

# 植物染色体原位杂交技术的发展与应用

奇文清 李懋学

(北京大学生命科学学院 北京 100871)

## THE DEVELOPMENT AND APPLICATIONS OF IN SITU HYBRIDIZATION TECHNIQUE IN PLANT CHROMOSOMES

Qi Wenqing Li Maoxue

(College of Life Sciences, Peking University Beijing 100871)

**关键词** 原位杂交, 植物染色体

**Key words** In situ hybridization, Plant chromosome

植物染色体原位杂交(In situ hybridization)是近年来得到快速发展的一门新技术<sup>[1~4]</sup>。其基本原理是根据核酸分子碱基互补配对的原则(A---T、G---C),将有放射性或非放射性标记的外源核酸(探针:Probe)与染色体上经过变性后的单链DNA互补配对,结合成专一的核酸杂交分子,再经一定的检测手段将待测核酸在染色体上的位置显示出来。由于各种非放射性标记探针方法的出现以及植物染色体制片方法的改进,该技术得以快速推广和应用。在植物基因的染色体物理作图,杂种中亲本染色体的鉴定,外源染色体或染色体片段的检测,物种进化及亲缘关系的探讨,遗传转化材料的分析,染色体基因组的结构、组成和在细胞中的空间排列等的研究中,运用该技术取得了一些重要成果,展示了其广阔的应用前景。

### 1 探针标记方法和染色体制片技术的改进

植物染色体原位杂交的研究,较长一段时间远远落后于人类及哺乳动物的研究,其主要原因是受两个因素的相互制约。其一是植物细胞有细胞壁和细胞质对染色体的严重覆

盖,同时,植物染色体又缺乏如人类和哺乳动物染色体那样的特异性 G 带,难以准确地识别所标记的单个染色体在核型中的序号;第二个相关的制约因素则是探针的标记方法。首先,主要是以放射性同位素如 $^3\text{H}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{32}\text{P}$  等标记探针,该标记探针的灵敏度虽然较高,但由于杂交后自显影所显示的杂交信号,是杂交位点周围的还原银粒,因此,杂交信号与染色体并不在同一聚焦平面,再加以射线散射产生的干扰信号,使信号定位增加了难度。所以,用放射性标记探针杂交,通常需要观察大量具染色体分散较好的细胞,并且要以统计学方法,方可确定杂交位点。放射性同位素标记探针的这种特点以及植物细胞壁和细胞质双重覆盖,使植物染色体的原位杂交研究困难重重。1985 年以前,只有少数作者用放射性标记探针分别对黑麦染色体端粒异染色质的序列组成<sup>[5]</sup>,大豆、小麦、洋葱的 rRNA 在染色体上的定位,小麦染色体中卫星 DNA 的分布等进行了初步研究<sup>[6,7]</sup>。80 年代以来,相继发展了 3 种非放射性标记和检测 DNA 探针的系统<sup>[8~10]</sup>。

(1) 生物素标记检测系统:即用核苷酸的生物素衍生物代替放射性标记核苷酸,在 DNA 多聚酶的作用下,用 DNA 缺刻转移法使 Biotin-11-dUTP 或 Biotin-7-dATP 掺入 DNA 链,标记探针与变性后的染色体 DNA 杂交,然后用链霉抗生物素蛋白和辣根过氧化物酶的复合物(Streptoavidin-horseradish peroxidase)检测,该复合物与生物素标记探针结合,经酶促反应而形成棕色沉淀,此即杂交信号,该系统的检测灵敏度为 0.25 pg 同源序列。此外,尚有光生物素(Photo-biotin)标记方法,其标记步骤很简单,不用酶,只将 DNA 与光生物素溶液混合照光 0.5 h 即可,检测方法同上,不过,其灵敏度不及前者。

(2) 羟基毛地黄苷标记检测系统:这是近年德国 Boehringer Mannheim 公司开发的新产品,商品名为“Digoxigenin,简称 DIG”,人工合成的 digoxigenin-11-dUTP 在 DNA 多聚酶的催化下,用随机引物在单链 DNA 上合成带 DIG 的互补链,此为探针。杂交后用抗毛地黄苷抗体与碱性磷酸酯酶的复合物处理,用硝基四唑兰(NBT)和 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸盐(BCIP)显色,其检测灵敏度为 0.1 pg 同源序列。

(3) 荧光素:荧光素可直接标记核酸探针,杂交体用荧光显微镜观察,在不同激发光的照射下可发出不同颜色的荧光。原位杂交中常用的荧光素有异硫氰酸荧光素(Fluorescein isothio cyanate, FITC)、羟基香豆素(Hydroxy coumarin)、罗达明(Rhodamin)和氨基香豆素醋酸酯(Aminomethyl coumarin acetic acid AMCA)等。目前已有各种荧光素标记的核苷酸商品进入市场,如 FITC-dUTP,羟基香豆素-dUTP 等。这些荧光素标记核苷酸可通过酶促反应标记法制备荧光素标记核酸探针,原位杂交的结果直接用荧光显微镜观察分析。结合使用不同颜色的荧光素标记,可在同一标本上显示 2 种或 2 种以上的核酸序列。另外,用荧光素标记抗体也可做为非放射性原位杂交(如生物素或地高辛标记探针的原位杂交)的一个免疫组织化学检测系统。

