

花椰菜单染色体的显微分离和 LA-PCR 扩增

李金泉^{1,2}, 周元昌¹, 吴为人¹, 夏法刚¹, 黄代青³

(¹福建农林大学作物科学学院, 福州 350002; ²湖北省农科院蔬菜科技中心, 武汉 430064; ³福建农林大学园艺学院, 福州 350002)

摘要: 以花椰菜品种‘闽花 60 天’根尖为材料, 采用微细玻璃针法随机分离了 40 多条花椰菜的单染色体, 并用 LA-PCR (linker-adaptor PCR) 对分离的单染色体进行了体外扩增, 研究了单染色体的 Sau 3A 酶切时间对 LA-PCR 扩增片段大小的影响。结果表明, 通过对单染色体的不完全酶切可以显著提高 LA-PCR 扩增片段的大小; Dot-blotting 验证的结果表明, 单染色体的扩增产物确实来自其基因组, 但 Dot-blotting 不能有效地鉴别花椰菜的 9 条染色体。

关键词: 花椰菜; 显微分离; LA-PCR; Sau 3A 酶切时间; Dot-blotting

Micro-dissection and LA-PCR Amplification of Single Chromosome in Cauliflower

LI Jin-quan^{1,2}, ZHOU Yuan-chang¹, WU Wei-ren¹, XIA Fa-gang¹, HUANG Dai-qing³

¹ College of Crop Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002;

² Centre of Horticulture Technology, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064;

³ College of Horticulture Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002)

Abstract: More than 40 single-chromosomes of the cultivar Minhua-60-day, in cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.) were randomly isolated with micro-glass-needles by means of micromanipulation. LA-PCR was carried out in isolated single chromosomes DNA. The relationship between the time of digestion with Sau 3A and the length of amplified LA-PCR fragments was also investigated. Longer fragments were obtained in case of incomplete digestion of single-chromosome with Sau 3A. The results of Dot-blotting hybridization indicated that the PCR products of single chromosome came from the genomic DNA, 40 isolated single chromosomes couldn't be divided into 9 groups with Dot-blotting.

Key words: Cauliflower; Micro-dissection; LA-PCR; Endonuclease digestion time; Dot-blotting

染色体的微分离和体外扩增技术是随着分子生物学的发展、结合了细胞遗传学和分子生物学技术而诞生的一项高新技术。该技术也是细胞遗传学和分子遗传学结合的桥梁。它能够根据研究者的需要分离任意一条染色体或区段, 并快速高效地建立相应的 DNA 文库, 进行相关的分子生物学研究。染色体显微切割技术诞生于 20 世纪 80 年代初期。欧洲分子生物学实验室 Scalenghe^[1]领导的研究小组 1981 年首次报道了应用特殊的玻璃针成功地对果蝇唾液腺染色体进行了切割和微克隆。Ludecke 等^[2]将 PCR 技术引入微切割领域, 使得该领域取得突破性进展。Sandery 等^[3]

首次将该技术应用到植物中, 近年来取得了可喜进展。已相继进行了甜菜^[4]、大麦^[5]、小麦^[6]、黑麦^[3, 7, 8]、燕麦^[9]、蝇子草^[10]、玉米^[11]、大豆^[12]、水稻^[13]和中间偃麦草^[14]等种植物的染色体显微分离、文库构建和特异性序列的克隆。其中有些微克隆文库已应用于 RFLP 分子标记遗传作图^[9]、基因组的物理作图^[15]、重要基因的定位^[4, 5]和分离^[16]、染色体进化和比较基因组^[8, 15]等研究中。

花椰菜 (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.) 是一种经济价值很高的蔬菜作物, 原产地中海沿岸, 19 世纪中叶传入中国, 现已有很多地方品种和改良种, 遗传

收稿日期: 2003-07-02

基金项目: 福建省青年科技人才创新资助项目 (2001 J048)

作者简介: 李金泉 (1972-), 湖北武汉人, 硕士, 主要从事蔬菜分子生物学研究。Tel:027-87389846; E-mail: lijinquan01@163.com, 周元昌和吴为人通讯作者。周元昌: Tel:0591-3789331; E-mail: zwy-2002@yahoo.com.cn, 吴为人: Tel:0591-3789176; E-mail: zjweiren@pub5.fz.fj.cn

