

# 抗肌萎缩蛋白基因51号外显子的筛选 及其两侧内含子的亚克隆<sup>①</sup>

张成<sup>②</sup> 柴建华 刘焯霖 王滢  
(中山医科大学神经病学教研室,广州,510080)

**提 要** 用 cDMD<sub>8</sub> 探针, 从人 X 染色体噬菌体文库中筛选并作 DNA 印迹杂交鉴定出含有抗肌萎缩蛋白基因 51 号外显子的克隆。经限制酶切图谱分析, 确定 *Kpn* I 和 *Hind* III 为亚克隆位点, 从而获得了与抗肌萎缩蛋白基因 51 号外显子相连的 50 和 51 号内含子亚克隆, 为该区段的核苷酸顺序分析打下了基础。

**关键词** 抗肌萎缩蛋白基因; 50 和 51 号内含子; 亚克隆

**中图分类号** R746.2

抗肌萎缩蛋白基因是迄今发现的人类最大基因, 长约 2300 kb, 含有 75 个外显子<sup>[1]</sup>。该基因突变导致其蛋白产物——抗肌萎缩蛋白 (dystrophin) 异常, 在临床上出现病情严重的 Duchenne 型肌营养不良症 (Duchenne muscular dystrophy, DMD) 和较为缓和的 Becker 型肌营养不良症 (Becker muscular dystrophy, BMD)。60% 以上的 DMD/BMD 病人是由于抗肌萎缩蛋白基因部分外显子缺失所致, 其中 50% 为 44~53 号外显子之间不同组合的外显子缺失, 称之为缺失热区<sup>[2]</sup>, 其断裂点多在内含子中。在 479 例的抗肌萎缩蛋白基因缺失病例中, 50 和 51 号内含子共断裂造成 51 号外显子丢失 28 例<sup>[2~4]</sup>, 提示 50 和 51 号内含子的核苷酸顺序有某些特征。为了了解抗肌萎缩蛋白基因 DNA 缺失的机制, 我们用 cDMD<sub>8</sub> 探针, 从人 X 染色体噬菌体文库中筛选出含有 51 号外显子的克隆, 然后亚克隆 50 和 51 号内含子, 为测定其核苷酸顺序, 探讨 DMD/BMD 发病机制打下基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

限制性内切酶和 T<sub>4</sub> DNA 连接酶, 随机引物标记试剂盒购自美国 BRL 公司, cDMD<sub>8</sub> 探针来自 Kunkel 博士。人 X 染色体入 Charon35 分子克隆库由 Los Alamos National Lab 赠送。 $\alpha$ -<sup>32</sup>P-ATP 为 New England Nuclear 公司产品。M<sub>13</sub>mp 19 RF DNA 为瑞典 Pharmacia 公司产品。菌种 JM<sub>103</sub> 为本实验室所藏。

### 1.2 实验方法

基本上按照 Cold Spring Harbor Laboratory 的方法<sup>[5]</sup>。

1.2.1 噬菌斑原位杂交 将已用  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-ATP 标记的 0.9 kb cDMD<sub>8</sub> 探针与原位复印到硝化纤维素滤膜上的噬菌体重组 DNA 杂交, 放射自显影后从平皿中挑选出相应的阳性噬菌斑进行复筛, 以获得充分孤立的阳性噬菌斑。

1.2.2 DNA 印迹杂交 制备孤立的复筛阳性克隆 DNA, 经 *Hind* III 完全酶切, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离, 转移到硝化纤维膜上, 在 50% 甲酰胺, 4 × SSC, 1 mmol/L EDTA, 50 mmol/L 磷酸钠 pH 7.2, 1% SDS, 50 μg/ml 变性鲑鱼精 DNA, 1% 硫酸葡聚糖, 10 × Den-

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 36 岁, 男, 讲师, 第二及第四作者单位在复旦大学遗传学研究所

hardt 溶液中, 42℃预杂交3h, 再加入变性的 (0.5~1) × 10<sup>6</sup>次/min·ml<sup>-1</sup> <sup>32</sup>P 标记的 cDMD<sub>3</sub>探针, 42℃杂交16h, 用2×SSC, 0.1% SDS 洗膜, 于-70℃放射自显影1~4d。

1.2.3 克隆 DNA 的限制酶图谱分析 按柴建华所述方法<sup>[6]</sup>进行。

1.2.4 DNA 片段的亚克隆 回收 DNA 印迹杂交鉴定的含有抗肌萎缩蛋白基因51号外显子的噬菌体克隆 DNA 片段(3.1kb Hind III 片段), 经 Kpn I 完全酶切, 同时将载体 M<sub>13</sub>mp 19RF DNA 用 Kpn I 和 Hind III 双酶切, 然后由 T<sub>4</sub>DNA 连接酶连接, 转化后可获得50和51号内含子亚克隆。

