4 Dai Y F, Qiu X F, Hsneh J L, et al. High efficient transfer and expression of hF ⑨cDNA in cultured human skin fihroblasts from hemophilia B patient by retrovirus vectors. Science in China, Series B, 1992, 35: 182~ 193
5 孙 萌, 冯仁丰, 王鸿利, 主编. 实用临床检验年册. 上海: 上海科技教育出版社, 1990
6 陈学进, 陈永福, 张克诚. 家畜转基因研究进展. 上海畜牧兽医通讯, 1997, 4: 7~ 11
7 Yull F, Harold G, Wallace R, et al. Fixing human facter ⑧(f ⑧): correction of a cryptic RNA splice enable the production of biologically active f ⑧in the mammary gland of transgenic mice. Proc Natl Acad USA, 1995, 92: 10 899~ 10 903

(1998-02-23 收稿, 1998_03_09 收修改稿)

# 大麦染色体的激光微束切割、片段分离及体外扩增

王 槐 周奕华 党本元 胡赞民 王兰岚 李良材 陈正华
(中国科学院遗传研究所, 北京 100101)

摘要 用 Nd: YAG 激光微束对大麦 7H 染色体进行切割并利用玻璃针分离了 7HS 端部片段, 对获得的染色体片段 DNA 进行了 2 次 LA_PCR(linker adaptor PCR) 体外扩增, 扩增片段长度为 500~ 3 000 bp, 大多数集中在 1 000 bp, 经 Southern 杂交分析证实扩增片段来自大麦基因组. 与前人报道相比, 本研究具有以下特点: ( ) 切割染色体细致准确、易于操作, 且费用较低. ( ) 所需底物量少, 用单一染色体片段即可进行有效扩增.

关键词 **大麦 染色体微切割 Nd: YAG 激光微束 LA-PCR**

特定染色体或染色体片段的显微切割、分离和体外扩增对于基因组研究意义十分重大. 这项技术自 1981 年建立以来[1], 经过不断发展, 现已成功地应用于人类及动物的基因组研究[2, 3]. 但是由于植物细胞与染色体的特殊性, 1991 年才首次将此技术用于植物染色体的研究[4], 而且进展相对缓慢, 到现在为止仅有十几篇报道, 主要原因是植物染色体的显微切割、分离及体外扩增技术尚不够完善, 难度较大.

目前, 微切割、微分离植物染色体的方法主要是玻璃针法[4~ 8]和 Fukui[9] 等人建立的激光法. 前者是分离植物染色体较为成熟的方法, 但难以对染色体进行准确的定位切割; 后者切割细致, 但需要底部带有特殊薄膜的小皿, 费用高且步骤繁琐. 另外, 以往报道中多用几条甚至几十条相同染色体作为模板[4, 5]进行体外扩增. 如果没有特殊材料( 如端体、三体、单体等), 同时挑取几十条相同染色体不仅费时费力, 也极难保证每次挑取染色体的准确性, 该项工作难以进行.

针对上述问题, 在本实验室工作基础上[7, 10, 11], 本研究以大麦为材料, 探索出一条简便有效的用 Nd: YAG 激光微束切割植物染色体、借助玻璃针分离染色体片段, 并用单一染色体片段作为底物进行体外扩增的程序, 为大麦染色体片段 DNA 文库的构建奠定了基础.

## 1 材料与方法

(1) 材料. 以大麦 (*Hordeum vulgare* L. )“沪麦 6 号”为实验材料, 种子由中国科学院遗传研究所李义文先生馈赠.

(2) 染色体标本制备. 取大麦种子发芽, 待根长至 0.5~ 1 cm 时, 截取根尖于冰水中预处理 24~ 36 h, 然后用卡诺固定液(甲醇: 冰醋酸= 3: 1) 固定 5 min, 移入 70% 乙醇中 4 ℃保存. 根尖于酶解液中(含 2% 的纤维素酶 Onazuka R-10 和 1.5% 的果胶酶 Pectolyase Y-23) 37 ℃消化 1~ 1.5 h 后涂片, 稍气干后 Giemsa 染色, 加盖玻片, 即可直接用于染色体的显微切割. 制片过程中所用酶解液、染色液及制片用具均经严格灭菌处理.

