

• 药材与资源 •

菰蓝 rDNA 及端粒多色荧光原位杂交分析

杨 飞¹, 李立家^{2*}

1. 长江大学医学院 分子生物学部, 湖北 荆州 434023

2. 武汉大学生命科学院, 植物发育生物学教育部重点实验室, 湖北 武汉 430072

摘要: 目的 对菰蓝 45S rDNA、5S rDNA 和端粒进行物理定位, 并分析其核型。方法 使用多色荧光原位杂交技术(FISH)进行定位。结果 菰蓝基因组有一对 45S rDNA 位点位于 4 号染色体, 一对 5S rDNA 位点位于 5 号染色体, 14 对端粒信号位于染色体两端; 核型公式为 $2n=2x=14=10m(2SAT)+4sm$, 属 2A 核型。结论 为菰蓝核型分析、分子细胞遗传图谱构建提供了稳定、有效的细胞学标记。

关键词: 菰蓝; rDNA; 端粒; 荧光原位杂交; 核型

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)05-0972-04

Multicolor fluorescence *in situ* hybridization analysis on rDNA and telomere of *Isatis indigotica*YANG Fei¹, LI Li-jia²

1. Department of Molecular Biology, College of Medicine, Yangtze University, Jingzhou 434023, China

2. Key Laboratory of the MOE for Plant Developmental Biology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China

Abstract: Objective To investigate the physical location of 45S, 5S rDNA, and telomere sequences and analyze the karyotype of the metaphase chromosomes of *Isatis indigotica*. **Methods** Multicolor fluorescence *in situ* hybridization (FISH) approach was used to detect the physical location of the above sequences. **Results** One pair of 45S rDNA sites located on chromosome 4, one pair of 5S rDNA sites located on chromosome 5 and 14 pairs of telomere sites located at the ends of each chromosome in *I. indigotica* were detected. The karyotype formula is $2n=2x=14=10m(2SAT)+4sm$, which belongs to 2A karyotype. **Conclusion** This research provides effective cytological markers for karyotype analysis and construction of a molecular cytogenetic map of *I. indigotica*.

Key words: *Isatis indigotica* Fort.; rDNA; telomere; fluorescence *in situ* hybridization (FISH); karyotype

菰蓝 *Isatis indigotica* Fort. 是十字花科菰蓝属植物, 在我国南北方各地都有大宗栽培^[1-2]。菰蓝干燥的叶入药为大青叶, 根入药为板蓝根^[3]。板蓝根和大青叶的药效基本相同, 具有清热解毒^[4]、凉血利咽的功效, 临床用于防治流感、腮腺炎、急性传染性肝炎、伤寒及上呼吸道感染等^[5]。菰蓝还有提高免疫细胞功能^[6]、抗柯萨奇病毒^[7]、腺病毒^[8]的作用。国内外对菰蓝的研究主要集中在药理活性^[9]、制剂工艺^[3]、GAP 种植^[10]以及临床应用^[5]等方面。

关于菰蓝细胞学的研究存在分歧^[11-13], 这可能

是因为菰蓝染色体微小、差异不显著, 不利于染色体识别导致的。而菰蓝多倍体的育种及比较基因组学需要对其细胞学进行深入地研究。随着分子细胞遗传学技术的进步, 荧光原位杂交 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 被广泛应用于染色体识别和分析^[14]。为了深入研究菰蓝的分子细胞学特征, 本研究以 45S rDNA、5S rDNA 和端粒序列为探针, 对菰蓝有丝分裂中期染色体进行荧光原位杂交实验, 建立菰蓝荧光染色体核型。本研究不仅是对菰蓝传统核型分析的重要补充, 也为菰蓝分子细胞遗

收稿日期: 2010-12-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30821064); 湖北省教育厅科学研究项目 (Q20111307)

