

文章编号:1674-7054(2011)02-0129-04

木薯 *MeEF I* 基因的原位 PCR 物理定位

冯耀文^{1,2}, 王 英¹, 高和琼¹, 庄南生¹

(1. 海南大学 农学院, 海南 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院 热带作物品种资源研究所, 海南 儋州 571737)

摘 要: 用原位 PCR 技术将木薯延长因子基因(*MeEF I*) 定位到木薯染色体上, 根据 *MeEF I* 基因的全长 cDNA 序列设计该基因的特异引物, 以华南 6 号木薯根尖为材料制备染色体标本, 结果表明: 通过原位 PCR 检测发现, 在木薯细胞不同时期的分裂相上均能发现 1~2 个荧光信号位点; 通过核型分析, 初步将木薯 *MeEF I* 基因定位于华南 6 号木薯的第 10 号染色体的短臂上, 基因位点到着丝粒的百分距离是 35.11。

关键词: 木薯; 延长因子; 原位 PCR; 物理定位

中图分类号: S 533

文献标志码: A

蛋白质合成延伸因子(elongation factor 1- α , *EF-1 α*) 在真核生物蛋白质的合成中起重要作用, 它可以通过在核糖体上催化氨基酸链的延伸来推动、控制蛋白质的合成。研究表明, *EF-1 α* 与氨酰-tRNA 和 GTP 相互作用, 使伸长过程中的氨酰-tRNA 结合到核糖体上, 以方便蛋白质的合成^[1], 同时, 它也和植物微管的组合和降解有关^[2]。目前, 许多植物如番茄、大麦、玉米、拟南芥等的 *EF-1 α* 基因或者 cDNA 序列已经被分离。木薯延长因子(*Manihot esculenta* elongation factor 1- α , *MeEF I*) 也已经被分离和测序^[3], 其表达序列全长为 4 866 bp, 其中包括 1 个全长为 2 709 bp 的基因表达调控序列, 1 347 bp 的表达序列被 1 个长为 374 bp 的内含子分割成 2 部分, 另外, 还包括 1 个长为 435 bp 的 3'终止序列, 该基因上游转录位点上含有 3 个控制位点, 包括 1 个 TEF 框, 1 个 TELO 框和 2 个 TATA 框。该基因在染色体上的位置至今尚未见报道。原位 PCR 技术(in situ PCR) 是一种把原位杂交(in situ hybridization, IsH) 的高准确度与标准 PCR 高敏感度结合起来的研究手段。即在不破坏细胞的前提下, 利用完整的细胞作为一个微小的反应体系来扩增细胞内的目标片段, 并通过免疫组织化学反应或者原位杂交等检测手段来检测细胞内的扩增产物^[4]。目前, 原位 PCR 技术已经在动植物的研究领域中得到应用。利用原位 PCR 技术, 已将菜豆(*Phaseolus vulgaris*) 豆根瘤蛋白(*Lb*) 基因定位到菜豆的 2 号染色体上^[5], 将橡胶树的死皮病相关基因(*HbMyb1*)、抗白粉病基因 *OPV-10390* 连锁标记和橡胶延长因子基因(*REF*) 分别定位到橡胶树不同的染色体上^[6-7]。笔者采用原位 PCR 技术对木薯的 *SBE II* 基因进行染色体物理定位, 旨在揭示该基因在染色体上的位置和分布特点。

1 材料与方 法

1.1 材料 实验材料为华南 6 号木薯品种, 由海南大学(儋州校区) 农学院基地和中国热带农业科学院品种与资源研究所种质圃提供。

纤维素酶购自 Japan Yakult; 果胶酶购自 Serva; *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs 购自 Promega 公司; Pepsin、PI 购自 Sigma 公司; DIG- α -dNTP、Anti-DIG-Fluorescein 购自 Roche 公司; 抗褪色剂 Vectashield 购自 Vector 公

收稿日期: 2011-04-29

基金项目: 国家 973 计划项目(2010CB126606); 海南大学科研专项项目(NVSTC08-03) 和海南大学 211 工程项目“热带作物遗传育种与生态保育”经费资助

