

- mercatoethanol dependent differentiated insulin secreting cell lines. *Endocrinology*, 1992, 130 (1): 167~ 178
- 10 Sekine N, Fasolate C, Pralong W F, *et al.* Glucose induced insulin secretion in INS-1 cells depends on factors present in fetal calf serum and rat islet-conditioned medium. *Diabetes*, 1997, 46 (9): 1424~ 1433
- 11 Mclean J S. Improved techniques for immortalizing animal cells. *TIBTECH*, 1993, 11 (3): 232~ 238
- 12 Dueschle U, Pepperkok R, Wang F, *et al.* Regulated expression of foreign genes in mammalian cells under the control of coliphage T3 RNA polymerase and Lac repressor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86 (11): 5400~ 5404
- 13 Efrat S, Fuscó-Demant D, Lemberg H, *et al.* Conditional transformation of a pancreatic β -cell line derived from transgenic mice expressing a tetracycline regulated oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92 (8): 3576~ 3580
- 14 Hughes S D, Quaade C, Johnson J H, *et al.* Transfection of AtT-20ins cells with GluT-2 but not GluT-1 confers glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem*, 1993, 268 (20): 15205~ 15212
- 15 Stewart C, Taylor N A, Green I C, *et al.* Insulin-releasing pituitary cells as a model for somatic cell gene therapy in diabetes mellitus. *J Endocrinology*, 1994, 142 (2): 339~ 343
- 16 Simpson A M, Marshall G M, Tuch B E, *et al.* Gene therapy of diabetes: glucose-stimulated insulin secretion in a human hepatoma cell line (HEP G2ins/8). *Gene Ther*, 1997, 4 (11): 1207~ 2215
- 17 Gros L, Montoliu L, Riu E, *et al.* Regulated production of mature insulin by non- β cells. *Hum Gene Ther*, 1991, 8 (18): 2249~ 2259
- 18 Lu D, Tamemoto H, Shibata H, *et al.* Regulatable production of insulin from primary-cultured hepatocytes: insulin production is up-regulated by glucagon and cAMP and down-regulated by insulin. *Gene Ther*, 1998, 5 (7): 888~ 895
- 19 Kaneda Y, Iwal K, Uchida T. Introduction and expression of the human insulin gene in adult rat liver. *J Biol Chem*, 1989, 264 (16): 12126~ 12129
- 20 Kolodka T M, Finegold M, Moss L, *et al.* Gene therapy for diabetes mellitus in rats by hepatic expression of insulin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92 (8): 3293~ 3297
- 21 李秀钧, 董砚虎, 程丽霞, 等. 糖尿病研究进展——第16届国际糖尿病联盟大会纪要. *中华内分泌代谢杂志* (Li X J, Dong Y H, Cheng L X, *et al.* *Chinese Journal of Endocrinology and Metabolism*), 1998, 14 (1): 72~ 77
- 22 Efrat S. Prospects for gene therapy of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologies*, 1998, 41 (12): 1401~ 1409
- 23 Bailey C J, Davie E L, Docherty K. Prospects for insulin delivery by *ex-vivo* somatic cell gene therapy. *J Mol Med*, 1999, 77 (1): 244~ 249

Progress in the Studies of Gene Therapy for Diabetes Mellitus. ZHANG Shu-Yun, GE Wei (*Hangzhou Sanatorium of PLA, Hangzhou 310007, China*); QIAN Kai-Xian (*Department of Biology, Zhejiang University, Hangzhou 310025, China*).

Abstract That advances in gene transfer technology have led to the investigation of molecular strategies for replacement of normal insulin delivery function. Substantial progress has been made in engineering glucose-responsive β -cell lines and non- β -cell lines. *In vivo* transfer the insulin gene to animals can improved control of the diabetes. New therapeutic approaches to diabetes which are based on gene technology and implications for future are summarized.

Key words gene therapy, insulin, diabetes mellitus

BAC-FISH 在植物基因组研究中的应用*

覃 瑞 魏文辉 宋运淳

(武汉大学发育生物学研究中心, 武汉 430072)

摘要 细菌人工染色体与荧光原位杂交合成技术 (BAC-FISH) 是 90 年代开始发展起来的一种新的定位技术. 由于该技术较常规荧光原位杂交 (FISH) 技术的信号检出率高得多, 近年来在植物基因组研究中得到了越来越多的应用. 运用该技术已将一些重要的功能基因定位到相应植物染色体上.