资源丰富, 而花椰菜的分子连锁图谱及相关分子生物学研究则相当贫乏, 相关报道极少^[17]。本研究的目的是为花椰菜单染色体高密度分子标记连锁图谱的构建进行探索性的研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

福建花椰菜品种‘闽花 60 天’种子根尖(种子从福建省种子子公司购买); 显微分离得到的‘闽花 60 天’单染色体; ‘闽花 60 天’单染色体 LA-PCR (linker-adaptor PCR) 扩增产物。

1.2 染色体标本的制作

挑选籽粒饱满、大小一致的种子, 均匀放在铺有几层湿润滤纸的培养皿中, 于 25℃生化培养箱中萌发、生根。根长 0.5 cm 左右时, 切取根尖, 用 8-羟基喹啉(0.002 mol L⁻¹) 预处理 2 h。用蒸馏水漂洗 2~3 次, 置于卡诺氏固定液(乙醇: 冰醋酸=3:1) 中固定 10 min, 移入 70%乙醇中保存备用。制备染色体标本时, 取 8~10 个根尖在无菌蒸馏水中前低渗 30 min, 去除根冠, 切取生长区约 1 mm, 放入含 2%纤维素酶与 2%果胶酶混合液(1:1) 的 0.2 ml 离心管中, 37℃酶解 30~40 min, 小心吸去酶液, 用无菌蒸馏水小心清洗 2~3 次(后低渗), 卡宝品红染色液(0.22 μm 滤膜过滤除菌) 染色并制成细胞悬液, 吸 2 μl 于干净的载玻片上, 压片, 镜检。选取具有分散良好的中期分裂相的玻片用液氮速冻, 揭片, 气干, 立即用于显微分离染色体。

1.3 染色体的显微分离

染色体的显微分离方法参照黄代青^[18]的方法, 借助于 Leitz 拉针仪, 在微火酒精灯上将医用毛细管拉制成直径 0.5 μm 左右的闭口微细玻璃针。在 Nikon 显微操作仪上, 用粘取法随机分离花椰菜单染色体, 将粘附单染色体的玻璃针尖折断于含 10 mg ml⁻¹ 蛋白酶 K 溶液(1×T₄ DNA 连接酶缓冲液配制) 的 0.2 ml 离心管中, 高速离心数秒钟, -20℃保存备用。

1.4 Sau 3A 接头的制备

Sau 3A 连接接头是采用 23 碱基和 19 碱基的一对寡核苷酸引物(由上海生工合成, 并将 23 碱基引物磷酸化) 制备的。引物分别为 5'-GATCCTGAGCTCGAATTCGACCC-3' 和 5'-GGGTCGAATTCGAGCTCAG-3', 二者互补配对后形成四碱基限制性内切酶 Sau 3A 的一个粘性末端。接头制备的详细过程参考 Chen 等^[9]方

法。制备好的接头用紫外线照射过的无菌蒸馏水稀释至 5 g·L⁻¹, -20℃保存备用。

1.5 单染色体的 LA-PCR 体外扩增

随机分离到的花椰菜单染色体先后经过蛋白酶 K 消化、Sau 3A 酶切、Sau 3A 接头连接、LA-PCR 两轮扩增, 以上步骤参考 Albani 等^[6]的方法, 略有修改。为了获得较理想的扩增片段大小, 本研究在 Sau 3A 酶切的酶切时间上设置了梯度(分别为 0.5、2、4 h), 以期通过实现单染色体的不完全酶切, 获得较大的 LA-PCR 扩增片段。为了避免外源 DNA 的污染, 整个单染色体体外扩增操作过程均在无菌条件下进行, 并设立严格不含染色体 DNA 的阴性对照和以 10 pg 基因组 DNA 为模板的阳性对照。以上反应过程中所用的试剂购自 Promega 公司。

1.6 花椰菜基因组 DNA 提取和 Dot-blotting 杂交

花椰菜基因组 DNA 提取参照江昌俊等^[19]的方法, 并加以改进, 制备‘闽花 60 天’基因组 DNA。DNA 斑点印迹膜的手工制备、制备探针、预杂交、杂交、洗膜及压片、显影和定影, 以上过程主要参考文献 [20]、Promega 公司的 Prime-a-Gene Labeling System 使用说明书和上海冠龙牌 X-ray Film Developer、X-ray Film Fixer 的使用说明书进行, 并稍有改动。试验过程中所用的 [α -³²P] dCTP (PN103) 为北京市福瑞生物工程公司的产品, 所用的尼龙膜为 Amersham Pharmacia Limited 公司的 HybondTM-N⁺。

