

## ND-FISH 技术在两栖类中的应用

常晓媛<sup>1,2</sup>, 夏云<sup>1</sup>, 曾晓茂<sup>1,\*</sup>

1. 中国科学院成都生物研究所, 四川 成都 610041
2. 中国科学院大学, 北京 100049

**摘要:** 非变性荧光原位杂交 (ND-FISH) 是近年来兴起的一种技术, 一般使用带有荧光标记的简单序列重复 (SSRs) 作为探针, 杂交中不需要进行探针和染色体的变性使得检测简单快捷。SSRs 探针可检测出染色体上 SSR 富集的区域, 可以帮助辨识染色体, SSRs 分布的多态性还可以为遗传多态性的研究提供信息。(1) 该研究首次将 ND-FISH 运用于两栖动物中, 得到了 5 个可运用于多态性研究的标记。(2) 研究发现, 有别于其他类群, 当 ND-FISH 应用于两栖动物时, 染色体标本必须进行变性。(3) 该研究还对双色荧光原位杂交流程进行了较大的改进, 在一个杂交体系中同时使用直接和间接标记探针, 通过一次实验获得双色信号, 从而使步骤简化。

**关键词:** ND-FISH; SSRs; 标记筛选; 双色 FISH

中图分类号: Q959.5; Q7; Q343 文献标志码: A 文章编号: 0254-5853-(2013)06-0610-07

## Application of ND-FISH in amphibians

Xiao-Ai CHANG<sup>1,2</sup>, Yun XIA<sup>1</sup>, Xiao-Mao ZENG<sup>1,\*</sup>

1. Chengdu Institute of Biology Chinese Academy of Science, Chengdu 610041, China
2. University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China

**Abstract:** The recently popularized non-denaturing fluorescence *in situ* hybridization (ND-FISH) is a new technique that is both quick and efficient, in part because denaturing of both of the probes and the chromosomes is unnecessary. Synthetic simple sequence repeats (SSRs) labeled with fluorescein are used as probes to detect SSR-enriched chromosome regions and provide markers to identify the chromosomes. To date this method has not been applied to amphibians, even though the polymorphism of the distribution of SSRs may help to advance genetic polymorphism research. This paper also improved the double-colour FISH method by simultaneously using probes labelled with fluorescein and probes labelled with DIG to get double-color signals. This study found 5 SSRs markers that may be useful in the polymorphism research, and that the amphibian chromosomes must be denatured in ND-FISH.

**Keywords:** ND-FISH; SSRs; Marker selection; Double-colour FISH

遗传多态性一直是进化生物学研究的重要内容。而细胞遗传水平的多态性研究一般都使用 C 带、Ag 带等带型技术和荧光原位杂交技术 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH)。相对于条带技术, FISH 可同时提供分子和细胞水平的信息, 并提供了更高的精度和分辨率。根据探针及靶部位长度不同, FISH 的探针可分为 3 种类型: (1) 多拷贝基因探针, 如核糖体 RNA 基因、组蛋白基因探针等, 这些探针属于功能基因, 但在基因组上有较多的拷贝, 所

以仍然很容易得到杂交信号, 如 18S rDNA, 组蛋白基因等。(2) 简单重复序列探针, 如着丝粒、端粒序列探针, 哺乳动物的 Alu 序列探针等, 这类探针尽管其本身序列较短 (如端粒序列探针只是 5 碱基或 6 碱基重复), 然而由于在基因组中有极多拷贝, 靶序列很长, 所以杂交信号非常明亮, 定位难度相对较低。(3) 独特序列探针, 指由大片段克隆 (Fosmid、BAC 等)、染色体特异性文库、基因组 DNA 等制备的探针 (Huan, 2009)。

收稿日期: 2013-07-19; 接受日期: 2013-08-07

基金项目: 国家自然科学基金 (31272282); 中国科学院重要方向性项目 (KSCX2-EW-J-22)

\*通信作者 Corresponding author. E-mail: zengxm@cib.ac.cn

第一作者简介: 常晓媛 (1988-), 女, 硕士研究生, 研究方向为细胞与分子进化。E-mail: changxa@cib.ac.cn

ND-FISH (non-denaturing FISH) 是近几年兴起的一种技术, 使用的探针与过去常规的几种探针不同, 主要是微卫星序列, 又称为简单序列重复 (SSRs)。探针是合成的15~20 bp的单碱基、二碱基、三碱基或四碱基的微卫星序列。微卫星位点广泛分布于真核生物的基因组中 (Hamada et al, 1982)。因重复数目的不同而呈现高度多态性 (Amos et al, 1993)。目前几十到几百个碱基的微卫星序列由于其在个体间的多态性, 作为分子标记广泛的应用于连锁图谱、基因标记、系统发育等多领域的研究。微卫星探针有着出乎意料的在非变性染色体上识别SSRs的能力, 它们可以快速结合到SSR富集的染色体区域 (Cuadrado & Jouve, 2010)。ND-FISH属于直接杂交法, 15~20 bp的DNA探针上带有荧光基团, 并且是合成的单链DNA, 因而在荧光原位杂交中不需要对染色体和探针进行变性, 也不需要添加抗体, 这使得检测变得省时省力, 简便高效。ND-FISH由于不需要对染色体进行变性, 染色体的形态得到了很好的保持, 这对于同一分裂相上的重复杂交有很大优势。另外ND-FISH合成的探针保证了荧光标记的质量。

