

## 综述与专论

## 酵母人工染色体克隆技术及其进展

方炳良 罗会元

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京 100005)

## 提 要

酵母人工染色体克隆(YAC)是最近几年发展起来的大分子DNA克隆技术. 文章综述了YAC克隆技术的发展, YAC的分离、分析与鉴定, 以及这一技术在分子生物学中的应用.

**关键词** 基因克隆, 酵母人工染色体, 染色体制图

常规的克隆方法应用质粒或噬菌体为载体, 细菌为宿主细胞, 克隆插入片段小于50kb. 由于真核细胞基因功能区域常跨越几百kb, 在定向克隆中目的基因距起点通常为几千kb, 人们希望能找到大片段DNA克隆技术, 跳跃文库<sup>[1]</sup>、P1噬菌体克隆<sup>[2]</sup>、酵母人工染色体(YAC)克隆<sup>[3]</sup>等就是在这一目的上发展起来的新的克隆技术.

YAC (yeast artificial chromosome) 的基本原理是在体外构建含酵母着丝粒与端粒的链状大分子DNA, 将其转化入酵母细胞, 并在酵母中以染色体形式稳定存在. 载体由二条臂组成, 含DNA复制子, 酵母着丝粒, 可选择标记及Tetrahymena的端粒, 克隆片段插入于两臂之间(图1). 实验证明可将100—1000kb的外源DNA分子制备成YAC, 并在酵母中以染色体形式稳定繁殖. 这一技术填补了连锁分析得到的遗传图谱与重组DNA技术得到的分子物理图谱之间的差距, 相互重叠的YAC克隆代表某一染色体区域的连续DNA序列; 每个YAC则可能通过次级克隆而进行序列分析. 因此YAC克隆技术为基因结构与功能的研究及应用反向遗传学分离致病基因提供了有效手段. 本文综述YAC技术及其最新进展.

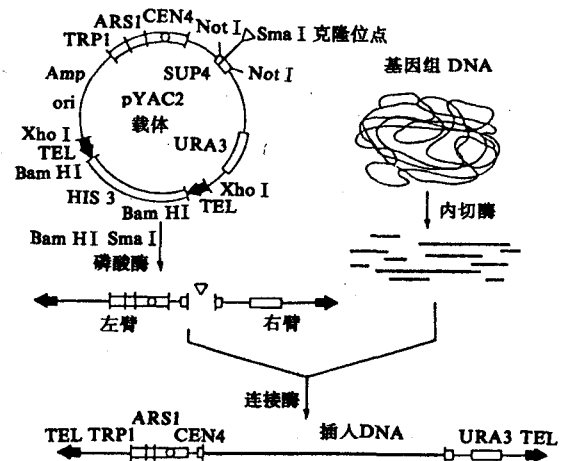


图1 YAC克隆示意图

载体(pYAC2)含Tetrahymena端粒(TEL), 酵母着丝粒(CEN4), 自主复制序列(ARS1), 克隆位点(Sma I)及选择标志(TRP1与URA3)

## 1 克隆方法的改进

### 1.1 大分子DNA制备

由于YAC转化酵母细胞的效率很低, 建立YAC文库需要大量大分子DNA (>1000 kb). 最初应用蔗糖梯度离心法分离制备酵母染色体DNA及从白细胞中制备哺乳动物染色体DNA<sup>[3,4]</sup>, 但所得DNA很稠并易受机械损

伤,操作时也不精确.应用凝胶包埋法制备染色体 DNA 得到 DNA 片段大于 4 000kb,不易被机械损伤.但转化前须将琼脂糖经琼脂糖酶处理除去.加入多聚胺(如精胺等)可以减少操作时的机械损伤,同时增加转化效率<sup>[5-7]</sup>.

