

已成为基因定位的常规而必不可少的手段。在人类基因组的研究中更是越用越多, 现在已发展到这样的情况, 每发表一个 DNA 片段的研究结果或每报道一个基因, 就有一张相应的 FISH 图。1993 年, 在人类基因组研究神户会议上, 有人提出, 要用 24 种不同的颜色来标记 24 条不同的染色体。随着应用的广泛, FISH 也在不断得到发展。人类基因组研究新的五年计划中提出要完全人类基因组分辨率为 100kb 的 STS (sequence tagged sites) 图, 对于完整基因组将需要 30000 个 STS。到目前为止我们还只有 1500 多个, 也就是说还缺少 95% 新的 STS。每个新的 STS 都需要定位数据, 这些数据都需要用 FISH 来完成。

参 考 文 献

- Gall J G, Pardue M L. Proc Natl Acad Sci USA, 1969; **63**: 378
- Gerhard D S, Kawasaki E S, Carter Bancroft F *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1981; **78**: 3755
- Harper M E, Ullrich A, Saunders G R. Proc Natl Acad Sci USA, 1981; **78**: 4458
- Trask B. TIG, 1991; **7** (5): 149
- Korenberg J R, Yang-Feng T, Schreck R. TIBTECH, 1992; **10**: 27
- Landegent J E, N. Jansen in de Wal N, van Ommen G J B *et al.* Nature, 1985; **317** (12): 175
- Landegent J E, Jansen in de Wal N, Dirks R W *et al.* Hum Genet, 1987; **77**: 366
- Fan S S, Sasi R, Lee C *et al.* Genomics, 1992; **14**: 542
- Lichter P, Tang C C, Call K *et al.* Science, 1990; **247**: 64
- Trask B, Mass H, Kenwick S *et al.* Am J Genet, 1991; **48**: 1
- Montanaro V, Casamassimi A, D' Urso M *et al.* Am J Genet, 1991; **48**: 183
- Selleri L, Eubanks J H, Giovannini M *et al.* Genomics, 1992; **14**: 536
- Parra I, Windle B. Nature genetics, 1993; **5**: 17
- Lawrence J B, Villave C A, Singer R H *et al.* Cell, 1988; **52**: 51
- Lawrence J B, Singer R H. Nucleic Acids Research, 1985; **13** (5): 1777
- Callen D F, Mulley J C, Baker E G. Hum Genet, 1987; **77**: 236

FISH and its Application in Human Genome Research. Wu Xuejun, Chai Jianhua (*Fudan University, Shanghai 200433, China*).

Abstract FISH is a new technique which is used to localize a specific sequence on chromosome. It has been widely used in the research of human genome project. With FISH, a SCP, a cosmid or a YAC can be localized on the metaphase chromosome; and a chimeric YAC can also be identified. Gene mapping can be done at the resolution of 50 kb with FISH on the interphase nuclei. Now FISH of a gene on the stretched chromatic fibre can be done, the length of the gene can directly be measured and the gene can be localized at high resolution. In a word, FISH is playing a more and more important part in the human genome research.

Key words FISH, human genome research, chromosome localization, gene mapping.

定位克隆中寻找新基因的方法

张建之 柴建华

(复旦大学遗传学研究所, 上海 200433)

摘要 在克隆人类遗传病致病基因的过程中, 寻找染色体特定区段的转录序列成为主要的限速步骤。早期的努力集中在筛选 cDNA 文库, 找寻进化上保守的 DNA 序列, 以及 Northern 杂交。最近几年, 在

人类基因组计划的推动下,发展了数种有效的寻找基因的新方法.这些方法不但扩展了寻找新基因的染色体区段,而且能在不依赖基因表达的情况下进行筛选.文中综述新旧几种寻找基因的方法,并讨论它们各自的优点与局限.

关键词 新基因的识别,定位克隆,人类基因组

目前大多数人类遗传病靠连锁分析和定位克隆来研究.在研究过程中一个最主要的限速步骤是寻找染色体特定区域的表达序列.所以设计寻找并克隆这些序列的有效方法对于分离疾病的候选基因就显得异常重要.当这些方法运用于较大的区段(如细胞遗传学上的带或染色体的一臂)时就能在连锁分析尚不完善的前提下找到遗传病的候选基因.当人类染色体的物理图完成之后这些方法就会更加重要.

