

多聚酶链式反应应用于带人 IX 因子 cDNA 的转基因小鼠的初筛*

胡以平 邱信芳 薛京伦

(复旦大学遗传学研究所, 上海 200433)

关键词 多聚酶链式反应、人凝血 IX 因子 cDNA、转基因小鼠

在转基因小鼠的制备中, 对于所导入外源 DNA 的检测一般采用 DNA-DNA 分子杂交法. 由于它具有敏感性和可靠性高等优点, 故它在转基因小鼠的研究中是不可少的. 然而, 这种方法在实际应用中也有一些缺点, 如操作复杂、工作量大、实验周期长、DNA 样品量大以及放射性同位素来源的时间限制等, 这些都给转基因小鼠的制备带来了一定的困难. 我们在人凝血 IX 因子 (Clotting factor IX) 转基因小鼠的制备中, 将多聚酶链式反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 技术应用于转基因小鼠的初筛, 并与 Southern 杂交结果进行了比较. 结果表明这种方法是可行的, 其最大的优点是提高了效率, 缩短了实验周期.

1 材料与 方法

1.1 材料

(1) 带人 IX 因子 cDNA 的转基因小鼠: 由本实验室制备.

(2) 限制性内切酶及其它试剂: 各种限制性内切酶、RNA 酶和蛋白酶 K 购自美国 New England BioLabs 公司; α - 32 P-dATP 为英国 Amersham 公司产品; FD 耐热 DNA 聚合酶为复旦大学科技开发公司产品.

(3) 寡聚核苷酸引物: 由本实验室自行设计合成, 其顺序为

引物 1: 5'-CTTGA TCATG AAAAC GCCAA-3'

引物 2: 5'-AACAT ACTGC TTCCA AAATT-3'

1.2 方法

(1) 小鼠基因组 DNA 的抽提: 按胡以平等所描述的方法进行^[1]. 但最好在乙醇沉淀 DNA 之前加一步对 TE 透析.

(2) PCR: 反应体积一般为 50 μ l. 首先在 0.5 ml Eppendorf 管内加入 ddH₂O 2 μ l, 反应缓冲液 (5X) 10 μ l, dNTP (5X, dATP, dTTP, dGTP 和 dCTP 的浓度各为 1 mmol/L) 10 μ l, 引物 1 (10 μ mol/L) 1 μ l, 引物 2 (10 μ mol/L) 1 μ l, 基因组 DNA (100 ng/ μ l) 1 μ l 和石蜡油 40 μ l. 然后将其置于 PCR 反应仪 (英国 Hybaid 公司 HB-TR-I 型) 上 94°C 7 min, 使其基因组 DNA 变性. 取下

1993-03-19 收稿, 1993-09-25 收修改稿.

* 国家高技术发展计划及高等学校博士学科点专项科研基金资助项目.

样品于室温中加 FD 耐热 DNA 聚合酶 $1\mu\text{l}$ ($2\text{U}/\mu\text{l}$), 混匀, 并置离心机内稍加转动, 使水相集中于油相之下. 再将样品置于 PCR 反应仪中, 按如下过程进行反应: 70°C , 70s , 以完成第一个周期. 随后, 93°C , $33\text{s} \rightarrow 55^\circ\text{C}$, $33\text{s} \rightarrow 70^\circ\text{C}$, 65s , 重复此过程 20 次. 再以 93°C , $30\text{s} \rightarrow 55^\circ\text{C}$, $30\text{s} \rightarrow 70^\circ\text{C}$, 95s 的条件重复 15 次. 然后, 70°C , 7min , 反应结束. 取其反应物 $7\mu\text{l}$ 作 2% 琼脂糖电泳. 电压 $5\text{V}/\text{cm}$, 一般在 3h 左右可以观察结果.

(3)Southern 杂交: 参照《Molecular Cloning》一书中有关方法进行^[2]. 其杂交膜的洗脱条析为 $2\times\text{SSC}$, 0.5% SDS 室温下 5min ; $2\times\text{SSC}$, 0.1% SDS 室温下 15min ; $0.1\times\text{SSC}$, 0.5% SDS 37°C 振荡洗涤 60min ; $0.1\times\text{SSC}$, 0.5% SDS 68°C 振荡洗涤 60min ; 然后, 以 $0.1\times\text{SSC}$ 室温下稍加洗涤, 晾干, 压片.

2 结果与讨论

最初采用我们在人培养细胞检测中所用的反应条件^[3], 对人基因组 DNA(从人外周血白细胞中提取)和 2 只已证实带有人 IX 因子 cDNA 的转基因小鼠(分别称之为 1 号和 2 号)的基因组 DNA 进行扩增, 人仅出现 371bp 的扩增带, 2 只小鼠都出现了 183bp 的扩增带, 同时还出现了约 550bp 的扩增带. 进而以人 IX 因子 cDNA 标记探针作 Southern 杂交分析, 发现人的 371bp 扩增带和小鼠的 183bp 扩增带能被杂交, 而小鼠的约 550bp 扩增带则不被杂交, 如图 1 所示.

