

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2010.00824

染色体特异DNA文库的构建与鉴定

孙雷¹, 刘新雄¹, 陈哲¹, 张明², 陆阳清², 卓永光¹, 符可鹏¹, 樊祖茜¹

1. 钦州市妇幼保健院, 钦州 535000;
2. 广西大学动物繁殖研究所, 南宁 530005

摘要: 为构建人类 21 号染色体特异 DNA 文库, 以应用于人类遗传疾病的鉴定和研究, 文章采用循环温度梯度法溶解释放微分离的人外周血细胞 21 号染色体 DNA, 将其进行简并寡核苷酸引物 PCR(Degenerate oligo nucleotide primer-PCR, DOP-PCR)扩增后, 利用 100~500 bp 和 500~2 000 bp 分段回收纯化的两种不同片段大小的 DOP-PCR 产物构建染色体特异 DNA 文库, 并分别采用荧光原位杂交(Florescence *in situ* hybridization, FISH)和斑点杂交对 DOP-PCR 产物的来源和随机取样的文库克隆进行检测以评估所构建 DNA 文库的特异性。结果表明: 循环温度梯度法能有效溶解释放微分离的 21 号染色体 DNA; 通过对 DOP-PCR 产物的分段回收纯化和克隆, 增加了大片段 DNA 的连接效率; 利用 FISH 技术和斑点杂交双重鉴定实验证明了文库的特异性, 从而构建了 21 号染色体特异的 DNA 文库, 并建立了构建染色体特异 DNA 文库及检测其特异性的方法, 为 21 号染色相关遗传疾病的鉴定和研究奠定了基础。

关键词: 21 号染色体; 染色体微分离与微切割; DOP-PCR; 染色体特异DNA文库

Construction and identification of the chromosome specific DNA library

SUN Lei¹, LIU Xin-Xiong¹, CHEN Zhe¹, ZHANG Ming², LU Yang-Qing²,
ZHUO Yong-Guang¹, FU Ke-Peng¹, FAN Zu-Qian¹

1. Qinzhou Women and Children Healthcare Hospital, Qinzhou 535000, China;
2. Animal Reproduction Institute, Guangxi University, Nanning 530005, China

Abstract: The objective of the present study was to construct a human chromosome 21 specific DNA library for further use in research of genetic disease. Human chromosome 21 microdissected from the peripheral blood cells were subjected to repeatedly incubation in gradient temperature bath to release DNA. The library of chromosome 21 was constructed using the DNA fragment of 100–500 bp and 500–2 000 bp recovered from the products of DOP-PCR. Florescence *in situ* hybridization (FISH) and dot blotting analyses were carried out to assess the chromosome 21 specificity of the DNA library. The results indicated that DNA of chromosome 21 was released easily after repeatedly incubation in gradient temperature bath. Recovery of DNA fragments from DOP-PCR in different size ranges improved the efficiency of cloning of large fragments. Both FISH and dot blotting analyses revealed that the DNA library constructed in this study was chromosome 21-specific. This DNA library facilitates identification and investigation of the chromosome 21 related abnormality.

Keywords: chromosome 21; chromosome microdissection; DOP-PCR; chromosome-specific DNA library

