

基因组消减杂交技术及其应用

侯 萍 吴 旻

(中国医学科学院肿瘤研究所, 分子肿瘤学国家实验室, 北京 100021)

摘要 基因组消减杂交是通过突变型(驱赶 DNA, driver)与野生型(检测 DNA, tester)基因组 DNA 之间的差异比较来分离和鉴定突变基因的方法. 该方法具有简便、快速、敏感、经济等特点, 已被广泛应用于分离和鉴定肿瘤缺失和重排基因, 制备多态位点探针, 分离遗传性疾病、病毒感染性疾病的致病基因和基因诊断等领域. 文章对这一新技术的建立和发展、实验策略、应用实例、目前存在的问题和发展前景等方面做了简要的综述.

关键词 消减杂交, 基因缺失, 核酸酶 SI, PCR

随着分子生物学研究不断深入和重组体 DNA 技术的广泛应用, 对基因的分离和鉴定, 特别是肿瘤中缺失基因的检测提出了更高的要求. 经典的策略即细胞遗传学研究结合限制性片段长度多态性(RFLP)、杂合性缺失(LOH)和染色体步移的方法获得目的基因, 费时、费力且受许多因素的制约. 近几年在 PCR 基础上完善和发展起来的多种分离和鉴定基因的方法^[1,2]是基因分析和检测的一次技术革命, 其中基因组消减杂交的方法倍受重视, 越来越多的研究报告采用这项技术.

1 基因组消减杂交技术的建立和发展

采用消减杂交技术分离缺失基因的概念是 1966 年 Bautz^[3]率先提出的, 他利用噬菌体 T₄ 缺失突变株的 DNA 分离相应缺失区域的 mRNA 并获得成功. 随后许多实验室引进并改进这项技术, Lamar^[4]建立了基因组消减杂交技术, 通过检测 DNA 与过量的驱赶 DNA (比例是 1:100) 单轮竞争性杂交, 克隆了人染色体特异的基因探针. Kunkel^[5]和 Nussbaum^[6]分别用该方法克隆了 DMD (duchenne muscular dystrophy) 和脉络膜缺损 (choroideremia) 座位的探针, 然而这种方法只能富集疾病座位的大片段缺失, 富集倍数低于突变型

与野生型的比例 (小于 100 倍). Welcher^[7]改进了上述方法, 采用多轮杂交 (5 轮) 获得富集的缺失片段, 但多轮杂交成功的关键是两个基因组之间存在显著的差异. 1990 年 Straus^[8]和 Wieland^[9]分别将 PCR 技术引入消减杂交方法中, 大大提高了缺失片段的富集倍数, 使基因组消减杂交技术得以推广应用. Straus 使用生物素-亲和素-磁珠系统, 而 Wieland 采用羟基磷灰石柱 (HAT) 层析技术结合生物素-亲和素系统分离缺失片段. 由于这两种机械分离手段精确性不高, 丢失一部分 DNA 片段, 同时真核生物基因组又十分复杂, 他们的富集效率不超过 800 倍.

最近 Wigler 实验组^[10]设计出一种能够克隆小片段基因组 DNA 差异的方法命名为 RDA (representational difference analysis), 该方法富集缺失片段达 10⁶ 倍, 同时采用不同的限制性内切酶制备一系列检测 DNA 和驱赶 DNA, 消减杂交后, 使存在于整个基因组中不同限制性内切酶片段上的缺失序列得以充分富集. 我室朱侍贵和吴旻^[11]采用单引物序列 PCR 结合核酸酶 SI 建立的缺失基因富集方法, 进一步简化了基因组消减杂交的步骤, 使得该技术得到发展和完善.

2 基因组消减杂交技术的实验策略

通常将含有特异 DNA 片段的正常组织或细胞 DNA 称为检测 DNA (tester), 缺失了特异 DNA 片段的组织或细胞 DNA 称为驱赶 DNA (driver). 基因组消减杂交正是通过过量的驱赶 DNA 与检测 DNA 充分变性, 使检测 DNA 中与驱赶 DNA 相同的大部分 DNA 与驱赶 DNA 完全复性, 从而检测 DNA 中特异 DNA 片段自身复性而被分离出来.

