通过转化对植物进行遗传改良对基础和应用研究具有极大的价值和广阔的前景。然而,由于转基因表达的不稳定性(基因沉默和基因失活)极大地阻碍了遗传转化系统的应用。因此,对插入基因表达稳定性的影响因子的研究显得十分重要。转基因表达的一个重要影响因素就是位置效应,即转基因在受体细胞基因组中的位置。目前可以利用 Southern Blot 来研究位置效应,同时也可以利用原位杂交技术来确定转基因在基因组中的物理位置来研究位置效应。

Ambros 等人(1986)采用原位杂交技术研究了转基因还阳参(*Crepis capillaris*)中的 RiT-DNA 的插入位点的分布,发现 RiT-DNA 插入点在 4 株独立转化植株的 3 条染色体上随机分布。Wang 等(1995)用原位杂交技术研究转基因矮牵牛植物中 T-DNA 的插入时发现 T-DNA 在染色体上的整合是随机的,每一条染色体都可能成为 T-DNA 插入的靶染色体,但大部分整合插入位点位于端粒区域附近。近来,Fransz 等(1996)采用 FISH 和冷却 CCD 相机把 T-DNA 定位于转基因矮牵牛染色体上。Brich 和 Franks(1991)用原位杂交技术证实整合到基因组前质粒 DNA 通常被切割成几个片段,质粒的一个或几个拷贝或者质粒的部分片段被串联地插入到相同位点。因此,用 Southern Blot 很难得到确切的拷贝数(Pederden 等,1997)。Pederden 等(1997)用 GAA-卫星序列、rDNA 和 FISH 技术定位了转基因在转基因大麦、转基因小麦和转基因小黑麦染色体上的位置,确定了含转基因的染色体,同时研究了整合的形式,找到了优先的整合位点,即整合趋向于染色体的远端区域。Victor 等人(1997)通过原位杂交发现:能稳定表达的转基因位于染色体端粒附近,而不能稳定表达的转基因位于染色体中间或同臂内异染色质区域。

转基因的染色体定位十分重要。它能研究插入基因的染色体位点与插入基因的稳定表达、遗传之间的相关性。另外,转基因染色体定位还与转座子转化、用于转座子标记的

植株的产生有关。原位杂交定位对于具有定位在固定区域的转座子株系的筛选是很有价值的方法。

2.3 在构建植物基因物理图谱上的应用

DNA 序列在染色体上的定位和分子图谱的构建是克隆目的基因的基础。FISH 技术能直接完成基因在染色体上的定位,所以它对基于图谱的基因克隆意义重大。通常人们通过对 DNA 分子标记,如 RFLP、RAPD、ALFP 等的遗传分析,从中找出不同 DNA 序列之间的连锁遗传关系和相关位置。这种分析方法的准确性与图谱的分辨率水平将取决于染色体减数分裂时 DNA 的重组率。由于重组率在染色体上的不均匀分布,造成了两个分子之间的遗传距离(genetic distance)与真实的物理距离(physical distance)发生偏差。而 FISH 能直接反映基因在特定染色体上的真实位置,能有效克服以上缺点,尤其是多彩色 FISH 技术的发展,简化了基因物理图谱的绘制,可以直接确定空间位置紧密连锁的探针顺序,已成为一种最直接分析 DNA 序列在染色体或 DNA 分子上排列的分子细胞学技术,已被广泛地应用于动植物基因结构(genomic organization)的研究和 DNA 分子物理图谱(physical map)的构建。目前,FISH 技术在对重复 DNA 序列和多拷贝基因组及低或单拷贝序列的染色体作图已取得成功(Jiang, 1994)。今后,FISH 技术和现有的分子生物学技术相结合,将加速大范围 DNA 物理图谱的构建以及分离和克隆目的基因的进程,进而达到植物遗传转化,改良植物性状的目的。

2.4 在染色体 RNA 研究上的应用

染色体的主要成分是 DNA、组蛋白、非组蛋白和 RNA。对这些物质在染色体中的分布进行精确定位是研究染色体的高级结构和构建染色体模型的关键所在。人们对染色 DNA 和蛋白质的研究已比较深入,但对染色体中 RNA 的研究,尤其是对染色体中 RNA 的性质、种类、来源、分布特点以及它们的生物学功能缺乏深入的研究。

