

文章编号 1674-7054(2018)02-0163-07

MYC 基因家族 5 成员在巴西橡胶树染色体上的物理定位

高 豫^{1,2}, 庄南生¹, 王 英¹, 高和琼¹

(1.海南大学 热带农林学院, 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 MYC 类转录因子(Myelocytomatosis proteins, MYCs), 即髓细胞组织增生蛋白, 在茉莉酸信号转导中起着非常重要的调节作用。巴西橡胶树 MYC 基因家族的 5 个基因已被克隆, 但在橡胶树染色体上 MYC 基因家族成员的具体位置暂未确定。以巴西橡胶树热研“7-33-97”品种作为研究对象, 采用荧光原位杂交技术对 MYC 家族的 5 个基因在染色体上的具体位置进行了物理定位分析。结果表明 *HbMYC2* 和 *HbMYC5* 均位于 9 号染色体长臂上, 距着丝点的平均百分距离分别为 47.96 和 47.22; *HbMYC1* 和 *HbMYC3* 基因分别位于第 6、8 号染色体长臂上, 距着丝点的平均百分距离分别为 32.56 和 62.77; *HbMYC4* 定位在第 5 号染色体短臂上, 距着丝点的平均百分距离为 55.67。笔者研究了这些基因在染色体上的具体位置和相互关系, 为橡胶树基因组学、分子辅助育种等研究提供细胞学基础。

关键词 巴西橡胶树; *HbMYC* 基因家族; 荧光原位杂交(FISH); 物理定位

中图分类号 Q943.2 文献标志码 A DOI:10.15886/j.cnki.rdsxb.2018.02.006

MYC 家族成员在茉莉酸信号途径中起着非常重要的转录调控作用^[1]。茉莉酸信号途径是调节橡胶生物合成的重要途径, 其在植物的生长发育、应激反应和次生代谢等方面起重要调节作用。植物茉莉酸类激素响应途径中的核心转录因子即 MYC 类转录因子^[2]。这类转录因子广泛存在于动植物中, 且具有多种调节功能^[3]。目前, 在橡胶树染色体上这 5 个 MYC 基因的具体位置还没有相关报道。笔者以巴西橡胶树热研“7-33-97”品种($2n=36$)的古铜期嫩叶为实验材料, 制备染色体标本制片, 采用 FISH 技术在细胞水平上对 MYC 家族中的 *HbMYC1*、*HbMYC2*、*HbMYC3*、*HbMYC4*、*HbMYC5* 这 5 个基因进行染色体物理定位, 从而探讨 MYC 家族基因在染色体上的具体分布。实验结果有助于进一步确定该基因家族与其他功能基因在染色体上的位置关系, 进而为橡胶树辅助育种和橡胶树基因组学的研究提供分子细胞遗传学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 以巴西橡胶树热研“7-33-97”古铜期的嫩叶为实验材料, 经对二氯苯预处理 1.5~2 h 后置于 75%酒精中 -20℃ 冰箱低温保存。实验材料采自海南大学热带农林学院基地(海甸校区和儋州校区), 以及中国热带农业科学院橡胶研究所橡胶种质圃。

1.2 染色体标本的制备 参照高和琼^[4]等和李懋学^[5]等染色体标本制备方法, 主要采用酶解去壁低渗法, 用 5% 纤维素酶和 4% 果胶酶溶于磷酸盐缓冲液中配制成酶解液^[6], 于 37℃ 下酶解 1~1.5 h (酶解时间根据叶片大小的不同而有所差异)。

收稿日期 2018-03-05 修回日期 2018-04-09

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-33-YZ2), 海南省重大科技项目(ZDZX2013023)

