利用流式细胞术测定昆虫基因组大小

Estimation of Insect Genome Size by Flow Cytometry

刘贵春, 常洲, 董志巍, 何金武, 赵若苹, 王文, 李学燕*

遗传资源与进化国家重点实验室, 中国科学院昆明动物研究所, 昆明

*通讯作者邮箱: lixu@mail.kiz.ac.cn

引用格式: 刘贵春, 常洲, 董志巍, 何金武, 赵若苹, 王文, 李学燕. (2021). 利用流式细胞术测定昆虫基因组大小. *Bio-101* e1010655. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010655.

How to cite: Liu, G.C., Chang, Z., Dong, Z.W., He, J.W., Zhao, R.P., Wang, W. and Li, X.Y.. (2021). **Estimation of insect genome size by flow cytometry.** *Bio-101* e1010655. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010655. (in Chinese)

摘要: 基因组大小, 指的是生物单倍体核 DNA 的总量, 或者是单拷贝染色体 DNA 的总量也称为 C 值 (C-value), 是真核生物基因组最重要的特征之一。随着技术的进步, 流式细胞术被认为是估计基因组大小最可靠、高效快捷和经济的方法。本项目以鳞翅目的蝴蝶、鞘翅目的萤火虫、竹节虫目的叶螭等昆虫为例, 利用流式细胞术测定这些昆虫的基因组大小, 将为探讨昆虫基因组大小的进化提供重要的技术手段, 同时也为高深度测序解析非模式生物基因组的成本提供重要参考。本方法的实验流程如下: 解剖待测昆虫头部获取脑组织, 研磨脑组织制成细胞核悬液, 细胞核悬液过滤去除杂质, 按比例混合细胞核悬液与内标样品, 混合液染色, 染色样品上机获取数据, 分析数据。

关键词: 基因组大小, 流式细胞术, 昆虫

研究背景: 自20世纪50年代初期C值 (生物单倍体核DNA的总量) 概念被提出以来, 越来越多物种的C值被测定, 基因组大小与物种的进化关系、基因组大小变化的原因和结果等话题引起了进化生物学领域激烈的争论 (Swift *et al.*, 1950; Gregory *et al.*, 2013)。而随着技术的发展, 基因组大小的检测技术也从原始的复性动力学估算法、脉冲凝胶电泳法、Feulgen密度测定法, 发展到如今普遍采用的流式细胞术和基于二代测序读长 (reads) 的k-mer估算法, 其中流式细胞术被认为是最可靠、高效快捷和经济的方法。这

为探讨基因组进化提供了重要的技术手段 (Gregory *et al.*, 2013)。现有研究结果揭示，昆虫基因组大小差异不仅与基因组的结构 (染色体倍性和非编码DNA的量，尤其是DNA的重复序列) 及进化过程密切相关，而且与昆虫的各种表型特征如发育的速度和发育的复杂性、生命周期策略等有很大的相关性 (Alfsnes *et al.*, 2017; Fan *et al.*, 2019)。总之，基因组大小变化即“C值之谜”还需要更多物种的数据及更多交叉学科的融合来解释。本研究利用流式细胞术测定昆虫基因组大小为探讨C值的进化模式及解析“C值之谜”提供更多的数据支持。

实验原理

碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 是一种可对DNA染色的细胞核荧光染料，不能穿透正常的活细胞膜中，但可以进入失去膜完整性的细胞内与DNA结合。被PI染色的细胞在激光照射下发射荧光，发射的荧光强度与结合的DNA含量成正比。利用流式细胞仪测定细胞的荧光强度从而可推算出细胞的DNA含量。本方法将通过流式细胞术测定昆虫的基因组大小，为理解昆虫基因组大小进化提供数据支持，也为昆虫基因组的测序及组装提供参考。

材料与试剂

1. 流式管
2. 1.5 ml 离心管
3. 20 μ m (200目) 尼龙膜 (泽浩，中国)
4. 三角纸袋
5. 肝素抗凝采血管
6. 待测昆虫活体 (如柑橘凤蝶、萤火虫、叶螽等)
7. 内标样品 (如黑腹果蝇、鸡血等)
8. PBS磷酸缓冲盐溶液 (2 mM KH_2PO_4 、8 mM Na_2HPO_4 、136 mM NaCl、2.6 mM KCL、pH 7.4)
9. Galbraith's buffer (45 mM MgCl_2 、30 mM sodium citrate、20 mM MOPS、0.1% (w/v) TritonX-100、pH 7.0)
10. 碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI)

仪器设备

1. 解剖剪
2. 尖头镊子
3. 35 mm培养皿
4. Pellet pestles (Sigma, catalog number: Z359998-1EA)
5. BD Fortessa流式分析仪器 (BD, model: LSR Fortessa)
6. 显微镜 (Nikon, model: SMZ 745)
7. 离心机 (Eppendorf Centrifuge, model: 5810 R)