在本实验中所用的一对引物, 分别位于人 IX 因子基因的第二和第三外显子内. 其中, 引物 1 对应于 $6,331$ 至 $6,350$ 区域, 引物 2 对应于 $6,382$ 至 $6,401$ 区域, 此处的核苷酸编号按

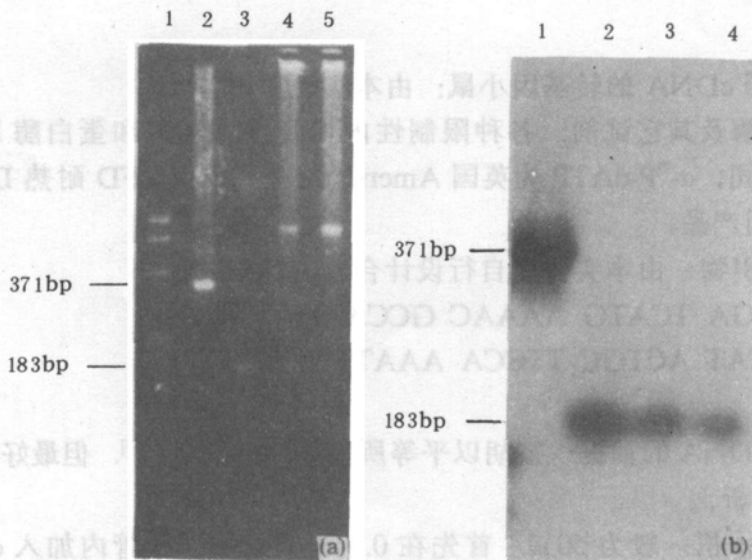


图 1 小鼠基因组 DNA 的 Southern 杂交和 PCR 分析的比较

(a) PCR 的电泳照片. 1. pBR322/MspI, 2. 人基因组 DNA(阳性对照), 3. 重组质粒 pKG5-IX cDNA(其中含有人 IX cDNA, 用作阳性对照), 4 和 5 分别为 (a) 中的 1 和 2 号小鼠的基因组 DNA.

(b) 为 (a) 的同一反应产物经电泳和 Southern 转移后, 以人 IX 因子 cDNA(1.58 kb) 为探针的杂交结果.

1. 人基因组 DNA(阳性对照), 2. 重组质粒 pKG5-IX(阳性对照), 3 和 4 分别为 1 号和 2 号小鼠的基因组 DNA

Yoshitake 等的规定^[4]。如果以人基因组 DNA 为模板,PCR 反应的结果是产生 371bp 长度的片段;如果是人 IX 因子 cDNA 为模板,由于 cDNA 中没有第二内含子顺序(188bp),故所扩增出来的产物要比从基因组 DNA 中扩增出来的产物短 188bp,从而得到 183bp 的片段。从图 1 中可以看出:(1)以人基因组 DNA 为模板可以扩增出 371bp 的片段,以人 IX 因子 cDNA 为模板也可以扩增出 183bp 的片段,而且这两种扩增片段都能与人 IX 因子 cDNA 探针发生杂交反应,这说明了这两种片段确实是以人 IX 因子基因和人 IX 因子 cDNA 为模板而扩增出来的,同时也说明了与引物设计的要求相吻合。(2)从两只转基因小鼠的基因组 DNA 中都扩增出了 183bp 的片段。这两只转基因小鼠携带的转基因中含有人 IX 因子 cDNA,故本来也应该扩增出 183bp 的片段。这样的结果与其基因组 DNA 的 Southern 杂交分析的结果是相吻合的。

然而,从图 1 中也可见到,从这两只转基因小鼠的 DNA 中,都扩增出了一条其 DNA 片段长度大约 550bp 的带,在其它样品中没有出现这种带。而这条带又不能与人 IX 因子 cDNA 探针发生杂交反应,因此,我们认为这是一条内源性的扩增带。虽然目前对小鼠 IX 因子基因的顺序和结构还不清楚,但从小鼠 IX 因子 cDNA 的顺序可以知道,我们所用引物在人 IX 因子基因中的对应区域的核苷酸顺序与小鼠 IX 因子基因中对应区域的顺序之间的同源性很高^[9]。其中引物 2 是完全同源的,引物 1 仅有 3 个碱基的差别,具体顺序如图 2 所示。

