

## 用原位杂交法定位猪乳铁蛋白基因于染色体 2q<sup>12</sup>

何 新 陈清轩

(中国科学院发育生物学研究所 北京 100080)

**摘 要** 本研究以非放射性标记的猪乳铁蛋白(Porcine Lactoferrin 简称 PLF)cDNA 为探针,通过染色体原位杂交法,对 PLF 基因进行了染色体定位。实验中采用金胶抗体技术并结合使用银增强系统,提高了方法的灵敏度。利用染色体的组型分析,对杂交点的分布进行统计学分析。52% (26/50)的分裂相在第 2 号染色体具银粒分布,实验结果表明:PLF 基因定位于猪 2 号染色体 2q<sup>12</sup>区域。

**关键词** 猪乳铁蛋白基因,染色体原位杂交,基因定位  
学科分类号 Q78

对家猪(*Sus scrofa* L.)的基因定位工作,早在 1964 年 Andresen<sup>[1]</sup>首次报道了猪的红细胞原 C(EAC)和 J 基因(EAJ)存在连锁关系。近年来,随方法学的不断改进,使猪的基因定位取得了长足的进展,并成为哺乳动物基因定位工作中一个异常活跃的领域。迄今,已定位的猪基因数(包括定位的 DNA 片段)有 156 个<sup>[2]</sup>。猪的基因定位不仅可为猪基因图谱的绘制提供资料,在理论上,其有助于了解染色体的结构功能以及基因表达调控等一系列问题。

乳铁蛋白(Lactoferrin LF)基因是研究较早的基因之一。对 LF 基因研究较多的是人乳铁蛋白(hLF),其 cDNA 已经克隆。序列已测知,且 hLF 基因已定位于人染色体 3q<sup>21-23</sup><sup>[3-5]</sup>。在其它哺乳动物研究中,现已将小鼠 LF cDNA 克隆,并将此基因定位于 9 号染色体上<sup>[6]</sup>。经查,对 PLF 基因进行染色体定位的研究,尚未见报道。

本文的目的旨在用非放射性 Dig 标记的 PLF cDNA 为探针,对猪染色体标本进行原位杂交,将 PLF 基因进行染色体定位。此研究不仅可为猪的基因图谱的绘制提供资料,且可对提高猪抗病能力的研究提供参考数据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 染色体的制备

无菌手术法自长白猪耳静脉采血,将 0.5ml 血接种于含 PHA(sigma)、10% FBS(Gibco)、青链霉素的 RPMI 1640(Gibco)5ml 中。于 39℃ 培养 72h,收获细胞 4h 前加秋水仙素使最终浓度为 0.04μg/ml。按常规法制备外周淋巴细胞染色体玻片标本。置 4℃ 待用。

#### 1.2 质粒 DNA 的提取和插入片段的回收

质粒构建如图 1 所示。将 PLF 全长 cDNA 克隆于载体 p<sup>Bluescript KS<sup>+</sup></sup> 之 Not I 插入位点

上(此质粒由台湾养猪研究所提供)。质粒 DNA 的提取参照文献[7]进行,分离纯化后的质粒 DNA 经 Not I 完全酶切后,经低熔点胶分离电泳,回收 2.06kb 片段。

### 1.3 探针的非放射标记

探针的标记按文献[8]进行,将 2.06kb DNA 片段以 Dig-11-dUTP 用随机引物法进行探针标记(Boehringer Mannheim 非同位素标记试剂盒)。

### 1.4 原位杂交

**1.4.1 染色体玻片标本预处理:**为减少非特异吸附,在每张玻片上加 100 $\mu$ l RNase(100 $\mu$ g/ml),盖上盖片,置于潮湿皿中,37 $^{\circ}$ C, 1h。去除盖片用 2 $\times$  SSC 洗片 5 次。再用乙醇(70%, 80%, 90%, 100%)逐级脱水,空气干燥。

