

利用流式细胞法鉴定马铃薯倍性方法的优化

王婷婷, 张光海, 蔡汶玻, 郭华春*

(云南农业大学, 云南 昆明 650201)

摘要: 为了建立适于马铃薯倍性鉴定的流式细胞法试验体系, 以二倍体马铃薯‘E’和四倍体马铃薯‘青薯9号’为材料, 分别利用LB01, Galbraith's和Tris·MgCl₂ 3种细胞核分离缓冲液制备马铃薯组培苗幼叶单细胞核悬浮液, 比较离心和不离心及不同核酸染料碘化丙啶(Propidium iodide, PI)和4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)对流式细胞仪检测结果的影响。结果表明, 3种核分离缓冲液对制备马铃薯组培苗幼叶单细胞核悬浮液存在差异, 其中核分离缓冲液LB01的效果最好; 不离心的效果和离心相比, 离心的悬浮液中目的细胞少于不离心的; 染料DAPI与PI相比, 染色效果无明显差异。从而初步建立起一套利用流式细胞术鉴定马铃薯倍性的方法, 该方法样品需求量小, 且制备简单, 测量快速, 准确度高, 背景碎片和杂峰较少, 主峰清晰, 是鉴定马铃薯染色体倍性的理想方法。

关键词: 马铃薯; 核分离缓冲液; 流式细胞术; 倍性鉴定

Optimization of Potato Ploidy Identification Method Using Flow Cytometry

WANG Tingting, ZHANG Guanghai, CAI Wenbo, GUO Huachun*

(Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China)

Abstract: The diploid potato line 'E' and tetraploid variety potato 'Qingshu 9' were used as materials in order to establish a flow cytometric test system suitable for potato ploidy identification. The single cell nuclear suspensions of young leaves were prepared by using various dissociation buffers LB01, Galbraith's and Tris·MgCl₂, and the effects of centrifugation and noncentrifugation and different nucleic acid dyes propidium iodide (PI) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) on flow cytometry were compared. There were differences among the three nuclear dissociation buffers for preparation of single cell nuclear suspensions with the nuclear dissociation buffer LB01 having the best effect. The target cells in the centrifuged suspension were less than those without centrifugation. However, there was no obvious difference in dyeing effect between DAPI and PI. Therefore, the method to identify potato ploidy by flow cytometry is established. The method has the advantages of small sample demand, simple preparation, fast measurement, high accuracy, few background fragments and miscellaneous peaks, and clear main peak, which is an ideal method for identifying ploidy of potato chromosome.

Key Words: potato; nucleic isolation buffer; flow cytometry; identification of ploidy

流式细胞法(Flow cytometry, FCM)是利用流式细胞分析仪检测植物细胞DNA含量, 分析得到

DNA含量直方图, 根据DNA含量直方图的峰值位置推断出植株的倍性。由于细胞在有丝分裂的过

收稿日期: 2017-07-20

基金项目: 国家马铃薯产业技术体系(CARS-10-21P)。

作者简介: 王婷婷(1992-), 女, 硕士研究生, 从事马铃薯遗传育种研究。

*通信作者(Corresponding author): 郭华春, 博士, 教授, 主要从事马铃薯遗传育种研究, E-mail: ynghc@126.com。

程中,核内的DNA会进行复制,造成DNA含量的变化。如果把处于G0/G1期的细胞的DNA含量看作 $2n$ 的话,处于G2/M期的细胞的DNA含量则为 $4n$,所以FCM可以准确快速地鉴定大批量植物材料的染色体倍性水平^[1,2]。流式细胞术可以测定液体悬浮液中荧光和微小粒子的光散射(荧光标记的微粒)。由于其快速准确的特点,FCM在20世纪80年代,代替细胞荧光光度法和显微分光光度测定法,成为测定植物细胞核DNA含量的主流方法,其原理是利用特异的荧光染色剂对细胞进行染色,通过流式细胞仪测定荧光含量^[3,4]。由于所使用的荧光染色剂大多为核酸荧光染料,可以与细胞内DNA碱基特异性结合,所以荧光的含量与细胞DNA含量成正比关系,随着染色体数目的成倍增加,细胞核DNA含量也必然成倍增加,细胞核DNA相对含量的高低与细胞的倍性密切相关,根据细胞核DNA含量的高低可进行倍性鉴定。常用的荧光染料有碘化丙啶(Propidium iodide, PI)、异硫氰基荧光素(Fluorescein isothiocyanate, FITC)和4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)等^[5-7]。FCM短时间内可以测定大量的细胞核,样品需求量小,不会影响植物的正常生长。且样品制备仅需要几分钟,而且不需要昂贵的试剂。流式细胞术简便、快速、分辨率和准确度高,鉴于这些优点,已经在多种植物的染色体倍性鉴定中得以应用。例如,苹果^[5]、梨^[8]、桑树^[9]、菘蓝^[10]、草莓^[11]、水稻^[12]、樱桃^[13]等。

