

家畜基因之選殖

林志生* 葉珍珍**

一、前言

分子生物與生物技術在近十年來風起雲湧，各個不同範疇之研究者莫不加入此一行列。尤其在醫學及遺傳學上，藉由基因之研究每年都有突破性之發展。在畜牧界方面，也已逐步朝向分子遺傳層次進展，以期開創另一新機。

藉由基因之研究，人類終於解開許多遺傳性疾病（例如鎌刀型貧血症、地中海貧血症、白血病……）之起因，也發現在人體內本來就存在許多致癌基因（例如c-myc，c-fos，c-ski……），只是這些基因在正常情形之下不表現或表現很弱罷了！如今，在實驗室中更創造出不同基因轉殖動物，藉以研究各項基因架構、組合之功能。然而，運用微生物製造大量昂貴藥劑的技術，卻早已邁入商品行列。

在臺灣，畜牧研究者跨進分子生物之領域才只不過兩年的光景，一切均在草創之際，所以家畜基因選殖就更顯得重要，因為有了最原始的基因片段與資訊才能進行往後的一系列研究。家畜基因選殖即在家畜總基因體(genome)DNA上篩選出特定的一段基因序列，其一般流程如下：一、基因選殖策略之決定；二、家畜基因組集合庫(genomic library)之建立；三、基因組集合庫之篩選工作；四、篩選所得之基因組DNA分析，此步驟又可細分為：（一）確認基因片段之DNA。（二）DNA限制酶圖譜之建立及次選殖。（三）DNA序列分析；五、重組特殊用途之基因架構。（圖一）

本文即針對家畜基因選殖之一般流程做更詳盡之描述並介紹一些基本的篩選程序。

二、家畜基因選殖之一般流程

（一）基因選殖策略之決定

由龐大的基因組集合庫中選殖一段特定基因的確有如大海撈針，所以根據研究者本身之實際狀況設定正確的選殖策略乃為基因選殖成功最重要之步驟。

策略之決定因素很多，因應研究者本身專長及實驗室設備變化極大。但一般而言，有三項重大方針有待決定：（一）基因組集合庫建立之模式；（二）選殖方法之確定；（三）

所選殖基因之用途（圖二）。質體、凝聚質體及噬菌體均可為基因組集合庫之載體，運用這三種載體各有利弊：質體操作容易，但所能接入之家畜基因太短（約5kb以下），所需建立之集合庫過於龐大；凝聚質體所能接入之家畜基因最長（約30~40kb），但操作不易也不穩定；噬菌體可接入家畜基因約15~20kb，穩定但操作不易，較為一般研究者所採用。選殖方法大多採核酸雜交法，但若所欲選殖之基因帶有某些生化表現之特徵，則遺傳學及免疫化學之篩選辦法值得運用。採用核酸雜交法時，探針之來源決定選殖難易程度，一般多用同種或不同種家畜基因之cDNA，mRNA或有部份同源序列之 ϕ ligomer，利用各種限制酶及修飾酶進行DNA重組架構工作，進行其他各項研究。

所謂核酸雜交法（即DNA-DNA雜交）之基本原理（圖三）乃利用互補DNA序列可藉由氫鍵、離子鍵……鍵結能力結合一起成雙股DNA，故在雜交前先將一段已知序列之DNA製造成 ^{32}P 或biotin等之dNTP的探針，而多段未知序列之DNA亦先經變性處理成爲單股DNA再與探針進行雜交作用，若雜交成功即可在x-ray底片上呈現曝光點或在硝化纖維濾紙上呈色（使用bintin時之結果）。

* 國立中興大學畜牧研究所二年級

** 國立中興大學畜牧系

決定探針之後，往往會先在欲選殖基因之家畜基因組DNA進行偵測，以確定探針無誤且家畜基因組DNA中亦具有所欲選殖之基因片段。圖四即顯示在總基因組DNA上找出一個假想的基因序列之限制酶圖譜之方法。