作者简介: 杨 飞 (1980—), 女, 博士, 讲师, 从事分子细胞遗传学研究。E-mail: yfwhu@163.com

*通讯作者 李立家 Tel: (027)68754505 E-mail: ljli@whu.edu.cn

传图谱的构建提供了必要依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验所用菰蓝 *Isatis indigotica* Fort. 种子采集自长江大学农学院农场, 由长江大学农学院徐延浩博士鉴定。

1.2 方法

1.2.1 染色体的制备 染色体制片按徐延浩等^[14]的方法稍加改进。菰蓝种子 25 °C 浸泡 4 h 后, 放入两层滤纸的培养皿中, 25 °C 蔽光培养 48 h。取生长旺盛的根尖, 用饱和 α -溴萘水溶液 25 °C 处理 4 h, 水洗 3 次, 用新鲜卡诺固定液(乙醇-冰醋酸, 3:1)固定过夜。用 2% 纤维素酶和 2% 果胶酶 28 °C 酶解 1 h, 采用火焰干燥法制片, -20 °C 保存备用。

1.2.2 探针标记 45S rDNA 和 5S rDNA 序列来源于番茄。碱裂解法提取 45S rDNA 和 5S rDNA 质粒。端粒序列按照 Li 等^[15]方法进行克隆。通过切口平移的方法, 用生物素-dUTP 标记 45S rDNA 序列, 用地高辛-dUTP 标记 5S rDNA 和端粒序列。

1.2.3 原位杂交及检测 染色体原位杂交按徐延浩等^[14]的方法, 每张片子 40 μ L 杂交液, 含 50% 去离子甲酰胺(Sigma)和 10% 硫酸葡聚糖(Sigma), 2 $\times$ SSC, 100 ng/ μ L 鲑鱼精 DNA, 用 22 mm $\times$ 22 mm 的盖玻片制片, 80 °C 共变性 3 min, 于保湿皿中 37 °C 杂交 12~48 h。2 $\times$ SSC 在室温及 37 °C 各洗 10 min, 1 $\times$ PBS 室温洗 1 次, 加入抗体, 37 °C 下温育 30 min, 再用 1 $\times$ PBS 室温洗 3 次, 每次 5 min。

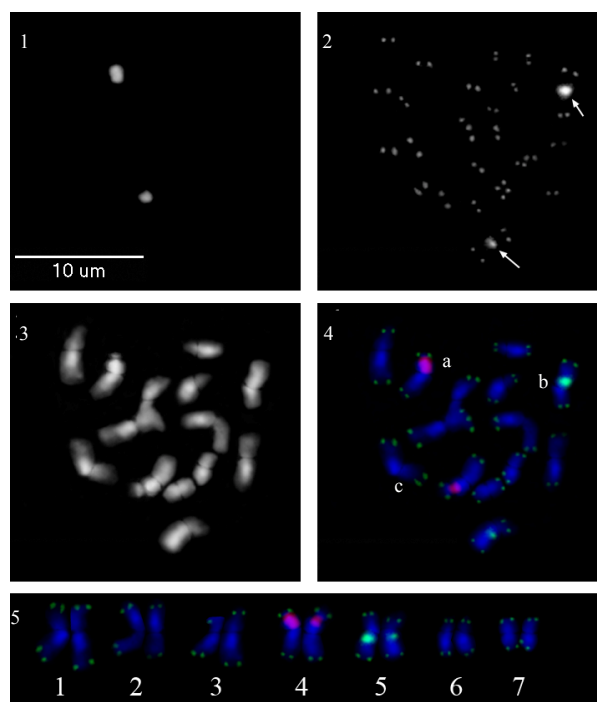
1.2.4 图像检测及分析 染色体制片用 5% DAPI (4', 6-二脒基-2-苯基吡啶) 复染, 加抗淬灭剂 Vectorshield (Vector Lab), 用显微镜观察荧光原位杂交信号, 用 Photometrics SenSys CCD (charge coupled device) 1400E 照相装置和 Metamorph 4.6.3 (Universal Imaging Crop.) 软件获取图像, Photoshop 7.0.1 软件进行图像分析。

