

应用 DOP-PCR 与染色体涂染技术鉴别赤麂的 Y 染色体

单祥年^{1,2}, 张悦², 王毅², 刘宁生², 鲁晓萱²,
聂文惠³, 杨凤堂³, 王金焕³, 陈玉泽³

(1. 南京师范大学生命科学学院, 南京 210097)

(2. 东南大学医学院生物教研室, 南京 210009)

(3. 中国科学院昆明细胞动物所, 昆明 650223)

[摘要] 流式细胞仪分离小麂的 Y 染色体, 并应用 DOP-PCR 扩增后标记作为探针, 分别与雄性及雌性赤麂中期核型进行染色体涂染. 结果表明, 只有雄性赤麂 Y₂ 染色体与探针有明显的杂交信号, 说明只有 Y₂ 染色体与赤麂的性别决定相关, 排除了赤麂 Y1 染色体在性别决定中的作用.

[关键词] 赤麂; 性染色体; DOP-PCR; 染色体涂染

[中图分类号] Q343.2; Q953; [文献标识码] A; [文章编号] 1001-4616(2001)02-0071-04

0 引言

鹿属动物的细胞遗传学研究一直是国内外热门的话题. 赤麂 $2n = 6\text{♀}, 7\text{♂}$, 是哺乳动物中已知染色体数目最少的种类^[1], 只分布于印度、缅甸和我国的云南省, 并已成为研究遗传毒理学、细胞周期最好的模式动物. 小麂与赤麂同属一个亚科, 其染色体数目为 $2n = 46$, 雄性只有 1 条 Y 染色体. 施立明^[2]等对赤麂、小麂及其杂交子一代的染色体 G 带带型分析表明, 这两种鹿的核型具有高度同源性, 并发现如果将小麂的染色体按照一定的顺序排列出来, 和赤麂的染色体 G 带带型非常相似, 推测小麂的祖先通过串联易位形成今天的赤麂核型. 雄性赤麂和雌性小麂杂交后可以得到第一代杂种, 也可间接说明它们之间的亲源关系非常近. 那么在赤麂胚胎的早期分化过程中究竟是那一条 Y 染色体起着性别决定的作用, 还是两条 Y 染色体都起决定作用以及赤麂的核型命名是否合适? 这是一个有趣而非常有研究价值的问题, 对于揭示哺乳动物性别决定机制的研究具有重要意义, 并对珍稀动物的人工繁殖、物种保护以及研究其与鹿科其它动物之间进化关系都有重要作用.

1 材料与方法

1.1 材料

小麂雄性、赤麂雄性和雌性细胞株均由胚胎肺组织培养而来, 引自中国科学院昆明动物研究所.

收稿日期: 2000-09-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 39670393)

作者简介: 单祥年, 1938 —, 南京师范大学生命科学学院教授、博士生导师, 从事遗传学的教学与研究.

1.2 方法

1.2.1 赤麂中期染色体核型的制备

细胞培养成致密单层后加入秋水仙素使其终浓度为 $0.4 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 0.6 \mu\text{g}/\text{mL}$ 营养液 37°C 继续培养 $6 \sim 10 \text{ h}$,低渗、固定、制片按常规处理。

