

青岛文昌鱼(*Branchiostoma belcheri tsingtauense*) 染色体荧光原位杂交条件研究*

赵婷婷^{1,2} 王昌留¹ 张广珍¹ 王俊刚² 黄玲¹ 王磊¹

(1. 鲁东大学生命科学院 烟台 264025; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所 海口 571101)

提要 采用青岛文昌鱼 18S rDNA 序列为探针进行荧光原位杂交, 根据囊胚晚期细胞上的核杂交信号多少及特异性确立青岛文昌鱼染色体荧光原位杂交的最佳反应条件。结果表明适合于青岛文昌鱼染色体荧光原位杂交的条件为: 预处理采用 5ng/μl 的胃蛋白酶处理 3—5min 和 10ng/μl RNA 酶处理 1h; 100—300 倍探针浓度的鲑鱼精 DNA 进行封闭; 50% 甲酰胺/2×SSC, 1×SSC, 2×SSC, 42℃ 的洗脱强度; 3% BSA 进行抗体封闭; 杂交时间可以控制在 12—18h; 杂交温度保持 37℃; PI (1.5μg/ml) 的量每片 20μl 以内。

关键词 青岛文昌鱼, 染色体, 荧光原位杂交

中图分类号 Q343.1+7

染色体荧光原位杂交技术(fluoresce *in situ* hybridization, FISH)是继染色体显带技术之后发展起来的一种新的细胞遗传技术。自 1986 年首次利用 FISH 技术进行了人类细胞遗传检测以来(Pinkel *et al.*, 1986), FISH 技术已经被广泛用于动物、植物、微生物的细胞遗传检测应用方面(Levsky *et al.*, 2003), 如特定基因的物理定位、检测染色体异常、检测及鉴定病原菌、检测整合入基因组的外源基因及鉴定种属间的亲缘关系等。

在进化地位上, 文昌鱼是介于脊椎动物和无脊椎动物之间的一种过渡型海洋珍稀生物。2002 年, Castro 和 Holland 首次将 FISH 技术应用于文昌鱼的染色体基因定位(Castro *et al.*, 2002), 但是由于受到染色体制片因素的影响, 定位结果并不理想。目前, 青岛文昌鱼(*Branchiostoma belcheri tsingtauense*)染色体核型及显带方面的研究笔者等已进行了详细报道(Wang *et al.*, 2003, 2004; Zhang *et al.*, 2004; 牟洪善等, 2011) [王义权等(2005)根据 DNA 分子标记技术, 建议将产于青岛等地的文昌鱼种名 *Branchiostoma*

belcheri tsingtauense 订正为 *B. japonicus*]。采用荧光原位杂交技术对文昌鱼染色体结构进行精细分析, 将有助于进一步揭示文昌鱼的进化地位及与其它物种的亲缘关系。本文主要采用青岛文昌鱼 18S rDNA 克隆序列在囊胚晚期细胞上的核杂交信号优劣来确立文昌鱼染色体荧光原位杂交适宜的实验条件, 可为青岛文昌鱼染色体基因定位、物理作图、比较基因组杂交等分子细胞遗传学研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

7 月份将青岛文昌鱼雌、雄成体饲养于底层铺有 15cm 厚沙子的容器内, 容器内的海水连续充气。每天换水一次, 换水后投喂单胞藻。每天傍晚检查文昌鱼的产卵情况。一般情况下雄性文昌鱼先从沙中游出, 并在水面上快速游动并完成排精, 然后雌性文昌鱼游出排卵。将雌性文昌鱼捞出, 使其排卵于平皿中。用含有文昌鱼精子的海水使其受精, 以无菌海水洗涤受精卵后, 让其在室温下自然发育(Wu *et al.*, 1994)。

* 国家“863”高技术研究发展计划, 2008AA092604 号; 山东省自然科学基金项目资助, ZR2010CM030 号; 山东省教育厅科技计划, J08LE03 号。赵婷婷, 博士研究生, E-mail: zhaoting1010@163.com