(二) 家畜基因組集合庫之建立

以噬菌體為載體建立基因組集合庫的方法最常被應用，其詳細之模式如圖五。載體之處理為抽取噬菌體之DNA（於本文以 λ EMBL3為例），再以SalI處理（亦可視狀況決定用BamHI或EcoRI處理）後回收入EMBL3之左、右兩臂DNA；家畜之基因組DNA亦以相同之限制酶處理，再用CIP（calf intestinal alkaline phosphatase：小牛腸鹼性磷酸酶）去除5'端之磷酸，如此3'端也會和3'端一樣形成羥基，故DNA之兩端切頭就不會自行接合。最後將切成片段之家畜基因組DNA與載體的左、右兩臂DNA利用黏接酶接合起來，再進行體外噬菌體包裝及感染宿主細胞行增殖之作用就可以建立起完整的基因組集合庫。

基因組集合庫到底要多大才能包括所有的家畜基因組DNA呢？圖六列舉一個說明，其結果就是所建立之基因組集合庫必須大於 9.2×10^5 容積(titration)所囊括之家畜總基因的機率始可達99%。可是一般所運置之基因組集合庫都會先經增殖，所以容積量大多為 $1 \sim 9 \times 10^9$ pfu/ml(plaque forming unit)。

(三) 基因組集合庫之篩選工作

基因篩選工作是一反覆而龐大的工程，圖七乃以噬菌體為載體的基因組集合庫之基因篩選的一般流程。通常於第一輪篩選時，在15cm培養皿上佈有50,000個溶菌斑，即50,000 pfu/plate 15cm；第二輪則減少為800~1,500 pfu/plate 9cm；第三輪為100~300 pfu/plate 9cm，如此之篩選步驟如正常的話在第三、四輪後即可得純的單一溶菌斑，篩選工作也告一段落。但是在真核細胞之任一特定基因往往均大於10kb，所以在篩選所得之基因片段不一定涵括研究者所欲利用之段落，再加上於實際之操作程序的影響，基因篩選工作更益顯得困難。

(四) 篩選所得之基因組DNA分析

在上述篩選所得之單一溶菌斑之噬菌體即帶有研究者所欲得之家畜基因片段，此段DNA必須由載體上切割出來，再經原篩選時所用之探針確認，而後行限制酶圖譜分析，以上各步驟都必須經各種不同限制酶切割、跑電泳、南方吸漬法及雜交等程序（圖八）。所謂限制酶圖譜，就是定出一段DNA上各種不同限制酶的切割位置及其相關距離，圖九即為大鼠 γ -casein基因之部份DNA限制酶圖譜。確認基因組DNA片段最直接的證據就是進行DNA序列分析，但由於目前DNA序列分析技術僅限於1kb以下之片段，所以依據不同限制酶切割位置進行次選殖—即是將所選殖到之家畜基因組DNA分切為不同長短片段再架接在質體，如此即便於序列分析。DNA序列分析之原理是利用雙去氧核糖核酸ddNTP以達機終止由引子（primer）所引導複製之DNA片段，如此若分成ddATP、ddCTP、d-dTTP及ddGTP等四管反應且並列跑聚丙烯酰胺膠體，便可以在X-ray底片上讀出DNA序列（圖十）。

DNA序列讀出後，即可利用各種方法來確認啓動子（promotor），exon或intron甚至其他之各項鍵結位置（binding site）。上述基因之各項特質，研究者就可利用各種限制酶及修飾酶重組特殊用途之基因架構，進行更進一步之實驗。

三 結論

基因之篩選工作雖龐大而繁瑣，但研究者可根據本身之實際狀況設定正確之選殖策略應可建立正確而迅速之篩選流程模式。如此對日後DNA之研究或基因轉殖動物之產生均可

伸展至較廣的空間，而不必處處受制於分子生物學的技術。

總之，家畜基因選殖工作為畜牧研究者跨越分子遺傳領域之第一要務，而基因轉殖家畜可望突破目前數量育種對改良家畜品種所面臨之瓶頸，同時利用家畜來大量生產昂貴的藥劑、疫苗及各種物質將為全人類帶來莫大的福祉，同時也可提升畜牧業之經營管理型態。