根据染色体上的位置分离人类基因的想法始于70年代,由于以下三个方面的进展——RFLP的应用,分离特异染色体上的DNA片段,遗传图和物理图谱促成了这一方法.寻找染色体或区域特异的基因的尝试最早在1986年^[1].当时从只含人21号染色体的杂种细胞株构建了cDNA文库,以人基因组特有的重复序列Alu作探针筛选到3个克隆.最早使用已克隆的未知DNA来寻找基因的方法是“动物园杂交”(“zoo blot”),它可用于较保守基因的克隆.在这些早期工作的基础上发展了大量的技术,本文即介绍这些方法并评述它们的优缺点.

目前人类基因组计划正花大量的财力和人力于YAC重叠群的构建,许多规模不大的研究组则希望构建可能包含致病基因或有生物学兴趣的染色体区段的YAC重叠群.正因为YAC重叠群是提供染色体上大范围DNA的极佳材料,所以发展一种寻找特定YAC中的基因的有效方法就变得异常重要.这一领域已有大量的尝试,并且有了一些方法.

有些时候需要在染色体上一段尚未克隆的区域内寻找基因.一些直接从这些区域筛选cDNA的方法也已经建立,筛选到的cDNA反过来可以筛选YAC克隆,从而构建我们感兴趣区域的基因周围的物理图.

1 用已克隆的DNA的方法

1.1 依赖表达的方法

许多方法是用已克隆的DNA探针从cDNA文库中筛选克隆,也可用Northern杂交筛选mRNA.所有这些方法都有一个要求,即所要筛选的基因在构建cDNA文库的组织或提取mRNA的组织中是表达的.

1.1.1 用复杂探针筛选cDNA文库 YAC中的插入片段可直接标记用来筛选cDNA文库^[2].这一方法免除了将YAC亚克隆的过程,并且一次筛选就能找到多个转录序列.它的缺点是:a.分离并提纯足够的YAC DNA并不容易.b.标记时间很长(不少于16h).c.由于探针很复杂,含有重复序列,所以会造成杂交信号弱,背景强,假阳性等.d.插入片段很短的cDNA克隆或文库中含量低的克隆可能筛选不到,当然标准化(normalized)的cDNA文库可克服后者的障碍.

1.1.2 Northern杂交法 已克隆的基因组DNA与总mRNA作Northern杂交的优缺点和与cDNA杂交相似,关键在于提取mRNA的组织中必须转录足够的mRNA.YAC的插入片段太复杂以致很难可靠地在Northern杂交中检出特异的mRNA.然而COS质粒(cosmid)DNA和噬菌体DNA是可行的^[3].所以将YAC亚克隆到COS质粒或噬菌体中看来是必须的.能检出mRNA的亚克隆再与cDNA文库杂交,显然要比直接用YAC作探针有效得多.当然亚克隆,以及每个亚克隆与mRNA作Northern杂交是颇费力的,尤其当YAC插入片段很大时.

1.1.3 杂交选择法 最近发展的3种杂交选择法克服了上述方法的局限.这3种方法都要用到PCR,加上用大片段基因组DNA与

cDNA 文库杂交。

第一种策略^[4]是将目标 DNA (纯化的 YAC 或 COS 质粒 DNA) 转移到尼龙膜上, 然后用第 15 号染色体基因组 DNA, 基因组重复序列 DNA, rDNA, poly (dI) -poly (dC) 以及酵母 DNA 来封闭目标 DNA 中的重复序列。一个用随机 6 聚物引物构建的 cDNA 文库与目标 DNA 杂交。非特异杂交的 DNA 分子被洗去后, 特异的 cDNA 经一系列巢式 (nested) PCR (使用内外几对引物以增加扩增的特异性) 扩增。这样经 2 次选择后, 特异的 cDNA 被浓缩了 7000 倍。

第二种策略^[5]与第一种的主要区别在两个方面。a. 重复序列的封闭是在 cDNA 中进行, 使用的是经超声打断的人基因组总 DNA, 酵母 DNA, pBR322DNA。b. 只用一对引物进行 PCR 扩增。这个方法的效果与前者类似 (每次选择浓缩 800—2000 倍) (见图 1)。

