

水稻程序性细胞死亡抑制基因 *Dad-1* 在薏苡中的定位

韩永华^{1,2}, 金危危¹, 王小兰¹, 宋运淳^{1*}

(1. 武汉大学植物发育生物学教育部重点实验室, 武汉 430072; 2. 广西师范大学生命科学学院, 桂林 541004)

摘要: 基因 *Dad-1* 是普遍存在于动物和植物中一个高度保守的程序性细胞死亡抑制基因。以水稻 *Dad-1* 基因为探针, 采用 Southern 杂交在薏苡中检出了 *Dad-1* 基因的同源序列, 并利用荧光原位杂交的方法对其进行了染色体物理定位。在薏苡第 9 染色体短臂上检测到 *Dad-1* 基因的杂交信号, 信号与着丝粒的百分距离为 67.44 ± 1.45 。

关键词: 程序性细胞死亡; *Dad-1*; 薏苡; 荧光原位杂交

中图分类号: Q942

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2003)06-0471-04

Chromosomal Localization of Programmed Cell Death Suppressor *OsDad-1* Gene in *Coix lacryma-jobi* L.

HAN Yong-Hua^{1,2}, JIN Wei-Wei¹, WANG Xiao-Lan¹, SONG Yun-Chun^{1*}

(1. The Key Laboratory of MOE for Plant Developmental Biology, Wuhan University, Wuhan 430072, China;

2. College of Life Sciences, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

Abstract: The gene *Dad-1* is a well-conserved programmed cell death (PCD) suppressor gene in animals and plants. In this study, the single copy rice gene *Dad-1* was used as probe to investigate its homology and physical localization in *Coix lacryma-jobi* genome. The results of Southern blotting suggested that there were sequences homologous to rice *Dad-1* gene in *C. lacryma-jobi* genome. Further, the sequences were mapped on the short arm of chromosome 9 in *C. lacryma-jobi* by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). The percent distance from the signal site to centromere was 67.44 ± 1.45 .

Key words: Programmed cell death; *Dad-1*; *Coix lacryma-jobi*; Fluorescence *in situ* hybridization

近年来, 随着植物遗传图谱的迅速构建, 许多功能基因被定位在特定的染色体上, 如大麦抗灼热(Scald resistance)基因的定位^[1], 玉米抗秋季粘虫(Fall armyworm)基因的定位等^[2]。然而遗传图仅仅反映了基因在染色体上的相对位置, 尚未落实到染色体的具体区域。染色体原位杂交技术是众多基因物理定位中最直接而简便的方法之一, 它可将基因或分子标记直接定位到染色体的具体位置上。应用染色体原位杂交技术开展基因物理定位的研究工作方兴未艾, 其中一个重要的前提是需要克隆的基因或 DNA 片段作探针, 而目前许多研究大量集中

于对一些模式生物基因或 DNA 片段的克隆。利用这些生物已获得的探针, 对相关的物种进行异源探测和比较定位, 为基因的物理定位研究提供了新思路。比较定位研究的分子基础就是在物种间 DNA 序列尤其是编码序列的保守性上。对禾本科植物的比较作图和比较基因组的研究表明, 尽管禾本科植物物种之间在亲缘关系远近, 基因组大小、染色体数目上各不相同, 但比较作图的结果却显示出它们的基因组存在高度的保守性, 染色体共线性片段和基因间的同源性广泛存在^[3]。这为在禾本科植物间开展异源基因探测和基因比较定位提供了依据。

收稿日期: 2003-03-29, 修回日期: 2003-09-02。

基金项目: 国家自然科学基金资助(30070376)。

作者简介: 韩永华(1971-), 女, 博士生, 从事植物分子细胞遗传学研究(E-mail: hanyhzhou@sohu.com)。

* 通讯作者(E-mail: songyc@wlu.edu.cn)。

薏苡属植物属于禾本科玉蜀黍族, 是玉米的近缘亲属。该属的染色体基数是 5, 属内物种有从 $2n=10$ 的二倍体到 $2n=40$ 的八倍体多种形式, 其中 $2n=20$ 的四倍体是最常见的类型^[4, 5]。玉蜀黍族中仅在薏苡属中有 $2n=10$ 的二倍体种, 所以, 在玉蜀黍族中薏苡属是最原始的^[6], 有推测认为薏苡可能参与了玉米的起源^[7]。薏苡具有抗病虫、适应性强、品质好等优良性状, 是改良玉米等禾谷类作物的优良种质资源^[8]。

