

染色体显微切割与微克隆技术的研究进展

田 毅¹⁾ 卢一凡²⁾ 邓继先²⁾ 刘广田

(中国农业大学植物科技学院, 北京 100094)

摘要 介绍了染色体显微切割及微克隆技术的原理和主要方法, 综述了显微切割及微克隆的研究进展, 并讨论了其在植物中的应用。

关键词 染色体, 显微切割, 微克隆

学科分类号 Q24, Q78

传统的克隆及分离特定基因的方法应具备以下四个条件中的一个: a. 特定基因的序列; b. 基因在染色体上的位置; c. cDNA 序列及表达产物; d. 已知基因作用。在植物中优良性状的基因克隆的很少, 但国内外学者们对一些已知功能的基因在染色体上进行了定位, 为克隆这些基因提供了可能。这部分基因的克隆可通过染色体显微切割及微克隆的方法来实现。此技术在人类及哺乳动物中已得以成功运用, 在植物上也已开始探索。

1 原理及进展

染色体显微切割与微克隆技术起始于 80 年代早期, 近 10 年的时间该技术使得特异性基因克隆获得突破。该技术主要采用微细的玻璃针, 在倒置显微镜下对目的基因所在的染色体区段进行切割与分离, 并通过 PCR 扩增, 将产物插入载体, 构建染色体区带特异性 DNA 文库。通过对文库筛选, 分离出染色体区带特异性的 DNA 位点标记 (STS), DNA 多态片段和相关基因, 再用染色体步移法分离得到目的基因。

Scalenghe 等在果蝇多线染色体上首次应用显微切割和微克隆。Gillias 等^[1]首先在人的染色体上进行小区带切割及微克隆, 得到 106 条染色体片段, 克隆入 λ gt10 载体建立微克隆, 得到 238 bp 和 202 bp 单拷贝探针。这是在显微切割染色体后直接进行操作, 需要切割

的染色体数目较多。Ludecke 等^[2]把 PCR 技术引入到微克隆中, 使所需切割的染色体数目明显减少。Robert 等^[3]又设计了一接合体, 连接于切割的染色体上, 使扩增效率明显提高。邓汉湘等^[4]在接合体上又增加了一连接体, 成功地构建了人类染色体区带文库。在此基础上, 技术的进步又把染色体显微切割和微克隆技术引入荧光原位杂交, 建立染色体区带特异性绘画技术, 开始人类基因组计划的研究。

Sandery 第一次将此技术引入植物。近年来, 显微切割和微克隆在植物上的研究日渐活跃。在燕麦、小麦上都有研究, 技术也在日臻完善。最新报道已能只剥离一条染色体于单管中经一系列操作后, 通过 PCR 扩增, 建立微克隆^[5]。然而这方面工作国内尚属空白。

2 主要技术问题

2.1 染色体辨认

早期显微切割是对未显带染色体进行的, 染色体辨认和切割十分困难, 只能在一些易于辨认的染色体上进行, 其应用受到局限。人类染色体中, 只能在不经过染色处理, 即能辨认的第二染色体上进行^[1]。其他一些切割的人类染色体只能通过体细胞杂交来鉴定操作十分困难。

染色体分带技术的应用使染色体的辨认易

¹⁾中国医学科学院心血管病研究所生化室, 北京 100037。

²⁾军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071。

收稿日期: 1997-08-18, 修回日期: 1998-01-16

于进行. Ludecke 等^[2]将 G 分带技术应用于染色体辨认, 从 Langer Giedion syndrome 准确切割了单一区带 LGCR 8q23~ q24. 1, 并进行了微克隆. Buiting 等准确切割 Wilms' tumor 染色体 WT1 11p13, Prader-Willi syndrome 染色体 PWR 15q11. 2~ q12. 在植物上, 通常采用 C 分带及 N 分带来辨认染色体, Kamisaki 等通过用 Giemsa 染色后得到的 Crepis (还阳参) 染色体的 C 带图谱并辨认染色体, 并对此进行了显微切割. 分带技术与染色体显微切割的结合使任一条染色体的任一区带切割都成为可能, 这使染色体的识别简单、准确.