**1.4.2 杂交液的配制:**杂交液中含有 1ng/ $\mu$ l 标记探针, 50% 甲酰胺, 10% 硫酸葡聚糖, 0.5mg/ml sss DNA 2 $\times$  SSC。

**1.4.3 探针、染色体变性与杂交:**染色体玻片经 72 $^{\circ}$ C 变性 5min, 迅速置于碎冰上使其充分变性;在每张玻片上加入已变性的标记探针,盖上盖片,于潮湿皿中,42 $^{\circ}$ C 杂交 16h。

**1.4.4 脱水:**杂交反应后的玻片用 50% 甲酰胺, 2 $\times$  SSC 洗涤 5 次,每次 5min。

### 1.5 用免疫金胶抗体的方法进行基因定位

将 2 $\times$  SSC 洗涤过的杂交玻片在 PBS 中洗 1 次,去除多余的 PBS,但不要使玻片完全干燥。在玻片上加 10 $\mu$ l 胶体金标记的抗 Dig 抗体(参照文献[9]的方法,并按 Boehringer Mannheim 公司提供的试剂盒说明操作)1:30 稀释于 PBS 中,并加入 1mg/ml BSA。盖上盖片,室温反应 1h。PBS 洗片 1 次,以 200ml 去离子水充分洗片 5 次,以去除氯离子。在每张玻片上加新鲜配制的银增强试剂(Boehringer)100 $\mu$ l 置潮湿皿内,室温、避光作用 30min,用去离子水洗片数次以终止反应。玻片自然风干。

### 1.6 染色体 G-显带

用胰酶法 G-显带,主要参照文献[10, 11]的方法,并加以改进。为得到杂交后较好的染色体 G-带,故进一步降低酶浓度且缩短胰酶作用时间。用去离子水洗片以终止反应。10% Geimsa 染液(用 0.06mol/L PB, pH6.8 稀释)染色 10min,用去离子水洗去多余液,自然干燥后镜检。选择分散良好的分裂相、摄影、记录,并作数据的数理统计分析。

## 2 结果和讨论

### 2.1 结果

油镜下观察实验结果,可见在紫色染色体上有黑色银颗粒分布。图 2 示原位杂交后经过 G-显带的中期相。选择染色体平直、分散良好、带型清楚的中期相进行分析。共计数分析 50 个中期分裂相,52% (26/50) 的分裂相第 2 号染色体具银粒分布;45% (26/57) 的银粒位于 2 号染色体上,其余银粒则在染色体上随机分布,(如图 3 所示)。而 2 号染色

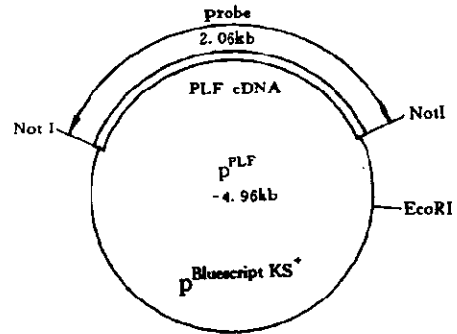


图 1 质粒 p<sup>PLF</sup>构建图

Fig.1 Eucaryotic map of recombinant plasmid p<sup>PLF</sup>  
Hybridization probe is the 2.06kb fragment.

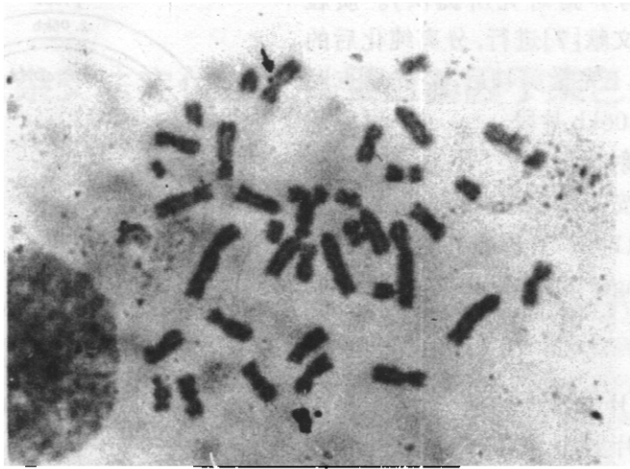


图 2 长白猪染色体中期相与 2.06kb PLF cDNA 为探针进行原位杂交后经 G-显带

Fig. 2 In situ hybridization with probe of 2.06 kb PLF cDNA in a metaphase spread of porcine

The chromosome were G-banded following hybridization

Arrow indicates silver grain located on 2q<sup>12</sup>.