作者简介: 冯耀文(1986-) 男, 四川阆中人, 海南大学农学院作物遗传育种专业 2008 级硕士研究生。

通信作者: 庄南生(1962-) 男, 海南大学农学院教授, 博士, 博士生导师。E-mail: zhuangns@163.com

司;去离子甲酰胺(formamide Deionized)购自BBI公司;Easiseal原位克隆框购自英国Hybaide公司;Poly-L-Lysine(PLL)购自S.ABC公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 染色体标本的制备 参考曾霞的方法^[8]。剪取根长0.5~1 cm的根尖,放入0.002 mol·L⁻¹的8-羟基喹啉中,于15~20℃预处理2 h,水洗后,以新配的乙醇-冰醋酸混合液($V_{\text{乙醇}}:V_{\text{冰醋酸}}=3:1$)固定18~24 h(4℃),水洗3次,再用蒸馏水浸泡30 min,在37℃下用 $w=3\%$ 的纤维素酶和 $w=2.5\%$ 的果胶酶混合液酶解4~5 h,水洗,再以蒸馏水浸泡30 min,加固定液($V_{\text{乙醇}}:V_{\text{冰醋酸}}=3:1$)于4℃固定30 min,采用事先用PLL包被的载玻片进行火焰干燥制片。

1.2.2 特异引物的设计与筛选 根据报道的木薯延长因子基因序列(登录号:AF041463),使用Primer 5.0设计多对引物,以木薯基因组DNA为模板进行PCR扩增和电泳,回收和纯化PCR产物为惟一条带的目标片段,测序后与木薯延长因子基因序列比对,由此筛选出该基因的特异引物。

1.2.3 原位PCR步骤 染色体标本预处理:5 mg·L⁻¹的胃蛋白酶溶液(0.01 mol·L⁻¹ HCl)处理5 min,以0.5×TBS液洗涤10 min,用无菌水漂洗玻片2~5 min,空气干燥。

原位PCR反应:(1)标本置于 $\varphi=70\%$ 的甲酰胺(0.1×SSC)溶液中70℃变性2 min后,立即浸入冰浴的0.1×SSC液洗1 min,然后浸入冰浴的无菌水洗1 min。标本依次经-20℃的 $\varphi=75\%$ 的乙醇、 $\varphi=90\%$ 的乙醇及无水乙醇进行脱水,每次3 min,空气干燥。(2)将50 μL PCR反应液加在标本上,滴加20 μL矿物油,密封,以不加Taq酶或引物为阴性对照。反应液成分为:5×Buffer 10 μL,25 mmol·L⁻¹的MgCl₂ 9 μL,5 g·L⁻¹的BSA 5 μL,10 mmol·L⁻¹的dATP 1 μL,10 mmol·L⁻¹的dGTP 1 μL,10 mmol·L⁻¹的dCTP 1 μL,3.6 mmol·L⁻¹的dTTP 1 μL,20 μmol·L⁻¹的DIG-11-dUTP 10 μL,5 U·μL⁻¹的TaqDNA polymerase 1 μL,20 μmol·L⁻¹的F-Primer 5 μL,20 μmol·L⁻¹的R-Primer 5 μL,ddH₂O 1 μL。(3)PCR扩增,先95℃变性10 min,然后94℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 1.5 min,共20个循环,最后72℃延伸10 min。

检测:扩增后,揭开原位克隆框及塑料盖片,将玻片置于0.1×PBS中,37℃洗脱4~5 min。每玻片加 $w=5\%$ 的BSA(0.1×SSC/吐温20)100 μL,盖上塑料盖片孵育20 min,37℃。孵育完后去盖片,去除BSA溶液,每片加20 mg·L⁻¹的Anti-DIG-Fluorescein 50 μL,盖上塑料盖片孵育1 h,37℃。0.1×SSC/吐温20漂洗2~4 min。每片加1 g·L⁻¹的PI 50 μL,盖上压膜盖片孵育15 min,37℃。0.1×SSC/吐温20漂洗1~2 min,空气干燥。用抗褪色剂Vectashield封片,4℃,黑暗中显色0.5 h。用荧光显微镜(BX51TR-32FA1-A03)观察,选择WBV荧光激发块,用Penguin/Proseries Camera systems软件进行拍照。染色体呈红色,黄绿色区域为扩增位点。

