

应用显微操作和 PCR 技术进行基因的染色体定位*

郭金虎^① 余多慰^① 赵清良^① 张晓琼^② 李华^② 单祥年^{①**}

(^①南京师范大学生命科学学院 南京 210097; ^②南京市儿童医院遗传室 南京 210008)

摘要 :介绍了一种将染色体显微操作和 PCR 技术结合起来进行基因染色体定位的方法,具有简便易行,特异性和敏感性很高等特点。分析了这种定位方法的技术特点,以及 SSCP 和 DNA 序列分析等方法在排除错误结果中的运用。

关键词 染色体;显微操作;PCR;基因定位

中图分类号:Q781 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2000)04-25-04

Bind Chromosome Micro-Manipulation with PCR to Locate Genes on Chromosomes

GUO Jin-Hu^① YU Duo-Wei^① ZHAO Qing-Liang^①
ZHANG Xiao-Qiong^② LI Hua^② SHAN Xiang-Nian^①

(^①College of Life Science of Nanjing Normal University Nanjing 210097, China;

^②Genetics Department of Children's Hospital of Nanjing Nanjing 210008, China)

Abstract :A easy method binding chromosomal micro-manipulation with PCR was introduced, which can be used to locate genes on chromosomes. This method has high specialty and sensitivity. The analysis of the using range of this method and techniques to eliminate the false results such as SSCP, DNA sequencing were discussed in the paper.

Key words :Chromosome; Micro-manipulation; PCR; Location of gene

基因定位是细胞遗传学和分子遗传学领域内的一项重要技术手段,对于进一步研究基因结构和行为有着重要的作用。到目前为止,已经建立和发展起来的基因定位技术主要有原位杂交(ISH)、荧光原位杂交技术(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)、引物原位延伸(primed retention *in situ*, PRINS)、原位 PCR(*in situ* PCR)^[1]、体细胞杂交技术等。其中原位杂交发展得最为完善,应用领域也最广,但其花费较高,费时费事^[2]。更加令人遗憾的是原位杂交一般比较适用于检测 1kb 以上的较大片段或多拷贝的基因序列,对于低拷贝或单拷贝

的短序列则常常无能为力,并且制备探针比较麻烦。还处于发展阶段的原位 PCR 技术由于引入了具有高特异性和灵敏性的 PCR(聚合酶链反映, polymerase chain reaction)技术,因而显示出了对于定位低拷贝、短序列基因的很好前景,但从目前许多文献上看,这项技术的稳定性

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39670393);

** 通讯联系人;

第一作者介绍:郭金虎,男,24岁,硕士,实习研究员,研究方向:分子生物学,现工作单位:南京医科大学江苏省生殖医学重点实验室, E-mail: guojh@njmu.edu.cn;

收稿日期:1999-04-14, 修回日期:2000-04-18

和可重复性还不能令人满意^[1]。体细胞杂交技术需要将靶细胞与啮齿类动物的细胞进行融合,然后还需进行筛查,工作量很大^[3]。因此快速、简便地进行低拷贝、短序列基因的定位便成为诸多研究工作者关注的一个技术难题。

Röhome 1984 年运用显微操作技术与小鼠胚胎发育、精子分化、性别决定相关的 t 复合体定位和克隆出来, Lüdeche 1989 年曾用切割 G-显带染色体,然后再进行 PCR,成功地将 Langer Giedion 综合征基因定位于人的 8 号染色体^[5],开创了染色体单条带水平定向克隆的纪元。邓汉湘、夏家辉等又将这一技术用于构建人染色体特异的探针池^[6]。Alimove 1997 年用激光束作为工具结合 Alu-PCR 构建了带有 Not I 酶切位点的人 3p21-ter 克隆^[7]。本文在将染色体显微操作技术和 PCR 技术具有的高灵敏性、高特异性的特点结合起来的基础上,探讨了这种方法在定位哺乳动物低拷贝、短序列基因的研究工作中的运用。

1 基本方法

运用显微操作技术进行基因定位,除了倒置显微镜和显微三维操作仪外不需要其他的特殊设备。将 Zeiss、Olympus 或 Nikon 等公司的倒置显微镜与 Narishige 或 Zeiss 等公司的显微三维操作仪组装起来便可进行染色体的显微操作。用于显微操作的玻璃针可以用 Narishige 公司的玻璃管,外直径为 1.2 mm,内直径为 0.7 mm 或其他相近规格。调整电流值,使拉成的玻璃针的末端既具有一定的刚性又具有一定的韧性,同时玻璃针的末端应该以封口为好。