在近年的植物染色体原位杂交研究中,生物素标记探针日益退居次要地位。希望进行高灵敏度而又能长期保存制片的研究者,比较更喜爱采用“DIG”标记和检测系统,因为其灵敏度极高。而更多的作者偏爱用荧光素标记的探针,这不仅因为操作更简便,而且也易于在同一标本上同时标记 2 种以上不同颜色的靶 DNA,以彩色照相记录,对比鲜明艳丽,赏心悦目。

关于供原位杂交的植物染色体制片的要求,主要有两点:其一是最好完全排除细胞壁

和细胞质的覆盖,提高探针对靶 DNA 的可及性;其二是要求染色体牢固地附着在盖片或载片上,以避免高温和反复洗涤过程中染色体脱落。关于第一个问题,基本上可分为两种情况处理:具大染色体的材料,一些作者往往只用 45% 乙酸软化约 1 h 后,用乙酸压片,也可获得杂交的良好效果。另一种处理则是先用纤维素酶和果胶酶处理,再用 45% 乙酸压片,其中以后一种方法制片者居多。对具小染色体的材料,则多采用酶解去壁制备细胞悬液,滴片铺展自然干燥的方法<sup>[11]</sup>。此外,如果用 Biotin 或 DIG 标记和检测系统,尚可用 0.2 mol/L HCl 解离细胞而便于压片,能有效地减少背景的干扰。但如果是用荧光标记和检测系统,则不能用 HCl 处理染色体。

防止染色体脱落是一个重要的技术问题,不少作者曾做过多种实验。例如在载片上涂以铬矾明胶<sup>[12,13]</sup>、多聚赖氨酸<sup>[14]</sup>或进行硅烷处理<sup>[15]</sup>。此外,载片不经上述方法处理,而是在染色体制片于变性和杂交之前,用 4% 多聚甲醛(Paraformaldehyde)再固定 10 min,然后经一系列乙醇脱水干燥<sup>[16]</sup>,不仅可以改善杂交结果的质量,而且也可有效地防止染色体脱落,我们的实践也证明了其优点。

## 2 原位杂交中的技术难点

在保证 DNA 探针的纯度,染色体制片的高质量,以及采用各公司提供的标记和检测试剂盒的条件下,在原位杂交的主要程序中,则只有探针和染色体的变性和杂交了。在分析了各种植物染色体原位杂交的实验程序后可见,杂交的温度和持续时间是比较一致的,通常是 37℃ 过夜或稍长时间,杂交步骤不是难点,余下的就是变性步骤了。现将几种作物的探针混合液和染色体的变性温度和持续时间列于表 1。

表 1 几种植物探针和染色体的变性条件

Table 1 The denatured condition of probe and chromosome of some plants

种 名 Species	探针 DNA Probe DNA	探针混合液 Probe mixture	染色体 Chromosome	温度 Temperature(℃)	时间 Time(min)
小 麦 <i>Triticum aestivum</i>	黑麦基因组	+	+	70 88	10 10
大 麦 <i>Hordeum vulgare</i>	大麦基因组	+	+	70 90	10 10
黑 麦 <i>Secale cereal</i>	黑麦串联重复 DNA	+	+	70 80	10 10
棉 花 <i>Gossypium hirsutum</i>	大豆 18 s rDNA	+	+	85 75	15~20 2~5

表 1 所示,除棉花外,其他作物的探针混合液的预变性温度均为 70℃,持续 10 min,但染色体的变性温度和持续时间则是各不相同的。因此,变性的温度和持续时间的可变动性便成为最重要的技术难点。这种可变动性取决于以下诸因素:物种间差异,探针、封阻 DNA 和靶 DNA 的差异,分别变性与共变性的差异。此外,尚有细胞壁和细胞质对靶 DNA 覆盖程度的差异以及药品质量(尤其是甲酰胺)的影响等。张德玉等<sup>[17]</sup>对上述一些重要因素进行了有参考价值的对比研究。为便于严格控制变性的温度,一些作者专门设计了用于变性和杂交的可程序化的温度控制仪<sup>[16]</sup>。

