

# LA-PCR 法制备赤鹿 Y<sub>2</sub> 涂染探针与原位杂交

粘伟红, 潘丹岷, 曹祥荣, 张锡然

(南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210097)

**[摘要]** 应用显微切割技术获得赤鹿的 Y<sub>2</sub> 单条染色体, 经 LA-PCR(linker-adaptor PCR) 扩增后用 DIG 标记制备探针, 然后用 Southern blot 杂交法对所制备的探针进行验证并对毛冠鹿的中期核型进行原位杂交。结果表明: 用该法制备的涂染探针是成功的, 原位杂交也获得了阳性结果, 可以初步验证毛冠鹿中的 Y 染色体。

**[关键词]** LA-PCR, Southern 杂交, 原位杂交, 赤鹿, 毛冠鹿

**[中图分类号]** Q243 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2006)02-0078-03

## Label Y<sub>2</sub> Paint Probes of *Munticus Muntjac Vaginalis* by LA-PCR and *in situ* Hybridization

Nian Weihong, Pan Danmin, Cao Xiangrong, Zhang Xiran

(School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

**Abstract:** Y<sub>2</sub> chromosome of *M. m vaginalis* is obtained by microdissection technology, and probes are made with DIG labels after the DNA copies by LA-PCR (linker-adaptor PCR) are amplified. Labeled probes are detected by Southern blot hybridization, and *in situ* hybridization of the metaphase karyotype of *Elaphodus cephalophus* are made. The results indicate that it is successfully to make the paint probe with the method, and masculine results are also obtained in the *in situ* hybridization, and thus the Y chromosome of *Elaphodus cephalophus* can be proved.

**Key words:** LA-PCR, Southern blot hybridization, *in situ* hybridization, *M. m vaginalis*, *Elaphodus cephalophus*

毛冠鹿 (*Elaphodus cephalophus*) 属于鹿亚科毛冠鹿属动物, 主要分布在我国东南及西南等省。迄今已在毛冠鹿中发现了 6 种不同核型<sup>[1-5]</sup>, 不同核型间在染色体数目和形态上存在一定的差别, 比较分析可以看出这种差别主要集中在 2 条较大的异染色质丰富的染色体上, 而且毛冠鹿的这种核型多态可能主要是由于性染色体多态引起的。本实验室采用性染色体连锁基因在单条染色体上的定位已证实了其中的 X 和 Y 染色体<sup>[5]</sup>。我们希望利用原位杂交技术对毛冠鹿的 Y 染色体加以验证。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

赤鹿细胞株 (KIZ-7901): 为中国科学院昆明动物所建立, 材料来自云南一雄性赤鹿的肺组织。

毛冠鹿细胞株 (KIZ-81A): 为张锡然等人建立, 材料来自浙江一雄性毛冠鹿的肺组织。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 染色体制片

当细胞呈对数增长并形成致密单层时加入秋水仙素至终浓度为 0.4 μg/mL, 6 h 后终止培养。胰酶消

收稿日期: 2005-06-20.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30370789, 39970388).

作者简介: 粘伟红, 女, 1981—, 硕士研究生, 主要从事细胞遗传及分子遗传的学习与研究. E-mail: nwh0927@yahoo.com.cn.

通讯联系人: 张锡然, 女, 1941—, 研究员, 博士生导师, 主要从事细胞遗传与分子遗传学研究. E-mail: zhangxiran@njnu.edu.cn

化法收集细胞,37℃下 0.4% KCl 中低渗处理 20 min,室温下 3:1 的甲醇:冰醋酸固定 15 min,共固定 2 次,然后按常规空气干燥法制片.用于切割的染色体只需固定 1 次,5 min 即可.

1.2.2 显微切割单条染色体

显微操作仪、操作台及工作间在使用前用紫外线照射 30 min.在高倍显微镜下选择分散较好便于切割的分裂相,调节切割针进入视野,切割所需的赤鹿 Y<sub>2</sub> 单条染色体,每一条染色体放入一个 PCR 薄壁管中.

1.2.3 单条染色体的 LA-PCR 扩增及扩增片段的 DIG 标记

切割的单条染色体先用蛋白酶消化和 Sau3A I 酶切,用接头连接之后用与接头互补的序列作为引物 (5' CGGGAATTCTGGCTCTGCGACATG 3') 进行两轮 LA-PCR 扩增,第二轮 PCR 时取 2 μL 第一轮 PCR 产物作模板,然后以第二轮 PCR 产物作为模板,PCR 法进行 DIG 标记.标记试剂盒为 PCR DIG Labeling Mix<sup>PLUS</sup>,Roche 公司产品.

1.2.4 Southern blot 验证

毛冠鹿基因组 DNA 用 BamH I 酶切,1.0% 琼脂糖凝胶电泳,碱变性后转到尼龙膜上,烤膜后备用.杂交时先将膜装入含有预杂交液的杂交袋中 68℃ 预杂交 3 h.取 1 μL DIG 标记的探针加入 6 × SSC 中,100℃ 变性 5 min,立刻冰上放置 5 min,然后加入杂交袋中 68℃ 杂交过夜.次日取出膜按试剂盒说明进行洗膜、显色.使用的试剂盒为 DIG Luminescent Detection Kit, Roche 公司产品.