1.2.2 小鹿染色体的制备及分离

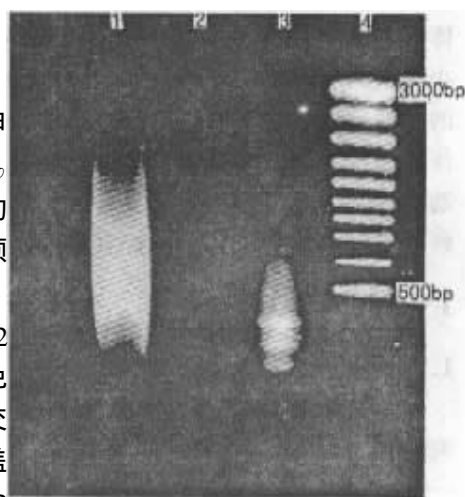
在密度已达 80% 的培养瓶中加入 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 秋水仙素 37°C 5 h ,有丝分裂间期的细胞洗脱下来 400 g 离心 5 min .然后将细胞沉淀悬浮在 10 mL 低渗的缓冲液中在室温中静置 15 min 破裂细胞 400 g 离心 8 min 后 ,沉淀悬浮在 $500 \mu\text{L}$ TBA 缓冲液($15 \text{ mmol}/\text{L}$ Tris , $0.2 \text{ mmol}/\text{L}$ 精胺 , $0.5 \text{ mmol}/\text{L}$ 亚精胺 , $2 \text{ mmol}/\text{L}$ EDTA , $0.5 \text{ mmol}/\text{L}$ EGTA , $80 \text{ mmol}/\text{L}$ KCl , $14 \text{ mmol}/\text{L}$ 巯基乙醇 , 0.25% Triton-X100 pH7.2)中 ,冰浴 10 min ,振荡 $10 \sim 15 \text{ s}$,使染色体释放到上清液中 ,再用 $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ 色霉素 A3 , $2 \text{ mmol}/\text{L}$ MgSO_4 , $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33 258 固定染色体至少 2 h .染色体分离前 10 min ,加入亚硫酸钠和柠檬酸钠(终浓度分别为 10 , $25 \text{ mmol}/\text{L}$) .制备好小鹿雄性细胞株的染色体放置 FACStar 正向分离器(Becton Dickinson)中 ,分离出小鹿的 3 号和 Y 染色体 ,每种各 300 条染色体分别置于 $500 \mu\text{L}$ 试管中 ,加入 $33 \mu\text{L}$ 无菌水 , -20°C 保存。

1.2.3 DOP-PCR 制备小鹿染色体探针

DOP-PCR 引物 6-MW 序列 : $5'-\text{CCGACTCGGNNNNNNATGTGG}-3'$ (N = 任意碱基) ,由上海生工公司合成。 $50 \mu\text{L}$ PCR 反应体系 : $10 \times$ TAPS Buffer($250 \text{ mmol}/\text{L}$ TAPS pH 9.3 , $500 \text{ mmol}/\text{L}$ KCl , $20 \text{ mmol}/\text{L}$ MgCl_2 , $10 \text{ mmol}/\text{L}$ dithiothreito) $5 \mu\text{L}$, 0.1% W₁ detergent $2.5 \mu\text{L}$,分离的染色体 $5 \mu\text{L}$, dNTPs ($2 \text{ mmol}/\text{L}$) $4 \mu\text{L}$, Taq 酶 ($5 \text{ U}/\mu\text{L}$) $0.5 \mu\text{L}$, 6-MW 引物($25 \text{ pmol}/\mu\text{L}$) $5 \mu\text{L}$,加无菌水至 $50 \mu\text{L}$.并设阳性对照(随机选取 3 号常染色体)及阴性对照(不加 DNA) . PCR 反应参数为 :第 1 周期 : 94°C 9 min ;第 2 周期 : 94°C 1 min 30°C 1.5 min 72°C 3 min 9 个循环 ;第 3 周期 : 94°C 1 min 62°C 1 min 72°C 3 min 30 个循环 ; 72°C 延伸 10 min .取 $2 \mu\text{L}$ DOP-PCR 产物以 biotin-16-dUTP 标记 ,其中 dTTP $125 \mu\text{mol}/\text{L}$, Biotin-16-dUTP $100 \mu\text{mol}/\text{L}$,其他条件不变。取 $5 \mu\text{L}$ 产物在 1% 琼脂凝胶电泳检查扩增产物。

