

# 向日葵rRNA基因克隆及其染色体定位研究

高 猛<sup>1,2</sup> 安玉麟<sup>1\*</sup> 孙瑞芬<sup>1</sup> 张艳芳<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>内蒙古农牧业科学院生物技术研究中心, 呼和浩特 010031; <sup>2</sup>内蒙古农业大学农学院, 呼和浩特 010019)

**摘要** 该研究以内葵杂3号三交种为材料, 采用同源序列法克隆了5S rRNA和18S rRNA基因并进行了序列测定, 测得片段长度分别为515 bp和1 808 bp。以5S rRNA、18S rRNA和45S rRNA基因为探针, 分别与内葵杂3号三交种染色体进行荧光原位杂交(FISH)分析。结果表明: 45S rRNA和18S rRNA基因均得到3对杂交信号且位点分布相同, 分别位于第3对和第10对染色体及第2对随体染色体的短臂末端; 5S rRNA基因的信号位点共有2对, 分布在第7对和第10对染色体短臂端部。

**关键词** 向日葵; 染色体; rRNA基因; 荧光原位杂交(FISH)

## Cloning and Physical Mapping of rRNA on Metaphase Chromosomes in Sunflower (*Helianthus annuus* L.)

Gao Meng<sup>1,2</sup>, An Yulin<sup>1\*</sup>, Sun Ruifen<sup>1</sup>, Zhang Yanfang<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Biotechnology Research Center, Inner Mongolia Academy of Agriculture and Animal Husbandry Sciences, Huhhot 010031, China;

<sup>2</sup>College of Agronomy, Inner Mongolia Agriculture University, Huhhot 010019, China)

**Abstract** In this paper, 5S rRNA and 18S rRNA gene fragments were cloned from the triple hybrid of “Inner Mongolia Hybrid oil sunflower 3” and their sequences were analysed. The lengths of 5S rRNA and 18S rRNA gene fragments were 515 bp and 1 808 bp, respectively. In fluorescence *in situ* hybridization, the probes for 5S rRNA, 18S rRNA and 45S rRNA were hybridized with sunflower genomic DNA from the triple hybrid of “Inner Mongolia Hybrid oil sunflower 3”. Three pairs of hybridization signals were detected at the same loci both with 45S rRNA and 18S rRNA probes: at the end of short arms of chromosome pairs 3, 10 and satellite chromosome pairs 2. 45S rRNA probe showed the same intensity of hybridization signals. 5S rRNA showed two pairs signals at the end of the short arms of chromosome pairs 7 and 10.

**Key words** sunflower; chromosome; rRNA gene; fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

核糖体是蛋白质生物合成的场所, 核糖体由大、小两个亚基组成, 主要成分为核糖体RNA(rRNA)和蛋白质。真核生物的rRNA有4种类型, 即18S rRNA、5.8S rRNA、28S rRNA和5S rRNA。18S rRNA序列位于小亚基40S上, 其他3种位于大亚基60S上。核糖体rRNA的编码基因主要分布在细胞核内的染色体

上, 不过也有极少数分布在叶绿体和线粒体中。编码这几种rRNA的基因有两种, 一种为45S rDNA, 另一种为5S rDNA。其中, 45S rDNA是高度串联重复序列, 它位于核仁组织区(NORs)<sup>[1]</sup>, 具有NORs的染色体称为随体染色体, 在有丝分裂的中期细胞学形态表现为染色体的次缢痕<sup>[2]</sup>。每个45S rDNA重复单位依次编码5.8S rRNA、18S rRNA、28S rRNA, 而5S rDNA虽然也是串联重复序列, 但其并不位于核仁组织区上<sup>[3]</sup>, 每个重复单位编码5S rRNA。

荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)是一项分子生物学与细胞学相结合的技术, 目前在植物研究中的应用非常广泛。它是用特异性的核酸重复序列作为探针, 用一定方法将其进行荧光标

收稿日期: 2013-09-17 接受日期: 2013-11-12

国家向日葵现代产业技术体系项目(批准号: CARS-16)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0471-5294388, E-mail: nkyanyulin@163.com