### 1.2 小分子 DNA 片段的去除

为了有效地建立 YAC 文库,需要提取内切酶酶解后的待克隆片段. EcoR I 将 DNA 随机部分酶解,尽管平均 DNA 片段可以较大,但仍有很多小分子 DNA,连接时这些小片段 DNA 之间可以相互连接,得到的克隆可能含有二个互不相关的 DNA 片段,给进一步分析带来困难.这些克隆在 YAC 文库中约占 10--30%,其含量的多少与连接反应的条件有关.连接前将这些小片段除去可减少此类克隆<sup>[4,5]</sup>.连接后将小片段除去可减少因未连接或自身连接的载体转化所造成的本底克隆.应用蔗糖密度梯度离心可以将大量的不同大小 DNA (10--600 kb) 分离<sup>[4,8]</sup>,但需经脉冲场电泳(PFGE)鉴定,工作费时,片段分布较宽,液体容积较大.用 PFGE 直接分离所需片段,方法简便,但转化前须将琼脂糖除去.

## 2 YAC 的分离与 YAC 克隆的鉴定

YAC 克隆面临的最大困难就是没有简便快速的方法鉴定 YAC 克隆并将 YAC 从宿主细胞中分离出来.常规的质粒或噬菌体 DNA 分离法不适用于 YAC 克隆.因此根据目的不同有不同的 YAC 分离方法.

### 2.1 电泳法

PFGE 可将酵母染色体分离,从 PFGE 凝胶中可直接制备 YAC DNA.此方法的 DNA 产量较低,因为 PFGE 电泳 DNA 加量不能过多.若 YAC DNA 与某一酵母染色体 DNA 电泳速度相同,分离到的 DNA 将含有 50% 的酵母 DNA.此方法分离的 YAC DNA 可用于染色体原位杂交进行定位.从整个酵母细胞中提取 DNA 也可直接用来原位杂交进行定位,但本底较高.在 YAC 载体的两臂近克隆部位加入 T7 或 T3 启动子(如载体 pJS97, pJS98)则

可利用 T7 或 T3 RNA 聚合酶从酵母细胞 DNA 中直接制备 YAC 插入片段末端的标记 RNA 探针<sup>[7]</sup>.但无法将插入片段分离作进一步分析.

### 2.2 克隆法

由于很难从 PFGE 胶中分离到足够的 YAC,通常将含 YAC 的整个酵母 DNA 克隆到质粒或粘粒(cosmid)中,形成新的文库,并从这一文库中分离相应的次级克隆<sup>[9,10]</sup>.哺乳动物可以利用其特异的重复序列为探针筛选有关克隆.以载体为探针则可分离与载体相邻的插入片段.在载体的两条臂上分别加入 Ori, Amp 及 Neo 基因片段,选择合适的内切酶酶解含 YAC 的酵母基因组 DNA,并将所得片段自身连接环化,转化 *E. coli* 可以很快得到 YAC 插入片段的两末端片段<sup>[3,11]</sup>.

### 2.3 多聚酶链反应(PCR)法

PCR 在 YAC 的鉴定与插入片段的分离中起了极大作用. Green 和 Olson<sup>[12]</sup>应用 PCR 从人基因组 YAC 文库中分离特异的 YAC 克隆.将 YAC 文库各个克隆随机分成几组,以已知序列合成引物对其进行 PCR,根据是否得到相应的 PCR 产物可直接判断该组中是否含有已知序列的克隆,再将阳性组分为几个小组,进行 PCR 可将阳性克隆追溯到 200--400 个克隆范围内,后者可经硝纤膜菌落原位杂交而筛选出单个阳性克隆,此方法大大减少杂交次数并加快筛选速度.

应用 PCR 分离 YAC 中的插入片段有两种方法,反向 PCR(图 2)与 Alu PCR 或 Alu-载体 PCR.反向 PCR 以载体序列为引物,分离插入片段的末端<sup>[13-15]</sup>.该方法包括分离酵母基因组 DNA,内切酶酶解(选择的内切酶在两引物中间没有切点,但在克隆位点远端的引物的 3' 端有一切点),酶解产物经连接而环化,产生环状 PCR 模板.这一 PCR 反应被称之为反向 PCR,因为扩增的 DNA 序列是在引物的外侧.其产物为含插入片段末端及载体引物序列的链状 DNA 分子.

