

技术与方法

MAPPING 重组噬菌体中插入片段的
“分/合”策略*戴旭明 薛红¹⁾ 杨桦 胡以平 傅继梁²⁾

(第二军医大学医学分子遗传学开放实验室, 上海 200433)

摘要 随着胚胎干细胞基因打靶技术不断推广应用, 如何有效地从小鼠基因组 DNA 文库中筛选得到基因组 DNA 并进行结构分析 (如限制性内切酶酶切图谱分析, 即 mapping 等) 已成为一个被普遍关心的问题. 设计应用了“分/合”的策略, 即先对重组噬菌体插入片段制备一套亚克隆, 在对亚克隆进行详细的 mapping 的基础上, 再对完整的大分子噬菌体 DNA 进行酶切分析, 将两者相结合, 可以分析得到完整的酶切图谱. 应用此策略, 简便准确地对所克隆的含有小鼠凝血因子 IX 基因组 DNA 的大分子插入片段进行了限制性内切酶酶切图谱分析, 结果得到了 DNA 印迹等的验证.

关键词 限制性内切酶酶切图谱分析, 重组噬菌体, “分/合”策略, 基因打靶

学科分类号 Q78

基于 DNA 同源重组机制的基因打靶技术, 已成为人为地改造或修饰动物基因组的结构和组成的有效手段, 并正在被越来越广泛地应用^[1]. 基因打靶载体的构建是实验成败的关键. 常用的基因打靶置换型载体的结构通常包括同源臂 (长臂和短臂)、正向选择基因、负向选择基因等基本结构, 其中同源臂的选用直接影响同源重组的频率. 从现有的文献看, 用作同源臂的基因组 DNA 都是从小鼠基因组 DNA 噬菌体文库中筛选得到的, 这一过程也就成了基因打靶实验的一个最基础的工作. 如何有效地进行噬菌体文库的筛选和插入片段的结构分析, 也便成了一个普遍关心的问题. 我们结合现有的实验条件, 设计了基于多种内切酶组合并完全酶切后分析的“分/合”策略, 对所克隆的含有小鼠凝血因子 IX 基因组 DNA 的重组 λ 噬菌体插入片段进行了限制性酶切图谱分析, 结果经 DNA 印迹验证, 证实这一方法是简便、易行且可靠的, 值得推广应用.

1 材 料

1.1 主要材料

1.1.1 基因组文库: 129Sv 小鼠基因组 DNA 噬菌体文库 (λ 2001 载体, 基因组 DNA 经 *Xho* I / *Bam* H I 不完全酶切后经 CsCl 梯度离心分离得到 20 kb 左右的片段为插入片段).

1.1.2 质粒: pBluescript SK⁺ (Stratagene 公司) 本室保存.

1.1.3 菌株: 大肠杆菌 DH5 α 由本室保存.

1.2 主要试剂

1.2.1 常用酶类: 限制性内切酶 (*Bam* H I、*Eco* R I、*Hind* III、*Kpn* I、*Cla* I、*Sac* I、*Sal* I、*Sfi* I、*Xba* I、*Xho* I 等), T4 DNA

* 上海市生命科学研究课题 (95JC14009)、国家自然科学基金课题 (39680021)、军队九五重点攻关课题资助 (96Z033).

¹⁾ 香港科技大学生物化学系.

²⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1997-07-31, 修回日期: 1997-11-16

连接酶, 碱性磷酸酶 (CIP) 等分别购自 Gibco, Promega, Biolab, Bohring Mannhan, USB 等公司.

1.2.2 常用分子生物学试剂: 低融点琼脂糖, 琼脂糖, 生物琼脂, 酵母浸出粉, 蛋白冻, 麦芽糖, NZCYM 粉, 鲑精 DNA 等分别购自 Oxid, Sigma, Gibco, Biorad 等公司.

1.2.3 放射性同位素: $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP, ^{32}P -dATP 分别从 Amersham 公司和北京亚辉生物技术公司订购. Wizard Plasmid DNA MiniPrep 购自 Promega 公司; Ready-to-Go DNA Labelling System 购自 Pharmacia 公司.