### 3 PRINS 原位杂交技术

Prined in situ hybridization 技术是由 Koch 等<sup>[18,19]</sup>开发的一种新的原位检测核酸顺序的技术。其流程主要包括:未标记的特异序列的寡核苷酸引物或短 DNA 片段与载片上变性的染色体 DNA 杂交,用新合成的 DNA 作为引物,在 DNA 聚合酶的催化下,标记的核苷酸便原位掺入,故该技术最初称 PRINS 为引物原位标记技术。其优点是简单而快速,背景干扰少。该技术在人类染色体研究中应用较多,但在植物中仍较少。Abbo<sup>[20]</sup>等曾以克隆的小麦 rDNA 为引物,用 PRINS 技术标记和检测到黑麦染色体上的 NOR。一般认为,对植物染色体而言,引物的选择以及低拷贝 DNA 顺序的检测,仍存在一些困难。不过,近年已在技术流程中加入一个类似聚合酶链式反应(PCR),使标记引物原位扩增,信号成倍增强,已能够检测到低拷贝序列,该改进技术称之为 PCR-PRINS<sup>[21]</sup>。每一个 PCR-PRINS 循环标记后的 DNA 增加约 20%,其信号强度超过线性增加,但远未达到通常 PCR 呈指数增加的水平。原位 PCR 的效率较低,使用带标记的 DNA 作模板可能是其中的原因之一。PCR-PRINS 技术的应用需配置一台带有适合载片装置的热循环仪(如 Hybaid 公司的 Omni Slide 循环仪)。此外,德国的 Boehringer Mannheim 公司已有 PRINS 反应试剂盒供应。据称,全部操作和反应可在半天中完成。随着植物染色体特异序列寡核苷酸引物的研究与合成,以及相关技术的改进,该技术也可望将在植物染色体的快速鉴定以及基因作图中得到广泛地应用。

### 4 单拷贝和多拷贝基因的物理作图

1985 年, Rayburn 等<sup>[22]</sup>首次将生物素标记探针及其检测系统应用于植物染色体原位杂交,以黑麦的 120 bp DNA 为探针与“中国春”小麦的染色体杂交,结果发现在小麦的 11 对染色体上显示有 24 个杂交位点。其中 4A 含 4 个位点,1B 含 3 个,2B 含 2 个,3B 含 2 个,4B 含 3 个,5B 含 3 个,6B 含 2 个,2D、3D 和 5D 各含 1 个。与 C-或 N-带比较,杂交位点是在浅染区而不是在深带区。Ambros 等<sup>[23]</sup>研究了农杆菌的 T-DNA(17 kb)在被其感染的还阳参(*Crepis capillaris*)根细胞中的分布,发现被生物素标记的 T-DNA 探针,定位于第 3 号同源染色体的邻近核仁组织区的部位。Shen 等<sup>[24]</sup>以编码玉米蜡质基因的 RNA 为探针,与玉米减数分裂粗线期染色体杂交,显示该基因位于玉米第 9 号染色体上。Huang 等<sup>[25]</sup>确定了一个编码黄酮甙通道的关键酶——查尔酮合成酶(Chalcone synthase)的单拷贝内源基因在欧芹(*Petroselinum crispum*)细胞的 4 个亚中部着丝点染色体上的分布。大麦的醇溶蛋白基因(B-Hordein)被定位于大麦的第 5 号染色体上<sup>[26]</sup>。此外,尚有豌豆的豆球蛋白基因<sup>[27]</sup>和硬粒小麦的抗 Hessian 蝇的 H20 基因的定位<sup>[23]</sup>等。5S rRNA 基因不定位在核仁组成区(NOR),与核仁形成无关。在小麦中,5S rRNA 的结构、组织和进化,具有重要的理论意义。近年,一些作者相继进行过原位杂交的研究<sup>[28~32]</sup>,发现 5S rRNA 多基因族存在两种不同大小的结构:大者约 500bp,由 1 个 120 bp 的编码区和约 380 bp 的隔离区组成;小者约 400 bp,编码区长度与前者相同,隔离区长度约 280 bp。在“中国春”小麦中,5S rRNA 被定位于部分同源染色体组 1(1AS、1BS 和 1DS)和部分同源染色体组 5(5AS、5BS 和 5DS)。最近, Song 等<sup>[33]</sup>把水稻的 5S rDNA 基因复合体定

