

文章编号: 1674-7054(2016)03-0318-07

橡胶素基因家族4个成员在橡胶树染色体上的定位

彭宝丰^{1,2}, 王英¹, 高和琼¹, 庄南生¹

(1. 海南大学农学院/海南省热带生物资源可持续利用重点实验室, 海口 570228;

2. 中国热带农业科学院橡胶研究所, 海南 儋州 571737)

摘要: 笔者以巴西橡胶树‘热研7-33-97’品种为材料, 利用原位PCR技术对巴西橡胶树的4个橡胶素基因(*Hev1.1*, *Hev1.2*, *Hev2.1*, *Hev2.2*) 在染色体的位置进行了物理定位分析, 并利用荧光原位杂交技术对原位PCR结果进行了验证。结果表明: *Hev1.1*, *Hev1.2*, *Hev2.1*, *Hev2.2* 基因分别位于巴西橡胶树第8号染色体长臂、第7号染色体长臂、第6号染色体短臂和第12号染色体长臂上; 信号距着丝粒平均百分距分别为10.88, 31.51, 63.81和67.92。

关键词: 巴西橡胶树; 橡胶素基因(*Hev1.1*, *Hev1.2*, *Hev2.1*, *Hev2.2*); 原位PCR; 荧光原位杂交

中图分类号: Q 789

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2016.03.007

巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)的橡胶乳管是由网状的细胞链在皮层中形成的, 其功能主要是用来合成橡胶粒子(一种被单层膜包裹着的1 μ - 聚异戊二烯微粒)^[1]。人们的割胶行为损伤了乳管组织, 从而使胶乳流出, 直到橡胶树胶乳凝固系统发生凝固反应堵塞了损伤部位终止胶乳外流。这一凝集过程被认为是在橡胶素(*Hevea brasiliensis* hevein, 简称 Hevein)的参与下完成的^[2]。橡胶素基因是由损伤、乙烯和脱落酸处理诱导^[3]合成的, 而*Hev1.1*, *Hev1.2*, *Hev2.1*, *Hev2.2* 这4个基因作为橡胶素基因家族成员参与了橡胶素前体蛋白的合成调控, Valerie等经过文库筛选获得了这4个基因并用于转基因研究中, 并在水稻中得以表达^[4]。目前, 在NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>)查阅这4个基因的DNA序列的登录号分别是AY247787, AY247788, AY247789, AY247790。在这4个基因的下游区域有高度的保守序列, 相似性高达90%以上, 但关于这4个基因在巴西橡胶树染色体上的具体位置尚不清楚, 亦未见相关报道。原位PCR(In situ PCR, IS-PCR)技术由Haase等在1990年首次创建^[5], 并为Bo Johansen等^[6]于1997年首次引进到植物研究中。原位PCR同时兼有原位杂交和PCR二者的优点, 具有较高的特异性与灵敏性。即可同时获得染色体的形态结构信息与分子遗传信息, 又能检测出染色体中单拷贝或低拷贝的DNA, RNA序列。荧光原位杂交技术(Fluorescence in situ hybridization, FISH)是先通过探针与目标区域结合, 然后通过抗体抗原反应使得荧光分子在目标沉积从而实现信号放大^[7], 完成定位。原位PCR技术和荧光原位杂交技术被广泛地应用于染色体结构的研究^[8]、基因检测与定位^[9]、功能基因物理遗传图谱的绘制^[10]以及物种种属关系的鉴定^[11]等诸多领域。笔者以巴西橡胶树热研7-33-97品种(2n=36)为材料制备细胞染色体标本, 采用原位PCR技术对4个HEV基因进行了物理定位, 并利用荧光原位杂交进行验证。Hev基因在染色体真实位置的确定有利于更深入地了解该基因家族在基因组中的分布以及它们与其

收稿日期: 2015-03-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(31360186); 国家天然橡胶产业技术体系(CARS-34); 海南省重大科技项目(ZDZX2013023)及中央财政支持中西部高校提升综合实力专项