程序性细胞死亡在细胞分化和发育的过程中起着重要作用。基因 *Dad-1* 是普遍存在于动物和植物中一个高度保守的程序性细胞死亡抑制基因。1993 年 Nakashima 等研究者首次从仓鼠的突变细胞系 tsBN7 中克隆到抑制细胞凋亡的 *Dad-1* (Defender against apoptotic cell death) 基因, 它编码一种疏水蛋白。此后, 在人、爪蟾、小鼠、线虫、拟南芥和水稻中都克隆出与仓鼠 *Dad-1* 基因同源的 cDNA 序列, 它们都能有效地抑制仓鼠 tsBN7 细胞的凋亡^[9-12]。水稻 *Dad-1* 基因被物理定位在水稻第 2 染色体短臂末端^[13]。比较物理定位的结果表明在玉米的第 4、5 染色体长臂末端和第 9 染色体短臂末端上都存在 *Dad-1* 基因的同源序列^[13]。本研究采用 Southern 杂交在薏苡中检出了 *Dad-1* 基因的同源序列, 并利用荧光原位杂交的方法对其进行了染色体物理定位。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料武汉薏苡 (*Coix lacryma-jobi*) 由华中农业大学农学系李建生教授提供。染色体制片参照 Song 等 1995 年的程序^[14]略有修改。取生长旺盛的根尖, 在水饱和的 α -溴萘溶液中于 25 度处理 2.5 h, 用新鲜固定液 (甲醇 冰乙酸 = 3 1) 4 度过夜, ddH₂O 充分洗净, 1% 的纤维素酶和 1% 的果胶酶 (SERVA) 28 度条件下酶解约 3 h。水洗并固定后采用火焰干燥法制片。

1.2 原位杂交的 DNA 探针及标记

探针 *Dad-1* cDNA 序列长 1.5 kb, 克隆在载体 pUC19 上。用切口平移法对 *Dad-1* cDNA 探针进行标记, 0.5 mol/L Na₂EDTA 终止液终止。Sephadex CL-6B (Sigma) 凝胶柱离心纯化, 点印迹检测标记效果。

1.3 Southern 杂交

薏苡总 DNA 的提取和 Southern 杂交分别参照 Doyle^[15] 和 Sambrook^[16] 的方法。薏苡总 DNA 分

别经限制性内切酶 Hind 和 EcoR 进行酶切后, 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 然后转移至 Hybond N⁺ 尼龙膜上。加入经 ³²P-dCTP 标记的 *Dad-1* cDNA 进行杂交, 杂交完成后, 取出杂交膜, 洗涤后放在 -20 度冰箱中放射自显影 4~7 d, 冲洗 X 光片。

1.4 原位杂交及荧光信号检出 (FISH)

原位杂交及信号检出参照 Song 等的程序^[14], 并加以适当修改。每张染色体制片所用的杂交混合液 (50 μ L) 含约 0.2 μ g 标记的 DNA 片段, 50% 去离子甲酰胺 (Sigma), 10% 硫酸葡聚糖 (Sigma), 4.2 μ g ssDNA, 2 \times SSC。杂交混合液在沸水中煮 10 min 后, 迅速置于冰上放置 10 min 以上。杂交在 37 度进行, 约 16~24 h。