1.2.4 信号观察及分析 根据王静晖等的方法^[9]确定扩增信号位置,本研究扩增信号位点在染色体上的位置用扩增信号位点到着丝粒的百分距离来衡量。公式如下:

$$\text{扩增信号位点的百分距离} = \frac{\text{扩增信号位点到着丝粒的距离}(\mu\text{m})}{\text{扩增信号位点所在染色体臂的长度}(\mu\text{m})} \times 100\%$$

2 结果与分析

通过对设计的引物进行筛选,获得了1对具有特异条带的引物,该引物为:上游5'-CTCCCGTGAT-TTAGATTACTTC-3',下游5'-AGCACCCAGGCATACTTGA-3'。对特异条带测序后与木薯MeEF I基因cDNA序列(AF041463)相比,相似性达到97%,说明该引物为MeEF I基因的特异引物,可用于原位PCR。

用MeEF I特异引物在华南6号木薯的根尖($2n=36$)细胞的染色体标本上进行原位PCR扩增,通过荧光显微镜的检测观察,发现在不同分裂时期的细胞核上都可以检测出1~2个扩增的绿色荧光信号位点(图1、图2,箭头所示为信号位点)。对中期分裂相进行核型分析,结果表明,在第10号染色体的短臂上有扩增的信号位点(图1),由此可将MeEF I基因定位在第10号染色体的短臂上,基因位点到着丝粒的百分距离是35.11(图3)。

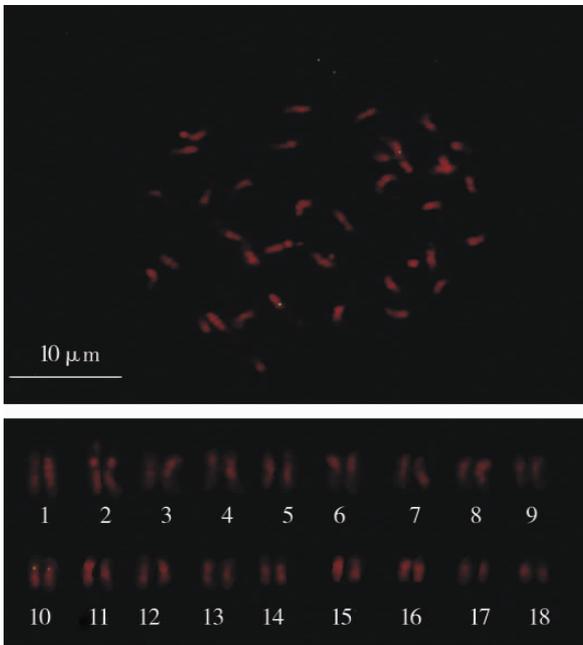


图 1 *MeEF I* 特异引物在华南 6 号木薯上的原位 PCR 结果及核型图
白点为信号位点, 信号位点在第 10 号染色体的短臂上。

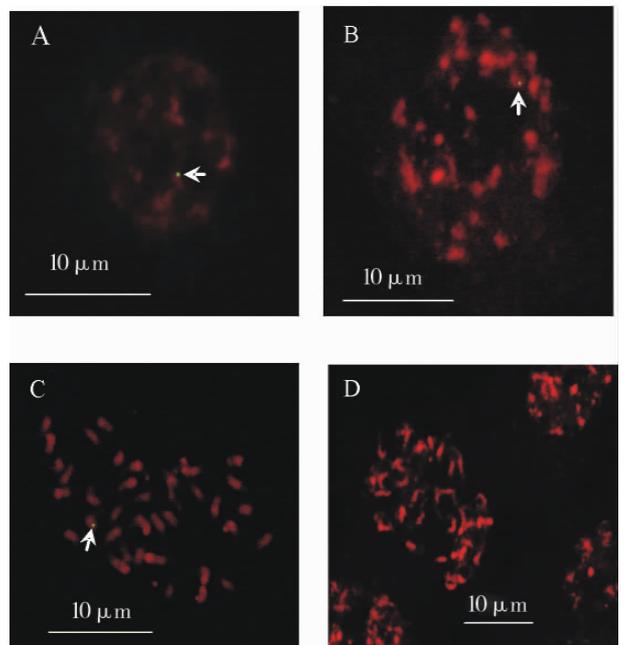


图 2 *MeEF I* 特异引物在华南 6 号木薯上的原位 PCR 结果
如在木薯华南 6 号不同时期的染色体标本上均能发现信号位点, 图中白色箭头所示。A: 间期信号, B: 前中期, C: 中期, D: 阴性对照。

