

巨大 DNA 分子的制备与操作进展

毛先枝 王子芳

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

(一) 绪言

当今分子生物学中有关基因组顺序组织的研究主要是通过遗传图谱和物理图谱所提供的信息。在某些较简单的物种中, 遗传图的分辨率可达单个碱基对的水平, 但在其它物种如大部分寄生性原生动植物中, 根本就未能研究其遗传图谱, 因为尚无合适的研究方法。哺乳动物遗传图谱的分辨率在 5cM 至 25cM 之间 (小鼠基因组为 1600cM, 人为 3300cM)。虽然靠传统的方法可以稍稍提高分辨率, 但需花极大的气力。当今的分子生物学技术仅能分析几百 Kb 的距离, 而小鼠中 2000Kb 相当于 1cM, 人中 1000Kb 相当于 1cM。因此, 传统的遗传图谱的分辨率与分子生物学方法的分析范围之间有一条鸿沟。

最近几年发展起来的巨大 DNA 分离方法弥补了这条鸿沟。这些方法可以使得人们在 50Kb—10Mb 的范围内观察到 DNA 的重排现象、绘制物理图谱等。这些方法发展迅速^[1,2]。

(二) Mb DNA 分子的纯化与操作

众所周知, 在水溶液中很难对 Mb 大小的 DNA 分子进行工作, 因为这样大的 DNA 分子对剪切断裂作用非常敏感。最近发展起来的在支持介质 (如琼脂糖) 上纯化和后续操作 DNA 分子的方法克服了这个困难。按下述思路有可能从任一来源的材料中制备出未断裂的染色体 DNA。首先将细胞悬浮在低熔点琼脂糖中, 然后使样品固化。再按需要使酶、变性剂或其它试剂扩散进入琼脂糖介质中, 以破裂细胞的壁或膜, 除去蛋白质和 RNA, 最后的样

品就是与琼脂糖凝胶的洞中细胞 DNA 含量成定量关系的 DNA 分子。需要时, 基因组 DNA 可以被分成较小的片段, 方法是用特殊的限制性内切酶进行原位处理^[3]。

这些方案之所以成功, 是因为典型的琼脂糖凝胶约 1000 Å 的孔径足够蛋白质和变性剂等有效地扩散, 但这还太小而不允许巨大 DNA 分子有效扩散。在这类方法中, 琼脂糖成了防止巨大 DNA 分子断裂的有效保护剂。

(三) PFGE 法分离巨大 DNA 分子

大于 50Kb 的 DNA 分子要想进入典型的琼脂糖凝胶, 必须改变其本身的形状。在典型的琼脂糖凝胶电泳中使用 1—10V/cm 的电场时很易产生这种情况。改变了形状的 DNA 分子虽然可在凝胶中泳动, 但泳动率并不与其分子量成比例。因此, 起初采用通常的电泳法分离巨大 DNA 分子的尝试并未成功。这些困难可被脉冲电场凝胶电泳法所克服。

在 Schwartz 等人^[4-6]首先描述的脉冲电场凝胶电泳 (pulsed field gel electrophoresis, PFGE) 中, 由于施加的电场之方向不断变换, DNA 分子周期性受力而改变其泳动方向。如下是几种典型的设计 (图 1)。

尽管应用该法的细节不尽相同, 但都有如下的共同特点:

1. 在一个方向上泳动所花费的时间 (称为脉冲时间) 决定了分离范围的上限。对小于 10Kb 的 DNA 分子, 其脉冲时间为 0.1 秒; 对于 10Mb 的 DNA 分子, 脉冲时间长达 1 小时。在此范围内, 脉冲时间与分离上限之大小基本上成线性关系。如在 15°C 条件下, 以 1%