1.2.5 染色体核型分析方法 染色体类型划分和核型分析参照文献中的标准^[16]。采用 Metamorph 4.6.3 测量染色体相对长度, 相对长度系数(染色体长度/全组染色体平均长度)参照 Kuo 等^[17]的方法和标准。核型分类按照 Stebbins^[18]的核型分类标准划分。核型不对称系数为长臂总长占全组染色体总长比例, 比值愈大愈不对称。

2 结果

2.1 rDNA 及端粒序列的定位结果

生物素-dUTP 标记的 45S rDNA 与菰蓝有丝分裂中期染色体荧光原位信号见图 1-A, 在合成图中为红色信号(图 1-D-a)。地高辛-dUTP 标记的 5S rDNA 及端粒与菰蓝有丝分裂中期染色体荧光原位信号见图 1-B, 其中箭头所示的为 5S rDNA 信号, 其他为端粒信号; 5S rDNA 及端粒在合成图中为绿色信号(图 1-D-b)。DAPI 染色的菰蓝有丝分裂中期染色体见图 1-C, 在合成图中为蓝色信号(图 1-D-c)。在检测的 100 多个菰蓝有丝分裂中期相中, 95% 以上的分裂相有 1 对 45S rDNA, 1 对 5S rDNA



A-45S rDNA 杂交信号; B-5S rDNA 及端粒杂交信号, 箭头所示为 5S rDNA 信号; C-DAPI 复染的中期染色体; D-45S rDNA (a 红色)、5S rDNA 及端粒 (b 绿色) 与 DAPI 复染的中期染色体 (c 蓝色) 的合成图; E-将图 A~D 中的菰蓝染色体通过核型分析后得到的菰蓝染色体核型图, 45S rDNA 定位在 4 号染色体上, 5S rDNA 定位在 5 号染色体上, 端粒信号定位在染色体端部

A-signals of 45S rDNA; B-signals of 5S rDNA and telomere, the arrows showed signals of 5S rDNA; C-DAPI counterstained metaphase chromosomes; D-A merged image the 45S rDNA (a red), 5S rDNA and telomere (b green), and DAPI counterstained metaphase chromosomes (c blue); E-The Karyotype of *I. indigotica*, the 45S rDNA was located on the chromosome 4, the 5S rDNA was located on the chromosome 5, and the telomere was located on the end of chromosomes

图 1 45S rDNA、5S rDNA 和端粒在菰蓝有丝分裂中期染色体上的定位

Fig. 1 FISH localization of 45S rDNA, 5S rDNA, and telomeres on metaphase chromosomes of *I. indigotica*

及 14 对端粒位点。就信号强度而言, 45S rDNA 信号最强, 5S rDNA 信号其次, 端粒信号最弱。说明这些序列在菰蓝基因组中的拷贝数存在差异, 45S rDNA 拷贝数最多。

2.2 菰蓝 FISH 核型分析

借助菰蓝中期染色体 FISH 结果进行同源染色体配对及排序, 选择 30 个分散良好的中期分裂相使用 MetaMorph 软件测量染色体长臂、短臂的相对长度 (表 1), 构建的菰蓝有丝分裂中期染色体 FISH 核型结果见图 1-E。菰蓝基因组有一对 45S rDNA 位点位于 4 号染色体短臂近端部处, 一对 5S rDNA 位点位于 5 号染色体长臂近着丝粒处, 其端粒则由

不同长度的 (TTTAGGG)_n 串联重复序列组成。

菰蓝有丝分裂中期染色体的相对长度、臂比 (长臂/短臂)、染色体类型、相对长度系数见表 1。根据表中结果, 确定菰蓝的核型公式为 $2n=2x=14=10m(2SAT)+4sm$, 4 号染色体具有次缢痕和随体; 染色体相对长度变异范围为 10.09%~19.00%, 相对长度组成为 $2L+6M2+4M1+2S$; 最长染色体与最短染色体的比值为 1.88; 染色体平均臂比为 1.53; 臂比大于 2 的染色体比率为 14.29%; 核型不对称系数为 59.64%。由以上分析可以确定菰蓝核型的对称等级为 2A, 是一种比较对称的核型。