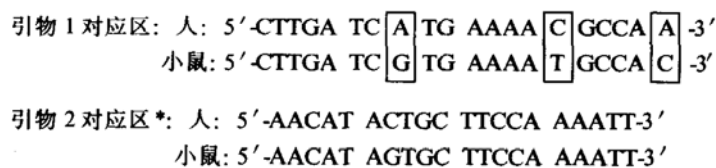


图 2 所用引物在人和小鼠 IX 因子基因中对应区域的核苷酸顺序

□ 人与小鼠之间之差别, * 负链上的顺序

从图 2 中可以看出,我们所用的引物在人和小鼠 IX 因子基因内的对应区域的核苷酸顺序同源性是很高的。因此,在某种条件下,完全有可能以内源性的 IX 因子基因为模板,扩增出一条内源性的带。这也许可以解释在我们的实验中所出现的那条大约 550bp 的扩增带。至于它的长度要比从人 IX 因子基因中扩增出来的带(371bp)要大得多的现象,可能是小鼠 IX 因子基因的第二内含子较人的第二内含子长一些的结果。

于是,我们改进了 PCR 的反应条件。结果发现,以本文“材料与方法”中所给出的反应条件较为理想。按此条件进行反应,那条约 550bp 的带就消失了,而仅出现 183bp 的带,结果如图 3 所示。

从图 3 中可以看出,按我们以前反应条件所进行实验中的那条大约 550bp 的扩增带消除了,这也说明我们的推论可能是正确的。而且目的带的扩增效果也比较满意,因此,这个 PCR 反应条件是比较理想的。

随后,我们采用这一反应条件,对 99 只待检小鼠进行了分析,以初步确定它们的基因组中是否整合有所导入的人 IX 因子 cDNA,即是否为带有人 IX 因子 cDNA 的转基因小鼠。结果发现 48 只为阳性,即从它们的 DNA 样品中扩增了 183bp 的带。图 4 中显示了第 25 至 30 号小鼠的扩增结果。

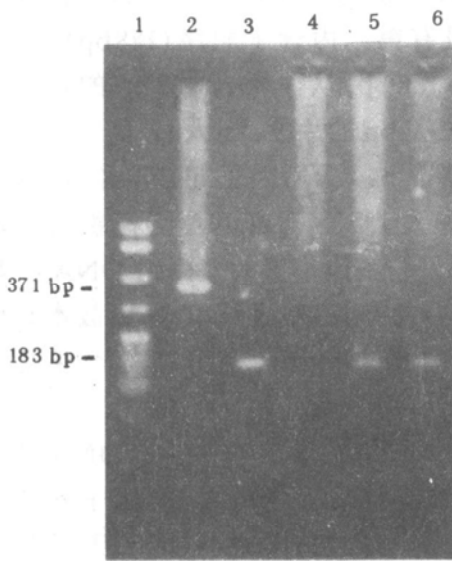


图 3 小鼠基因组 DNA 的 PCR 分析

1. pBR322DNA/MspI, 2. 人基因组 DNA(阳性对照),
3. 重组质粒 pKG5-IX DNA(阳性对照), 4. 普通小鼠
基因组 DNA(阴性对照), 5 和 6 分别为 1 号和 2 号转
基因小鼠的基因组 DNA

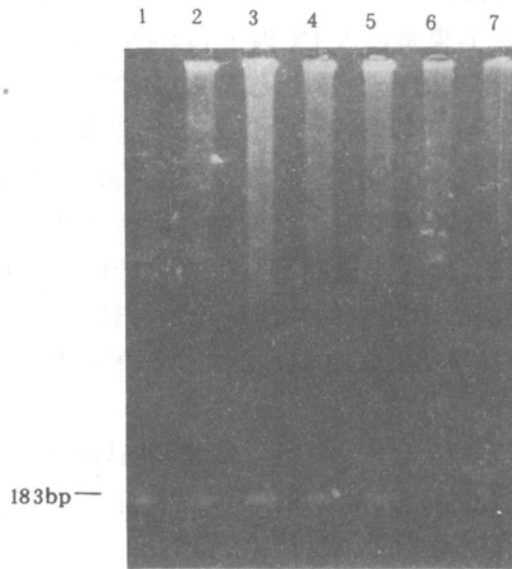


图 4 转基因小鼠基因组 DNA 的 PCR 分析

1. 重组质粒 pKG5-IX DNA(阳性对照), 2—7 分别为第 25,
26, 27, 28, 29 和 30 号小鼠的基因组 DNA

从图 4 中可以看出, 第 25, 26, 27 和 28 号小鼠都出现了 183bp 的带, 表明在这几只小鼠的基因组中整合所导入的人 IX 因子 cDNA. 然而, 由于本实验所用的这对引物只能反映人 IX 因子 cDNA 中的部分顺序(183bp)的存在, 因此, 要确定所整合的人 IX 因子 cDNA 是否完整, 则需进一步采用基因组 DNA 酶切后的 Southern 杂交分析. 我们先后对 PCR 阳性小鼠中的 8 只做了 Southern 杂交分析, 发现都是杂交阳性. 图 5 显示了对第 26, 27 和 28 号小鼠的 Southern 杂交结果. 所用的限制性内切酶为 KpnI 和 SacI, 探针 DNA 为人 IX 因子 cDNA (1.58kb), 杂交的目的片段的长度为 6.94kb.