在前人的研究中, SSRs探针在大麦、玉米、蝗虫、果蝇和人类中得到了明显的杂交信号, 而且特异性很强 (Cuadrado & Jouve, 2010)。在大麦 *Hordeum vulgare* 和 *H. bulbosum* 的研究中, SSRs探针为染色体的识别提供了标记, 其中 (ACT)<sub>5</sub> 的信号在 *H. vulgare* 的7对同源染色体之间最具多态性, 可以清晰的辨别所有染色体。(AAG)<sub>5</sub> 和 (ACT)<sub>5</sub> 两个探针还为 *H. vulgare* ssp. *spontaneum* 中一个株系5号染色体与7号染色体相互易位提供了标记。前人在观察染色体形态和C带等经典细胞学研究后认为 *H. bulbosum* 是 *H. vulgare* 的近缘种, 共享一套“H基因组”, 而 *Hordeum* 属其他物种则具备另三套“H基因组” (Carmona et al, 2012; Linde-Laursen et al, 1997)。但是 (AG)<sub>10</sub>、(AAG)<sub>5</sub>、(ACT)<sub>5</sub> 和 (ATC)<sub>5</sub> 的ND-FISH结果却显示 *H. vulgare* 和 *H. bulbosum* 染色体上SSRs的分布有着很大不同。这支持了另一种相反的假说, 使得 *H. vulgare* 和 *H. bulbosum* 的近缘关系仍然存在争议, 也暗示着使用SSRs的ND-FISH可以为系统发育假说提供佐证 (Carmona et al, 2012)。

在两栖动物中, 独特序列探针的缺乏是很严重的问题。rDNA 等常用的探针提供的多态性信息很少, 只能辨识个别染色体, 这使得分析两栖动物细

胞水平遗传多态性的研究十分困难。在对雨蛙科 *Aplastodiscus* 属染色体进化的研究中, 研究者使用了端粒作为分子标记, 在 *A. perviridis* 和 *A. callipygius* 中, 端粒探针杂交了所有染色体的端部, 而在 *A. leucopygius* 的3号染色体的着丝粒区域发现了内端粒序列 (ITS)。在 *A. arildae* 和 *A. eugenioi* 的杂交结果中, 所有染色体的端粒和着丝粒都有信号 (Gruber et al, 2012)。在棘腹蛙的荧光原位杂交的研究中, 5S rDNA 探针的信号只出现在1号染色体上, 端粒序列探针出现在了所有染色体端部, 在极个别个体中检测到 ITS (Qing et al, 2013)。总之, 这些常用探针在属下、种下呈现很低的多态性。

本研究尝试了 ND-FISH 在两栖类中的应用:

(1) 我们将常用的 SSRs 在两栖类中进行筛选, 得到一系列在染色体间有多态性的标记, 可用于两栖类染色体识别和遗传多态性等研究。(2) 较之其他类群, ND-FISH 技术在两栖类中, 染色体必须变性之后才可以得到杂交信号。(3) 此外, 本研究对双色杂交流程进行了较大的改进, 尝试同时使用直接标记和间接标记的探针, 避免了两次杂交所增加的洗脱及相关程序, 直接获得双色信号, 使杂交流程简化、提高效率。

## 1 材料和方法

### 1.1 有丝分裂染色体制备

选取来自于四川地区的棘腹蛙 (*Quasipaa boulengeri*) 个体制备染色体。棘腹蛙具有易位多态现象, 分布区靠西的部分种群中检测到多种核型。Qing et al (2012) 在研究中共发现了5种核型, 因1号和6号两对染色体相互易位而成。I型是常规核型, 两对染色体均未发生重排, 1号和6号染色体分别为一对大的和一对小的中着丝粒染色体, 可表示为 MM/mm。II-V型 (MM/mSt、MT/mm、MT/mSt、MT/StSt) 中, 或1号、或6号, 或1和6号染色体均有涉及到易位后形成的异形染色体。由于易位发生仅局限于该种分布区西端部分种群, 该物种大多数个体仍为没有发生易位的I型核型。而本研究旨在技术的运用, 故实验标本均采用没有发生易位的I型核型个体。