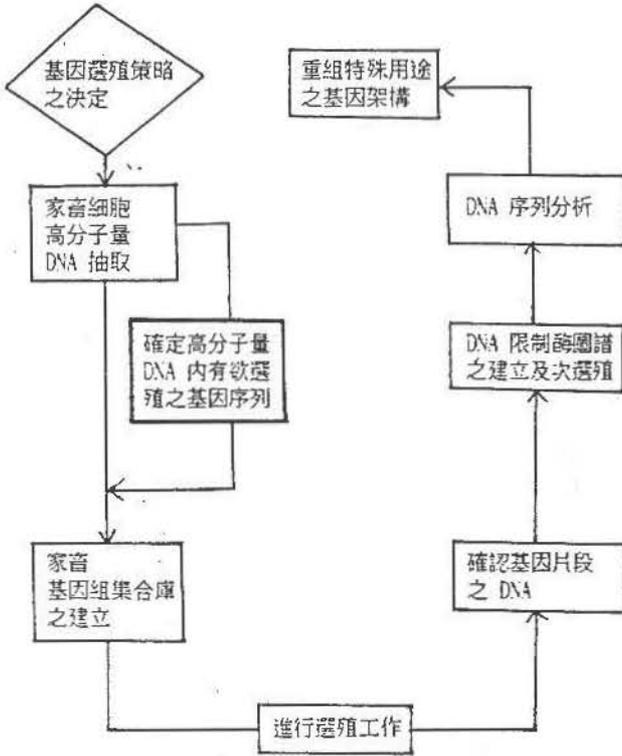


Fig. 1 家畜基因選殖之一般流程

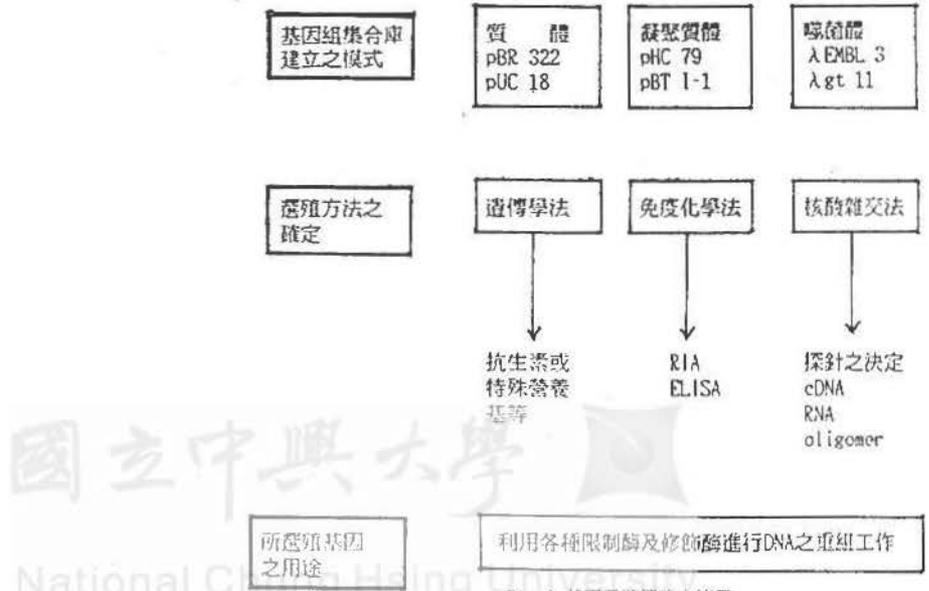


Fig. 2 基因選殖策略之流程

國立中興大學

National Chung Hsing University

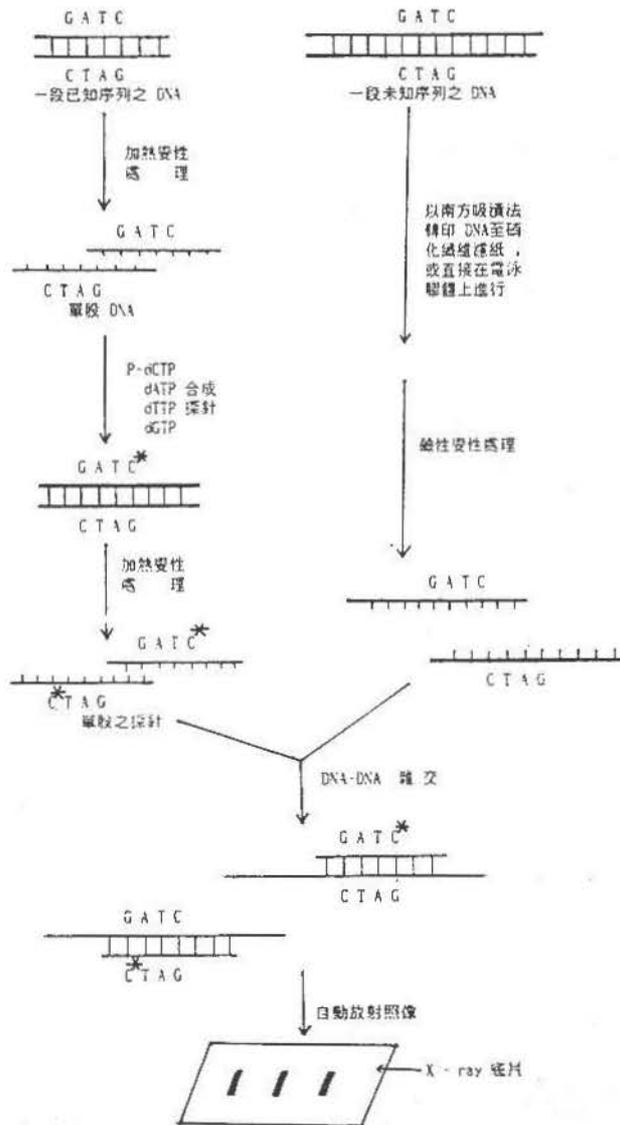


Fig. 3 DNA-DNA雜交之基本原理