通讯作者: 王昌留, 博士, 教授, E-mail: changliuwang@sina.com

收稿日期: 2011-09-15, 收修改稿日期: 2011-11-28

在解剖镜下连续观察文昌鱼胚胎的发育时期,在大部分胚胎发育至晚期囊胚和早期原肠胚时,用吸管吸取胚胎于培养皿中,备用。

文昌鱼 rDNA 质粒 puDNA34 克隆(由中国海洋大学发育生物学实验室惠赠); Biotin-Nick Translation Mix, 购自 Roche 公司; Fluorescein Avidin DCS, 购自 Vector 公司; Mounting Medium with PI, 购自 Vector 公司; 三博远志公司质粒提取试剂盒。

1.2 方法

1.2.1 染色体玻片标本的制备 选用文昌鱼囊胚晚期和原肠早期胚胎细胞制备染色体。染色体制片方法参照 Wang 等(2003)的青岛文昌鱼染色体制备方法。

以下 FISH 流程以及梯度设置是参考 Pinkel 等(1986)、Costro 等(2002)和 Beatty 等(2002)进行预设的。

1.2.2 探针制备 质粒提取(按照三博远志公司质粒提取试剂盒进行提取); 探针标记: 将提取好的质粒按照 Biotin-Nick Translation Mix 说明书操作步骤进行生物素标记。将标记好的质粒探针溶于杂交缓冲液(50%去离子甲酰胺, 10%硫酸葡聚糖, 0.1% SDS, 2×SSC)中(Octavian *et al*, 2000), 浓度为 10ng/μl 探针。在杂交缓冲液中应加入封闭 DNA (blocking DNA), 本实验中采用超声波断裂的小片段鲑鱼精 DNA 作为封闭 DNA(赵婷婷等, 2007)。并且选用了四个浓度对照分别为 50 倍、100 倍、300 倍、500 倍的探针浓度来比较在不同浓度的 blocking DNA 条件下对杂交信号及背景的影响。

1.2.3 探针及标本变性

探针变性 将制备好的探针杂交缓冲液 80℃ 变性 7min; -20℃ 放置 10min 以上; 杂交前 32℃ 预退火 5min。

标本变性 将标本置于 50℃ 烘箱中, 变性 2h; 75℃ 预热的 75%去离子甲酰胺/2×SSC 中变性 3min; 室温下, 70%、90%、100%梯度酒精脱水, 每一梯度中静置 7min, 空气干燥。

1.2.4 标本预处理

蛋白酶预处理 选用胰蛋白酶和蛋白酶 K 两种蛋白酶对染色体玻片标本进行预处理(Schwarzacher *et al*, 2000)。同时分别采用不同浓度的蛋白酶 K 1ng/μl、5ng/μl、10ng/μl, 不同的处理时间 10s、20s、30s、60s、180s、300s。

RNase 预处理 10ng/μl RNase (sigma)于 37℃ 处理 1h。

1.2.5 杂交 将变性的探针滴加到经过预处理的染色体制片标本上, 每片约 20μl 杂交混合液, 加盖盖玻片, 封口膜封好, 置于湿盒 37℃ 杂交 13h、15h、16h、17h。

1.2.6 杂交后洗脱 三种强度洗脱: (1) 50%甲酰胺/2×SSC, 42℃, 浸洗 4 次, 各 5min; 1×SSC, 42℃, 浸洗 3 次, 各 5min; 2×SSC 室温中轻洗。(2) 50%甲酰胺/2×SSC, 45℃, 浸洗 4 次, 各 5min; 1×SSC, 45℃, 浸洗 3 次, 各 5min; 2×SSC 室温中轻洗。(3) 50%甲酰胺/1×SSC, 42℃, 浸洗 4 次, 各 5min; 1×SSC, 42℃, 浸洗 3 次, 各 5min; 2×SSC 室温中轻洗。

加 BSA(牛血清白蛋白)封闭液(3% BSA, 2×SSC, 0.1% Tween20), 加盖玻片置暗盒中 37℃ 温育 1h。将适量 10μg/ml Fluorescein Avidin 加于染色体玻片上, 37℃ 温育 1h。标本于洗脱液(4×SSC, 0.1% Tween-20)中 42℃, 浸洗 3 次, 各 5min。1.5μg/mlPI(溴化丙啶)复染, 加盖盖玻片指甲油封片。