Received: September 17, 2013 Accepted: November 12, 2013

This work was supported by the National Modern Industry Technology System of Sunflower (Grant No.CARS-16)

\*Corresponding author. Tel: +86-471-5294388, E-mail: nkyanyulin@163.com

网络出版时间: 2014-01-17 15:14

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.02.0302.html>

记, 然后与被测目标进行杂交, 通过荧光显微镜可以观察到特异的荧光信号, 从而对其进行分析处理。目前, 荧光原位杂交技术广泛应用在核糖体重复序列的染色体定位研究中。通过rDNA在染色体上的定位, 能够识别形态相近的染色体和核型相近的物种<sup>[4-5]</sup>; 根据rDNA位点数目和位置的变化, 可以揭示染色体结构的变异, 分析物种亲缘关系、多倍体物种之间的系统发育关系及基因进化<sup>[6-7]</sup>等。

向日葵是世界上重要的油料作物, 目前向日葵的全基因组序列还没有报道, 国内外有关向日葵染色体方面的研究主要集中在核型分析上。近年来, 利用FISH技术已将5S rDNA、18S rDNA、45S rDNA分别定位在玉米<sup>[8]</sup>、大麦<sup>[9]</sup>、小麦<sup>[10]</sup>、棉花<sup>[11]</sup>等多种植物的染色体上。在向日葵染色体上的定位国外已有报道<sup>[12-15]</sup>, 而国内迄今未见报道。本文以向日葵内葵杂3号三交种为研究材料, 通过同源序列法克隆了18S rRNA和5S rRNA基因, 这一结果将有利于增进对向日葵属植物重复序列基因结构的认识; 采用FISH技术将克隆的5S rDNA、18S rDNA和水稻45S rDNA定位在染色体上并对其位点分布进行分析, 建立了一套向日葵染色体荧光原位杂交的技术方法, 同时该研究结果为探讨向日葵染色体进化及种间亲缘关系和进化模式等提供了依据, 并对指导杂交育种实践和新品质创新具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验材料 供试材料内葵杂3号三交种, 由内蒙古农牧业科学院向日葵课题组提供; 含有水稻45S rRNA序列的质粒由南京农业大学细胞遗传研究所王秀娥教授馈赠。

1.1.2 主要试剂 植物基因组DNA提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、DL2000 Marker、感受态细胞TOP10购自北京天为时代科技有限公司; *EcoR*I、pGEM-T easy vector Kit购自Promega公司; 2×Taq Master Mix购自南京博尔迪公司; 硫酸葡聚糖(DS)、鲑鱼精DNA(ssDNA)、去离子甲酰胺(dFA)、甲酰胺(FA)购自Amresco公司; 碘化丙啶(PI)购自Sigma公司; 抗荧光衰减封片剂购自广州外显子生物公司; Nick Translation Kit、Fluorescein-12-dUTP购自Roche公司; 其他均为国产分析纯试剂。

1.1.3 引物 根据水稻18S rRNA和5S rRNA基因序

列设计引物, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。序列如下: 18S rRNA引物1: 5'-AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT-3', 引物2: 5'-GTA GGT GAA CCT GCA GAA GGA TCA-3'; 5S rRNA引物1: 5'-GAT CCC ATC AGA ACT CCG AAG-3', 引物2: 5'-ATA CCA GCA CTA AAT CAC CG-3'。

### 1.2 方法

1.2.1 18S rRNA与5S rRNA基因的克隆及序列分析 用植物基因组DNA提取试剂盒提取向日葵基因组DNA, 并以其为模板PCR扩增18S rRNA和5S rRNA片段。扩增产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测, 并用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收、纯化目的片段。通过T<sub>4</sub> DNA连接酶将目的片段连接到T载体上, 用连接产物转化*E. coli* TOP10, 在添加X-gal、IPTG、Amp的LB培养基上筛选阳性克隆, 并进行PCR检测和酶切鉴定。将检测合格的阳性克隆各5个送上海生物工程公司测序, 测得序列通过DNAMAN软件的Multiple Sequence Alignment程序进行序列分析, 确定的序列再通过NCBI数据库进行Blast比对分析。