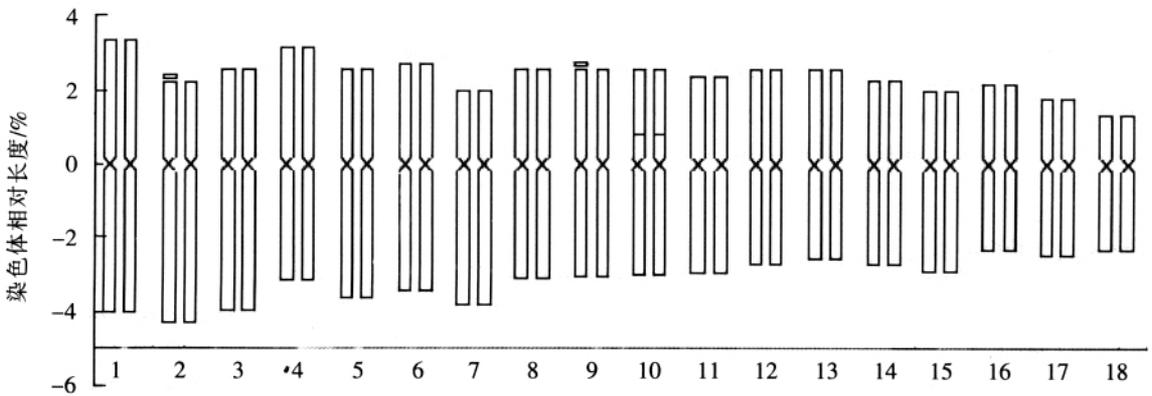


图 3 华南 6 号木薯 ($2n = 36$) 的核型模式图
第 10 号染色体短臂中部的黑线部分表示 *MeEF I* 基因位点

3 讨 论

由于在此之前还没有使用原位 PCR 技术对木薯基因进行定位的报道, 笔者参照王英^[10] 甘蔗特异 DNA 片段原位 PCR 体系与高和琼^[6] 的橡胶树原位 PCR 体系, 并加以优化。主要是胃蛋白酶处理时间的改变和不使用 HCl 进行处理。胃蛋白酶可以增加细胞的通透性, 破坏已固定形成的蛋白质网络结构, 暴露靶序列, 使反应液容易进入细胞, 并且还消除内源性的生物素产生的影响。本实验所使用的胃蛋白酶的质量浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 处理温度为 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 但胃蛋白酶处理的时间应该视标本的具体情况而定。若处理时间过长, 则容易导致细胞消化过度, 使染色体变形; 若处理时间过短, 又会使细胞酶解不充分, 特异位点可能会被蛋白质所掩盖, 导致假阴性。针对本实验使用的材料木薯根尖, 如果在制片过程中酶解效果比较好, 那么在预处理阶段用胃蛋白酶处理的时间就不宜过长, 本实验的处理时间为 5 min。

在许多其他植物的原位 PCR 体系中, 都有用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl 处理的步骤, 其作用与胃蛋白酶处理的作用相似, 消化掉细胞内大量的内含蛋白, 利于反应。但是, 处理过头也会使染色体变形, 甚至丢失。本实验中, 在对标本使用胃蛋白酶处理的前提下, 使用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl 处理的时间分别设置为: 15,

10.5 μ min。结果显示, ≥ 10 min 处理的细胞, 染色体机构松散, 形态变形, 没有信号; 而对于处理 5 min 和不处理, 效果均一致。所以, 本实验不选用 HCl 处理标本。