有丝分裂相采用骨髓细胞制备 (Schmid et al, 2010)。制备好的染色体标本于室温干燥2~4天后, 经70%、90%、100%的酒精梯度脱水后, 于100%的酒精中-20℃保存。

## 1.2 SSRs 和 5S 探针的合成

SSRs 探针由上海英俊 (invitrogen) 合成, 序列及修饰见表 1。

5S 探针带有 DIG 标记, 由 PCR 法合成。5S 正向引物 5'-GCCTACGGCCACACCAC-3', 反向引物 5'-AAGCCTACGACACCTGGTATTC-3' (Qing et al, 2012)。5S PCR 扩增程序: 94 °C 1 min, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环。得到的 PCR 产物经过 GenElute™ PCR Clean-Up Kit (SIGMA) 纯化, -20 °C 保存。

表 1 ND-FISH 使用的 SSRs 探针  
Table 1 SSRs used as probes in ND-FISH experiments

探针 Probe	序列 Sequence	5'端修饰 Modifications in 5'
(A) <sub>20</sub>	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	TAMRA
(C) <sub>20</sub>	CCCCCCCCCCCCCCCCCC	TAMRA
(AC) <sub>10</sub>	ACACACACACACACACAC	TAMRA
(AG) <sub>10</sub>	AGAGAGAGAGAGAGAGAG	TAMRA
(CT) <sub>10</sub>	CTCTCTCTCTCTCTCTCT	TAMRA
(AT) <sub>10</sub>	ATATATATATATATATAT	TAMRA
(AAC) <sub>5</sub>	AACAACAACAACAAC	TAMRA
(AAG) <sub>5</sub>	AAGAAGAAGAAGAAG	TAMRA
(AAT) <sub>5</sub>	AATAATAATAATAAT	TAMRA
(ACG) <sub>5</sub>	ACGACGACGACGACG	FITC
(ACT) <sub>5</sub>	ACTACTACTACTACT	TAMRA
(CAT) <sub>5</sub>	CATCATCATCATCAT	TAMRA
(CCG) <sub>5</sub>	CCGCCCGCCGCCCG	FITC
(ACC) <sub>5</sub>	ACCACCACCACCACC	TAMRA
(AGG) <sub>5</sub>	AGGAGGAGGAGGAGG	TAMRA
(AGC) <sub>5</sub>	AGCAGCAGCAGCAGC	TAMRA
(GACA) <sub>5</sub>	GACAGACAGACAGACAGACA	TAMRA
(GATA) <sub>5</sub>	GATAGATAGATAGATAGATA	TAMRA
(GACT) <sub>5</sub>	GACTGACTGACTGACTGACT	TAMRA
(GCAT) <sub>5</sub>	GCATGCATGCATGCATGCAT	TAMRA
(GAGT) <sub>5</sub>	GAGTGAGTGAGTGAGTGAGT	TAMRA

## 1.3 SSRs 的 ND-FISH

染色体标本从 -20 °C 取出后镜检, 55 °C 放 2 h。0.01 mol/L HCl 中配制 0.01% pepsin, 每张片子 500 μL, 盖盖玻片 37 °C 处理 15 min。洗去 pepsin 后于 70% 甲酰胺, 10% 20×SSC 中 72 °C 变性 2 min。将片子迅速放在预冷的 70%、90%、100% 梯度酒精中, 各处理 10 min。完成后扇动晾干。

2×SSC 中配制杂交液 40 μL: 30% 去离子甲酰胺, 10% 硫酸葡聚糖, 0.3% SDS, SSR 探针 100 ng。杂交液滴在片子上, 盖盖玻片。于 37 °C 潮湿暗盒中杂交 3 h。

将片子浸入室温的洗脱液 (4×SSC, 0.2% Tween 20) 中, 待盖玻片自动脱落后涮洗 10 min。再用洗脱液涮洗 5 min。最后用 ddH<sub>2</sub>O 涮洗几遍。甩干片子, 加 DAPI 30 μL, 用配备对应滤镜组合的 Leica DMRA2 荧光显微镜对杂交信号进行检测, 并通过 Leica DFC490 CCD 与 Qwin V3 和 Qgo 软件进行图像拍摄和采集。

