

张利国. 大麻 ISSR 引物的筛选与细胞学制片技术的优化[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(4): 30–32.

# 大麻 ISSR 引物的筛选与细胞学制片技术的优化

张利国<sup>1,2</sup>, 张效霏<sup>3</sup>, 房郁妍<sup>1</sup>, 郑楠<sup>1</sup>, 宋宪友<sup>1</sup>

(1. 黑龙江省农业科学院经济作物研究所, 黑龙江哈尔滨 150086; 2. 东北农业大学生命科学学院, 黑龙江哈尔滨 150030;  
3. 广西大学数学与信息科学学院, 广西南宁 530004)

**摘要:**在稳定的 ISSR-PCR 扩增条件下, 使用 50 个大麻 ISSR 引物对代表性的大麻材料进行 PCR 扩增, 筛选出 14 个适合大麻的 ISSR 引物; 同时, 为优化大麻染色体的制片质量, 对大麻染色体制片过程中的变温预处理、低温提高中期分裂相的方法及解离等具体技术与方法进行了试验, 优化后的大麻染色体制片条件为: 芽长达 1 cm 后 (21 ℃), 23 ℃ 条件下促芽生长 24 h, 再低温 (0 ℃) 处理 24 h, 37 ℃ 解离 20 min (20 g/L 纤维素酶和 20 g/L 果胶酶)。适合大麻 ISSR-PCR 反应的引物筛选与染色体制片技术的优化, 将为大麻遗传多样性的多层次化分析提供试验基础。

**关键词:**ISSR 引物; 大麻; 染色体; 制片技术

**中图分类号:** S563.303 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)04-0030-03

大麻起源于我国, 大麻纤维公元前 8 世纪即有应用, 是人类历史上最早应用的纤维作物<sup>[1]</sup>, 目前在纺织、建筑和医药上都有广泛用途。国内主要是应用大麻纤维, 大麻纤维具有吸湿、透气、杀菌抑菌、无静电等特点, 且具有极强的抗紫外线功能, 已成为重要的军用纺织品原料。由于大麻是雌雄异株作物, 遗传资源极易混杂, 而且至今未能建立起有效的鉴别方法和标准<sup>[2]</sup>, 给大麻的种质鉴定、扩大栽培等带来不便。

ISSR 可以在没有任何分子生物学研究基础的情况下, 进行基因组指纹图谱的构建。ISSR 引物较长, 因而对 PCR 反应的敏感性低于 RAPD, 稳定胜优于 RAPD, 具有较好的稳定性

和多态性<sup>[3-5]</sup>。针对目前大麻遗传学研究基础薄弱、相关的 SSR 引物并未开发的现状, ISSR 标记技术是从分子水平研究大麻遗传分化较合适的方法。ISSR 标记可重复性明显优于 RAPD, 但不如细胞学标记直观和稳定, 而细胞学的核型资料在种内相当稳定, 直观性好, 说服力强, 同时在研究植物的起源与进化上具有独特的优势<sup>[6]</sup>。综合利用细胞遗传学和 ISSR 技术来研究大麻遗传多样性, 将有效地克服单一方法存在的局限, 从各自的角度提供种间分化信息。

对于不同植物, 其染色体压片技术中的处理手段与处理时间各不相同。目前传统的大麻制片方法是通过对二氯苯、8-羟基喹啉、秋水仙碱<sup>[7]</sup>等化学药剂的作用, 使染色体分裂相尽可能地停留在中期, 但由于使用了化学药剂, 容易产生染色体的异常分裂、染色体断片、丢失、形态上的扭曲等现象, 不利于荧光原位杂交等后续试验。同时, 如果操作不当, 易诱发人的细胞染色体突变, 对长期制片工作者具有一定的损害。此外, 这些方法在操作上效果有限, 获得大量中期分裂相难度

收稿日期: 2013-08-13

基金项目: 黑龙江省自然科学基金 (编号: QC2012C115); 黑龙江省哈尔滨青年科技创新人才项目 (编号: 2013RFQYJ014)。

作者简介: 张利国 (1978—), 男, 黑龙江哈尔滨人, 博士研究生, 助理研究员, 从事麻类分子育种学研究。E-mail: zlg86@aliyun.com。

通信作者: 张效霏。E-mail: 14975487@qq.com。

[2] Mihola O, Trachtulec Z, Vlcek C, et al. A mouse speciation gene encodes a meiotic histone H3 methyltransferase [J]. Science, 2009, 323 (5912): 373–375.

[3] Hayashi K, Yoshida K, Matsui Y. A histone H3 methyltransferase controls epigenetic events required for meiotic prophase [J]. Nature, 2005, 438 (766): 374–378.