2.1 检测 DNA 和驱赶 DNA 的制备

来源于正常组织或细胞的 DNA 经限制性内切酶作用后制成检测 DNA, 来源于突变组织的 DNA 用超声击碎至片段大小为 500 ~ 1500 bp 制成驱赶 DNA^[8]. 或将正常和突变组织或细胞 DNA 的酶切片段连上寡核苷酸接头, PCR 扩增后, 用同一内切酶切下接头, 回收 DNA 片段, 正常组织或细胞酶切片段两端再连上另一组寡核苷酸接头制成检测 DNA 和驱赶 DNA. 由于 PCR 的有效扩增, 仅需 10 μ g 左右的驱赶 DNA 即可完成消减杂交全过程^[8].

2.2 实验原理和步骤

基因组消减杂交是根据变性的 DNA 双链在一定条件下可以复性的特性设计而成. 主要步骤有:

2.2.1 液相杂交: 检测 DNA 与驱赶 DNA 按比例 (1:100~1:200) 混匀, 乙醇沉淀, 溶于缓冲体系中, 覆盖液体石蜡油, 100℃ 煮沸 10 min, 在 1 mol/L NaCl 高盐浓度下, 67℃ 作用 20 h. 90% 的单链 DNA 都复性成稳定的双链结构, 这一过程遵循 $C/C_0 = 1/K(C_0t + 1)$, t 为时间, K 为速率常数^[10]. 通常经过 3~4 轮杂交后即可富集出特异片段.

2.2.2 特异片段的富集: 液相杂交后可能出现以下 4 种情况, 如图 1 所示. a. 检测 DNA 中仅有的片段自身复性, b. 检测 DNA 与驱赶 DNA 复性, c. 驱赶 DNA 自身复性, d. 检测 DNA 与驱赶 DNA 都剩一些单链. 为了从中分离出检测 DNA 中仅有的自身复性片段, 也就是驱赶

DNA 中缺失的 DNA 片段, 可采用生物素-亲和素-磁珠系统或 HAT 结合生物素-亲和素层析系统^[8,9], 富集倍数低于 1000 倍, 而采用核酸酶 S1 结合 PCR 富集倍数可高达 10^6 倍^[10].

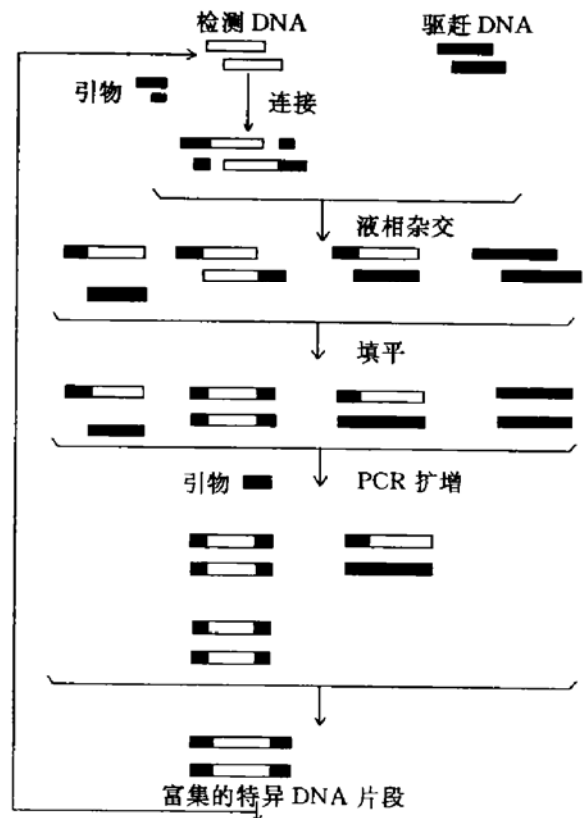


图1 特异DNA片段富集示意图

2.2.3 特异片段的扩增: 采用PCR技术扩增检测DNA中自身的特异基因片段. PCR引物带有某种限制性内切酶酶切位点, 可以是单引物或双引物序列^[10,11]. 扩增形式有两种: a. 机械方法分离的DNA片段, 连上寡核苷酸接头或原检测DNA两端的接头填平后, 以填平的