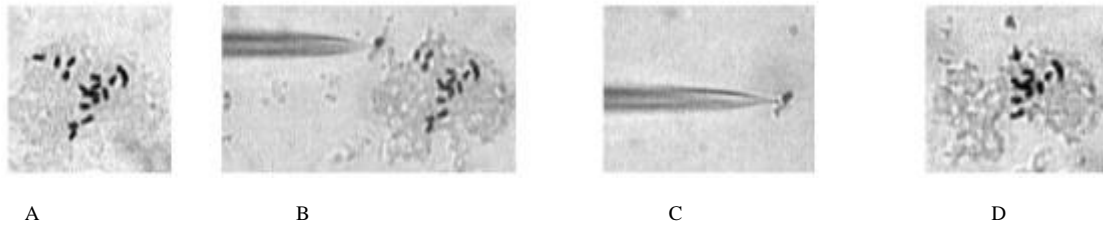
2 结果与分析

2.1 花椰菜单染色体的显微分离

笔者采用酶解和前后低渗的处理方法^[8], 较好地解决了显微分离中细胞质干扰问题, 获得了较理想的适于花椰菜染色体显微分离的标本。采用粘取法先后随机分离了 40 多条花椰菜的单染色体。图 1 显示从一个分裂相中分离出 6 条染色体的过程。

2.2 花椰菜单染色体的 LA-PCR 扩增结果

显微分离得到的花椰菜单染色体, 经过两轮 LA-PCR 扩增, 其扩增产物经过 1% 琼脂糖凝胶电泳后显示出较强的扩增信号(图 2)。图 2 中 1 为阳性对照, 是把基因组 DNA 稀释 10 000 倍, 取 2 μl(约 10 pg), 经过两轮 LA-PCR 扩增的结果, 其扩增片段大小主要分布在 0.3~2 kb 之间。图 2 中, 2、3、4、5 分别是分离的单染色体经不同时间的 Sau 3A 酶切, 经两轮 LA-PCR 扩增后的结果。酶切 0.5 h 所获得的扩增片



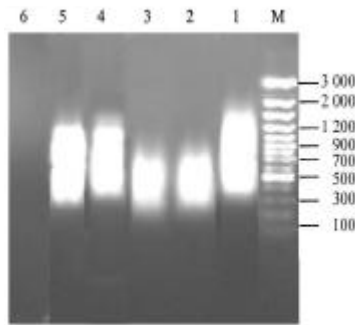
A. 显微分离前的中期分裂相; B. 正在分离的第一条染色体; C. 分离的染色体吸附在玻璃针尖上; D. 分离 6 条染色体后的分裂相

A. Metaphase chromosomes before micro-dissection; B. The first chromosome being isolated; C. The chromosome isolated adherence to the tip of glass-needle; D. Metaphase chromosomes after 6 chromosomes isolated

图 1 花椰菜染色体的分离过程 (600×)

Fig.1 Process of chromosome micro-dissection in cauliflower (600×)

段明显大于酶切 4、2 h 所获扩增片段, 可以达到 2 kb 左右, 而酶切时间为 4、2 h 时, 只能达到 1 kb 左右, 且二者没有明显区别。图 2 中 6 是阴性对照, 没有扩增出产物, 说明在试验过程没有带来外源 DNA 的污染。



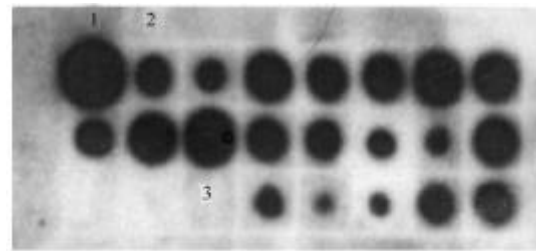
1. 酶切 0.5 h 阳性对照; 2、3. 分别酶切 4 h、2 h 的单染色体扩增产物;
4、5. 酶切 0.5 h 单染色体扩增产物; 6. 阴性对照; M. DNA marker
1. Amplification products of genomic DNA digested with Sau 3A for 0.5 h;
2, 3. Amplification products of single chromosome digested with Sau 3A for 4 h and 2 h repectively; 4, 5. Amplification products of single chromosome digested with Sau 3A for 0.5 h; 6. Negative control; M. 100 bp DNA marker

