

## 应用 5S rDNA 间隔序列分析鉴定体细胞杂种\*

周爱芬 徐春晖 向凤宁 夏光敏 陈惠民

(山东大学生命科学院 济南 250100)

关键词 体细胞杂种, 5S rDNA 间隔序列, PCR

分类号 Q37 文献标识码 A 文章编号 1000 3061(1999)04-0529-32

近年来,由于分子生物学的飞速发展,极大地推动了生命科学各分支学科在 DNA 水平上的研究力度。就体细胞杂种的鉴定而言,仅形态、细胞学、生化方面的证据还远远不足,直接从 DNA 水平上鉴定其杂种性质已成为必然。目前,从分子水平上鉴定体细胞杂种的方法有多种,如 RFLP 图谱分析、RAPD 分析等。由于 RFLP 分析需要特异探针,RAPD 分析的重复性较差,在一定程度上限制了两种方法在体细胞杂种鉴定方面的应用。

据报道<sup>[1]</sup>,5S rDNA(即 5S rRNA 基因)在至今研究的所有真核生物中是以串联重复单位组成的,与卫星 DNA 类似,属简单多基因家族,120bp 的编码区之间是随不同生物而长度不同的非转录间隔区。基因本身表现出很高程度的序列保守性,非转录间隔区由于并未处于与基因本身同样严酷的选择压力下因而变异较大。高等植物的间隔序列长度在 90~400bp 之间,同一属的不同种植物之间以及同一种植物之间间隔序列的碱基序列和长度不同。以保守的 5S rDNA 编码区的一致序列为基础设计 PCR 引物,用来选择性扩增变异较大的非转录间隔区,以区别融合双方的核基因组,据此可进行体细胞杂种的鉴定<sup>[2,3]</sup>。

本研究的目的在于探讨用 5S rDNA 间隔序列分析鉴定体细胞杂种的可行性,为分子水平上体细胞杂种的鉴定提供一种快速、简便、可靠的方法。

### 1 材料和方法

#### 1.1 实验材料

本实验选用的属间体细胞杂种材料为:1)普通小麦(*Triticum aestivum*)栽培品种 99P(+ )簇毛麦(*Haynaldia villosa*)原生质体经紫外融合再生的愈伤组织<sup>[4]</sup>;2)99P(+ )无芒雀麦(*Bromus inermis* Leyss)的杂种愈伤组织<sup>[5]</sup>;两种愈伤组织的形态均介于双亲之间,经染色体和同工酶分析确定为杂种,3)普通小麦品种济南 177(+ )高冰草(*Agropyron elongatum*)的体细胞杂种 F<sub>2</sub> 代植株<sup>[6]</sup>。

科间体细胞杂种材料为:酿酒葡萄(*Vitis vinifera*)(+)柴胡(*Bupleurum scorzonifolium*)的体细胞杂种愈伤组织及杂种再生的幼叶<sup>[7]</sup>。

#### 1.2 引物、DNA 抽提和 PCR 分析

本实验选用的两组引物(20mer 和 25mer)<sup>[2,3]</sup>序列为:

P I : 5' - GAGAGTAGTACATCGATGGG - 3'; P II : 5' - GGAGTTCTGACGGGATCCGG - 3' (20mer)

P III : 5' - GGATGGGTGACCTCCCGGAAGTCC - 3'; P IV : 5' - CGCTTAAGTGC GGAGTCTCTGATGGG - 3'

(25mer)

\* 国家自然科学基金(No. 39570465)和高等学校博士点基金资助项目。

收稿日期:1998-11-09,修回日期:1999-04-22。

根据材料量的多少不同,选择不同的 DNA 提取方法。参照陈永强等<sup>[6]</sup>的方法大量提取 99P(+)簇毛麦 99P(-)无芒雀麦杂种愈伤组织和济南 177(+)高冰草 F<sub>2</sub> 代植株叶片 DNA;用 CTAB 法<sup>[9]</sup>小量提取酿酒葡萄(+)柴胡杂种再生幼叶的 DNA,最后用超纯水溶解后 -20℃ 保存备用。PCR 扩增条件参照 Cox 等<sup>[12]</sup>的条件并稍加修改。反应条件为:94℃ 1min,65℃ 1min,72℃ 2min,40 个循环。扩增反应在 SX-240 型扩增仪(西安顺达电子有限公司)上进行。反应结束后,取 7μL 反应混合液上样,在 3% 的琼脂糖凝胶上电泳,用 50V 恒压电泳 30min-1h 后紫外灯下观察并照相。

## 2 结果与讨论

### 2.1 小麦与簇毛麦体细胞杂种愈伤组织的 5S rDNA 间隔序列分析

用 25mer 5S rDNA 间隔序列引物对亲本普通小麦 99P、簇毛麦及二者原生质体融合再生的愈伤组织 DNA 的 PCR 产物电泳结果如图版 1-1 所示。其中 1、2、6 号克隆具有双亲特征带。用 20mer 5S rDNA 间隔序列引物的扩增结果如图版 1-2 所示。1、2、7、8 号克隆均具双亲特征带,6 号克隆具有簇毛麦的特征带,8 号克隆还出现了与亲本不同的新带。表明这几个克隆均为杂种,与染色体、同工酶分析的结果相吻合<sup>[4]</sup>。