## 1.4 SSRs 与 5S 的双色荧光原位杂交

染色体标本的处理与 SSRs 的 FISH 相同。2×SSC 中配制杂交液 40 μL: 40% 去离子甲酰胺, 10% 硫酸葡聚糖, 0.3% SDS, SSRs 探针 100 ng, 5S 探针 50 ng。杂交液于 83 °C 变性 8 min 后立即置于冰上, 放置 10 min。杂交液滴在片子上, 盖盖玻片。于 37 °C 潮湿暗盒中杂交 6 h 后, 载玻片在 2×SSC 中浸泡 2~3 min, 摇落盖玻片后轻轻涮洗几下。每张片子上加 200 μL 抗体溶液 (2 μL Dig-FITC, 198 μL 1% BSA), 37 °C 孵育 1 h 后在洗脱液中涮洗 3 次, 每次 5 min。甩干片子, 最后加 DAPI 30 μL, 镜检。

## 1.5 SSRs 探针的重复实验与分析

(AC)<sub>10</sub>、(AG)<sub>10</sub>、(AAC)<sub>5</sub> 分别在 5 个个体中重复实验, (CAT)<sub>5</sub> 在 14 个个体中重复, (GACA)<sub>5</sub> 在 3 个个体中进行重复, 选择好的分裂相拍摄并进行分析, 得到每个探针在染色体上稳定出现的位置。

## 2 结果

### 2.1 SSR 探针筛选结果

采用单一探针杂交方法, 将合成的 21 对探针分别对不同染色体标本进行杂交, 检测得 (AC)<sub>10</sub>、(AG)<sub>10</sub>、(AAC)<sub>5</sub>、(CAT)<sub>5</sub>、(GACA)<sub>5</sub> 等 5 个较为稳定的标记。

(AC)<sub>10</sub> 的杂交结果显示, 信号稳定出现于 2 号、6 号、13 号染色体着丝粒附近, 以及 11 号染色体的短臂上 (图 1A); (AG)<sub>10</sub> 的信号主要位于 1 号染色体着丝粒, 2 号、6 号染色体的着丝粒与端部, 3 号、5 号染色体的端部, 以及 12 号染色体短臂上 (图 1B); (AAC)<sub>5</sub> 杂交信号主要位于 1 号染色体着丝粒与长臂上, 3 号染色体的端部, 5 号染色体短臂端部, 以及 6 号染色体着丝粒处 (图 1C); (GACA)<sub>5</sub> 的信号主要位于 2 号染色体的着丝粒附近 (图 1D)。(CAT)<sub>5</sub> 的信号位于 1 号染色体的长臂和短臂的近着丝粒处、2 号染色体的着丝粒处, 在部分个体中还出现在 3 号染色体长臂上 (图 2)。