1.2.4 染色体涂染

用杂交缓冲液将 $100 \sim 150 \text{ ng}$ biotin 标记的染色体特异性涂染探针稀释至 $15 \mu\text{L}$.制备好的片子在 70% 甲酰胺(以 $2 \times \text{SSC}$ 稀释)变性 $1.5 \sim 2 \text{ min}$,在冰冷的 70% 乙醇中止反应 ,并在 70% , 70% , 90% , 90% , 100% 的乙醇系列中脱水。染色体特异性涂染探针在 65°C 中预变性 10 min ,在 37°C 预杂交 60 min 除去重复 DNA。 $12 \sim 15 \mu\text{L}$ 预杂交过的探针滴到载波片上 ,盖上 $22 \text{ mm} \times 22 \text{ mm}$ 盖玻片 ,四周用胶封住 ,放置在 42°C 过夜。为了避免探针自身的重复序列杂交 ,探针变性后 ,冰浴保存。杂交后 ,片子放置在 $2 \times \text{SSC}$ 中 $42^\circ\text{C} \sim 45^\circ\text{C}$ $5 \sim 10 \text{ min}$ 泡开盖玻片 ,然后在 50% 甲酰胺/ $2 \times \text{SSC}$ 中 $42^\circ\text{C} \sim 45^\circ\text{C}$ 5 min 2 次 $2 \times \text{SSC}$ 洗涤 2 次 ,在 $4 \times \text{TNFM}$ 中 37°C 固定至少 10 min . Avidin-Cy3 ($4 \times \text{TNFM}$ 稀释至 $1:500$)加到杂交区内 ,上覆 Nescofilm , 37°C 湿盒内孵育 20 min , $4 \times \text{TNFM}$ 42°C



1: Y 染色体 2 阴性对照(未加任何 DNA) ,
3 阳性对照(3 号染色体) 4 :Marker

图 1 小鹿染色体 DOP-PCR 扩增结果

5 min 3 次.片子用 Nikon Microphot-SA 荧光显微镜观察,图像用致冷 CCD 照相.

2 结果

2.1 DOP-PCR 的扩增结果

DOP-PCR 扩增小麂 Y、3 号染色体的产物约为 100 bp ~ 2 000 bp 的片段,其浓度约为 50 ~ 100 ng/ μ L.

2.2 染色体涂染结果

以 biotin 标记的小麂 Y 染色体探针与雌性及雄性赤麂中期染色体杂交结果表明:雌性赤麂未见杂交信号,雄性赤麂 Y₂ 染色体中可见明显杂交信号,其余染色体均无杂交信号.(图 2、3).说明赤麂只有 Y₂ 染色体与小麂 Y 染色体具有同源性,这意味着在赤麂的性别决定中只有 Y₂ 是真正起作用的性染色体.

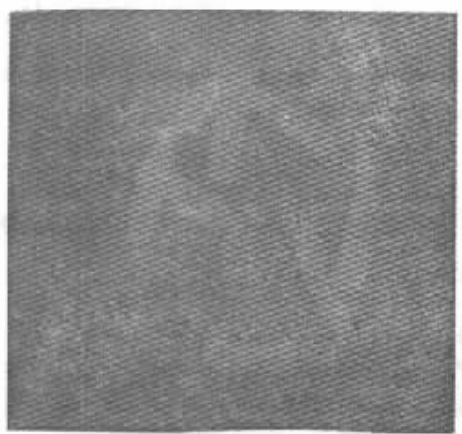


图 2 雌性赤麂染色体涂染结果

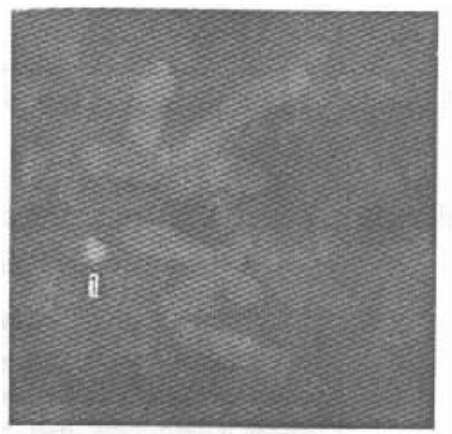


图 3 雄性赤麂染色体涂染结果

3 讨论

作为为荧光原位杂交(FISH)的一种特殊应用,染色体涂染是用某个染色体的 DNA 片段混合物通过荧光标记检测中期或间期细胞中该染色体最有效的方法^[3].亦可用来比较相近物种中染色体的同源性^[4].