Alu PCR 用于分离人类 YAC 克隆的插入

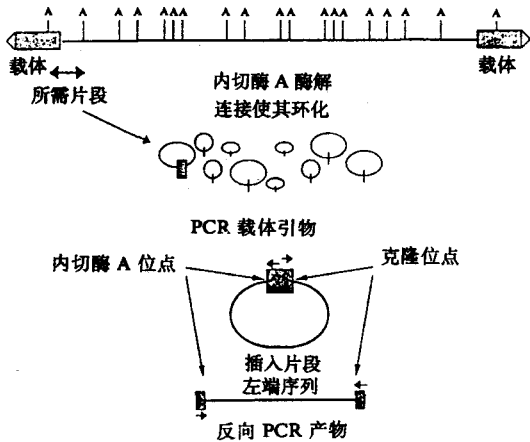


图2 反向PCR法分离YAC插入片段的左端序列  
同样的方法可用于获得右端序列

片段<sup>[16]</sup>。Alu 重复序列是人类特异的一约 300bp 的重复序列，平均每 4 kb 人 DNA 中含一个 Alu，根据 Alu 序列合成引物进行 PCR 可将两个相邻 Alu 之间的序列扩增。此方法可在几小时内从酵母基因组 DNA 中分离到 YAC 插入片段，酵母本身 DNA 不扩增，80% 的 YAC (插入片段 > 130 kb) 可得到扩增片段。应用 Alu-载体引物进行 PCR 可以分离插入片段末端序列<sup>[17]</sup>。Alu-Alu PCR 与 Alu-载体 PCR 所得产物可用于原位杂交基因定位。Alu-载体 PCR 产物还可用来分离重叠的 YAC 克隆。对 Alu-载体 PCR 产物进行序列分析，可得到 YAC 插入片段末端序列，并用来设计新的 PCR 引物进行重叠克隆的 PCR 筛选。

### 3 YAC 克隆的分析

#### 3.1 内切酶谱法

YAC 内切酶谱的鉴定常用部分末端制图法<sup>[3]</sup>。YAC 在宿主细胞中以链状分子存在，而且两末端为载体序列。用凝胶包埋法制备酵母 DNA，内切酶部分酶解，经 PFGE 分离并将其转移到膜上，以载体的一臂为探针进行杂交，即可从杂交片段的大小直接获得所用内切酶切点之间的距离。此外还可应用 Alu PCR 产物或已知的单拷贝序列为探针进行内切酶谱分析。

#### 3.2 重组制图法

Pavan 等<sup>[18]</sup>设计的重组制图法最先用来确定重复序列在 YAC 中的位置。应用 YAC 中的 Alu 序列进行同源重组，即将含 Alu 重复序列，端粒及选择标记的重组质粒转化到 YAC 菌内，质粒上的 Alu 序列将与 YAC 中的 Alu 序列发生重组，并在重组部位插入一端粒，该部位远端的 YAC 部分将缺失，导致不同大小的缺失型 YAC (与插入部位有关)。根据表型筛选克隆并应用 PFGE 鉴定各个克隆中 YAC 的大小，可获得发生重组的部位，即原始克隆中每一 Alu 序列与左臂末端的距离 (左臂含着丝粒，复制子，因此必将保留)，并得到 Alu 序列及位置，所得到的克隆还可进一步用来作内切酶谱分析。应用 cDNA 作重组序列，可以对基因中的外显子进行定位，因为从缺失片段的大小可以判断内含子的大小。

#### 3.3 指纹法

应用 Alu PCR 扩增各个 YAC 克隆，比较 PCR 产物的带型，就可能发现共同的片段，这一方法可鉴定相互重叠的克隆，这对于分离某一特定染色体区域的 YAC 连续片段，进行染色体步行具有重要意义。指纹法的另一途径是制备各个 YAC 菌的 DNA，经酶解，DNA 印迹与重复序列 (Alu, LINE) 探针杂交，比较不同克隆的带型，也可发现相互重叠的克隆<sup>[19]</sup>。

### 4 功能研究

YAC 在基因功能的研究中应用还不多，但前景非常广阔。应用 YAC 进行转基因研究对了解某一特定位点的功能与调节将起重要作用。已有报道说明可将含 G6PD 基因的 YAC 成功地转化到哺乳动物细胞，并得到正常表达。YAC 在分离分析人类端粒序列上起了重要的作用。由于端粒部位缺少合适的酶切位点，无法用原来的克隆体系克隆该部位序列。对这一部位的克隆则利用半 YAC 克隆体系。以一条含着丝粒、端粒、复制子及选择标记的左臂为载体，直接与含人端粒 DNA 片段连接，转化酵母细胞，酵母端粒酶在接受端粒序列信息时并