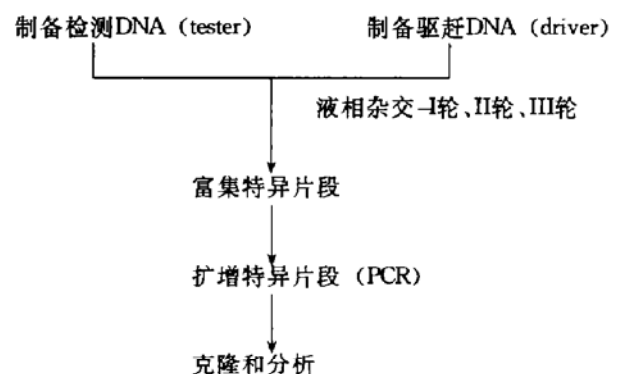


图2 基因组消减杂交的实验策略

末端为引物结合点,以原接头为引物进行 PCR 扩增^[9,10]; b. 将检测 DNA 与单引物填平连接后,液相杂交,以填平的末端为引物结合点,以原接头为引物进行 PCR 扩增^[11]. 总结实验过程如图 2 所示.

3 基因组消减杂交技术应用举例

90 年代初期以 Wigler 实验组为代表进一步完善了基因组消减杂交技术,国外越来越多的研究者注意到这项技术的简便、快速、敏感、经济等优点,竞相开展该项技术的应用,在此仅举三个实例,供读者参考.

3.1 肺癌中缺失基因的分离

Wieland^[12]用正常人胎盘 DNA 和两个拷贝的 λ DNA 经 *Sau*3A 酶切后制成检测 DNA,其中以 λ DNA 作为标记,肺癌细胞系 SK-LC-17 的 DNA 经超声击碎至大小为 500 bp 的片段为驱赶 DNA,经 3 轮杂交富集的特异片段克隆到 pUC18 质粒中,筛选并测序得到三个单拷贝阳性克隆,这三个片段 (del-27、del-109、del-118) 与 GenBank 和欧洲分子生物学数据库 EMBL 库中已知序列相比无同源性,并已存于这两个库中. a. del-27 约 420 bp,定位于 5 号染色体上, b. del-118 约 522 bp,定位于 8 号染色体上,并发现在许多肺癌转移淋巴结中均缺失,推测 del-118 在肺癌的演进中起重要作用, c. del-109 仅测定部分序列,约 450 bp,定位于 X 和 Y 染色体上,据细胞遗传学分析很可能是肿瘤抑癌基因的候选基因.

3.2 外源插入片段的筛选

Wigler 实验组^[10]用淋巴样细胞系 DRL484 DNA 与腺病毒 II 型 DNA 和 λ DNA (作为外源插入片段) 经 *Bgl*III 酶解后制成检测 DNA,以 DRL484 DNA 为驱赶 DNA,经三轮杂交后有效地扩增出小于 1 kb 的腺病毒 DNA 和 λ DNA 片段,富集倍数达到 10^6 . 因此该方法可用来分离病毒感染性疾病的致病基因并且选用不同的限制性内切酶,制备一系列检测 DNA 和驱赶 DNA,即可对整个基因组进行消减杂交.

3.3 多态位点探针的制备

采用基因组消减杂交的方法制备合适的检测 DNA 和驱赶 DNA,经消减杂交后可获得一系列呈多态性分布的限制性内切酶片段或与未知基因紧密连锁的多态位点探针,为绘制某单基因性状的遗传图谱和定位克隆 (positional cloning) 开辟途径^[10,13].

4 基因组消减杂交技术存在的问题和发展前景

基因组消减杂交这项新技术的应用受以下几个因素的制约^[8,10].

a. 具备纯合或杂合缺失的细胞株,这种缺失至少占有一个限制性内切酶片段且主要由非重复序列组成.

b. 检测 DNA 和驱赶 DNA 最好同源,保证不受不相关位点缺失序列的干扰,降低检测 DNA 中重复序列被富集的机会.

c. 由于 PCR 只能有效地扩增出小于 1 kb 的富集片段,所以必须采用多种限制性内切酶消化野生型 DNA,以对存在于整个基因组中的缺失基因进行消减杂交.

d. 该方法成功的关键是充分降低驱赶 DNA 的复杂度,降低无效序列的污染.

总之由于这项新技术与其他如定位克隆^[14]、递减式 cDNA 文库技术^[15]、及 mRNA 差异显示^[16]等分离和克隆基因的方法相比具有简便、快速、敏感、经济实用等优点. 人们相信随着这项技术的发展和完善,将为分离和鉴定缺失或扩增的基因,完成人类基因组计划,对遗传病、病毒感染性疾病的基因诊断和治疗做出贡献.