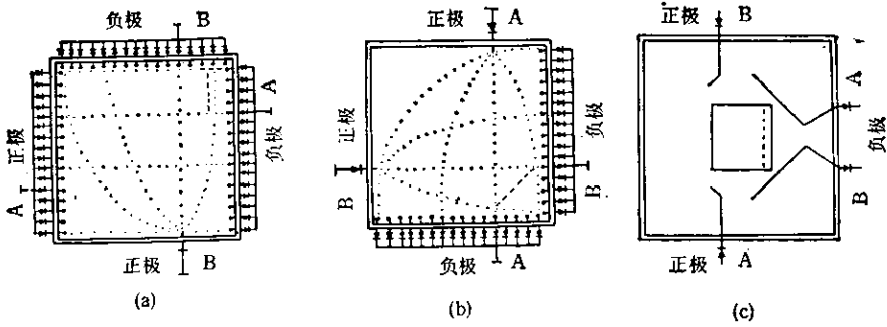


图1 Schwartz 等设计的几种典型的脉冲电场凝胶电泳系统

凝胶浸入电极间的缓冲液中,样品上于凝胶板的样品槽孔(实心短线)中。电场交替施加于 A、B 电极以形成脉冲,脉冲时间可调。每根电极线由于有二极管而避免了交替转换时发生漏电或导通现象。(a) 产生的电场(虚线)在 A-A 方向上是均匀的,而在 B-B 方向上则不均匀。在这种电场中各样品所受的作用并不完全相同,因此,每个样品的泳迹并不是直线,这样进行比较就较困难。(b、c) 这二种系统比 (a) 更适应对巨大 DNA 分子进行分离。产生的交替电场的净作用如图中虚线所示,其中, DNA 分子的泳迹较 (a) 中的直,对各个样品的作用也较一致,便于比较分析。上述三种系统对样品均有浓缩效应

琼脂糖为介质,施加 2.5—10V/cm 的电场时,典型的分离时间约需 20—80 小时。

2. 变换电场的施加角度可以不同,且当角度大于 90° 时分辨效果更好。与其它技术显著不同的是,在 PFGE 中,较大分子的分离效果比较小分子的好。DNA 分子大小与泳动率之间的线性关系可以用脉动着的 DNA 分子的重新取向是以之字形路线的机制进行的而加以解释。

3. 巨大 DNA 分子的大小可以通过比较标准物在 PFGE 中的泳动率来度量。最有效和应用得最多的是顺序式退火所形成的噬菌体(如 λ 噬菌体) DNA 的线性连环体;也可以使用酵母染色体 DNA。

4. PFGE 分离后的结果可用 EB 染色或经 Southern 转移后进行杂交而显现。

(四) 染色体组型的电泳分析

许多酵母和原生动物的染色体是由 PFGE 技术分离的单个 DNA 分子所组成。因此,电泳就能直接得到有关的染色体组型的信息,即可以得到染色体数量和大小的信息;这也为后续的分析提供了分离了的染色体。用克隆的 DNA 片段作探针与 PFGE 转移物杂交,可以确定其染色体定位^[5]。显然,这种方法的更进一步改良将可以进行亚染色体定位分析。因此,利用 PFGE 法可以直接进行基因图谱的研

究。目前,Carle 和 Olson 等已经在啤酒酵母等酵母中部分或全部成功地运用了上述的研究路线^[7-10]。

(五) 细菌的限制性内切酶谱

细菌的基因组常由一个环状染色体和一些抗性质粒组成。通常情况下,大的环状染色体是不能进入琼脂糖凝胶的。然而,这些 DNA 分子可用原位法处理,即选择那些对特定 DNA 分子具有较少作用位点的内切酶在琼脂糖中处理 DNA 而使之断裂成较大的线状片段。这些特殊的内切酶及其识别位点见表 1。内切酶的选择可以采用试测法,或在所感兴趣的有机体的染色体的核苷酸顺序;或和碱基组成有足够的可资利用的信息的基础上而采用更系统的方法。单一的酶完全处理后所产生的片段的图谱即提供了整个细菌基因组的指纹图谱。这些指纹图谱可以用来研究不同株系间或相近的种间的关系。此为一。