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)属于茄科(Solanaceae)茄属(*Solanum*)一年生,草本植物,起源于南美洲的秘鲁和智利地区^[14]。马铃薯普通栽培种分为2个亚种,分别为长日照普通栽培种亚种(*S. tuberosum* subsp. *tuberosum*)和短日照安第斯亚种(*S. tuberosum* subsp. *andigena*),经过几个世纪的自然进化选择,形成了目前世界各国广泛栽培的普通栽培种(*Solanum tuberosum* L.)^[15]。马铃薯倍性丰富,染色体基数为 $n = 12$,自然界中分布有二倍体($2n = 24$)、三倍体($2n = 36$)、四倍体($2n = 48$)、五倍体($2n = 60$)、六倍体($2n = 72$)^[16]。这些是改善栽培马铃薯的重要基因资源,可以为育种工作提供具有理想遗传背景的材料,而马铃薯的

倍性鉴定则是开展野生种马铃薯育种应用研究的基础和前提^[17,18]。

尽管关于马铃薯倍性鉴定方法已有很多研究报道,但利用流式细胞法鉴定马铃薯倍性方面的报道仍然较少。本试验借鉴流式细胞法在其他植物染色体倍性鉴定方面的研究,通过筛选适合制备马铃薯幼叶单细胞核悬浮液的缓冲液,比较离心和不离心及不同染料对结果的影响,期望利用流式细胞术建立一套适合鉴定马铃薯染色体倍性的方法,快速准确地鉴定马铃薯倍性,从而为马铃薯的倍性研究提供依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料与仪器

二倍体马铃薯品系‘E’和四倍体马铃薯‘青薯9号’为研究对象,取在MS培养基中正常生长3周左右的幼嫩叶片为试验材料。流式细胞仪(BD FACSAria™ II)。

1.2 细胞核分离缓冲液的配制

细胞核分离缓冲液 I (LB01): 15 mmol/L Tris, 2 mmol/L Na_2EDTA , 0.5 mmol/L 胍胺, 80 mmol/L KCl, 20 mmol/L NaCl, 0.1% (v/v) Triton X-100, 用 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.5, 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 再加 15 mmol/L β -巯基乙醇; 分装后 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

细胞核分离缓冲液 II (Galbraith's buffer): 45 mmol/L MgCl_2 , 20 mmol/L MOPS, 30 mmol/L 柠檬酸钠, 0.1% (v/v) Triton X-100; 用 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.0, 0.22 μm 滤膜过滤除菌; 分装后 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

细胞核分离缓冲液 III (Tris · MgCl_2 buffer): 200 mmol/L Tris, 4 mmol/L MgCl_2 , 0.5% (v/v) Triton X-100; 用 1 mol/L HCl 调节 pH 至 7.5, 0.22 μm 滤膜过滤除菌, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

1.3 马铃薯叶片细胞核悬浮液的制备

选用上述3种核分离缓冲液,取约20 mg正常生长3周左右的马铃薯‘E’组培苗叶片,置于预冷的培养皿中央,加入1 mL预冷的核分离缓冲液,使材料完全浸没在解离液中,然后用锋利的双面刀片迅速切碎,切的过程中样品应始终接触缓冲

液。将匀浆混匀, 避免产生气泡。将预先浸泡在解离液中400目的滤膜取出, 用此滤膜将匀浆过滤到1.5 mL离心管中^[19]。

1.4 离心漂洗次数选择

采用1.3的方法, 加入1 mL预冷的LB01缓冲液, 分别进行不离心和离心1次的比较试验。离心1次的试验条件为4 ℃, 1 000 r/min, 离心5 min, 弃去上清, 再加200 μL LB01缓冲液。