作者简介 高豫(1992-), 女, 海南大学热带农林学院 2015 级硕士研究生, E-mail: 642820329@qq.com

通信作者 庄南生(1962-), 男, 教授, 研究方向 热带作物育种, E-mail: zhuangns@163.com

1.3 特异性引物的设计 *HblMYC* 家族基因片段来自中国热带农业科学院橡胶研究所田维敏教授实验室(登录号分别为:GU434304, HM061097, HM347338, HM347339, HM347340)。用 Primer Permier 5 对 *HblMYC* 基因家族进行引物的设计。以巴西橡胶树热研“7-33-97”基因组 DNA 为 PCR 扩增模板,筛选特异性引物(表 1)。经下列反应程序扩增:预变性(94 °C, 5 min);变性(94 °C, 1 min);退火(52~60 °C, 45 s);延伸(72 °C, 90 s);后延伸(72 °C, 10 min);保存(4 °C, ∞)。重复这样的循环 25 次。

表 1 *HblMYC* 家族基因扩增使用的特异性引物

Tab.1 The specific primers for the amplification of *HblMYC* genes

基因名称 Gene	引物序列/(5'-3') Primer sequence	引物长度/bp Primer length	扩增长度/bp Amplification length
<i>HblMYC1</i>	ATAACCCCAAGTCTCACTTGTAACCC	26	1 619
	CCTTAATATGAGATCAGCAAGCAC	24	
<i>HblMYC2</i>	CATGAAAAAGATATCAATGGAGGAG	25	1 540
	GCACTATATAGAGAAAGACATAACAG	26	
<i>HblMYC3</i>	AGATATCAATGGAGGAGATAACGTC	25	1 440
	GAGATCATAGGCTAGCAGCTAAGTT	25	
<i>HblMYC4</i>	TGACTCTACCAAAAACACAGAGAAC	25	1 506
	GACCACATTTTATGCTAGTAGCTGT	25	
<i>HblMYC5</i>	ACTACGGTGCAAAGAACGAATATTC	25	1 656
	GTTGTAGGTAGTGGACTCATTGGA	25	

1.4 荧光原位杂交 PCR 扩增得到 5 个基因 (*HblMYC1*, *HblMYC2*, *HblMYC3*, *HblMYC4*, *HblMYC5*)产物,对得到的产物进行回收,经纯化后用生物素切口平移试剂盒(Biotin-Nick Translation Mix)或地高辛切口平移试剂盒(DIG-Nick Translation Mix)标记成探针,探针纯化后用 100%去离子甲酰胺溶解, -20 °C 冰箱储存备用。荧光原位杂交的方法主要参照官锦燕^[7]等和高佳佳^[8]等,稍作改进:载玻片置于 70 °C 下 70%甲酰胺溶液,处理时间由原来的 10 min 改为 3~5 min。原位杂交液(50%去离子甲酰胺、10%硫酸葡聚糖、2× SSC、0.7 g·L⁻¹ 鲑鱼精 DNA、0.33 g·L⁻¹ 已标记探针、ddH₂O)于 99 °C 水浴锅或 PCR 仪中变性 10 min,将配制混匀的杂交液加到处理好的玻片上,盖上盖玻片指甲油封片(注意不要有气泡),于隔水式恒温(37 °C)培养箱孵育 16~24 h。单探针 FISH 检测参照高佳佳^[8]的方法,双探针 FISH 检测参照官锦燕^[7]的方法,每次经过信号级联放大反应后,分别用 1× PBS, 1× PBS(Triton-100 20 μL), 1× PBS 震荡洗涤,洗涤的时间改为 5, 5, 8 min。信号放大完成后,在标本玻片上滴加 30 μL 10 μg·mL⁻¹ DAPI(用抗淬灭剂 DABCO 稀释的 4, 6-二脒基-2-苯基吲哚)复染,盖上盖玻片,指甲油封片,暗处理显色 30 min 后于荧光显微镜下观察。

1.5 图像检测与分析 经过 DAPI 染色的玻片标本暗处理显色后用 OLYMPUS BX51 TRF 荧光显微镜观察,用 Image-Pro Plus 6.0 软件拍照。Photoshop 处理图片后,通过 Song Y^[9]等报道的信号位点距着丝点的百分距离计算方法,结合高和琼^[10]等分析的热研“7-33-97”品种的核型参数,确定染色体上扩增信号位点的具体位置。

