

引用格式:

黄雄, 郭英华, 田林, 李全梓, 岳志强. 基于流式细胞术的桫欏基因组大小测定[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2020, 46(2): 171–175.

HUANG X, GUO Y H, TIAN L, LI Q Z, YUE Z Q. The genome size determination of *Alsophila spinulosa* based on flow cytometry[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2020, 46(2): 171–175.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



基于流式细胞术的桫欏基因组大小测定

黄雄, 郭英华, 田林, 李全梓, 岳志强*

(中国林业科学研究院林木遗传育种国家重点实验室, 北京 100091)

摘要: 以买麻藤(*Gnetum montanum*)为内参, 测定 5 种常用裂解液(Tris·MgCl₂、LB01、WPB、Otto's、Galbraith's)对桫欏(*Alsophila spinulosa*)细胞核的裂解效果, 并通过比较桫欏和买麻藤流式细胞仪测定的荧光峰值, 计算出桫欏的基因组大小。结果表明: 5 种裂解液中, WPB 为桫欏最佳裂解液; 桫欏基因组大小为 6 003.25 Mb, 即 2C DNA 含量为 6.138 pg。

关键词: 桫欏; 买麻藤; 裂解液; 流式细胞术; 基因组大小

中图分类号: Q943.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2020)02-0171-05

The genome size determination of *Alsophila spinulosa* based on flow cytometry

HUANG Xiong, GUO Yinghua, TIAN Lin, LI Quanzi, YUE Zhiqiang*

(State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: In this study, to find out the optimal lysis buffer for dissociating cell nucleus, five common lysis buffers (Tris·MgCl₂, LB01, WPB, Otto's, Galbraith's) were tested on the cell nucleus of *Alsophila spinulosa* leaves by use of *Gnetum montanum* as internal standard, and, the genome size of *A. spinulosa* was calculated according to the multiple relationships of peak values of *A. spinulosa* and *Gnetum montanum* using flow cytometry. The results showed that the WPB was the most appropriate lysis buffer to dissociate *A. spinulosa* cell nucleus and the genome size of *A. spinulosa* was determined to be 6 003.25 Mb, i.e. 2C DNA content was 6.138 pg.

Keywords: *Alsophila spinulosa*; *Gnetum montanum*; lysis buffers; flow cytometry; genome size

基因组大小的测定不仅对物种的分子遗传与细胞遗传研究具有重要意义, 也为其基因组学及其亲缘进化研究以及生态学研究提供重要参考^[1]。目前, 测定基因组大小的方法有孚耳根微显影法、基因组测序法和流式细胞术^[2-4]。流式细胞术是一种对悬浮于流体中的微小颗粒进行计数和分选的生物计数方法, 具有操作简单、分析速度快、结果相

对准确的优点, 被广泛应用于物种基因组大小的测定^[5-7]、核型分析^[8]和细胞计数^[9]等方面的研究。

桫欏(*Alsophila spinulosa*)是子遗植物, 属桫欏科(Cyatheaceae)桫欏属(*Alsophila*), 别名树蕨、蛇木等, 是现存唯一的木本蕨类植物, 株高可达数米, 有“蕨类植物之王”的美誉^[10-11], 目前处于濒临灭绝状态, 被列为国家一级野生保护植物^[12-13]。桫欏

收稿日期: 2019-05-31

修回日期: 2019-08-22

基金项目: 中国林业科学研究院基本科研业务费专项资金项目(CAFYBB2017ZY001)

作者简介: 黄雄(1992—), 男, 四川广元人, 博士研究生, 主要从事林木分子与代谢研究, huangxiongcaf@163.com; *通信作者, 岳志强, 硕士, 高级工程师, 主要从事林木分子与代谢研究, yue7210@sina.com

的生长对环境的要求较高,喜阴冷潮湿,在中国仅分布于南方和西南地区^[14]。桫欏的茎干有较好的药用价值,具有润肺止咳、除湿祛风等功效,被称为“龙骨风”。目前,对桫欏化合物成分^[15-16]、配子体和孢子体^[17]、染色体数目与核型^[18]、栽培技术^[19]等方面进行了较多研究,但有关桫欏基因组大小的研究尚少见报道。本试验中,以买麻藤为内参,采用流式细胞仪对桫欏的基因组大小进行分析,旨在为今后开展桫欏属植物基因组学的研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