作者简介: 彭宝丰(1987-), 男, 海南大学农学院2013级硕士研究生, E-mail: 273714964@qq.com

通信作者: 庄南生(1962-), 男, 教授, 主要从事热带作物遗传育种研究, E-mail: zhuangns@163.com

他功能基因间的连锁关系,从而有效地将这些信息应用于橡胶分子辅助育种和比较基因组学以及其他遗传育种研究之中。

1 材料与方法

1.1 材料 自海南大学农学院基地和中国热带农业科学院橡胶研究所采摘巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*) ‘热研 7-33-97’的古铜期嫩叶为试验材料,采后于-20℃低温保存。

1.2 染色体标本的制备 参照文献[12]的方法,并略作修改,利用巴西橡胶树‘热研 7-33-97’古铜期有丝分裂旺盛的嫩叶的边缘进行染色体标本的制备,酸解法(0.01 mol·L⁻¹ HCl 酸解 10 min)与酶解[5% 纤维素酶(*Lellulase* “Onozuka” R-10, Japan Yakult)和 3.5% 的果胶酶(*Serva*, *Easiseal*)混合液]去壁低渗法相结合,-20℃干燥保存备用。

1.3 特异引物的设计 依据橡胶素多基因家族部分成员基因 *Hev1.1*(GenBank: AY247787),*Hev1.2*(GenBank: AY247788),*Hev2.1*(GenBank: AY247789),*Hev2.2*(GenBank: AY247790)的序列和他们的共有序列在 Primer Permier 6 上进行引物设计,由上海英俊公司合成。PCR 扩增产物纯化后经上海立菲生物技术有限公司测序,比对无误后确定获得的特异性引物(表 1)。

表 1 *Hev* 基因在橡胶树基因组中扩增使用的引物
Tab. 1 The specific primers for the *Hev* genes amplification

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	引物长度/bp Primer length
<i>Hev1.1</i>	F 5'-GCCACCGCTCAATTCACATT-3'	20
	R 5'-CAACCTTGAACTCACAATCGTAAC-3'	24
<i>Hev1.2</i>	F 5'-AAACACCTTAGCCACATATCTCTCTG-3'	22
	R 5'-TTACTATGGATGCCTTCATTCCCTTGG-3'	22
<i>Hev2.1</i>	F 5'-AGGCTATGCTCAAGGCTACC-3'	20
	R 5'-AGATGATTAGGACAAGGAGGAAGT-3'	24
<i>Hev2.2</i>	F 5'-TCACCACCATTTCAGTCCACTT-3'	21
	R 5'-TCACTCATAACAAGCCACTCAAC-3'	23
4 个基因的共有序列	F 5'-GCTATAAATAAAGCCAAGTGAGC-3'	23
Common sequence of four genes	R 5'-TCTTCACCAATACCTTACAGAGC-3'	23

1.4 原位 PCR 原位 PCR 参考文献[13]的方法进行。标本玻片置于 60℃烘箱内固化 60 min;0.01 mol·L⁻¹ HCl 处理 12 min;含有胃蛋白酶的 0.01 mol·L⁻¹的 HCl 处理 10 min;90℃烘箱中变性 10 min;依次经 0.5×TBS 和灭菌水洗涤;70% 甲酰胺(0.1×SSC)溶液于 70℃烘箱中变性 5 min;立即将变性后的标本浸入 0.1×SSC 溶液(冰浴的)和灭菌水(冰浴的)各洗涤 1 min;依次用冰冻于-20℃下的 75% 90% 100% 乙醇各脱水 3 min,干燥。于原位 PCR 仪中进行原位扩增,退火温度分别设为 60℃ 62℃ 63℃ 60℃。扩增后的玻片置于 0.1×PBS 溶液中,37℃条件下洗脱 5 min;5% BSA(0.1×SSC/吐温 20)37℃下孵育 20 min;Anti-DIG-Fluorescein 37℃烘箱中孵育 1 h;37℃条件下 0.1×SSC/吐温 20 溶液中漂洗后加入 DAPI,于黑暗条件下显色 1 h。

1.5 探针的制备与原位杂交 回收由 PCR 扩增得到的 4 个基因的共有序列,用 DIG-Nick Translation Mix for in situ probes (Roche)试剂盒标记成探针,标记的探针溶于去离子甲酰胺中备用。

参照文献[14]的方法稍加修改,染色体标本在 60℃下烘片 1 h 后直接在 70℃下 70% 去离子甲酰胺中变性 5 min,依次用于-20℃下冰冻的 70% 95% 100% 酒精逐次脱水然后晾干。滴加变性后的杂交液

