

染色体微切割、微分离、微克隆技术及其研究进展

戢福云,余其兴

(武汉大学生命科学学院遗传学系 武汉 430072)

摘要:自 1981 年染色体微切割及微克隆技术创建以来,该技术已广泛应用于人类及动植物遗传学、医学、进化学等研究领域,主要包括构建特定染色体或染色体区域的 DNA 文库、制备染色体描绘探针池以研究染色体重排和染色体进化等。本文对该技术的产生、发展及某些研究进展作一综述。

关键词: 染色体 微切割 微分离 微克隆

中图分类号 :Q813.4

文献标识码 :A

文章编号 :0253 - 9772(2000)04 - 0258 - 04

Advances in Study of Chromosome Microdissection and Microcloning Technique

Ji Fu-yun , YU Qi-xing

(Department of Genetics, College of Life Science, Wuhan University, Wuhan, 430072, China)

Abstract: Since chromosome microdissection and microcloning technique was developed in 1981, it has been wide

收稿日期 :1999 - 07 - 02 ;修回日期 :1999 - 10 - 28

基金项目 :国家自然科学基金 (39770407) 和高等学校博士点科学专项科研基金资助 (1999)

作者简介 :戢福云,女,汉族,1972 年生于湖北,在读博士生,从事分子细胞生物学研究工作。Tel:027 - 87860253, E-mail:yuqixing@371.net

ly used in genetics, medicine, evolution and other fields, mainly in establishing chromosome or chromosome specific region DNA libraries, preparing chromosome painting probe pools to study chromosome rearrangement and evolution. In the paper, the development and research progress of the technique are discussed.

Key words: chromosome microdissection microisolation microcloning

随着高度多态的 DNA 遗传标记的丰富和应用,人类及许多高等动植物的基因图的研究也取得了长足进步。但基因图中遗传标记分布不均匀,有的染色体区域遗传标记的密度尚需进一步提高,有的染色体区域需要新的标记去填充以建立高精度基因图。这就需要采用新方法去发现和利用染色体特异的 DNA 文库和新的标记。1981 年 Scalghe 等首次应用染色体微切割方法成功地分离并克隆了果蝇多线 X 染色体的特定区域^[1]。此后,染色体微切割和微克隆方法广泛应用于构建鼠^[2]、人^[3]染色体特定区域的 DNA 文库及探针池。为获得染色体特异的遗传标记提供一个新的方法,近年来,该方法也广泛应用于医学、进化研究等领域^[4-5],为探索人类及高等动植物基因组的奥秘开辟一条新的途径和提供丰富的信息资源。

1 染色体微切割、微分离、微克隆技术流程

染色体微切割、微分离及微克隆技术主要包括染色体标本的制备、微切割染色体、染色体 DNA 的克隆和鉴定等。

1.1 制备染色体标本

染色体标本的制备与常规制片的差别在于固定液的组成成分比例和固定时间。常规制片时固定液为 3:1 的甲醇:冰乙酸,而制备微切割染色体标本时为 9:1、5:1 和 3:1 的甲醇:冰乙酸梯度固定液,并且,固定时间相对较短。其目的是防止冰乙酸损伤 DNA 结构而影响微克隆效率^[6]。

1.2 微切割及分离染色体

染色体微切割最初是在倒置显微镜下用带有尖端直径不超过 0.5 μ m 玻璃针的显微操作仪上进行。具体如下:在倒置显微镜下于 160 \times 倍视野中用玻璃微针切割并分离染色体,然后把粘附有染色体的针尖连同染色体碎于 EP 管中。在粘附有染色体片段的玻璃微针移开玻片前,用 1~2 滴乙醇冲洗针尖,其目的是破坏表面张力而使染色体紧紧附着于针尖,防止染色体片段丢失^[1]。

1.3 染色体 DNA 的微克隆

首先将分离出的多个同一目的染色体片段进行抽提去蛋白质及 DNA 纯化、酶切,然后加入同一限制性内切酶切割的载体及连接酶,连接后再转化一定的宿主菌,以建立染色体 DNA 文库。在 PCR 介导的微克隆技术发展之前,主要采用这种酶切直接克隆法。