1.2.2 染色体荧光原位杂交(FISH) 按照闫素丽等<sup>[16]</sup>的方法制作染色体片。以含有45S rRNA、18S rRNA和5S rRNA序列的克隆为模板, 按照Nick Translation Kit说明书采用缺刻平移法进行探针标记, 并将标记好的探针与杂交液混匀后, 100 °C变性10 min, 立即置于冰上10 min。同时, 将脱水气干后的制片在76 °C~78 °C的70% FA中变性70 s, 之后立即置于-20 °C预冷的70%、95%、100%乙醇中各5 min, 气干。每张制片均匀滴加含有探针的杂交液30 μL, 盖上盖玻片, 放在垫有湿滤纸的密闭盒子中, 37 °C避光杂交过夜。次日揭去制片的盖玻片, 用2×SSC洗片2次, 每次10 min; 50% FA洗片1次, 每次5 min; 2×SSC洗片2次, 每次5 min; 以上洗片均在42 °C下进行; 最后用1×PBS常温下洗片2次, 每次5 min。洗片过程中轻轻晃动制片, 确保洗片充分。制片清洗后晾干, 取1.2 μL PI母液(100 μg/mL)稀释于1 mL 1×PBS中, 混匀后每个制片上滴加500 μL, 染色1~2 min, 1×PBS冲洗数次后晾干。在制片上滴加10 μL抗荧光衰减封片剂, 封片后进行信号检测。以上过程均应避光操作。

## 2 结果

### 2.1 18S rRNA与5S rRNA基因的序列分析

从内葵杂3号三交种克隆的18S rRNA和5S

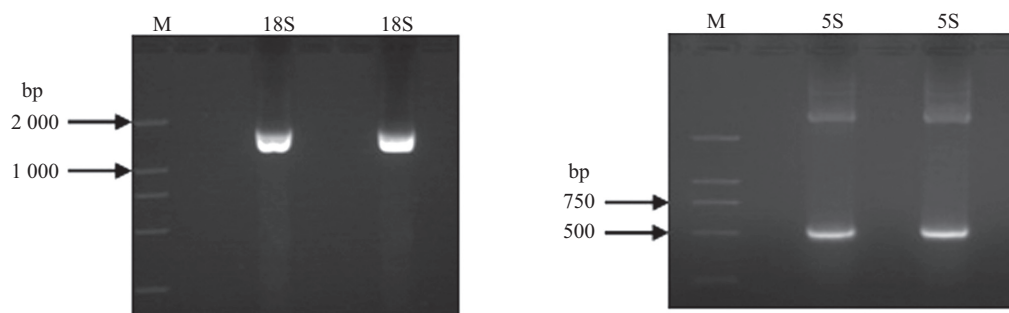
rRNA基因片段(图1~图3), 测得序列长度分别为1 808 bp和515 bp, 序列经BLAST分析表明, 1 808 bp序列与GenBank中公布的向日葵18S rRNA基因序列(AF107577)同源性达99%; 515 bp序列与已公布的向日葵5S rRNA基因序列(DQ865267)同源性达94%。除此之外, 2个rRNA基因序列与多种植物的18S rRNA和5S rRNA基因的序列也有很高的相似性, 如1 808 bp序列与白术梗稻(*Atractylodes japonica*)和非洲菊(*Gerbera jamesonii*)的18S rRNA基因序列(EU678363, AF107576)相似性均达99%; 515 bp序列与桉树(*Eucalyptus preissiana*)的5S rRNA基因部分序列相似性达94%(U10652.1|EPU10652), 与辣椒(*Capsicum baccatum*)、马铃薯(*Solanum tuberosum*)、维尼亚豇豆(*Vigna unguiculata*)和番茄(*L. esculentum*)的5S rRNA基因序列(AF217951, Y16655, AF141141和X55697)相似性分别达95%、97%、92%和98%, 说明克隆的内葵杂3号三交种的18S rRNA和5S rRNA基因片段, 可以用来进行FISH研究, 2个序列