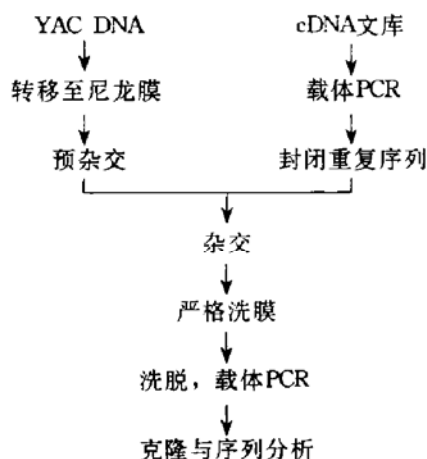


图 1 杂交选择法示意图

第三种策略^[6]的不同在于杂交是在液相中进行的。经 PCR 扩增的 cDNA 插入片段与结合有生物素的 COS 质粒 DNA 杂交, 表面带有 streptavidin 的小磁珠用来结合目标 DNA, 从而除去非特异 cDNA, 然后洗脱并用 PCR 扩增。

这些杂交选择法比直接从 cDNA 文库筛选有以下几个优点: a. 耗时少; b. 内含子及剪接位点无影响; c. 能筛到转录水平极低的基

因 (在百万 cDNA 中找到一个^[6]); d. 能找出其他物种不具有的基因, 因为这种方法不依赖基因的种间同源性; e. CpG 岛的存在与否无影响; f. 目标 DNA 的大小无影响, 所以 YAC 不必亚克隆。

正如已经指出的, 所有上述方法的内在局限是要有一个可靠的 cDNA 文库 (包含有兴趣区域的转录子), 这也可用几个 cDNA 文库混合来解决。最终要确定阳性克隆尚需用选出的 cDNA 与目标 YAC 或 COS 质粒杂交, 或者用标记的 YAC DNA 与浓缩的 cDNA 文库杂交, 但后者仍存在低信号与高背景的问题。

1.2 不依赖于表达的方法

在初步的找寻阶段, 不要求基因表达的方法自然有其优越性, 因为它不需要某一特定发育阶段特定组织来源的 cDNA 文库。但一旦找到了可能的编码序列, 表达仍需得到确认 (或通过 Northern 杂交, 或分离 cDNA 克隆)。但这只要研究基本肯定含外显子的较小的片段就行了。

1.2.1 跨种序列同源性 跨种序列同源性法^[7]在寻找潜在的编码序列方面有非常成功的先例。基于种间的编码序列同源性大大高于非编码区, 用一段候选 DNA 与多个物种的 DNA 杂交, 检测杂交信号是否跨越了种 (或目, 门) 的界线, 一个可与别种 DNA 杂交的克隆通常含有编码序列。因为这个方法只要用基因组 DNA, 所以不依赖于表达。但是作为一种寻找一定区域内所有表达序列的通用方法, 它有几个明显的缺点: 首先, 大片段 DNA 需亚克隆, 每个亚克隆都要作“动物园杂交”, 当 DNA 片段很大时这就成为非常麻烦的事。其次, 这个方法不能找到种间同源性不高的基因。

1.2.2 寻找 CpG 岛 最近几年寻找 CpG 岛的方法已广为应用。由于非甲基化的小 CpG 岛常常与表达序列相联系, 而 CpG 岛又能被某些稀切点酶检出, 所以这一方法可快速寻找大片段 DNA 中的基因。CpG 岛两侧的 DNA 序列可作为探针筛选 cDNA 文库或作 Northern 杂交。此方法也能检出在“动物园杂交”法

中无法检出的不保守基因. 它唯一的缺点是必须用脉冲电泳来分析酶切结果, 并且 CpG 岛两侧的 DNA 顺序需要进一步克隆. Patel 等^[8]设计了一种新的克服这些缺点的方法, 它是将大片段 DNA 用 Not I 酶切, 然后接上一个接头, 以 Alu 序列和接头序列为引物进行 PCR 扩增, PCR 产物克隆进载体.