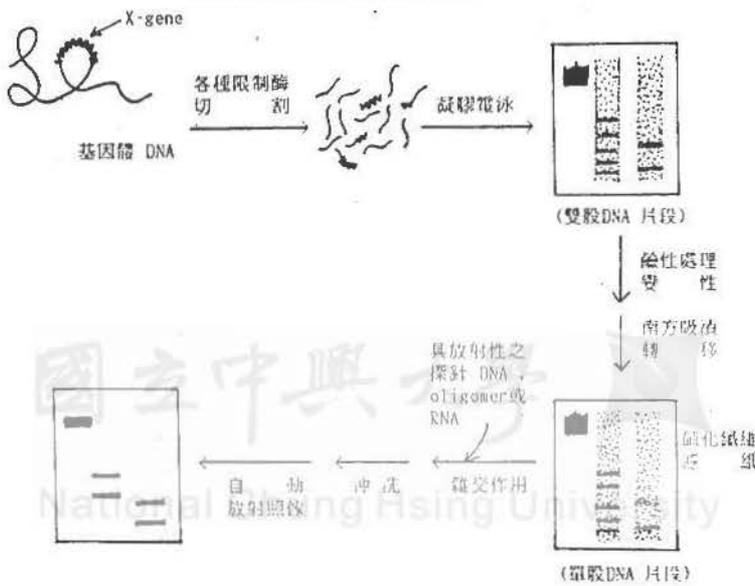


Fig. 4 以南方吸漬法，在總基因體DNA上找出一個假想的基因序列之限制 圖譜

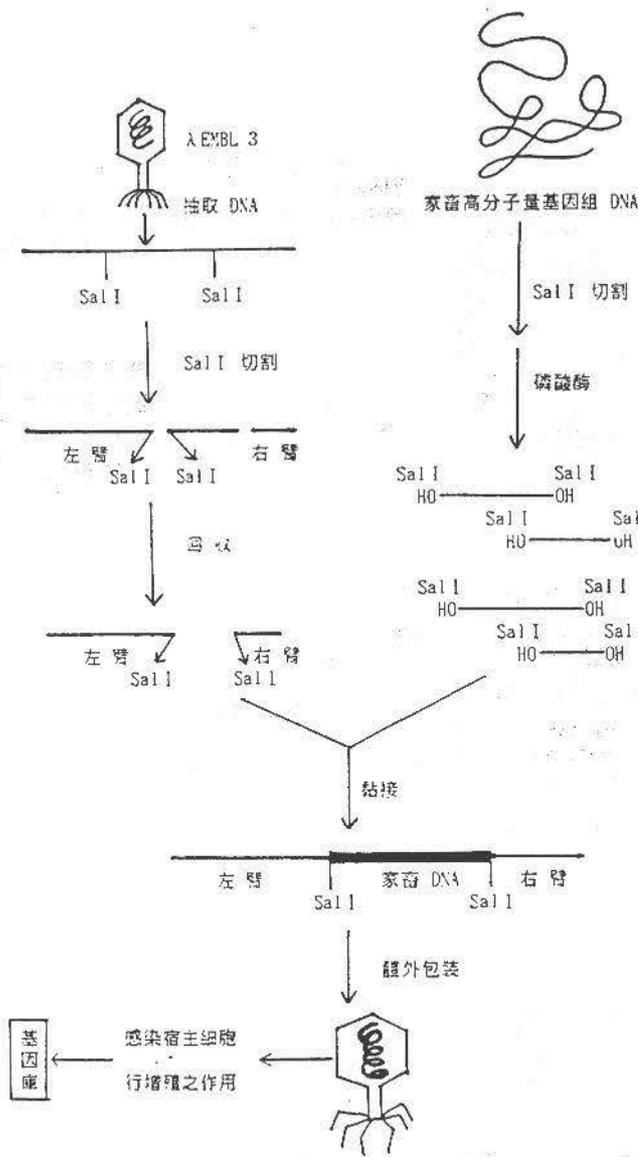


Fig. 5 家畜基因组集合限制 图谱

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - 1/n)}$$

- N : 合成家畜基因组集合库载体数 (噬菌体数)
- P : 合成之基因组集合库含括家畜基因组 DNA 全部序列之机率
- n : 家畜基因组 DNA 全长除以选殖入载体中之平均家畜基因组 DNA 长度 (约 15 - 20 kilobase)

例: 假设乳牛之基因组 DNA 全长为 3×10^6 Kb, 欲建立一机率 99% 的乳牛基因组集合库, 则此基因组集合库该为多大? (选殖入载体中 DNA 长度平均为 15 kilobase)