位于第9号染色体的短臂端部。通常,18S和26S rRNA多基因族是位于染色体上的核仁组织区(NOR),细胞形态学上显示为次缢痕区,其远端具随体。小麦族的NOR或18S和26S rRNA,其起源和演变比较复杂,一向成为研究的热点问题。在常规的乙酸洋红染色下,一般只明显可见小麦的1B和6B两对染色体具随体或NOR。早先,Cermeno等<sup>[34]</sup>用Ag-NOR染色技术研究,发现小麦的1B、6B、5D和1A均显示银染正反应。其强度顺序是6B>1B>5D>1A。用放射性同位素标记探针的研究中,Appels等<sup>[29]</sup>报道“中国春”小麦的18S和26S rRNA是位于1B、6B和5D染色体。黑麦是位于1R,大麦位于5H和6H。在六倍体的斯卑尔托(*Triticum spelta*)小麦中,杂交信号位于1A、1B、6B和5D染色体。而其他六倍体小麦,如印度园粒小麦(*T. sphaerococcum*)、密穗小麦(*T. compactum*)和“中国春”小麦,均位于1B、6B和5D染色体。茹可夫斯基小麦(*T. zhukovskyi*, AAAAGG)则只有4个位点。波斯小麦(*T. carthlicum*, AABB)具3个位点,其他四倍体小麦均只有两个杂交位点。拟斯卑尔托山羊草(*Aegilops speltoides*)有2个杂交位点,节节麦(*Ae. squarrosa*)只有1个位点<sup>[35]</sup>。Miller等<sup>[36]</sup>和Friebe等<sup>[37]</sup>均报道栽培一粒小麦(*T. monococcum*)的rRNA基因定位于1A和5A染色体上,近年,Mukai等<sup>[38]</sup>以生物素标记探针对“中国春”小麦和节节麦染色体进行原位杂交,发现18S和26S rRNA杂交信号是定位于5对染色体上,即1AS、1BS、5DS、6BS和7DL。其中7DL是首次报道的新位点,而且与节节麦的7DL杂交信号相符。杂交信号强度依次为6B>1B>5D>1A>7D。钟少斌等<sup>[39]</sup>报道,六倍体小黑麦品种“Badger”有6个杂交位点,即1B、6B和1R染色体对。而在普通小麦品种“84056-1-36-1”中则有8个杂交位点,因该材料是1R(1D)代换系,故认为可能是位于1B、6B、5D和1R染色体。此结果与先前一些作者用Ag-NOR染色结果不同。他们认为在小黑麦及其黑麦的代换或附加系中,1R的NOR活性均将被小麦染色体所抑制。以上作者对小麦18S和26S rRNA定位的研究仍有不尽相同之处,是研究方法不同,还是其本身存在多态现象所致,仍有存疑。尤其是小麦起源中各供体种间rRNA基因族的演变和传递之间的关系,则更有待深入研究。

## 5 易位和互换的鉴别

在鉴别易位和互换的细胞学技术中,银染联会复合体(Ag-SC)的电镜观察可以准确定位易位的断点,但识别易位的染色体则十分困难。C-带分带技术可以较准确地识别小麦和黑麦的易位染色体,但确定易位的断点则难以准确。染色体原位杂交技术的应用,有效地克服了上述两种方法的不足。Heslop-Harrison等<sup>[40]</sup>以黑麦的基因组总DNA为探针,与有小麦染色体(1B)和黑麦染色体(1R)易位的5个小麦品种进行原位杂交,不仅准确地确定了易位的黑麦染色体片断的大小,而且发现所有的易位点都在或靠近着丝点区。此外,在细胞周期的每个阶段都可以观察到易位现象。钟少斌等<sup>[39]</sup>也进行了类似的研究,确定了“宁8026”小麦中1B/1R易位染色体及易位的断点。Mukai等<sup>[41]</sup>以黑麦基因组总DNA和高度重复的DNA序列为探针,生物素标记,荧光检测,不仅准确地识别了含抗Hessian蝇基因的黑麦6RL与小麦不同染色体的易位,而且首次发现在小麦4A染色体长臂中部有一个黑麦6RL中间易位小片段。这种用射线诱导产生的位于臂中部的易位片段,用其他方法几乎是无法检测到的。

## 6 杂种中供体基因组及外源染色体的识别

基因组原位杂交(Genomic in situ hybridization, GISH)提供了一个直接的,可见的辨别属间或种间杂种中亲本基因组的有效手段。Schwarzacher 等<sup>[42]</sup>用非洲黑麦(*Secale africanum*)的基因组 DNA 作探针,与杂种(*Secale africanum* × *Hordeum chilense*)根尖染色体杂交,在细胞周期的每个阶段,都看到染色质呈红、黄两种不同颜色的荧光,杂交上的染色质发黄色荧光,未杂交上的染色质发红色荧光。在细胞分裂中期,有 7 条大的发黄色荧光的染色体和 7 条小的发红色荧光的染色体,长度测量表明前者来自亲本非洲黑麦,后者来自 *H. chilense*。在间期和前期,来源于双亲的基因组似乎不是随机混合的,而是各自占据一个确定的区域。同样,在杂种 *Festulopia hubbardii*(*Festuca rubra* × *Vulpia fasciculata*)中,用 GISH 检测出了杂种细胞有丝分裂中期 35 条染色体中,有 21 条来自 *F. rubra*, 14 条来自 *V. fasciculata*<sup>[43]</sup>。由于 *F. rubra* 和 *V. fasciculata* 的所有染色体大小、中部着丝点和亚中部着丝点都相似,所以用常规染色技术就不能区分减数分裂时同源(V-V, F-F)和异源(V-F)染色体的配对。而用基因组作探针,通过不同颜色荧光显示,则可区别同源(V-V, F-F)和异源(V-F)二价体,表明 GISH 也可用来分析杂种核减数分裂时染色体的行为。另外, GISH 在小麦中检测外源(alien)染色体或染色体片段也非常有效<sup>[44~47]</sup>。