由于并非所有基因都在 CpG 岛附近, 所以这一方法不能找到所有的基因. 通过这个方法找到的基因还要进一步确认它是否表达.

1.2.3 外显子捕捉法 最早的直接从已克隆的基因组 DNA 中找到外显子的方法是 Duyk

等^[9]设计的. 策略是: 用鸟枪法将基因组 DNA 克隆进含有剪接供体位点的捕捉载体, 进一步的操作 (包括转染入哺乳动物细胞) 使得含有剪接受体位点的克隆被识别. 这一系列操作需要多步克隆, 颇耗时间和劳力.

Buckler 等^[10]设计的方法 (外显子扩增) 要简单得多. 它要求插入片段中同时包含剪接供体和受体位点. 这一载体容量很大, 可以寻找大片段 DNA 中的外显子. 从理论上说外显子捕捉法可以找到一定区域内所有的内部外显子, 而与是否转录无关. 这一方法已有很成功的例子 (见表 1).

表 1 定位克隆法克隆的人类疾病基因及找到基因的方法

疾病名	克隆时间/年	染色体	方 法
慢性肉芽瘤病	1986	X	筛选富集的 cDNA 文库
杜氏肌营养不良	1986	X	动物园杂交与 cDNA 筛选
视网膜细胞瘤	1986	13	动物园杂交与 cDNA 筛选
囊性纤维变	1989	7	动物园杂交与 cDNA 筛选
维尔姆氏 (Wilm's) 瘤	1990	11	动物园杂交与 cDNA 筛选
神经纤维瘤 I 型	1990	17	动物园杂交与 cDNA 筛选
睾丸决定因子	1990	Y	"Noah's Ark" 杂交, 序列分析
无脉络膜	1990	X	动物园杂交与 cDNA 筛选
脆性 X 综合症	1991	X	直接 cDNA 筛选
多发性腺样肠息肉	1991	5	直接 cDNA 筛选, SSCP 分析; 动物园杂交, 序列分析及 cDNA 筛选
无虹膜	1991	11	动物园杂交, CpG 岛, cDNA 筛选
凯尔蒙 (Kallmann) 综合症	1991	X	直接序列分析与直接 cDNA 筛选
强直性肌营养不良	1992	19	三核苷酸重复, 直接 cDNA
诺里 (Norrie) 病	1992	X	直接 cDNA 筛选
洛氏 (Lowe) 综合症	1992	X	直接 cDNA 筛选
蒙科斯 (Menkes) 病	1993	X	外显子捕捉与直接 cDNA 筛选
X 连锁的丙种球蛋白缺乏	1993	X	几种方法
甘油激酶缺乏	1993	X	EST 与外显子扩增
肾腺白质营养不良	1993	X	动物园杂交, CpG 岛, 计算机分析
神经纤维瘤 I 型	1993	22	外显子扩增
亨丁顿氏病	1993	4	外显子扩增, 三核苷酸重复
FRAKE 智力障碍	1993	X	CpG 岛, 三核苷酸重复
脊髓小脑共济失调 I 型	1993	6	动物园杂交, 三核苷酸重复

1.2.4 筛选剪接位点 Melmer 与 Buchwald^[11]发展了一种用剪接位点一致序列作探针来寻找基因的方法. 随机的 COS 质粒克隆 DNA 或噬菌体克隆 DNA 酶解后转移到膜上, 然后用 4096 种简并的 15 聚寡核苷酸与 256 种

简并的 9 聚寡核苷酸检测 3' 剪接位点. 用 128 种简并的 10 聚寡核苷酸检测 5' 剪接位点. 9 聚寡核苷酸可检出 40% 的 3' 位点, 10 聚寡核苷酸可检出 18% 的 5' 位点. 这些探针经同位素标记后与膜杂交, 在 1/4—1/3 的克隆中能

得到杂交信号. 10 个杂交阳性的 COS 质粒克隆又用来进行跨种序列同源性分析, 结果 10 个都显示高度同源性.