不严格,人端粒 DNA 可补充 YAC 右臂的端粒<sup>[20,21]</sup>. 人类端粒的分离是制备哺乳动物细胞人工染色体 (mammalian artificial chromosome, MAC) 的重要步骤. MAC 将把哺乳动物的 DNA 直接以小染色体的形式克隆到哺乳细胞中,使得有些在酵母中无法克隆的 DNA 序列得以克隆. 插入片段的甲基化及其它修饰也可以维持原状. 制备 MAC 还需要哺乳细胞的复制子与着丝粒.

## 5 存在问题及展望

在 YAC 文库中约有 10% 的克隆含有一个以上的 YAC, 但目的 YAC 仍可通过再转化或其它方法分离. 有的同一 YAC 中含有来自不同区域的 DNA 片段, 文库中约含有 10—30% 这样的克隆. 这对于进一步分析带来很大困难. 还有些克隆 (约 2%) 为不稳定型, 在酵母中将发生缺失. 有些片段通常在酵母中无法克隆. 人基因组约有 10% 这样的序列.

尽管 YAC 技术还处于发展阶段, 它在分离致病基因及基因功能的研究上已得到越来越多的应用, 这对基因治疗也将起推动作用. 目前的转基因实验应用逆转录病毒为载体, 功能基因的 cDNA 表达由非特异的启动子控制, 这一模式缺少有关的调节信息, 基因表达没有组织特异性, 而且不能持久. 由于 YAC 载体可携带几百至几千 kb 的插入片段, 这不仅可包括基因本身, 还可包括该基因所有的 cis 调节序列, 并为基因调节提供合适的染色质空间结构. YAC 技术不但对物种之间及物种内部的基因组结构的分析将发挥重要作用, 还可获得有关生物进化, 种群形成, 基因突变及基因重组等机制的信息.

## 参 考 文 献

- Collins S F, Drumm M L, Cole J L *et al.* Construction of a general human chromosome jumping library, with application to cystic fibrosis. *Science*, 1987; **235**:1046
- Sternberg N. Bacteriophage P1 cloning system for the isolation, amplification and recovery of DNA fragments as large as 100 kb pairs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 103
- Burke D T, Carle G F, Olson M V. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science*, 1987; **236**:806
- Burke D T, Olson M V. Preparation of clone libraries in yeast artificial vectors. *Method Enzymol*, 1990; **194**:251
- Anand R, Villasante A, Tyler-Smith C. Construction of yeast artificial chromosome libraries with large inserts using fractionation by pulsed field gel electrophoresis. *Nucl Acids Res*, 1989; **17**:3425
- Imai T, Olson M V. Second generation approach to the construction of yeast artificial chromosome libraries. *Genomics*, 1990; **8**:297
- McCormick M K, Shero J H, Cheung M C *et al.* Construction of human chromosome 21 specific yeast artificial chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; **86**:9991
- Noll H. Characterization of macromolecules by constant velocity sedimentation. *Nature*, 1967; **215**:360
- Coulsen A, Waterston R, Kiff J *et al.* Genomiclinking with yeast artificial chromosomes. *Nature*, 1988; **335**:184
- Riethman H C, Moysis R K, Meyne J *et al.* Cloning human telomeric DNA fragments into *Saccharomyces cerevisiae* using a yeast-artificial chromosome vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; **86**:6240
- Traver C N, Klapholz S, Hyman R W *et al.* Rapid screening of a human genomic library in yeast artificial chromosomes for single-copy sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; **86**:5898
- Green E D, Olson M V. Systematic screening of yeast artificial-chromosome libraries by use of the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; **87**:1213
- Triglia T, Pertson M G, Kemp D J. A procedure for in vitro amplification of DNA Segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucl Acids Res*, 1988; **16**:8186
- Ochman H, Gerber A S, Hartl D L. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics*, 1988; **120**:621
- Silverman G A, Ye R D, Pollock K M *et al.* Use of yeast artificial chromosome clones for mapping and walking within human chromosome segment 18q21.3. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; **86**:7485
- Nelson D L, Ledbetter S A, Corbo L *et al.* Alu polymerase reaction; a method for rapid isolation of human specific sequences from complex DNA sources. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; **86**:6686
- Breukel C, Wijnen J *et al.* Vector-Alu PCR; a rapid step