宋林生等(1996)用生物素标记的玉米 18s rRNA、小麦 5s rRNA 及 tRNA 的 cDNA 作为探针,利用原位杂交证实玉米染色体中既有来自核仁的 rRNA 或其前体,又含有来自核基质的 rRNA、5s rRNA 或 hnRNA,从而阐明了染色体中 RNA 的种类、染色体 RNA 的来源。对 RNA 在染色体中的生物学功能进行深入研究将对染色体的结构有更加全面的认识,也将弥补染色体结构研究中的薄弱环节,达到丰富细胞遗传学内容的目的。

2.5 在其它方面的应用

原位杂交技术已在高度重复序列(Bedrook 等, 1980)、中度重复序列(Rayburn 等, 1985)、单拷贝序列(Rayburn 等, 1987)作探针的杂交中取得成功。这就为物种的起源和进化、基因表达行为的揭示以及基因组进化、结构、组成和空间排列的研究提供了新的途径。在植物系统进化和亲缘关系研究中,King 等(1993)利用 GISH 技术发现小麦 A、B 基因组间比 Eb 基因组关系更近。在对属间杂交(Leich 等, 1991)、种交杂交(Anantgawat 等, 1993)的杂种细胞的 GISH 研究表明:不同种的染色体在杂种细胞中是呈区域性分布的,而非随机混合分布。此外,RNA:RNA 原位杂交技术已用于许多植物的发育研究中,在检测基因的空间和瞬时表达上也起了巨大的作用(姚景侠等, 1991)。

3 原位杂交技术展望

3.1 提高原位杂交技术的检出率

原位杂交技术将来发展的重要任务是提高检出率。目前在植物上探针的灵敏度已很容易检测多拷贝序列和高度重复序列,但对低重复序列则很难检测。这将极大限制原位杂交技术的广泛应用。将来主要应对以下几方面开展研究:(1)更好地研究去除植物细胞壁和细胞质碎片的方法;(2)选择更佳的细胞分裂期;(3)对杂交过程中的各种条件进行优化;(4)开展探针标记技术的研究,提高探针灵敏度,同时完善信号检测技术,采用级联放大的酶联抗原抗体反应等技术来提高检测灵敏度;(5)完善利用单拷贝、短片段探针的原位杂交技术。

3.2 原位杂交技术和显带技术的结合

原位杂交技术和显带技术相结合,可以更加精确地定位目的基因,可将靶序列定位到染色体的特定区段。人类和动物遗传学研究中同步 C-显带、N-显带、G-显带、Q-显带、重复显带和原位杂交技术已较为成熟,但在植物中应用较少(McNeil 等,1991),只有 C-显带、N-显带和原位杂交技术结合使用的成功报道(Jiang, 1994; 任南等,1997)。

通过发展染色体显带原位杂交技术,将为基因图谱的基因克隆、显微切割和构建微基因组 DNA 文库创造有利条件,促进它们的发展。

3.3 发展 PCR-原位杂交技术

为了高频率地检测低于几个 kb 单拷贝的 DNA 序列,可以采用在原位杂交前对靶 DNA 进行 PCR 扩增或直接用标记的核苷酸进行原位 PCR 扩增。这种技术在人类和动物染色体中已开始应用(Gosden 等,1993; Troyer 等,1994);然而,至今为止,在植物上很少有染色体上进行原位 PCR 的报道,而且所报道的原位 PCR 杂交质量并不高(Zhu 等,1995)。对植物原位 PCR 开展研究将极大地完善和促进原位杂交技术在植物上的应用。

3.4 用原位杂交技术对遗传连锁关系进行细胞遗传学鉴定

对遗传连锁和个别染色体间关系的遗传学鉴定是分子细胞遗传学的重要任务。以前常通过对非整倍体的分析把某条染色体划到特殊的连锁群。然而,非整倍体原种很难保持并且每一种植物不一定都能产生三体。用原位杂交技术能有效地对遗传连锁和个别染色体间的关系进行遗传学鉴定。对特殊的连锁群专一的 DNA 序列可以转化为原位杂交标记,以便细胞遗传学鉴定,而原位杂交标记则可以从 YAC(yeast artificial chromosome)和 BAC(bacterial artificial chromosome)文库中筛选出来。显带技术和原位杂交技术可用来定位染色体上的标记,这将对相近种的染色体结构修饰和进化分析起到巨大的作用(Jiang 等,1994)。

参 考 文 献

- 马渐新等,1997.遗传学报,24(5):447~452
任南等,1997.遗传,19(5):1~4
宋林生,等,1996.植物学报,38(2):89~94
张辉等,1996.中国农业科学,29(2):90~93
姚景侠等,1991.植物染色体核酸原位杂交,江苏省农科院遗传生理所,第20~30页