已提交NCBI并注册, 登录号分别为HM638219和HM638217。以上比对分析证明了18S rRNA和5S rRNA基因序列在物种间的高度保守性。

## 2.2 染色体荧光原位杂交分析

2.2.1 5S rRNA位点分布 在内葵杂3号三交种染色体上, 观察到两对5S rRNA杂交信号, 分别位于第7对同源染色体和第10对同源染色体上, 其中第7对染色体上的信号较强, 第10对染色体上的信号较弱, 而且这几个位点都位于染色体的短臂近端部(图4)。信号强弱与5S rRNA的拷贝数多少有关, 说明5S rRNA在不同的染色体上的拷贝数不同。

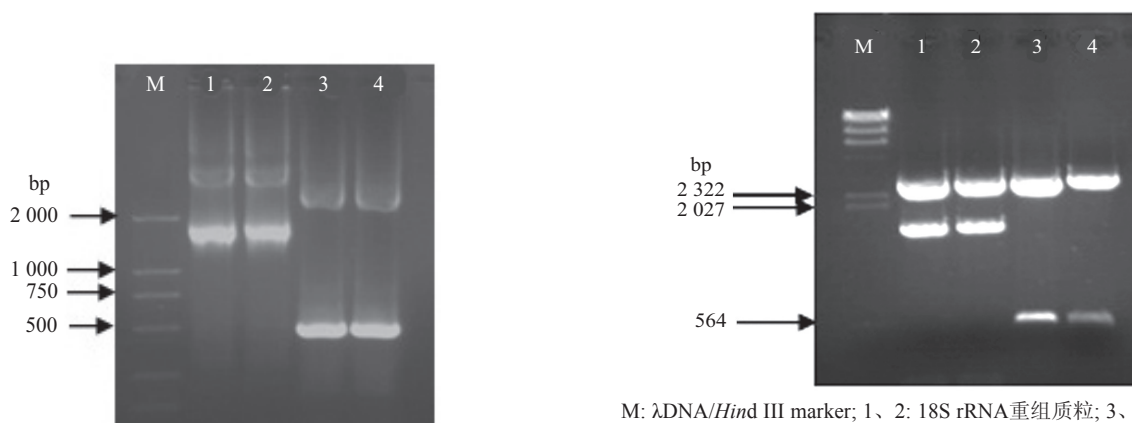
2.2.2 18S rRNA位点分布 在内葵杂3号三交种染色体上, 检测到3对清晰可见的18S rRNA杂交信号, 分别位于第3对、第10对同源染色体以及第2对随体染色体的短臂末端, 其中第3对和第10对染色体上的信号较强, 第2对染色体上的信号较弱, 但第2对染色体上的信号将整个随体包围(图5)。同样, 信号的强弱反映出18S rRNA的拷贝数不同。



M: DL2000 marker.

图1 18S rRNA和5S rRNA基因的PCR扩增

Fig.1 Amplification of 18S rRNA and 5S rRNA genes



M: DL2000 marker; 1,2: 18S rRNA; 3,4: 5S rRNA.

图2 重组质粒的PCR检测

Fig.2 PCR amplification of 18S rRNA and 5S rRNA from recombinant plasmids

M:  $\lambda$ DNA/*Hind* III marker; 1, 2: 18S rRNA重组质粒; 3, 4: 5S rRNA重组质粒。

M:  $\lambda$ DNA/*Hind* III marker; 1,2: 18S rRNA recombinant plasmid digested with *Eco*R I; 3,4: 5S rRNA recombinant plasmid digested with *Eco*R I.

