

流式细胞术测定丹参毛状根核 DNA 方法的建立

袁 媛, 杨兆春, 吕冬梅, 陈 敏, 黄璐琦*
(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 建立丹参毛状根核 DNA 流式细胞术检测方法。方法: 分别对内标物的选择、根组织核 DNA 分离方法以及测定方法的稳定性进行研究。结果: 1) 选择大豆核 DNA 作为内标物; 2) 丹参毛状根分离方法的特点是分离时间适量延长, 且核 DNA 需要乙醇固定。3) 重复性稳定。结论: 该方法适用于毛状根核 DNA 的测定。

[关键词] 流式细胞; 毛状根; 核 DNA

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)12-0024-02

目前丹参毛状根已被作为研究有效成分合成与调控的工具之一^[1], 研究材料的遗传稳定性对于研究结果的准确性十分重要。长时间体外培养可能诱导染色体重排、多倍体的发生, 从而导致遗传不稳定^[2~3]。

流式细胞术是当染色体、细胞核和细胞等颗粒随着流动的液体(水或缓冲液)通过一个测量点时, 被探测器探测到, 这样根据颗粒的物理和化学特征而将不同的颗粒分开并计数分拣的技术。流式细胞分析在人类基因组计划中发挥了重要作用, 流式细胞技术的应用也适用于植物, 目前这个技术应用范围包括流式核型分析, 分拣纯化染色体, 定位基因, 构建文库等^[4]。本研究建立了适合毛状根的流式细胞分析方法, 并对丹参毛状根的核 DNA 进行检测。

1 材料与方 法

1.1 材料 由发根农杆菌菌株 (*Agrobacterium rhizogenes*) 15834 诱导的丹参叶片形成的毛状根(由中国林业科学院邱德有教授提供)。继代于无激素的 6, 7-V 固体培养基上, 6~8 周继代一次, 每继代一次为一个批次。

1.2 试剂和仪器 碘化丙啶、精胺购自 Fluka 公司, HEPES 购自 MERCK 公司, Triton X-100 购自 Amresco 公司。采用流式细胞仪 COULTER EPICS XL(USA) 进行检测。波长在 488~610 nm 间。

1.3 方法 取新鲜样品 50 mg 放置于 1.5 mL EP 管中, 加入 1 mL 冰预冷的核分离缓冲液(NIB)中, 用锋利的剪子剪碎。NIB 配方: 15 mM HEPES, 1 mM Na₂EDTA, 80 mM KCl, 20 mM NaCl, 300 mM 蔗糖, 0.2% (v/v) Triton X-100, 0.5 mM 精胺, 1% (w/v) polyvinylpyrrolidone(PVP-40), pH 7.5。用 300 目尼龙网过滤悬液, 滤液 8 000 g 离心 5 min, 弃上清。用 70% 乙醇固定过夜后, 用核分离缓冲液洗 3 遍。用含有 25 μg·mL⁻¹ RNase 的 300 μL NIB 重悬沉淀物, 加入 1 mg·mL⁻¹ 碘化丙啶 50 μL, 样品送由中国中医科学院中医基础理论研究所免疫实验室检测。

2 结果与分析

2.1 内标物的选择 拟南芥^[5]核 DNA 含量已有报道, 以拟南芥作为内标物测定大豆组织核 DNA 含量为 0.87 pg/2C, 由于丹参毛状根与拟南芥的细胞峰相近, 不能完全分离, 而大豆植株核 DNA 的荧光强度为 600(PI), 与样品的峰位可以完全分开互不干扰, 有利于辨认样品峰位, 因而在本研究中, 选择大豆组织作为内标物(图 1)。

2.2 提取方法的优化 已报道的核 DNA 分离方法多采用幼嫩的叶芽为材料, 对根组织几乎未见报道。本研究对 Alan 等^[6]的方法进行了改进:

2.2.1 核 DNA 分离时间的选择 将剪碎的材料放置在 NIB 中的时间延长。以往报道认为核 DNA 分离的时间不宜过长, 一般为 1 min。本研究分别将剪碎的毛状根放置在 NIB 中 1, 5, 10, 15, 20 min, 结果表明组织浸泡时间过短, 细胞分离效果不佳, 表现为样品中的细胞数目少, 无法检测。对于毛状根来说, 在 NIB 溶液中浸泡 15~20 min, 均可达到较好的破壁效

[收稿日期] 2008-04-23

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(2006CB504700)