图 2 花椰菜单染色体的 LA-PCR 扩增

Fig.2 LA-PCR of single chromosome in cauliflower

2.3 花椰菜单染色体扩增产物的 Dot-blotting 杂交分析

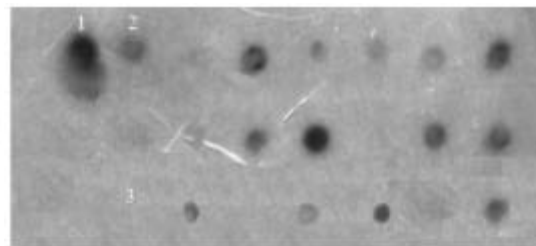
为了验证微分离染色体扩增产物的来源和对单染色体扩增产物进行分类, 本研究进行了 Dot-blotting 杂交分析。图 3、图 4 分别显示以酶切基因组 DNA 和其中 1 条单染色体的扩增产物 (即图 4 中的 2) 为探



1. 酶切基因组产物; 3. 阴性对照; 其它为单染色体的扩增产物
1. Genomic DNA digested by Eco RI; 3. Negative control; The others are amplified products of single chromosome

图 3 酶切基因组 DNA 为探针的 Dot-blotting 结果

Fig.3 Dot-blotting hybridization results using digested genomic DNA as probe



1. 酶切基因组产物; 2. 阳性对照; 3. 阴性对照; 其它为单染色体的扩增产物

1. Genomic DNA digested by EcoR I; 2. Positive control; 3. Negative control; The others are amplified products of single chromosome

图 4 以单染色体 2 的扩增产物为探针的 Dot-blotting 结果

Fig. 4 Dot-blotting hybridization results using PCR products from chromosome 2 as probe

针，与花椰菜基因组 DNA、21 条单染色体、阴性对照扩增产物的 Dot-blotting 杂交结果。当以酶切基因组 DNA 为探针时，基因组的酶切产物、单染色体的扩增产物都有明显的杂交信号，而阴性对照无杂交信号（图 3），说明单染色体的扩增产物确实来自其基因组。当以单染色体的扩增产物为探针时，在 21 条随机分离的单染色体的扩增产物中，有 11 个明显的杂交信号。

3 讨论

3.1 染色体单染色体微分离和体外扩增中的关键问题

花椰菜的细胞质很浓，在染色体制片过程中如果不能很好地去除细胞质的影响，很容易在显微分离过程中把其它染色体甚至整个细胞一并挑起，造成单染色体 DNA 的内源污染（来自细胞质 DNA 和其它非目标染色体）。本试验采用酶解和前后低渗处理方法^[8]较好地解决了花椰菜单染色体显微分离中细胞质干扰的问题（图 1）。花椰菜染色体绝对长度 2.05~3.90 μm ^[21]，根据染色体等级划分标准^[22]，都属于小染色体，因此对拉制用于染色体显微分离的微细玻璃针的质量有较高的要求。本试验采用“半自动”制针方法^[18]可以使针尖的直径达到 0.5 μm 左右，可以用于花椰菜单染色体的显微分离。

获得真实的单染色体扩增产物，是本研究的首要任务之一，而单条染色体仅含有 pg 级的 DNA 量，防止污染是研究人员面临的重要问题。因此，试验全过程中每一步操作都应在严格无菌的条件下进行外，对反应所用的各种酶（如蛋白酶 K、内切酶、Taq 聚合酶等）及各种试剂也有很高的要求，否则有可能带来杂质 DNA 的污染^[6, 23]。本研究表明，以下措施对控制污染行之有效：（1）每一步操作严格控制无菌条件；（2）所用的器具均经严格高压灭菌，最好现灭现用和操作前紫外照射，试验中所用的染色液、各种试剂（包括有些酶）经过滤除菌；（3）在一个密闭的无菌的超净工作台上进行显微分离，玻璃针现制现用，分离染色体时舍弃那些明显粘有细胞质的染色体；（4）制片时使染色体充分分散并尽量去除细胞质；（5）进行染色体体外扩增时，以单条染色体为模板；（6）选用高质量的试验试剂，本研究选用 Promega 公司的系列产品可以较好地满足试验要求。

