

抗肌萎缩蛋白基因 YAC 克隆的筛选和鉴定^①

张成^② 柴建华 刘焯霖 顾杨洪

(中山医科大学神经病学教研室, 广州, 510080)

提 要 应用完整的 DMD cDNA 探针, 从人 YAC 基因文库中筛选并 Southern 杂交鉴定 5 个 YAC-DMD 克隆, 其分子量分别为 900kb, 800kb, 650kb, 450kb 和 450kb。这些克隆是抗肌萎缩蛋白基因特定区域 DNA 用之不竭的源泉, 为抗肌萎缩蛋白基因结构和发病机制的研究创造了条件。

关键词 抗肌萎缩蛋白基因; YAC 克隆; 脉冲电泳; DMD cDNA 探针

中图分类号 R746.2

抗肌萎缩蛋白^[1](dystrophin)基因是迄今发现的人类最大基因, 长约 2 300kb^[2]。该基因异常导致蛋白产物抗肌萎缩蛋白异常的一种致死性遗传病——杜兴肌营养不良症(Duchenne muscular dystrophy, DMD)和一种较 DMD 病情缓和的贝克肌营养不良症(Becker muscular dystrophy, BMD)。虽然抗肌萎缩蛋白基因已被定位在 Xp21^[3]并得到了其 14kb cDNA 全顺序^[4], 发现 60% 以上的 DMD/BMD 是由于该基因部分外显子缺失所致^[5], 但缺失机制不清, 其主要原因为该基因组的内部结构尚不明了。尽管可用科斯体和噬菌体克隆进行染色体移步及缺失断裂点的分析, 但由于二者的载体容量相对较小, 速度太慢, 现已分析的 dystrophin 基因组结构还不足全长的 1/4, 且相互之间缺乏连贯性。因此, 科学家们致力寻找一种理想的大容量克隆载体。酵母人工染色体^[6](Yeast artificial chromosome, YAC)是 1987 年发展起来的一种大容量克隆载体, 一次可克隆成百乃至上千 kb 的 DNA 大片段, 其容量为科斯体克隆容量的 10~20 倍, 故对巨大基因的克隆和大尺度物理的绘制具有显著的优越性。为了弄清抗肌萎缩蛋白基因组的结构, 阐

明 DMD 的发病机制, 我们用完整的 DMD cDNA 探针, 从人 YAC 文库中筛选 YAC-DMD 克隆, 脉冲电泳分离, Southern 印迹杂交鉴定克隆的正确性, 为进一步分析提供了取之不尽的 DNA 源泉。

1 材料和方法

1.1 材 料

限制性内切酶 *EcoR* I, *Hind* III 等及随机引物标记试剂盒购自美国 BRL 公司, DMD cDNA 探针来自 Kunkel 博士。人基因组 YAC 文库及 22cm×22cm 的高密度列阵布点膜由复旦大学遗传所柴建华实验室构建及制备。 α -³²P-dATP 为 New England Nuclear 公司产品。CHEF-DR II 脉冲电泳系统和杂交仪为美国 Bio-Rad 公司产品。AB972 菌株为本实验室所藏。

1.2 方 法

1.2.1 原位杂交及放射自显影 由载体 YAC₄ 构建的 YAC 文库保存在数百个 96 孔培养板中, 抽提 YAC 文库中每个克隆 DNA 按照 96×96 点阵格式布点在 22cm×22cm 的 Hybond N⁺ 尼龙膜上, 称为高密度列阵布

① 国家自然科学基金和部分 863 高技术基金资助;

② 第一作者, 35 岁, 男, 副教授, 第二及第四作者单位在复旦大学遗传学研究所(200433)

点膜(另文发表)。将该膜置于尼龙网上,卷成圆筒状放入杂交管。加入 15ml 预杂交液(50%甲酰胺, $4 \times \text{SSC}$, 1mmol/L EDTA, 50mmol/L 磷酸钠 pH7.2, 1%SDS, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 鲑精 DNA, $10 \times \text{Denhardt}$ 溶液, 1%硫酸葡萄糖), 于杂交仪中 42 $^{\circ}\text{C}$ 预杂交 3h, 然后加入同位素 $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -dATP 标记的变性的 cDMD₁₋₁₄ 探针, 42 $^{\circ}\text{C}$ 杂交 20h, 用 $2 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS 42 $^{\circ}\text{C}$ 洗膜 2 次, 每次 15min。室温下待膜上水份消退, 立即用保鲜膜将其包被, -70 $^{\circ}\text{C}$ 借增感屏放射自显影 2~4d, 根据杂交信号在膜上的坐标, 从 96 孔培养板上挑出与之相对应的 YAC 克隆。