实验时应选用分散良好的中期细胞染色体玻片标本(常规方法制片^[8]),如无新制的标本,也可以用 1~2 年内冷冻、干燥存放的标本。如果上面有香柏油,可用二甲苯处理去除,如果上面有二甲苯不易去除的蜡状油脂,可用较低浓度的家用洗涤剂的去离子水溶液无菌处理后去除油脂。然后将玻片依次过 10%、90%、100% 的系列乙醇,每次 2 分钟,空气干燥^[8]。

如果标本颜色褪去,可以用 Giema 重新染

色并用相差显微镜观察,以便在进行显微切割时能准确辨认各条染色体。用显微操作技术取下染色体或染色体的某一条带后,准确无误地将其之转移到即将进行后续操作的 PCR 容器,是一项比较细致的工作。Ludeche 等是将染色体转入一个经过硅化的洁净油室^[5,6],我们是将染色体连同玻璃针末端剪入 PCR 薄壁管,离心使染色体附着于管底。然后假如预算好体积的 1 μ g/ml 的蛋白酶 K,将包裹 DNA 的组蛋白充分消化,体积的预算方法是按后续的 PCR 反应体系中水的体积加入的。消化后只需进行高温温育便可除去蛋白酶 K 的活性,以防止对 PCR 反应中的 Taq 酶产生影响。也可以用酚、氯仿抽提除去蛋白酶 K^[6]。

在进行 PCR 扩增时,只需要加入除水以外的其他组分,由于作为模板的 DNA 分子极少,所以设置的循环次数一般较多,为 30~60 个循环。PCR 结束后用琼脂糖凝胶电泳观察结果。

2 结果分析及假阳性、假阴性结果的排除

以定向切取的某条染色体作为模板进行的 PCR 反应,如果出现了扩增产物,则说明要定位的基因就位于这条染色体上。

为排除 PCR 产生的假阳性结果,可以增设阳性和阴性对照,PCR 结束后用单链构象多态分析(single strand construction polymorphism, SSCP)和 DNA 序列分析加以鉴定。SSCP 技术可以通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳将仅有一个碱基差异的 DNA 片段区分开来^[9],因此将所取染色体的 PCR 产物和阳性对照的 PCR 产物进行 SSCP,便可鉴定 PCR 是否存在假阳性结果。对 PCR 产物进行序列分析则可以更为准确地从根本上证实 PCR 结果的正确性。要排除假阴性结果,可以采取增加每管中作为扩增模板的相同染色体的数目、增设阳性对照和优化 PCR 反应条件等措施。

3 技术特点、使用范围及前景

这种方法使用在已经知道待定位基因序列或至少已经有扩增该基因引物的条件下,对染

染色体数目较少、染色体形态特殊或染色体带型容易辨别的动物基因的基因定位研究。取材时要求选用的染色体标本应分散良好,否则会增大显微操作的难度。如果根据染色体的带型特征割取染色体的片段进行扩增,则可以更为精确地将基因定位到染色体的某一区段上。

与原位杂交相比,显微切割和 PCR 技术相结合的方法,除了需要显微操作仪外,不需要其他特殊设备,花费低,操作也较为简便,技术难度不大。更有吸引力的是,这种方法具有的定位低拷贝、短序列基因的能力是原位杂交所欠缺的。原位 PCR 可以定位 100 bp 以上的单拷贝基因,而运用显微操作和 PCR 进行基因定位的方法在保持这一特点的同时又摒弃了原位 PCR 花费高、重复性差等缺点。体细胞杂交定位方法往往在细胞融合后还要对诸多基因表达产物进行筛选,比较麻烦。不过,这种方法得出的信息也没有原位杂交、原位 PCR 等方法更为直接。

本文作者曾用这种方法成功地将赤鹿的性别决定基因 *Sry* 基因定位于赤鹿的 Y1、Y2 两条染色体。赤鹿是一种重要的模式动物,数目和形态都具有很特异的核型(图 1)。我们扩增赤鹿 *Sry* 基因采用的是与其同源的人的 *SRY* 基因保守区的引物,扩增片段仅为 200 bp 左右