这一方法的优点在于数个克隆可同时分析. 尽管这些探针不能检出所有的剪接位点, 但同时使用 5' 和 3' 寡核苷酸序列提高了检出的概率, 因为只要有一个位点杂交阳性就得到阳性结果. 阳性克隆在亚克隆以后可进行 Northern 杂交, 序列分析, 筛选 cDNA 文库等进一步研究.

1.3 基于 DNA 序列的方法

可以用计算机从人基因组 DNA 序列数据库中找出表达序列. 过去通过比较种间的 DNA 序列同源性来确定表达序列, 但更可行的方法是神经网络识别法 (neural net recognition)^[12].

这个方法的局限性在于需要大量的 DNA 序列资料.

2 用未克隆的 DNA 的方法

2.1 减数 cDNA 杂交法

Jone 等^[13]发展了一种直接运用于 cDNA 的减数杂交法, 可以分离在一种细胞中表达而在另一种细胞中不表达的编码序列. 这一方法要求一个细胞株含我们感兴趣的染色体区段, 另一细胞株则含有除这段染色体以外第一细胞株中有的所有人 DNA, 我们可以从一个含有一条完整的人染色体的杂种细胞株减去只含部分这条染色体的另一细胞株来研究缺失区的基因.

运用这个系统曾在含 TSE1 基因的 2—4 百万个碱基的区域内找到了 9 个新的 cDNA. 看来这个系统还是很有效的, 但转录不活跃的基因是检不到的. 这个方法最大的好处是可用于未克隆的 DNA. 它的扩展可用于 YAC, 一个 YAC 或 YAC 重叠群转入哺乳动物后减去宿主细胞就能得到这个 YAC 或 YAC 重叠群的减数 cDNA 库.

2.2 一致序列克隆

这是用 PCR 从部分重叠的 DNA 片段中

扩增共有序列的方法^[14]. 当其中之一是 cDNA 库时, 这一技术就可以杂交细胞株中特异扩增人 cDNA. 这一方法也可用于已克隆的 DNA, 如 YAC. 具体作法是: 一个来源的 DNA 经双酶切后克隆 λ M13, 产生单链 DNA, “捕捉”寡核苷酸与这些单链 DNA 退火. 另一来源的 DNA 也用同样的酶作双酶切并用碱变性, 这两部分 DNA 一起退火. 只有双方的共有序列才能形成双链, 同时两端有“捕捉”寡核苷酸. 这样就可以用 PCR 放大. 这一技术能从复杂的 DNA 来源中找到基因, 如用杂种细胞株或 YAC 能产生染色体或染色体区段特异的 cDNA 文库.

2.3 杂种细胞株/hnRNA 方法

已发展了 3 种方法用杂种细胞株中的人类基因的 hnRNA (核不均一 RNA) 来寻找基因. 第一种方法^[15]用与剪接供体位点序列一致的简并的 6 聚寡核苷酸引导 hnRNA 合成 cDNA. 这包括未经剪接的 RNA 以及紧靠引物结合位点 5' 的外显子. 这个很大的 cDNA 文库与人总 DNA 杂交可以检出人的转录序列.

第二种方法^[16]与第一种类似, 只不过使用随机 6 聚寡核苷酸引物. Ellison^[16]用这一方法从失活 X 染色体上发现了 3 个新基因.

第三种方法^[17]基于人基因的内含子和 3' 不翻译区存在 Alu 序列, 因而可以以总 RNA 为模板用 Alu 引导 cDNA 合成. 这些合成的 cDNA 绝大多数是来源于人的, 所以不必建很大的库. 用这一方法从只含人 Xq24-qter 的细胞株 hnRNA 得到一个含 100 个克隆的库, 其中 80% 的克隆在 Xq24-qter. 这一方法可得到在杂种细胞株中表达的人染色体特定区段的基因.

2.4 微切割与微克隆

上述几种不依赖于 DNA 克隆的方法都有一个缺点, 就是需要包含特定染色体或染色体区带的杂种细胞株. 要得到这些细胞株并不方便, 有时甚至非常困难. 微切割与微克隆则避过了这一难关. 唯一的要求是知道我们感兴趣

的基因在染色体上的位置. Ludecke^[18]在分带的染色体上进行微切割后, 将 DNA 连接入载体, 用 PCR 扩增以后再克隆到质粒中. 这一方法能得到感兴趣区段的上千个克隆. Yu 等从 200 个微克隆中发现了 2 个表达序列.