1.3 方法

1.3.1 鸟枪法制备噬菌体克隆插入片段的亚克隆: 噬菌体 DNA 用 *Bam*H I 单酶切后, 酶切产物经酚/氯仿, 氯仿抽提和酒精沉淀, 载体 pBluescript SK⁺ 进行和上述相同的酶切, 酶切后载体的去磷酸化并抽提纯化, 按适当的比例将两者混合, 用 20 μl 体系进行连接反应, 连接后用常规方法进行转化, 涂板在含有 X-gal/IPTG 的琼脂平板上, 将所有白色菌落挑取, 小量制备质粒 DNA, 酶切鉴定重组子插入片段的大小. 由于噬菌体载体长臂和短臂各有一个末端不适于连接重组, 在重组子中不会出现这两段 DNA 插入后的克隆, 而酶切噬菌体克隆中插入片段所得的各种大小的片段都以一定的比例出现在重组子中, 通过一定数量重组子的筛选, 可以得到完整的一组亚克隆.

1.3.2 限制性内切酶酶切图谱分析: 用单酶/双酶组合完全酶切分析法进行 DNA 片段的酶切图谱分析: a. DNA 上酶切位点数为 n 时, 线性 DNA 可得到 $n+1$ 个酶切片段; 环状 DNA 则得到 n 个片段; b. 利用载体上已知有切点的限制性内切酶有助于酶切位点的分析; c. 结合单酶切和双酶切的结果综合分析, 可以得到各酶的切点位置; d. 酶切反应和凝胶电泳按常规操作进行; e. 先选用能使重组噬菌体 DNA 酶切明确得到 3~4 个片段 (不包括长臂和短臂) 的内切酶, 酶切后制备

pBluescript SK⁺ 载体的亚克隆, 对各亚克隆中的插入片段按上述策略作酶切图谱分析, 再将完整的重组噬菌体 DNA 作相应内切酶的单酶切和两两组合双酶切, 结合亚克隆酶切图谱, 可以综合分析得到重组噬菌体插入片段的酶切图谱 (分/合策略流程图见图 1).

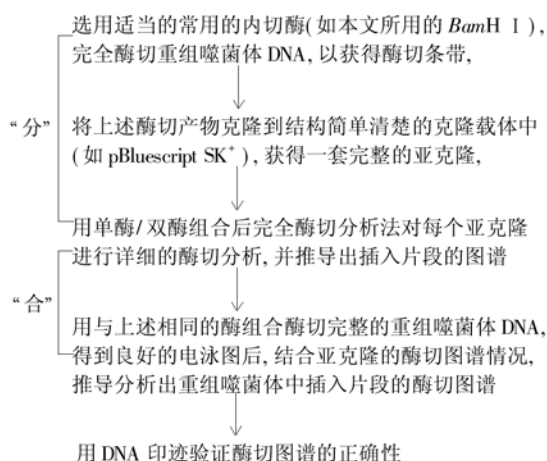


图 1 “分/合”策略的流程示意图

1.3.3 酶切反应和琼脂糖凝胶电泳: 按常规方法进行^[2].

1.3.4 DNA 印迹鉴定酶切图谱分析: DNA 转移用 Pharmacia VacuGeneTM XL Vacuum Blotting System 按说明书进行; 探针标记用 Pharmacia 公司 Ready-to-go kit 按试剂盒说明书进行; 杂交反应用杂交仪按常规方法进行.

2 结果

2.1 “分”——亚克隆制备和酶切分析

2.1.1 亚克隆的制备: 经过多次重复酶切和琼脂糖凝胶电泳, 结果都一致显示所选噬菌体 DNA *Bam*H I 酶切可出现六条带, 其中 20 kb 左右和 9 kb 左右条带分别是 λ 2001 载体的长臂和短臂; 插入片段得到四个 *Bam*H I 片段 (长度大约在 8.0 kb、3.5 kb、3.4 kb、3.0 kb 左右) (图 2a). 为了完整地亚克隆所有 *Bam*H I 片段, 采用鸟枪法进行, 筛选得到四个亚克隆质粒 (图 2b、c).