体的相对长度仅占猪染色体组总长度的 7.3%，以染色体的单位长度上银粒数计算，对第 2 号染色体上的银粒数进行数理统计分析，经 t 检验，表明 2 号染色体的银粒数目与其它染色体相比，差异显著 ( $P < 0.001$ )。

2 号染色体上银粒分布的情况，多位于 2 号染色体的长臂上，经进一步分析有 85% 的银粒集中在 q<sup>12</sup> 区域内 (如图 3 示)。由此可见 PLF 基因位于 2q<sup>12</sup>。

对于所用染色体的标准，不同品种猪之间以及与国外猪种之间在某些染色体带型存在一定的差异。由于本实验所用实验动物为长白猪，是纯属欧洲起源的猪种<sup>[12]</sup>，所以猪染色体标准带型参阅 Gustavsson<sup>[13]</sup>，并借鉴陈文元<sup>[14]</sup>标准进行分析。

## 2.2 讨 论

用于猪基因定位的主要方法有：体细胞杂交法、原位杂交法、遗传连锁分析法、染色体重组定位法。体细胞杂交法只能将基因定位在某一染色体上，而利用原位杂交法可将基因定位在某一染色体的特定区段上。这一方法是目前比较理想的一种基因定位方法，正越来越多地被各国学者所采用。在以往的工作中，人们多用同位素标记法进行原位杂交试验，它虽然精确、灵敏度高、重复性好，但也带来环境污染，且实验周期长。故此，Yerle<sup>[8]</sup>将此方法加以改进，首次在猪基因定位中用生物素标记探针取代同位素标记探针，使得这一方法更迅速、精确和特异。我们在此基础上又加以改进，本文采用德国 Boehringer Mannheim 公司的地高辛标记试剂盒并结合使用胶体金标记抗体及银增加试剂，取得了较好的效果。金胶抗体技术的应用提高了免疫反应的灵敏度；银增加试剂的作用是将银颗粒附着在金颗粒表面，起信号放大作用，使用普通光学显微镜即可直接观察到染色体上的银粒。

在实验过程中，杂交液内加入 10% 硫酸葡聚糖是非常必要的。葡聚糖是一种大分子量的惰性聚合物，正是由于它在杂交液中占据一定的溶液体积并将大分子 DNA 排除于

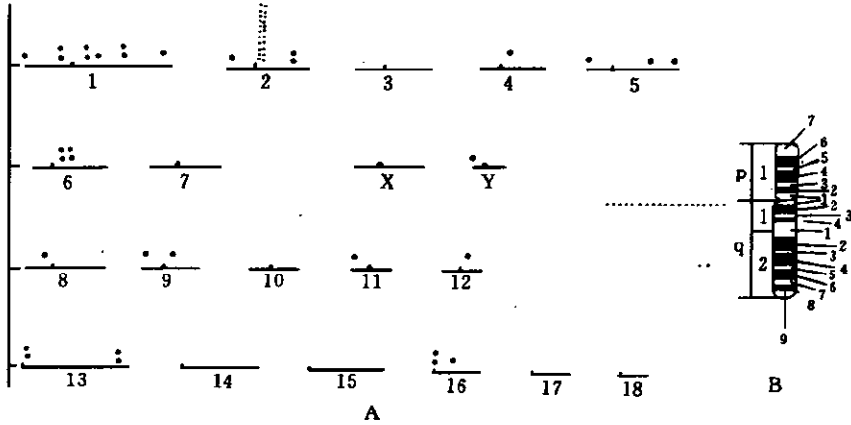


图 3 A. 原位杂交后, 50 个分裂相中银粒分布的直方图  
B. 2 号染色体银粒的分布, 85% 银粒位于 2q<sup>12</sup>

Fig. 3 A. Histogram showing silver grain distribution after *in situ* hybridization in 50 cattle metaphase spreads