桫欏采自四川省洪雅县桫欏国家种质资源库(N29°52', E103°11');买麻藤由中国林业科学研究院林木遗传育种国家重点实验室提供。

1.2 主要仪器与试剂

主要仪器:流式细胞仪(BD Influx)、荧光显微镜(Carl Zeiss)、离心机(Thermo Fisher Scientific)。

裂解液:Tris·MgCl₂^[20]、LB01^[21]、WPB^[22]、Otto's^[23]、Galbraith's^[24],配方详见表1。

表1 5种细胞核裂解液的配方

Table 1 Component of five nuclear lysis buffers

裂解液	配方
Tris·MgCl ₂	200 mmol/L Tris, 4 mmol/L MgCl ₂ ·6H ₂ O, 0.5%(体积分数) TritonX-100, pH 7.5
LB01	15 mmol/L Tris, 2 mmol/L Na ₂ EDTA, 0.5 mmol/L Spermine·4HCl, 80 mmol/L KCl, 20 mmol/L NaCl, 0.1%(体积分数) TritonX-100, 15 mmol/L β-mercaptoethanol, pH 8.0
WPB	0.2 mol/L Tris·HCl, 4 mmol/L MgCl ₂ ·6H ₂ O, 2 mmol/L Na ₂ EDTA·2H ₂ O, 86 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Na ₂ S ₂ O ₅ , 1%PVP-10, 1%(体积分数) TritonX-100, pH 7.5
Otto's	OTTO I: 100 mmol/L Citric acid, 0.5%(体积分数) Tween-20, pH 2.0~3.0; OTTO II: 400 mmol/L Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O, pH 8.0~9.0
Galbraith's	45 mmol/L MgCl ₂ , 30 mmol/L Sodium citrate, 20 mmol/L MOPS, 0.1%(体积分数) TritonX-100, pH 7.0

供试试剂:碘化丙啶(propidium iodide, PI)染液、PBS 溶液、鞘液。

1.3 试验方法

1.3.1 细胞核悬液的制备

在预冷的培养皿中加入 1 mL 预冷的裂解液,放入约 0.2 g 桫欏和 0.1 g 买麻藤幼嫩叶片,用刀片切碎后,再加入 1 mL 预冷的裂解液,使材料全部浸没在裂解液中。裂解 5 min 后,用 1 mL 移液枪吸取培养皿内的裂解液,过筛(孔径为 48 μm)至 2 mL 离心管中,离心(3 000 r/min)8 min。弃上清液后,将细胞核沉淀置于 4 °C 冰箱保存,备用。每种裂解液各做 3 个平行实验。

1.3.2 DNA 特异性染色

向细胞核沉淀中加入 500 μL 预冷的碘化丙啶(PI)染料,用移液枪将聚集成团的细胞核分开,置于 4 °C 冰箱中,避光染色 15 min。

染色后,离心(3 000 r/min)4 min,弃上清液,再加入 30 μL 预冷的 1%PBS 溶液,重悬沉淀后,用移液枪吸取 10 μL 核悬液于载玻片上,于荧光显微镜下观察细胞核染色情况。

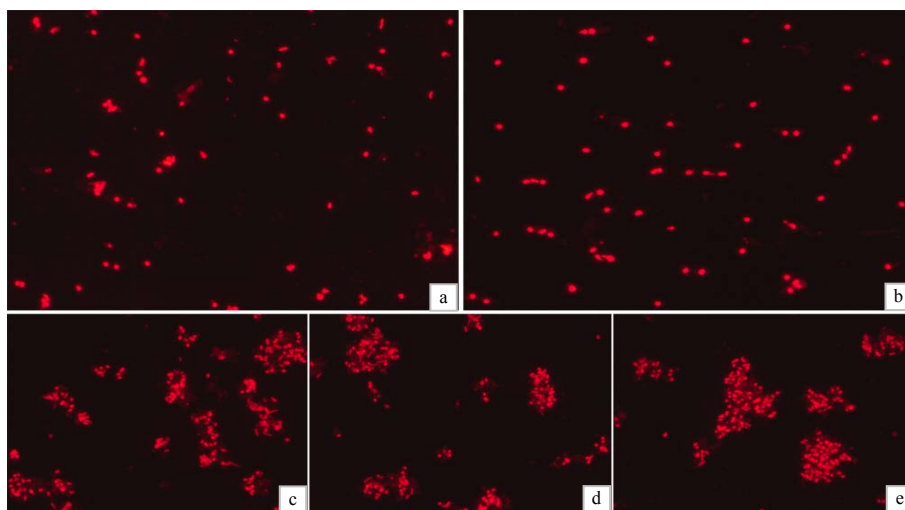
1.3.3 流式细胞仪检测

将染色后的细胞核沉淀移至上样管,加入 500 μL 鞘液,充分混匀后上机检测。采用波长为 488 nm 的激光,收集 610/20 通道的荧光,检测 PI 的发射荧光强度。每个样品至少收集 2 万个细胞核(不包括碎片)。测定所得的数据由仪器自带的 BD FACS 软件进行处理分析,计算细胞核 DNA 的含量。