(3) 染色体的激光微束切割. 照射所用的激光微束仪是由中国科学院遗传研究所与重庆京渝生物激光研究所共同研制的 Nd: YAG 激光细胞显微照射系统, 能够发射 4 种波长的激光, 输出激光微束的脉宽及输出能量也均可调. 激光器引入一台相差显微镜, 激光微束可通过显微镜后聚焦到生物样品, 能造成直径小于 1 μm 的损伤; 激光器还配有屏幕监视、录象及照相系统, 可监视整个显微切割过程, 也可录像和拍照.

将新制备的染色体标本置于激光微束仪的显微镜载物台上, 先在低倍镜下找到染色体长度适中、分散良好的分裂相, 然后转换到 100 倍油镜下辨认出特定的染色体, 并通过目镜内的十字线瞄准染色体待切割部位, 调节好激光微束的脉宽、波长和输出能量后, 发射脉冲切割染色体, 整个切割过程通过屏幕监测.

(4) 染色体片段的显微分离. 激光切割染色体后, 液氮冰冻去盖片, 在倒置显微镜(Olympus 1M) 下用手工拉制的玻璃针(尖端直径为 1~ 3 μm, 向下弯曲 120°) 借助 Leitz 显微操作器(Code-No, 933114) 显微分离染色体片段. 整个分离过程基本上参照胡赞民[7] 等人的方法, 略有改进. 最后将粘有染色体片段的玻璃针尖折断于含有 20 μL 蛋白酶 K (5 ng/μL, Sigma 公司, 1 × $T_4$ DNA 连接酶缓冲液(Promega 公司) 配制) 的 0.5 mL Eppendorf 管中, 高速离心机 12 000 r/min 离心 30 s, – 20 ℃保存待用.

(5) Sau3A 接头(linker adaptor) 的制备及染色体片段的体外扩增. 采用 Sau3A 连接接头 PCR(Linker- adaptor PCR) 的方法扩增微分离得到的染色体片段, 接头的制备、染色体片段的蛋白酶 K 消化、接头连接及 2 轮 PCR 反应过程基本参照 Albani[5] 等人的方法.

对照设有两种, 阳性对照加入约 10 pg 大麦基因组 DNA 为初始底物, 阴性对照中不加任何底物, 所有反应过程同上.

(6) 大麦基因组 DNA 提取及 Southern 杂交分析. 用 CTAB 法从大麦幼苗叶子中提取基因组 DNA, 具体过程参见文献[12]. 取约 2 μg 基因组 DNA 用 EcoR iv(Promega 公司) 充分酶切后, 与对照及染色体片段 DNA 的第 2 次 PCR 产物一起电泳并吸印转移至 Hybond$^+$ 尼龙膜(Amersham) 上, 然后用地高辛标记的基因组 DNA 探针进行杂交. 转膜、探针标记、杂交、显色过程详见宝灵曼公司的 The DIG system User's Guide for Filter Hybridization (1995).

## 2 结果

### 2.1 染色体的激光微束切割与染色体片段的显微分离

根据大麦染色体中期或前中期的形态特征, 可以准确地辨认出 6, 7 号染色体. 这 2 条染色体短臂均带有随体, 但是 7H 染色体与 6H 染色体相比又具有长度大、臂比大、随体小的特点, 易于识别(图 1), 故我们选择 7H 染色体作为切割目标. 经过反复实验表明, 当激光输出波长 0.53 μm, 脉宽 10 ns, 输出能量约 10 mJ 时, 能取得较好的切割效果, 样品损伤光斑直径可小于 1 μm. 我们采用上述参数, 对 7H 染色体发射激光微束脉冲, 同时微调载片位置, 结果 6~ 8 个脉冲后即可切断染色体, 可按此法将一条染色体切为多段(图 2).