荧光检出程序: (1) 杂交后的片子依次在 42 度于 20% 的甲酰胺、2 \times SSC 溶液、0.1 \times SSC 溶液中各漂洗 15 min; 0.1% Triton X-100 室温下处理 5 min; PBS 室温下处理 2 \times 5 min。之后加入链亲和素-Cy3 (Kirkegaard perry laboratories), 37 度于保湿皿中温育 30 min 后, 室温下 PBS 溶液洗 3 \times 5 min; 然后加入生物素化的链亲和素 (Vector laboratories), 37 度于保湿皿中温育 30 min 后, 室温下 PBS 溶液洗 3 \times 5 min; 再加入链亲和素-Cy3, 37 度于保湿皿中温育 30 min 后, 室温下 PBS 溶液洗 3 \times 5 min; 每张制片加 40 μ L (10 μ g/mL) 含 20% 抗猝灭剂 Vectashield 的 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 复染。制片在 Olympus BX60 荧光显微镜下观察。

2 结果与分析

Dad-1 基因与经限制性内切酶 Hind 和 EcoR 进行酶切的薏苡总 DNA Southern 杂交, 均呈现 3 条主带 (图 1), Southern 结果证实在薏苡基因组中存在水稻 *Dad-1* 基因的同源序列, 这为进一步用荧光原位杂交的方法在薏苡染色体上定位 *Dad-1* 基因打下了基础。

经链亲和素-Cy3 和 DAPI 复染后, 染色体呈现蓝色而信号点显示为红色。荧光原位杂交的结果表明, 在薏苡基因组中 *Dad-1* 基因的同源序列位于第 9 染色体短臂上, 信号与着丝粒的百分距离为 67.44 \pm 1.45。我们发现仅有极少部分分裂相在 2 个同源染色体上都出现杂交信号 (图 2: A), 大部分分裂相只有 1 条染色体上显示杂交信号双点或单点 (图 2: B, C), 大部分的间期核中显示 2 个杂交信号 (图 2: D)。