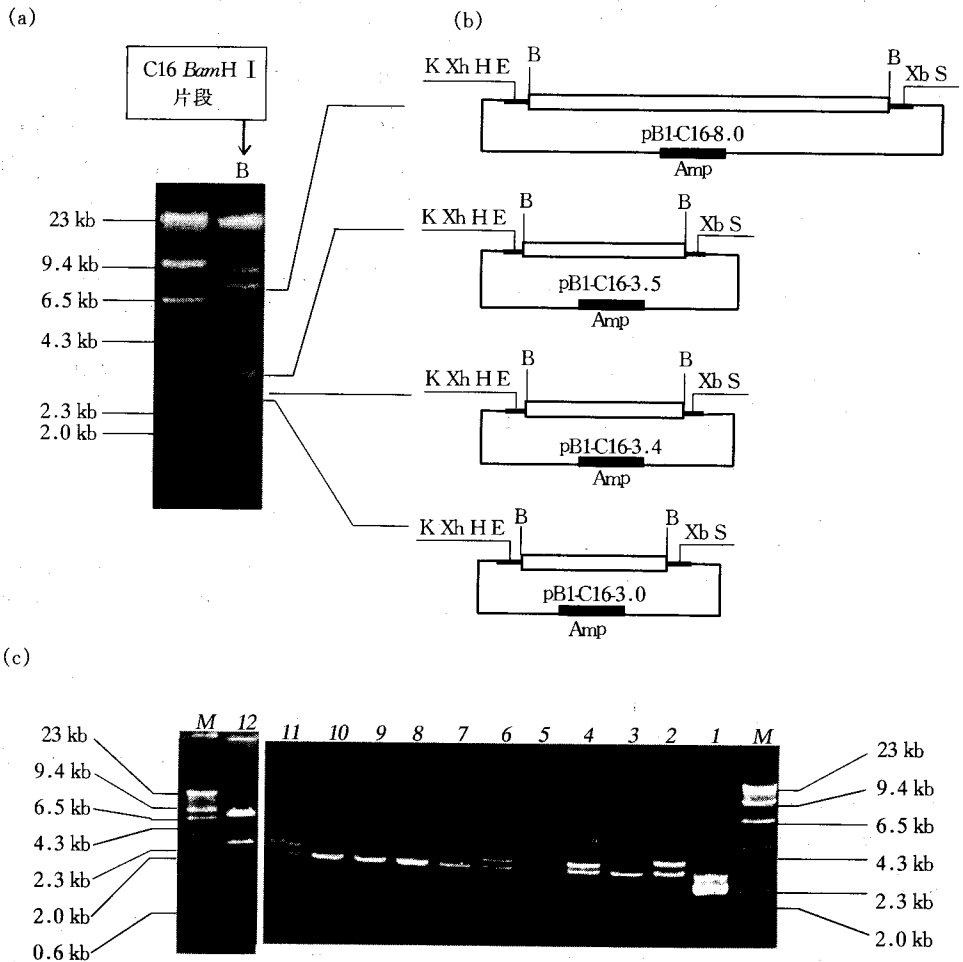


图2 鸟枪法对重组噬菌体 DNA 插入片段进行亚克隆

(a) C16 DNA 经 *Bam*H I 完全酶切后得到 6 个片段; (b) 四个亚克隆的预期结构图; (c) Amp^r 和 IPTG/X-gal 显色系统中的白色菌落中质粒 DNA 用 *Bam*H I 酶切鉴定结果 (1: pBluescriptSK⁺ DNA; 2, 11: pBl-C16-3.5;

4, 5, 6: pBl-C16-3.4; 3, 7, 8, 9, 10: pBl-C16-3.0; 12: pBl-C16-8.0)。

2.1.2 对每个亚克隆进行限制性内切酶酶切图谱分析: 将大分子的基因组插入片段用 *Bam*H I 酶切并亚克隆到结构清楚简单的 pBluescript SK⁺ 载体后, 用 *Bam*H I (B)、*Eco*R I (E)、*Hind* III (H)、*Kpn* I (K)、*Xba* I (Xb) 和 *Xho* I (Xh) 等酶进行酶切, 详细分析各个亚克隆的酶切图谱, 图 3 显示从酶切电泳图结果推导出的四个亚克隆质粒 pBl-C16-8.0 (图 3a)、pBl-C16-3.5 (图 3b)、pBl-C16-3.4 (图 3c) 和 pBl-C16-3.0 (图 3d) 的酶切图谱, 原始的酶切电泳结果本文略。

2.2 “合”——完整噬菌体 DNA 的酶切分析

在分析获得各亚克隆的详细酶切图谱之后, 用完整的噬菌体 DNA 进行相同内切酶组合的酶切分析, 根据酶切电泳结果图和亚克隆的酶切图谱, 可以推导出完整噬菌体插入片段的酶切图谱。