2.2 显微切割

显微切割主要是用微细玻璃针切割染色体, 对其微克隆. 尽管设计简单, 应用前景亦十分广泛, 但其技术操作却是困难的. 障碍之一是显微切割技术和收集大量同一区域的染色体片段, 这并非易事. Mongjembashi 用激光束切割了载玻片上的人类染色体. 尽管切割速度快, 但光束的位置控制和光束强度调节都十分困难. Fukui 等用计算机进行激光切割获得植物染色体片段, 用氩离子激光对染色体进行一个个切割消除, 最后获得目标染色体. 这为染色体的切割提供了一条新思路.

2.3 微克隆的建立

早期微克隆建立是将切割的染色体转移到油室中, 在微升或纳升体积中对其进行消化, 然后连接入载体中^[2, 4]. 该程序染色体转移困难, 又要分离克隆, 在操作过程中, DNA 丢失很多, 所得文库不完整, 缺乏实用价值. 1989 年, Ludecke 等^[2]对微克隆技术进行改进, 用载体连接后, 用质粒已知序列为引物进行 PCR 扩增, 把扩增产物克隆至载体上. 采用这种方法, 得到特定切割染色体区带的 5 000~ 20 000 个克隆. PCR 技术引用使得: a. 需要切割的染色体数目明显减少, 只需要原数目的 1/3~ 1/5 即可. b. 得到的克隆数目明显增多. 但由于 Ludecke 等采用的内切酶产生的是平头末端, DNA 的连接效率低, 并且要经过分离程序来分离目的 DNA 片段, DNA 的

丢失率高, 这使所获得的微克隆文库不够完整.

Saunders 等设计 5' 含有 *Sau*3A 或 *Mbo* I 位点的两段寡核苷酸序列, 合成一接合体, 有一 GATC 粘性末端, 分别为 24mer 和 20mer, 将切割的染色体用 *Sau*3A 或 *Mbo* I 消化, 产生许多小片段, 同接合体连接, 用 20mer 的序列为引物进行 PCR 扩增, 扩增产物再用 *Sau*3A 或 *Mbo* I 消化, 克隆至有 *Bam*H I 位点的载体上. 用这种方法获得了大量的克隆, 构建了 100 kb 的染色体区带的 DNA 文库. 由于接合体的使用, 只需 1 μ g 切割的染色体区带 DNA 即可成功地进行扩增, 具有高度的敏感性, 所需切割的材料大大减少而扩增的特异性提高. 同时, 用 PCR 扩增方法得到的切割区带探针达 90% 以上, 而用早期方法只得 3%~ 4%. 不仅如此, 用接合体进行 PCR 扩增得到的微克隆文库要比 Ludecke 等^[2]用质粒得到的文库实用价值高得多: a. 使用了几种不同的接头 (linker) 和限制性内切酶; b. 用粘性末端代替了平末端. 邓汉湘等^[4]采用类似方法设计了一个由 10mer 和一个 24mer 的接合体, 同样具有 GATC 粘性末端, 与用 *Sau*3A 消化的切割的人类染色体高效连接, PCR 扩增, 得到了人类染色体区带 DNA 文库. 由于减少了分离程序, 防止 DNA 丢失, 提高了文库的完整性. Kao 等用 *Mbo* I 消化, 采用以上方法构建了人类 21 号染色体 700 000 个微克隆, 杂交试验显示出 42% 克隆含有重复序列, 58% 克隆是低拷贝序列, 长度为 50~ 1 100 bp, 平均为 416 bp, 得到大量的克隆, 插入片段亦很长, 并且筛选出一些 cDNA 序列, 构建了整条染色体的特异区带文库. 由此看出, 微克隆技术日臻完善. 将所建立的文库与 cDNA 或基因组文库杂交, 筛选新的基因也获得了较好的结果.