1.5 染色剂的选择

在用LB01缓冲液制备的单细胞核悬浮液中, 分别加入PI(50 μg/mL)染料和DAPI(5 μg/mL)染料, 注意加PI染料的核悬浮液中要同时加入质量浓度为50 μg/mL的核糖核酸酶(RNase)。4 ℃避光

染色30 min, 并轻摇混匀。

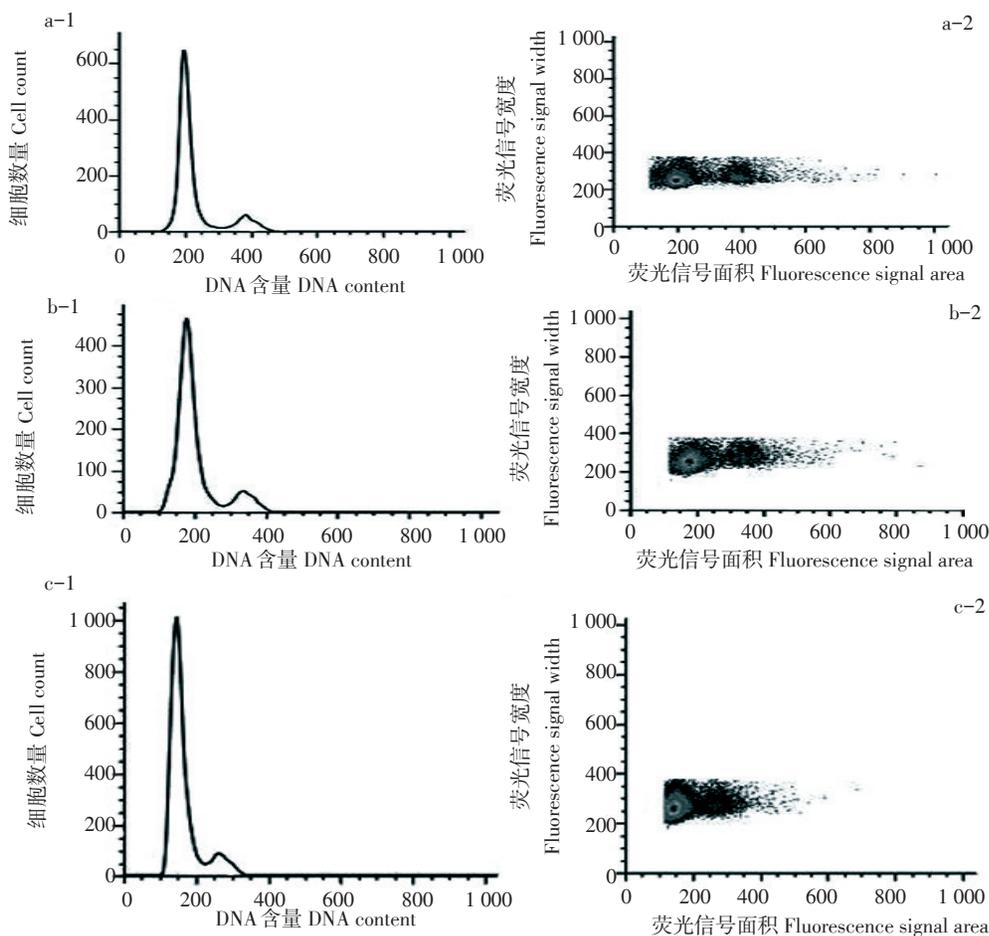
1.6 上机检测与数据分析

用BD FACSAria™ II流式细胞仪进行检测, 调节参数, 每个经过染色的样品收集10 000个细胞核, 利用FlowJo软件进行数据分析, 从而获得流式峰值图(横坐标为细胞核DNA相对含量的荧光强度, 纵坐标为细胞核数量)和散点图(横坐标为细胞的总荧光强度, 纵坐标为细胞通过激光的时间)。

2 结果与分析

2.1 不同缓冲液的效果比较

取约20 mg正常生长3周左右的二倍体马铃薯品系‘E’组培苗幼嫩叶片, 分别用核分离缓冲液



a. LB01解离液; b. Galbraith's解离液; c. Tris•MgCl₂解离液。

a. LB01 buffer; b. Galbraith's buffer; c. Tris•MgCl₂ buffer.