收稿日期: 2009-11-15; 修回日期: 2009-12-06

基金项目: 2009 年钦州市科学研究与技术开发计划项目(合同编号: 20092804)资助

作者简介: 孙雷(1982-), 男, 硕士研究生, 专业方向: 分子细胞生物学。E-mail: sunshijie12345@163.com

1981年Scaleghe等^[1]首次应用染色体微切割方法分离并克隆了果蝇多线X染色体的特定区域,但由于该技术带有克隆效率不高、切割精度不高等缺陷,因而不能适应更为精细的分析,从而阻碍了该技术在其他物种上的推广和应用。随着PCR技术的发展,1989年Ludecke等^[2]将染色体显带技术、PCR技术和染色体微切割与微克隆技术结合起来,由于技术路线的改进与新技术的应用使染色体显微切割技术方面获得了重大突破。此后,染色体微切割和微克隆方法广泛应用于构建植物^[3]、动物^[4]和人^[5]染色体特定区域的DNA文库及探针池。目前,该技术已广泛应用于与人类遗传疾病和动物经济性状有关的染色体特异DNA的基因分离与定位、分子细胞学分析、染色体进化研究、特异表达序列(Expressing sequence)筛选、染色体原位杂交等方面^[6-8],显示出广泛的应用前景和潜力,因此,该技术倍受细胞生物学家和遗传学家的青睐。

本研究对显微切割和微克隆技术加以利用并创新,选择了在遗传疾病研究上具有重要意义的人类21号染色体为研究对象,采用循环温度梯度法代替传统的酶解法溶解释放染色体DNA,利用FISH技术和斑点杂交技术双重试验鉴定排除文库构建过程中内源DNA与外源DNA的污染,并根据产物大小进行分段纯化回收,为染色体特异DNA文库的构建进行方法探索。

1 材料和方法

1.1 实验材料

正常人体外周血液,由广西钦州市妇幼保健院提供。

1.2 方法

1.2.1 染色体的制备、识别与显微分离

按照实验室常规方法进行细胞培养、染色体制备、胰酶处理、Giemsa染色进行G显带;在倒置显微镜下从分散良好的分裂相中找出21号染色体,使用尖端直径为0.1 μm的玻璃针,利用显微操作仪挑取21号染色体,将吸附有染色体的针尖折断于0.2 mL的PCR管中,-20℃保存备用。

1.2.2 染色体DNA的温度梯度溶解

向含21号染色体的0.2 mL PCR管中加入25 μL

ddH₂O,先置于50℃30 min,然后置于37℃1 min,50℃1 min,循环20次后,37℃放置30 min。

1.2.3 染色体的DOP-PCR扩增

DOP-PCR反应体系包括:10×PCR buffer 5 μL, dNTPs (10 mmol/L) 1 μL, DOP引物(100 μmol/L) 1 μL, Taq酶(TaKaRa)2 U, ddH₂O补足50 μL。PCR反应条件为:94℃预变性5 min, 94℃变性1 min, 35℃复性3 min, 72℃延伸3 min, 8个循环,之后将PCR条件改为94℃变性1 min, 55℃复性1 min, 72℃延伸2 min, 扩增30个循环,最后72℃延伸10 min, 1%琼脂糖凝胶电泳观察PCR扩增结果。

1.2.4 PCR产物的FISH杂交鉴定

探针的制备:采用PCR标记方法,反应体系除部分dTTP由生物素-dUTP代替外,其他成分与DOP-PCR扩增体系相同,反应条件与DOP-PCR扩增的后30个循环相同,探针标记好后于-20℃保存备用。

原位杂交:杂交总体系为20 μL,取杂交液16 μL与4 μL已标记好的探针混匀,将探针杂交液于75℃变性5 min,冰浴10 min;染色体玻片于50℃烤片1 h,在72℃70%甲酰胺/2×SSC中变性5 min,以70%、90%、100%系列冰乙醇脱水各5 min,晾干,将探针滴于变性后的玻片上,封片,置杂交盒37℃杂交过夜。

洗脱及荧光检测:将杂交后的片子去掉封胶,依次放入40℃~45℃的50%甲酰胺/2×SSC中漂洗2次,每次5 min;1×SSC中漂洗3次,每次5 min;取出玻片后晾至玻片未完全干燥,滴加Streptavidin-FITC,于37℃孵育30 min以上,2×SSC中漂洗3次,每次5 min, DAPI复染后封片。