2.3 酶切图谱的鉴定

为了验证酶切图谱制备是否正确, 用 DNA 印迹方法进行鉴定。图 4c 中显示了探针的结合部位。图 5 中, 1~4 阳性带大小分别为 5.3 kb、22 kb、6.2 kb、3.0 kb, 与预期的

结果相吻合, 其中 *EcoR* I 酶切结果 (图 5 中 3 泳道), 杂交信号有三条带, 可能是酶切不完全所致, 但其中最小的片段约为 6.2 kb, 与

据酶切图谱推测的 *EcoR* I 片段相当, 这些结果都进一步验证了所得图谱.

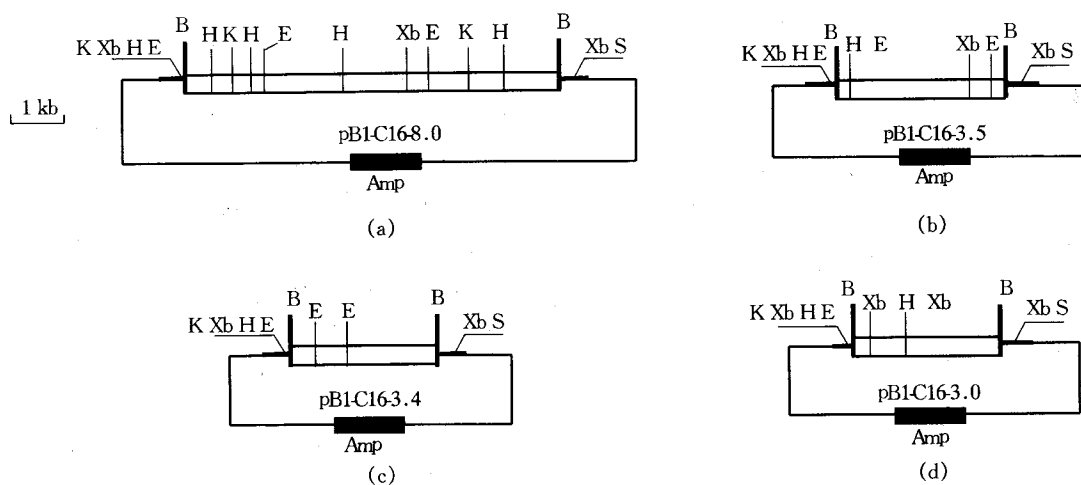


图 3 四个亚克隆的酶切图谱

(a)、(b)、(c) 和 (d) 分别是亚克隆 pBl-C16-8.0, pBl-C16-3.5, pBl-C16-3.4, pBl-C16-3.0 的图谱.