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

2 结果与分析

2.1 *HblMYC1* 与 *HblMYC2* 基因的荧光原位杂交检测 将 *HblMYC1* 基因的扩增产物纯化后用生物素标记,将 *HblMYC2* 基因的扩增产物纯化后用地高辛标记,进行双探针荧光原位杂交检测,结果见图 1A~C

所示。由图 1-D 可知 2 个基因在有丝分裂的不同时期均检测到 2 个信号点。以高和琼^[10]等分析的热研“7-33-97”的核型参数为参考依据,对原位杂交检测的结果进行核型分析,得到原位杂交核型图。结果表明 *HblMYC1* 基因定位在 6 号染色体长臂上,到着丝点的平均百分距离为 32.56; *HblMYC2* 基因定位于第 9 号染色体长臂上,信号位点到着丝粒的平均百分距离为 47.96。核型模式图见图 2。

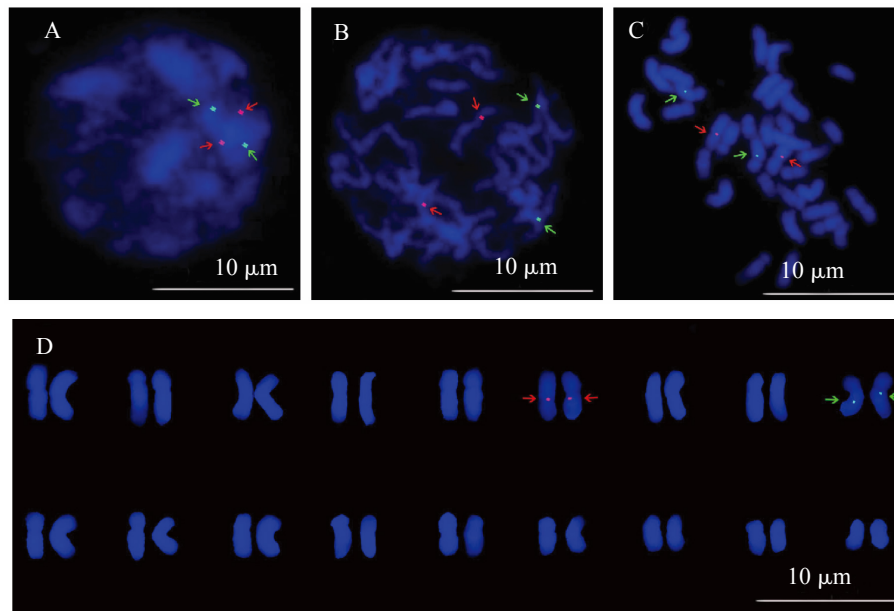


图 1 *HblMYC1* 和 *HblMYC2* 在热研“7-33-97”有丝分裂不同时期染色体上荧光原位杂交结果

A: 间期; B: 前期; C: 中期; D: 中期细胞核型图

Fig.1 FISH with *HblMYC1* and *HblMYC2* on interphase, prophase, prometaphase and metaphase chromosomes of rubber clone Reyan-7-33-97

