

用染色体原位杂交技术定位猪 β HCG 基因同类物于 $14q^{11}-q^{16}$

李奎 蒋建桥 童素红
张木先 袁亚萍 张锡元

(武汉大学生物系, 武汉 430072)

摘 要

本研究以点渍法和原位杂交技术为主要方法, 以人类绒毛膜促性腺激素(Human Chorionic Gonadotropin) β 链的克隆基因为探针, 开展猪的基因定位研究。证明猪的基因组中存在 β HCG 基因同类物, 并将其定位于染色体 $14q^{11}-q^{16}$ 。本文还对一些相关问题进行了讨论。

关键词 原位杂交, 基因定位, 猪, 人类绒毛膜促性腺激素 β 链

基因定位研究被称为基因组的解剖学。随着猪基因工程研究的兴起和发展, 对猪基因组精细结构的深入了解日益重要, 因而猪的基因定位研究日益受到重视。但该研究起步较晚, 与人类和小鼠的同类研究相比, 仍要落后许多。国内尚少见有关猪基因定位研究的报道。原位杂交技术始于本世纪60年代末, 它具有简便、直接、实验周期相对较短等优点, 是目前猪基因定位研究的最主要方法之一。

HCG (人绒毛膜促性腺激素) 由 α 和 β 两条多肽链所组成, 其生物学功能主要由 β 链所决定^[1], 它被广泛用于猪的超数排卵及转基因猪研究中。本研究运用点渍法确定猪基因组中存在 β HCG 基因同类物, 并用原位杂交法对其进行了染色体区域定位。

材 料 与 方 法

一、实验材料

1. 实验用猪: 湖北白猪, 5♀、5♂, 由华中农业大学种猪场和兽医院提供。
2. 探针 DNA: 重组质粒 $p^{\beta\text{HCG}}$ 中含约 0.4Kb cDNA 插入片段, 已转入 *E. coli* HB101中。
3. 主要试剂: 同位素标记的核苷 $^3\text{H-dATP}$ 、 $^3\text{H-dCTP}$ 购自上海原子核研究所, $\alpha\text{-}^{32}\text{P-dCTP}$ 购自北京福瑞公司, 各种工具酶均购自华美生物工程公司。

二、主要方法

1. 探针 DNA 和猪总 DNA 的制备和纯化: 质粒的扩增、提取和纯化方法参见 Mani-

* 本文承华中农业大学彭中镇教授审阅谨致谢意。

** 李奎现在华中农业大学畜牧兽医系工作。

*** 本文于1991年10月28日收到。

atis等(1982)^[2]。用 BamHI 和 EcoRI 对纯化后的质粒进行双酶切,回收 β HCG cDNA 片段。猪总 DNA 由肝脏中提取^[3]。

2. 探针的放射性标记:采用切口平移法标记 β HCG cDNA 片段^[4]。³H 标记的探针经 Sephadex G-50 柱层析纯化,用液闪仪计数确定标记探针的比活和同位素掺入率,本文所用探针的比活均在 1×10^6 cpm/ μ g DNA 以上,同位素的掺入率为 40~50%。 α -³²P 的具体标记方法按所购买药盒的操作指南进行。

3. 点渍法检测 β HCG 在猪基因组中的同源性:取猪、人(阳性对照)和枯草杆菌(Bacillus Subtilis, 阴性对照),总 DNA 各 10 μ g,经变性处理后,点于硝酸纤维素膜上。然后经预杂交、杂交和洗膜等步骤后,X光底片夹膜作放射自显影检查。