显微镜观察及图象处理:以Nikon荧光显微镜观察,并采集照片。

1.2.5 染色体PCR产物的克隆及PCR鉴定

将21号染色体的DOP-PCR扩增产物电泳后,分100~500 bp和500~2 000 bp两区段进行PCR产物的纯化回收。分别取2 μL回收产物与pMD18-T载体(TaKaRa)在16℃连接过夜后,将连接产物转化*Escherichia coli* DH5a感受态细胞,从转化产物中取100 μL涂于含Amp^r的LB平板上,37℃培养过夜。

蓝白斑筛选后摇菌培养, 采用碱裂解法制备质粒 DNA, 并用 pMD18-T 载体通用引物对质粒进行 PCR 鉴定, 1% 琼脂糖凝胶电泳观察 PCR 扩增结果。

1.2.6 应用斑点杂交验证 21 号染色体文库内克隆子的来源

探针的制备: 按照实验室常规方法提取基因组, 然后根据罗氏地高辛原位杂交标记试剂盒说明书对基因组进行标记制备成杂交探针。

点膜质粒的处理: 将点有质粒 DNA 的硝酸纤维素膜分别放置在被下列溶液饱和的滤纸上: 变性液中浸润 5 min; 中和液中浸润 5 min; $2\times\text{SSC}$ 中浸润 5 min; 将膜在空气中晾干 30 min, 夹在两张滤纸中, 于 80 °C 烘烤 2 h。

杂交与检测: 按照罗氏地高辛原位杂交标记试剂盒说明书进行。

2 结果与分析

2.1 染色体标本的制备与目标染色体的显微分离

按照人外周血淋巴细胞染色体制备方法, 获得了背景干净且分散较好的细胞中期染色体标本。未显带的 21 号染色体与 22 号染色体比较难于区分, G 显带后, 人 21 号染色体为最小的近端着丝粒染色体, 着丝粒处着色较深, 因此, G 显带后, 21 号染色体能够很容易被识别和显微分离。

2.2 分离染色体的体外 DOP-PCR 扩增

经过 PCR 扩增, 21 号染色体 DNA 获得了较强的扩增信号, 而阴性对照无任何扩增信号(图 1), PCR 扩增产物长度主要在 100~2 000 bp 之间。

2.3 FISH 杂交鉴定扩增产物的来源

为鉴定 DOP-PCR 产物是否来源于人 21 号染色体 DNA, 将 DOP-PCR 产物用生物素-dUTP 代替部分 dTTP 标记制备成杂交探针后与玻片细胞染色体进行杂交, 结果 21 号染色体获得了明显的黄绿色杂交信号(图 2), 这说明显微分离的染色体为 21 号染色体, 并且 DOP-PCR 扩增产物来源于人 21 号染色体 DNA。