1.4 微克隆的鉴定

所建立的 DNA 文库的特异性一般采用 Southern 杂交、原位杂交和特定片段的 PCR 扩增进行鉴定。

1.4.1 Southern 杂交分析 Southern 杂交时可用一定的标记物标记基因组 DNA,与建立的染色体 DNA 文库进行杂交,或标记建立的 DNA 文库中插入片段,用其作为探针与基

因组 DNA 进行杂交。其目的是初步鉴定该文库中插入片段的来源。但即使有杂交信号,也存在以下几种可能性:a:来自于目的染色体;b:与目的染色体 DNA 序列同源,故需要进一步验证。

1.4.2 原位杂交分析 用得到的染色体 DNA 文库中插入片段作探针进行原位杂交。其目的是检测:①插入片段是否源自目的染色体;②鉴别该染色体特有的克隆;③鉴别与其他染色体共有的克隆。所用探针可用放射性同位素和非放射性标记物如地高辛、生物素等进行标记。最初,放射性同位素是主要的标记物,现在主要采用荧光原位杂交技术 (fluorescent *In Situ* hybridization, FISH) 进行检测^[6]。

1.4.3 PCR 扩增方法 PCR 扩增时所用 DNA 模板可以是微分离的染色体 DNA^[7],也可以是染色体 DNA 文库中的插入片段。只要该染色体某一基因 (Type I) DNA 两侧序列可知,就可利用 PCR 鉴别该染色体的特异性。

2 方法的改进

2.1 染色体的分离

最初采用玻璃微针在倒置显微镜下分离目的染色体或其特定区域。1972 年 Fukui 等开发出显微激光切割法^[8]。该方法主要特点:①用激光切割染色体以分离染色体特定区域^[9];②利用激光产生的高温“烧掉”目的染色体周围的染色体,然后分离目的染色体^[33]。Ponielis 等采用激光微切割果蝇多线染色体后进行微克隆,并测出端粒 DNA 序列^[10]。王兰岚等应用激光切割小冰麦异附加系花粉母细胞染色体。其目的是探索该技术应用于农作物染色体工程和基因定位的可能性^[11]。

另一种方法是用流式细胞仪分选特定染色体。其原理是利用与染色体 DNA 特异结合的荧光染料 hoechst33258 和色霉素 A₃ 对染色体 DNA 染色后,根据染色体碱基组成和含量分选染色体^[12-13,14]。该方法可在短时间内分离大量的同一染色体。但也存在缺陷:①形态相似的染色体难以分开;②不能构建染色体区域特异的 DNA 文库。尽管用激光微束切割和流式细胞分选仪分离染色体更方便并可自动控制,但由于仪器昂贵,这两种方法并没有得到广泛普及。许多学者更偏向于用玻璃微针切割和分离染色体^[15-16,17]。

2.2 染色体 DNA 的微克隆

分离得到的染色体 DNA 进行体外扩增以增加模板量。最初采用酶切直接克隆法^[1,18]。该方法的优点是克隆片段相对较大。缺点是技术复杂、操作精细,为满足微克隆对 DNA 模板量的要求需要分离 100~200 条同一染色体片段。PCR 技术的出现及其广泛应用,使染色体微切割、分离及克隆技术得到很大的发展。

2.2.1 连接子-衔接子 PCR 方法 染色体 DNA 经一定的内切酶(如 *Sau3AI*)切割后在其末端连上一个接头(Linker, 24mer 的寡核苷酸,其 5'端磷酸化),再用另一个与连接子互补的衔接子(adaptor, 20mer 的寡核苷酸,其 5'端非磷酸化)作引物进行 PCR,以增加 DNA 的量^[19]。PCR 产物可连入一定的载体中以建立 DNA 文库。