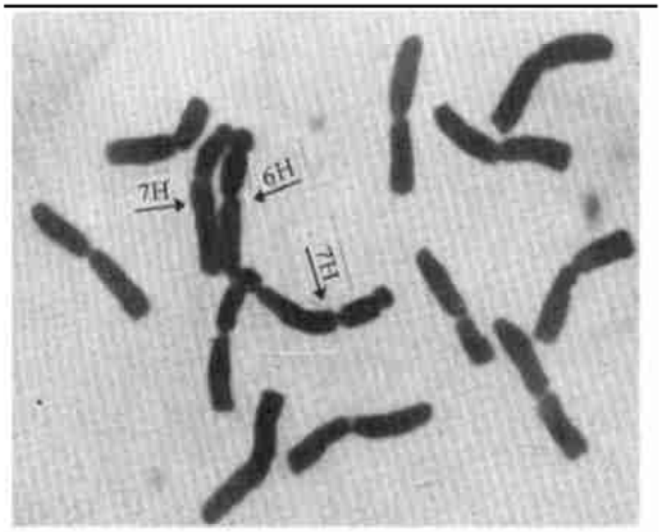


图 1 大麦根尖细胞有丝分裂中期染色体($2n=14$)
箭头所示为 6H, 7H 染色体, × 1 098



图 2 7H 染色体被 Nd: YAG 激光微束切为多段,
× 1 098



图 3 7H 端部染色体片段被玻璃针取走后的
染色体分裂相
箭头所示为染色体被移走区域, × 1 098



图 4 染色体片段粘附于玻璃针上,
× 430

按照“材料与方法”中所述程序用玻璃针将切割后的 7H 染色体带随体的端部放入含蛋白酶 K 的 Eppendorf 管中, 图 3 是将 7H 短臂端部取走后的染色体分裂相, 图 4 为染色体片段粘附于玻璃针上的情形.

**2.2** 染色体片段的体外扩增与 **Southern** 杂交分析

大麦染色体片段 DNA 及阳性对照经第 1 次 PCR 扩增后即得到了微弱的扩增信号(未显示), 阴性对照无任何扩增信号. 第 2 次 PCR 产物电泳结果如图 5 所示: 染色体片段 DNA 的扩增产物显示为 0.5~ 3 kb 的较强连续带, 其中有些区域要明显亮于其他部分; 阳性对照也有信号较强的连续带, 但亮度比较均匀, 长度范围也较前者大; 阴性对照中仍无扩增信号. 以大麦基因组 DNA 为探针进行 Southern 杂交分析表明, 杂交所得带型与电泳结果完全相符(图 6), 证明上述 PCR 扩增产物来自大麦基因组, 以单个染色体片段为底物即可在体外用 LA-

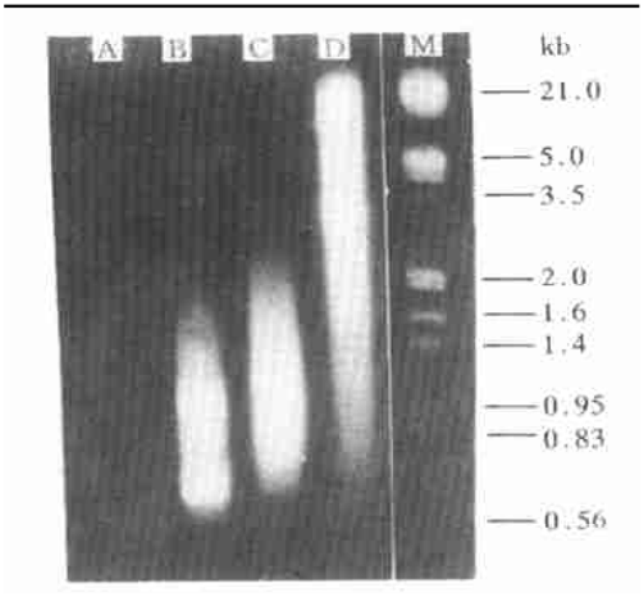


图 5 2 轮 PCR 后的扩增结果
A ——阴性对照; B ——大麦 7H 染色体单一片段第 2 轮 PCR 扩增产物; C ——阳性对照: D ——EcoR iv酶切基因组 DNA; M ——EcoR iv/Hind ㉔双酶切 λDNA