3 整个基因组的搜寻

最近, 大量的努力集中于人脑 cDNA 文库中随机 cDNA 的部分测序. 这些序列被称为表达序列标志 (EST, expressed sequence-tag). 至今已有 2 万多个新 cDNA 被测序, 现在正集中力量进行这些 EST 的染色体定位, 估计每条染色体平均不少于 100 个新 EST. EST 除了可作为位标进行物理作图之外, 还能克隆产生它的基因. EST 还能作为遗传病的候选基因. 当足够多的 EST 覆盖了每条染色体后, 候选基因法将逐步代替定位克隆法.

4 总结与展望

本文介绍的所有方法都曾用来克隆染色体特定区域的基因. 经典的方法 (如直接筛选 cDNA 文库, 跨种序列同源性法等) 曾有过不错的战绩, 而新发展的方法使基因找寻的工作扩大到更大的染色体区段. 如 Morgan 等^[19]用改进的直接筛选法从含白细胞介素 4 和 5 基因的 425kb 的 YAC 中分离到 9 个 cDNA. Vetrie 等^[20]用类似的方法找到了两种 X 连锁的丙种球蛋白缺乏症基因.

有了这么多方法, 看来只要花足够的时间, 任何定位克隆都会成功的. 如亨丁顿氏病的基因经 10 年努力终于被分离到了. 多种方法并用也是一个可行的策略. 譬如对富含基因的 MHC 区域就已有几种方法的研究. 相信在人类基因组计划的实施过程中还会涌现更快捷有效的方法, 这样就能在不依赖序列分析和基因表达的前提下得到染色体上所有基因的位置, 这将大大加速疾病基因的分离和生命奥秘的探索, 当然这仍需相当的时间与技术革新.

参 考 文 献

1 Neve R L, Stewart G D, Newcomb P *et al.* *Gene*, 1986;

49: 361—369

- 2 Elvin P, Slynn G, Black D *et al.* *Nucleic Acids Res.*, 1990; **18**: 3913
- 3 Rommens J M, Iannuzzi M C, Kerem B S *et al.* *Science*, 1989; **245**: 1059
- 4 Parimoo S, Patanjali S R, Shukla H *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; **88**: 9623
- 5 Lovett M, Kere J, Hilton L M. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; **88**: 9628
- 6 Korn B, Sedlacek Z, Manca A *et al.* *Hum Mol Genet.*, 1992; **1**: 235
- 7 Call K M, Glaser T, Ito C Y *et al.* *Cell*, 1987; **51**: 1051
- 8 Patel K, Cox R, Shipley J *et al.* *Nucleic Acids Res.*, 1991; **19**: 4371
- 9 Duyk G M, Kim S, Myers R M *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; **87**: 8995
- 10 Buckler A J, Chang D D, Graw S L *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; **88**: 4005
- 11 Melmer G, Buchwald M. *Hum Mol Genet.*, 1992; **1**: 435
- 12 Uberbacher E C, Mural R J. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; **88**: 11261
- 13 Jones K W, Shaperro M H, Chevrette M *et al.* *Cell*, 1991; **66**: 861
- 14 Brookes A J, Porteous D J. *Nucleic Acids Res.*, 1991; **19**: 2609
- 15 Liu P, Legerski R, Siciliano M J. *Science*, 1989; **246**: 813
- 16 Ellison J, Passage M, Yu L-C *et al.* *Somat Cell Mol Genet.*, 1992; **18**: 259
- 17 Corbo L, Maley J A, Nelson D L *et al.* *Science*, 1990; **249**: 652
- 18 Ludecke H-J, Senger G, Claussen U *et al.* *Nature*, 1989; **338**: 348
- 19 Morgan J G, Dolganov G M, Robbins S E *et al.* *Nucleic Acids Res.*, 1992; **20**: 5173
- 20 Vetrie D, Vorechovsky I, Sideras P *et al.* *Nature*, 1993; **361**: 226

Methods for Finding New Genes in Positional Cloning. Zhang Jianzhi, Chai Jianhua (*Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433, China*).