2 结果与分析

2.1 裂解液的筛选结果

用 5 种裂解液处理桫欏幼嫩叶片后,发现叶片颜色变化有所差异。用 WPB、LB01 裂解的叶片呈绿色,用 Tris·MgCl₂、Otto's、Galbraith's 裂解的叶片呈褐色或深褐色。在荧光显微镜下观察,发现 WPB 和 LB01 的裂解效果较好,能很好地将细胞核游离出来,细胞核的数量较多,背景杂质和碎片较少;Tris·MgCl₂、Otto's、Galbraith's 裂解出的细胞核数量较少,呈零星分布,大部分为背景杂质和碎片(图 1)。LB01 裂解液中含有 β-巯基乙醇^[25],是一种有毒物质,对人体有害。综合来看,WPB 为本研究筛选的最佳裂解液。



a、b、c、d、e 分别为 LB01、WPB、Tris·MgCl₂、Otto's、Galbraith's 的裂解结果。

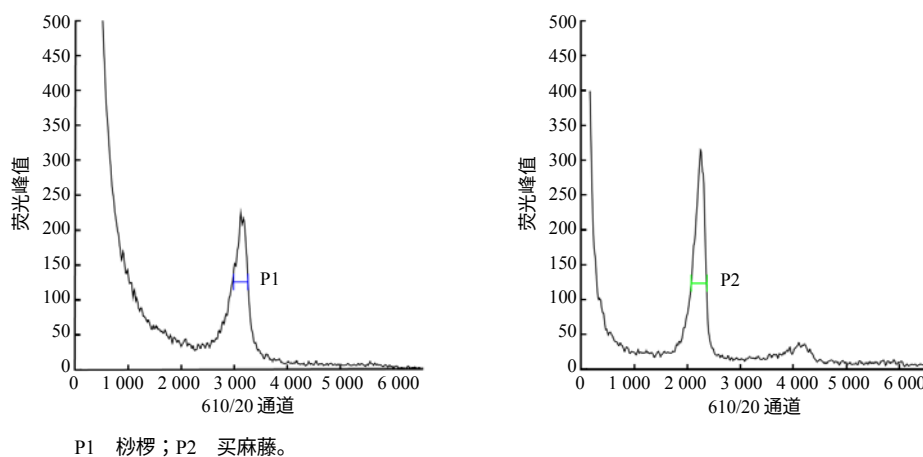
图 1 细胞核的染色荧光检测结果

Fig.1 Nucleus fluorescence detection after staining

2.2 基因组大小的测定

对比分析待测样品桫欏与买麻藤单独测定的结果，发现桫欏测定峰的位置和买麻藤的没有重

叠干扰，也没有在买麻藤测定峰 1/2 或 2 倍的位置，排除了 2 个物种 2C DNA 和 4C DNA 峰的交叉影响，保证了用买麻藤作内参的准确性(图 2)。



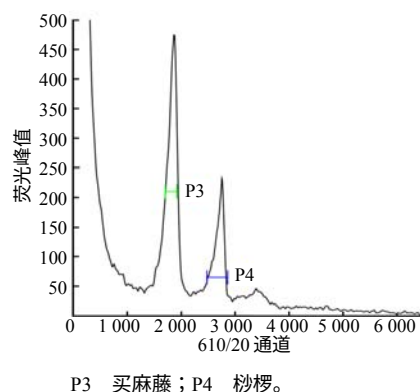
P1 桫欏；P2 买麻藤。

图 2 流式细胞仪的检测结果

Fig.2 The peak graph of FCM detection

采用 BD FACS 软件对桫欏和买麻藤混合样品进行流式结果分析。从分析结果(图 3)可以看出，桫欏和买麻藤的荧光峰图能较好地分开，曲线平滑，峰形较佳。根据 3 次测定结果(表 2)，可计算出桫欏的 2C DNA 荧光峰值是买麻藤 2C DNA 荧光峰值的 1.475 倍。根据买麻藤的基因组大小 4.07 Gb^[26]，计算得到桫欏基因组大小为 6 003.25 Mb。

变异系数(CV 值)是流式细胞术中检验精准度的一个标准，CV 值越小，说明细胞核完整性越好，碎片越少。从表 2 可以看出，所有测定结果中的变异系数 CV 值均控制在 4%以下，进一步保证了实验结果的可信度。