表 1 菰蓝有丝分裂中期染色体核型分析
Table 1 Karyotype analysis of metaphase chromosomes of *I. indigotica*

染色体序号	染色体相对长度/%		臂比 (长臂/短臂)	类型	相对长度系数
	短臂	长臂			
1	7.72	11.28	1.46	m	1.33 (L)
2	7.42	8.31	1.12	m	1.10 (M2)
3	5.93	9.2	1.55	m	1.06 (M2)
4*	6.23	8.61	1.38	m	1.04 (M2)
5	5.04	8.90	1.76	sm	0.98 (M1)
6	3.56	7.72	2.17	sm	0.79 (M1)
7	4.45	5.64	1.27	m	0.71 (S)

*随体染色体, 随体长度计算在内
*Satellites, the length of satellites was included in chromosome length

3 讨论

刘丽莎等^[11]报道菰蓝属 2A 核型, $2n=2x=14=6m+2sm(2SAT)+2st$; 肖成汉等^[13]报道的菰蓝同属 2A 核型, 但 $2n=2x=14=6m(2SAT)+8sm$; 而鹿萍^[12]报道的菰蓝为 4A 核型, $2n=2x=14=14m$ 。本研究证实菰蓝属 2A 核型, 但在核型公式, 平均臂比, 核型不对称系数与上述研究存在差异。这种差异首先可能是不同菰蓝材料染色体结构不同所造成的, 暗示菰蓝在长期栽培的过程中, 可能形成了不同的地方品系, 值得深入研究。其次, 这些差异也可能是核型分析方法和手段的不同所造成的。菰蓝染色体很小, 同源染色体识别较难, 常规核型分析菰蓝染色体着丝粒不易识别。通过 45S rDNA、5S rDNA 在菰蓝染色体上的定位, 准确地识别了部分同源染色体; 通过端粒序列的定位, 准确地界定了染色体的边界。同时, DAPI 染色清晰地显示了染色体上的异染色质区和着丝粒, 也有助于染色体识别。由此可见, 荧光原位杂交技术是染色体, 特

别是中小染色体识别的有力工具, 为同源染色体识别、核型分析提供了有效的细胞学标记。

45S rDNA 和 5S rDNA 是编码核糖体 rRNA 的基因, 参与构建核糖体。染色体荧光原位杂交结果显示, 菰蓝 45S rDNA 位于 4 号染色体短臂次缢痕处, 即随体处。在其他的很多植物中也发现 45S rDNA 定位于染色体的次缢痕处^[14,19-20], 这些结果都支持 45S rDNA 参与构成核仁组织区 (nucleolus organizer region, NOR)。与 45S rDNA 不同, 5S rDNA 在细胞核上的位置并不恒定, 但一般不位于核仁区^[20]。Mantovani 等^[20]认为 45S rDNA 与 5S rDNA 在细胞核中占有各自的空间位置, 从而使它们能承担各自独特的功能。

端粒是染色体重要的功能元件, 主要作用是维持染色体的完整和稳定。目前发现拟南芥、水稻等大多数植物端粒的保守重复序列是 (TTTAGGG)_n, 但洋葱 *Allium cepa* L. 的端粒序列由 350 bp 的卫星重复序列组成^[15]。本研究证实了菰蓝的端粒序列与拟