数据分析软件

1. FlowJo v7.6
2. Excel

实验步骤

1. 内部标准品的选择及细胞核悬液的制备

- 1) 内部标准品的选择：先对待测样品的基因组大小进行估计，可通过查找待测昆虫近缘类群 (同属、同科、同目) 是否有基因组大小的报道 (Gregory, 2020), 从而预估待测物种的基因组大小。根据预估值，选取与待测物种相差3-5倍左右的已有参考基因组的物种作为内部标准品 (如待测样品预估的基因组大小为500 Mb, 可以选取果蝇 (0.18 pg) 或者鸡血细胞 (1.25 pg) 作为对照)。为避免非线性误差，理想的内标应该选用与待测物种基因组大小相近，但又能够相互区分、遗传稳定、基因组大小数据可靠且容易获得足够样品的物种。
- 2) 标准样品细胞核悬液的制备：以黑腹果蝇作为内部标准品，用CO₂气体使黑腹果蝇昏迷，取15只果蝇置于加有200 μ l Galbraith's buffer (Galbraith *et al.*, 1983) 的带凹槽的载玻片上，在显微镜下，用镊子取下头部组织放入装有60 μ l预冷Galbraith's buffer的1.5 ml离心管中混合研磨，加入预冷的Galbraith's buffer 940 μ l，利用20 μ m尼龙膜过滤两次果蝇细胞核悬液，制成果蝇细胞核悬液。以鸡血细胞作为内部标准品，采集新鲜的肝素抗凝血1 ml，加10 ml生理盐水稀释，4 $^{\circ}$ C、239 rcf离心5 min，弃上清，重复该步骤两次。最后用1 ml生理盐水悬浮制成纯

净的红细胞，再按1:100的比例将鸡红细胞加入Galbraith's buffer中，制成鸡血细胞核悬液。

2. 待测样品细胞核悬液的制备

1) 样品清洗和解剖：以蝴蝶等鳞翅目昆虫为例 (Liu *et al.*, 2020)，去除活体蝴蝶成虫的翅膀，翅存于三角纸袋可作为凭证材料，用剪刀剪下头部置于PBS缓冲液中清洗 (图1A)。在显微镜下用镊子去除触角口器 (图1B)，之后沿口器基部撕开头部表皮 (图1C)，可以看到乳白色的脑 (不同物种昆虫脑形态大致相同，但颜色可能不相同)，用镊子轻轻取出脑 (图1D)。以萤火虫等鞘翅目昆虫为例 (Liu *et al.*, 2017)，直接用剪刀剪下活体萤火虫的整个头部，置于PBS缓冲液中清洗，清洗干净后将其转移到新的培养皿中。从切口部分沿着背面两眼中线位置撕开，可见乳白色脑组织，用镊子将周围的肌肉组织剔除，将脑组织取出。以叶螭等竹节虫目昆虫为例，直接用剪刀剪下活体叶螭的整个头部，置于PBS缓冲液中清洗，清洗干净后将其转移到新的培养皿中。叶螭头部较硬，可用剪刀将两侧剪开，将整个头部暴露，用PBS冲洗干净体液等污物，就能看到乳白色半透明的脑组织。

2) 制作细胞核悬液

将获取的待测样品的脑部组织快速放入加有60 μ l预冷的Galbraith's buffer的1.5 ml离心管中，用组织研磨机研磨充分，获得细胞核悬浮液，然后加入预冷的Galbraith's buffer 340 μ l，得到400 μ l待测样品细胞核悬液。

3. 过滤细胞碎片或组织碎片

利用20 μ m尼龙膜过滤两次细胞核悬液。

4. 待测样品与内标样品的混合及染色

将过滤后的待测样品细胞核悬液与内标样品细胞核悬液按10:1比例混合，加入碘化丙啶 (PI) 至终浓度50 ppm，放置4 $^{\circ}$ C的黑暗环境中染色30 min。内标样品与待测样品均需要单独制备一管样品，已确定两个样品的相对荧光位置。

5. 流式细胞仪检测

使用LSR Fortessa检测已染色的样品，在561 nm激发光下，检测内标样品和待测样品的2C核的相对荧光信号，统计平均荧光峰值。每个样品至少收集10,000个细胞核荧光信号，变异系数 (coefficient of variation, CV) 控制在5%以内。为了确保基因组