假阳性是原位 PCR 中常出现的非特异性问题。产生假阳性的因素有很多, 但主要有以下 3 点: ①引物的错配。由于引物的非特异性导致与模板的错配或者延伸过程中, 三磷酸核苷酸的错误渗入导致了非特异性扩增。其主要原因是受退火温度、 Mg^{2+} 、引物特异性影响, 因此, 采取热启动 PCR 反应以及最佳的退火温度可以解决。②扩增产物的扩散。可以使用多重引物对 PCR 反应中合成具有重叠的黏性末端片段并使其交联在一起, 成为比较大的产物, 滞留在细胞内不易逸出。③DNA 的修复和内源性扩增。由 DNA 的内源性修复所造成的假阳性很少, 可以通过降低 PCR 反应循环数来提高反应的特异性并降低背景^[11]。在扩增后加入一定的 BSA(牛血清白蛋白) 可防止扩增产物的扩散。在洗脱的过程中, 降低洗脱强度也可以防止假阳性的产生。在实验过程中, 必须设置阴性对照来提高原位 PCR 的准确性和特异性, 尽可能排除其他的干扰。一般是在扩增过程中以不加 Taq 酶为阴性对照, 如果在任何一个对照中出现信号, 必然是假阳性, 就需要对实验进行修改和优化。

笔者在进行木薯延长因子 *MeEF I* 的原位 PCR 定位时, 发现在华南 6 号木薯的根尖不同分裂时期的细胞核中可以检测到 1~2 个信号位点。对于等位基因在细胞内只出现 1 个信号位点的原因可能是由于核酸在不同时期的呈现的松散程度不同, 从间期到中期, 染色体不断凝缩, 并高度螺旋化, 使扩增的难度加大。目前, 国内外还没有使用原位 PCR 技术对木薯基因物理定位的报道, 所以, 对于这一方面研究过程中还有待于进一步的探讨。

参考文献:

- [1] BROWNING K. The plant translational apparatus[J]. *Plant Mol Biol*, 1996, 32: 107-144.
- [2] LITTLEPAGE L M, GARMAN J M, MENDENHALL, et al. Plant microtubule (MT) severing, stiffening, and bundling by wheat germ protein synthesis elongation factor 1 α [J]. *Mol Biol Cell*, 1995(6): 1495-1505.
- [3] SUHANDONO S, HUGHES J, BROWN K, et al. An elongation factor 1- α gene from cassava (*Manihot esculenta* Crantz)[J]. *Plant Physiol*, 1998, 116: 1603.
- [4] 苏伟, 索振河. 原位 PCR 技术[J]. 国外医学: 遗传学分册, 1996, 19(2): 64-66.
- [5] UCHIUMI T, KUWASHIRO R, MIYAMOTO J, et al. Detection of the leghemoglobin gene on two chromosomes of *Phaseolus vulgaris* by in situ PCR linked-fluorescent in situ hybridization (FISH) [J]. *Plant Cell Physiology*, 1998, 39(7): 790-794.
- [6] 高和琼. 巴西橡胶树 *HbMyb1* 基因和 *OPV40390* 连锁标记原位 PCR 定位研究[D]. 海口: 海南大学农学院, 2008.
- [7] 邱海燕. 巴西橡胶树 *REF*、*RT* 和 *SRPP* 基因的物理定位研究[D]. 海口: 海南大学农学院, 2010.
- [8] 曾霞. 木薯遗传背景的染色体 C-分带及 RAPD 研究[D]. 儋州: 华南热带农业大学, 2002.
- [9] 王静晖, 宋运淳, 杭超, 等. 玉米大斑病抗性基因 *htZ* 的原位杂交物理定位[J]. 武汉大学学报: 自然科学版, 1998, 44(4): 465-468.
- [10] 王英. 甘蔗亲本种特异 DNA 序列的 PCR 检测及原位 PCR 定位的研究[D]. 儋州: 华南热带农业大学, 2007.
- [11] 邵军军, 常惠芸, 谢庆阁. 原位 PCR 技术及其应用[J]. 中国兽医科技, 2003, 33(6): 32-36.

Physical Location of *MeEF I* from *Manihot esculenta crantz* by *in situ* PCR

FENG Yao-wen^{1,2}, WANG Ying¹, GAO He-qiong¹, ZHUANG Nan-sheng¹

(1. College of Agriculture, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, 571737, China)

Abstract: In our report, the chromosome was prepared using root tips of cassava variety SC6, the specific primers of *MeEF I* were designed according to the complete cDNA sequence in GenBank, and in situ PCR was used to locate *MeEF I* in *Manihot esculenta crantz* genome. The results indicated that one or two signals were detected by in situ PCR on all phases of cell division; *MeEF I* gene located on the short arm of chromosome 10; the percent distances of the gene from centromere is 35.11.

Key words: *Manihot esculenta crantz*; Elongation factor; *in situ* PCR; physical location