- in mapping cosmids and YACs. *Nucl Acids Res*, 1990; **18**:3097
- 18 Pavan W J, Hiéter P, Reeves R H. Generation of deletion derivatives by targeted transformation of human-derived yeast artificial chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990;**87**:1300
- 19 Wada M, Little R D, Adidi F *et al.* Human Xq24-q28: Approaches to mapping with yeast artificial chromosomes. *Am J Hum Genet*, 1990;**46**:95
- 20 Brown W R A. Molecular cloning of human telomeres in yeast. *Nature*, 1989;**338**:774
- 21 Cheng J-F, Smith C L, Cantor C R. Isolation and characterization of a human telomere. *Nucl Acids Res*, 1989; **17**:6109

## 卡介苗载体及其在疫苗研究中的应用\*

张大军 皇甫永穆

(同济医科大学实验医学研究中心, 武汉 430030)

### 提 要

卡介苗是发展多价疫苗最好的载体之一。把外源基因导入卡介苗有3种途径:一是分枝杆菌噬菌体衍生的基因转移系统;二是分枝杆菌质粒衍生的基因转移系统;三是同源重组基因转移系统。重组卡介苗多价疫苗的研制为各种疾病的预防开辟了广阔的前景。

**关键词** 卡介苗载体, 基因转移系统, 重组多价疫苗, 分枝杆菌

目前,国内外报道了沙门氏杆菌、牛痘、脊髓灰质炎病毒等多种多价疫苗载体,引起了疫苗领域的大变革。最近,美国二个研究小组报道,他们能在卡介苗(BCG)中表达外来抗原基因<sup>[1]</sup>;虽然工作尚属开端,但由于BCG是全世界应用最广泛的疫苗,是目前所知最强的免疫佐剂之一,因此在国内对分枝杆菌(*Mycobacteria*, M.)疾病的研究受到疫苗学界重视。令人遗憾的是,由于本世纪20年代以来在BCG的应用中,人们忽视了对分枝杆菌的深入研究;很少进行使BCG成为疫苗载体的分子生物学研究,近年国内外专家才开始重视,相信不久将取得硕果。

### 1 卡介苗的主要分子生物学特征

重组DNA和MAb技术的运用,使分枝杆菌的研究进入了分子生物学时代。在过去的6年里,结核杆菌(*M. tuberculosis*)、麻风杆菌(*M. leprae*)和BCG等分枝杆菌的基因组,通过质粒和噬菌体载体在大肠杆菌(*E. coli*)中

得到克隆<sup>[2-4]</sup>。到目前为止,采用MAb和单一T细胞克隆作探针,已从分枝杆菌基因组表达文库中筛选出十多种蛋白抗原编码基因<sup>[5]</sup>,如表1所示,这些基因已进行了全核苷酸序列和抗原决定簇分析等深入研究。其它分枝杆菌抗原也正在进行纯化、基因克隆和定序<sup>[6-8]</sup>。目前对分枝杆菌基因组也有重要发现。在DNA定序后将提高我们对分枝杆菌尤其是致病性分枝杆菌之间种属联系的认识。研究表明,BCG基因组中仅存在一个或两个rRNA顺反子<sup>[9]</sup>;相反快生长类分枝杆菌(如耻垢分枝杆菌,*M. smegmatis*)基因组常包含6个以上的rRNA顺反子,并且常用RNA合成装置中的一半来合成rRNA,这些可解释分枝杆菌维持慢生长能力的部分原因,对于在致病机制中要求维持慢生长能力的分枝杆菌来说更是重要。另外,由于分枝杆菌培养费时费力,故找到早期诊断分

\* 国家自然科学基金资助课题。

收稿日期:1992-04-13 修回日期:1992-06-11