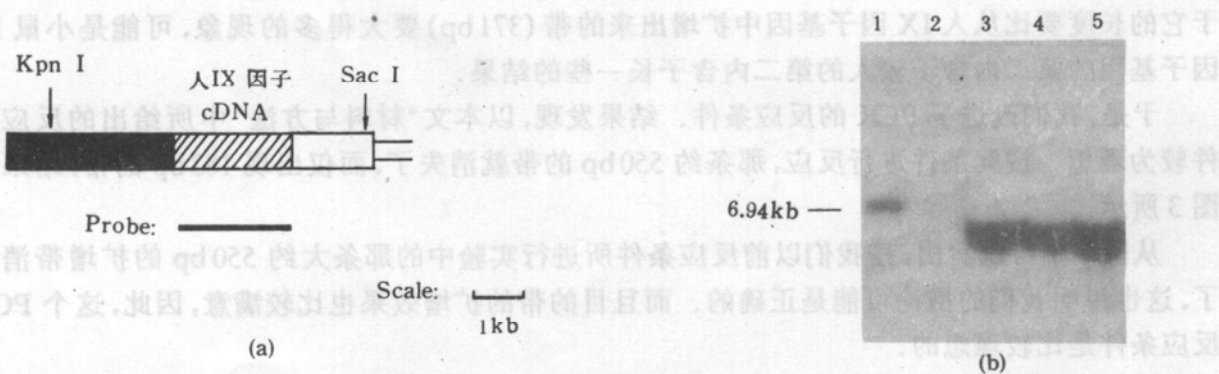


图 5 PCR 阳性小鼠的 Southern 杂交结果

(a) 转基因中的 KpnI 和 SacI 切点以及探针位置的示意图. (b) Southern 杂交的照片. 1. 重组质粒 AX2-2 (其中含有 6.94 kb 的转基因)/Kpn I+Sac I, 2—5 分别为普通小鼠(阴性对照)、第 26, 27 和 28 号小鼠/Kpn I+Sac I

从图5中可以看出,所分析的3只PCR阳性小鼠都出现了6.94kb的杂交带,这不仅进一步证明它们是带有人IX因子cDNA的转基因小鼠,同时也说明了所整合的转基因的结构是完整的。

以上结果表明,在上述的反应条件下,只要能够扩增出183bp的带,就可以基本上确定它是带有人IX因子cDNA的转基因小鼠。进而Southern杂交分析便可直接在这些PCR阳性小鼠中进行,而不必对所有欲检测小鼠都进行这样的分析。这也就是说PCR可以作为对转基因小鼠进行初筛的手段。对于假阳性的可能性,我们认为是很低的。因此PCR非特异扩增的因素虽然很多,但要正好出现大约183bp的非特异性带,才有可能造成假阳性,这种情况发生的机率显然是太低了。至于假阴性出现的可能性是存在的。因为影响PCR成功的因素很多,故很容易将因为DNA的质量、耐热DNA聚合酶的活力以及其他一些技术原因的失败而误认为是阴性。因此,如果用PCR方法来进行转基因小鼠的初筛,一个最大的缺点就是容易出现假阴性,而把真正的转基因小鼠漏检。然而,在实际研究中,如果欲检测的小鼠数量较多,那么,个别阳性小鼠的漏检对整个研究的影响是不大的。

总之,由于PCR方法具有操作简便、实验周期短、而且又不受放射性同位素来源的限制,加之阳性结果的可信性较高等优点,故可以认为,以它进行转基因小鼠的初筛,至少对于使用我们的这对引物在人IX因子cDNA转基因小鼠的初筛,是可行的,也是有效的。

参 考 文 献

- [1] 胡以平、秦世真、许月芳等, 遗传学报, 1992, 19(2): 27—33.
- [2] Sambrook, J., Friston, E. F., Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- [3] Zhou, J. M., Dai, Y. F., Qiu, X. F. *et al.*, *Chinese Science Bulletin*, 1990, 35(23): 1995—1999.
- [4] Yoshitake, S., Schach, B. G., Foster, D. C. *et al.*, *Biochemistry*, 1985, 24(14): 3736—3750.
- [5] Yao, S. N., De Silva, A. H., Kurachi, S. *et al.*, *Thrombosis and Haemostasis*, 1991, 65(1): 52—58.