1.2.7 信号检测及图像处理 将复染后的玻片于 Olympus 荧光显微镜 BX50 下选用不同的滤镜组合 WIB(激发 FITC, 呈绿色荧光)、WIG(激发 PI, 呈现红色荧光)观察荧光信号, 并用 DP70 摄像头拍照。获取的图像用 Adobe photoshop 7.0 进行处理。

2 结果

2.1 染色体制片预处理对照

染色体荧光原位杂交中, 目标材料的预处理有利于探针与染色体上的相应靶基因结合, 并且便于荧光抗体和生物素的相互作用。预处理的好坏直接影响到探针结合的稳定性(Schwarzacher *et al*, 2000)。因此, 目标材料预处理是影响杂交结果的一个关键因素。

2.1.1 不同蛋白酶种类预处理结果比较 分别采用 5ng/μl 胃蛋白酶和 5ng/μl 胰蛋白酶处理玻片上胚胎细胞 3min 后发现文昌鱼胚胎细胞对胰蛋白酶的作用更加敏感。在相同浓度条件下, 胰蛋白酶处理后的胚胎细胞中出现材料丢失现象, 而胃蛋白酶作用相对较弱, 没有造成材料的缺失。一旦蛋白酶预处理造成材料缺失很可能引起部分或全部染色体丢失, 也就不可能得到高质量和完整数目的染色体。因此, 选用胃蛋白酶进行预处理效果较好。

2.1.2 不同浓度的胃蛋白酶预处理比较 对不同浓度胃蛋白酶处理结果进行比较发现(处理时间均为 3min): 在胃蛋白酶浓度为 1ng/μl 时, 核杂交信号不明显, 只能在胚胎细胞周围看到单个细胞核物质, 蛋

白酶作用力度不足; 当以 $5\text{ng}/\mu\text{l}$ 胃蛋白酶进行处理时核杂交信号分布均匀, 集中于表层胚胎细胞, 结果如图 1。从图 1 的 PI 复染图像中进一步可以看出细胞中的核物质(图中一个红色点状物质代表一个细胞中的核物质), 杂交探针也就更容易与靶片段结合; 当采用 $10\text{ng}/\mu\text{l}$ 胃蛋白酶处理后出现材料的丢失。总体比较而言, 采用 $5\text{ng}/\mu\text{l}$ 的胃蛋白酶进行预处理较为适宜。

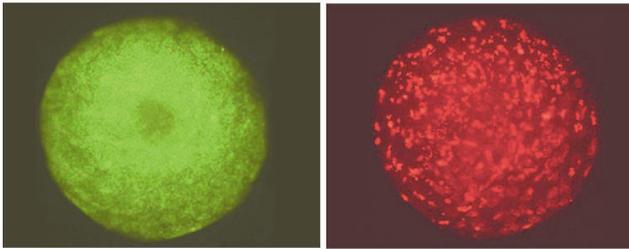


图 1 胃蛋白酶预处理后胚胎细胞杂交信号

Fig.1 The hybridization signal on blastula cells after pepsin treatment

注: 左为 FITC 激发出的绿色荧光; 右为 PI 复染后激发出的红色荧光

2.1.3 不同的胃蛋白酶处理时间结果对比 本试验采用了 10s、20s、30s、60s、180s、300s 六个时间梯度进行 $5\text{ng}/\mu\text{l}$ 的胃蛋白酶处理最佳时间的探讨。研究表明随着处理时间的延长核杂交信号越来越明显, 杂交背景越来越低, 没有材料部位荧光背景较弱。当以 $5\text{ng}/\mu\text{l}$ 的胃蛋白酶处理 10s 时, 杂交信号不明显, 整个胚胎均显示出绿色荧光, 整体没有差别, 背景较高; 在分别处理 20s、30s、60s、180s 时, 单个可分辨信号逐渐增多, 界限越来越明显, 背景越来越低, 尤其在胃蛋白酶处理 300s 时, 能够很清楚地分辨出单个信号, 表明探针与靶序列结合更容易, 周围的荧光背景低, 单个荧光信号易于独立分辨出来。然而, 在胃蛋白酶处理 300 s 的胚胎细胞中, 部分出现材料缺失现象。因此最佳的胃蛋白酶处理时间应为 3—5min, 不能超过 5min。