A: interphase; B: prophase; C: metaphase; D: cell karyotype

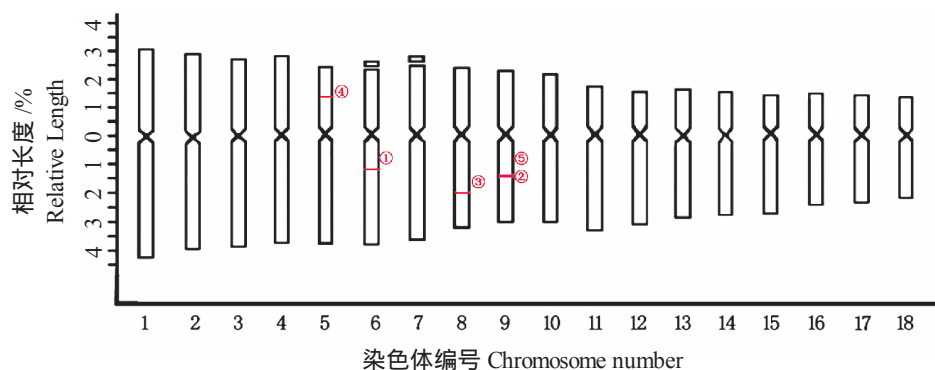


图 2 巴西橡胶树热研“7-33-97”中期染色体荧光原位杂交的核型模式图

① *HblMYC1*; ② *HblMYC2*; ③ *HblMYC3*; ④ *HblMYC4*; ⑤ *HblMYC5*

Fig.2 FISH-aimed karyoidiogram on metaphase chromosomes of rubber clone Reyan-7-33-97

2.2 *HblMYC3* 基因的荧光原位杂交检测与物理定位 用生物素标记 *HblMYC3* 基因作为探针并进行荧光原位杂交检测,可检测出在细胞有丝分裂的间期、前期和中期均有 2 个荧光信号点(图 3A~C),由此得出该基因在橡胶树热研“7-33-97”品种的基因组中存在 1 对等位基因。以高和琼^[10]等分析的热研“7-33-97”品种的核型数据为参考,对 FISH 检测的中期细胞进行核型分析,得到 FISH 核型图(图 3-D)。结果表明:*HblMYC3* 定位在 8 号染色体长臂上,到着丝点的平均百分距离为 62.77。核型模式图见图 2。

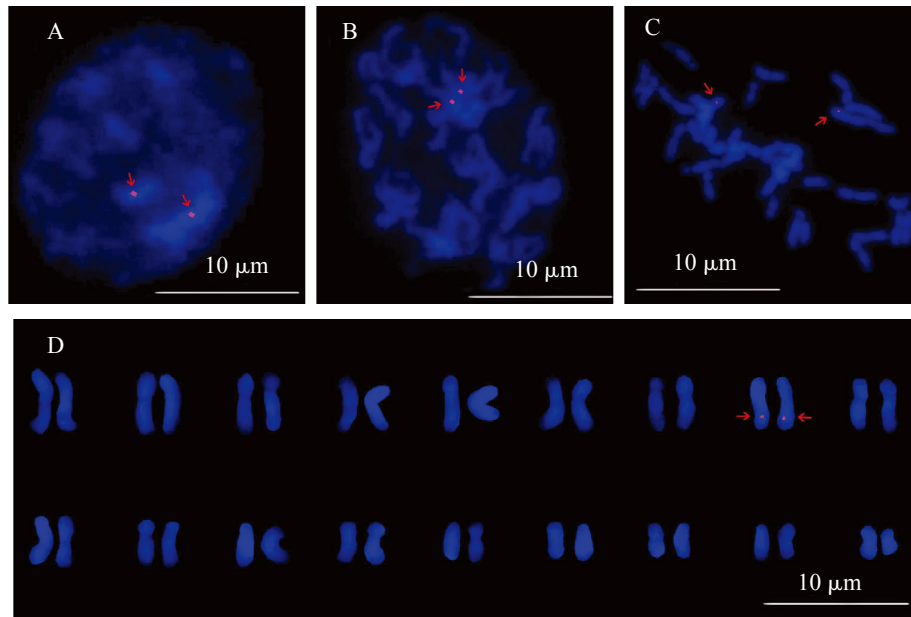


图 3 *HblMYC3* 在热研“7-33-97”有丝分裂不同时期染色体上荧光原位杂交结果

A: 间期; B: 前期; C: 中期; D: 中期细胞核型图

Fig.3 FISH with *HblMYC3* on interphase, prophase, prometaphase and metaphase chromosomes of rubber clone Reyan-7-33-97