图3 重组质粒的酶切鉴定

Fig.3 Resroction enzyme digestion of recombinant plasmids

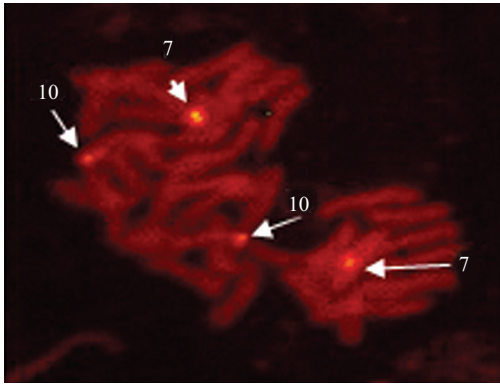


图4 5S rRNA基因的定位

Fig.4 Location of 5S rRNA gene in triple hybrid sunflower

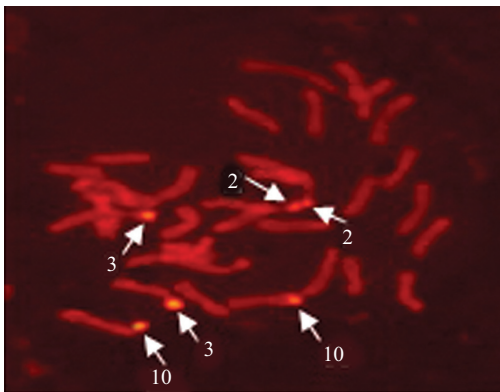


图5 18S rRNA基因的定位

Fig.5 Location of 18S rRNA gene in triple hybrid sunflower

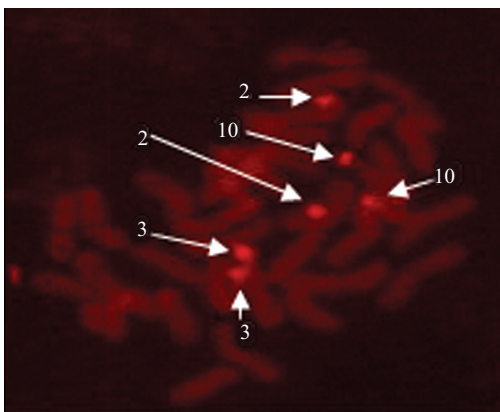


图6 45S rRNA基因的定位

Fig.6 Location of 45S rRNA gene in triple hybrid sunflower

2.2.3 45S rRNA位点分布 45S rRNA在内葵杂3号三交种染色体上的位点数及分布与18S rRNA的位点数及分布一致, 同样有3对位点, 分别位于第2对、第3对以及第10对同源染色体上的短臂末端, 不同的是3对信号强弱基本一致(图6), 说明45S rRNA在3对同源染色体上的拷贝数差别不大。由于染色体

片清晰度欠佳, 致使第2对染色体上的随体显示不明显, 不过由于向日葵染色体上的随体本身很小、呈圆点状, 因而可以推断第2对染色体上的整个随体也被信号所包围。

### 3 讨论

真核生物中, 5.8S rRNA、18S rRNA和28S rRNA组成一个转录元, 产生45S的前体RNA, 因此18S rDNA的位点分布也反映了45S rDNA的位点。5S rDNA和45S rDNA是独立存在的, 通常分布在不同的染色体上。研究表明, 在多种植物中, 通过FISH将45S rDNA(或18S rDNA)定位在中期染色体的次缢痕处, 与随体相连, 45S rDNA在次缢痕处的位置实际上还包括随体, 甚至信号能将随体包围<sup>[17]</sup>。Ceccarelli等<sup>[12]</sup>对向日葵自交系HA89进行了rDNA的FISH分析, 得到了4对45S rDNA杂交信号分别位于染色体短臂的末端, 其中3对信号分别与3对随体染色体的次缢痕有关, 另外1对不在随体染色体上, 与Schrader等<sup>[13]</sup>和Vanzela等<sup>[14]</sup>的研究结果基本一致。他的研究还表明, 这4对杂交信号中3对随体染色体上的杂交信号较强, 另外1对信号较弱, 而Schrader等<sup>[13]</sup>发现这4对信号中2对信号较强, 2对信号较弱。Cuellar等<sup>[15]</sup>同样对相同向日葵品种进行研究, 结果只在有随体的3对染色体上出现了45S rDNA的杂交信号, 这可能与实验中信号显示的分辨率有关。对于5S rDNA的定位分析前人的研究结果比较一致, Schrader等<sup>[13]</sup>和Cuellar等<sup>[15]</sup>的实验结果发现, 5S rDNA的杂交信号出现在2对染色体的短臂末端, 1对较强, 1对较弱, 其中1对信号出现在随体染色体上与45S rDNA的位置接近。本文中, 实验材料内葵杂3号三交种的染色体数为 $2n=34$ , 第2对染色体为随体染色体<sup>[16]</sup>。该实验结果显示出3对18S rDNA和45S rDNA杂交信号及2对5S rDNA杂交信号。18S rDNA和45S rDNA位点分布一致, 不同的是, 18S rDNA的3对信号中2对较强1对较弱, 45S rDNA的3对信号强弱基本一致; 2对5S rDNA信号中有1对与45S rDNA和18S rDNA定位在同一对染色体的短臂末端。具有随体的染色体有18S rDNA和45S rDNA的杂交信号, 与前人研究结果基本一致, 随体染色体上没有5S rRNA的信号。一般来说, 45S rRNA基因的位点数与随体的数目是相等的, 但我们的实验结果中该基因除了出现在随体上这一位