图1 不同解离液下二倍体马铃薯品系‘E’单细胞核悬浮液的相对DNA含量直方图和散点图

Figure 1 Peak value histogram and scatter diagram of single cell suspension solution for relative DNA contents using different dissociation buffers in diploid potato line 'E'

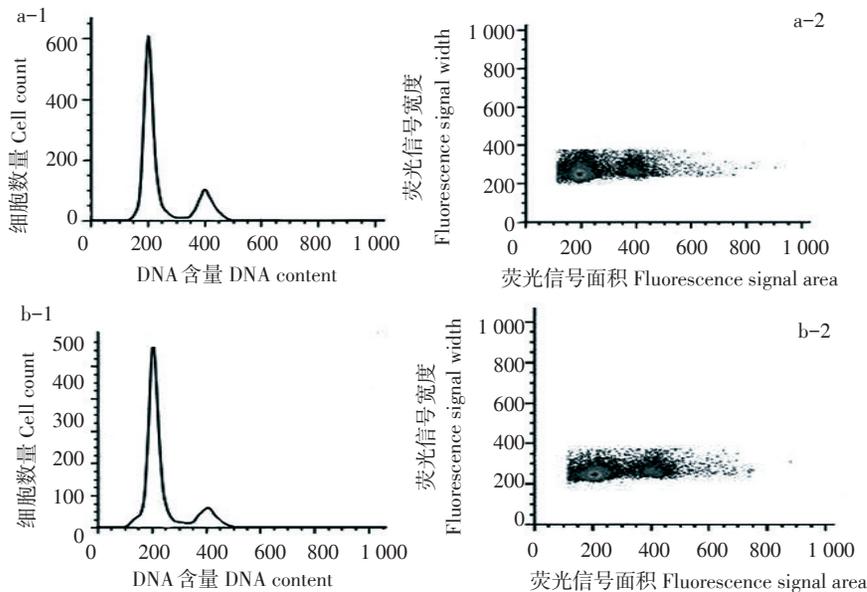
I (LB01)、核分离缓冲液 II (Galbraith's buffer) 和核分离缓冲液 III (Tris · MgCl₂ buffer) 制备马铃薯单细胞核悬浮液, 检测结果见图 1。使用 3 种缓冲液制备的马铃薯幼叶细胞核悬浮液, 经流式细胞仪检测均可产生非常明显的峰。核分离缓冲液 I (LB01) (图 1-a) 的解离效果明显优于 Galbraith's buffer (图 1-b) 和 Tris · MgCl₂ buffer (图 1-c)。LB01 解离液得到的散点图中, 粒子团清晰、集中, 2 个细胞群可以完全分开, 收集到的完整细胞核较多, 在荧光通道值为 200 处附近出现 G1 峰, G1 峰和 G2 峰可以完全分开, 峰值较为准确 (图 1-a-2)。而 Galbraith's buffer 和 Tris · MgCl₂ buffer 制备的核悬浮液中 (图 1-b-2 和图 1-c-2), 2 个细胞群不能完全分开, 反映在直方图上则表现为 G1 峰和

G2 峰不能完全分开, 主峰位置明显发生偏移。因此, 核分离缓冲液 LB01 可作为制备马铃薯幼叶单细胞核悬浮液的最优解离液。

2.2 离心和不离心的效果比较

取二倍体马铃薯品系 'E' 组培苗新鲜幼嫩叶片制备的马铃薯单细胞核悬浮液, 进行不离心 (图 2-a) 和离心 1 次 (图 2-b) 的试验, 检测结果如图 2 所示。从图 2-a-2 和图 2-b-2 看出两者均表现为粒子团集中、清晰, 2 个细胞群可以完全分开, 反映在直方图上则表现为 G1 峰和 G2 峰可以完全分开, 但离心得到的悬浮液中完整细胞核少于不离心得到的。

从提高试验效率和节约试验成本来说, 应采用不离心方法制备马铃薯单细胞悬浮液。



a. 不离心; b. 离心 1 次。
a. No centrifugation; b. Centrifugation one time.