A: interphase; B: prophase; C: metaphase; D: cell karyotype

2.3 *HblMYC4* 基因的荧光原位杂交检测与物理定位 用地高辛标记 *HblMYC4* 基因并进行原位杂交检测, 该基因在细胞有丝分裂周期的各个时期均检测到 2 个荧光信号点, 结果见图 4A~C 所示。参考高和琼^[10]等的分析数据, 对原位杂交检测结果的中期细胞进行核型分析, 得 FISH 核型图(图 4-D)。由此将 *HblMYC4* 定位在 5 号染色体短臂上, 信号点到着丝粒的平均百分距离为 55.67。核型模式图见图 2。

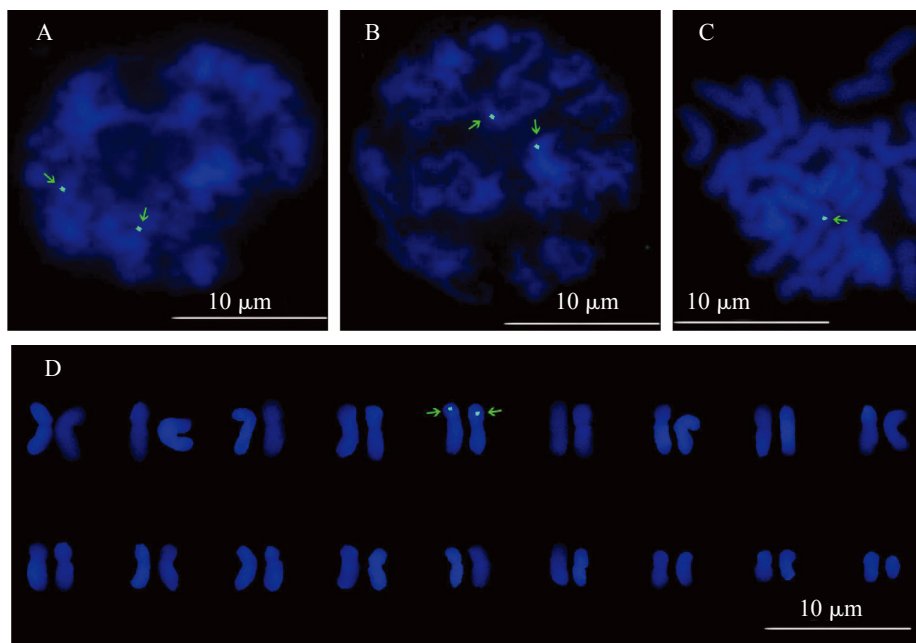


图 4 *HblMYC4* 在热研“7-33-97”有丝分裂不同时期染色体上荧光原位杂交结果

A: 间期; B: 前期; C: 中期; D: 中期细胞核型图

Fig.4 FISH with *HblMYC4* on interphase, prophase, prometaphase and metaphase chromosomes of rubber clone Reyan-7-33-97

A: interphase; B: prophase; C: metaphase; D: cell karyotype

2.4 *HblMYC5* 基因的荧光原位杂交检测与物理定位 *HblMYC5* 基因用生物素标记制作探针并进行荧光原位杂交检测, 在细胞有丝分裂周期的各个时期可检测出均有 2 个荧光信号点, 所得结果如图 5 中

A~C 图片所示,核型图如图 5 中 D 所示。由此将 *HblMYC5* 定位在 9 号染色体长臂上,信号点到着丝粒的平均百分距离为 47.22。核型模式图见图 2。