置外, 在其他染色体上也有。类似现象除了在向日葵HA89中存在外<sup>[12]</sup>, 在多种植物如小麦<sup>[18]</sup>、油菜<sup>[19]</sup>、大麦<sup>[20]</sup>等中也有。我们的结果还显示出5S rRNA和45S rRNA的位点出现在同一对染色体上的现象, 在向日葵其他品系中也存在<sup>[13,15]</sup>。一般在真核生物的基因组中, 5S rDNA和45S rDNA是独立存在的, 分布在不同的染色体上, 但是也有很多物种出现了两者处于相同的染色体上的现象。Lim(Lim KB. Intergression breeding through inter-specific polyploidisation in lily: A molecular cytogenetic study. Wageningen University, Ph.D. thesis, 2000)研究发现, 麝香百合(*Lilium longiflorum*)和百合属另一种植物*Lilium rubellum*中的两种核糖体rDNA同时定位在4、7号和2、4号染色体的相同位置上, 在麦类中也存在两者出现在同一染色体上的现象<sup>[21]</sup>。以上说明, 不同物种间的核糖体rDNA之间的关联性存在很大的差异, 通过这一现象可以区别不同的物种和进一步研究核糖体基因重复序列的关系。

### 参考文献 (References)

- Long EO, Dawid IB. Repeated genes in eukaryotes. *Annu Rev Biochem* 1980; 43: 727-64.
- Fukui K, Ohmido N, Khush GS. Variability in rDNA loci in the genus *Oryza* detected through fluorescence *in situ* hybridization. *Theor Appl Genet* 1994; 87(8): 893-9.
- Rogers SO, Bendich AJ. Ribosomal RNA genes in plants: Variability in copy number and in the intergenic spacer. *Plant Mol Biol* 1987; 9(5): 509-20.
- 徐汉杰, 汤佳立, 戚大石, 李宗芸. 不同地域乌拉尔甘草基因组的FISH分析与染色体识别. *西北植物学报*(Xu Hanjie, Tang Jiali, Qi Dashi, Li Zongyun. FISH analysis and chromosome identification of *Glycyrrhiza uralensis* genome from different territory. *Journal of Northwest Botany*) 2010; 30(2): 262-8.
- Hasterok R, Wolny E, Hosiawa M, Kowalczyk M, Kulak-Ksiazczyk S, Ksiazczyk T, *et al.* Comparative analysis of rDNA distribution in chromosome of various species of *Brassicaceae*. *Ann Bot* 2006; 97(2): 205-16.
- 张 露, 蔡友铭, 诸葛强, 邹惠渝, 黄敏仁. 新疆石竹属野生种核糖体DNA的ITS序列与亲缘关系. *遗传学报*(Zhang Lu, Cai Youming, Zhu Geqiang, Zou Huiyu, Huang Minren. Sequence of the ITS region of nuclear ribosomal DNA (nrDNA) in Xinjiang Wild *Dianthus* and its phylogenetic relationship. *Acta Genetica Sinica*) 2002; 29(6): 549-54.
- Gorman SW, Teasdale RD, Cullis CA. Structure and organization of the 5S rRNA genes (5S DNA) in *Pinus radiata* (*Pinaceae*). *Pl Syst Evol* 1992; 183(3/4): 223-34.
- 韩永华, 王小兰, 刘立华, 宋运淳. 玉米mir1基因在玉米和薏苡中的比较物理定位. *遗传学报*(Han Yonghua, Wang Xiaolan, Liu Lihua, Song Yunchun. Comparative physical localization of maize mir1 gene in *Zea mays* L. and *Coix lacryma-jobi* L. *Acta Genetica Sinica*) 2004; 31(4): 335-9.