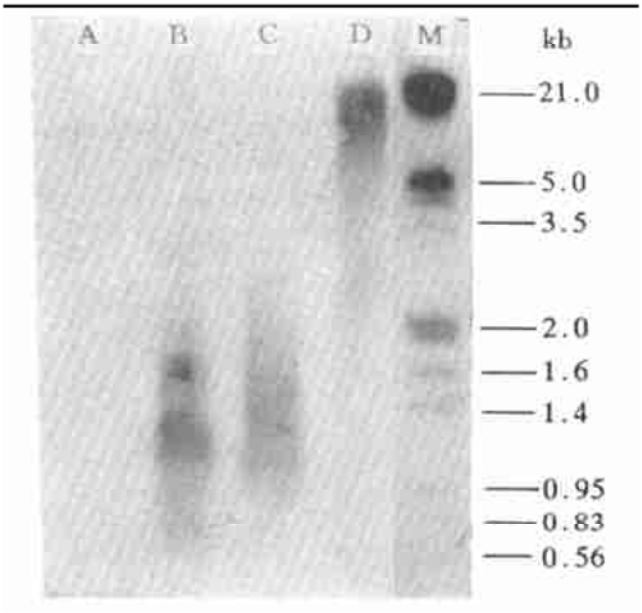


图 6 DIG 标记的大麦基因组 DNA 与图 5 中样品进行 Southern 杂交分析结果

PCR 的方法成功扩增其 DNA.

## 3 讨论

微切割、微分离并克隆特定植物染色体及染色体片段是细胞生物学与分子遗传学结合的桥梁, 利用此技术可得到定位于特定染色体( 区域) 的分子标记. 这项技术不断发展, 目前已有利用单一染色体作为底物进行成功扩增的报道, 进一步建立精细切割特定染色体区域并以单一染色体片段为底物进行扩增的技术很有必要.

目前, 玻璃针法和激光法是微切割、微分离植物染色体的两种主要手段. 相对而言, 激光法操作较易掌握, 切割也更细致准确. Fukui[9] 等人建立了利用激光微束微切割、微分离植物染色体的技术, 但这种方法需要价格昂贵的特殊小皿, 操作也较复杂. 我国学者王兰岚[10, 11] 等人首次在国内成功采用氩离子激光微束切割了蚕豆、小麦、大麦、玉米、小冰麦等植物的染色体, 但作者强调氩离子激光热效应大, 容易对切口附近的染色体 DNA 造成较大损伤, 并且在当时未能将切割的染色体片段分离出来.

本研究在本实验室已有工作的基础上[7, 10, 11] 探索了一种简便有效的 Nd: YAG 激光微束与玻璃针结合使用切割、分离植物染色体片段的方法. 我们使用的 Nd: YAG 激光器能以极短脉冲的形式( 脉宽 10 ns) 发射激光, 与前人所用的氩离子激光相比, 大大降低了热效应; 另外, 选用偏离核酸光吸收峰值的长波长激光( 0.53 μm) 进行切割也有助于减小切口处的 DNA 损伤. 由于使用激光微束进行切割, 因此在染色体分裂相上面加盖玻片不会影响切割效果, 盖玻片的存在不仅减少了切割过程中外源 DNA 分子的污染, 而且为使用油镜更准确地识别目的染色体和定位切割靶点创造了条件. 再者, 因为采用玻璃针法分离切割后的染色体片段, 所以用普通载玻片进行染色体制备即可达到要求. 可见, 玻璃针-激光法不仅切割细致准确, 而且

费用也相对较低.