- 钟少斌等, 1997. 中国农业科学, **30**(1):33 ~ 37
- Ambros P F et al, 1986. *EMBO J*, **5**:2073 ~ 2077
- Anantgawat J K et al, 1993. *J. Heredity*, **84**:78
- Bedbrook J M et al, 1980. *Nature*, **288**:133 ~ 137
- De Vos G et al, 1981. *Plasmid*, **6**:243 ~ 253
- Franz P F et al, 1996. *Plant J*, **9**:767 ~ 774
- Gill B S et al, 1988. *Genet. Symp*, **18**:299 ~ 321
- Gosden J et al, 1993. *Biotechniques*, **15**:78 ~ 80
- Heiskanen M et al, 1996. *Trends in Genetics*, **12**:379 ~ 382
- Jiang J et al, 1994. *Genome*, **37**:717 ~ 725
- King I P et al, 1993. *Heredity*, **71**:369
- Leich A R et al, 1991. *Chromosoma*, **101**:2206
- McMeil J A et al, 1991. *Genet Anal Tech Appl*, **8**:41 ~ 58
- Mouras A et al, 1989. *Theor Appl Genet*, **78**:715 ~ 720
- Pedersen C et al, 1997. *Theor Appl Genet*, **94**:749 ~ 757
- Rajaram S et al, 1983. *Proc Int Wheat Genet Symp*, 6th, pp. 613 ~ 621
- Rayburn A L et al, 1985. *J Heredity*, **76**:78 ~ 81
- Rayburn A L et al, 1987. *Ameri J Bot*, **74**:574 ~ 580
- Tomashow M F et al, 1980. *Cell*, **19**:729 ~ 739
- Troyer D L et al, 1994. *Cytogenet Cell Genet*, **67**:199 ~ 204
- Victor A I et al, 1997. *The Plant Cell*, **9**:1251 ~ 1264
- Wang J et al, 1995. *Transgenic Research*, **4**:241 ~ 246
- Wullems G J et al, 1981b. *Cell*, **24**:719 ~ 727
- Yang F et al, 1981. *Proc Natl Acad Sci, USA*, **78**:4151 ~ 4155
- Zhu T et al, 1995. *Plant Mol Bio. Rep*, **13**:270 ~ 277

(上接第 635 页)

- Allersheim P, Darvill A G, 1985. *Sci Amer*, **253**: 44 ~ 50
- Altamura M M, Pasqua G, Monacelli B, 1986. *Plant Sci*, **46**: 69 ~ 75
- Altamura M M et al, 1992. *Physiol Plant*, **84**(4): 555 ~ 560
- Altamura M M, 1989. *Physiol Plant*, **76**: 233 ~ 239
- Apelbaum A, Canellakis Z N, Applewhite, 1988. *Plant physiol*, **88**: 996 ~ 998
- Becher T, Haberland G, Koop H, 1992. *Plant Cell Rep*, **11**:39 ~ 43
- Chen H, Xu G, Loaschke D et al, 1995. *Plant Cell Rep*, **14**:393 ~ 397
- Chen Z, Zhuge Q, Sundqvist C, 1995. *Plant Cell Rep*, **14**: 354 ~ 358
- Flores H F et al, 1990. In: Recent Advances in Phytochemistry, Plant nitrogen, Jonathan E (eds). New York: Leonus Plenum Press, pp 328
- Gregory D M, Rowan A, Hugh S M, 1995. *Biotechnology*, **13** (May):486 ~ 492
- Meeks-Wagner D R et al, 1989. *Plant cell*, **1**: 25
- Morgan D C, Mergan C B, In Vince Prue D et al (eds), 1984. Light and the Flowering Process. Academic Press. London. pp 227
- Okole B N, Schulz F A, 1997. *Plant Cell Rep*, **16**: 339 ~ 343
- Okole B N, Schulz F A, 1996. *Plant Science*, **116**:185 ~ 195
- Simmonds D H, Setterfield G, 1986. *Planta*, **167**: 460 ~ 468
- Torrigiani P, Altamura M M, 1993. *J Plant Physiol*, **142**(1):81 ~ 87
- Tran T V, 1980. In: Indra k, Vasil (ed). International Review of Cytology, Supplement 11A, Academic Press, pp 175 ~ 194
- Tran T V et al, 1985. *Nature*, **314**: 615
- Van den Ende G et al, 1984. *Physiol Plant*, **62**:83 ~ 88
- Wernike W, Brettel R, 1980. *Nature*, **287**:138 ~ 139
- Wernike W, Milkovits L, 1984. *Plant Physiol*, **115**: 49 ~ 58