在 37 ℃ 恒温培养箱杂交 16 ~ 24 h; 然后进行信号放大; 最后用 1 × PBS 溶液洗脱 3 次, 每次 8 min 后直接用 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DAPI(用抗淬灭剂稀释) 进行染色封片。

1.6 图象检测与分析 经 DAPI 染色的染色体标本在暗处显色后用荧光显微镜 BX51TR-32FA1-A03 进行观察, 用 Penguin/Proseries Camera systems 软件拍照。经 Photoshop 软件处理后, 根据 Song Y 等^[15] 报道的信号位点的百分距离的计算方法, 结合高和琼等^[16] 的核型分析确定信号位点在染色体上的具体位置。

扩增信号位点的百分距离 = (扩增信号位点到着丝粒的距离 / 扩增信号位点所在染色体臂的长) × 100

2 结果与分析

2.1 *Hev1.1*, *Hev1.2*, *Hev2.1*, *Hev2.2* 基因的原位 PCR 检测及定位 分别用 *Hev1.1*, *Hev1.2*, *Hev2.1*, *Hev2.2* 基因的特异引物, 对巴西橡胶树 ‘热研 7-33-97’ 品种的染色体标本进行原位 PCR 扩增反应和荧光检测, 结果见图 1~4。4 个基因在细胞的间期、前中期和中期均分别检测到 1 个信号点, 由此可见这 4 个基因在橡胶树基因组中都属于单拷贝基因。依据文献 [16] 报道的 ‘热研 7-33-97’ 品种的核型分析数据, 对这些带有信号位点的中期细胞进行核型分析, 初步结果为: 橡胶树 *Hev1.1* 基因定位在第 8 号染色体的长臂上, 信号位点到着丝点的百分距离为 10.88(图 1 A1-A4, 图 5); *Hev1.2* 基因定位在第 7 号染色体的长臂上, 信号位点到着丝点的百分距离为 31.51(图 2 B1-B4, 图 5); *Hev2.1* 基因定位在第 6 号染色体的短臂上, 信号位点到着丝点的百分距离为 63.81(图 3 C1-C4, 图 5); *Hev2.2* 基因定位在第 12 号染色体的长臂上, 信号位点到着丝点的百分距离为 67.92(图 4 D1-D4, 图 5)。

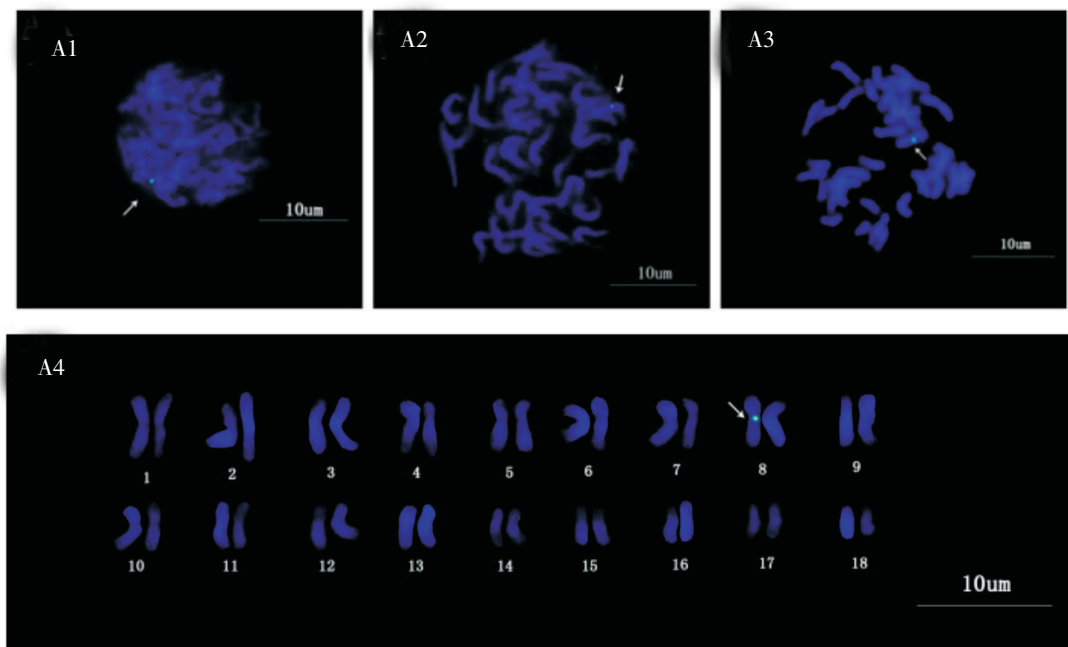


图 1 *Hev1.1* 在热研 7-33-97 不同时期染色体上原位 PCR 结果(箭头所示为信号位点)