3.2 影响 LA-PCR 扩增片段大小的因素

单染色体体外扩增的 DNA 片段大小直接关系到其应用价值。本研究设计了在单染色体连接接头之前

不同酶切时间的试验（如图 2 所示，分别设计了 Sau 3A 的酶切时间为 4、2、0.5 h），以期通过实现对单染色体的不完全酶切来达到获得大的 LA-PCR 扩增片段的目的。结果表明，Sau 3A 酶切 0.5 h 所获扩增片段基本可以达到 2 kb 左右或以上，而酶切 4、2 h 所获扩增片段明显小于 2 kb（图 2）。另外，在本研究过程中也发现，相同的 Taq 酶、内切酶浓度、酶切时间，不同单染色体的 LA-PCR 扩增片段大小也有差别较大的情况。（特别是在酶切时间为 4、2 h 的情况下，图中未显示）。黄代青^[18]采用 LA-PCR 扩增柚子、银杏的单染色体时，采用 4 h 的酶切时间，分别获得了 0.3~2 kb、0.3~3 kb 的扩增条带；Albani 等^[6]在扩增小麦‘中国春’染色体时，采用酶切时间 2 h，获得了 0.1~2 kb 的片段，其中主带范围为 0.2~0.8 kb；周弈华等^[12]在扩增大豆单染色体时采用酶切时间 2 h，获得了 0.3~3 kb 连续的 DNA 带等。到目前为止，尚未见到通过设置不同的酶切时间获得大片段单染色体扩增产物的报道。由此，可以看出不同物种、不同单染色体获得大片段的扩增产物，其适宜的酶切时间不同，可能原因是不同物种、不同单染色体的 DNA 酶切位点数目多少和分布不同。

3.3 应用 Dot-blotting 鉴别花椰菜单染色体的尝试

本研究的目的是为了构建花椰菜单染色体高密度的分子标记连锁图谱，以便于后续的基因克隆等分子生物学研究，因此染色体显微分离中目标染色体的识别或染色体的分类，是一项很有意义的工作。利用一些形态易于辨认的染色体^[24, 25]或者一些特殊的遗传材料^[3-5, 16]（如单体、三体、端体、B-染色体等）识别目标染色体将受到物种和研究条件的限制。染色体分带^[26, 27]虽然在理论上使区分每一条染色体成为可能，但实际上可使分离的染色体 DNA 受到不同程度的损伤，影响单染色体的扩增产物或所构建的文库的应用价值。本研究中做了如下试验设计，以期能够鉴别花椰菜的 9 条染色体：

以一定数量的单染色体扩增产物制成杂交膜[比如在花椰菜中取 45 条随机单染色体的扩增产物加上一些对照，这样以一定的数学概率保证这 45 条中有需要的 9 条染色体（花椰菜 $2n=18$ ）]。然后，每次取以前没有杂交信号的单染色体扩增产物标成探针，进行 Dot-blotting 杂交。理论上通过 9 次杂交可以把花椰菜的 9 条染色体区分开来。但试验结果总是只能分成杂交信号的有无两类，而杂交信号的强弱之间难有明确

的界限(如图4)。本试验中(如图4),取了21条随机分离的单染色体扩增产物点膜,当以其中1条单染色体扩增产物为探针杂交时,结果有11个有明显的杂交信号。花椰菜 $2n=18$,如果Dot-blotting能够成功地鉴定花椰菜单染色体扩增产物,这种情况从数学概率上来说是很小的。本研究中也增加了杂交膜上单染色体扩增产物的样品数,但多次试验后也只能分成有限的3~4类,而远远不能分成笔者所期待的9类,因此,这种鉴别思想在花椰菜中可能不合适。这可能跟芸薹属物种在进化过程中经历了很多的重复,并且这些重复分散在整个基因组中有关^[28, 29]。也可能跟杂交过程中的洗膜时间、点膜的样品浓度等操作有关系。