[4] Grey C, Barthès P, Chauveau-Le Fric G, et al. Mouse PRDM9 DNA-binding specificity determines sites of histone H3 lysine 4 trimethylation for initiation of meiotic recombination [J]. PLoS Biology, 2011, 9 (10): e1001176.

[5] Li L, He S H, Sun J M, et al. Gene regulation by Sp1 and Sp3 [J]. Biochemistry and Cell Biology, 2004, 82 (4): 460–471.

[6] Lee J A, Suh D C, Kang J E, et al. Transcriptional activity of Sp1 is regulated by molecular interactions between the Zinc finger DNA binding domain and the inhibitory domain with corepressors, and this interaction is modulated by MEK [J]. Biological Chemistry, 2005, 280 (30): 28061–28071.

[7] 郭晓强. PRDM9 在哺乳动物基因重组热点中的作用 [J]. 生物化

学与生物物理进展, 2010, 37 (9): 929–931.

[8] Parvanov E D, Petkov P M, Paigen K. Prdm9 controls activation of mammalian recombination hotspots [J]. Science, 2010, 327 (5967): 835.

[9] Thomas J H, Emerson R O, Shendure J. Extraordinary molecular evolution in the PRDM9 fertility gene [J]. PLoS One, 2009, 4 (12): e8505.

[10] Laity J H, Chung J, Dyson H J, et al. Alternative splicing of Wilms' tumor suppressor protein modulates DNA binding activity through isoform-specific DNA-induced conformational changes [J]. Biochemistry, 2000, 39 (18): 5341–5348.

[11] Oliver P L, Goodstadt L, Bayes J J, et al. Accelerated evolution of the Prdm9 speciation gene across diverse metazoan taxa [J]. PLoS Genetics, 2009, 5 (12): e1000753.

[12] Irie S, Tsujimura A, Miyagawa Y, et al. Single-nucleotide polymorphisms of the PRDM9 (MEISET2) gene in patients with nonobstructive azoospermia [J]. Journal of Andrology, 2009, 30 (4): 426–431.

较大,给大麻染色体分析带来直接困难。

本研究在建立大麻 ISSR - PCR 反应体系的条件下,筛选出适合大麻的 ISSR 引物;同时采用日本京都大学细胞遗传学家远藤教授的植物染色体制片方法(该方法在小麦、亚麻、苕麻等作物上都取得了良好效果),结合大麻作物特点,优化大麻染色体制片条件。研究结果将为从细胞和分子水平综合分析大麻遗传起源、进化提供研究基础,两方面互相补充,将会有效克服单一方法存在的局限。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料黑龙江大麻地方品种 Wuchang40 以及代表性大麻资源 K - 16、K - 20 由黑龙江省农业科学院经济作物研究所提供。ISSR 分析采用哥伦比亚大学最新公布的 50 条引物。

1.2 试验方法

1.2.1 筛选适合大麻的 ISSR 引物 在前期工作中,反应体系各因素及梯度设计见表 1。

表 1 大麻 ISSR - PCR 反应条件筛选试验设计

影响因素	试验梯度
dNTP	0.1、0.15、0.2、0.25 μL(25 mmol/L)
Taq DNA 聚合酶	0.5、1、1.5、2 U(2.5 pmol/μL)
引物体积	1、1.5、2 μL(2.5 pmol/μL)
预变性时间	0、1、2、3、4、5 min
退火温度	47、48、49、50、51、52 ℃

通过以上试验,最终得到优化的 ISSR 反应体系和反应程序:

ISSR 反应体系(25 μL):模板 1 ng/μL,聚合酶 1 U(2.5 pmol/μL),引物 200 nmol/L,dNTP 200 μmol/L。

ISSR 反应程序:94 ℃预变性 3 min;94 ℃变性 15 s,48 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,循环 38 次;72 ℃延伸 10 min;4 ℃保存。

以 Wuchang40、K - 16、K - 20 等 3 份代表材料 DNA 为模板,用 50 条 ISSR 引物扩增。

1.2.2 高质量细胞学制片条件的优化 与制片相关联的各

影响因素试验设计见表 2。

发芽:培养皿加厚滤纸,加水量以水不能自由流动为宜,将种子在滤纸上摆好,在 21 ℃ 条件下按时间梯度进行培养(表 2)。种芽低温处理:将发芽的种子置于 8 ℃ 温度条件下培养 40 h。促芽生长:将低温处理的种子转入 23 ℃ 温度条件下,按时间梯度(表 2)进行培养,使种芽迅速生长,主根可长至 2 ~ 3 cm。处理:将上述处理的根尖剪下 1 cm 左右,立即放入装有冰水的试管中。将装有根尖的试管放入带有冰水的保温瓶中,按时间梯度进行冷处理(表 2)。固定:将根尖取出,经滤纸吸干,在卡诺固定液中低温固定。保存:材料在 70% 乙醇中可保存 0.5 年,更长时间保存则用 95% 乙醇。前低渗:将材料从固定液中转入双蒸水中进行前低渗处理,一般在 25 ℃ 左右条件下处理 30 min。酶解去壁:吸除低渗液,直接加入 20 g/L 纤维素酶和 20 g/L 果胶酶,材料与酶解液的比例是 1 : 5,37 ℃ 适当解离,酶解时间见表 2,以去除细胞壁。后低渗:用同温度的蒸馏水清洗根尖,去除酶解液,在双蒸水中停留 15 min。染色:1% Giemsa 染液(pH 值 7.1)染色,制片,乙醇灯火焰干燥后,镜检。