图 2 不同离心次数制备二倍体马铃薯品系 'E' 的相对 DNA 含量直方图和散点图
Figure 2 Peak value histogram and scatter diagram for relative DNA contents using different centrifugation times in diploid potato line 'E'

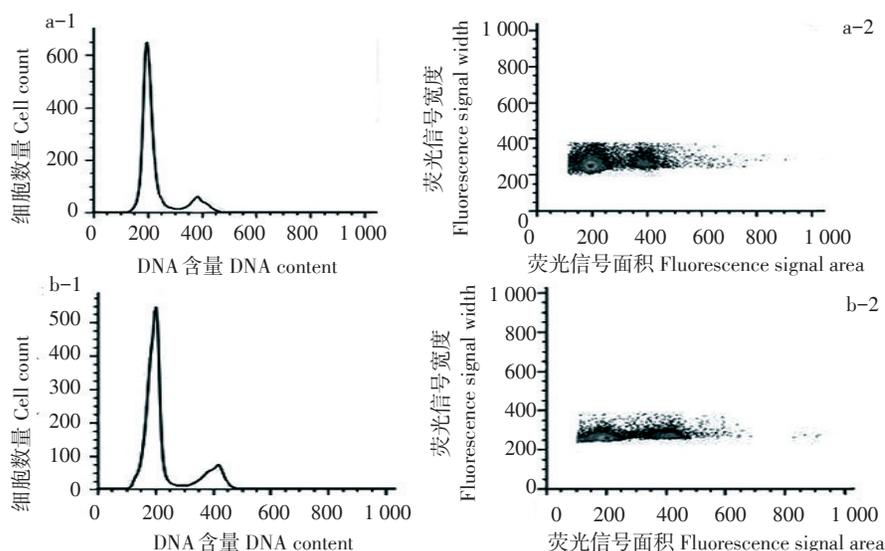
2.3 不同染料的效果比较

取二倍体马铃薯品系 'E' 组培苗新鲜幼嫩叶片制备的单细胞核悬浮液, 分别用 PI (50 μg/mL) 染料和 DAPI (5 μg/mL) 染料进行染色试验, 检测结果如图 3 所示。PI 染料和 DAPI 染料对马铃薯单

细胞核悬浮液的制备无明显差异, 处理后得到的完整细胞核均较多, 粒子团清晰集中, 背景碎片少, 2 个峰可以完全分开。

2.4 马铃薯品种 '青薯 9 号' 的倍性分析

利用以上所得的最优试验方案, 取大约 20 mg



a. 碘化丙啶; b. 4',6-二脒基-2-苯基吲哚。
a. PI; b. DAPI.

图3 不同染料制备二倍体马铃薯品系‘E’幼叶的相对DNA含量直方图和散点图

Figure 3 Peak value histogram and scatter diagram for relative DNA contents using different fluorescent dyes in diploid potato line 'E'

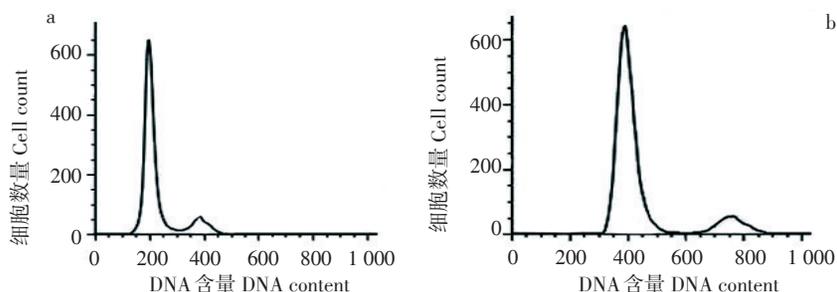


图4 流式细胞术检测二倍体马铃薯品系‘E’(a)和四倍体品种‘青薯9号’(b)的相对DNA含量

Figure 4 Peak value histogram for relative DNA contents of diploid potato line 'E' (a) and tetraploid variety 'Qingshu 9' (b) by flow cytometry

正常生长3周左右的‘青薯9号’组培苗幼嫩叶片，置于预冷的培养皿中央，加入1 mL预冷的核分离缓冲液LB01，然后用锋利的双面刀片迅速切碎，将匀浆混匀，随后用预先浸泡在解离液LB01中的400目滤膜将匀浆过滤到1.5 mL离心管中。加入10 μ L预冷的质量浓度为50 μ g/mL PI的染料，同时加入质量浓度为50 μ g/mL的RNase，避光染色30~60 min，最后流式细胞仪上样检测。以二倍体马铃薯品系‘E’作为对照，将‘青薯9号’的核DNA含量与二倍体马铃薯‘E’相比较，结果如图4。二