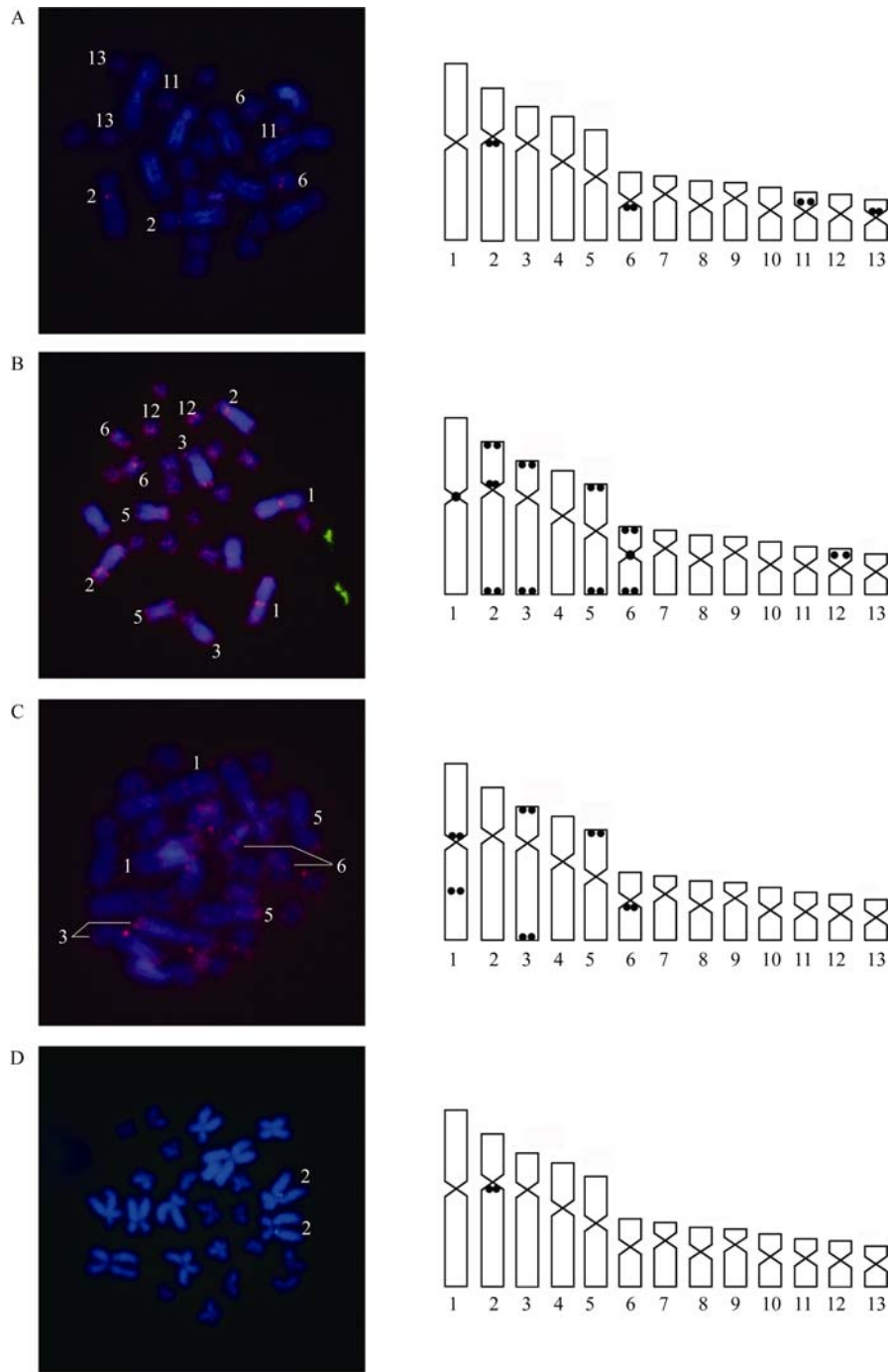


图1  $(AC)_{10}$ 、 $(AG)_{10}$ 、 $(AAC)_5$ 、 $(GACA)_5$  杂交信号在棘腹蛙染色体上的分布

Figure 1 Chromosomal distribution of signals of  $(AC)_{10}$ ,  $(AG)_{10}$ ,  $(AAC)_5$  and  $(GACA)_5$  in metaphases of *Quasipaa boulengeri*

A:  $(AC)_{10}$  杂交信号呈红色, 主要分布于 2 号、6 号、13 号染色体着丝粒附近, 以及 11 号染色体的短臂上; B:  $(AG)_{10}$  杂交信号呈红色, 主要分布于 1 号染色体着丝粒, 2 号、6 号染色体的着丝粒与端部, 3 号、5 号染色体的端部, 以及 12 号染色体短臂上; C:  $(AAC)_5$  杂交信号呈红色, 主要分布于 1 号染色体着丝粒与长臂上, 3 号染色体的端部, 5 号染色体短臂端部, 以及 6 号染色体着丝粒处; D:  $(GACA)_5$  的信号呈绿色, 位于 2 号染色体的着丝粒附近。

A The  $(AC)_{10}$  signals appear red and locate near the centromeric region of chromosome no.2, no. 6, no.13, and on the short arm of chromosome no. 11; B: The  $(AG)_{10}$  signals appear red and locate near the centromeric region of chromosome no.1, no. 2 and no. 6, and on the telomeric position of chromosome no. 2, no. 3, no. 5, no. 6, and on the short arm of chromosome no. 12; C: The  $(AAC)_5$  signals appear red and locate near the centromeric region of chromosome no.1, no. 6, and on the long arm of chromosome no. 1, and on the telomeric position of chromosome no. 3, and the telomeric position of short arm of chromosome no. 5; D: The  $(GACA)_5$  signals appear green and locate near the centromeric region of chromosome no.2.