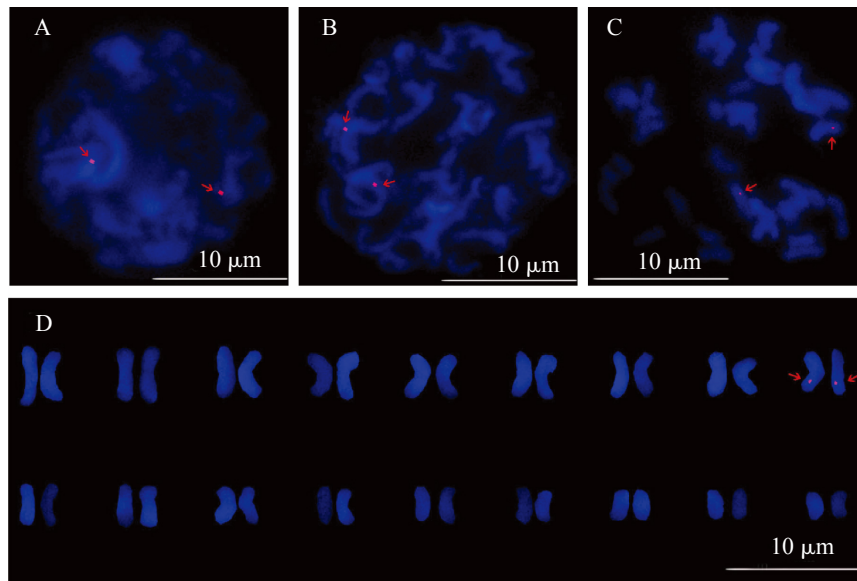


图 5 *HblMYC5* 在热研“7-33-97”有丝分裂不同时期染色体上荧光原位杂交结果

A: 间期; B: 前期; C: 中期; D: 中期细胞核型图

Fig.5 FISH with *HblMYC5* on interphase, prophase, prometaphase and metaphase chromosomes of rubber clone Reyan-7-33-97

A: interphase; B: prophase; C: metaphase; D: cell karyotype

2.5 *HblMYC2* 与 *HblMYC5* 基因的荧光原位杂交检测 通过 NCBI 对 *HblMYC2* 与 *HblMYC5* 序列查找,发现这 2 个基因位于相同的 Scaffold0103 上,且 2 个基因在全基因组上的距离只相差 10 224 bp。用双探针杂交的方法,将 *HblMYC2* 基因用地高辛标记为绿色,将 *HblMYC5* 基因用生物素标记为红色,检测出这 2 个基因在染色体分裂的各个时期均有 2 个信号位点出现,有部分重合,为黄绿色点。检测结果见图 6。*HblMYC2* 与 *HblMYC5* 均位于第 9 号染色体长臂,信号点到着丝点的平均百分距离分别为 47.96 和 47.22。

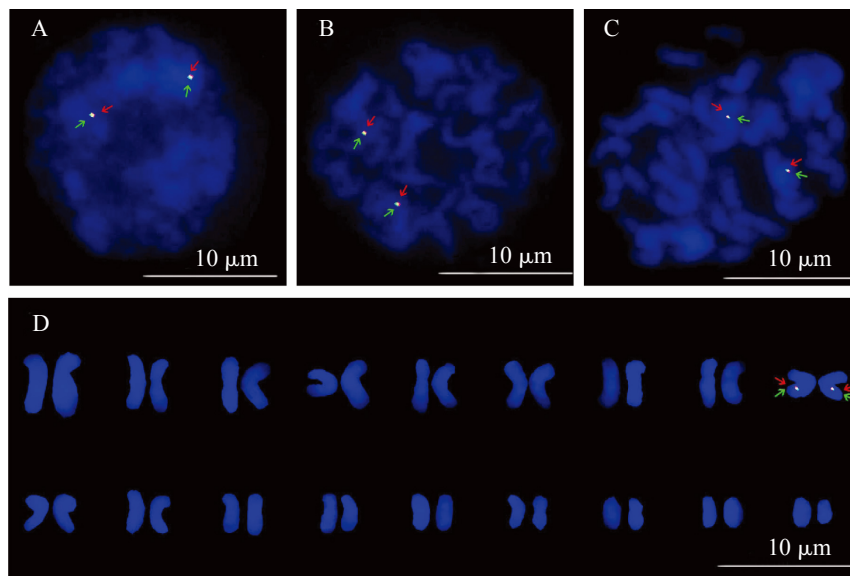


图 6 *HblMYC2* 和 *HblMYC5* 在热研“7-33-97”有丝分裂不同时期染色体上荧光原位杂交结果

A: 间期; B: 前期; C: 中期; D: 中期细胞核型图

Fig.6 FISH with *HblMYC2* and *HblMYC5* on interphase, prophase, prometaphase and metaphase chromosomes of rubber clone Reyan-7-33-97