References

- [1] Scalenghe F, Turco E, Edstrom J E. Microdissection and cloning of DNA from a specific region of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. *Chromosoma*, 1981, 82:205-216.
- [2] Ludecke H J, Senger G, Claussen U. Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification. *Nature*, 1989, 338(23):348-350.
- [3] Sandery M J, Forster J, Macadam S R. Isolation of a sequence common to A- and B-chromosomes of rye (*Secale cereale*) by microcloning. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1991, 9:21-30.
- [4] Jung C, Claussen U, Horsthemke B. A DNA library from an individual *Beta patellaris* chromosome conferring nematode resistance obtained by microdissection of meiotic metaphase chromosome. *Plant Molecular Biology*, 1992, 20:503-511.
- [5] Schondelmaier J, Martin R, Jiahoor A. Microdissection and microcloning of the barley (*Hordeum vulgare* L.) chromosome 1HS. *Theoretical and Applied Genetics*, 1993, 86:629-636.
- [6] Albani D, Cote M J, Armstrong K C. PCR amplification of microdissected wheat chromosome arms in a simple "single tube" reaction. *The Plant Journal*, 1993, 4:899-903.
- [7] 周奕华, 党本元, 王槐, 胡赞民, 王兰岚, 陈正华. 黑麦 1R 染色体微克隆文库的构建与分析. *植物学报*, 1999, 41: 1 269-1 274.
Zhou Y H, Dang B Y, Wang H, Hu Z M, Wang L L, Chen Z H. Construction and characterization of the microclone library from chromosome 1R in rye. *Acta Botanica Sinica*, 1999, 41(2):1 269-1 274. (in Chinese)
- [8] 崔丽华, 胡赞民, 王兰岚, 李良材, 陈正华. 黑麦 1R 染色体的显微分离和回收. *植物学报*, 1997, 39: 697-700.
Cui L H, Hu Z M, Wang L L, Li L C, Chen Z H. Microdissection and recovery of 1R chromosome in rye(*secale cereale*). *Acta Botanica Sinica*, 1997, 39: 697-700. (in Chinese)
- [9] Chen Q, Armstrong K C. Characterization of a library from a single microdissected oat (*Avena sativa* L.) chromosome. *Genome*, 1995, 38: 706-914.
- [10] Scutt C P, Kamisugi F, Sakai, P M Gilmartin. Laser isolation of plant sex chromosomes: studies on the DNA composition of the X and Y sex chromosomes of *Silene latifolia*. *Genome*, 1997, 40: 705-715.
- [11] Stein N, Ponelies N, Musket T, McMullen M D, Weber G. Chromosome micro-dissection and region-specific libraries from pachytene chromosomes of maize (*Zea mays* L.). *The Plant Journal*, 1998, 13(2): 281-289.
- [12] 周奕华, 党本元, 胡赞民, 崔丽华, 李良材, 陈正华. 大豆单染色体的显微分离及体外扩增. *植物学报*, 1998, 40(2): 144-150.
Zhou Y H, Dang B Y, Hu Z M, Cui L H, Li L C, Chen Z H. Microdissection and PCR amplification of single soybean chromosome. *Acta Botanica Sinica*, 1998, 40(2): 144-150. (in Chinese)
- [13] 魏建华, 周奕华, 孙传清, 党本元, 胡赞民, 王向坤, 陈正华. 水稻第 12 染色体微分离及 LA-PCR 扩增. *中国农业科学*, 1998, 31(2): 14-18.
Wei J H, Zhou Y H, Sun C Q, Dang B Y, Hu Z M, Wang X K, Chen Z H. Microdissection and LA-PCR amplification of chromosome 12 of rice(*Oryza sativa* L.). *Scientia Agricultura Sinica*, 1998, 31(2): 14-18. (in Chinese)
- [14] 林志珊, 张增艳, 辛志勇, 马有志, 孔凡晶, 李连城, 王晓平. 中间偃麦草染色体臂 7Ai-1L 端体的细胞遗传学鉴定及显微分离与克隆. *中国农业科学*, 2002, 35(9): 1 049-1 054.
Lin Z S, Zhang Z Y, Xin Z Y, Ma Y Z, Kong F J, Li L C, Wang X P. Identification of ditelosome 7Ai-1L of the chromosome arm in *Thinopyrum intermedium* by cytogenetic methods and its microdissection and microcloning. *Scientia Agricultura Sinica*, 2002, 35(9): 1 049-1 054. (in Chinese)
- [15] Liu B, Segal G, Vega J M, Feldman Abbo S. Isolation and characterization of chromosome-specific DNA sequences from a chromosome arm genomic library of common wheat. *The Plant Journal*, 1997, 11: 959-965.
- [16] 田 毅, 卢一凡, 邓继先, 李 滨, 张学勇, 刘广田. 普通小麦—中间偃麦草 TAI-27 中附加染色体的显微切割及特异性探针的筛选. *中国科学*, 1999, 29(2): 174-179.
Dian C, Lu Y F, Deng J X, Li B, Zhang X Y, Liu G T. Microdissection and screening of specific probes of the alien addition chromosome in wheat *Elytrigia intermedium* TAI-27. *Science in China*, 1999, 29(2): 174-179. (in Chinese)
- [17] 卢 钢, 曹家树, 陈 杭. 芸薹属植物分子标记和基因组研究进展. *园艺学报*, 1999, 26(6): 384-390.
Lu G, Cao J S, Chen H. Progress of study on molecular markers and genome of the genus *Brassica*—a review. *Acta Horticulturae Sinica*, 1999, 26: 384-390. (in Chinese)