B. Silver grain distribution on chromosome 2, eighty-five percent of silver grains at the Long arm of chromosome 2(2q<sup>12</sup>)

外, 从而提高了探针 DNA 的有效浓度<sup>[15]</sup>, 本实验中使用的探针 PLF cDNA 长度仅 2.06kb, 杂交获成功, 这与葡聚糖的使用有很大关系。

猪乳铁蛋白是与新生小猪存活率密切相关的一种蛋白, 过去的研究表明: 该糖蛋白具有抑制细菌生长, 促进淋巴细胞生长, 调节巨噬细胞, 提高机体免疫力的作用<sup>[16,17]</sup>。基于其重要的生理作用, 我们开展了对 PLF 基因的定位工作。实验结果表明: 猪乳铁蛋白基因被定位于猪 2 号染色体的长臂上, 具体位置为 2q<sup>12</sup> 区域。此结果对提高猪抗病能力的研究及对该基因进行调控的研究提供了参考数据。

### 参 考 文 献

- Andresen E. Genetics, 1964, 49: 379~386
- O'Brien S J. Genetic Maps. Locus Maps of Complex Genomes. Sixth Edition. 1993, 4: 240~246
- Mc combs J L, Teng C T, Pentecost B T. Cytogenet Cell Genet, 1988, 47: 16~17
- Naylor S L, Marshall A, Solomon A. Cytogenet. Cell Genet, 1987, 46: 669
- Powell M J, ogden J E. Nucleic Acids Res., 1990, 18: 4013
- Teng C T, Pentecost B T. Somat. Cell Molec Genet, 1987, 13: 689~693
- Sambrook J. Fritch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory. Manual Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor 1989
- Yerle M. Cytogenet Cell Genet, 1992, 59: 48~51
- Herrington C S, Graham A K, McGee J O *et al.* J Clin Pathol, 1991, 44(1): 33~38
- Lichter P, Boyle A L, Cremer T *et al.* Genet Anal Techn Appl, 1991, 8: 24~35
- Cannizzare L A, Emanuel B S. Cytogenet Cell Genet. 1984, 38: 308
- 柳万生. 畜牧兽医杂志, 1990, 3: 32~35
- Gustavsson I. Hereditas, 1988, 109: 151~157

- 14 陈文元, 王子淑, 王喜忠. 遗传学报, 1991, 18(2): 120~126
- 15 Wahl G M. Proc Natl Acad Sci, 1979, 69: 3683~3687
- 16 Redman M Cbu DVM, Sibb-Rong Wang. Am J Vet Res, 1993, 54(77): 1154~1159
- 17 Lonnerdal B, Lyer S. Annu Rev Nutr, 1995, 15: 93~110

## Localization of PLF Gene at Porcine Chromosome 2q<sup>12</sup> Band by *In Situ* Hybridization

He Xin Chen Qingxuan

(*Institute of Developmental Biology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080*)

**Abstract** In order to located the PLF gene to porcine chromosome, we use PLF cDNA as the probe which was nonradioactive labeled for *in situ* hybridization. The method is based on hybridizing digoxigen probe to metaphase chromosome. Digoxigen gold signals are amplified by silver precipitation. The experiment has a higher sensitive. The number of silver grains on every chromosome was calculated and statistical analyzed. The fifty-two percent of hybridized metaphases exhibited silver grains at the terminal region of long arm of chromosome 2. The result showed that the PLF gene is located at 2q<sup>12</sup>.

**Key words** Porcine lactoferrin(PLF), gene localization, *in situ* hybridization