A: interphase; B: prophase; C: metaphase; D: cell karyotype

3 讨论

2016 年 5 月,中国热带农业科学院橡胶研究所完成了巴西橡胶树热研“7-33-97”的测序工作,并发布了其基因组草图(Tang et al. 2016) [11]。在 NCBI 中查到 *HbLMYC1~5* 这 5 个基因所在的 Scaffold 依次为 Scaffold0541, Scaffold0103, Scaffold1591, Scaffold3545 和 Scaffold0103, 其中 *HbLMYC2* 和 *HbLMYC5* 位于同一个 Scaffold0103 上,2 个基因之间的距离为 10 224 bp。根据本研究对 *HbLMYC1~5* 基因的定位结果,可将对应的 Scaffold 锚定到相应的染色体上:Scaffold0541, Scaffold0103 和 Scaffold1591 分别位于第 6, 9, 8 号染色体上,而 Scaffold3545 则位于第 5 号染色体上。*HbLMYC1*, *HbLMYC3*, *HbLMYC4* 分别定位于第 6, 8 和 5 号染色体上,*HbLMYC2* 和 *HbLMYC5* 定位第 9 号染色体上。结合前人已经报道的定位基因 *HbLMYC1* 与 *HbRZF1* [12], *HbSUT3* [13], *HRT1* [14], *RT* [7], *Hev2.1* [15], *HbNAC24* [16], *HbJAZ6* [17] 都位于第 6 号染色体上,互为连锁基因;*HbLMYC2*, *HbLMYC5* 与 *HbCPT* [13], *HbNAC3* [16], *HbJAZ5* [18] 都位于第 9 号染色体上,互为连锁基因;*HbLMYC3* 与 *SRPP* [7], *Hev1.1* [15], *HbJAZ3* [16] 都位于 8 号染色体上,互为等位基因;*HbLMYC4* 与 *HbRZF3* [12], *HbNIN1* [14], *HbMyb1* [17], *HbNAC1* [16] 都位于 5 号染色体上,互为连锁基因。

单拷贝或低拷贝基因在原位杂交时信号检出难度较大 [19], 笔者采用切口平移法制备探针, DNA 酶可以使 DNA 分子的 2 条链上随机切出多个切口 [20] 从而使 DNA 分子 2 条链可被随机切成 300~600 bp 的片段, 这些片段大小有利于探针穿过细胞组织进而与靶序列结合。因此, 选用切口平移法标记的探针进行原位杂交检测可提高荧光原位杂交的效率。笔者在 FISH 检测时, 发现在大多数中期细胞中, 每个探针均能检测出现 2 个杂交信号点的理想效果, 但也存在假阳性的不理想现象。笔者认为, 出现假阳性的原因可能是在操作过程中出现以下情况: 一是配制杂交液时加探针浓度过大; 二是杂交时间过长; 三是杂交孵育过程中出现干片现象; 四是杂交后的洗脱强度不够。

参考文献:

- [1] 赵悦. 巴西橡胶树乳管细胞茉莉酸信号途径对橡胶生物合成调节的研究[D].海口:海南大学, 2011.
- [2] 沈乾, 陆续, 张凌, 等. 植物中 MYC2 转录因子功能研究进展[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2012, 30(6):51-57.
- [3] Pires N, Dolan L. Origin and diversification of basic-helix-loop-helix proteins in plants[J]. Molecular biology and Evolution, 2010, 27(4): 862-874.
- [4] 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.
- [5] 李懋学, 张纯方. 植物染色体研究技术[M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 1991.
- [6] 张志丹, 王英, 庄南生, 等. 巴西橡胶树染色体制片方法的改良及 FISH 信号检测[J]. 基因组学与应用生物学, 2018(4): 1-6.
- [7] 官锦燕. 巴西橡胶树 SUT 和 RZF 基因家族物理定位的研究[D].海口:海南大学, 2014.
- [8] 高佳佳, 王英, 高和琼, 等. 巴西橡胶树胶乳转化酶 HbNIN 基因家族物理定位的研究[J]. 热带作物学报, 2014, 35(9): 1704-1709.
- [9] Y. C. Song, J. P. Gustafson. The physical location of fourteen RFLP markers in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1995, 90(1): 113-119.
- [10] 高和琼, 庄南生, 王英, 等. 橡胶树两个品种的核型分析[J]. 武汉植物学研究, 2009, 27(5):537-540.
- [11] Tang Chaorong, Yang Meng, Fang Yongjun et al. The rubber tree genome reveals new insights into rubber production and species adaptation[J]. Nature plants, 2016, 2(6): 16073.
- [12] 官锦燕, 王英, 高和琼, 等. 巴西橡胶树 4 个环锌指蛋白基因(HbRZF)的物理定位[J]. 基因组学与应用生物学, 2014, 33(3):610-616.
- [13] 官锦燕, 王英, 高和琼, 等. 巴西橡胶树 SUT 家族部分基因物理定位的研究[C]//中国作物学会. 中国作物学会 2013 年学术年会论文摘要集. 北京: 中国作物学会, 2013:46.
- [14] 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.
- [15] 彭宝丰, 王英, 高和琼, 等. 橡胶素基因家族 4 个成员在橡胶树染色体上的定位[J]. 热带生物学报, 2016, 7(3):318-324.
- [16] 杨光涌, 郑菲, 王英, 等. 巴西橡胶树 NAC 基因家族 5 个成员的荧光原位杂交物理定位[J]. 分子植物育种, 2018, 16(2): 512-517.
- [17] 高和琼. 巴西橡胶树 *HbMyb1* 基因和 OPV-10_(390)连锁标记原位 PCR 定位的研究[D].海口:海南大学, 2008.

- [18] 李晓燕,苏莉莉,高佳佳,等. JAZ 基因家族 6 个成员在橡胶树上的物理定位[J]. 分子植物育种, 2017, 15(12): 4992-4999.
- [19] 宁华,任南,宋运淳,等. 玉米(*Zea mays* L.)盐逆境胁迫蛋白基因 *nae1* 的染色体原位杂交物理定位[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 1996(4):104-109.
- [20] 张大海. 切口平移法制备 DNA 探针的原理[J]. 中学生物学, 2015, 31(9):3-4.

Physical Location of 5 Members of MYC Gene Family on the Chromosomes in *Hevea brasiliensis*

GAO Yu^{1,2}, ZHUANG Nanshen¹, WANG Ying¹, GAO Heqiong¹

(1. Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China;

2. Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737, China)

Abstract :MYC transcription factors or Myelocytomatosis proteins (MYCs) play a very important role in the signal transduction of jasmonic acid. Five genes of the MYC gene family of *Hevea brasiliensis* had been cloned, and their functions had been reported. However, the specific locations of the MYC gene family members on the chromosome have not been reported. In this experiment, the locations of 5 genes of MYC family of *H. brasiliensis* were physically located on the chromosomes by using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique. Rubber clone Reyan 7-33-97 of *H. brasiliensis* was used as an experimental material. The results show that both *HblMYC2* and *HblMYC5* genes were located on the long arm of chromosome 9, with an average distance of 47.96 and 47.22 from the centromere, respectively; *HblMYC1* and *HblMYC3* genes were located on the long arm of 6th and 8th chromosomes, respectively, with a respective average distance of 32.56 and 62.77 from the centromere; *HblMYC4* was located on the short arm of 5th chromosome, with an average distance of 55.67 from the centromere. This study explored the specific locations of the 5 genes and their relationships on chromosomes, which can provide cytological basis for genomics and molecular marker assisted breeding of *H. brasiliensis*.

Keywords *Hevea brasiliensis*; MYC gene family; fluorescence *in situ* hybridization (FISH); physical location

(责任编辑:钟云芳)