

技术与方法

琼脂糖凝胶直接杂交快速鉴定低拷贝数转基因

卢一凡 田 毅¹⁾ 邓继先

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

摘要 采用常规的 PCR 方法检测低拷贝数转基因有一定困难. 提出一种使用琼脂糖凝胶直接杂交的方法, 结果明确、简单可行, 是转基因动物中低拷贝数转基因鉴定的一种较好方法.

关键词 琼脂糖凝胶, 杂交, 低拷贝数基因, 转基因

学科分类号 Q78

转基因动物的建立, 为生命科学研究提供了新的有力工具. 然而由于该技术的建立涉及动物胚胎技术、转基因技术和常规的分子生物学技术等, 使其难度大增. 如何准确、快速鉴定所产生的动物是否整合有外源基因, 是转基因动物建立中一项极为关键的一步. 特别是整合拷贝数极低时, 检测难度大增. 有时往往会造成漏检. 本文报告了我们在转基因鼠的建立中, 探索出的一种快速鉴定低拷贝数转基因的方法.

1 材料和方法

1.1 显微注射片段及转基因小鼠的建立

转基因鼠的建立采用常规的显微注射法. 受精卵的获得以及卵的移植均按文献 [1] 进行. 转基因的构件为, 小鼠乳清酸蛋白 (WAP) 基因 2.6 kb 的调控序列、3 kb 结构基因及 1.4 kb 的 3' 区序列. 以人基因组 G-CSF 基因 1.5 kb 为目的片段, 将其插入 WAP 基因起始密码子 ATG 前的 *Kpn*I 位点, 构建 8.7 kb 的注射片段 (图 1).

1.2 转基因鼠的检测

采用 PCR 方法进行转基因鼠检测. 以剪取仔鼠尾提取 DNA 为模板^[2], 在基因组 G-CSF 基因第一和第二外显子上分别合成一段序列做为正向引物和反向引物. 引物 1: 5'-

CCATGGCTGGACCTGCCACCCAG-3'; 引物 2: 5'-GCGGTGGAACGGGTCTGGGACTCG-5'.

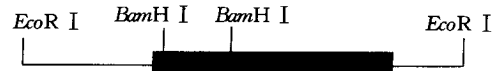


图 1 显微注射片段示意图

■: 人基因组 G-CSF 基因; ■: 鼠 WAP 结构基因

—: 鼠 WAP 基因 5' 和 3' 区.

1.3 琼脂糖凝胶直接杂交

a. 用 *Bam*HI (150 U) 对由假孕鼠产生的仔鼠剪尾提取基因组 DNA 10 μ g 酶切过夜, 取少量电泳检查酶切完全后, 上样电泳 8 h, 3~4 V/cm. b. 将电泳槽板连同凝胶置 50 $^{\circ}$ C 放置 3 h, 用镊子轻轻揭起凝胶, 放于变性液 (0.5 mol/L NaOH, 0.15 mol/L NaCl) 20 min, 转置中和液 (0.5 mol/L Tris·HCl, 0.15 mol/L NaCl) 20 min, 将胶放于玻璃板上沥干液体, 室温放置 30 min. c. 干胶应立即杂交. 先将胶在水中泡一下, 以利于操作. d. 将胶放入杂交液 (6 \times SSC, 5 \times Denhardt's, 0.25% SDS, 100 mg/L 鲑鱼精 DNA), 加入探针, 42 $^{\circ}$ C 杂交 16~20 h. e. 杂交完成后,

¹⁾ 中国医学科学院心血管病研究所, 北京 100037.

收稿日期: 1997-04-17, 修回日期: 1997-07-11

洗膜 8 轮, 42°C 每次 15 min. $2 \times \text{SSC} - 0.1\%$ SDS、 $1 \times \text{SSC} - 0.1\%$ SDS、 $0.1 \times \text{SSC} - 0.1\%$ SDS、 $0.1 \times \text{SSC} - 0.1\%$ SDS, 各洗两次. 在冰水中浸泡 2 min, 以利于盐的排出. f. 干燥后按检测试剂盒操作, 室温压片 0.5~2 h. 冲片照相.