A1: 间期细胞; A2: 分裂前中期细胞; A3: 中期细胞; A4: 中期细胞核型图

Fig. 1 In situ PCR of chromosomes of Reyan7-33-97 with *Hev1.1* at the interphase, prometaphase and metaphase (As the arrows indicates)

A1: Interphase; A2: Prometaphase; A3: Metaphase; A4: Cell karyotype

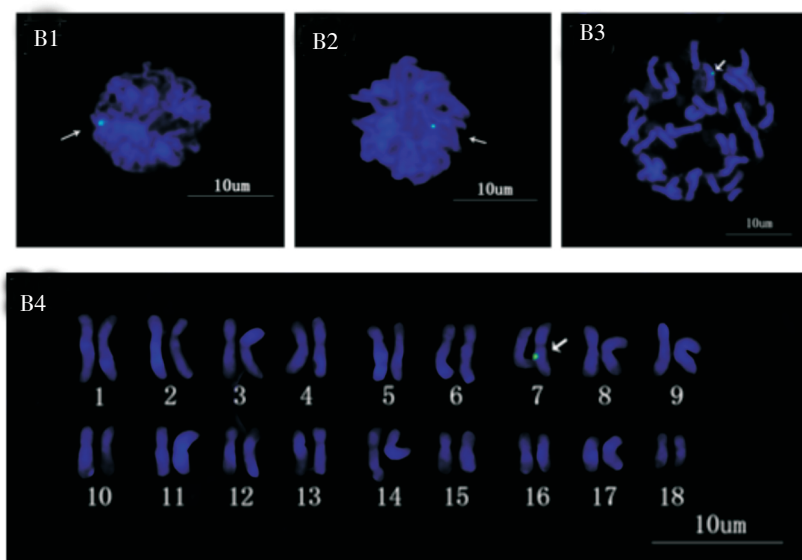


图 2 *Hev1.2* 在热研 7-33-97 不同时期染色体上原位 PCR 结果(箭头所示为信号位点)

B1: 间期细胞; B2: 分裂前中期细胞; B3: 中期细胞; B4: 中期细胞核型图

Fig. 2 In situ PCR of chromosomes of Reyan7-33-97 with *Hev1.2* at the interphase , prometaphase and metaphase (As the arrows indicates)