关键词 细菌人工染色体与荧光原位杂交合成技术, 植物基因组, 原位杂交, Cot-1 DNA

学科分类号 Q343.2

DNA 荧光原位杂交 (fluorescence *in situ* hybridization) 是 80 年代末开始发展起来的一种重要的非放射性标记原位杂交技术. 用不同非放射性标记物标记的核苷酸分子 (如 digoxigenin-11-dUTP 或 biotin-11-dUTP) 制备探针, 再用不同的

荧光素分子耦联, 通过激发荧光检测不同的探针分子, 可以对多个 DNA 探针在一张切片上进行同时

* 国家自然科学基金 (207982333) 和国家教委博士点基金 (207980112) 资助项目.

Tel: (027) 87684505, E-mail: ycsong@whu.edu.cn

收稿日期: 1999-01-20, 修回日期: 1999-05-20

定位^[1].

在植物基因组研究中, 原位杂交 (*in situ* hybridization) 技术原主要用于对 DNA 重复序列和多拷贝基因家族作图^[2]. 植物单或低拷贝基因原位杂交技术的应用远较人和动物缓慢. 其重大障碍是植物细胞壁影响着探针与靶 DNA 序列的接触; 此外, 单或多拷贝基因常为 1 至数 kb 小片段 DNA, 其探针与靶 DNA 序列相遇的机会较小, 因此杂交信号检出率较低. 近年来, 这两个问题已逐步得到解决. 采用原生质体制片技术, 消除细胞壁的影响, Song 等^[3]将多个 1 kb 左右的水稻 RFLP 单拷贝标记杂交定位到了染色体上. 此外, 扩大探针与杂交位点相遇的机会依赖于来自大片段克隆的探针的使用. 1992 年 Shizuya^[4]以大肠杆菌 F 因子为基础构建 BAC (bacterial artificial chromosome) 的载体 pBAC108L. 克隆的外源片段一般为 100 kb 左右. 因此采用 BAC 克隆作为探针进行染色体原位杂交较单或低拷贝小片段 DNA 序列更为容易, 而且准确可靠, 从根本上克服了过去单拷贝 DNA 杂交的困难. 将 BAC 克隆与具有高灵敏度的 FISH 技术结合成为一种新的原位杂交技术, 即细菌人工染色体与荧光原位杂交合成技术 (BAC-FISH), 无疑将大大促进植物基因组的研究. 运用该技术, 已将抗白叶枯病基因 *Xa21*^[5], 棉花 rRNA 基因^[6]、抗稻瘟病 *Pi5* (t)、抗绿叶蝉基因 *Glh* 和抗水稻黄萎病 *RTSV*^[7]成功地定位到染色体上, 揭示了 BAC-FISH 这种新技术的应用前景. 随着该技术不断发展及完善, BAC-FISH 将成为植物基因组研究中一种重要技术.

1 BAC-FISH 技术简介

常规 FISH 技术包括探针的标记及纯化、探针与染色体的杂交、信号检测三个主要步骤. BAC-FISH 技术的方法在此基础上增加了 Cot-1 DNA 的制备和 Cot-1 DNA 对探针的封阻两个重要步骤^[8].

1.1 Cot-1 DNA 的制备

由于许多植物基因组中含有很高比例的重复序列, 如水稻、玉米、小麦、黑麦及柠檬, 其百分比分别为 50%、78%、83%、92%、95%^[9,10]. 亲缘关系较近物种的特异性重复序列可能有很大的不同, 亲缘性较远的物种能有相似的特异性重复序列, 如端部重复序列及 rRNAs^[11,12], 重复序列的存在, 会影响原位杂交的分析以及影响染色体信号观察, 造成假阳性信号, 严重干扰来源于较大片段

克隆的探针在染色体原位杂交中的应用. Cot-1 DNA 仅仅富含高度和中度 DNA 重复序列, 不含有单及低拷贝序列, 其动力学原理参见文献 [13]. 在 BAC-FISH 中运用 Cot-1 DNA 对基因组 DNA 进行竞争性杂交, 封阻 (block) 探针中的重复序列, 从而避免探针中的重复序列与基因组 DNA 中的重复序列产生非特异性结合. Yan 等^[7]用与 *Pi5* (t) 等基因连锁的 BACs 克隆原位杂交结果表明, 用 Cot-1 DNA 封阻相对于不用 Cot-1 DNA 封阻能大大降低重复序列对杂交的干扰, 减少了杂交背景信号, 保证了实验结果更为精确可靠. 因此, Cot-1 DNA 在 BAC-FISH 中的使用是非常必要的.