参 考 文 献

- 1 Sharma P, Loenneborg A, Stougaard P. *Biotechniques*, 1993; 15 (4): 610
- 2 Peng L, Arthur B P. *Science*, 1992; 257: 967
- 3 Bautz E K F, Reilly E. *Science*, 1966; 151: 328
- 4 Lamar E E, Palmer E. *Cell*, 1984; 37: 171
- 5 Kunkel L M, Monaco A P, Middlesworth W *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985; 85: 4778

- 6 Nussbaum R L, Lesko J G, Lewis R A *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1987; **84**: 6521
- 7 Welcher A A, Torres A R, Ward D C. Nucleic Acid Res, 1986; **14**: 10027
- 8 Straus D, Ausubel F M. Proc Natl Acad Sci USA, 1990; **87**: 1889
- 9 Wieland L, Bolger G, Asouline G *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1990; **97**: 2720
- 10 Lisitsyn N, Lisitsyn N, Wigler M. Science, 1993; **259**: 946
- 11 Zhu S G, Wu M. Nucleic Acid Res, 1994; **22**: 2428
- 12 Wieland L, Bohm M, Bogatz S. Proc Natl Acad Sci USA, 1992; **89**: 9705
- 13 Lisitsyn N, Segre J A, Kusumi K *et al.* Nature Genet, 1994; **6**: 57
- 14 Collins F. Nature Genet, 1992; **1**: 3
- 15 Feng L, Wang X Q, Wu M *et al.* Science in China (Series B), 1992; **35**: 445
- 16 Lamers W H. Nucleic Acid Res, 1994; **22**: 878

The Method and Applications of Genomic Sub-

traction. Hou Ping, Wu Min (*National Laboratory of Molecular Oncology and Department of Cell Biology, Cancer Institute, CAMS-PUMC, Beijing 100021, China*).

Abstract Genomic subtraction is an efficient and economical method for isolating sequences present in one genomic DNA population (tester) but absent in another (driver). It proved widely applicable to detecting genomic abnormalities in cancer, probes for polymorphic loci and acquisition of new sequences in infectious diseases of viral organism. The foundation and development of genomic subtraction, experimental strategy, applications, problems in present and promise in future are described.

Key words subtractive hybridization, deleted gene, PCR, nuclease S1

甲烷单加氧酶的催化性能和活性中心结构*

沈润南 李树本

(中国科学院兰州化学物理研究所, 羰基合成和选择氧化国家重点实验室, 兰州 730000)

摘要 甲烷单加氧酶是甲烷利用细菌代谢甲烷过程中的重要酶系, 它能够催化烷烃羟基化和烯烃环氧化反应, 还能催化降解氯代烃类, 可用于环境中氯代烃类化合物污染的治理, 是具有广泛应用前景的生物催化剂。甲烷单加氧酶是含有 μ -氧桥双核铁催化活性中心的蛋白, 它的研究对分子氧的活化、化学催化剂的设计具有重要意义。文章介绍了甲烷单加氧酶催化性能和机理的最新研究进展。

关键词 甲烷单加氧酶, 甲烷利用细菌, 催化性能, 催化活性中心

甲烷单加氧酶 (EC 1.14.13.25 简称 MMO) 是甲烷利用细菌 (methanotrophic bacteria) 代谢过程中的重要酶系, 在细菌细胞内 MMO 直接利用分子氧作为底物催化甲烷氧化成甲醇, 这一反应在化学催化中很难实现。对 MMO 催化活性中心和机理深入研究, 为化学催化剂的设计提供一个理论模型, 以指导甲烷催化氧化制备甲醇催化剂的研制。具有重要的理论意义和应用价值。

MMO 作为一个具有应用前景的工业生物催化剂能够催化烷烃的羟基化反应和烯烃的环氧化反应 (反应式见图 1)。据统计, 欧、美、日各石油化学大公司就 MMO 催化烷烃羟基化、烯烃环氧化反应等申请专利 50 多项。MMO 催化烯烃环氧化反应具有立体选择性。而纯的

* 国家自然科学基金资助项目和中国科学院“八五”应用技术重大项目。

收稿日期: 1994-09-15, 修回日期: 1995-06-15