在过去的研究中,真正用一条染色体作底物进行成功PCR扩增的报道只有一篇[6],用单个染色体片段作模板进行体外扩增的报道本文尚属首次. 本研究用LA_PCR的方法成功扩增了挑取的单一染色体片段,并且得到的扩增片段(大多数片段为600~ 2 000 bp)较前人的报道(大多数片段为300~ 1 000 bp)大. 我们认为扩增产物大小可能与下列因素有关:( )染色体制片之前材料的固定. 缩短在卡诺固定液中的固定时间或者直接用乙醇固定,可降低或杜绝醋酸的脱嘌呤作用,保持模板DNA的完整性有助于大片段的扩增. ( )Sau3A对染色体DNA的酶切程度. Sau3A在酶量相对较少或酶切时间较短的情况下,会导致染色体片段DNA的部分酶切,模板DNA大从而扩增出大片段产物的机会要多一些. ( )所用的Taq酶及其他试剂. ( )染色体DNA的自身结构. 本研究中阳性对照的扩增片段比染色体片段DNA的扩增片段要大一些,估计与前两个原因有关. 另外阳性对照的带比较均匀,而染色体片段DNA扩出的带则有的区域特别亮,这可能与染色体的DNA结构有关(我们挑取的这段染色体带随体,具有高度重复序列,可能由这些重复序列来的扩增产物较多且大小相近,从而形成较亮的带),当然这还需要进一步的研究.

本研究说明,将激光微束与玻璃针结合使用切割分离染色体不仅兼具了切割细致精确和费用低的特点,而且分离得到的染色体片段完全可用于体外扩增,这为将来染色体特定区域的微切割、微克隆工作的深入展开奠定了基础.

致谢 本工作为中国科学院生物科学与技术研究特别支持课题.

## 参 考 文 献

1 Scalenghe F, Turco E, Edstrom J E, et al. Microdissection and cloning of DNA from a specific region of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. Chromosoma, 1981, 82: 205~ 216
2 夏家辉,杜 娟,戴和平,等. 人类7号染色体专特性探针池的构建与应用. 实验生物学报,1994,27(3):321~ 329
3 傅俊江,夏家辉,龙志高,等. 一例智力低下患者7q+ 标记染色体的来源鉴定. 实验生物学报 ,1996,29(2):151~ 157
4 Sandery M J, Forster J W, Macadam S R, et al. Isolation of a sequence common to A_and B_chromosoms of rye (*Secale cereale*) by microcloning. Plant Mol Biol Rep, 1991, 9: 21~ 30
5 Albani D, Cote M J, Armstrong K C, et al. PCR amplification of microdissected wheat chromosome arms in a simple "single tube" reaction. Plant J, 1993, 4: 899~ 903
6 Chen Q F, Armstrong K C. Characterization of a library from a single microdissected oat (*Avena sativa* L.) chromosome. Genome, 1995, 38: 706~ 714
7 胡赞民,崔丽华,王兰岚,等. 王百合单条染色体和染色体片段的分离. 遗传学报,1997, 24(3): 278~ 281
8 宋文芹,崔香芹,许文胜,等. 蚕豆大M染色体长臂端部的显微切割与PCR扩增. 科学通报,1996,41(4): 361~ 363
9 Fukui K, Minezawa M, Kamisugi Y, et al. Microdissection of plant chromosomes by argon_ion laser beam. Theor Appl Genet, 1992, 84: 787~ 791
10 王兰岚,陆仲康,黄力全,等. 激光微束切割植物染色体的研究. 中国激光,1991,18(4):313~ 316
11 王兰岚,宋桂英,徐正平,等. 激光微束切割小冰麦异附加系染色体的研究. 遗传学报,1997,24(3):238~ 240
12 傅荣昭,孙勇如,贾士荣. 植物遗传转化技术手册. 北京: 中国科学技术出版社,1994. 135

(1997-12-23收稿)