Cot-1 DNA 制备的常用方法是以超声波或高压灭菌方法将提纯的植物基因组 DNA 打断至 100 bp 到 1000 bp 的长度, 根据 DNA 动力学公式 $Cot = 1 = \text{mol/L} \times T_s$ ^[13], 计算所需 Cot-1 DNA 完全复性的时间. 由于高度重复序列和中度重复序列比低或单拷贝序列复性快得多, 因此退火后经一定的时间, 即 Cot-1 DNA 完全复性的时间, 利用 S1 核酸酶特异性地切除尚未复性的单或低拷贝序列, 从而可得到所需的 Cot-1 DNA.

1.2 Cot-1 DNA 对探针的封阻

最佳的封阻 (block) 效果决定于 Cot-1 DNA 与探针的浓度比例. 已标记好的 BAC 克隆探针与适当比例的 Cot-1 DNA 在含有去离子甲酰胺、硫酸葡聚糖和盐的杂交液中于 37 °C 下预退火 60 min, 以封阻 BAC 克隆中的重复序列, 再用于杂交.

2 BAC-FISH 技术的优点

BAC-FISH 技术与常规 FISH 技术相比, 除具有一般 FISH 的优点外, 还具有以下几个特点.

首先, 从探针的来源看, BAC 克隆的外源 DNA 插入片段较大, 一般在 50 kb 至 350 kb 之间, 平均长度为 100 kb 左右^[14]. 以前的报道用于植物单或低拷贝基因原位杂交的探针多不超过 10 kb, 大部分在 1 kb 左右^[7]. BAC 克隆的 DNA 插入片段长于质粒 (plasmid, 7~10 kb)、噬菌体 (bacteriophage, 17~20 kb)、粘粒 (cosmid, 35~47 kb) 等载体^[15], BAC 插入片段长, 只需要较少的克隆数便可覆盖整个基因组 (contig). 有利于构建真核生物基因组的物理图谱 (physical map) 和遗传图谱 (genetic map). 此外, BAC 克隆自身特点也决定了它作为探针在基因组研究中的广泛应用: a. BAC 克隆在宿主菌中拷贝数只有 1 至 2 个,

可稳定遗传; b. 缺失、重组及嵌合现象很少; c. BAC 以大肠杆菌为宿主, 转化效率高, 电转化可达到 10^9 转化子每微克 DNA; d. 易于提取, 采用一般碱变性法即可制备探针; e. 插入片段可用脉冲电泳 (pulsed field gel electrophoresis, PFGE) 进行分析^[4].

BAC 克隆平均长度在 100 kb 左右, 远远高于过去用于植物染色体原位杂交的 RFLP 等探针长度, 从而决定了 BAC 更易于与靶序列杂交, 因而, 杂交信号检出效率得到很大的提高. 根据以前的报道, 在原位杂交中染色体上的杂交信号的连接范围在 1 Mb 左右, 100 kb 的探针与 1 kb 左右的探针杂交结果的信号连接范围基本相同, 也在 1 Mb 左右^[7]. 因此 BAC-FISH 也不会降低定位的精确度. Jiang 等^[5]曾报道在间期核及中期分裂相中的信号检出率为 50%~90%, Yan 等^[7]对 Pr-5 (t), Glh 及 RTSV 的 BAC 克隆原位杂交定位信号检出率分别达到 46.8% 和 59.2%, 远高于过去的 RFLP (约 6%)^[3]等探针.

此外, 用 FISH 技术在植物基因组研究中的另一限制因素是体细胞染色体的分辨率 (resolution), 即两个不同 DNA 探针能够被检测到的最小距离, 它决定分子图谱的准确性和精密程度. 在决定 FISH 分辨率的因素中, 最重要的是所使用的靶 DNA 在染色体或 DNA 纤维上的浓缩度 (condensation)^[16], 在此思路下, Zhong 等^[17]和 Fransz 等^[18]分别在减数分裂粗线期染色体和 DNA 纤维上成功进行了荧光原位杂交, 其分辨率达到低于 100 kb 及 1 kb~1 Mb 左右. 无疑, BAC 克隆由于其自身的特点, 将快速准确构建出特定区域内的 DNA 物理图谱, 加速分离和克隆目的基因的进程.

3 BAC-FISH 在植物基因组研究中的应用

BAC-FISH 作为一种确定基因片段在染色体上位置最直接的更高效的方法, 在植物基因组研究中得到了越来越广泛的应用.