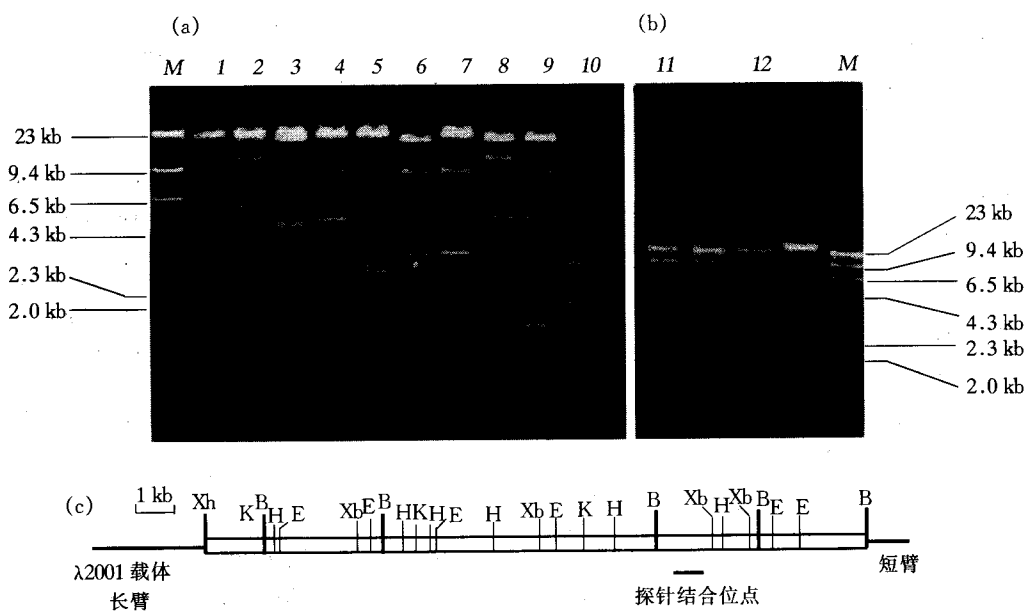


图 4 完整噬菌体 DNA (C16 克隆) 的酶切图谱分析

(b) 为酶切电泳图, M: λ /HindIII; 1: B; 2: E; 3: K; 4: Xb; 5: E/B; 6: B/K; 7: B/Xb; 8: E/K; 9: E/Xb; 10: Xb/K; 11: B/Xh; 12: B, (c) 为推导出的 C16 噬菌体插入片段的酶切图谱.

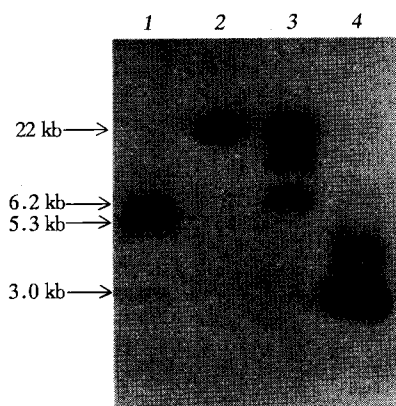


图5 酶切图谱分析的 DNA 印迹验证

C16重组噬菌体DNA分别被 *Xb* (1), *K* (2), *E* (3) 和 *B* (4) 酶切。

3 讨 论

对重组噬菌体 DNA 插入片段中目的基因结构的初步分析通常包括限制性内切酶酶切图谱分析和外显子定位等^[3]。限制性内切酶酶切图谱分析常用的方法是直接将重组 DNA 用选用的内切酶作不完全酶切，走低浓度琼脂糖凝胶电泳或适合于大分子 DNA 片段分析的脉冲场凝胶电泳 (PFGE)，并用噬菌体载体两臂中的片段作探针，进行 DNA 印迹实验，根据所得片段的大小，即可推测出内切酶酶切位点的数量和位置。这一方法结果可靠，但部分酶切的条件较难掌握，由于部分酶切后的噬菌体 DNA 通常有较大的分子质量 (20~50 kb)，普通的凝胶电泳较难得到理想的分离效果，而脉冲场电泳要求有专门的设备，所以本实验未采用此法。我们的方法是通过单酶和双酶完全酶切相结合进行组合分析的方法。该法简便易行，也是行之有效的。鉴于要分析的重组噬菌体 DNA 分子较大，我们在将大分子的插入片段进行有效的亚克隆，利用“先分后合” (separating/combining) 的策略，先对各亚克隆进行分析。由于各亚克隆中插入片段大小适中 (3~8 kb)，所用载体 pBluescript SK⁺ 结构清楚简单，适宜于对酶切结果的分析，比较方便地得到了四个 *Bam*HI 亚克隆的酶切图谱。

在此基础上，用完整噬菌体 DNA 作酶切分析，得到较清晰的电泳结果后，结合亚克隆的图谱，可以排列出完整的图谱。后续利用所得到的该含有小鼠凝血因子 IX 基因组 DNA 的噬菌体 DNA 进行基因打靶载体构建和 ES 细胞中基因打靶研究的实验结果也证实了这一图谱。从现有的文献看，用于基因打靶载体构建的基因组 DNA 都是从小鼠基因组 DNA 噬菌体文库中筛选得到的，这一过程也就成了通常基因打靶研究的一个最基础的工作之一^[4~6]。如何有效地进行噬菌体文库的筛选和插入片段的结构分析，也便成了一个普遍关心的问题。所以，“先分后合”的策略是一种简便有效的方法，值得推广应用。