2.1.4 RNA 酶预处理实验结果 在 RNA 酶预处理过程中, 主要是针对 PI 复染既可以染 RNA 又可以染 DNA 的特性来进行预处理的。若采用 DAPI 进行复染时可以不进行 RNA 预处理。结果表明经过 RNA 酶处理的材料荧光信号弱, 显示出来的杂交信号较少。这主要是因为 RNA 酶起了部分封闭抗体与生物素结合的作用。因此, 是否需要 RNA 酶预处理可以根据不同的实验情况而定。尤其在细胞碎片较多时可

以选用 RNA 酶处理, 否则会增加染色体外非特异性信号。

2.2 不同的鲑鱼精 DNA 浓度对杂交信号的影响

经过超声波处理的鲑鱼精 DNA 片段大小集中于 200bp 以下, 短序列的 DNA 片段可以封闭基因组 DNA 上具有普遍同源性的片段, 以减少探针的非特异性结合。用不同浓度鲑鱼精 DNA 进行杂交封闭比较分析发现: 较低浓度的鲑鱼精 DNA 封闭(blocking DNA)时, 核杂交信号较多, 杂交背景较高; 随着鲑鱼精 DNA 浓度的不断增加, 则可分辨的单个杂交信号增多; 当鲑鱼精 DNA 浓度达到 500 倍探针(probe)浓度时, 可视性单个杂交信号减少。因此, 在进行文昌鱼染色体 FISH 时, 采用 100—300 倍探针浓度的鲑鱼精 DNA 作为封闭 DNA。

2.3 不同的洗脱严紧度对杂交信号的影响

杂交后的洗脱对于杂交背景的影响至关重要 (Schwarzacher *et al*, 2000)。洗脱强度直接影响着非特异性信号的多寡以及杂交背景的高低和获取的荧光图片的质量。本试验根据多数文献报道中普遍采用的强度来进行试验和设置对照。结果表明在杂交后洗脱采用 50% 甲酰胺/ $1\times\text{SSC}$, $1\times\text{SSC}$, $1\times\text{SSC}$ 洗脱严紧度时, 没有材料区域的非特异性信号较多。在采用 50% 甲酰胺/ $2\times\text{SSC}$, $1\times\text{SSC}$, $2\times\text{SSC}$ 洗脱严紧度时, 非特异性信号减少。另外, 在相同的洗脱强度条件下, 分别采用 42°C 和 45°C 洗脱温度后发现: 在 42°C 时核杂交单个信号明显, 杂交背景低; 在 45°C 时核杂交信号界限不明显, 背景较高。

2.4 BSA 封闭对杂交信号的影响

BSA 的作用主要是封闭抗体的非特异性结合 (Schwarzacher *et al*, 2000)。本实验分别探讨了采用 BSA 处理和未经 BSA 处理的差别。结果表明未经 BSA 作用时, 出现了较多的非特异性信号, 核杂交信号分布均匀。在进行 BSA 处理时, 背景低, 杂交信号少, 非特异性和特异性杂交信号均减少。

2.5 PI 量对杂交信号的影响

用于复染的 PI 量的多少直接影响信号的检测和荧光图像的质量。对 $30\mu\text{l}/\text{片}$ ($22\text{mm}\times 50\text{mm}$) 和 $20\mu\text{l}/\text{片}$ PI 量进行胚胎细胞复染的图像, 比较分析发现 PI 量较少 $20\mu\text{l}/\text{片}$ 时杂交信号更加清晰。PI 量的多少主要根据染色体玻片上的材料多少进行调整, 不能以固定的量来进行复染。