3 在植物上的应用

Sandery 首次将此技术应用于植物, 剥离出黑麦 B 组染色体, 在油室中消化、连接, 最终得到一个区别于 A 组染色体的克隆, 插入序列为 2 kb. Jung 等在 *Beta patellaris* 上也进行了此

技术的尝试. 剥离减数分裂中期的染色体, 克隆于 pUC 质粒上, 用质粒已知序列作引物进行 PCR 扩增, 建立微克隆, 得到 23 000 个重组体, 其中 69% 经 DNA 印迹鉴定具有实用价值. 插入序列的平均长度为 150~ 160 bp.

Sandery 和 Jung 等将显微切割与微克隆技术应用到植物上, 也发现在植物上与在人类和哺乳动物上应用显微切割与微克隆技术有所不同. 首先, 植物与动物的细胞制片不一样, 植物细胞制片要复杂得多. 取材后, 首先要经过卡诺氏固定液的固定, 然后在醋酸的环境下压片, 获得良好的分裂相后用液氮或干冰揭片, 这样的载物片才能用来做染色体剥离或切割. 但植物制片取材的部位和时期较人和哺乳动物灵活得多, 可在根尖的染色体分裂中期^[8]花粉母细胞的减数分裂期进行.

近年来, 显微切割和微克隆在植物上的应用日渐活跃. Albani 等剥离 2~ 5 条染色体臂, 采用 Sau3A 连接-接合系统, 建立微克隆. 此方法不仅仅证明 Sandery 的方法在植物上的适用性, 而且对其进行了改进, 省去在油室操作过程, 使整个消化、连接、扩增过程在“single tube”中完成, 降低了操作的难度. Chen 等^[5]在燕麦上剥离一条染色体, 经单管中系列操作后, 用单个染色体少于 0.4 pg 的 DNA 量, 经两次 PCR 扩增, 得到 500 000 个重组克隆, 平均插入序列 650 bp, 其中 41% 高拷贝, 59% 低拷贝. 这不仅证明该方法的正确性, 而且只用一条染色体进行切割、扩增、

克隆, 得到染色体区带的 DNA 文库.

参 考 文 献

- 1 Bates G, Wainwright B J, Willianson N *et al.* Microdissection and microcloning from the short arm of human chromosome 2, *Mol Cell Biol*, 1986, **6** (11): 3826~ 3830
- 2 Ludecke H-J, Senger G, Claussen U, *et al.* Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification. *Nature*, 1989, **338** (23): 348~ 350
- 3 Robert D C, Saunders D, Glover M *et al.* PCR amplification of DNA microdissected from a single polytene chromosome band: a comparison with conventional microcloning. *Nucleic Acids Res*, 1989, **17** (22): 9027~ 9037
- 4 邓汉湘, 夏家辉 (Deng H X, Xia J H). 人类染色体显微切割、微克隆与染色体区带特异性绘画技术. *自然科学进展 (Progress in Natural Science)*, 1992, **4**: 361~ 367
- 5 Chen Q, Armstrong K. Characterization of a library from a single microdissected oat chromosome. *Genome*, 1995, **38** (4): 706~ 714

Progress of Chromosome Microdissection and Microcloning Technology. TIAN Chai, LU Yifan¹⁾, DENG Jixian¹⁾, LIU Guangtian (*Department of Plant Science, Chinese Agriculture University, Beijing 100094, China;* ¹⁾*Institute of Biotechnology, Academy of Military Medicine, Beijing 100071, China*).

Abstract Progress of chromosome microdissection and microcloning technology were reviewed. Some main technology problems such as chromosome identification, microdissection and microcloning were discussed. Some progress in plants was reviewed about chromosome microdissection and microcloning.

Key words chromosome, microdissection, microcloning

肿瘤坏死因子家族新成员——TRAIL

王梁华 焦炳华

(第二军医大学基础部微生物学教研室, 上海 200433)

摘要 肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体 (TRAIL) 或称凋亡素 2 配体 (Apo2 ligand, Apo2L), 是 TNF 家族的新成员. 它是从表达序列标签库 (expressed sequenced tag, EST) 中寻找 TNF 的同源分子