异源四倍体的栽培烟草,其染色体数目  $2n=4x=48$ , 含 S 和 T 两个基因组。S 组的供体种一致公认为林烟草(*Nicotiana sylvestris*,  $2n=2x=24$ ), T 组则到底是耳状烟草(*N. otophora*,  $2n=2x=24$ )还是绒毛状烟草(*N. tomentosiformis*,  $2n=2x=24$ ),难以定论。用以上 3 个供体种的稀释总 DNA 为探针,分别与栽培烟草 DNA 进行点杂交,发现林烟草表现出均一的强标记,耳状和绒毛状烟草也均表现与栽培烟草有广泛的同源性,但标记强度则明显低于林烟草。用烟草的特异性 DNA 分散重复序列为探针,与林烟草和耳状烟草的染色体原位杂交,均显示均一的颜色标记,而与绒毛状烟草杂交,则显示杂色标记。如果以 T 组两个种的 DNA 相互杂交,也显示类似的杂色标记染色体。因而认为,栽培烟草的 T 基因组实际包含两个供体种,即耳状和绒毛状烟草渐渗杂交的产物。此外,当以林烟草总 DNA 为探针与栽培烟草染色体原位杂交时,发现有 18 个染色体均匀杂交,12 个染色体完全不杂交,其余 18 个染色体则显示出部分杂交,表明 S 和 T 基因组至少有 9 对染色体发生了相互易位<sup>[48]</sup>。

## 7 鉴别基因组的同源性,目的是研究植物系统进化和亲缘关系

Rayburn<sup>[49]</sup>等研究了在多倍体小麦中 4A 染色体的起源和进化,探针用黑麦的重复 DNA 序列,与小麦和可能的二倍体祖先种染色体原位杂交。在“中国春”小麦中,4A 染色体短臂端部有一杂交位点,长臂上有一个端部和两个中部杂交位点, *Triticum turgidum* 4A 染色体的杂交位点与“中国春”相同, *T. timopheevi* 4A 染色体杂交位点位于短臂亚端部而不是端部。具 A-、B-和 D-基因组的祖先种中,只有提供 B 基因组的两种植物(*Aegilops speltoides* 和 *A. sharonensis*)的染色体具备与 4A 相同的杂交位点,表明 4A 属于 B 基因组。在多倍体小麦进化过程中,4A 染色体变化很小,具有保守性。King<sup>[50]</sup>等用

GISH检测了杂种 *Triticum durum* ( $2n = 4x = 28$ , AABB)  $\times$  *Thinopyrum bessarabicum* ( $2n = 2x = 14$ , E<sup>b</sup>E<sup>b</sup>)花粉母细胞减数分裂时部分同源染色体交叉的形成,确定了 wheat/wheat (W/W), wheat/*Th. bessarabicum* (W/Th), *Th. bessarabicum*/*Th. bessarabicum* (Th/Th)间重组的相对频率为:82.3%, 12.7%, 5.1%。W/W 部分同源染色体配对的频率高于 W/Th,表明小麦 A、B 基因组间比 E<sup>b</sup> 基因组 (*Th. bessarabicum*) 的关系更近。通过 W/W、W/Th/外来种间重组相对频率的研究,可提供分析基因组关系的方法。Rgaard 和 Heslop-Harrison<sup>[51]</sup>分别用克隆的 DNA 序列(pta71, 含编码 18S, 5.8S, 26S 的基因和非转录区,直接用罗达明-4-dUTP 标记)和基因组总 DNA (DIG-标记)作探针,研究了滨麦属 (*Leymus*)、新麦草属 (*Psathyrostachys*) 和大麦属 (*Hordeum*) 间基因组的关系。结果表明, 18S, 5.8S, 26S rRNA 基因在三属中的数目和位置不同。在 *H. lethleri* 中,检测到了 6 个 rDNA (即 Norloci) 位点。与 *Hordeum* 一样, *P. stoloniformis* 也具有多个 rDNA 位点,在其 10 条中期染色体上,共有 14 个 rDNA 杂交位点,其中 4 条的两端都有,而 *L. arenarius*、*L. paboanus* 和 *L. angustus* 分别有 8、16 和 12 个 rDNA 位点,说明 rDNA 位点数目与多倍性水平没有相关关系。二倍体的 *P. stoloniformis* 有 14 个 rDNA 位点,与 Dvorak 和 Zhang<sup>[52]</sup>认为 *Psathyrostachys* 是 *Leymus* 的唯一祖先的观点矛盾。基因组原位杂交的结果表明, *Leymus* 基因组与 *Psathyrostachys* 并无差别,但 *Hordeum* 的 H 基因组与 *Leymus* 的基因组不同。虽然在 *Triticeae* 的种中许多 DNA 的序列是共同的,但 *Leymus* 和 *Hordeum* 两属的基因组存在差异。