A. 薏苡总 DNA 经 Hind III 酶切; B. 薏苡总 DNA 经 EcoR I 酶切

A. *C. lacryma-jobi* genome DNA was digested with Hind III; B. *C. lacryma-jobi* genome DNA was digested with EcoR I

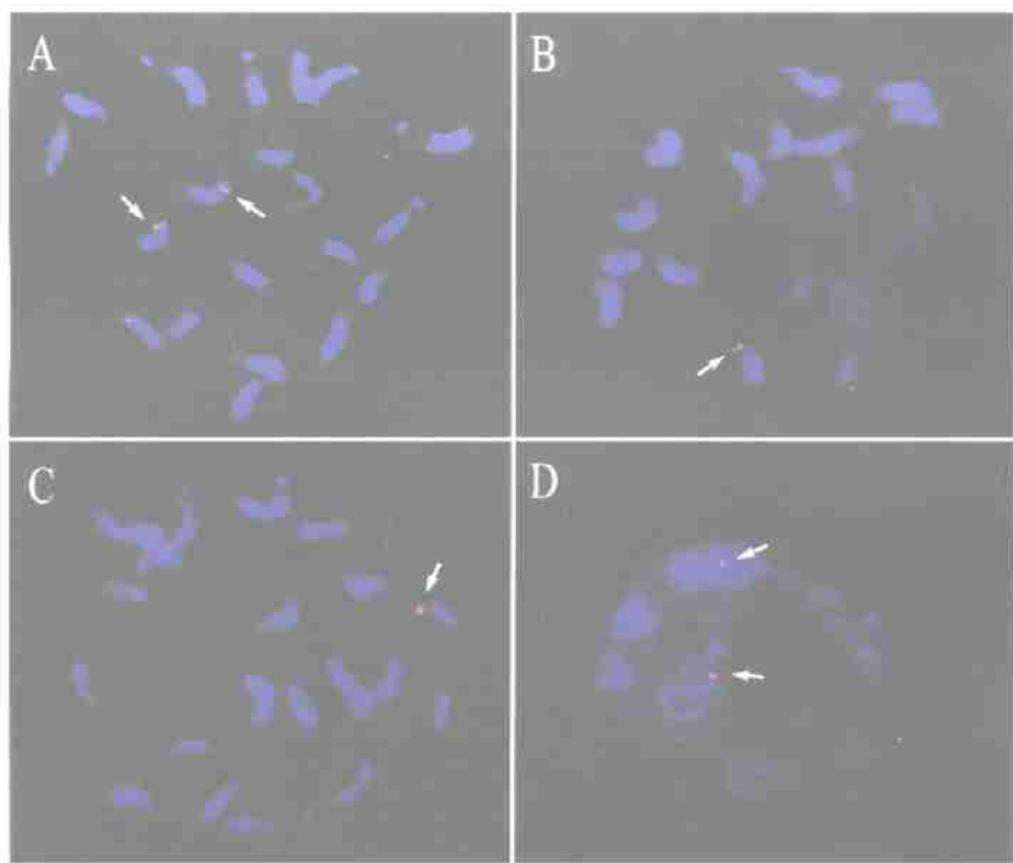
图 1 *Dad-1* 与薏苡总 DNA Southern 杂交结果

Fig. 1 Southern-hybridized with *Dad-1* in *C. lacryma-jobi*

3 讨论

薏苡体细胞中期的染色体均匀地浓缩成短棒形状, 染色体识别存在着很大的困难。然而, 薏苡前中期的染色体相对较长, 经过荧光染料 DAPI 染色后, 染色体上出现明显不同的深染区和浅染区。除染色体相对长度及臂比外, 根据各染色体间 DAPI 染色颗粒分布模式的不同, 我们构建了薏苡前中期染色体的数量染色体图(未发表资料)。该数量染色体图为识别薏苡基因组中每条染色体提供了有利依据。本研究中, 具有 *Dad-1* 基因杂交信号的染色体 9 就是根据这个数量染色体图被识别的。

作为一种重要的检测和定位特定 DNA 序列的分子细胞遗传学方法, 荧光原位杂交由于它的强反差、高灵敏度和检出率而被广泛应用于细胞遗传学的许多领域, 展现了良好的发展和应用前景^[17, 18]。至今, 越来越多的单拷贝基因已用荧光原位杂交方



A ~ C. *Dad-1* 基因被定位在第 9 染色体短臂上; D. 显示 *Dad-1* 基因在间期核中的杂交信号

A ~ C. Signals of *Dad-1* were detected on short arm of chromosome 9 in *C. lacryma-jobi*;

D. Signals of *Dad-1* were detected in interphase nucleus of *C. lacryma-jobi*

图 2 水稻 *Dad-1* 基因在薏苡中的荧光原位杂交结果

Fig. 2 FISH results of rice *Dad-1* in *C. lacryma-jobi*

法进行了成功的定位^[19,20]。但是, 荧光原位杂交的致命弱点是荧光信号容易猝灭, 通过一般的照相装置很不容易抓获。本研究中, 我们使用了合适的抗猝灭剂及高灵敏度的 CCD 照相装置, 而且对信号进行了多重放大, 使信号的检出率大大提高。因此我们成功地定位了水稻 *Dad-1* 基因在薏苡前中期的染色体。

比较遗传作图研究表明玉米的第 4 和第 5 染色体长臂与水稻的第 2 染色体高度同源^[21], 在玉米的第 4、第 5 和第 9 染色体间存在着共线性片段^[22]。水稻 *Dad-1* 基因在水稻和玉米中的比较物理定位结果与比较遗传图的结果一致, 定位在水稻第 2 染色体短臂上的 *Dad-1* 基因在玉米中的第 4、5 染色体长臂和第 9 染色体短臂上都检测到它的同源序列^[13]。尽管在薏苡与水稻之间基因的比较遗传作图的研究还未见报道, 我们推测薏苡的染色体 9 也许是与水稻的染色体 2 是同源的, 当然这需要通过进一步的实验来证实。

参考文献:

- [1] Schweizer G F, Baumer M, Daniel G. RFLP markers linked to scald (*Rhynchosporium secalis*) resistance gene *Rh2* in barley [J]. *Theor Appl Genet*, 1995, **90**: 920–924.
- [2] Pechan T, Jiang B H, Steckler D, et al. Characterization of three distinct cDNA clones encoding cysteine proteinases from maize (*Zea mays* L.) callus [J]. *Plant Mol Biol*, 1999, **40**: 111–119.
- [3] 沈立爽, 朱立煌. 植物的比较基因组研究和大遗传系统[J]. 生物工程进展, 1995, **15**: 23–28.
- [4] Christopher J, Singh Thaya G E. Chromosome number of *Coix aquatica* [J]. *Curr Sci*, 1986, **55**: 1200.
- [5] Christopher J, Benny Jacob. Cytology of a new Hexaploid cyto-type of *Coix lacryma-jobi* Linn [J]. *Cytologia*, 1990, **55**: 57–60.
- [6] 刘纪麟. 玉米育种学 [M]. 北京: 农业出版社, 1991.
- [7] Anderson E G. What is *Zea mays*? A report of progress [J]. *Chron Bot*, 1945, **9**: 88–92.
- [8] 李桂兰, 乔亚科. 薏苡的植物学及遗传学研究 [J]. 国外农学——杂粮作物, 1996, **2**: 16–19.
- [9] Nakashima T, Sekiguchi T, Kuraoka A. Molecular cloning of a human cDNA encoding a novel protein, DAD1, whose defect causes apoptotic cell death in hamster BHK21 cells [J]. *Mol Cell Biol*, 1993, **13** (10): 6367–6374.
- [10] Apte S S, Mattei M G, Seldin M F, et al. The highly conserved defender against the death 1 (DAD1) gene maps to human chromosome 14q11-q12 and mouse chromosome 14 and has plant and nematode homologs [J]. *FEBS Lett*, 1995, **363**: 304–306.
- [11] Gallois P, Makishima T, Hecht V, et al. An *Arabidopsis thaliana* cDNA complementing a hamster apoptosis suppressor mutant [J]. *Plant J*, 1997, **11** (6): 1325–1331.
- [12] Tanaka Y, Makishima T, Sasabe M. *Dad-1* a putative programmed cell death suppressor gene in rice [J]. *Plant Cell Physiol*, 1997, **38** (3): 379–383.
- [13] Jin W W, Yang Z, Ning S B, et al. Chromosomal location of program cell death suppressor *OsDad-1* in rice and maize [J]. *Dev Reprod Bio*, 2001, **10** (2): 47–52.
- [14] Song Y C, Gustafson J P. The physical location of fourteen RFLP markers in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Her Appl Genet*, 1995, **90**: 113–119.
- [15] Doyle J J. Isolation of plant DNA from fresh tissue [J]. *Focus*, 1998, **12** (1): 13–15.
- [16] Sambrook J, Fritsch E F, Mabatatis T. 分子克隆实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 1992.
- [17] Palotie A, Heiskanen M, Loan M, et al. High resolution fluorescence *in situ* hybridization: A new approach in genome mapping [J]. *Ann Med*, 1996, **28** (2): 101–106.
- [18] Raap A K. Advances in fluorescence *in situ* hybridization [J]. *Mutat Res*, 1998, **400**: 287–298.
- [19] Li L J, Song Y C, Yan H M, et al. The physical location of the gene *ht1* (*Helminthosporium turcicum* resistance 1) in maize (*Zea mays* L.) [J]. *Hereditas*, 1998, **129**: 101–106.
- [20] 李霞, 金危危, 宁顺斌, 等. 水稻 *Pib* 基因及其连锁 RFLP 标记在栽培稻、药用野生稻和玉米中的比较物理定位 [J]. 植物学报, 2002, **44** (1): 49–54.
- [21] Gale M D, Devos K M. Comparative genetics in the grass [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 1971–1974.
- [22] Brandon S G. Patterns of chromosomal duplication in maize and their implications for comparative maps of the grasses [J]. *Genome Res*, 2001, **11**: 55–66.