1.2.2 YAC 克隆 DNA 样品的制备 把从 YAC 克隆板上挑出的克隆在含有 AMP (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的 YPD (1% yeast extract, 2% dextrose, 2% bactopecton) 平板上划单菌落, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2~3d, 然后挑取单菌落接种于 50ml YPD (AMP 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 液体培养基中。30 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 36~48h, 将培养液 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心, $3 \times 10^3 \text{r}/\text{min}$, 10min。弃上清, 用 1.5 倍于沉淀细胞体积的 0.05mol/L EDTA (pH 8.0) 悬浮酵母菌。每 300 μl 菌液加入 100 μl lyticase (2mg/ml) 破细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$, 20min, 取 0.5ml 50 $^{\circ}\text{C}$ 1.6% 的低熔点胶(用 0.125mol/L EDTA 溶液配制)与 0.5ml 经 lyticase 处理的酵母菌悬液混匀, 加入在冰上预冷的模具中(容积为 20mm \times 9mm \times 1.2mm = 210 μl), 注意不留气泡, 置于 40ml LET (0.5mmol/L EDTA, 0.01mol/L Tris pH 7.5, 75% β -mercaptoethanol) 缓冲液中 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 16~24h, 弃去 LET 缓冲液, 加入 10ml NDS 缓冲液 (1% lanrylsarcosine, 1mg/ml proteinase K, 0.01mol/L Tris pH 7.5, 0.5mol/L EDTA pH8.0) 置于 50 $^{\circ}\text{C}$ 16~24h, 弃去 NDS 液, 加入 10ml 0.05mol/L EDTA, 室温 15min, 换 0.05mol/L EDTA 10ml 置于 50 $^{\circ}\text{C}$ 16~24h。连续 2 次, 置换 0.05mol/L EDTA, 将凝胶块置 4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。分子量标准酵母 AB972 制作方法同上。

1.2.3 脉冲电泳条件 ①制胶: 用 120~140ml 0.5 \times TBE (45mmol/L Tris base, 45mmol/L Boric acid, 1mmol/L EDTA) 电泳缓冲液制备 1% 琼脂糖凝胶, 厚 1cm。②上样: 将 1.2.2 制备的样品塞进凝胶上样孔, 使样品紧贴上样孔的前壁, 不留气泡, 用 0.8% 低熔点琼脂糖凝胶填充间隙, 固定样品块。③电泳: 新配制 2 000ml 0.5 \times TBE 于脉冲电泳槽中, 用循环水冷却器使其温度预冷至 14 $^{\circ}\text{C}$, 把已上样的凝胶固定于电泳槽中, 电泳缓冲液高于胶 2mm。电压 200V, 起始脉冲 60s, 终止脉冲 90s, 电泳 24h。

1.2.4 Southern 转移和杂交 电泳毕, 凝胶在 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 EB 溶液中染色 20~30min, 双蒸水脱色 1~3h, 短波紫外灯上拍照, 常规变性, 中和、转移、用 ^{32}P 标记的完整 DMD cDNA 探针杂交, 放射自显影。

2 结 果

2.1 YAC-DMD 克隆的筛选

高密度列阵布点膜上的每个克隆 DNA 的坐标, 与 96 孔培养板的克隆编号相对应。

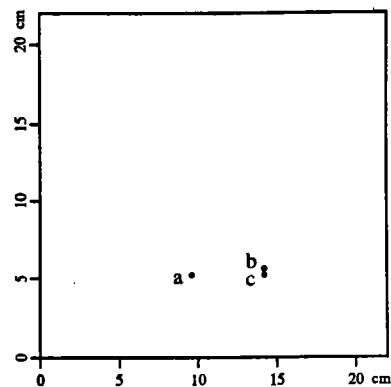


图1 YAC-DMD 克隆原位杂交
放射自显影结果
探针 cDMD₁₋₁₄

阳性克隆坐标为 a(9.6, 5.2), b(14.2, 5.6),
c(14.2, 5.2)(单位为 cm)

根据阳性杂交信号的坐标,就可以从克隆培养板上挑出对应的克隆。如图1坐标所示,很容易确定培养板上目的克隆位置。我们用 cDMD₁₋₁₄ 探针从 YAC 文库中筛选出 6 个克隆。

2.2 YAC-DMD 克隆的鉴定

对于经原位杂交筛选出来的阳性 YAC 克隆,还需要进一步做印迹杂交鉴定,并确定各 YAC-DMD 克隆 DNA 片段的分子量。将筛选出的 6 个 YAC-DMD 克隆制备成低熔点胶样品块行脉冲电泳印迹转移后用 cDMD₁₋₁₄ 探针杂交。5 个克隆具有杂交信号,其分子量为克隆 A 900kb, B450kb, D650kb, E450kb, F800kb(图 2)。克隆 C 没有杂交信号,为假阳性克隆。