其二,累加 DNA 片段的大小可以估测出整个基因组的大小;确定片段在基因组中的相对位置可以得到大型的限制性内切酶图谱。这条原则可以作为基因图谱研究的指导原则,也是检测任何基因组重排的有力工具。比如,只需用克隆的探针与转移的斑点进行杂交即可以将基因分段;仅需观察特定片段大小的变化即可以检测出 DNA 的插入与缺失等。现已发

展了多种办法来确定巨大 DNA 片段的顺序。最有效的办法是用单个限制性内切酶进行部分酶解^[11-13]，这类似于一般小片段的物理图谱构建时所采取的办法。

表 1 十四种具有较少切点的限制性内切酶*

| 内切酶 | 识别位点 | 内切酶 | 识别位点 |
|---------|----------|--------|---------------|
| Bss HII | GCGCGC | Nru I | TCGCGA |
| Cla I | ATCGAT | Pvu I | CGATCG |
| Eag I | CGGCCG | Sac II | CCGCGG |
| Mlu I | ACGCGT | Sal I | GTCGAC |
| Nae I | GCCGGC | Sfi I | GGCCNNNNNGGCC |
| Nar I | GGCGCC | Sma I | CCCGGG |
| Not I | GCGGCCGC | Xho I | CTCGAC |

* 消化作用条件见文献 [3]。

Smith 等^[13]运用上述方法成功地构建了大肠杆菌 K12 基因组的完整的 Not I 限制性内切酶图谱。此图谱包括 22 个 Not I 片段，整个大小为 4.7Mb。可以预料，运用相同的方法也可以得到各种不同细菌、酵母和原生动物的内切酶图谱。

(六) 哺乳动物某些区域的限制性内切酶图谱

上述方法还可被用来对更为复杂的基因组进行分析。识别位点为 8bp 的内切酶如 Not I 和 Sfi I 以及某些 6bp 的内切酶如 Mlu I、Sal I 和 Xho I 作用于哺乳动物 DNA 后仅产生相当少的片段，片段大小从几百 Kb 到约 1Mb。如果对哺乳动物基因组的某些区域而言有足够的克隆了的 DNA 探针可供使用，那么，利用这些探针就可以绘制出大到 Mb 级的部分或完整的限制性内切酶图谱。

最初的人基因组图谱研究集中在那些与人类疾病有关的区域是合适的。这包括一些与常见疾病如 Duchenne 氏肌肉营养不良症有关的基因^[14]等。研究结果显示：使用巨大 DNA 技术有可能很方便地构建整个人体染色体的限制性内切酶图谱。加上已有遗传连锁图谱^[15]和杂交细胞系可供利用，就有可能分离人体染色体中的具有特定功能的部份。因此，这为各种宏

观手段与分子手段之间找到了相对多的共同语言，也必将推动医学等的发展。

一般而言，图谱只是基因组的一个静态图像。巨大 DNA 技术也可以用于动力学研究。按上述方法对细菌进行研究就可以比较不同的有机体，检测所有的 DNA 重排（包括人癌中与癌基因活化有关的重排等）。当然，也可以用巨大 DNA 技术研究发育上受控的基因组的变更，如与免疫球蛋白和 T-细胞受体的表达有关的缺失等等。在上述研究中，PFGE 的明显长处是可以提供较大范围内的染色体图象。也就是说，即使重排现象并不总在同一个位置上发生，任一与重排有关的探针都可以用来检测这种重排。

另一方面，基因图谱也可为基因的功能提供直接线索。如在高等生物中，许多基因成簇存在，有些基因族成簇分布在基因组中。因此，一旦某特定族中的一个成员得以鉴定，就可以用来研究该基因的邻居，以观察是否有其它相关功能，或探讨其进化起源关系等等。巨大 DNA 技术显然会有助于这些研究，因为它可提供整个邻近部位的全面图象。例如，在哺乳动物中，胞嘧啶的甲基化与基因的表达是以一种复杂的方式相联系的。CpG 序列在基因组的大部分区域都很不常见^[16]，它的甲基化常常具有组织特异性。然而，成簇的未甲基化的 CpG 序列却单独存在于许多基因的附近^[17]。用来使哺乳动物 DNA 断裂成大片段的限制性内切酶识别位点几乎都有一个或多个 CpG 序列，大部分都对甲基化作用敏感。因此，由这些酶所产生的片段的 PFGE 图谱就直接揭示了基因定位方面的信息。不过，这些图谱是具有组织特异性的。这为全面研究组织特异性甲基化区域提供了有用的工具。虽然 DNA 的甲基化与基因表达的调控不是本文所要论述的，但要指出的是这种方法为基因组顺序组织和发育过程中基因表达的和谐性的研究提供了直接的手段。