3.1 核型分析

与动物和人不同, 植物染色体多数趋于具中间着丝粒和亚中间着丝粒, 近端点着丝粒的染色体很少, 从而造成了植物核型分析的困难. 许多重要的经济作物不仅是多倍体, 而且染色体非常小、形态相似, 用传统的核型分析技术很难识别各条染色体. 1995 年, Hanson 等^[6]用来自含有山地棉 *G. hirsutum* (基因组型为 AADD) 多个单拷贝序

列的 BAC 克隆作为探针对两种二倍体 (基因组型分别为 AA 和 DD) 棉花进行荧光原位杂交, 检测到了很强的荧光信号. 这预示着 BAC 克隆等分子细胞遗传学标记的发展为植物基因组的核型分析提供了新的思路, 这就有可能通过染色体上特异性的 DNA 序列作为分子标记, 通过 BAC-FISH 把染色体识别区分开来.

3.2 重要的功能基因定位及其意义

由于 BAC 克隆中插入片段长, 容易与基因组靶 DNA 结合. 因此, 根据连锁图谱 (linkage map), 用与目的基因紧密连锁的分子遗传标记如 RFLP、cDNA 等筛选出的与目的基因连锁的 BAC 克隆, 构成一个连接群 (contig), 该连接群在遗传效应上同样与目的基因紧密连锁. 所以, 来源于该 contig 的 BAC 克隆可以将目的基因在染色体上进行定位. 1995 年, Jiang 等^[5]运用 BAC-FISH 首次将 Xa-21 成功地定位到染色体上. 1997 年, Nakamura^[19]等构建与 Pr-ta² 连锁的 800 kb 的 BAC 连接群, 通过 BAC-FISH 将 Pr-ta² 定位在水稻第 12 号染色体的近着丝粒区域中. 同年, Gomez 等^[20]用来源于玉米 cDNA *sh2* 基因筛选高粱 BAC 文库, 筛选出的 BAC 克隆 86B6 通过 FISH 定位在 D 型染色体上. Yan^[7]将 Glh、Pr-5 (t) 和 RTSV 几个重要水稻抗性基因分别定位在第 4 染色体的长臂和短臂上. 目前, 利用 BAC-FISH 将几个重要抗病虫基因对药用野生稻的染色体作图 (国家自然科学基金资助项目) 也正在本实验室进行中. BAC-FISH 的结果可以确定基因在染色体上的真实位置, 这对于深刻认识基因间的真实连锁关系和染色体结构、改造染色体结构、目的基因的分离, 以及基因工程育种都是很重要的. 定位结果还可以用于对遗传图与物理图的比较, 检验遗传图中基因次序与臂区划分的准确性.

3.3 BAC-FISH 在比较作图中的应用

BAC-FISH 的高效精确的定位效果, 亦必将大大促进植物的比较染色体图的发展与完善. 目前世界上已经构建了水稻^[14, 21~23], 高粱^[24], 拟南芥菜^[25]的 BAC 文库. Moore 等^[26, 27]通过比较了水稻与小麦、玉米、谷子、甘蔗和高粱等植物间的基因组同源性, 已初步建立了禾本科祖先基因组的基本骨架. 由于 BAC 克隆本身携带外源 DNA 片段的高容量特性, 无疑将进一步完善植物基因组比较染色体图, 揭示植物在进化上的来龙去脉, 促进重要的经济作物的遗传育种研究.