2.2.2 DOP-PCR(degenerate oligonucleotide-primed-PCR) Tenenius H 等(1992)率先利用 DOP-PCR 扩增微分离所得到的染色体 DNA 扩增产物作染色体描绘的探针,或建立 DNA 文库^[20]。所谓的 DOP-PCR 就是应用简并寡核苷酸作引物进行的聚合酶链式反应。其中所用引物为 5'GATC (AAGCCTT) NNNNNNATGTGG-3'。在 5'端有 Hind III 酶切位点(下划线部分),中间为 6 个随机的核苷酸,而在 3'端有 6 个特异性结合碱基。许多学者应用 DOP-PCR 方法建立了人及动植物染色体 DNA 文库^[14, 17]。Yokoyama 等和 Zimmer 等改进 DOP-PCR 方法,应用 DOP-Shuttle-PCR 进行两步 PCR 以提高目的 DNA 的特异性。Yokoyama 等微切割人 GTG 显带后 1~5 个同一 R 带片段, DOP-Shuttle-PCR 后进行荧光原位杂交。其杂文信号与 R 带相应。结果表明所切割片段源自目的染色体^[16]。Zimmer 等应用由此方法建立的鸡 Z 染色体探针池筛选鸡的基因组 DNA 文库,得到 Z 染色体特异的阳性克隆^[6]。

3 应 用

3.1 构建特定染色体或染色体区域 DNA 文库

Scalleghe 等率先应用此法微克隆了果蝇多线 X 染色体特定区域的 DNA,并认该技术在原理上可应用于任何物种^[1]。自此,应用此法,人、鼠、中国仓鼠、大麦、甜菜、猪、羚羊等动植物染色体 DNA 文库成功地得到构建。Ludeck 等微分离 GTG 显带后人 8 号染色体上的 Langer-Giedion 综合征区域并构建了该区域特异的 DNA 文库^[21]。Jung 等构建了野生甜菜带有线虫抗性的染色体 DNA 文库,微克隆得到的重组 DNA 中,13% 可用于进行 RFLP 分析^[22]。Vooijs 等构建了人各条染色体的 PCR-DNA 文库^[19]。Chaudhary 等微切割猪 SSC1p, SSC1q26~q213 等区域,成功地构建了家猪的 SSC1p 和 SSC15 的 DNA 文库^[23]。Zimmer 等微分离鸡 Z 染色体进行 DOP-PCR 后构建了该染色体 DNA 文库^[17]。和基因组 DNA 文库相比而言,从显微操作所建立的染色体 DNA 文库中筛选某一特定基因,可节省人力、物力和财力。

3.2 筛选 DNA 文库

用微克隆中插入片段作探针,与 YAC、BAC、cDNA 文库和基因组 DNA 文库进行杂交,以筛选出染色体特异的阳性克隆和发现新的遗传位点或序列,为丰富基因图、了解遗传病之谜提供新线索^[6]。Rouquier 等微分离人第 17 和 19 号染色体后进行 DOP-PCR,应用由此得到的探针池直接筛选 cDNA 文库。为了证明该方法的可靠性,他们用所筛选到的阳性克隆作探针对细胞有丝分裂相进行荧光原位杂交。其结果表明,该方法是一种可靠、快速、直接筛选染色体特异的阳性克隆

的行之有效的办法^[14]。

3.3 构建基因图

到目前为止,许多物种的基因图已基本构建完成。但由于遗传连锁图与物理图整合时存在分歧,这就需要增添新的遗传位点以建立高饱和度的基因图。染色体微分离、微克隆以建立染色体 DNA 文库将有助于发现新的遗传位点和重要基因,这为建立高饱和度的基因图开辟一个新天地。Fiedler 等微切割和分离人 22 号染色体 22q¹²~q^{13.1} 区域并鉴定了神经纤维瘤-2 基因周围的新的遗传标记^[24]。Schondelmaier 等微切割了大麦染色体 1HS 的短臂,微克隆后绘制了该区域的 RFLP 遗传图,并筛选到一个与抗白粉病基因座 Mla 紧密连锁的探针,为该区域高精度基因图的构建奠定基础^[25]。

3.4 制备染色体描绘探针池

染色体描绘是研究染色体重组、畸变机制及进化的一个强有力的手段,染色体微分离及微克隆为其提供了丰富的探针源泉。Breneman 等微分离鼠带有罗伯逊易位的染色体(Rb2.8)。应用由此得到的探针池进行染色体描绘以检测受¹³⁷Cs 辐射的鼠染色体断裂、重组情况,并分析了染色体发生重组与辐射剂量之间的关系^[13]。Goldamer 等微分离黄牛(*B. taurus*)和瘤牛(*B. indicus*) Y 染色体特定区域进行 DOP-PCR 后交互进行染色体描绘。其研究结果表明,*B. indicus* 和 *B. taurus* 两者 Y 染色体差异来自于 Y 染色体的一个臂间倒位^[26]。Ambady 等微分离鸡的 Z 染色体,并用其作探针对火鸡的染色体进行描绘^[27]。Robinson 等用牛 Xp、Xq 染色体特异的探针对两种羚羊的染色体进行描绘^[28]。两者研究结果均表明,性染色体在进化中是高度保守的。