2.6 杂交时间及温度对杂交信号及杂交背景的影响

在 37°C 分别杂交 13h、15h、16h、17h 时, 杂交

信号及背景没有明显差别。

3 讨论与结论

经过比较分析, 适合文昌鱼胚胎细胞染色体荧光原位杂交条件为: 预处理采用 5ng/μl 胃蛋白酶处理达到 3—5min, RNA 酶可以根据实验需要选用; 鲑鱼精 DNA 浓度介于 100—300 倍探针浓度; 洗脱严谨度为 50% 甲酰胺/2×SSC, 1×SSC, 2×SSC, 42℃; BSA 既可减少非特异性信号, 也可以减少特异性信号, 可根据实验情况选用; PI 的量应控制在每片 20μl/片以内; 杂交时间可以控制在 12—18h 之内; 杂交温度保持 37℃。以优化组合条件进行文昌鱼胚胎细胞和染色体 FISH 结果见图 2, 从图中可以看出染色体上杂交信号特异性强, 杂交背景低, 适用于文昌鱼染色体的下一步基因定位分析。

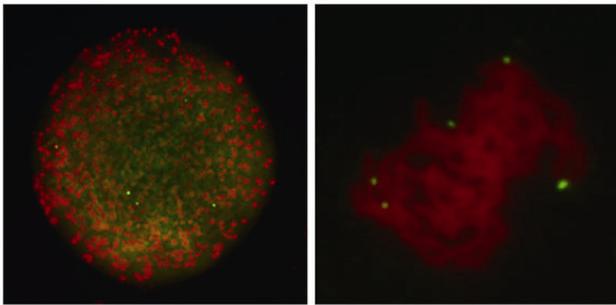


图 2 以优化组合条件进行胚胎细胞和染色体 FISH 结果
Fig.2 The FISH results of blastula cells and chromosome under optimum conditions

注: 左为胚胎细胞 FISH 杂交结果图, 红色物质为细胞核物质, 绿色亮点为杂交信号; 右为染色体 FISH 杂交结果图, 红色为染色体, 绿色为杂交信号

除上述较为普遍的影响因素之外, 还有一些细节也会直接影响杂交结果。如质粒的纯度, 探针标记的好坏, 杂交缓冲液中去离子甲酰胺的去离子程度, 探针变性温度以及杂交后洗脱温度都应该严格控制 (Schwarzacher *et al.*, 2000)。在加 FITC 抗体时应该尽量避光操作。此外, 蛋白酶、RNA 酶、BSA 都有可能造成抗体的作用减弱, 荧光信号变弱或减少。因此在相应的处理后都应该经过充分的洗脱以利于抗体与生物素的结合使特异性荧光信号更明显。

此外, 本文主要是根据核杂交信号来探讨杂交信号的多少以及杂交背景的高低。主要是由于在染色体荧光原位杂交过程中, 会同时出现核杂交信号和染色体杂交信号 (Iourov *et al.*, 2005; Schubert *et al.*, 2006)。核杂交信号的状况可以直接反映出染色体的

杂交信号的好坏并且核杂交信号更容易在不同的实验条件下表现出差异。因此本文主要根据核杂交信号进行了条件比较分析, 得到了适合于文昌鱼染色体荧光原位杂交的最适条件。而笔者采用 Castro 等 (2002) 的方法进行荧光原位杂时发现极易造成青岛文昌鱼染色体的非特异性杂交, 这可能与 Castro 等 (2002) 并没有对染色体玻片进行预处理, 并且杂交后洗脱次数较少有关。材料预处理的好坏是影响杂交信号和杂交背景的一个重要因素。对于不同物种的染色体、不同的基因序列需采用不同的 FISH 方案, 实验过程中的任何细微变化都可能会对实验结果造成直接的影响 (Karhu *et al.*, 1997)。

目前随着 FISH 技术的不断发展, 已从单色 FISH 发展到多色 FISH (Henegariu *et al.*, 2001a, b), FISH 技术已经广泛用于动物、植物、微生物的细胞遗传研究中, 但是由于受文昌鱼染色体制片等多种因素的影响, 对文昌鱼染色体荧光原位杂交的研究还没有很好地开展。文昌鱼作为一种无脊椎动物向脊椎动物之间的过渡型代表生物, 对其开展进一步的分子细胞遗传分析, 将会为文昌鱼的进化地位提供更加有力的证据。