参 考 文 献

- 1 Hooper M L. Embryonic stem cells: introducing planned changes into the animal germline. Switzerland: Harwood Academic Publishers, 1992. 1~4
- 2 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a Laboratory Manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989. 237~316
- 3 Seidman J G, Moore D D, Weis J H *et al.* Construction of recombination DNA libraries. *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, 1 (suppl 29): 5.10.1~5.10.2
- 4 Joyner A L. Gene targeting: A practical approach. Oxford: Oxford University Press, 1993. 14~20
- 5 Riele te H, Robanus-Maandag E, Berns A. Highly efficient gene targeting in embryonic stem via homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89 (11): 5128~5132
- 6 Johnson R S, Sheng M, Greenberg M E *et al.* Targeting of nonexpressed genes in embryonic stem cells via homologous recombination. *Science*, 1989, 245 (4923): 1234~1236

“Separating/Combining” Strategy for Restriction Mapping the Large Genomic Insert in Recombinant Phage Vector. DAI Xu-ming, XUE Hong¹⁾, YANG Hua, HU Yi-ping, FU Ji-liang (Open Laboratory of Medical Molecular Genetics, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; ¹⁾ Department of Biochemistry, Hong Kong University of Science and Technology, Hong Kong, China).

Abstract As the expanding of application of ES cell gene targeting technique, cloning and structural analysis of genomic DNA for phage library for homologous fragments in targeting vector are becoming more and more important. An effective strategy has been developed, termed as “separating/combining” strategy, to make restriction mapping of large genomic insert in recombinant phage vector. In this strategy, a set of subclone with commonly used plasmid vector, such as pBluescriptTM series, was generated as

first step, restriction mapping of each subclone was analyzed and then, digested the whole length phage DNA and analyzed the restriction site combined with the mapping of subclones. An accurate restriction mapping of a large insert of a phage clone, which contain mouse coagulation factor IX gene, was generated successfully with this strategy.

Key words restriction mapping, recombinant phage clone, “separating/combining” strategy, gene targeting

单细胞 LDL 受体与清道夫受体活性的同时测定*

边 欣 杨小毅 黄有国¹⁾

(中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 结合应用激光扫描共聚焦显微镜系统 (LSCM) 和 DiI-AcLDL 及 BODIPY FL-LDL 两种荧光配基选择性标记技术, 可在单细胞水平上同时测定 LDL 受体和清道夫受体活性. C57BL/6J 小鼠巨噬细胞用终浓度为 5mg/L 的 DiI-AcLDL 及 BODIPY FL-LDL, 在 37℃ 负载 5 h 左右的条件下可获得良好的标记效果. 两种荧光配基选择性标记具有高度特异性, 在激光共聚焦显微镜下可清晰、定量地观察细胞对 LDL 和 AcLDL 摄入, 是一种灵敏度高且可定量研究 LDL 受体和清道夫受体功能的非同位素方法.

关键词 激光扫描共聚焦显微系统, 荧光选择标记, 低密度脂蛋白受体, 清道夫受体

学科分类号 Q73, Q6-33

生理条件下, 低密度脂蛋白受体 (LDL 受体) 广泛地分布于肝、动脉壁细胞等各组组织细胞膜表面, 当血浆中的 LDL 与其受体结合后, 经受体介导的内吞作用进入细胞中, 并与溶酶体结合. 而 LDL 被摄入量的多少取决于 LDL 受体的活性. 因此 LDL 受体对维持血浆中的 LDL 浓度发挥重要作用. 某些家族性高脂血症患者, 由于 LDL 受体基因遗传性缺损导致细胞不能从血液中摄取 LDL, 使血液中胆固醇水平升高, 从而引发严重的动脉粥样硬化. 另一方面, 体内多种原因都可以导致脂蛋白的修饰, 如血液脂质过氧化物含量增加、内皮细胞的受损和血管平滑肌细胞的增殖, 而巨

噬细胞又可以通过其表面的清道夫受体活跃地吞噬这种修饰后的脂蛋白, 使细胞内大量胆固醇脂聚积成为泡沫细胞^[1], 构成动脉粥样硬化早期最重要的病理变化. 因此, 同时测定 LDL 受体与清道夫受体 (AcLDL 受体) 活性的变化具有重要的生理学和病理学意义. 迄今, 研究 LDL 受体与清道夫受体活性主要是用放射性同位素¹²⁵I 作为示踪剂分别检测群体细胞 LDL 受体与清道夫受体活性^[2]. 近年来, 激光扫描共聚焦显微镜系统 (laser scanning

* 国家自然科学基金资助项目 (39730130).

¹⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1997-12-04, 修回日期: 1998-06-09