3.5 其他应用

染色体微切割、微分离及微克隆技术在医学方面具有深远的意义^[29]。同时,应用此方法也可筛选染色体特异的微小卫星 DNA^[30]和进行染色体自身结构(如着丝粒/动粒复合体)的研究等^[31, 32]。

4 结 语

染色体微切割、微分离及微克隆技术在细胞遗传学和分子生物学之间架起一座新的桥梁,结合其他先进技术和方法,将加速这两门学科的更深层次的发展^[33]。同时,该技术也广泛应用于医学、辐射生物学、发育生物学和进化生物学等领域,这在尽早解开人类及生物本身之谜方面大有潜力并具有广阔的应用前景。

参 考 文 献:

- [1] Scalleghe F, et al. Microdissection and cloning of DNA from a specific region of *Drosophila melanogaster* polytene Chromosomes[J]. Chromosome, 1981, 182: 205~216.
- [2] Rohme D, et al. Molecular clones of the mouse t complex derived from microdissected metaphase chromosomes[J]. Cell, 1984, 36: 783~788.
- [3] Bate G B, et al. Microdissection and microcloning from the short arm of human chromosome 2, Mol[J]. Cell Biol, 1986, 6: 3826~3830.

- [4] Guan X Y, *et al.* Chromosome microdissection identifies cryptic sites of DNA sequence amplification in human ovarian carcinoma[J]. *Cancer Res*, 1995, 55: 3380 ~ 3385.
- [5] Ponce De Leon F A, *et al.* Development of a bovine X chromosome linkage group and painting probes to assess cattle, sheep and goat X chromosome segment homologies[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 3450 ~ 3454.
- [6] Zimmer R, *et al.* Generation of chicken Z-Chromosome painting probes by microdissection for screening large-insert genomic libraries. *Cytogenet*[J]. *Cell Genet*, 1997, 78: 124 ~ 130.
- [7] 马有志, 等. 小麦染色体的显微激光分离[J]. *遗传学报*, 1999, 26(1): 43 ~ 48.
- [8] Fukui K, *et al.* Microdissection of plant chromosome by argon-ion laser beam[J]. *Theor Appl Genet*, 1992, 84: 787 ~ 791.
- [9] Kamisugi Y, *et al.* Recovery of dissected C-band regions in crepis Chromosomes[J]. *Theor Appl Genet*, 1993, 85: 825 ~ 828.
- [10] Poneles N, *et al.* Tolemeric sequences derived from laser-microdissected polystyrene chromosomes[J]. *Chromosome*, 1989, 98: 351 ~ 357.
- [11] 王兰岚, 等. 激光微束切割小冰麦附加系染色体的研究[J]. *遗传学报*, 1997, 24(3): 238-240.
- [12] Breneman J W, *et al.* The development of painting probes for dual-color and multiple chromosome analysis in the mouse[J]. *Cytogenet Cell Genet*, 1995, 68: 197 ~ 202.
- [13] Breneman J W, *et al.* The development of chromosome-specific composite DNA probes for the mouse and their application to chromosome painting[J]. *Chromosoma*, 1993, 102: 591 ~ 598.
- [14] Rouquier S, *et al.* Direct selection of cDNAs using whole chromosomes[J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23: 4415-4420.
- [15] 胡赞民, 等. 玉米单染色体的分离和体外扩增[J]. *遗传学报*, 1998, 25(6): 545 ~ 550.
- [16] Yokoyama Y, *et al.* Improved simple generation of GTG-band specific painting probes[J]. *Cytogenet Cell Genet*, 1995, 71: 32-36.
- [17] Zimmer R, *et al.* Microisolation of the chicken Z chromosome and construction of microclone libraries[J]. *Genome*, 1997, 40: 865-872.