## 2 结 果

### 2.1 基因51号外显子克隆筛选

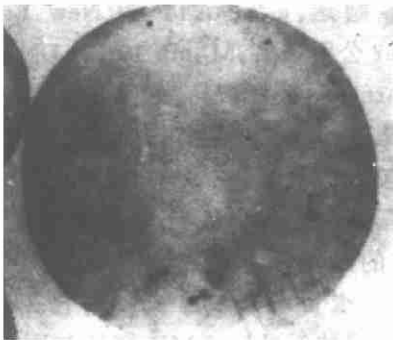


图1 噬菌斑原位杂交(初筛)放射自显影图  
探针 cDMD<sub>3</sub>箭头所示为阳性噬菌斑

### 2.3 基因部分限制酶图谱

ZFD801克隆 DNA 限制酶图谱拟另文发表。其中3.1kb 片段含有第51号外显子, 其中有一 Kpn I 切点。

### 2.4 基因50和51号内含子的亚克隆

电泳分离回收 ZFD801克隆3.1kb Hind III DNA 片段, 它含有抗肌萎缩蛋白基因部分50号内含子, 完整51号外显子和部分51号内含子。用 Kpn I 酶切该 DNA 片段, 连接到 M<sub>13</sub>mp 19载体上, 转化后得到8个转化子, 随机挑出2个测序, 发现2号和6号亚克隆分别含

用噬菌斑原位杂交法从初筛培养基上挑出与阳性杂交信号(图1)相对应的噬菌斑进行第二轮筛选。我们用0.9kb 的 cDMD<sub>3</sub>探针从人 X 染色体噬菌体文库中共得到10个单一阳性噬菌斑(图2), 分别命名为 ZFD801, ZFD802, ……ZFD810。

### 2.2 基因51号外显子克隆的鉴定

将上述10个阳性噬菌体克隆 DNA, 经 Hind III 酶切, 电泳, 转移, cDMD<sub>3</sub>探针杂交, 发现 ZFD801克隆含有3.1kb 杂交片段(图3)。根据文献<sup>[2]</sup>资料, 该片段中包含 dystrophin 基因51号外显子。

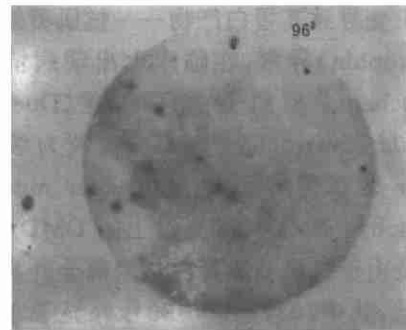


图2 噬菌斑原位杂交(复筛)放射自显影图  
探针 cDMD<sub>3</sub>

有部分50和51号内含子, 我们正在对它们进行进一步分析。

## 3 讨 论

### 3.1 目的克隆的筛选和鉴定

为了测定抗肌萎缩蛋白基因缺失热区50和51号内含子的核苷酸顺序, 探讨 DMD 发病的分子机制, 首先需获得该基因缺失热区的克隆。我们用 cDMD<sub>3</sub>探针经原位杂交从 X 染色体文库中筛选出10个充分孤立的阳性克

隆,但哪个或哪些克隆含有51号外显子,还需进一步鉴定。cDMD<sub>1</sub>探针包含抗肌萎缩蛋白基因47~52号外显子,因此,凡包含47~52号外显子的噬菌体克隆均可有杂交信号,Koenig<sup>[2]</sup>指出,47~52号外显子分别位于不同长度的 *Hind* III 酶切片段中,而51号外显子位于3.1kb *Hind* III 片段中。将每个阳性克隆DNA用 *Hind* III 酶切后,经初筛标记的 cDMD<sub>1</sub>探针杂交,带有3.1kb杂交片段的克隆则为51号外显子所在的克隆,然后进一步确定亚克隆的位点。

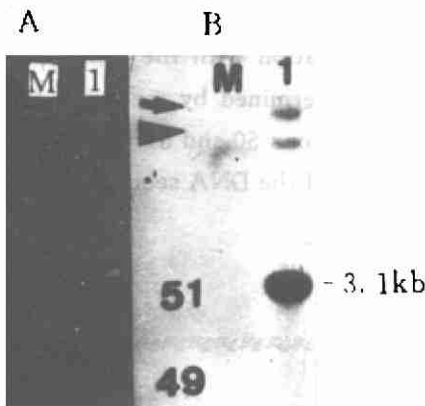


图3 噬菌体 DNA 印迹杂交自显影图

DNA 以限制酶 *Hind* III 酶解,以 DMD cDNA<sub>1</sub> 为探针作印迹杂交及自显影。A,噬菌体 DNA *Hind* III 酶解后作 1% 琼脂糖凝胶电泳;M 为分子量标准  $\lambda$ -*Hind* III;1 为噬菌体 DNA-*Hind* III 片段。B,以探针 DMD cDNA<sub>1</sub> 作杂交的放射自显影图,杂交带为 3.1kb,内含第 51 号外显子,箭头指处为噬菌体  $\lambda$  Charon35 左右臂