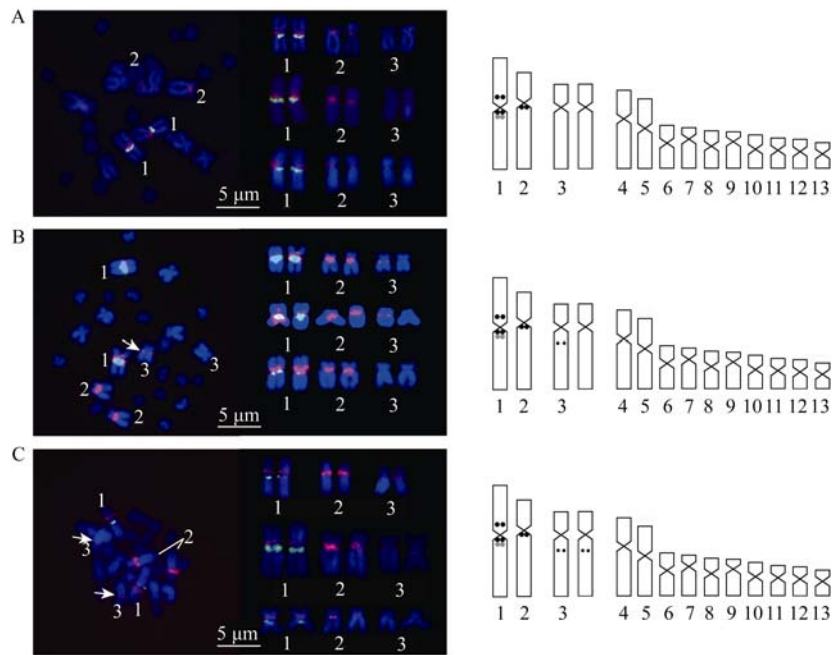


图2 (CAT)<sub>5</sub> 探针 (红色) 与 5S rDNA 探针 (绿色) 的双色 FISH

Figure 2 Double-color FISH with (CAT)<sub>5</sub> probe (red) and 5S rDNA probe (green)

(CAT)<sub>5</sub> 杂交信号位于 1 号染色体的长臂和短臂的近着丝粒处, 2 号染色体的着丝粒处, 在部分个体中还出现在 3 号染色体长臂上; 5S rDNA 的信号位于 1 号染色体长臂近着丝粒处。A: 3 号染色体上没有 (CAT)<sub>5</sub> 信号的代表个体。B: (CAT)<sub>5</sub> 信号出现在一条 3 号染色体上, 而同源染色体上没有的代表个体。C: 两条 3 号染色体上都有 (CAT)<sub>5</sub> 信号的代表个体。

The signals of locate on both short arm and long arm near the centromeric region of chromosome no. 1 and on the centromeric region of chromosome no. 2; The signals of 5S rDNA locate on the long arm of near the centromeric region of chromosome no. 1. A: The representative sample that has no signals on the chromosome no. 3. B: The representative sample that has signals on one chromosome no. 3 while the homologous chromosome has no signals. C: The representative sample that has signals on the chromosome no. 3.

## 2.2 双色杂交结果

同时使用直接标记与间接标记的探针, 用 (CAT)<sub>5</sub> 探针 (红色) 与 5S rDNA 探针 (绿色) 的双色 FISH, 得到理想的双色杂交效果。(CAT)<sub>5</sub> 的杂交结果显示, 信号稳定出现于 1 号染色体的长臂和短臂的近着丝粒处、2 号染色体的着丝粒处。在某些个体中, (CAT)<sub>5</sub> 的信号还出现在 3 号染色体的长臂上。有的个体一对 3 号染色体上都没有信号 (图 2A), 有的个体一条 3 号染色体上有信号而同源染色体上没有 (图 2B), 还有的个体一对 3 号染色体上都有信号 (图 2C)。5S 的信号稳定出现于 1 号染色体长臂的近着丝粒处。

## 3 讨论

### 3.1 筛选两栖类 SSRs 探针

以往在荧光原位杂交中使用的探针, 无论是重复序列、多拷贝基因还是单拷贝序列提供的带型都很单一, 一般都定位在一对同源染色体上, 只能对一对同源染色体起辨识作用, 例如 5S rDNA; 或者

是无差别的分布于所有染色体上, 例如端粒序列。而 SSRs 由于在染色体上分布广泛, 可提供多带型, 一个标记或几个标记组合就可以辨别出很多对同源染色体, 在 Carmona et al (2012) 的研究中, (ACT)<sub>5</sub> 一个标记就可以辨别所有 7 对同源染色体。在鱼类性染色体的研究中, SSRs 探针也成功的标记了 W 染色体 (de Bello Cioffi et al, 2012)。此外, 不同的 SSRs 序列在不同的物种和类群中的富集性和多态性有所不同, 在一个类群中得到清晰的多态性信号的标记在另一个类群中可能根本观测不到信号。例如在蟾鱼类 (Batrachoididae family) 的研究中, (GATA)<sub>n</sub> 探针在蟾鱼类的 4 个物种中都得到了大量强烈的信号 (Úbeda-Manzanaro et al, 2010), 而在本研究中 (GATA)<sub>n</sub> 探针与棘腹蛙染色体杂交却没有信号。

为了检测 SSRs 探针是否能在两栖类中运用, 我们选择了棘腹蛙作为实验对象。参照已有研究类群的工作 (Cuadrado & Jouve, 2010), 设计了 21 条 SSRs 探针进行尝试 (表 1)。结果表明, SSRs 探针

可以在两栖类中有良好的运用效果。在棘腹蛙中, (AC)<sub>10</sub>、(AG)<sub>10</sub>、(AAC)<sub>5</sub>、(CAT)<sub>5</sub>、(GACA)<sub>5</sub> 等 5 个标记得到了染色体间明显差异的信号, 这些标记在不同个体中较稳定出现, 都能起到一定的辨识染色体的作用(图 1, 2), 如果将不同的标记偶联上不同颜色的荧光, 多个标记组合可以在一次实验中更准确的辨别更多的染色体。其他标记则没有信号或在每条染色体上分布相同, 在棘腹蛙中不能起到染色体识别作用。