B1: Interphase; B2: Prometaphase; B3: Metaphase; B4: Cell karyotype

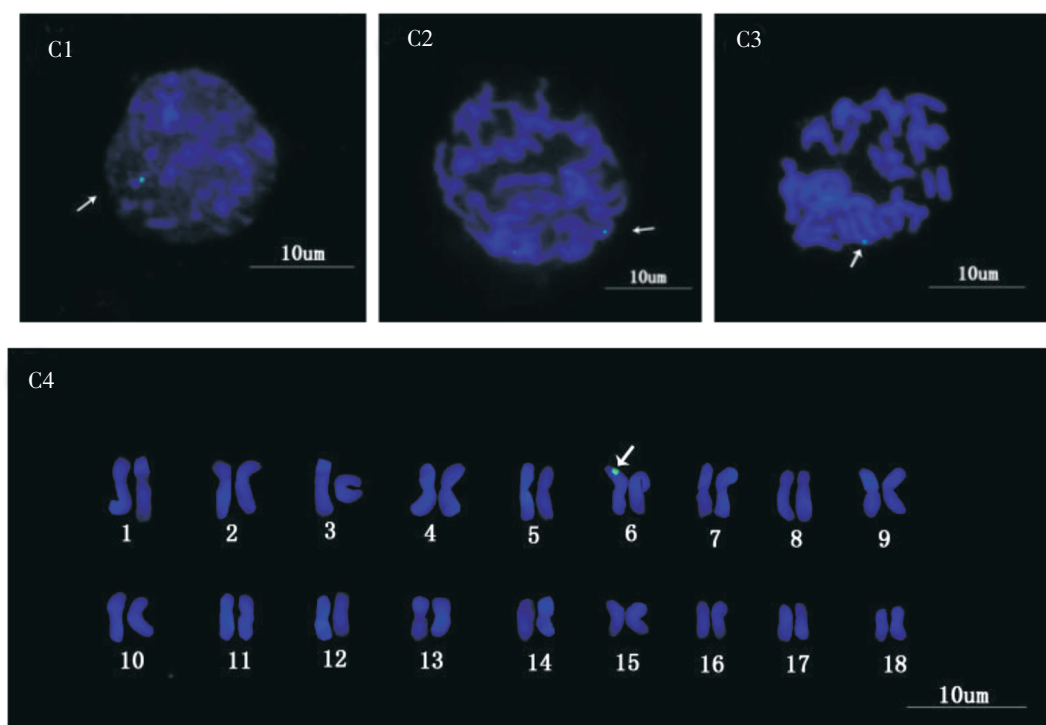


图 3 *Hev2.1* 在热研 7-33-97 不同时期染色体上原位 PCR 结果(箭头所示为信号位点)

C1: 间期细胞; C2: 分裂前期细胞; C3: 中期细胞; C4: 中期细胞核型图

Fig. 3 In situ PCR of chromosomes of Reyan7-33-97 with *Hev2.1* at the interphase , prometaphase and metaphase (As the arrows indicates)

C1: Interphase; C2: Prophase; C3: Metaphase; C4: Cell karyotype

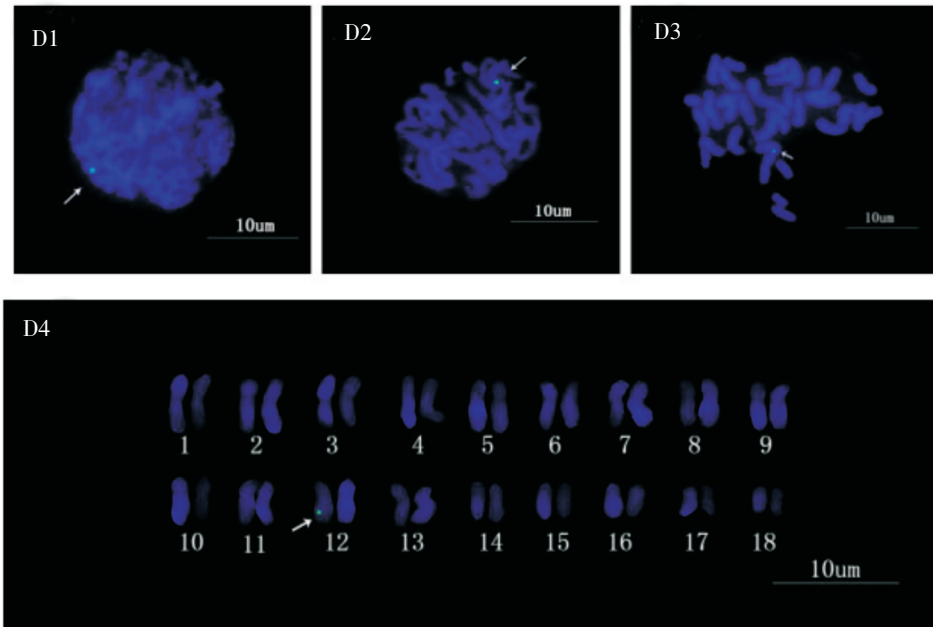


图4 *Hev2.2* 在热研 7-33-97 不同时期染色体上原位 PCR 结果(箭头所示即为信号位点)

D1: 间期细胞; D2: 分裂前中期细胞; D3: 中期细胞; D4: 中期细胞核型图

Fig.4 In situ PCR of chromosomes of Reyan7-33-97 with *HEV2.2* at the interphase, prometaphase and metaphase (As the arrows indicates)