### 2.2 小麦与高冰草体细胞杂种 F<sub>2</sub> 代 5S rDNA 间隔序列分析

图版 1-3、图版 1-4 所示的是两组 5S rDNA 间隔序列引物对亲本普通小麦济南 177、高冰草及二者的体细胞杂种 F<sub>2</sub> 代植株 DNA 的 PCR 扩增产物电泳结果。可见所测的这几种 F<sub>2</sub> 代植株均具有双亲的特征带。图版 1-3 中第 10、1 和图版 1-2 有新带出现,说明小麦与高冰草的遗传物质发生了重组并稳定遗传到了 F<sub>2</sub> 代。

### 2.3 小麦与无芒雀麦体细胞杂种愈伤组织的 5S rDNA 间隔序列分析

分别用 25mer 和 20mer 5S rDNA 间隔序列引物对亲本普通小麦 99P、无芒雀麦及二者原生质体融合再生愈伤组织 DNA 进行 PCR 扩增,扩增产物均具有双亲的特征带。20mer 扩增产物电泳结果如图版 1-5 所示:克隆 1、2、3 均具有双亲的特征带,克隆 2、3 还出现了新带。

### 2.4 酿酒葡萄与柴胡杂种再生幼叶的 5S rDNA 间隔序列分析

用 25mer 5S rDNA 间隔序列引物对亲本酿酒葡萄、柴胡及杂种再生幼叶 DNA 的 PCR 扩增产物电泳结果如图版 1-6 所示。7 号和 10 号杂种除具有双亲特征带外,还出现了新带,说明双亲的遗传物质发生了重组。进一步从分子水平上确定了这一远缘杂种的杂种性质。以上各组实验经 2 次以上重复实验,结果稳定,重复性好。

由以上 4 组亲缘关系远近不同的体细胞杂种的 5S rDNA 间隔序列分析结果可以看出 5S rDNA 间隔序列分析操作方便,重复性好,在生长发育的各个时期均能检测,所需 DNA 量少,是一种分子水平上鉴定体细胞杂种的好方法。但由于此法检测的基因组位点数目较少,可与其它的分子检测技术如 RAPD、RFLP 等相结合,对体细胞杂种中的异源基因作出更精确、更全面的定位与分析。

## 参 考 文 献

- [1] J. Dvorak, H. B. Zhang, R. S. Kota *et al.* *Genome*, 1989, **32**: 1003~1016.
- [2] A. V. Cox, M. D. Bennett, T. A. Dyer. *Theor. Appl. Genet.*, 1992, **83**: 684~690.
- [3] C. Zanke, N. Borisjuk, B. ruoss *et al.* *Theor. Appl. Genet.*, 1995, **90**: 720~726.
- [4] A. F. Zhou, F. N. Xiang, G. M. Xia *et al.* Eighteenth International Congress of Genetics, Beijing, China, 1998, **8P** 171.
- [5] 向凤宁,夏光敏,周爱芬等. 植物学报, 1999, **41**(5): 458~462.
- [6] 夏光敏,向凤宁,王晓莺等. 山东大学学报,自然科学版, 1998, **34**(4): 448~454.
- [7] 宋锡全,夏光敏,周爱芬等. 科学通报, 1999(待发表).
- [8] 陈永强. 遗传, 1979, **1**(1): 39~40.
- [9] 孙敬三,桂耀林.《植物细胞工程实验技术》,北京:科学出版社, 1995, p. 298

## Study on the Identification of Somatic Hybrids by PCR with 5S rDNA Spacer Sequence Primers\*

Zhou Aifen Xu Chunhui Xiang Fengning Xia Guangmin Chen Huimin  
(School of Life Science, Shandong University, Jinan 250100)

**Abstract** Three intergeneric somatic hybrids (wheat (+) *Haynaldia villosa*, wheat (+) *Bromus inermis*, wheat (+) *Agropyron elongatum*) and one interfamilial somatic hybrid between *Vitis vinifera* and *Bupleurum scorzonerifolium* were analyzed by PCR with two kinds of primers. The results showed that in the electrophoresis pattern of the PCR products the somatic hybrids had the characteristic bands of two parents and (or) new bands. This research reveals that PCR analysis with 5S rDNA spacer sequence primers can be used for the identification of somatic hybrids at the molecular level and it is a good method because of its simplicity and good reproducibility.

**Key words** Somatic hybrids, 5S rDNA spacer sequence, PCR

\* Supported by National Science Foundation of China(No. 39570465) and the Foundation of State Education Commission of China.