$P = 0.99$

$n = 3 \times 10^6 / 15 = 2 \times 10^5$

$N = \frac{\ln(1 - 0.99)}{\ln(1 - 1 / 2 \times 10^5)} = 9.2 \times 10^5$

Fig. 6 基因组集合库之计算模式

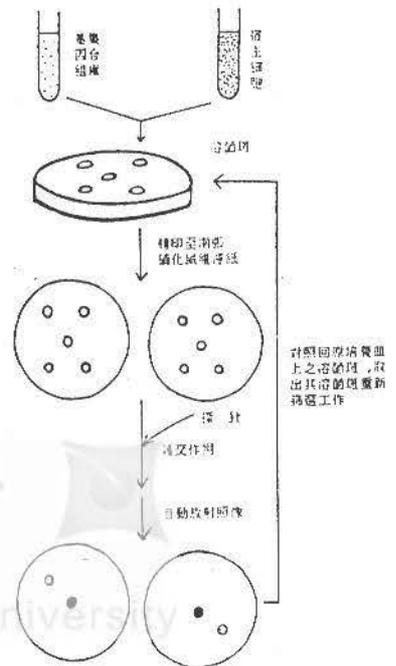


Fig. 7 以噬菌体为载体的基因组集合库之基因筛选流程

國立中興大學

National Chung Hsing University

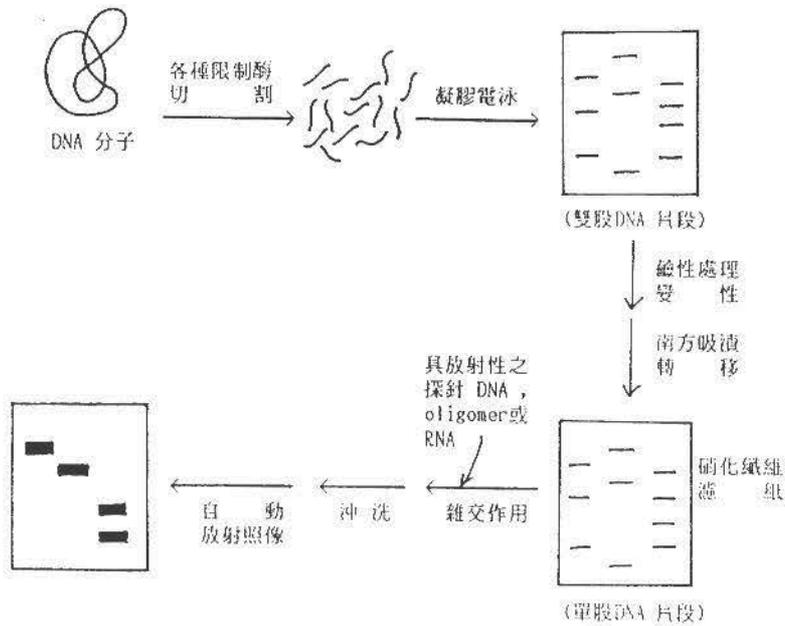


Fig. 8 以南方吸漬法，探尋DNA分子上與探針DNA為同源序列片段DNA 之流程

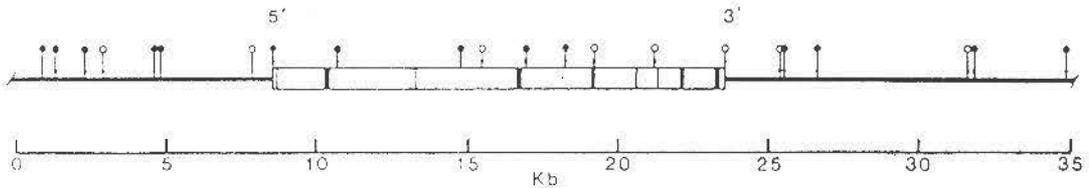


Fig. 9 大鼠 γ -casein 基因之限制 圖譜

參考文獻

1. Bonsing, J., and A. G. Mackinlay. 1987. *J. Dairy Res.* 54:447-461.
2. Feinberg, A. R., and B. Vogelstein. 1983. *Anal. Biochem.* 132:6-13.
3. Howell, M. D., J. Resner, R. K. Austin, and M. F. Kagnoff. 1987. *Gene* 55:41-45.
4. Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Cold Spring Harbor Lab. Press. N.Y.
5. Old, R. W., and S. B. Primrose. 1985. Great Britain Press. Cambridge.
6. Sal, G. D., G. Manfioletti, and C. Schneider. 1989. *BioTechnology.* 7:514-519.
7. Stewart, A. F., I. M. Willis, and A. G. Mackinlay. 1984. *Nucl. Acids Res.* 12:3398-3907.
8. Watson, J. D., N. H. Hopkins, J. W. Roberts, J. A. Steitz, and A. M. Weiner. 1987. Benjamin/Cummings Press. California.
9. Willis, I. M., A. F. Stewart, A. C., A. R. Thompson, and A. G. Mackinlay. 1982. *DNA* 1:375-386.
10. Yulee L. Y., L. Richermann, C. H. Couch, A. F. Stewart, A. G. Mackinlay, and J. M. Rosen. 1986. *Nucl. Acids Res.* 14:1883-1903.