- 赵丽娟, 李立家, 覃 瑞, 熊怀阳, 宋运淳. 大麦45S和5S rDNA定位及5S rDNA伸展纤维的FISH分析. *武汉植物学研究*(Zhao Lijuan, Li Lijia, Qin Rui, Xiong Huaiyang, Song Yunchun. Location of 45S and 5S rDNA on barley chromosomes and FISH analysis for 5S rDNA on extended DNA fibers. *Journal of Wuhan Botanical Research*) 2005; 23(1): 15-9.
- Jiang J, Gill BS. Nonisotopic *in situ* hybridization and plant genome mapping: the first 10 years. *Genome* 1994; 37(5): 717-25.
- 刘三宏, 王坤波, 宋国立, 王春英, 刘 方, 黎绍惠, 等. 棉花GISH-NOR的初步探讨. *科学通报*(Liu Sanhong, Wang Kunbo, Song Guoli, Wang Chunying, Liu Fang, Li Shaohui, *et al.* Preliminary study of cotton GISH-NOR. *Chinese Science Bulletin*) 2005; 50(5): 443-7.
- Ceccarelli M, Sarri V, Natali L, Giordani T, Cavallini A, Zuccolo A, *et al.* Characterization of the chromosome complement of *Helianthus annuus* by *in situ* hybridization of a tandemly repeated DNA sequence. *Genome* 2007; 50(5): 429-34.
- Schrader O, Ahne R, Fuchs J, Schubert I. Karyotype analysis of *Helianthus annuus* using Giemsa banding and fluorescence *in situ* hybridization. *Chromosome Res* 1997; 5(7): 451-6.
- Vanzela AL, Ruas CF, Oliverira MF, Ruas PM. Characterization of diploid, tetraploid and hexaploid *Helianthus* species by chromosome banding and FISH with 45S rDNA probe. *Genetica* 2002; 114(2): 105-11.
- Cuellar T, Belhassen E, Fernandez-Calvin B, Orellana J, Bella J. Chromosomal differentiation in *Helianthus annuus* var. *macrocarpus*: Heterochromatin characterization and rDNA location. *Heredity* 1996; 76: 586-91.
- 闫素丽, 安玉麟, 孙瑞芬. 内葵杂3号染色体核型分析. *植物遗传资源学报*(Yan Suli, An Yulin, Sun Ruifen. Chromosome karyotype analysis of sunflower. *Journal of Plant Genetic Resources*) 2010; 11(6): 784-8.
- Mukai Y, Endo TR, Gill BS. Physical mapping of the 18S.26S rRNA multigene family in common wheat: Identification of a new locus. *Chromosoma* 1991; 100(2): 71-8.
- Jordan EG, Martini G, Bennett MD, Flavell RB. Nucleolar fusion in wheat. *J Cell Sci* 1982; 56: 485-95.
- Maluszynska J, Heslop-Harrison JS. Physical mapping of rDNA loci in *Brassica species*. *Genome* 1993; 36(4): 774-81.
- Pedersen C, Linde-Laursen I. Chromosomal location of four minor rDNA and a marker microsatellite sequence in barley. *Chromosome Res* 1994; 2(1): 65-71.
- 廖进秋, 杨瑞武, 周永红, 辻本壽. 波兰小麦和矮兰麦45S rDNA和5S rDNA基因位点FISH分析. *遗传*(Liao Jinqiu, Yang Ruiwu, Zhou Yonghong, Tsujimoto Hisashi. FISH analysis of 45S rDNA and 5S rDNA genes in *Triticum poloni-cum* L. and *T. turgidum* L. cv. Ailanmai. *Hereditas* (Beijing)) 2007; 29(4): 449-54.