P3 买麻藤；P4 桫欏。

图 3 桫欏和买麻藤混合样品流式细胞仪的检测结果

Fig.3 The peak graph of FCM detection for mixed samples

表 2 桫欏和买麻藤混合样品检测荧光峰值

Table 2 The FCM detection statistical results for mixed samples

植物	荧光峰值			变异系数/%		
桫欏	26 680	27 674	26 729	2.65	2.47	2.70
买麻藤	18 128	18 817	18 032	3.76	3.42	3.76

同一物种下的 3 个数字为 3 次重复的测试值。

3 结论与讨论

在用流式细胞术测定物种基因组大小时,裂解液的筛选至关重要。本研究,对 5 种裂解液进行综合筛选,WPB 裂解液能很好地裂解桫欏细胞,释放出细胞核,且杂质少,可降低不必要的干扰信号;LB01 裂解液对桫欏也有较好的裂解效果,但 LB01 裂解液中的 β -巯基乙醇对人体有害;综合分析,WPB 为本研究桫欏最佳裂解液。

研究^[27-28]表明,所选取的参照植物与待测物种的基因组大小相差越大,误差就越大,结果越不准确。本研究以买麻藤作内参,单独对买麻藤和桫欏进行测定,两者的荧光峰图没有重叠,区分度好,且二者峰图相近,表明它们的基因组大小相近;同时,买麻藤基因组已被全基因组测序,其组装质量很好,充分保证了用买麻藤作内参的可靠性。通过流式细胞仪检测桫欏和买麻藤混合样品细胞核 DNA,计算得到桫欏基因组大小为 6 003.25 Mb。桫欏基因组大小的测定可为今后开展桫欏属植物基因组测序、文库构建和基因组学等相关研究提供参考。

参考文献:

- [1] GREILHUBER J, DOLEZEL J, LYSÁK M A, et al. The origin, evolution and proposed stabilization of the terms 'genome size' and 'C-value' to describe nuclear DNA contents[J]. *Annals of Botany*, 2005, 95(1): 255-260.
- [2] DU B, WANG D. C-values of seven marine mammal species determined by flow cytometry[J]. *Zoological Science*, 2006, 23(11): 1017-1020.
- [3] KIKUCHI S, TANAKA H, SHIBA T, et al. Genome size, karyotype, meiosis and a novel Extra chromosome in *Torenia fournieri*, *T. baillonii* and their hybrid[J]. *Chromosome Research*, 2006, 14(6): 665-672.
- [4] 张雪娟,周知里,朱仁斌,等.地构叶和广东地构叶基因组大小测定[J]. *西南林业大学学报*, 2015, 35(4): 86-90.
ZHANG X J, ZHOU Z L, ZHU R B, et al. Estimation of genome sizes of *Speranskia tuberculata* and *Speranskia cantonensis*[J]. *Journal of Southwest Forestry University*, 2015, 35(4): 86-90.
- [5] 李潞滨,武静宇,胡陶,等.毛竹基因组大小测定[J]. *植物学报*, 2008, 43(5): 574-578.
LI L B, WU J Y, HU T, et al. Estimation of genome size of moso bamboo(*Phyllostachys edulis*)[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2008, 43(5): 574-578.
- [6] 周知里,熊智,马焕成,等.两种木棉科植物基因组大小测定[J]. *西部林业科学*, 2014, 43(2): 97-101.
ZHOU Z L, XIONG Z, MA H C, et al. Genome sizes of two Bombacaceae plants[J]. *Journal of West China Forestry Science*, 2014, 43(2): 97-101.
- [7] 李秋实,徐江,朱英杰,等.基于流式细胞技术的灵芝基因组大小估测[J]. *菌物学报*, 2013, 32(5): 899-906.
LI Q S, XU J, ZHU Y J, et al. Estimation of the genome size of *Ganoderma lucidum* based on a flow cytometric analysis[J]. *Mycosystema*, 2013, 32(5): 899-906.
- [8] 唐艳梅,易自力,邓果特,等.4 种芒属植物的核型分析及亲缘关系探讨[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2018, 44(5): 487-494.
TANG Y M, YI Z L, DENG G T, et al. Chromosome karyotypic analysis on four *Miscanthus* species and their genetic relationship[J]. *Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences)*, 2018, 44(5): 487-494.
- [9] 李依驰,崔看,程鹏,等.拟南芥叶片细胞数直接高效检测体系的建立[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2015, 41(5): 480-485.
LI Y C, CUI K, CHENG P, et al. Establish the direct and high performance detection system for cell counts in leaves of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences)*, 2015, 41(5): 480-485.
- [10] 秦仁昌. *中国植物志(第二卷)*[M]. 北京:科学出版社, 1959.
QIN R C. *Flora of China (vol. 2)*[M]. Beijing: Science Press, 1959.
- [11] 王用平.待开发的活化石—桫欏[J]. *中国野生植物*, 1990, 9(1): 21-22.
WANG Y P. A living fossil to be exploited-*Alsophila*