倍体马铃薯‘E’的细胞核荧光强度在200道附近有明显的峰，而‘青薯9号’在400道附近出现明显的峰，为二倍体马铃薯‘E’的2倍，符合四倍体核DNA的特征。以上建立的方法适合进行马铃薯的倍性分析。

3 讨论

在利用流式细胞术鉴定染色体倍性的试验中，由于只利用物理方法切碎叶片，很难获得大量的完整的细胞核。因此，还需要加入核分离缓冲

液^[20]。但是, 对于不同科、属和种的植物来说, 在提取单细胞核悬浮液时, 需要的解离液也是不同的。如果解离液不适合, 会加速细胞核破裂, 导致碎片增多。因此, 选择适合本试验材料的解离液尤为重要。例如, 杨静等^[9]利用MgSO₄缓冲液成功鉴定了桑树的染色体倍性; 马艳芝和客绍英^[10]利用LB01解离液成功鉴定了菘蓝的染色体倍性; 在本文中, 利用3种核分离缓冲液制备马铃薯幼嫩叶片的单细胞核悬浮液, 结果表明, 解离液LB01的效果最好, 所得到的单细胞核悬浮液中, 有较多的完整细胞核, 而且背景碎片较少, 峰图清晰。另外, LB01缓冲液也适应于苹果的染色体倍性鉴定^[5]。所以, 在利用流式细胞术鉴定马铃薯染色体倍性时, 选择LB01缓冲液来制备核悬浮液。

由于植物的组织结构不同, 会采用不同的离心次数。于红梅等^[11]采用离心2次和离心3次的方法处理草莓单细胞核悬浮液, 发现两者相比, 离心3次的效果更好, 碎片较少, 流式直方图更清晰, 还可以减少对仪器的堵塞。杨静等^[9]比较了不离心、离心1次、离心2次对桑树染色体倍性鉴定结果的影响, 发现3种离心方式对结果并无显著影响, 认为采用不离心方法制备桑树的单细胞核悬浮液, 既可以提高试验效率又可以简化试验操作步骤。吴雅琴等^[13]利用流式细胞术鉴定甜樱桃砧木细胞核DNA含量和染色体倍性的试验中, 采用不离心的方式处理甜樱桃砧木单细胞核悬浮液, 效果显著, 鉴定出了不同砧木品种的倍性。朱道圩等^[21]则发现离心2次对中华猕猴桃染色体倍性鉴定效果好。本文比较了不离心和离心1次对马铃薯叶片单细胞核悬浮液制备效果的影响, 发现离心之后, 虽然粒子团也清晰集中, 但目的细胞略少于不离心组, 可能是离心过程中丢失了部分目的细胞。故选择不离心的方式制备马铃薯叶片单细胞核悬浮液。PI染料不仅可以与DNA结合而且还能与RNA结合, 所以用PI进行染色的时候要同时加入RNase。而DAPI仅与DNA结构中的A-T区域结合, 与RNA没有结合位点。从试验结果来看, 2种染料的效果差异不大, 所以今后的试验既可以选择PI又可以选择DAPI作为荧光

染料。

在本试验中, 通过对马铃薯幼嫩叶片的不同处理与结果分析, 总结出一套利用流式细胞术鉴定马铃薯染色体倍性的方案: 取大约20 mg正常生长3周左右的马铃薯组培苗幼嫩叶片, 置于预冷的培养皿中央, 加入1 mL预冷的核分离缓冲液LB01, 用锋利的双面刀片迅速切碎, 然后将匀浆混匀, 用预先浸泡在解离液LB01中的400目滤膜将匀浆过滤到1.5 mL离心管中。加入10 μL预冷的PI (50 μg/mL)染料, 同时加入RNase (50 μg/mL), 避光染色30~60 min, 最后流式细胞仪上样检测。