表 2 染色体制片条件优化试验设计

影响因素	试验梯度
发芽时间	24、28、32、36 h(21 ℃)
促芽生长时间	16、20、24、28 h(23 ℃)
冷处理时间	16、20、24、28 h(0 ℃)
酶解去壁时间	5、10、20、30 min

2 结果与分析

2.1 引物筛选结果

以 3 份代表性材料的 DNA 作模板,利用稳定的试验体系对所有的 50 个引物进行扩增,并重复 1 次,以期试验结果稳定。筛选引物的标准为:谱带清晰、稳定、可重复性好且有较丰富的扩增带,在个体间能够产生足够变异;有些引物虽然扩增条带清晰,但位点数少于 3 个,这类引物不使用(图 1)。共筛选出 14 个引物(表 3)。

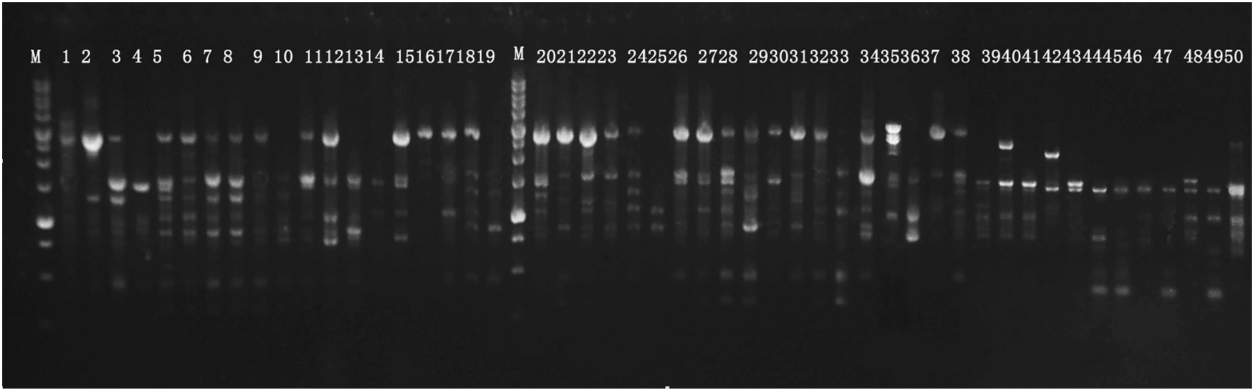


图 1 50 个 ISSR 引物对大麻的扩增电泳图谱

2.2 细胞学制片条件优化

2.2.1 预处理 种子发芽后(芽长达 1 cm 时)转入 23 ℃ 温度条件下,分别处理 16、20、24、28 h,结果表明,经过前期变温处理,在 23 ℃ 条件下处理 24 h,会使细胞分裂旺盛,获得较多的清晰、染色体凝聚适度的中期分裂相;其次是 20 h 的处理较好。

2.2.2 低温处理 根尖剪下后放入装有冰水的试管中,将装有根尖的试管放入带有冰水的保温瓶中,分别冷处理 16、20、24、32 h,结果表明,低温处理 24 h,会使得大量细胞分裂相停留在中期,而且染色体的形态良好,便于作进一步分析(图 2)。32 h 低温处理的染色体收缩过度,不易观察(图 3)。

表 3 筛选出的引物

引物编号	引物序列(5'→3')
804	TATATATATATATATAA
808	AGAGAGAGAGAGAGAGC
824	TCTCTCTCTCTCTCTCG
827	ACACACACACACACACG
834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT
841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC
848	CACACACACACACACARG
852	TCTCTCTCTCTCTCTCRA
857	ACACACACACACACACYG
859	TGTGTGTGTGTGTGTGRC
867	GGCGGCGGCGGCGGCGGC
869	GTTGTGTGTGTGTGTGTT
872	GATAGATAGATAGATA
873	GACAGACAGACAGACA