- spinulosa*[J]. Wild Plant Resources in China, 1990, 9(1): 21–22.
- [12] 程治英, 陶国达, 许再富. 桫欏濒危原因的探讨[J]. 云南植物研究, 1990, 12(2): 186–190.
CHENG Z Y, TAO G D, XU Z F. A study on the biological characteristics and the endangering factors of *Alsophila spinulosa*[J]. Acta Botanica Yunnanica, 1990, 12(2): 186–190.
- [13] 代正福, 周正邦. 中国野生桫欏科植物种类及其生境类型[J]. 贵州农业科学, 2000, 28(6): 47–49.
DAI Z F, ZHOU Z B. Kinds and ecological type of wild Cyatheaceae ornamental plants in China[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2000, 28(6): 47–49.
- [14] CHENG Y, CHEN F Z, HE X J. Isolation of three chemical constituents from *Alsophila spinulosa* stalks for the first time[J]. Medicinal Plant, 2011, 2(11): 5–7.
- [15] 陈封政, 向清祥, 李书华. 子遗植物桫欏叶化学成分的研究[J]. 西北植物学报, 2008, 28(6): 1246–1249.
CHEN F Z, XIANG Q X, LI S H. Chemical constituents in the leaves of *Alsophila spinulosa*[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2008, 28(6): 1246–1249.
- [16] 成英, 陈封政, 何兴金. 桫欏茎干中化合物成分研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(30): 18672–18674.
CHENG Y, CHEN F Z, HE X J. Study on the chemical constituents isolated from *Alsophila spinulosa* stalks for the first time[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2011, 39(30): 18672–18674.
- [17] 王金娟, 张宪春, 刘保东, 等. 桫欏科三种植物配子体发育的研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2007, 15(2): 115–120.
WANG J J, ZHANG X C, LIU B D, et al. Gametophyte development of three species in Cyatheaceae[J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2007, 15(2): 115–120.
- [18] 王景佑, 姚世鸿, 程光中. 贵州桫欏的核型研究[J]. 贵州师范大学学报(自然科学版), 1997, 15(2): 21–25.
WANG J Y, YAO S H, CHENG G Z. Researching on the karyotype of *Alsophila spinulosa* (Hook) Tryon of Guizhou[J]. Journal of Guizhou Normal University (Natural Science), 1997, 15(2): 21–25.
- [19] 张银丽, 李杨, 季梦成, 等. 黑桫欏孢子的无菌栽培[J]. 植物生理学报(原植物生理学通讯), 2007, 6(43): 1139–1140.
ZHANG Y L, LI Y, JI M C, et al. Spore sterile culture in *Alsophila podophylla* Hook[J]. Plant Physiology Journal(Plant Physiology Communications), 2007, 6(43): 1139–1140.
- [20] PFOSSER M, HEBERLE-BORS E, AMON A, et al. Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines. [J]. Cytometry, 1995, 21(4): 387–393.
- [21] DPOOLEŽEL J, BINAROVÁ P, LCRETI S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry[J]. Biologia Plantarum, 1989, 31(2): 113–120.
- [22] LOUREIRO J, RODRIGUEZ E, DOLEŽEL J, et al. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species[J]. Annals of Botany, 2007, 100(4): 875–888.
- [23] DOLEŽEL J, GREILHUBER J, SUDA J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry[J]. Nature Protocols, 2007, 2(9): 2233–2244.
- [24] GALBRAITH D W, HARKINS K R, MADDOX J M, et al. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues[J]. Science, 1983, 220: 1049–1051.
- [25] PENG R H, SONG G L, LIU F, et al. An efficient method of cotton DNA fibers preparation for FISH[J]. Acta Agronomica Sinica, 2009, 35(3): 412–417.
- [26] WAN T, LIU Z M, LI L F, et al. A genome for gnetophytes and early evolution of seed plants[J]. Nature Plants, 2018, 4(2): 82–89.
- [27] LI W B, WU J Y, HU T, et al. Determination of genome size of *Phyllostachys pubescens*[J]. Chinese Journal of Botany, 2008, 25(5): 574–578.
- [28] DOLEŽEL J, BARTOŠ J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size[J]. Annals of Botany, 2005, 95(1): 99–110.

责任编辑: 毛友纯

英文编辑: 柳 正