参 考 文 献

- 王义权, 方少华, 2005. 文昌鱼分类学研究及展望. 动物学研究, 26(6): 666—672
- 牟洪善, 王昌留, 李金萍, 2011. 青岛文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri tsingtauense*) 染色体 G 类带型研究. 海洋与湖沼, 42(4): 597—602
- 赵婷婷, 王俊刚, 陈 军等, 2007. 原位杂交中鲑鱼精 DNA 处理方法探究. 生命科学仪器, 5(9): 22—25
- Beatty B, Mai S, Squire J, 2002. 王 英, 张诗武译, 2003. FISH 荧光原位杂交技术. 天津: 天津科技翻译出版公司, 33—43
- Castro L F, Holland P W, 2002. Fluorescent *in situ* hybridization to amphioxus chromosomes. Zoological Science, 19: 1349—1353
- Henegariu O, Artan S, Grealley J M *et al.*, 2001a. Cryptic translocation identification in human and mouse using several telomeric multiplex FISH (TM-FISH) strategies. Laboratory Investigation, 81(4): 483—491
- Henegariu O, Bray-Ward P, Artan S *et al.*, 2001b. Small marker chromosome identification in metaphase and interphase using centromeric multiplex FISH (CM-FISH). Laboratory Investigation, 81(4): 475—481
- Iourov I Y, Soloviev I V, Vorsanova S G *et al.*, 2005. An approach for quantitative assessment of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) signals for applied human molecular cytoge-

- netics. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 53(3): 401—408
- Levsky J M, Singer R H, 2003. Fluorescence *in situ* hybridization: past, present and future. *Journal of Cell Science*, 116(14): 2833—2838
- Octavian H, Bray-Ward P, David C W, 2000. Custom fluorescent-nucleotide synthesis as an alternative method for nucleic acid labeling. *Nature Biotechnology*, 18: 345—348
- Pinkel D, Straume T, Gray J W, 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83: 2934—2938
- Schubert V, Klatt M, Pecinka A *et al*, 2006. Sister chromatids are often incompletely aligned in meristematic and endopolyploid interphase nuclei of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 172: 467—475
- Schwarzacher T, Heslop-Harrison P, 2000. Practical *in situ* hybridization. BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, 11—13
- Wang C L, Zhang S C, Chu J S, 2004. G-banding patterns of the chromosomes of amphioxus *Branchiostoma belcheri tsingtauense*. *Hereditas*, 141(1): 2—7
- Wang C L, Zhang S C, Zhang Y Z, 2003. The karyotype of amphioxus *Branchiostoma belcheri tsingtauense* (Cephalochordata). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 83: 189—191
- Wu S, Zhang S, Wang Y *et al*, 1994. Laboratory observation on spawning, fecundity and larval development of amphioxus (*Branchiostoma belcheri tsingtauense*). *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 12(4): 289—294
- Zhang S C, Wang C L, Chu J S, 2004. C-banding pattern and nucleolar organizer regions of amphioxus *Branchiostoma belcheri tsingtauense* Tchang *et al*, 1936. *Genetica*, 121(1): 101—105

RESEARCH ON OPTIMUM CONDITIONS OF CHROMOSOMAL FLUORESCENCE *IN SITU* HYBRIDIZATION TO AMPHIOXUS *BRANCHIOSTOMA BELCHERI TSINGTAUENSE*

ZHAO Ting-Ting^{1,2}, WANG Chang-Liu¹, ZHANG Guang-Zhen¹, WANG Jun-Gang²,
HUANG Ling¹, WANG Lei¹

(1. College of Life Science, Ludong University, Yantai, 264025; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, 571101)

Abstract The 18S rDNA sequence labeled as probe was applied for fluorescence *in situ* hybridization. According to the signals quantity and specificity on blastula cells, the key factors were discussed on chromosomal fluorescence *in situ* hybridization of amphioxus *Branchiostoma belcheri tsingtauense*. The results showed that optimum conditions were as follows: the pretreatment was 5ng/μl pepsin, 3—5 minutes incubation and 10ng/μl RNase, 1 hour incubation; the concentration of ratio salmon sperm DNA/probe DNA was 100—300; the wash stringency was 50% formamide/2×SSC, 1×SSC, 2×SSC at 42°C; 3% BSA blocking; 12—18h hybridizing at 37°C; counterstain with 20μl 1.5μg/ml PI per slide.

Key words *Branchiostoma belcheri tsingtauense*, Chromosome, Fluorescence *in situ* hybridization