早期染色体涂染探针是从该染色体文库中获得特别烦琐且难度大,从而限制了染色体涂染在比较细胞遗传学中的应用.然而最近发展起来的简并寡核苷酸引物 PCR(DOP-PCR)可以从少量的某染色体 DNA 扩增制备涂染探针,从而解除了这种限制^[5].DOP-PCR 是一种通用引物扩增方法,可以大量扩增人们需要的目的模板 DNA.DOP-PCR 的原理是在足够低的复性温度下,只有引物 3'端的 6 个特异性碱基与模板 DNA 结合(理论上模板 DNA 上每 4⁶≈4 kb 中就有一个结合位点),因此任何 6 个特异性序列都可以按这样的频率与模板 DNA 结合,进行高密度的扩增,所以它的扩增产物可以完整地代表原始 DNA 样品.这种方法特别适用于 DNA 模板量较少时(如单个流式分离的单个染色体),可成功制备便于遗传操作的模板 DNA.本文应用此方法将流式细胞仪分离的小麂 Y 染色体进行了多次扩增,应用于染色体涂染研究,避免了重复价格昂贵的流式细胞分离染色体技术.

我们应用流式细胞技术、DOP-PCR 及染色体涂染技术等较为先进的细胞及分子生物技术,在国内对雄性赤麂的性染色体进行了研究.证实赤麂的 Y_2 染色体与小麂的 Y 染色体同源,而赤麂的 Y_2 染色体正是 Sry 基因所在的染色体(另文发表).从而证实了赤麂的 Y_2 染色体是与性别相关的真正的 Y 染色体,因此雄性赤麂的性染色体是否用 XY_1Y_2 表示,则待商榷.

[参考文献]

- [1] 施立明.赤麂的核型[J].动物学报,1976 22 :116.
- [2] 施立明,叶良英.赤麂、小麂及其杂种 F1 的比较细胞学研究[J].自然杂志,1979 4 :6—7.
- [3] Pinkel D, Landegent J, Collins C. Fluorescence in situ hybridization with human Chromosome-specific libraries detection of trisomy-21 and translocation of chromosome-4 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988 85 :9238—9142.
- [4] Wienberg J, Stanyon R. Chromosome painting in mammals as an approach to comparative genomics [J]. Current Opinion in Genetics & Development, 1995 5 :792—797.
- [5] Telenius H, Peltmear A H, Tunnacliffe N P. Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow sorted chromosomes [J]. Genes, Chromosomes & Cancer, 1992 4 :257—263.

Identification of Y Chromosome of *Muntiacus Muntjac Vaginalis* by Chromosome Painting and DOP-PCR

Shan Xiangnian^{1 2}, Zhang Yue², Wang Yi², Liu Ningsheng², Lu Xiaoxuan²
Nie Wenhui³, Yang Fengtang³, Wang Jinhuan³, Chen Yuzhe³

(1. College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, PRC)

(2. Department of Biology, Medical College, Southeast University, Nanjing 210009, PRC)

(3. The Kunming Institute of Zoology of the Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, PRC)

Abstract :The Y chromosome of *M. reevesi* were sorted by fluorescence activated chromosome sorting and were amplified and labeled by DOP-PCR. Painted probes of *M. reevesi* were hybridized onto metaphase spreads obtained from female and male of *M. m. vaginalis*. Strong signals were detected only on Y_2 chromosome. That indicates Y_2 is the real sex chromosome in *M. m. vaginalis*.

Key words :*M. m. vaginalis* ;sex chromosome ;DOP-PCR ;chromosome painting

[责任编辑 孙德泉]