1.2.5 原位杂交

制备好的毛冠鹿染色体标本载玻片经过除 RNA、除蛋白、固定等预处理之后,在 73℃ 的变性液中变性 5 min,再在冷的 70%、85%、100% 乙醇中脱水备用.探针杂交液在 73℃ 变性 5 min 后,立即冰上放置 3 min,再在 37℃ 水浴中预杂交 1 h,以封闭探针中的非特异片段.预杂交过的探针滴加到载玻片上,盖上盖玻片并用石蜡封好,37℃ 湿盒中杂交过夜.次日采用酶促显色法 (DIG Luminescent Detection Kit Roche) 和荧光法两种方法进行信号检测.前者按照试剂盒说明进行,后者参照黄浩杰等<sup>[6]</sup>的方法略加修改.

2 结果与讨论

2.1 LA-PCR 扩增结果

结果见图 1.图 1 中第一泳道为 MakerDL2000,第二泳道为 Y<sub>2</sub> 单条染色体 LA-PCR 扩增产物.从图中可以看出扩增产物的片段大小主要集中在 750 bp ~ 2 000 bp 之间.

2.2 Southern blot 检测结果

见图 2.图 2 中 DIG 标记的探针与经过 BamHI 酶切的雄性毛冠鹿基因组 DNA 进行 Southern 杂交,结果检测到了几条明显的条带,表明我们在 PCR 过程中已将 DIG 标记到了目的序列上,探针的制备基本上是成功的.

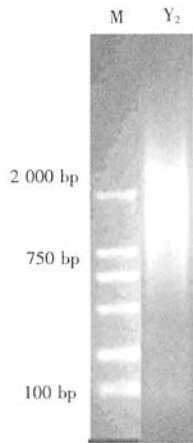


图 1 赤鹿 Y<sub>2</sub> 单条染色体 LA-PCR 扩增结果



图 2 赤鹿 Y<sub>2</sub> 涂染探针 Southern blot 结果

### 2.3 原位杂交结果

从图 3 和图 4 中可以看出箭头所示的近端着丝粒染色体几乎完全被信号覆盖,另外在许多染色体的着丝粒区和一条较大的端着丝粒染色体的异染色质区也出现了阳性信号,其中箭头所示为 Y 染色体.



图 3 酶促显色法检测结果,箭头示 Y 染色体

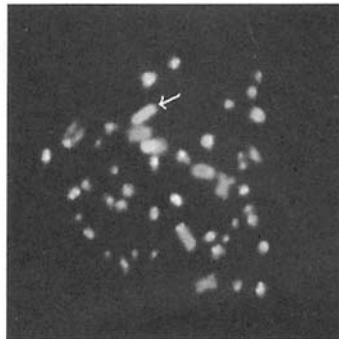


图 4 荧光法检测结果,箭头示 Y 染色体

## 3 讨论

赤麂和毛冠鹿同属于鹿亚科,亲缘关系很近.单祥年等曾用小鹿的 Y 染色体涂染探针证实了赤麂中的  $Y_2$  是真正的 Y 染色体<sup>[7]</sup>.我们通过显微切割制备赤麂  $Y_2$  涂染探针与毛冠鹿中期染色体的原位杂交来验证毛冠鹿中的 Y 染色体.在所采用的两种检测方法中均可看到有一条中等大小的近端着丝粒染色体几乎完全被信号覆盖,该染色体也就是从细胞水平上初步确认的 Y 染色体,而且与本实验室通过性染色体连锁基因证实的另一核型中的 Y 染色体在形态上完全一致,因此我们用原位杂交法再次证实了毛冠鹿中的 Y 染色体.但是杂交结果中也同时出现了非特异信号,这些非特异信号主要集中在着丝粒区及异染色质区,出现这种结果的原因可能是因为所标记的  $Y_2$  涂染探针中的一些重复序列在其它染色体的着丝粒区和异染色质区也有分布,而在预杂交过程中我们用的是人源的 COT-1 DNA,因为人源的 COT-1 DNA 与赤麂的在同源性上存在一定的差别致使预杂交效果不明显,从而导致非特异信号的产生.关于该如何来抑制其中的非特异信号有待于进一步研究.

### [参考文献]

- [1] 张锡然,王建华,陈玉泽. 毛冠鹿(*Elaphodus cephalophus*)体细胞的染色体研究[J]. 动物学研究, 1983, 4(1): 89 - 93.
- [2] 王宗仁,全国强. 毛冠鹿染色体组型[J]. 动物学研究, 1984, 5(1): 78.
- [3] Shi L, Yang F, Kumamoto A. The chromosome of tufted deer(*Elaphodus cephalophus*)[J]. Cytogenet Cell Genet, 1991, 56: 189 - 192.
- [4] 束峰珏,张锡然,聂刘旺,等. 毛冠鹿(*Elaphodus cephalophus*)一种新核型及 C 带分析[J]. 南京师大学报: 自然科学版, 1998, 21(4): 80 - 82.
- [5] Cao X, Jiang H, Zhang X. Polymorphic karyotypes and sex chromosomes in the tufted deer(*Elaphodus cephalophus*): cytogenetic studies and analyses of sex chromosome-linked genes[J]. Cytogenetic and Genome Research, 2005, 109: 512 - 518.
- [6] 黄浩杰,张锡然,潘淑娟,等. 应用涂染技术研究人和猕猴染色体的同源性[J]. 动物学报, 1998, 44(4): 458 - 465.
- [7] 单祥年,张悦,王毅,等. 应用 DOP-PCR 与染色体涂染技术鉴别赤麂的 Y 染色体[J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2001, 24(2): 71 - 74.

[责任编辑:孙德泉]