4. 原位杂交技术:(1)猪染色体标本的制备:常规微量全血培养,采用 BrdU 和 TdR 同步化法制备猪染色体标本;(2)染色体原位杂交方法参见张锡元等(1989),稍加改进^[5];(3)放射自显影:用 40~45 $^{\circ}$ C 双蒸水 1:1 稀释乳胶,然后滴 1~2 滴于标本片上,涂匀。置暗盒中 4 $^{\circ}$ C 曝光 5~22 天后取出,D-19 显影,F-5 定影,流水冲洗,气干;(4)杂交后显带:将标本置 0.01% 胰酶溶液中作用数分钟,再移入预热的磷酸缓冲液中处理 20'~30',然后置于 Wright's-Giemsa 染液中 5'~10',流水冲洗,气干,镜检;(5)原位杂交结果分析:杂交后显带的染色体标本置油镜下观察,选择染色体形态较好,染色体上出现银粒的分裂相进行分析,计数染色体上或紧靠染色体的银粒,并作照相记录。按普哇松分布统计分析染色体上的银粒分布是否具有特异性^[6]。

结 果

一、猪总 DNA 的提取结果

由猪肝中得到的总 DNA 大小均一,纯度较高(图 1)。

二、探针 DNA 的制备及纯化结果

经双酶切重组质粒后,回收到了纯度好的约 0.4Kb 的 β HCG cDNA 片段(图 2)。

三、猪基因组中存在 β HCG 基因的同源顺序

以 ³²P 标记的 β HCG cDNA 为探针,通过点渍法显示其与人和猪总 DNA 的反应呈阳性,而与枯草杆菌 DNA 的反应呈阴性(图 3),这证明猪基因组中存在 β HCG 基因同类物。

四、猪 β HCG 基因同类物的染色体定位

对 76 个杂交后显带分裂相的分析表明,位于染色体上的银粒共 186 颗,24.7% (46/186) 的银粒位于 14 号染色体上,其中 80.4% (37/46) 位于 14q¹¹-q¹⁶ 区域。经统计学检验,这些银粒的分布性具有极显著的特异性 ($P < 10^{-9}$)。大量非显带分裂相亦支持该结论,其余银粒则在染色体上随机分布。图 4 为 14 号染色体银粒分布示意图。图 5 为 76 个分裂相的银粒分布示意图。图 6 示一典型杂交后显带分裂相。

讨 论

一、有关原位杂交技术在猪基因定位研究中的应用

我们在本室现有仪器设备的情况下, 参照人类基因定位中所用的原位杂交技术, 加以改进并将其应用于猪基因定位研究之中, 已证明是成功的。在运用此技术的过程中, 除了掌握好预杂交和杂交的条件之外, 以下几点应加以注意, 方能得到好的结果。1、原位杂交技术对探针质量要求较高, 一定要保证探针 DNA 的纯度, 才能得到高比放的探针; 2、染色体标本应力求干净, 分裂指数应争取较高。才有利于统计分析; 3、在标记和杂交之前要检查各种酶的活性, 既能保证标记和杂交成功, 又能节省同位素等贵重药品和试剂。

原位杂交技术中染色体标本的显带处理亦很重要, 它直接关系到基因定位结果的准确性, 同时, 它又是整个原位杂交技术中较难掌握的环节^[7]。其显带方法大致可归为二类:

(1) 杂交前显带; (2) 杂交后显带。杂交前显带是指在原位杂交之前, 先将染色体进行显带处理, 并将所有好的分裂相进行显微摄影, 然后进行原位杂交和放射自显影处理, 其时带纹已被破坏。将带纹已被破坏但染色体上有银粒的分裂相与杂交前照的带纹清晰的分裂相相对照, 即能精确确定银粒所在位置。多数学者认为此方法比较繁琐。迄今已报道的杂交后显带方法有多种, 但稳定、重复性好的方法尚少。杂交后显带处理包括杂交后 G 显带、杂交后 R 显带和杂交与 R 显带同时进行等方法。在本室条件下, 我们在材料与方法部分所列出的方法比较稳定, 重复性也好。

二、有关猪 β HCG 基因同类物的染色体定位研究

已有研究表明, β HCG 是进化史上比较保守的顺序, 部分鱼类、两栖类中存在 β HCG的同源顺序。其中, 草鱼 β HCG 基因同类物被定位于一对中部着丝粒染色体(张锡元等, 1989)。在此基础上, 我们进一步证明猪中存在 β HCG基因同类物, 并将其定位于14q¹¹-q¹⁶, 这将有助于 HCG 在养猪业中的更广泛应用。 β HCG 也是猪14号染色体上首次定位的基因, 它的定位有助于深入了解猪基因组的结构。