## 8 基因组的空间分布

基因组、同源染色体在细胞中的空间分布,是随机的还是有序的,这是一个重大的理论问题。因为它与染色体行为、基因表达、DNA 复制,以及基因组的进化,包括物种的形成都密切相关。这些问题已争论几十年了。此前的研究中,较有影响的是 Bennett 等<sup>[53]</sup>的自然核型学说,其他的研究,熊治廷<sup>[54]</sup>已作过详细的综述。DNA 原位杂交的发展,为此问题的研究提供了更科学的技术手段。属间杂交<sup>[55~57]</sup>、种间杂交<sup>[58~61]</sup>的杂种细胞中的染色体,经各亲本基因组总 DNA 的探针标记和检测表明,不同种的染色体在杂种细胞中是呈区域性分布,而非随机混合分布的。但在有的属间杂种细胞中, DNA 的 GISH 显示,大部分间期核中仍维持有丝分裂后期的构型(Rabl 构型)。即着丝点附着于核膜,端粒趋向另一极,并不呈现基因组的分离,至中期,两基因组才呈现分离现象。至于体细胞同源染色体联合(Somatic association)现象,则仍有不同观察结果。Rayburn 等<sup>[60]</sup>观察到大部分细胞有此现象,而 Schwarzacher 等<sup>[59]</sup>以 DNA ISH 和切片的三维重建研究,则是否定的。看来,染色体在细胞中的空间分布并不是固定不变的,在不同类型细胞或在不同发育阶段可能有不同构型。因此,这个问题,还有待于更广泛和深入的研究。

## 9 结束语

染色体原位杂交技术在生命科学领域中,具有十分广阔的应用前景。它已在动物细胞遗传、人类医学研究领域显示了极大的优越性,今后,在植物科学的研究中,将会有一个迅速的发展。

(1) 应用原位杂交技术,可以把基因定位于染色体上。所定位的 DNA 片段可以是高度重复序列(如核糖体 DNA),也可以是单拷贝基因序列,还可以定位与某一性状有关的染色体特异序列乃至整个基因组特异序列。这些特异的基因在植物染色体上的定位,可为植物分子生物学和遗传工程学的研究奠定基础。

(2) 鉴定物种间亲缘关系的远近。采用基因组原位杂交,根据杂交信号的多少,判断同源序列的多少,进一步推测物种间亲缘关系的远近。另外,原位杂交在鉴定远缘杂种染色体构型、缺失、重复、倒位、易位等染色体结构变异以及染色体数目变异等方面有着重要的作用。

(3) 原位杂交在研究基因组进化以及间期核基因组的结构、组成及空间排列顺序等方面也将成为一个有效的工具。

(4) 用多种基因探针检测可以绘制出基因组的染色体物理图谱,目前在油菜、玉米、水稻等植物上已有一些进展。

(5) 可以检测外源 DNA(转化或病毒),为基因转移提供直接证据,而无需通过检测基因表达的产物来间接推断基因转移是否成功。应用原位杂交,不仅可以检测游离的,而且可以检测整合于细胞染色体内的外源核酸序列。

### 参 考 文 献

- 1 苏慧慈. 原位杂交. 北京: 中国科学技术出版社, 1994
- 2 Wilkinson D G. In situ hybridization: A practical approach. USA: IRL Press, 1992
- 3 吕忠进, 成美英. 核酸原位杂交技术及其发展. 生物技术, 1993, 3(1): 1~4
- 4 Gerlach W L, Appels R, Dennis E S *et al.* Evolution and analysis of wheat genomes using highly repeated DNA sequences. Proc 5th Int Wheat Genetics Symposium, 1978, 1: 81~91
- 5 Bedbrook J R, Jones J, O'Dell M *et al.* A molecular description of telomeric heterochromatin in *Secale* species. *Cell*, 1980, 19: 545~560
- 6 Miller T E, Gerlach W L, Flavell R B. nucleolus organiser variation in wheat and rye revealed by in situ hybridization. *Heredity*, 1980, 45: 377~382
- 7 Dennis E S, Gerlach W L, Peacock W J. Identical Polypyrimidine-polypurine satellite DNAs in wheat and barley. *Heredity*, 1980, 44: 344~366
- 8 王洪新, 董夫贵, 胡志昂. 生物大分子的非放射性标记. 植物学通报, 1993, 10(2): 7~9
- 9 Lichter P, Ward D C. Is non-isotopic in situ hybridization finally coming of age? *Nature*, 1990, 345: 93~94
- 10 Kessler C. The digoxigenin system: principle and applications of the novel nonradioactive DNA labeling and detection system. *Bio Tech Int*, 1990, 183~194
- 11 Griffior M C, Vodkin L O, Singh R J *et al.* Fluorescent in situ hybridization to soybean metaphase chromosomes. *Plant Mol Bio*, 1991, 17: 101~109
- 12 Gall G, Pardue M L. Nucleic acid hybridization in cytological preparations. *Meth Enzy Mol*, 1971, 38: 370~380
- 13 Pardue M L. In situ hybridization. In: Homes ed. Nucleic Acid Hybridization: A practical approach. England: Oxford, 1985. 179~202
- 14 Huang W M, Gibson S J, Facer P *et al.* Improved section adhesion for immunocytochemistry using high molecular weight polymers of L lysine as a slide coating. *Histochemistry*, 1983, 77: 275~279
- 15 Burns J. Detection lowcopy human papillomavirus DNA and mRNA in routine paraffin sections of cervix by non-isotopic in situ hybridization. *J Clin Pathol*, 1987, 40: 858~864