参 考 文 献

- 1 Dauwerse J G, Wiegant J. Multiple colors by fluorescence *in situ* hybridization using ratio-labelled DNA probes create a molecular karyotype. *Human Molecular Genetics*, 1992, **1** (2): 593~ 598
- 2 Jing J, Gill B S. Nonisotopic *in situ* hybridization and plant genome mapping: the first ten years. *Genome*, 1994, **37** (5): 717~ 725
- 3 Song Y C, Gustafson J P. The physical location of fourteen RFLP markers in rice (*Oryza sativa*). *Theor Appl Genet*, 1995, **90** (1): 113~ 119
- 4 Shizuya H, Brien B, Kim U J, *et al.* Cloning and stable maintenance of 300 kilobase pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (18): 8794~ 8797
- 5 Jiang J, Gill B S, Wang G L, *et al.* Metaphase and interphase fluorescence *in situ* hybridization mapping of the rice genome with bacterial artificial chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (10): 4487~ 4491
- 6 Hanson R E, Zwick M S, Choi S, *et al.* Fluorescent *in situ* hybridization of a bacterial artificial chromosome. *Genome*, 1995, **38** (4): 646~ 651
- 7 Yan H M, Song Y C, Li L J, *et al.* Physical location of the rice Pr5 (1), Glh and RTSV gene by ISH of BAC clones. *Wuhan Univ J Natur Sci*, 1998, **3** (2): 226~ 230
- 8 Michael S, Zwick M S, Hanson R E, *et al.* A rapid procedure for the isolation of Cot-1 DNA from plants. *Genome*, 1997, **40** (2): 138~ 142
- 9 Flavell R B, Bennett M D. Genome size and the proportion of repeated sequence DNA in plants. *Biochem Genet*, 1974, **12** (1): 257~ 269
- 10 McCouch S R, Smyth S D. The world rice economy challenges ahead. In: Khush G S, eds. *Rice Biotechnology; Biotechnology in Agriculture* (6). Wallingford: Commonwealth Agricultural Bureaux International, 1991. 1~ 3
- 11 Ganai M, Hemleben V. Different AT-rich satellite DNAs in *Cucurbita pepo* and *Cucurbita maxima*. *Theor Appl Genet*, 1986, **73** (1): 129~ 135
- 12 Zhao X, Wu T, Xie Y, *et al.* Genome-specific repetitive sequences in the genus *Oryza*. *Theor Appl Genet*, 1989, **78** (2): 201~ 209
- 13 Britten R J, Kohne D E. Repeated sequences in DNA. *Science*, 1968, **161**: 529~ 540
- 14 Yang D C, Parco A, Nandi S, *et al.* Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library and identification of overlapping BAC clones with chromosome 4 specific RFLP markers in rice. *Theor Appl Genet*, 1997, **95** (7): 1147~ 1154
- 15 刘建喜, 林爱星, 丁翔, 等. DNA克隆载体的发展和应用. 遗传 (Liu J X, Lin A X, Ding X, *et al.* *Hereditas*), 1997, **19** (6): 41~ 44
- 16 钟筱波, Pau F, Franz J, 等. 用荧光原位杂交技术构建高分辨率的DNA物理图谱. 遗传 (Zhong X B, Pau F, Franz J, *et al.* *Hereditas*), 1997, **19** (3): 44~ 48
- 17 Zhong X B, Franz P F. High resolution mapping on pachytene chromosome and extended DNA fibres by fluorescence *in situ* hybridization. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1996, **14** (3): 232~ 242
- 18 Franz P F, Alonso-Blanco C. High-resolution physical mapping in *Arabidopsis thaliana* and tomato by fluorescence *in situ* hybridization to extended DNA fibres. *Plant J*, 1996, **9** (3): 421~ 430
- 19 Nakamura S, Asakawa S, Ohmido N, *et al.* Construction of an 800-kb contig in the near-centromeric region of the rice blast resistance gene *Pr1ta*² using a highly representative rice BAC library. *Mol Gen Genet*, 1997, **254** (6): 611~ 620
- 20 Martha I, Gomez M I, Nurul M, *et al.* FISH of a maize sh2-selected sorghum BAC to chromosome of *Sorghum bicolor*. *Genome*, 1997, **40** (4): 475~ 478
- 21 Tao Q, Zhao H, Qiu L, *et al.* Construction of a full bacterial artificial chromosome (BAC) library of *Oryza sativa* genome. *Cell Res*, 1994, **4** (1): 127~ 133
- 22 Wang G L, Holsten T E, Song W Y, *et al.* Construction of a rice bacterial artificial chromosome library and identification of clones linked to the Xa21 disease resistance locus. *Plant J*, 1995, **7** (3): 525~ 533
- 23 Zhang H B, Choi S, Li Z, *et al.* Construction and characterization of two rice bacterial artificial chromosome libraries from the parents of a permanent recombinant inbred mapping population. *Mol Breed*, 1996, **2** (1): 11~ 24
- 24 Woo S S, Jiang J, Gill B S, *et al.* Construction and characterization of bacterial artificial chromosome library of *Sorghum bicolor*. *Nucleic Acids Res*, 1994, **22** (23): 4922~ 4931
- 25 Choi S, Creelman R A, Mullet J E, *et al.* Construction and characterization of bacterial artificial chromosome library of *Arabidopsis thaliana*. *Weed World*, 1995, **2**: 17~ 20
- 26 Moore G, Deves K M, Wang Z, *et al.* Grasses line up and form a circle. *Current Biology*, 1995, **5** (7): 737~ 739
- 27 Moore G, Roberts M, Alcaide L, *et al.* Centromere sites and cereal genome evolution. *Chromosoma*, 1997, **105**: 321~ 323

Application of BAC-FISH in Plant Genome Research. QIN Rui, WEI Wen-Hui, SONG Yun-Chun (*Developmental Biology Centre of Wuhan University, Wuhan 430072, China*).

Abstract BAC-FISH is a new technique which is developing from 1990s. It can detect signal more efficiently than FISH. Some important genes have been mapped onto plant chromosome. BAC-FISH will play a very important role in plant chromosome research in the future.

Key words BAC-FISH, plant genome, *in situ* hybridization, Cot-1 DNA