- [18] 黄代青. 果树单染色体及其 R 基因同源序列的分离与克隆. 博士论文. 2002. 福建农林大学园艺系.
Huang D Q. Isolation and cloning of single chromosomes and R gene analogs in fruit trees. Dissertation for Ph. D. of Department of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, 2002. (in Chinese)
- [19] 江昌俊, 陈彦. 分离芸薹属植物基因组 DNA 的一种方法. 中国油料, 1995, 17(4): 34-36.
Jiang C J, Chen Y. A method of Isolation genomic DNA from *Brassica*. *Oil Crop in China*, 1995, 17:34-36. (in Chinese)
- [20] F 奥斯伯, R E 金斯顿, D D 穆尔, G 塞德曼, J A 史密斯, K 斯特拉尔著. 颜子颖, 王海林译. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 1998: 55-68.
Ausubel F, Kingston R E, Moore D D, Seidman G, Smith J A, Struhl K. *Short Protocols in Molecular Biology*. Translated by Yan Z Y, Wang H L. Beijing: Science Press, 1998, 55-68. (in Chinese)
- [21] 利容千. 中国蔬菜植物核型研究. 武汉: 武汉大学出版社, 1989: 63-71.
Li R Q. *Karyotypes of the Plants of Vegetables in China*. Wuhan: Wuhan University Press, 1989, 63-71. (in Chinese)
- [22] 李懋学, 陈瑞阳. 关于植物核型分析的标准化问题. 武汉植物性研究, 1985, 3 (4): 297-302.
Li H X, Chen R Y. Research on standardization of karyotype analysis in plants. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 1985, 3:297-302. (in Chinese)
- [23] Ponelies N, Stein N, Weber G. Microamplification of specific chromosome sequences: an improved method for genome analysis. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(17):3 555-3 557.
- [24] Fukui K, Minezawa M, Kamisugi Y. Microdissection of plant chromosomes by argon-ion laser beam. *Theoretical and Applied Genetics*, 1992, 84: 787-791.
- [25] Pich U, Houben A, Fuchs J. Utility of DNA amplified by degenerate oligonucleotide-primed PCR (DOP-PCR) from the total genome and defined chromosomal regions of field bean. *Molecular Genetics*, 1994, 243: 173-177.
- [26] Ludecke H J, Senger G, Claussen U. Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification. *Nature*, 1989, 338(23): 348-350.
- [27] Kamisugi Y, Sakai F, Minezawa M. Recovery of dissected C-band regions in *Crepis* chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics*, 1993, 85:825-828.
- [28] Lagercrantz U, Putterili J, Coupland G. Comparative mapping in *Arabidopsis* and *Brassica*, fine scale genome collinearing and congruence of genes controlling flowering time. *The Plant Journal*, 1996, 9: 13-20.
- [29] Sadowski J, Quiros C F. Organization of an *Arabidopsis thaliana* gene cluster on chromosome 4 including the *RPS2* gene, in the *Brassica nigra* genome. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 96 (3/4): 468-474.

(责任编辑 曲来娥)