Abstract Finding transcribed sequences from specific genomic regions has been a major rate-limiting step in cloning genes involved in human genetic diseases. Early efforts was focused on screening of cDNA library, looking for evolutionarily conserved DNA sequences, and northern blot hybridization. In recent years, some new and effective methods have been developed by the Human Genome Pro-

ject. These methods can not only detect genes regardless of their expression patterns, but also expand the size of the genomic region capable of being scanned for genes. Several new and old methods for were reviewed finding

new genes in positional cloning and discuss the advantages and limitations of them.

Key words new genes identification, positional cloning, human genome

构建重组杆状病毒的几种新方法

施先宗 陈曲侯

(华中师范大学昆虫学研究所, 武汉 430070)

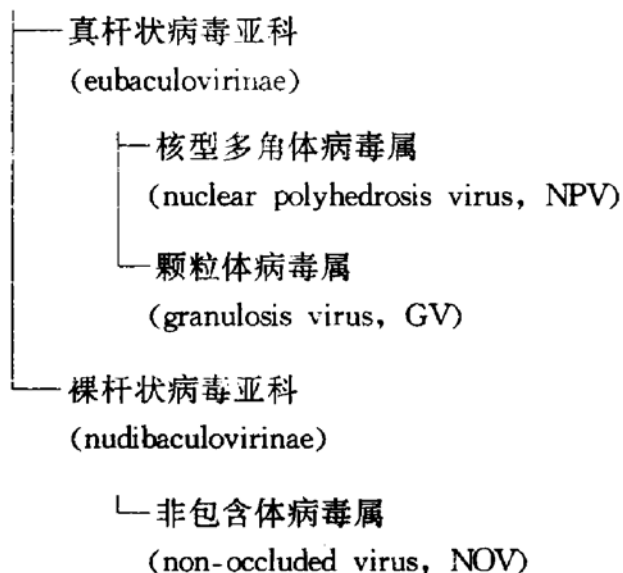
摘要 昆虫杆状病毒作为高效的表达载体, 现已广泛地用于各种外源基因的表达。但是, 用传统的方法构建重组杆状病毒, 存在着重组率低, 纯化难及耗时长等缺点, 围绕如何快速、简便、高效地构建重组杆状病毒, 近几年来人们进行了一些重大的改进, 包括使病毒 DNA 线状化以提高重组病毒的比例; 在体外进行重组; 同源重组和重组病毒的纯化与筛选在酵母和大肠杆菌中一次完成; 使重组病毒可以形成多角体等, 从而从根本上改变了传统方法中的不足。文章着重介绍了这几种新的改进方法。

关键词 重组杆状病毒, 重组率, 线状化, Cre-lox 系统, 转座子, 多角体

昆虫杆状病毒属杆状病毒科 (baculoviridae), 因其包埋于多角体中的病毒粒子呈棒状而得名。基因组由超螺旋的双链 DNA 组成, 大小为 88—160kb^[1]。根据国际病毒命名委员会第五次报告 (ICTV 5th Report, 1991), 杆状病毒科的组成情况如下:

杆状病毒科

(baculoviridae)



其中, 用作外源基因表达载体的杆状病毒目前仅限于核型多角体病毒属核型多角体病毒 (NPV)。

核型多角体病毒用作外源基因的表达载体, 通常是通过体内同源重组的方法, 用外源基因替代多角体蛋白 (polyhedrin) 基因而构建出重组病毒。这一构想最早由 L. K. Miller^[2]于 1981 年提出, 并由 Smith 和 Summers^[3]于 1983 年首次实现。他们在草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞 Sf9 中成功地表达出了人 β -干扰素。1985 年, Maeda 等^[4]用家蚕 (*Bombyx mori*) NPV 作表达载体, 在家蚕体内高水平地表达出了人 α -干扰素, 从而确证用杆状病毒作载体表达外源基因的可行性与高效性。国内的庞义等^[5]用粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) NPV 也高效地表达出了外源基因。

多角体蛋白基因的启动子很强, 在感染后期, 多角体蛋白量可占受染细胞蛋白总量的 50% 左右^[6]。用杆状病毒作表达载体, 正是将外源基因置于该启动子的控制之下, 所以外源