图2 YAC-DMD 克隆印迹杂交放射自显影
探针 cDMD₁₋₁₄

3 讨论

3.1 YAC 克隆的筛选

由于 YAC 文库中的每个克隆 DNA 按规定格式高密度列阵布点在 1~2 张 22cm × 22cm Hyband N 尼龙膜上,这给筛选带来了极大的方便,1~2 次杂交可从含有整个人类基因组 DNA 的膜上筛选目的基因。我们是采用核型为 48,XXXX 细胞 DNA 构建 YAC

分子克隆库,相当于 4 倍人类 X 染色体基因组当量,更有利于 X 染色体上基因的筛选。但在实验室中,我们发现 YAC 克隆杂交信号很弱,其原因可能有:①由于高密度列阵布点 YAC 克隆 DNA,为了防止克隆间的相互污染,故点阵的 DNA 量过少。②由于每一张 YAC 文库膜,要经过多次不同探针的杂交,洗膜及放射自显影后除去结合膜上的探针等一系列处理,使 YAC 膜上的 DNA 部分丢失。在这种情况下,要获得理想的杂交结果,就得提高杂交探针的比放射活性,严格掌握洗膜条件,延长放射自显影的时间。因此我们采用 α -³²P 高比放射活性标记探针 [2×10^9 次/min · μg^{-1} DNA] 杂交, $2 \times \text{SSC}$, 0.5% SDS 室温 (25℃) 洗膜 15min, -70℃ 放射自显影 5d, 用 Agfar 显影液冲洗 X 片;在片上寻找圆而均匀的杂交信号。将 YAC 克隆从母板上挑出后,再经脉冲电泳分离,用相应的探针 Southern 杂交证实为所需的克隆。而假阳性克隆的产生可能为杂交信号识别错误或其坐标测量错误。

3.2 目的克隆分子量的判断

YAC 克隆分子量的测定可从脉冲电泳和 Southern 印迹杂交来进行,常用分子量标准是酵母 AB972,如果重组的人工染色与酵母本身染色体的分子量差别较大,则可能脉冲电泳上看见多一条带。如果重组的人工染色体分子量与酵母本身染色体的分子量相近,则在脉冲电泳上看不见明显的 YAC 带,不能判断分子量大小,而需杂交后根据杂交信号进行分子量测量。我们用 cDMD₁₋₁₄ 探针杂交后 A-F 的分子量分别是 900kb, 450kb, 650kb, 450kb, 800kb。C 无杂交信号,为假阳性克隆。

3.3 筛选 YAC-DMD 克隆的意义

人类基因组的制图和测序是 21 世纪的宏伟规划,其总目标是进一步认识人类遗传和各种基因在疾病中的作用。而克隆各种基因是实现该目标的先决条件。YAC-DMD 基因组的每个克隆将成为 DMD 基因特定区域

DNA 的用之不竭的源泉,为进一步分析 DMD 基因结构和发病机制打下了基础。

参 考 文 献

- 1 张 成,刘焯霖,梁秀龄.关于 dystrophin 中文译名的商讨.中华医学遗传杂志,1992,9(4):232
- 2 Den Dunnen JT, Grootsholton PM, Bakker E, et al. Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FLGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications. Am J Hum Genet, 1989, 45: 835
- 3 Monaco AP, Kunkel LM. A giant locus for Duchenne and Becker muscular dystrophy gene. TIG, 1987; 3: 33
- 4 Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM, et al. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. Cell, 1988, 53: 219
- 5 Koenig M, Beggs AH, Moyer M, et al. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: Correlation of severity with type of deletion. Am J Hum Genet, 1989, 45: 498
- 6 Burke DT, Carle GF, Olson MV. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. Science, 1987, 236: 806

(1993-04-28 收稿 1994-09-21 修回)

THE SCREENING AND IDENTIFYING OF THE YEAST ARTIFICIAL CHROMOSOME CLONE CONTAINING DYSTROPHIN GENE

Zhang Cheng¹ Chai Jianhua² Liu Zhuolin¹ Gu Yanghong²

(1 Department of Neurology, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080

2 The Genetic Institute of Fudan University)

The five YAC-DMD clones were screened from human YAC gene library and identified with Southern hybridization using the complete probes of DMD cDNA. The molecular weight was 900kb, 800kb, 650kb, 450kb, and 450kb, respectively. These YAC-DMD clones will be the source of supplying the specific region DNA in dystrophin gene, which is the basis of studying the dystrophin gene structure and DMD pathogenesis.

Key words dystrophin gene; YAC clone; puls field electrophoresis; probe DMD cDNA