### 《生物工程学报》2000 年改版、征订启事

邮发代号:82-13

刊号:ISSN1000-3061

CN11-2611/Q

刊期:双月刊

页码:120

单价:20.0 元

全年:120 元

主办:中科院微生物研究所,中国微生物学会

主编:焦瑞身

#### 内容简介:

大 16 开、双月刊、四色铜版彩印封面,《生物工程学报》2000 年将以崭新的面貌迎接生物技术的新世纪。

本刊为中国自然科学核心期刊,据中国科技信息研究所及中科院引文数据库的 latest 统计结果,我刊影响因子的排名已跃居生物类期刊的前 10 位。2000 年,本刊仍将保持自己的学术特色,重点刊登获“863”高技术、国家自然科学基金资助或列为“八·五”、“九·五”攻关项目的高水平研究论文和简报,并将更多地关注国内外生物技术各领域(基因工程、细胞工程、酶工程和生化工程等)的研究进展。不定期的“MINI REVIEW”将使读者更快、更深入地获得最新的科研信息。

**刊期缩短! 周期更快! 单价不变! 欢迎订阅!**

若邮局订刊不便或漏订,亦可在编辑部直接订阅,免收邮费。

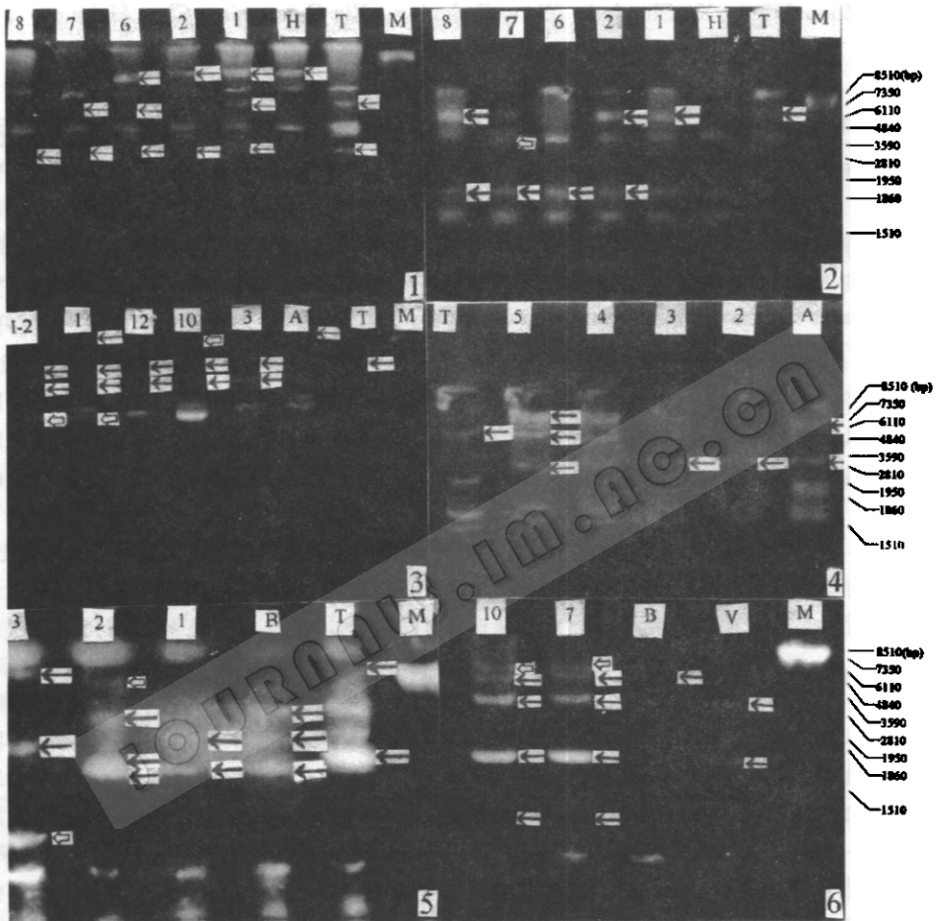
周爱芬等:应用 5S rDNA 间隔序列分析鉴定体细胞杂种

图版-I

Zhou Aifen *et al*: Study on the identification of somatic

Plate-I

hybrids by PCR with 5S rDNA spacer sequence primers



1. Electrophoresis pattern of PCR product with 25mer primer, M: Molecular weight marker

T: Common wheat cv. 99p, H: *Haynaldia villosa*, 1, 2, 6, 7, 8: Regenerated clones of wheat (+) *Haynaldia*

2. Electrophoresis pattern of PCR product with 20mer primer M, T, H, 1, 2, 6, 7, 8 as Fig. 1

3. Electrophoresis pattern of PCR product with 20mer primer, M: Molecular weight marker

T: Common wheat cv. Jinan177, A: *Agropyron glongatum*, 3, 10, 12, I, II-2: F<sub>2</sub> hybrid plant of T (+) A

4. Electrophoresis pattern of PCR product using 20mer primer, T: Common wheat cv. Jinan 177, A: *Agropyron elongatum*, 2, 3, 4, 5: F<sub>2</sub> hybrid plant of T (+) A

5. Electrophoresis pattern of PCR product using 20mer primer, M: Molecular weight marker,

T: Common wheat cv. 99p, B: *Bromus inermis*, 1, 2, 3: Regenerated clones of T (+) B

6. Electrophoresis pattern of PCR product using 25mer primer, M: Molecular weight marker,

V: *Vitis vinifera*, B: *Bupleurum scorzonrifolium*, 7, 10: Regenerated clones of V (+) B