南芥等的端粒序列一致,由(TTTAGGG)_n串联重复组成,主要分布在染色体的端部。

45S rDNA、5S rDNA 和端粒序列是对十字花科核型进化分析及比较基因组学研究的重要细胞学标记^[21]。本研究结果不仅为菘蓝的核型分析、多倍体育种提供了分子细胞遗传学的资料,也为菘蓝分子细胞遗传图谱的构建及开展菘蓝与拟南芥等其他十字花科作物比较基因组学研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 乔传卓. 菘蓝和欧洲菘蓝的鉴别研究 [J]. 第二军医大学学报, 1985, 4: 237.
- [2] 叶青, 梁宗锁, 董娟娥. 不同播期菘蓝的生长及结籽差异性研究 [J]. 中草药, 2006, 37(7): 1089-1092.
- [3] 马丽, 赵昕, 杨丽, 等. 板蓝根大青叶青黛及其制剂的药物分析研究进展 [J]. 时珍国医国药, 1998, 2: 186-187.
- [4] 方建国, 刘云海, 王文清, 等. 板蓝根清热解毒实质研究 [J]. 中草药, 2008, 39(3): 321-324.
- [5] 徐晗, 方建国, 刘云海. 板蓝根最新研究进展 [J]. 中草药, 2003, 34(4): 10-11.
- [6] Price D B, Hernandez D, Magyar P, *et al.* Randomised controlled trial of montelukast plus inhaled budesonide versus double dose inhaled budesonide in adult patients with asthma [J]. *Thorax*, 2003, 58(3): 211.
- [7] 赵玲敏, 杨占秋, 钟琼, 等. 菘蓝的 4 种单体成分抗柯萨奇病毒作用的研究 [J]. 武汉大学学报: 医学版, 2005, 26(1): 53-57.
- [8] 赵玲敏, 杨占秋, 方建国, 等. 菘蓝的 4 种有效成分及配伍组合抗腺病毒作用的研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2005, 16(3): 178-181.
- [9] 张汉明, 张戈, 乔传卓. 板蓝根和大青叶不同部位的靛蓝、靛玉红含量测定及其部分成分的抗内毒素作用比较 (摘要) [J]. 药学实践杂志, 2000, 18(5): 347.
- [10] 王瑞, 杨海英, 杨琪伟, 等. 板蓝根的质量标准研究 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 478-480.
- [11] 刘丽莎, 张西玲. 菘蓝的染色体核型分析 [J]. 甘肃中医学院学报, 1991, 8(1): 51-52.
- [12] 鹿萍. 菘蓝的染色体制片技术及核型研究 [J]. 赤峰学院学报: 自然科学版, 2010, 26(1): 22-24.
- [13] 肖成汉, 赵建伟. 3 种十字花科植物的核型研究 [J]. 武汉植物学研究, 1995, 13(3): 283-286.
- [14] 徐延浩, 杨飞, 程有林, 等. 45S rDNA 和 5S rDNA 在南瓜、丝瓜和冬瓜染色体上的比较定位 [J]. 遗传, 2007, 5: 614-620.
- [15] Li J, Yang F, Zhu J, *et al.* Characterization of a tandemly repeated subtelomeric sequence with inverted telomere repeats in maize [J]. *Genome*, 2009, 52(3): 286-293.
- [16] 李懋学, 陈瑞阳. 关于植物核型分析的标准化问题 [J]. 武汉植物学研究, 1985, 3(4): 297-302.
- [17] Kuo S R, Wang T T, Huang T C. Karyotype analysis of some formosan gymnosperms [J]. *Taiwania*, 1972, 17(1): 66-80.
- [18] Stebbins G L. *Chromosomal Evolution in Higher Plants* [M]. London: Edward Arnold, 1971.
- [19] Huang J, Ma L, Yang F, *et al.* 45S rDNA regions are chromosome fragile sites expressed as gaps *in vitro* on metaphase chromosomes of root-tip meristematic cells in *Lolium* spp [J]. *PLoS One*, 2008, 3(5): e2167.
- [20] Mantovani M, dos L D, Abel S, *et al.* Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localisation revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae) [J]. *Genetica*, 2005, 123(3): 211-216.
- [21] Mandakova T, Lysak M A. Chromosomal phylogeny and karyotype evolution in x = 7 crucifer species (Brassicaceae) [J]. *Plant Cell*, 2008, 20(10): 2559.