三、运用人类克隆基因开展猪基因定位研究的可行性和必要性

由于人类基因定位研究遥遥领先于其它物种, 而人与猪基因组之间存在大量同源基因和保守的同源染色体片段^[8], 所以在猪基因定位研究中可借用人类标记基因和人类 DNA 探针。这既能节省人力、物力, 亦能加速猪基因定位研究进展。例如, Yerle 等(1990)即是有目的地选用人1号染色体的 ENO1 (烯醇酶1) 和19号上的 APOE (载脂蛋白E) 两基因为探针, 应用原位杂交技术证明二者均位于猪6号染色体上, 进一步证实了猪 HAL (氟烷敏感性) 连锁群中包含人1号和19号染色体的保守片段^[9]。本研究结果也证明运用人类克隆基因开展猪基因定位研究是可行的。



图1 猪总DNA电泳图
 1. λ DNA/PstI 2. 鱼总 DNA/PstI
 3. 鱼总 DNA 4. 猪总 DNA/PstI
 5. 猪总 DNA

Fig.1 Electrophoresis showing total DNA of pigs
 1. λ DNA/PstI 2. Fish DNA/PstI
 3. Fish DNA 4. Pig DNA/PstI
 5. Pig DNA



图2 β HCG cDNA片段
 1. β HCG cDNA 片段
 2. λ DNA/HindIII (标记)

Fig. 2 Electrophoresis showing β HCG cDNA fragments
 1. βHCG cDNA fragments
 2. λ DNA/HindIII (Marker)

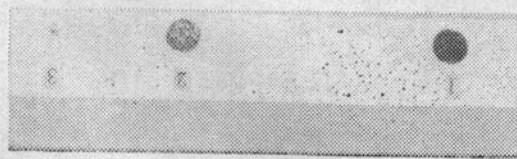


图3 点渍法放射自显影图
 1. 人 DNA 2. 猪 DNA
 3. 枯草杆菌 DNA
 Fig. 3 Autoradiograms showing dot blotting
 1. Human DNA 2. Pig DNA
 3. Bacillus subtilis DNA

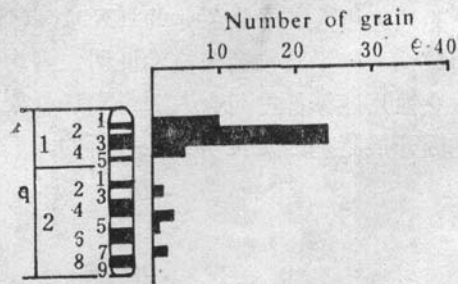


图4 14号染色体银粒分布示意图
 Fig. 4 The idiogram showing grain distribution of chromosome 14