- 16 Heslop-Harrison J S, Schwarzbacher T, Ananthawat-Jonsson K *et al*. In situ hybridization with automated chromosome denaturation. *Technique*, 1991, **3**: 104~115
- 17 张德玉, 钟少斌, 李浩兵等. 麦类作物原位杂交影响因素的研究. *植物学报*, 1995, **37**(3): 181~185
- 18 Koch J E, Steen Kølvræ, Petersen K B *et al*. Oligonucleotide-priming methods for the chromosome-specific labelling of alpha satellite DNA in situ. *Chromosoma*, 1989, **98**: 259~265
- 19 Koch J E, Mogensen J, Pedersen S *et al*. Fast one-step procedure for the detection of nucleic acids in situ by primer-induced sequence-specific labelling with fluorescein-12-dUTP. *Cytogenet Cell Genet*, 1992, **60**: 1~3
- 20 Abbo S, Miller T E, King I P. Primer-induced in situ hybridization to plant chromosomes. *Genome*, 1993, **36**: 815~817
- 21 Terkelsen C. 对细胞分裂中期染色体的特异 DNA 序列进行重复引物引导原位标记. *生化资讯*, 1995, **1**: 4~6
- 22 Rayburn A L, Gill B S. Use of biotin-labeled probes to map specific DNA sequences on wheat chromosomes. *J Hered*, 1985, **76**: 78~81
- 23 Ambros P F, Matzke M A, Matzke A J M. Detection of a 17 kb unique sequence (T-DNA) in plant chromosomes by in situ hybridization. *Chromosoma*, 1986, **94**: 11~18
- 24 Shen D L, Wang Z F, Wu M. Gene mapping on maize pachytene chromosomes by in situ hybridization. *Chromosoma*, 1987, **95**: 311~314
- 25 Huang P L, Hahlbrock K, Somssich I E. Detection of a single copy gene on plant chromosomes by in situ hybridization. *Mol Gen Genet*, 1988, **211**: 143~147
- 26 Clark M, Karp A, Archer S. Physical mapping of the B-hordein loci on barley chromosome 5 by in situ hybridization. *Genome*, 1989, **32**: 925~929
- 27 Simpson P R, Newman M A, Davies D R. Detection of legumin gene DNA sequences in pea by in situ hybridization. *Chromosoma*, 1988, **196**: 454~458
- 28 Anri A, Cox T S, Gill B S *et al*. Chromosomal location of the hessian fly resistant gene H20 in 'Jori'du wheat. *J Hered*, 1990, **81**: 72
- 29 Appels R, Gerlach W L, Dennis E S *et al*. Molecular and chromosomal organization of DNA sequences coding for the ribosomal RNAs in cereals. *Chromosoma*, 1980, **78**: 293~311
- 30 Lassner M W, Dvorak J. Organization of the 5s rRNA gene family in wheat. *J Cell Biochem Suppl*, 1985, **90**: 219
- 31 Scoles G J, Gill B S, Xin Z-Y *et al*. Frequent duplication and deletion events in the 5s RNA genes and the associated spacer regions of the Triticeae. *Plant Syst Evol*, 1988, **160**: 105~122
- 32 Dvorak J, Zhang H B, Kota R S *et al*. Organization and evolution of the 5s ribosomal RNA family in wheat and related species. *Genome*, 1989, **32**: 1 003~1 016
- 33 Song Y C. Physical mapping of the 5s rDNA gene complex in rice (*Oryza sativa*). *Genome*, 1993, **36**: 658~661
- 34 Cerniello M C, Orellana J, Santos J L *et al*. Nucleolar organizer activity in wheat, rye and derivatives analyzed by a silver-staining procedure. *Chromosoma*, 1971, **89**: 370~376
- 35 Hutchinson J, Miller T E. The nucleolar organisers of tetraploid and hexaploid wheats revealed by in situ hybridization. *Theor Appl Genet*, 1982, **61**: 285~288
- 36 Miller T E, Hutchinson J, Reader S M. The identification of the nucleolus organiser chromosomes of diploid wheat. *Theor Appl Genet*, 1983, **65**: 145~147
- 37 Friebe B, Kim N S, Kuspira J *et al*. Genetic and cytogenetic analyses of the A genome of *Triticum monococcum* N. production and identification of primary trisomics using the C-banding technique. *Genome*, 1990, **33**: 542~555
- 38 Mukai Y, Endo T R, Gill B S. Physical mapping of the 18s, 26s rRNA multigene family in common wheat: Identification of a new locus. *Chromosoma*, 1991, **100**: 71~78
- 39 钟少斌, 张德玉, 周楠等. 用原位杂交技术检测小麦异源染色质及定位核糖体 DNA. *植物学报*, 1991, **33**(6): 437~442
- 40 Heslop-Harrison J S, Leitch A R, Schwarzbacher T *et al*. Detection and characterization of 1B/1R translocations in