- [18] Saunderson R D C, *et al.* PCR amplification of DNA microdissected from a single polytene chromosome band: a comparison with conventional microcloning[J]. *Nucleic Acids Res*, 1989, 17(22): 9027-9037.
- [19] Vooijs M, *et al.* Libraries for each human chromosome, constructed from sorter-enriched chromosome by using linker-adaptor PCR[J]. *Am J Hum Genet*, 1993, 52: 586-597.
- [20] Tenenius H, *et al.* Degenerate oligonucleotide-primed PCR: General amplification of target DNA by a single degenerate primer[J]. *Genomics*, 1992, 13: 718 ~ 725.
- [21] Ludeck H J, *et al.* Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification[J]. *Nature*, 1989, 338(23): 348 ~ 350.
- [22] Jung C, *et al.* A DNA library from an individual *Beta patellaris* chromosome conferring rematode resistance obtained by microdissection of meiotic metaphase chromosomes[J]. *Plant Mol Bio*, 1992, 20: 503 ~ 511.
- [23] Chaudhary R, Microdissection of pig chromosomes: dissection of whole chromosomes, arms and bands for construction of paints and libraries[J]. *Hereditas*, 1998, 128: 265 ~ 271.
- [24] Fiedler W, *et al.* New markers for the neurofibromatosis-2 region generated by microdissection of chromosome 22[J]. *Genomics*, 1991, 10(3): 786 ~ 791.
- [25] Schondelmaier J, *et al.* Microdissection and microcloning of the barley chromosomes 1HS[J]. *Theor Appl Genet*, 1993, 86: 629 ~ 636.
- [26] Goldammer T, *et al.* Comparative analysis of Y Chromosome structure in *Bos taurus* and *indicus* by FISH using region-specific, microdissected and locus-specific DNA probes[J]. *Cytogenet Cell Genet*, 1997, 77: 238 ~ 241.
- [27] Ambady S, *et al.* Development of a chicken Z chromosome specific DNA library[J]. *J of Heredity*, 1997, 88(3): 247 ~ 249.
- [28] Robinson T J, *et al.* X Chromosome evolution in the suni and eland antelope: detection of homologous regions by fluorescence in situ hybridization and G-banding[J]. *Cytogenet Cell Genet*, 1997, 77: 218 ~ 222.
- [29] 蒋伟菊, 等. 人类染色体显微切割技术及其应用[J]. *国外医学遗传学分册*, 1997, 20(2): 66 ~ 70.
- [30] 徐磊, 等. 人类染色体 8q24.1 带特异性微小卫星 DNA 的筛选[J]. *遗传学报*, 1997, 24(1): 1 ~ 6.
- [31] Houben A, *et al.* Molecular-cytogenetic characterization of a higher plant centromere / kinetochore complex[J]. *Theor Appl Genet*, 1996, 93: 477 ~ 484.
- [32] Houben A, *et al.* Molecular cytogenetic characterization of the terminal heterochromatic segment of the B-chromosome of rye[J]. *Chromosoma*, 1996, 105: 97 ~ 103.
- [33] 马有志, 徐琼芳, 辛志勇. 染色体显微切割技术的现状与展望[J]. *遗传*, 1987, 19(2): 45 ~ 47.

北京科文印刷厂

Beijing Science & Culture Printer

我厂地处八大学院区内 毗邻中关村科技园区。1976 年建厂以来 经过不断的技术更新和改造 现已形成图文制作、照排出片、彩色胶印、书刊印刷、胶订精装、期刊合订等一条龙服务体系。尤以印制高档短版期刊见长, 为北京市书刊印刷定点企业之一。

近年, 我们在中科院有关专家的亲自指导下, 又建立了 CCT 软件照排系统, 专门承接 CCT、Word、PageMake、北大方正等各种排版软件的照排出片业务。

我们愿以“真诚的信誉、精良的品质、周到的服务”为我国科学文化事业的振兴作出努力!

厂址 北京市海淀区清华东路 15 号

邮编 :100083

电话 :010-62345723, 62321124, 62311250

E-mail: kwys@bj163.com

联系人 李红云 邓淑琴 张会玲