使用的探针为 G-CSF cDNA, 探针的标记采用 Fluorescein-12-dUTP, 检测试剂盒为杜邦公司产品, 操作按试剂盒说明书进行.

2 结果和讨论

电泳后经处理的琼脂糖凝胶直接用于杂交的结果见图 2.

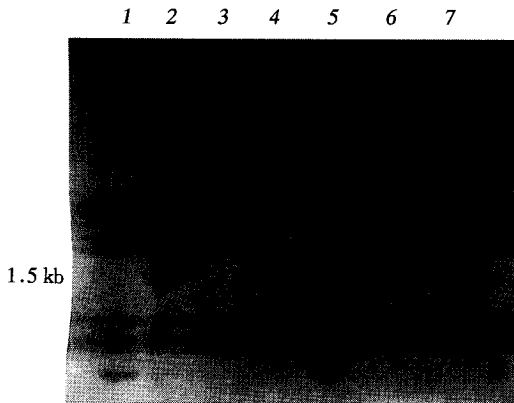


图 2 琼脂糖凝胶直接杂交

1: λ DNA/*Hind*III Marker (用 Fluorescein-12-dUTP 标记, 检测按试剂盒说明进行); 2: 阳性对照 (G-CSF 基因组 DNA 克隆至 pUC19, 用 *Bam*HI 酶切, 切出约 1.5 kb 的 G-CSF 和载体片段, 参见图 1); 3: 非转基因鼠; 4: 多拷贝转基因鼠; 5: 多拷贝数转基因鼠; 6: 多拷贝数转基因鼠; 7: 低拷贝数转基因鼠.

由图 2 中可见, 用这一方法获得的结果, 4、5、6 在 1.5 kb 有明显的特征带, 说明在这些小鼠的基因组中整合有人 G-CSF 基因. 7 的信号较弱, 可以证实其拷贝数较低. 对所检测的小鼠提取基因组 DNA 为模板做 PCR 检测的结果表明, 4、5、6 号样品能扩增出特异的片段, 而 7 号样品却未能扩增出结果. PCR 扩增结果见图 3.

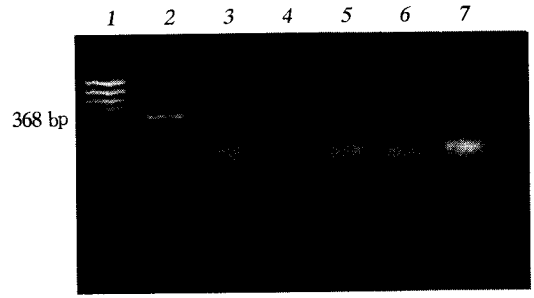


图 3 PCR 扩增鉴定转基因鼠

1: PCR Marker; 2: 阳性对照; 3: 阴性对照; 4: 多拷贝转基因鼠; 5: 多拷贝转基因鼠; 6: 多拷贝转基因鼠; 7: 低拷贝数转基因鼠 (未见扩增产物).

PCR 扩增是筛选转基因鼠中常用的方法, 然而从小鼠复杂的基因组中扩增低拷贝数基因具有较大的困难, 往往因扩增不出特异带而将样品做为阴性结果淘汰, 丢失了可能获得结果的宝贵材料. 我们所提出的用琼脂糖凝胶直接杂交的方法, 较好地解决了低拷贝数转基因的检测问题, 结果不仅直观, 而且特异性好. 与常规的 DNA 印迹相比, 它所具有的优势是省略了将 DNA 进行膜转移的步骤, 从而避免了因转膜不完全所造成的 DNA 量的损失, 特别是低拷贝数转基因的丢失. 另一方面, 也使复杂的 DNA 印迹操作程序大大简化. 因此, 在转基因鼠的鉴定中, 将此方法结合 PCR 方法一起使用, 是防止低拷贝数转基因漏检的一种可行途径.