2.4 PCR 产物 DNA 文库的构建和初步分析

为了构建大片段 DNA 文库, 将扩增产物电泳后

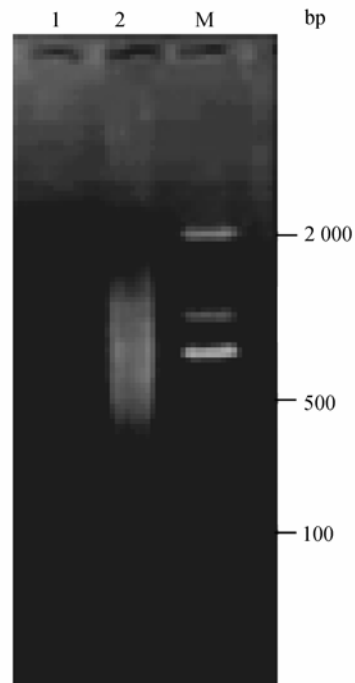


图 1 21 号染色体 DOP-PCR 扩增

1: 阴性对照; 2: 21 号染色体扩增图谱; M: DL2000 Marker。

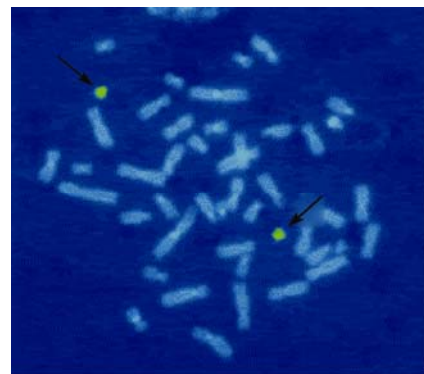


图 2 探针池的 FISH 鉴定

箭头为 21 号染色体具有明显的黄绿色杂交信号。

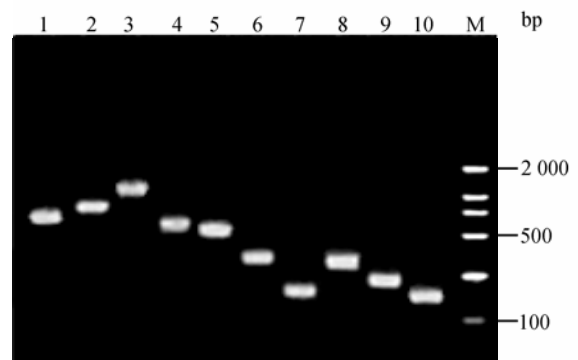


图 3 重组子 DNA 片段的 PCR 鉴定

1~5: 500~2 000 bp 回收产物的插入片段; 6~10: 100~500 bp 回收产物的插入片段; M: DL2000 Marker。

按照 DNA 片段大小分别回收、连接和转化, 转化菌培养 16 h 后, 每一平板平均长出约 600 个重组克隆。采用 PCR 方法随机分析部分重组克隆, 发现小片段回收产物克隆的插入片段大小介于 100~500 bp 之间, 大片回收产物克隆的插入片段大小介于 500~2 000 bp 之间, 所得 DNA 文库克隆大小与回收片段大小一致。图 3 为部分重组克隆的 PCR 产物电泳结果。

2.5 斑点杂交验证人 21 号染色体文库内克隆子的来源

通过 FISH 技术排除了显微分离过程可能引起的细胞内其他染色体 DNA 的污染, 即排除了内源性的污染情况, 为进一步检测所构建文库是否有外源 DNA 污染, 用地高辛-dUTP 代替 dTTP 标记人的基因组 DNA 后, 与文库部分克隆子质粒进行斑点杂交, 从图 4 部分重组克隆的质粒杂交结果来看(其中 1A 为人基因组的阳性对照, 2A 为阴性对照), 本实验中所鉴定的质粒都有明显的杂交信号, 说明重组克隆的插入 DNA 片段的来源确来源于人 21 号染色体 DNA。

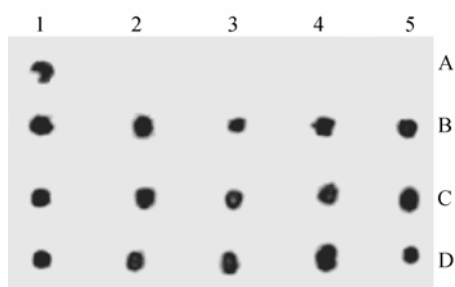


图 4 重组克隆的斑点杂交

3 讨论

染色体涂染探针制备成功的关键是如何控制与排除 DOP-PCR 扩增过程中的污染问题, 因为 DOP-PCR 对任何 DNA 都能非特异扩增, 任何少量外源 DNA 的掺入都可能掩盖目的 DNA 的扩增, 所以在进行 DOP-PCR 时, 要注意杜绝内源性和外源性 DNA 的污染。目前, 微分离染色体 DNA 的溶解和释放, 实验室广泛采用的是向含目标染色体的 0.2 mL PCR 管中加入 0.1 g/L 的蛋白酶 K, 55 °C 酶解 2 h, 然后 80 °C 20 min 灭活蛋白酶 K, 以溶解释放微分离的染色体 DNA^[9], 该方法虽然能达到溶解释放染色体 DNA 的