(七) PFGE 分析的误差来源

尽管 PFGE 分析技术如此强有力，但也必

须指出有些因素可导致这种分析产生误差。例如不同实验室的方法可能会略有不同,此为一。其二,用较少切点的几种限制性内切酶作用后产生的能与探针共杂交的几个 PFGE 分离的片段的现象在基因的定位研究中会引起混淆。不过,这种现象却为大范围内的物理图谱的构建提供了更多的信息^[5,18]。其三,巨大 DNA 片段的泳动率与分子量大小标准物之间的相互关系在不同的 PFGE 条件下会略有不同^[19]。其四,任一特定大小的片段在整个基因组中可能会出现很多次,而不同的片段则可能共泳动,这是大部分电泳法中所共有的缺陷。因此,遇到这类疑问时,必须采取多种双酶解法进行分析以确定有疑问片段的真伪,这正如传统的物理图谱构建时所采取的对策那样。

最后应强调指出的是,巨大 DNA 分离方法还在迅速发展。人们操作 Mb 而不是 Kb 大小的 DNA 分子的新能力的整个细节目前还只能是猜测,况且, Southern 十字转印杂交技术^[20]的问世,为物理图谱的研究提供了快速有效的方法。这些技术的发展与综合利用,必将在研究技术方面产生全新的局面。显然,从细菌、真菌和原生动到哺乳动物甚至人的各种生物的遗传学和分子生物学的研究都将得益于这些新技术的应用。

参 考 文 献

- [1] Van der Ploeg, L. H. T.: *Biotechnol.*, 5: 8—16, 1987.
- [2] Van Ommen G., J. B. and Verkerk, J. M. H.: In *human Genetic Disease, A Practical Approach* (Davies, K. ed.) pp 113—133, IRL Press, 1986.
- [3] Herrmann, B. G. et al.: *Cell*, 48: 813—825, 1987.
- [4] Schwartz, D. C. et al.: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 47: 189—195, 1983.
- [5] Schwartz, D. C. and Cantor, C. R.: *Cell*, 37: 67—75, 1984.
- [6] Carle, G. F. and Olson, M. V.: *Nucleic Acids Res.*, 12: 5647—5664, 1984.
- [7] Carle, G. F. and Olson, M. V.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3756—3760, 1985.
- [8] Smith, C. L. et al.: *Nucleic Acids*, 15: 4481—4493, 1987.
- [9] Snell, R. G. and Wilkins, R. J.: *Nucleic Acids Res.*, 14: 4401—4406, 1986.
- [10] De Jonge, P. et al.: *Yeast*, 2: 193—204, 1986.
- [11] Smith, C. L. and Cantor, C. R.: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51: 115—122, 1986.
- [12] Lawrence, S. K. et al.: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51: 123—130, 1986.
- [13] Smith, C. L. et al.: *Science*, 236: 1448—1453, 1987.
- [14] Kenwrick, S. et al.: *Cell*, 48: 351—357, 1987.
- [15] Donis-Keller, H. et al.: *Cell*, 48: 319—337, 1987.
- [16] Razin, A. and Riggs, A. D.: *Science*, 210: 604—610, 1980.
- [17] Bird, A. et al.: *Cell*, 40: 91—98, 1985.
- [18] Van Ommen, G. J. B. et al.: *Cell*, 47: 499—504, 1986.
- [19] Bernards, A. et al.: *Gene*, 42: 313—322, 1986.
- [20] 齐义鹏, 黄永秀: 生物化学与生物物理进展, 第 6 期, 第 74—76 页, 1987。