D1: Interphase; D2: Prometaphase; D3: Metaphase; D4: Cell karyotype

2.2 原位杂交检测及定位 以 4 个基因的共有 DNA 序列作为 DIG 标记的探针, 在热研 7-33-97 品种的染色体标本上进行原位杂交与荧光检测, 在间期、前期和中期都能检测到 6~8 个杂交信号点(图 6)。依据文献[16]报道的‘热研 7-33-97’品种的核型分析数据, 对中期细胞染色体多次重复测量后进行核型分析的结果表明 *Hev1.1* *Hev1.2* *Hev2.1* *Hev2.2* 的杂交信号位点分别位于第 6 号染色体的短臂、7 号染色体的长臂、8 号染色体的长臂和 12 号染色体的长臂上, 信号位点到着丝点的百分距分别是 63.81, 31.51, 10.88, 67.92 (图 5)。荧光原位杂交的结果与 4 个基因分别进行的原位 PCR 结果是一致的, 这表明原位 PCR 的结果是可靠的。

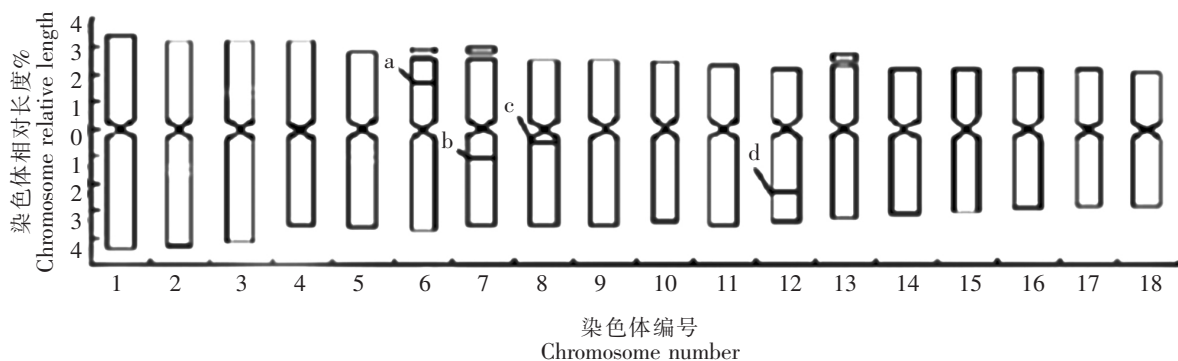


图5 巴西橡胶树‘热研 7-33-97’中期染色体核型模式图

a: *Hev2.1* b: *Hev1.2* c: *Hev1.1* d: *Hev2.2*

Fig.5 Metaphase chromosome karyotype of *Hevea brasiliensis* Reyan7-33-97

a: *Hev2.1*; b: *Hev1.2*; c: *Hev1.1*; d: *Hev2.2*

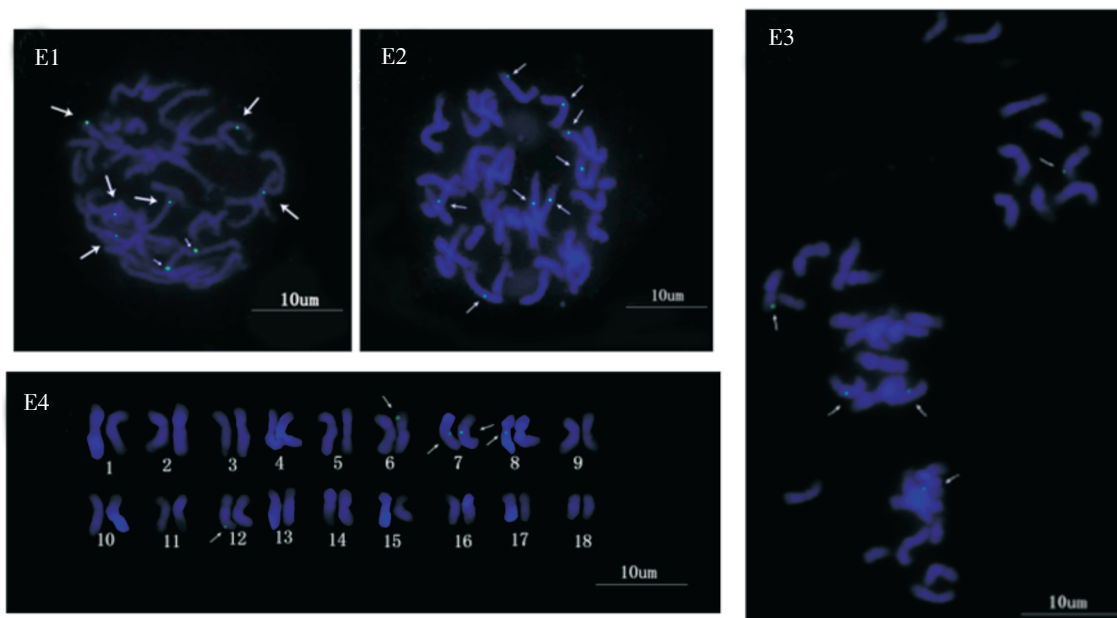


图6 共有序列在热研7-33-97有丝分裂不同时期染色体上FISH的结果(箭头所示为信号位点)

E1: 前期细胞; E2: 分裂中前期细胞; E3: 中期细胞; E4: 中期细胞核型图

Fig. 6 Fluorescence in situ hybridization of chromosomes of Reyan-7-33-97 with the common sequence of four genes at the interphase, prometaphase and metaphase (As the arrows indicates)

E1: Interphase; E2: Prometaphase; E3: Metaphase; E4: Cell karyotype