### 3.2 亚克隆位点的选择

在实验中,有时得到许多亚克隆并测序,由于亚克隆之间的关系不明确,故测定的核苷酸顺序无法分析,因此合理地选择亚克隆位点明确各亚克隆之间的关系就显得特别重要。我们的目的是比较 50 和 51 号内含子的 DNA 顺序,从克隆 ZFD801 限制酶图谱知道,含有第 50 号外显子的 3.1kb *Hind* III 片段中有一 *Kpn* I 切点,位于该片段的中央。由于已证实克隆 ZFD801 的 3.1kb *Hind* III 片段中含有第 51 号外显子,在 51 号外显子中有一 *Kpn* I 切点<sup>[7]</sup>, (将 233bp 的 51 号外显子分为

99bp 和 134bp),而在 3.1kb *Hind* III 片段中只有一个 *Kpn* I 切点,故可把 51 号外显子精确定位在 3.1kb *Hind* III 片段的中央。我们回收 3.1kb *Hind* III 片段,然后再用 *Kpn* I 酶切,则得到两种片段,一种是包含部分 50 号内含子和部分 51 号外显子片段,一种是包含部分 51 号外显子和部分 51 号内含子片段,它们都带有 *Hind* III 和 *Kpn* I 酶切的粘性末端。将 M<sub>13</sub>mp19 载体用 *Hind* III 和 *Kpn* I 双酶切,经连接,转化可获得 50 和 51 号内含子两种亚克隆,它们均与 51 号外显子相连。经过这样的位点测序,明确测定顺序与已知 51 号外显子 DNA 顺序的关系,就可进行内含子之间的核苷酸顺序,为阐明抗肌萎缩蛋白基因 DNA 缺失的机制提供依据。

### 参 考 文 献

- 1 Den Dunnen JT, Grootsholten FM, Bakker E, et al. Topography of the Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and duplications. *Am J Hum Genet*, 1989, 45:835
- 2 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
- 3 Hodgson S, Hart K, Abbd S, et al. Correlation of clinical and deletion data in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *J Med Genet*, 1989, 26:682
- 4 Upadhyaya M, Smith RA, Thomas NST, et al. Intragenic deletions in 164 boys with Duchenne muscular dystrophy (DMD) studies with dystrophin cDNA. *Clin Genet*, 1990; 37:456
- 5 Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning, a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, 108-2 111
- 6 柴建华.  $\lambda$  噬菌体和 cosmid 重组 DNA 克隆的快速限制性内切酶图谱分析方法. *遗传学报*, 1990, 17(2):136

7 Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-

shaped cytoskeletal protein. Cell, 1988, 53:219  
(1993-03-09收稿 1993-11-29修回)

## SCREENING OF EXON 51 AND SUBCLONE OF INTRONS 50 AND 51 ON BOTH SIDES OF THE EXON 51 IN DYSTROPHIN GENE

Zhang Cheng    Chai Jianhua    Liu Zhuolin    Wang Ying

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

The clone containing exon 51 of dystrophin gene was screened from Human X Chromosome Phage Library and identified by Southern blot hybridization with the probe cDMD<sub>8</sub>. The subclone sites of enzyme *Kpn* I and *Hind* III were determined by means of the fine scale map of dystrophin gene. So the subclones containing introns 50 and 51 which linked to exon 51 of dystrophin gene were obtained, which is the basis of the DNA sequences of intron 50 and 51 were analysed.

**Key words**    dystrophin gene; introns 50 and 51; subclone



•新成果•

### 精液、阴道液几种同工酶的研究

课题负责 伍新尧

(中山医科大学实验中心, 广州, 510089)

精液、阴道液分别是男女生殖系统中有重要意义的分泌液,其新陈代谢十分活跃,因而具有相应的同工酶。作者对精液、阴道液、血液几种同工酶进行了系统的研究,调查了大批人群的 PGM<sub>1</sub>亚型、ESD、EAP、GLOI的分布,计算出了 PGM<sub>1</sub>、ESD、EAP 亚型的基因频率,证明了精液的 PGM<sub>1</sub>亚型及 GLOI 表型与血液的完全相同,无精子精液也能测出这些同工酶型。阴道液的 PGM<sub>1</sub>亚型、ESD、GLOI 等表型除部分同工酶活性低下外,大部分与血液的完全相同,而刺激会增强某些阴道液的同工酶的活性。该研究提高了精液/阴道液混合斑的鉴别率,在法医学上有创新性和应用价值,也为性生理、生殖系统疾病及其遗传因素的研究提供基础资料。该成果在全国范围的公检法部门得到推广,收到了良好的社会效益。对健全和加强我国社会主义法制起了积极作用。1992获国家教委科技进步三等奖,同获广东省医药卫生科技进步二等奖。

(陈丽芳)