- hexaploid wheat. *Heredity*, 1990, **65**: 385~392
- 41 Mukai Y, Friebe B, Hatchett J H *et al*. Molecular cytogenetic analysis of radiation induced wheat-rye terminal and intercalary chromosomal translocations and the detection of rye chromatin specifying resistance to hessian fly. *Chromosoma*, 1993, **102**: 88~95
- 42 Schwarzacher T, Leitch A R, Bennett M D *et al*. In situ localization of parental genomes in a wide hybrid. *Ann Bot*, 1989, **64**: 315~324
- 43 Bailey J P, Bennett S T, Bennett M D *et al*. Genomic in situ hybridization identifies parental chromosomes in the wide grass hybrid  $\times$  *Festulopia hubbardi*. *Heredity*, 1993, **71**: 413~420
- 44 Le H T, Armstrong K C, Miki B. Detection of rye DNA in wheat-rye hybrids and wheat translocation stocks using total genomic DNA as a probe. *Plant Mol Biol Rep*, 1989, **7**: 150~158
- 45 Mukai Y, Gill B S. Detection of barley chromatin added to wheat by genomic in situ hybridization. *Genome*, 1991, **34**: 448~452
- 46 Friebe B, Zeller F J, Mukai Y *et al*. Characterization of rustresistant wheat—*Agropyron intermedium* derivatives by C-banding, in situ hybridization and isozyme analysis. *Theor Appl Genet*, 1992, **83**: 775~782
- 47 Schwarzacher T, Ananthawat-Jonsson K, Harrison G E *et al*. Genomic in situ hybridization to identify alien chromosome segments in wheat. *Theor Appl Genet*, 1992, **84**: 778~786
- 48 Kenton A, Parokony A S, Gleba Y Y *et al*. Characterization of the *Nicotiana tabacum* L. genome by molecular cytogenetics. *Mol Gen Genet*, 1993, **240**: 159~169
- 49 Rayburn A L, Gill B S. Molecular evidence for the origin and evolution of chromosome 4A in polyploid wheats. *Can J Genet Cytol*, 1985, **27**: 246~250
- 50 King I P, Purdie K A, Orford S E *et al*. Detection of homoeologous chiasma formation in *Triticum durum  $\times$  *Thinopyrum bessarabicum* hybrids using genomic in situ hybridization. *Heredity*, 1993, **71**: 369~372*
- 51 Rgaard M, Heslop-Harrison J S. Investigations of genome relationships between *Leymus*, *Psathyrostachys* and *Hordeum* inferred by genomic DNA; DNA in situ hybridization. *Ann Bot*, 1991, **73**: 195~203
- 52 Dvorak J, Zhang H B. Application of molecular tools for study of phylogeny of diploid and polyploid taxa of *Triticale*. *Heredity*, 1992, **116**: 37~42
- 53 杨继, 罗敏, 李懋学. 一种新的核型分析方法——自然核型. 武汉植物学研究, 1988, **6**(3): 299~306
- 54 熊治廷. 真核生物体细胞染色体的空间排列. 武汉植物学研究, 1989, **7**(2): 189~200
- 55 Schwarzacher-Robinson T, Finch R A, Smith J B *et al*. Genotypic control of centromere positions of parental genomes in *Hordeum  $\times$  *Secale* hybrid metaphases. *J Cell Sci*, 1987, **87**: 291~304*
- 56 Linde Laursen I B, Jensen J. Genome and chromosome disposition at somatic metaphase in a *Hordeum  $\times$  *Psathyrostachys* hybrid. *Heredity*, 1991, **66**: 203~210*
- 57 Leitch A R, Schwarzacher T, Mosgoller W *et al*. Parental genomes are separated throughout the cell cycle in a plant hybrid. *Chromosoma*, 1991, **101**: 206~213
- 58 Ananthawat-Jonsson K, Schwarzacher T, Heslop-Harrison J S. Behavior of parental genomes in the hybrid *Hordeum vulgare  $\times$  *H. bulbosum*. *J Hered*, 1993, **84**(1): 78~82*
- 59 Schwarzacher T, Heslop-Harrison J S, Ananthawat-Jonsson K *et al*. Parental genome separation in reconstructions of somatic and premeiotic metaphases of *Hordeum vulgare  $\times$  *H. bulbosum*. *J Cell Sci*, 1992, **101**: 13~24*
- 60 Rayburn A L, Gill B S. Use of repeated DNA sequences as cytological markers. *Amer J Bot*, 1987, **74**(4): 574~580