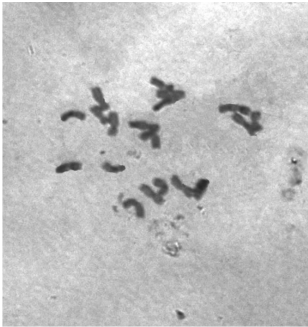


图2 处理良好的大麻中期染色体

2.2.3 酶解 研究发现,20 g/L 纤维素酶和 20 g/L 果胶酶在 37 ℃ 处理 20 min,细胞解离去除细胞壁效果较好(图 2);处理 10 min 则去除细胞壁程度不够,部分染色体依然被果胶质包裹(图 4);而处理 30 min 的材料容易破碎,获得的分裂相不完整。

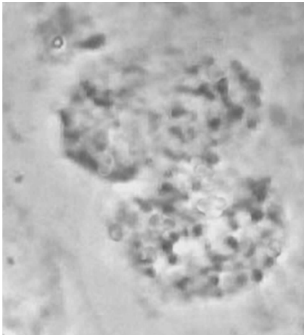


图3 染色体过度收缩(低温处理)

2.2.4 固定 研究发现,卡诺固定液中低温固定,固定时间至少保证 16 h,但固定时间也不宜过长,如果长期放在固定液中染色体容易凝缩。

3 结论与讨论

3.1 ISSR 引物筛选

由于不知道目的基因组 DNA 的背景资料,有一些 ISSR 引物可能在特定基因组 DNA 中没有配对区域而无扩增产物。在 PCR 扩增反应中,退火温度的影响是最大的,一般在运行 ISSR-PCR 时,采用 48~52 ℃ 退火温度都能得到好的扩增

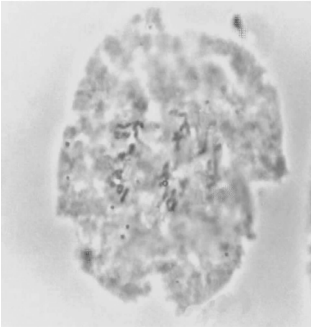


图4 酶解时间不足(果胶质包裹)

带,而且 ISSR 也是显性标记,模板浓度需要较一致。筛选适合大麻 ISSR-PCR 引物的标准为:谱带清晰、稳定,扩增位点较多(一般在 3 个以上),重复性好。

3.2 细胞学制片优化

制片的关键在于根尖材料的处理。本试验通过变温处理来提高根尖细胞的分裂指数,在 21 ℃ 萌发后转到 8 ℃ 条件下培养 40 h,再转到 23 ℃ 下培养 24 h。不同大麻品种变温处理具体要求可能会稍有变化,可随时压片镜检确定,原则上也就是在根尖生长最旺盛的时候取材。

冰水混合物(低温冷处理)的作用是通过抑制微管蛋白组装成纺锤丝,因此凡进入中期的染色体均被阻遏而不进入分裂后期,这样就可以累积大量的处于分裂中期的染色体。

本试验采用 24 h 低温处理,染色体长度适中,形态良好。在处理的过程中一定保证冰水混合物的状态;并且处理时间不能过长,否则会导致染色体高度浓缩,不利于进一步分析。低温处理的方法简便易行,获得的中期分裂相较多,效果良好,而且由于在整个制片过程中没有使用化学药剂,所以不会出现污染和因为前处理产生异常分裂现象,可为原位杂交等后续技术在大麻研究上的应用奠定试验基础。

大麻 ISSR 引物的筛选和高质量细胞学制片技术的优化,将为多层次、多角度研究大麻遗传信息奠定基础,包括研究大麻遗传多样性、物种起源和遗传演化等。

参考文献:

[1] 关风芝. 大麻遗传育种与栽培技术[M]. 哈尔滨:黑龙江人民出版社,2010.

[2] 张利国,关风芝,吴广文,等. 基于核型与 RAPD 标记的大麻地方品种遗传多样性分析[J]. 中国麻业科学,2009,31(3):169-172,181.

[3] 陶爱芬,祁建民,粟建光,等. SRAP 和 ISSR 及两种方法结合在分析黄麻属起源与演化上的比较[J]. 作物学报,2011,37(12):2277-2284.

[4] 汪 斌,祁 伟,兰 涛,等. 应用 ISSR 分子标记绘制红麻种质资源 DNA 指纹图谱[J]. 作物学报,2011,37(6):1116-1123.

[5] 张 明,李延龙. 基于 ISSR 标记的韭菜种质资源遗传多样性初探[J]. 西北农业学报,2012,21(1):146-150.

[6] Sheng Y,Zheng W H,Pei K Q,et al. Population genetic structure of a dominant desert tree, *Haloxylon ammodendron* (Chenopodiaceae) in the Southeast Gurbantungut desert detected by RAPD and ISSR markers[J]. Acta Botanica Sinica,2004,46(6):675-681.

[7] 辛培尧. 大麻染色体行为分析[J]. 西北植物学报,2008,28(11):2189-2193.