[通讯作者] * 黄璐琦, Tel: 64014411-2955; E-mail: huangluqi@263.net

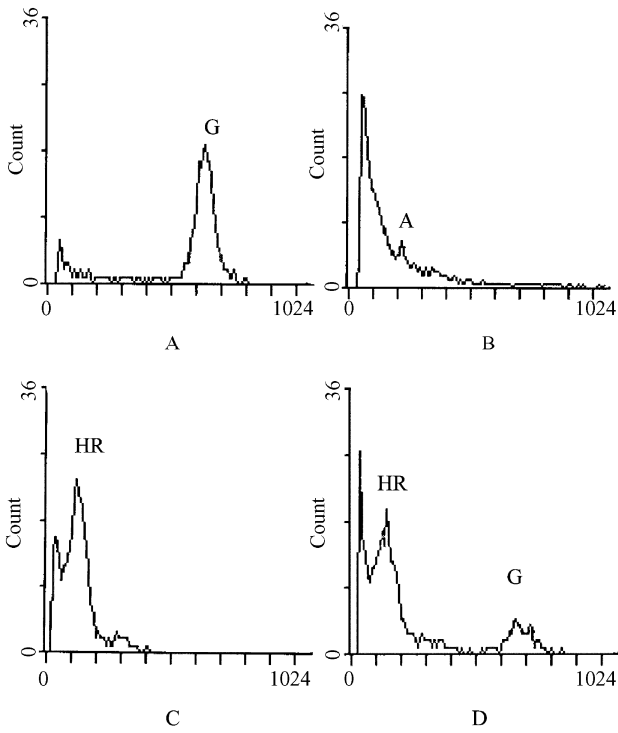


图 1 流式细胞柱状图

A. 大豆; B. 拟南芥; C. 丹参毛状根; D. 样品
G. 大豆细胞峰; A. 拟南芥细胞峰; HR. 丹参毛状根细胞峰。

果。

2.2.2 乙醇固定对核 DNA 检测的影响 利用乙醇对分离 DNA 进行固定。以往的报道多采用核 DNA 分离后直接进样检测, 本研究发现采用此方法处理的毛状根样品因碎片过多而无法辨认细胞峰的位置, 而采用乙醇对核 DNA 进行固定后, 毛状根细胞峰可以清晰的辨认。

2.3 重复性实验 利用流式细胞术检测了 5 个丹参毛状根组织的核 DNA 含量(表 1), 根据以下公式计算: $DI = \text{丹参毛状根 } 2C \text{ peak mean} / \text{大豆 } 2C \text{ peak mean}$; 丹参毛状根 $2C$ 核 DNA (pg) = $DI \times 2.32 \text{ pg} / 2C$; $1 \text{ pg DNA} = 978 \text{ Mbp}^{[7]}$ 。结果表明丹参毛状根核 DNA 含量平均为 $0.18 \text{ pg} \cdot 2C^{-1}$, 基因组大小平均为 87.8 Mbp 。

表 1 丹参毛状根核 DNA 含量 ($n = 2$)

样品	DI ¹⁾	核 DNA 含量($\text{pg}/2C$) ²⁾	1C 基因组大小(Mbp) ³⁾
1	0.199	0.17	84.7
2	0.225	0.20	95.7
3	0.193	0.17	82.1
4	0.217	0.19	92.3
5	0.198	0.17	84.2
平均值	0.206	0.18	87.8
SE	0.007	0.005	2.589

3 讨论

用流式细胞仪检测核 DNA 含量通常有两种方法: 即外标法和内标法。外标法指用碘化丙啶对样品染色达到饱和, 保证全部 DNA 均被染色, 这时可以不需要内标物直接得出核 DNA 含量。但实际实验中我们很难预测染色剂的饱和用量, 而且峰位漂移或不稳定时无法察觉和矫正, 所以我们在此次实验中选择用内标法检测。与新芽等组织不同, 丹参毛状根核 DNA 分离方法的特点是: 1) 分离时间适量延长; 2) 核 DNA 需要乙醇固定。通过本实验研究, 建立了用于测定丹参毛状根核 DNA 的流式细胞术方法, 该法可用于毛状根核型分析、分拣纯化染色体、定位基因、构建文库等研究。

[参考文献]

- [1] Wu J, Shi M. Ultrahigh diterpenoid tanshinone production through repeated osmotic stress and elicitor stimulation in fed-batch culture of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008. 78(3): 441-448.
- [2] Phillips R, Kaepler S, Olhoff P. Genetic instability of plant tissue culture: Breakdown of normal controls [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994. 91: 5222-5226.
- [3] Cassells A, Curry R. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2001. 64: 145-157.
- [4] 李立家, 宋运淳. 流式细胞术分析和分拣植物染色体 [J]. *遗传*, 2005, 27(3): 461-465.
- [5] Bennett M, Leitch I, Price H. Comparisons with *Caenorhabditis* (~ 100 Mb) and *Drosophila* (~ 175 Mb) using flow cytometry show genome size in *Arabidopsis* to be ~ 157 Mb and ~ 25% larger than the *Arabidopsis* genome initiative estimate of ~ 125 Mb [J]. *Ann Bot*, 2003. 91: 547-557.
- [6] Alan A R., Zeng H, Assani A. Assessment of genetic stability of the germplasm lines of medicinal plant *Scutellaria baicalensis* Georgi (Huang-qin) in long-term, in vitro maintained cultures [J]. *Plant Cell Rep*, 2007. 26: 1345-1355.
- [7] Dolezel J, Bartos J, Voglmayr H. Nuclear DNA content and genome size of trout and human [J]. *Cytometry*, 2003. 51: 127-128.