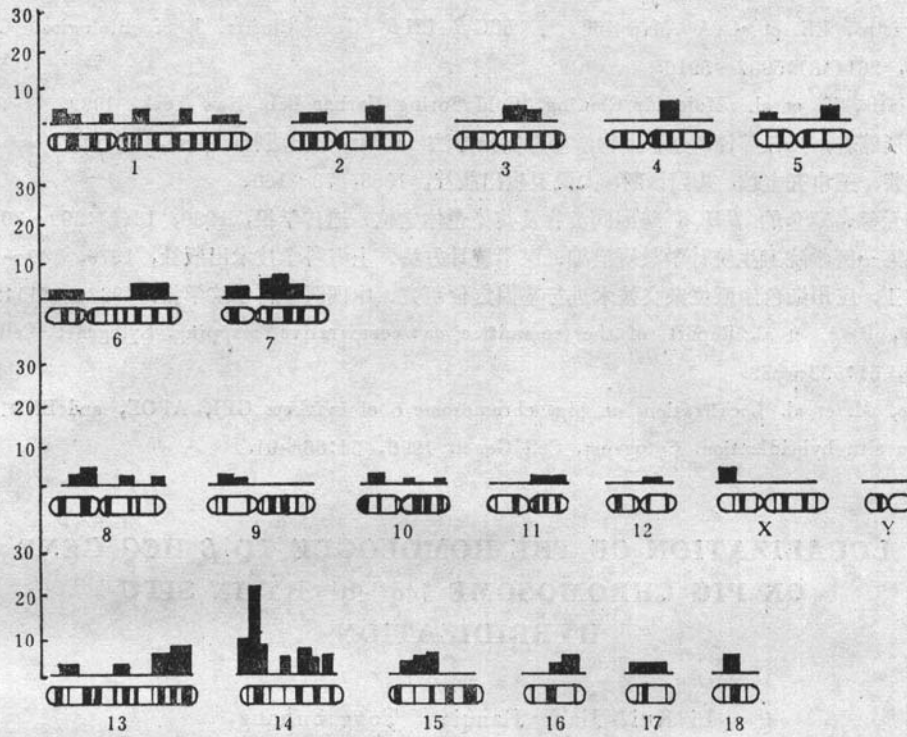


图5 76个分裂相银粒分布示意图
(纵轴示银粒数)

Fig. 5 Grain(distribution from in situ hybridization of 76 metaphase chromosome spreads (the ordinate shows the number of silver grains)

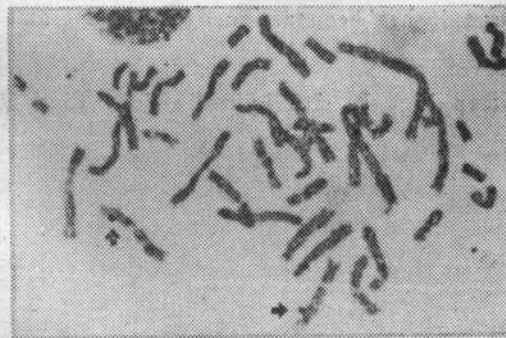


图6 示一杂交后显带分裂相，银粒位14号染色体上(箭头所示)

Fig. 6 A banded chromosome spread after in situ hybridization, the silver grains are located on chromosome 14 (arrows)

参 考 文 献

- [1] Policastro, PE. et al. A Map of the hCG β -LH β Gene Cluster. *J. of Biological Chemistry*, 1986, 261(13):5907~5916.
- [2] Maniatis, T. et al. *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Lab. New York, 1982, 1~98.
- [3] 戴维斯等著, 张钰等译. 分子生物学基本实验方法. 复旦大学出版社, 1989, 1~50.
- [4] 吴冠芸, 王申五主编. 基因诊断. 人民卫生出版社, 1988, 78~160.
- [5] 张锡元等. 草鱼的 β HCG 基因同类物及其染色体定位. *遗传学报*, 1989, 16(4):293~304.
- [6] 上海第一医学院卫生统计学教研组编. 医学统计方法. 上海科学技术出版社, 1979, 149~160.
- [7] 程在玉. 应用染色体原位杂交技术进行基因定位研究. *中国医学科学院学报*, 1987, 9(1):23~27.
- [8] Lally, P. A. et al. Report of the committee on comparative mapping. *Cytogenet Cell Genet.*, 1989, 51:503~532.
- [9] Yerle, M. et al. Localization on pig chromosome 6 of markers GPI, APOE, and ENO1, carried by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 1990, 54:86~91.

**LOCALIZATION OF THE HOMOLOGUE TO β HCG GENE
ON PIG CHROMOSOME 14q¹¹-q¹⁶ BY IN SITU
HYBRIDIZATION**

Li Kui, Jiang Jianqiao, Tong Suhong,
Zhang Muxian, Yuan Yaping, Zhang Xiyuan
(Department of Biology, Wuhan University)

Abstract

To map the gene of pigs, dot blotting and in situ hybridization are conducted, using the β HCG as the probe. It is shown that there is the homologue to β HCG gene in the genome of pigs, and it has been assigned to chromosome 14q¹¹-q¹⁶. The relevant points of the studies are discussed.

Key words Gene mapping, In situ hybridization, Pigs, β HCG