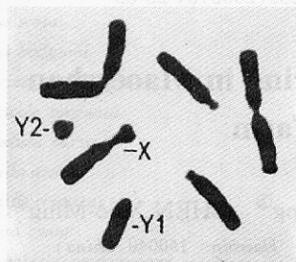


图 1 雄性赤鹿的核型

(图 2),然后又进行了 SSCP 分析以排除假阳性(图 3)。*SRY/Sry* 基因(人的性别决定基因为 *SRY* 基因,小鼠及其它动物为 *Sry* 基因)为单拷贝或低拷贝基因,用原位杂交等手段很难将其定位^[10,11],因此这种将显微操作与 PCR 相结合的定位方法显示出了对于定位低拷贝、短

序列基因的应用价值。当然,最终的定位结果还有赖于对扩增产物的序列分析。

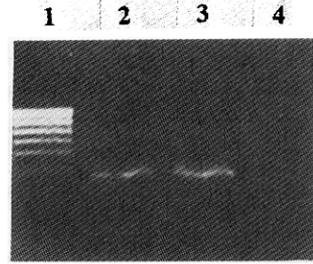


图 2 X, Y1, Y2 染色体的 PCR 结果

1. Marker (1 543, 994, 697, 515, 377, 237 bp);

2. Y1; 3. Y2; 4. X

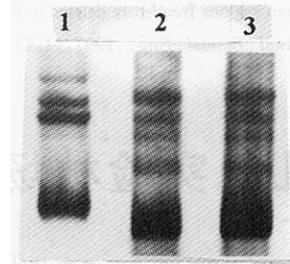


图 3 PCR 产物的 SSCP

1. 人 *SRY* 基因 PCR 产物; 2. Y1; 3. Y2

紫外光和激光束也被用于细胞染色体的分离与切割操作,用激光共聚焦显微镜产生的具有强大能量的激光束作为工具可以更准确、高效地“操纵”染色体^[12],可以精确、清楚地知道单个细胞内不需要的部分或者分离出染色体的任意片段。

如果在 PCR 引物上接上酶切位点的序列,则可以对 PCR 产物进行克隆,用这些克隆制备染色体或染色体特异区段的探针池,能用来作为分离和克隆相关疾病基因的工具,对于 DNA 全序列分析工作中物理图谱的绘制也具有重要的意义。

参 考 文 献

- [1] Gosden, J. R. PRINS and *In Situ* PCR Protocols. Totawa, N. J.: Human Press, 1997. 1~51.
- [2] 苏慧慈,刘彦仿.原位 PCR. 北京:科学出版社,1995. 31~32.
- [3] Nestor, O. Bianchi, Martha, S. Bianchi, Graciela Baillier *et al.* Characterization and sequencing of the sex deter-

- mining region Y gene(Sry)in Akodon(Cricetidae)species with sex reversed females. *Chromosoma* . ,1993(102): 389~395.
- [4] Rohome ,D. ,H. Fox , B. Herrmann *et al.* Molecular clones of the mouse t complex derived from microdissected metaphase chromosomes. *Cell* ,1984 **36** :783~788.
- [5] Lüdeche ,H. J. *et al.* Cloning defined regions of human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification. *Nature* ,1989 **338**(23):348~352.
- [6] 夏家辉 杨毅 戴和平等. 14 个染色体区带特异性探针池的构建. *遗传学报* ,1994 **21**(4):253~256.
- [7] Alimov ,A. A. ,M. A. Rodova ,R. Z. Gizatullin *et al.* A micro-dissection approach for isolation of Not I linking clones from regions frequently deleted in RCC and SCLC. *Genet. Anal. Biomol. Eng.* ,1997 **14**(1):21~23.
- [8] 中国科学院昆明动物研究所细胞遗传研究室染色体研究组. 赤麂细胞株的建立及其生物学特性观察. *动物学研究* ,1981 **2**(2):105~112.
- [9] 鄢波 张思仲. 46XY 女性患者 SRY 基因启动子区域的突变分析. *遗传* ,1996 **18**(6):12~14.
- [10] 黄晓 周荣家 程汉华等. 两种淡水鱼 Sox 基因的扩增和测序. *动物学报* ,1998 **44**(2):239~240.
- [11] Sinclair ,A. H. ,P. Berta ,M. S. Palmer *et al.* A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* ,1990 **346** :240~244.
- [12] Schuetze K. ,I. Becker ,K. F. Becker *et al.* Cut out or poke in-the key to the world of single genes :laser micro-manipulation as a valuable tool on look out for the origin of disease. *Genet. Anal. Biomol. Eng.* ,1997 **14**(1):1~8.