采用流式细胞术鉴定马铃薯染色体倍性, 所需材料用量少, 速度快, 短时间内便可鉴定出植株倍性, 可以为马铃薯的倍性研究提供实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] 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(4601): 1049.
- [2] Arumuganathan K, Earle E D. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1991, 9(3): 229-241.
- [3] Mallón R, Rodríguez-Oubiña J, González M L. *In vitro* propagation of the endangered plant *Centaurea ultriciae*: assessment of genetic stability by cytological studies, flow cytometry and RAPD analysis [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2010, 101(1): 31-39.
- [4] 周香艳, 张宁, 王旺田, 等. 流式细胞术检测4种提取沙棘核DNA方法的比较 [J]. *甘肃农业大学学报*, 2012, 47(4): 155-160.
- [5] 李贇, 石荫坪, 束怀瑞, 等. 利用流式细胞光度术鉴定苹果倍性的研究 [J]. *西北植物学报*, 1998(4): 499-503.
- [6] Dolezel J, Bartos J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size [J]. *Annals of Botany*, 2005, 95(1): 99-110.
- [7] 吴雅琴, 常瑞丰, 程和禾. 流式细胞术进行倍性分析的原理和方法 [J]. *云南农业大学学报*, 2006, 21(4): 407-409.
- [8] 王晓庆, 骆军, 施春晖, 等. 一种利用流式细胞术鉴定梨倍性的方法 [J]. *中国农学通报*, 2014, 30(31): 46-51.
- [9] 杨静, 宋勤霞, 宁军权, 等. 利用流式细胞术鉴定桑树染色体倍性的方法 [J]. *蚕业科学*, 2017(1): 8-17.
- [10] 马艳芝, 客绍英. 菘蓝四倍体株系细胞形态学和流式细胞术鉴

- 定 [J]. 中药材, 2014, 37(5): 736-740.
- [11] 于红梅, 王静, 赵密珍, 等. 利用流式细胞仪检测草莓倍性方法的优化 [J]. 南方农业学报, 2012, 43(10): 1530-1533.
- [12] 覃永华, 徐鑫, 王春台. 水稻细胞核 DNA 含量和倍性的流式细胞术测定 [J]. 中南民族大学学报: 自然科学版, 2014(1): 28-30.
- [13] 吴雅琴, 周锡明, 陈龙, 等. 利用流式细胞术鉴定甜樱桃砧木细胞核 DNA 含量和染色体倍性 [J]. 果树学报, 2014(1): 48-52.
- [14] Levin D A. Polyploidy and novelty in flowering plants [J]. American Naturalist, 1983, 122(1): 1-25.
- [15] Hawkes J G. Origins of cultivated potatoes and species relationships [M]//Bradshaw J E, Mackay G R. Potato genetics. Wallingford: CAB International, 1994: 3-42.
- [16] Ryoko M H. Diversity of potato genetic resources [J]. Breeding Science, 2015, 65(1): 26-40.
- [17] 王淑珍, 周历萍, 阮松林, 等. 适合草莓倍性鉴定的流式细胞术方法的建立 [J]. 浙江农业学报, 2014, 26(3): 638-642.
- [18] 朱明凯, 程天庆, 高湘玲, 等. 双单倍体马铃薯染色体加倍的方法 [J]. 中国马铃薯, 1987, 1(2): 1-4.
- [19] Doleel J, Greilhuber J, Suda J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry [J]. Nature Protocols, 2007, 2(9): 2233-2244.
- [20] 田新民, 周香艳, 弓娜. 流式细胞术在植物学研究中的应用—检测植物核 DNA 含量和倍性水平 [J]. 中国农学通报, 2011, 27(9): 21-27.
- [21] 朱道圩, 杨宵, 鄧玉宝, 等. 用流式细胞仪鉴定中华猕猴桃的多倍体 [J]. 植物生理学报, 2007, 43(5): 905-908.

如何喷雾种薯效果更好?

AGROLEX 新加坡利农喷雾器原装进口, 结合智慧植保方案, 更加科学, 喷雾种薯, 细致均匀、雾化好, 愈合伤口好, 病虫害防治效果更佳! 出苗快, 减少病菌侵染几率。出苗壮, 增加匍匐茎数量, 有利于优质高产! AGROLEX 新加坡利农喷雾器, 安全高效、节省成本。

Nothing in the world is as powerful as an idea coming at the right moment.

Have AGROLEX Sprayer, it always benefits you!

AGROLEX Sprayer, your successful secret code!

在需要的时候, 找到解决问题的关键至关重要。

拥有新加坡利农喷雾器, 就时刻拥有了收获的关键!

AGROLEX 新加坡利农喷雾器, 您的成功小密码!

AGROLEX AGROLEX 新加坡利农

地址: 北京市朝阳区光华路甲 8 号和乔大厦 B 座 511A

电话: (010) 65816128

传真: (010) 65816136 网址: www.agrolex.com.cn 微信号: **AGROLEXGoodlife**



更多应用技术
请扫二维码
关注新加坡利农