其中, (CAT)<sub>5</sub> 在一些个体 3 号染色体长臂上出现信号, 表现出多态性。有的个体的两条 3 号染色体上都没有出现 (CAT)<sub>5</sub> 的杂交信号, 有的个体一条 3 号染色体上有信号而同源染色体上没有, 有的个体两条同源 3 号染色体上都有信号。根据长臂上是否有信号, 可认为 3 号染色体有两种, 一种或许是由另一种变化而来。发生变化新产生的 3 号染色体在种群中通过杂交扩散, 产生了现在看到的情况, 即不同个体中的 3 号染色体对表现出 3 种类型: 一对 3 号染色体都没有信号的纯合子, 一对 3 号染色体都有信号的纯合子, 以及一条 3 号染色体有信号而另一条却没有的杂合子。3 号染色体所具备的多态性可应用于棘腹蛙种群关系的分析。

### 3.2 两栖类的 ND-FISH 染色体变性是必须条件

两栖动物染色体的高度螺旋化在很多带型研究中都有反映 (Schmid, 1978a)。两栖动物每微米的染色体含有的 DNA 量要远远多于其他脊椎动物 (如哺乳类、鸟类、爬行类) (Schmid, 1978b)。因此两栖类的染色体的明带和暗带间距很小, 常常难以辨别 (Schmid, 1978a, b)。例如前人对两栖类染色体的 R 带研究中就发现带型缺乏多样性 (Schempp & Schmid, 1981)。染色体的高度螺旋化或许是 ND-FISH 在两栖动物中难以直接应用的原因。经验证 ND-FISH 中, SSRs 探针是与染色体上的 DNA 相杂交, 而不是 RNA, 也就是说 ND-FISH 的原理是依赖于 SSRs 探针对于双链 DNA 的插入性 (Carmona et al, 2012)。在染色体螺旋化程度很高的情况下, SSRs 探针很难接触到靶序列, 入侵双链 DNA 并与之结合就更困难了。ND-FISH 中使用的探针为人工合成的单链 DNA, 不需变性, 但在两栖动物的应用中, 需要添加对两栖类染色体标本变性的步骤, 否则杂交难以成功。

ND-FISH 由于不需要对探针和染色体变性, 使得实验操作方便快捷, 虽然在两栖类的应用中发

现染色体标本必须进行变性, 然而由于 SSRs 探针的特性, 杂交时间相比于常规 FISH 还是有了很大缩短, 由 9~15 h 缩短到 3~4 h, 工作效率可显著提高。

### 3.3 双色荧光原位杂交的改进

本研究尝试在一次杂交中同时使用直接标记探针与间接标记探针, 通过这种方式, 可更为快捷地获得双色信号的杂交结果。

荧光原位杂交技术使用的探针有两种。第一种是与荧光物直接偶联标记探针, 即碱基与荧光素直接偶联的探针; 第二种是和半抗原 (如生物素、地高辛等) 偶联的间接标记探针, 探针的制备通常使用缺口平移、PCR、随机引物法等方法。使用的探针不同使得杂交实验中的步骤有很大区别。其中最重要的就是间接标记的探针在与染色体杂交之后还要与连有荧光素的抗体反应, 之后还需要进行洗脱, 而直接标记的探针则不需要。而且由于间接法中的抗原抗体反应有级联放大的作用, 容易出现大量杂信号, 洗脱条件一般较严格, 而直接法的洗脱较温和。

之前也有学者同时使用 SSRs 和 rDNA 标记染色体, 进行双色荧光原位杂交, 其中 SSRs 序列的获得是使用 (GATA)<sub>7</sub> 和 (TATC)<sub>7</sub> 作为引物在无模板的情况下进行 PCR, 然后再用缺口平移法标记探针 (Úbeda-Manzanaro et al, 2010)。这种方法相比于直接合成单链探针要繁琐的多。

当我们试图使用带有荧光素标记的 SSRs 探针和 DIG 标记的 5S rDNA 探针一起标记染色体时, 就遇到了直接标记和间接标记探针杂交后洗脱条件不同的问题。按照常规步骤, 要想在同一个分裂相上看到两个标记的信号需要将片子上第一个标记洗脱, 再将第二个标记重新杂交。而重新杂交会影响第二次杂交的效果, 而且很费时费力。于是我们尝试一次完成两种探针的杂交。双色 FISH 中, 在配制杂交液时我们将两种探针一起加入, 按照双链 DNA 探针的要求提高去离子甲酰胺的浓度并进行变性, 在探针与染色体杂交结束后不对多余探针进行洗脱, 而是直接加抗体。抗体反应结束后则是按照前人 SSRs 探针杂交的经验 (Cuadrado & Jouve, 2010), 洗脱得较温和。我们在实验研究中发现探针的变性、杂交液配比的改变和地高辛的抗体反应对于 SSRs 的杂交结果几乎没有影响, 而直接标记探针所使用的温和的洗脱虽然会增加一些 5S rDNA