3 讨论

利用巴西橡胶树的4个橡胶素基因(*Hev1.1*, *Hev1.2*, *Hev2.1*和*Hev2.2*)的特异引物,对巴西橡胶树‘热研7-33-97’染色体标本进行原位PCR扩增反应,结果发现扩增反应的各个时期都只能在1条染色体上检测到信号位点,而在其同源染色体的相同位点上却检测不到信号。出现这一现象的原因是原位PCR是在细胞或染色体标本片上直接用特异引物对特定DNA序列进行PCR扩增,特异引物的特异性以及同源染色体之间的差异性导致特异性引物不能识别,从而导致不能扩增出对应的序列,故只检测到1个信号点。原位PCR过程中还出现假阴性现象(即检测不到信号点),其原因可能是本研究中以蛋白酶K处理原位PCR玻片标本时间过长导致与核酸交联组的蛋白被破坏而产生内源性核酸片段^[17],从而影响特异引物的结合而导致假阴性的出现;原位PCR中还会因盖片封盖不严使热循环中PCR液体的蒸发造成无效扩增从而出现假阴性等^[18];在荧光原位杂交实验中,由于同源染色体上的等位基因是高度同源的,所以等位基因的信号位点理论上应该同时出现,通过检测,信号位点为6~8个,存在着假阴性现象。造成这一现象的可能原因是洗脱时间过长或者振荡过重导致特异信号被洗掉,也有可能是封阻DNA过量,过量的封阻DNA与目标DNA区域结合阻碍探针与目标区域的杂交,或者一些其他物理因素例如细胞壁、细胞质的阻挡以及染色体叠加或染色体与载玻片的粘附等^[19]。

笔者将这4个*Hev*基因分别定位于第8号、第7号长臂、第6号短臂和第12号长臂上,它们互为独立基因。依据对橡胶树中的定位基因*HbRT1*(橡胶转移酶因子)^[14]、*HbRZF1*与*HbRZF4*(环锌指蛋白基因)^[20]、*HPT3*与*HbCPT*(顺式-异戊烯基转移酶基因)^[21]以及*SRPP*(小橡胶粒子蛋白基因)^[14]的基因连锁分析报道,笔者的分析结果为*Hev2.1*与*HbRT1*^[14]和*HbRZF1*^[20]都位于第6号染色体上,互为连锁基因; *Hev1.2*与*HbRZF4*^[20]、*HPT3*^[21]都位于第7号染色体上,属于基因连锁,其中*Hev1.2*位于*HPT3*和*HbRZF4*之间; *Hev1.1*与*SRPP*^[14]位于第8号染色体上,互为连锁基因。

参考文献:

- [1] 吴华玲,段翠芳,聂智毅,等. 巴西橡胶树橡胶粒子研究进展[J]. 热带作物学报, 2009, 30(7): 1044-1049.