尽管本文提出的检测方法有许多优越性, 但仍须注意一些问题. 在操作上, 电泳后要对凝胶及时处理使凝胶干燥, 以防凝胶中 DNA 扩散, 导致结果难以确定, 电泳时隔孔上样是解决这一问题的一个可行方法. 其次, 琼脂糖的质量应该较好, 尤其是不应含有内切酶的存在, 否则有时将使低拷贝数基因的杂交结果难以解释.

参 考 文 献

- 1 Hogan B, Costantini F, Lacy E. Manipulating the mouse embryo. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1986. 81~197

2 Abbott C, Povey S, Vivian N *et al.* PCR as a rapid screening method for transgenic mice. *TIG*, 1988, 22 (4): 325

A Rapid Method of Identifying Low Copy Number Transgene Using Agarose Gel Hybridization. LU Yifan, TIAN Chai¹⁾, DENG Jixian (*Institute of Biotechnology, Academy of Military Medicine, Beijing 100071, China;* ¹⁾ *Cardiovascular Institute and Fuwai Hospital, Beijing Union Medical University & Chinese*

Academy of Medical Sciences, Beijing 100037, China).

Abstract There are a lot of difficulties using PCR method to identify low copies of exogenous gene in transgenic animal. A method of agarose gel direct hybridization was established. A fast and easy method to identify low copy transgenes in transgenic animal is provided.

Key words agarose gel, hybridization, low copy number of gene, transgenic animal

pZ189 质粒 DNA 体外复制系统的建立

冯朝晖 余应年 陈星若

(浙江医科大学病理生理教研室, 杭州 310031)

摘要 报道了含 SV40 复制起点的质粒 DNA 在真核细胞抽提物中进行复制的 DNA 体外复制系统的建立. 在外源性蛋白质 SV40 大 T 抗原 (SV40 Tag) 的参与下, 穿梭质粒 pZ189 能在猴肾 vero 细胞胞浆抽提物中, 利用其中参与体内 DNA 复制所需的蛋白质成分, 有效地进行体外 DNA 复制. 从而为研究真核细胞 DNA 复制系统的结构与功能提供了简单、有效的模型.

关键词 穿梭质粒, 真核细胞, DNA 复制系统, 体外, SV40 大 T 抗原

学科分类号 Q785

真核细胞 DNA 复制是重要的生物学现象, 对其复制系统具体结构与功能的研究具有重要的理论和实践意义. DNA 体外复制系统在排除了体内许多与 DNA 复制非直接相关的因素影响的情况下, 为研究真核细胞内复杂的 DNA 复制系统提供了一个简单、有效的模型. 研究证实, 在外源性蛋白质 SV40 Tag 的参与下, 在猴肾细胞 (CV1、Cos 等) 和人类细胞 (HeLa 等) 胞浆抽提物中, 含 SV40 复制起点的质粒 DNA 能利用抽提物中参与体内 DNA 复制所需的蛋白质成分, 模拟体内 DNA 复制过程, 有效、准确地进行 DNA 体外复制^[1,2]. 我们利用 pZ189 质粒, 在猴肾 vero 细胞胞浆抽提物中, 建立了有效的 DNA 体外复制系统.

1 材料与方法

1.1 质粒 DNA 模板

pZ189 质粒为一 5 504 bp 的穿梭质粒, 含有 SV40 和 pBR327 复制起点^[3]. 质粒在 *E. coli* MBM7070 菌株中扩增并纯化.

1.2 细胞胞浆抽提物的制备

单层生长的 vero 细胞培养于 DMEM 液中, 加 10% 小牛血清. 收获呈指数级生长的细胞 (7×10^7 细胞). 在 4℃ 条件下进行以下操作. 溶液 PBS 漂洗细胞, 离心 $500 \times g$, 5 min, 以沉淀细胞. 在冰冷的低渗液 A (20 mmol/L HEPES·KOH, pH 7.5, 5 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L DTT) 中