的杂信号,但主信号也更明显了,拍摄调整曝光就可以得到很好的结果。

致谢:感谢电子科技大学杨足君教授、四川

大学王亚军教授、武汉大学刘江东教授、湖北中医药大学赵刚教授提供的文献和指导,感谢四川大学彭锐、中国科学院成都生物研究所卿立燕的建议和帮助。

### 参考文献:

- Amos B, Schlotterer C, Tautz D. 1993. Social Structure of pilot whales revealed by analytical DNA profiling. *Science*, **260**(5108):670-672.
- Carmona A, Frierio E, de Bustos A, Jouve N, Cuadrado Á. 2012. Cytogenetic diversity of SSR motifs within and between *Hordeum* species carrying the H genome: *H. vulgare* L. and *H. bulbosum* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 2013, **126**(4):949-961.
- Cuadrado Á, Jouve N. 2010. Chromosomal detection of simple sequence repeats(SSRs) using non-denaturing FISH(ND-FISH). *Chromosoma*, **119**(5):495-503.
- de Bello Cioffi M, Kejnovský E, Marquioni V, Poltronieri J, Molina WF, Diniz D, Bertollo LAC. 2012. The key role of repeated DNAs in sex chromosome evolution in two fish species with ZW sex chromosome system. *Molecular Cytogenetics*, **5**(1):28.
- Gruber SL, Zina J, Narimatsu H, Haddad CFB, Kasahara S. 2012. Comparative karyotype analysis and chromosome evolution in the genus *Aplastodiscus*(Cophomantini, Hyliinae, Hyliidae). *BMC Genetics*, 13: 28.
- Hamada H, Petrino MG, Kakunaga T. 1982. A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **79**(21):6465-6469.
- Huan P. 2009. Application of Fluorescence *in situ* Hybridization(FISH) in Chinese Shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* and Zhikong Scallop, *Chlamys farreri*: Gene Mapping and Map Integration. Doctor thesis, Institute of Oceanography, Chinese Academy of Sciences. University of Chinese Academy of Sciences. 128.[郇聘. 2009. 利用荧光原位杂交技术(FISH)对中国明对虾和栉孔扇贝若干重要基因定位的研究. 博士论文, 中国科学院海洋研究所. 中国科学院研究生院. 128.]
- Linde-Laursen I, Heslop-Harrison JS, Shepherd KW, Taketa S. 1997. The barley genome and its relationship with the wheat genomes. A survey with an internationally agreed recommendation for barley chromosome nomenclature. *Hereditas*, **126**(1):1-16.
- Qing LY, Xia Y, Zheng YC, Zeng XM. 2012. A *de novo* case of floating chromosomal polymorphisms by translocation in *Quasipaa boulengeri*(Anura, Dicroglossidae). *PLoS ONE*, **7**(10):e46163.
- Qing LY, Xia Y, Zheng YC, Zeng XM. 2013. FISH of 5S rDNA and telomeric(TTAGGG)<sub>n</sub> repeats in normal and translocated populations of the frog *Quasipaa boulengeri*(Anura, Ranidae). *Chinese Science Bulletin*, **58**(18):2168-2173.
- Schempp W, Schmid M. 1981. Chromosome Banding in Amphibia. VI. BrdU-replication patterns in Anura and demonstration of XX/XY sex chromosomes in *Rana esculenta*. *Chromosoma*, **83**(5):697-710.
- Schmid M. 1978a. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma*, **66**(4):361-388.
- Schmid M. 1978b. Chromosome banding in Amphibia. II. Constitutive heterochromatin and nucleolus regions in Ranidae, Microhylidae and Rhacophoridae. *Chromosoma*, **68**(2):131-148.
- Schmid M, Steinlein C, Bogart JP, Feichtinger W, León P, La Marca E, Diaz LM, Sanz A, Chen SH, Hedges SB. 2010. The Chromosomes of terraranan frogs. Insights into vertebrate cytogenetics. *Cytogenetic and Genome Research*, **130-131**(1-8):1-568.
- Úbeda-Manzanaro M, Merlo MA, Palazón JL, Cross I, Sarasquete C, Rebordinos L. 2010. Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes,(GATA)<sub>n</sub> and U2 snRNA gene by double-colour FISH in species of the Batrachoididae family. *Genetica*, **138**(7):787-794.