- [2] 高政权, 孟春晓. 橡胶素(Hevein)和几丁质酶在橡胶树排胶中的作用[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(9): 2727–2728.
- [3] Broekaert I, Lee H I, Kush A, et al. Wound-induced accumulation of mRNA containing a hevein sequence in laticifers of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990, 87(19): 7633–7637.
- [4] Pujade-Renaud V, Sanier C, Cambillau L, et al. Molecular characterization of new members of the *Hevea brasiliensis* hevein multigene family and analysis of their promoter region in rice [J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 2005, 1727(3): 151–161.
- [5] Johansen B O. In situ PCR on plant material with sub-cellular resolution [J]. Annals of Botany, 1997, 80(5): 697–700.
- [6] 马琦, 张锡元. 原位 PCR 技术及其应用前景[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996(6): 488–492.
- [7] Pinkel D, Landegent J, Collins C, et al. Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4 [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1988, 85(23): 9138–9142.
- [8] 唐宗祥. 重复序列引起小麦染色体结构、基因组及性状的变化[D]. 雅安: 四川农业大学, 2006.
- [9] 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.
- [10] 钟筱波. 用荧光原位杂交技术构建高分辨率的 DNA 物理图谱[J]. 遗传, 1997(3): 44–48.
- [11] 李分龙, 陈庆富. 原位 PCR 技术在植物学中的应用[J]. 贵州师范大学学报: 自然科学版, 2010, 28(2): 111–114.
- [12] 高和琼, 王英, 金鸽, 等. 橡胶树叶片染色体制片方法的优化[J]. 热带作物学报, 2009, 30(5): 565–569.
- [13] 吴文婧, 黄东益, 庄南生. 原位 PCR 及其在植物研究中的应用[J]. 热带农业科学, 2006, 26(2): 65–69.
- [14] 邱海燕. 巴西橡胶树 REF、RT 和 SRPP 基因物理定位的研究[D]. 海口: 海南大学, 2010.
- [15] Song Y, Jp. G. The Physical Location of Fourteen Rflp Markers in Rice (*Oryza Sativa* L.) [J]. Tag. theoretical & Applied Genetics, theoretische Und Angewandte Genetik, 1995, 90(1): 113–119.
- [16] 高和琼, 庄南生, 王英, 等. 橡胶树两个品种的核型分析[J]. 植物科学学报, 2009, 27(5): 537–540.
- [17] 李宏. 饱和对二氯苯液诱导小麦根尖细胞异常性的研究[J]. 重庆工商大学学报: 自然科学版, 1997(1): 36–42.
- [18] 仇红刚. 原位 PCR 实验结果质量保证措施研究进展[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 1998, 19(2): 58–61.
- [19] 林小虎, 李兴锋, 王黎明, 等. 麦类作物体细胞基因组原位杂交 (GISH) 效果影响因素的分析[J]. 实验生物学报, 2005, 38(2): 126–132.
- [20] 官锦燕, 王英, 高和琼, 等. 巴西橡胶树 4 个环指蛋白基因(HbRZF)的物理定位[J]. 基因组学与应用生物学, 2014(3): 610–616.
- [21] 张新新. 巴西橡胶树 4 个胶乳生物合成相关基因的物理定位研究[D]. 海口: 海南大学, 2013.

Physical Locations of Four Members of Hevein Gene Family in *Hevea brasiliensis*

PENG Baofeng^{1,2}, WANG Ying¹, GAO Heqiong¹, ZHUANG Nansheng¹

(1 Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresource/ College of Agronomy, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China;
2 Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737, China)

Abstract: Hevein, as an important phytolectin, participating in various stress responses of rubber tree, has important biological functions. In situ PCR technique was used to locate the four hevein genes (*Hev1.1*, *Hev1.2*, *Hev2.1* and *Hev2.2*) of rubber tree. And the 4 genes was detected and validated by in situ hybridization. The results indicated that these four genes were located on the long arm of chromosome 8, the long arm of chromosome 7, the short arm of chromosome 6 and the long arm of chromosome 12, respectively, with their average percentage distances from the centromere to the hybridization site being 10.88, 31.51, 63.81 and 67.92, respectively.

Keywords: *Hevea brasiliensis*; Hevein(*Hev1.1*, *Hev1.2*, *Hev2.1*, *Hev2.2*); in situ PCR; fluorescence in situ hybridization (FISH)