目的, 但是多个试剂的加入也增加了污染源; 同时, 蛋白酶 K 也更容易将外源细胞消化并释放其 DNA, 造成外源细胞 DNA 的污染。而本实验采用的循环温度梯度溶解法能很好释放目的染色体 DNA, 并且能有效避免酶解过程中的多重试剂污染, 也避免了污染细胞的酶解和 DNA 的释放。

利用微克隆方法建立的染色体或染色体区带特异性文库能否用于今后的遗传学分析, 要从扩增片段来源、插入片段大小等方面对染色体文库进行鉴定。一般采用微卫星检测^[10]、Southern 杂交^[11]、斑点杂交^[12]、原位杂交^[13]等方法来鉴定扩增产物或文库片段的来源。微卫星检测^[14]是对已定位在染色体上的微卫星标记进行扩增, 对扩增产物进行验证, 以鉴定染色体或染色体区带特异性的 DNA 文库。PCR 扩增所用的模板 DNA 可以是染色体 DNA 文库中的插入片段, 也可以是微分离的染色体 DNA。用于检测的微卫星数量越多, 分布越广, 越能检测扩增的效率与扩增的区域片段, 但却不能排除显微分离过程中细胞内其他染色体 DNA 的污染与外源染色体 DNA 的污染。通过 Southern 杂交鉴定^[15]扩增片段的来源目前应用较普遍, 但该方法只能确定扩增产物是否来自目标染色体所在的物种基因组, 却不能确定是否真实地来自目标染色体或染色体区段, 即同样不能排除显微分离过程中细胞内其他染色体 DNA 的污染与外源染色体 DNA 的污染。斑点杂交^[16]主要是通过标记该物种基因组与重组克隆进行杂交, 鉴定重组子是否来源于该物种的基因组, 因此, 可以比较准确的反应克隆片段的来源, 排除外源 DNA 的污染, 但却不能排除显微分离过程中细胞内其他染色体 DNA 的污染。原位杂交^[17]主要用于鉴定微分离与微克隆所获得的 DNA 片段是否来源于所切割的染色体区域, 所获得的 DNA 文库是否为该染色体区域特有的, 以及确定哪些克隆是这个区域与其他染色体共有的, 通过该技术可以非常容易地排除显微分离过程中细胞内其他染色体 DNA 的污染, 但是不能检测外源 DNA 的污染。

本研究采用 FISH 技术, 标记了 DOP-PCR 扩增产物, 与玻片上的中期细胞染色体杂交后, 直接从玻片细胞和染色体上检测到 21 号染色体的杂交信号, 证明扩增片段的来源确来源于人 21 号染色体 DNA,

而不是来源于其他染色体,从而排除了显微分离过程中人类其他染色体 DNA 的内源性污染;同时,为了排除外源 DNA 污染,从构建的文库中随机挑取部分质粒与标记后的人基因组 DNA 进行斑点杂交,杂交结果证明文库片段来源于人基因组 DNA。通过双重实验鉴定排除了文库构建过程中内源 DNA 与外源 DNA 的污染,确保了构建文库的特异性。

在以往染色体微分离或微切割文库构建中,由于 DOP-PCR 产物中小片段比大片段多许多,而且小片段的连接效率明显高于大片段 DNA,所以在与载体连接时,小片段 DNA 的竞争优势非常明显,克隆所得的 DNA 片段的长度一般都不超过 600 bp,导致大片段的克隆效率极低^[18]。为增加大片段的克隆效率,本研究在进行胶回收时,将不同长度的 DNA 分别予以回收,并分别进行连接和转化,对重组克隆的鉴定结果表明,大大提高了大片段 DNA 的连接效率和转化效率。

本研究通过染色体显微分离和 DOP-PCR 扩增方法,建立了人类 21 号染色体 DNA 文库,并通过 FISH 和斑点杂交验证了文库的专一性和可靠性,研究结果为 21 号染色体相关遗传疾病的鉴定和研究奠定了基础。

参考文献(References):