大小估计的准确性和统计学意义，每个物种至少检测4个个体（即4个生物学重复）。

6. 基因组大小计算

获得的数据用FlowJo v7.6分析软件进行处理，用细胞周期界面进行分析，通过比较待测样品的2C平均峰值与内标样品的2C平均峰值的比率来估算待测样品的基因组大小。基因组大小估算公式：待测样品C值 = 内标样品C值 × 待测样品mean值/内标样品mean值。以果蝇为对照测蝴蝶基因组C值（图2）为例： $X_c = \text{黑腹果蝇样品C值} \times G2 \text{ mean}/G1 \text{ mean}$ ，其中 X_c ：待测蝴蝶样品C值、黑腹果蝇样品C值 = 0.18 pg、G2 mean：待测蝴蝶样品mean值、G1 mean：果蝇mean值。依据图2的PI荧光直方图，可以计算出待测蝴蝶样品C值：0.36 pg ($X_c = 0.18 \times 106/53$)，待测蝴蝶样品基因组大小为352 Mb ($978 \text{ Mb} \times \text{C值}$)。以鸡血细胞为对照测竹节虫样品基因组C值（图3）为例： $X_c = \text{鸡血细胞C值} \times G2 \text{ mean}/G1 \text{ mean}$ ，其中 X_c ：待测竹节虫样品C值、鸡血细胞C值 = 1.25 pg、G2 mean：待测竹节虫样品mean值、G1 mean：鸡血细胞mean值。依据图3的PI荧光直方图，可以计算出待测竹节虫样品C值：10.6 pg ($X_c = 1.25 \times 543/64$)，待测竹节虫样品基因组大小为10.37 Gb ($978 \text{ Mb} \times \text{C值}$)。

图1. 蝴蝶脑组织解剖图。 (A) 剪下蝴蝶整个头部； (B) 去除触角及口器； (C) 用钳子沿口器基部撕开头部，红框标记为脑组织； (D) 脑部组织。标尺为500 μm。

图2. 果蝇样品与待测蝴蝶流式细胞仪检测的DNA含量荧光峰图。(A) 通过FSC/SSC 收集10,000个黑腹果蝇细胞；(B) 黑腹果蝇样品的PI荧光直方图；(C) 通过FSC/SSC收集10,000待测蝴蝶样品的细胞；(D) 待测蝴蝶样品的PI荧光直方图；(E) 通过FSC/SSC收集10,000个黑腹果蝇和待测蝴蝶样品的细胞；(F) 黑腹果蝇样品和待测蝴蝶样品的PI荧光直方图。

图3. 鸡血细胞与待测竹节虫样品流式细胞仪检测的DNA含量荧光峰图。(A) 通过FSC/SSC 收集10,000个鸡血细胞；(B) 鸡血细胞样品的PI荧光直方图；(C) 通过FSC/SSC收集10,000待测竹节虫样品的细胞；(D) 待测竹节虫样品的PI荧光直方图；(E) 通过FSC/SSC收集10,000个鸡血细胞和待测竹节虫样品的细胞；(F) 鸡血细胞和待测竹节虫样品的PI荧光直方图。

试剂的配制

1 L Galbraith's buffer的配制：分别取4.26 g MgCl_2 、8.84 g sodium citrate; 4.2 g 4-morpholinepropane sulfonate (MOPS), 1 ml TritonX-100到含有800 ml无菌水的容量瓶中，待试剂全部溶解后调节pH到7.0，最后定容至1 L，120 °C高压灭菌2 h后保存4 °C备用。

致谢

感谢国家自然科学基金委员会面上项目 (31472035、32070482)、云南省科学技术厅面上项目 (2014FB179)、中国科学院西部之光项目 (A类) 对中国科学院昆明动物研究所遗传资源与进化国家重点实验室的支持。

参考文献

1. Swift, H. H. (1950). [The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei.](#) *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 36(11): 643-654.
2. Gregory, T. R., Nathwani, P., Bonnett, T. R., Huber, D. and Bainard, J (2013). [Sizing up arthropod genomes: an evaluation of the impact of environmen.](#) *Genome* 56(9): 505-510.
3. Alfsnes, K., Leinaas, H.P. and Hessen, D.O. (2017). [Genome size in arthropods: different roles of phylogeny, habitat and life history in insects and crustaceans.](#) *Ecol Evol* 7(15): 5939-5947.
4. Fan, Q., Baack, E.J., Whitney, K.D., Dan, G.B., Tetreault, H.M., Rieseberg, L.H. and Ungerer, M.C. (2019). [Phylogenetic trends and environmental correlates of nuclear genome size variation in helianthus sunflowers.](#) *New Phytol* 221(3): 1609-1618.
5. Galbraith, D. W., Harkins, K. R., Maddox, J. M., Ayres, N. M., Sharma, D. P. and Firoozabady, E. (1983). [Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues.](#) *Science* 220(4601): 1049-1051.
6. Gregory, T. R. (2020). Animal Genome Size Database. <http://www.genomesize.com>.
7. Liu, G.C., Chang, Z., Chen, L., He, J.W., Dong, Z.W., Yang, J., Lu, S.H., Zhao,

R.P., Wan, W.T., Ma, G.L., Li, J., Zhang, R., Wang, W. and Li, X.Y. (2020). [Genome size variation in butterflies \(Insecta, Lepidoptera, Papilionoidea\): a thorough phylogenetic comparison](#). *Syst Entomol* 45(3): 571-582.