- [1] Scalenghe F, Turco E, Edsrom JE, Pirrotta V, Melli M. Microdissection and cloning of DNA from a specific region of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. *Chromosoma*, 1981, 82(2): 205–216. [\[DOI\]](#)
- [2] Ludecke HJ, Senger G, Claussen U, Horsthemke B. Construction and characterization of banded specific DNA libraries. *Hum Genet*, 1990, 84(6): 512–516.
- [3] Chen Q, Armstrong K. Characterization of a library from a single microdissected oat (*Avena sativa* L.) chromosome. *Genome*, 1995, 38(4): 706–714. [\[DOI\]](#)
- [4] Rohme D, Fox H, Herrmann B, Frischau AM, Edstrom JE, Mains P, Silver LM, Lehrach H. Molecular clones of the mouse t-complex derived from microdissected metaphase chromosomes. *Cell*, 1984, 36(3): 783–788. [\[DOI\]](#)
- [5] Bates GP, Wainwright BJ, Williamson R, Brown SD. Microdissection and microcloning from the short arm of human chromosome 2. *Genet Mol Biol*, 1986, 6(11): 3826–3830.
- [6] Fominaya A, Linares C, Loarce Y, Ferrer E. Microdissection and microcloning of plant chromosomes. *Cytogenet Genome Res*, 2005, 109(1–3): 8–14. [\[DOI\]](#)
- [7] Backx L, Esch HV, Melotte C, Kosyakova N, Starke H, Frijns JP, Liehr T, Vermeesch JR. Array painting using microdissected chromosomes to map chromosomal breakpoints. *Cytogenet Genome Res*, 2007, 116(3): 158–166. [\[DOI\]](#)
- [8] Henning F, Trifonov V, Almeida-Toledo LF. Use of chromosome microdissection in fish molecular cytogenetics. *Genet Mol Biol*, 2008, 31(1): 179–283.
- [9] 戴福云, 余其兴, 郭一清, 海燕, 周荣家, 刘利. 黄鳍单条染色体的显微分离及特异性检测. *动物学报*, 2002, 48(1): 114–120.
- [10] 闫守庆, 帅丽芳, 孙金海. 猪 13/17 罗伯逊易位染色体的显微分离及 DOP-PCR 扩增. *中国兽医学报*, 2006, 26(1): 98–100.
- [11] 黄代青, 吕柳新, 王平. 银杏第 1 染色体 DNA 文库的构建. *福建农林大学学报*, 2002, 31(4): 490–494.
- [12] 吴菁华, 吕柳新. 水仙单染色体特异文库的构建. *西北植物学报*, 2006, 26(2): 305–308.
- [13] 谭跃球, 李麓芸, 朱亚辉, 卢光琇. 应用染色体涂染技术分析两例染色体结构异常. *遗传*, 2000, 22(1): 1–3.
- [14] Hu ZM, Cui LH, Li LC, Wang LL, Chen ZH. Isolation of single chromosome and chromosomal fragments of *Lilium regale* Wilson. *Chin J Genet*, 1998, 25(2): 131–135.
- [15] Buiting K, Neumann M, Lüdecke HJ, Senger G, Claussen U, Antich J, Passarge E, Horsthemke B. Microdissection of the Prader-Willi syndrome chromosome region and identification of potential gene sequences. *Genomics*, 1990, 6(3): 521–527. [\[DOI\]](#)
- [16] Kao FT, Yu JW. Chromosome microdissection and cloning in human genome and genetic disease analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(5): 1844–1848. [\[DOI\]](#)
- [17] Rappold G, Cremer T, Hager H, Davies K, Muller C, Yang T. Sex chromosome positions in human interphase nuclei as studied by in situ hybridization with chromosome specific DNA probes. *Hum Genet*, 1984, 67(3): 317–325. [\[DOI\]](#)
- [18] Yu JW, Qi JX, Kao FT. Region-specific microdissection library and single-copy microclones for human chromosome 2p11–p13. *Somat Cell Mol Genet*, 1993, 20(2): 133–136.