

研究
简报

云南疣粒野生稻细菌人工染色体(BAC)文库的构建与分析

阿新祥¹ 程在全² 吴成军² 鄢波² 陈善娜¹ 杨明挚¹ 黄兴奇^{2,*}

(¹ 云南大学生命科学学院, 云南昆明 650091; ² 云南省农科院生物技术研究所, 云南昆明 650223)

Construction and Analysis of Bacterial Artificial Chromosome (BAC) Library of *Oryza granulata* Nees et Arn. ex Watt. in Yunnan

A Xin Xiang¹, CHENG Zai-Quan², WU Cheng-Jun², YAN Bo², CHEN Shan-Na¹, YANG Ming-Zhi¹, HUANG Xing-Qi^{2,*}

(¹ College of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091, Yunnan; ² Biotechnology Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223, Yunnan, China)

我国有 3 种野生稻,即普通野生稻 (*Oryza rufipogon*)、药用野生稻 (*O. officinalis*)、疣粒野生稻 (*O. granulata*)。野生稻由于长期处于野生状态,经受了各种灾害和不良环境的自然选择,抗逆性较强,是天然的基因库,保持有栽培稻不具有或已经消失了的遗传基因,它在水稻育种中具有独特的作用,是水稻育种的宏厚物质基础。但是,由于人为干扰破坏等种种原因,云南的野生稻和全国的野生稻一样也处于濒危状态^[1]。因此进行云南野生稻遗传资源的保护与研究是非常重要的和有意义的。

大片段 DNA 插入文库的构建,为开展基因组的分化组成、基因的表达与调控、染色体区段的分子物理作图 (physical mapping) 等领域的研究和基因的克隆提供技术平台。基因组大片段插入文库的发展主要经历 3 个阶段: Cosmid 文库^[2]、YAC 文库^[3]、BAC 文库^[4]。Cosmid 文库用于高等植物的基因图位克隆时,其插入片段就显得太小。近年来得到广泛应用的人工染色体主要是 YAC、BAC 和 PAC。然而, YAC 具有转化效率低、嵌合体高及插入片段回收困难等难以克服的缺点。比较而言, BAC 具有嵌合、重排频率相对低,外源 DNA 能较稳定遗传,转化效率高;重组 DNA 容易分离等优点,因而弥补了 YAC 的不足。转化前又无需对重组子 DNA 进行包装而又易于 PAC。所以 BAC 得到了迅速发展和广泛的应用。近几年来, BAC 克隆系统已成为构建基因组大片段插入文库应用最广泛的系统,几十种植物 (包括大多数重要农作物) (<http://www.hbz.tamu.edu>)、动物^[5,6]甚至线粒体等细胞器^[7]的 BAC 文库正在构建或已构建完毕。国内对 BAC 文库的构建及应用也得到了快速发展^[7-16]。但到目前为止,对于疣粒野生稻 BAC 文库的构建还未见报道。本研究通过云南疣

粒野生稻 BAC 文库的构建,在分子水平上保存了疣粒野生稻的遗传物质。分析结果表明,该文库包含 25 000 个克隆, DNA 插入片段平均大小为 80 kb,相当于疣粒野生稻基因组大小的 4.6 倍。本文库不仅较完整地保存了疣粒野生稻的核基因组,同时还可以进一步用来发掘利用疣粒野生稻的有利基因。

1 材料与方法

1.1 植物材料

野外采集的云南疣粒野生稻种植于温室中,待发出嫩叶后,收集嫩叶材料用于提取核基因组 DNA。

1.2 主要溶液和试剂

试剂盒采用美国 Epicentre 公司的 CopyControl™ BAC Cloning Kits,包括 CopyControl™ pCC1BAC™ Vector、Fast-Link™ DNA Ligase、Fast-Link™ 10 × Ligation Buffer、ATP 等 EP1300 感受态细胞。氯霉素、Spermidine 和 Spermine 为 Sigma 产品,琼脂糖、Lambda Ladder PFG Marker 购自 New England Biolabs 公司。

1.3 高分子量核基因组 DNA 的制备

主要参照 Zhang HB 等方法^[17]提取细胞核。收集的细胞核液于 45 °C 水浴中预热 5 min,加入等体积 45 °C 预热 1% 的 LMP,混匀。快速将上述混合液加入 plug 模具中,静置凝固约 1 h。将 plug 转移到 5 ~ 10 倍的含蛋白酶 K 裂解溶液 (lysis buffer) 中,在 50 °C 的环境中轻微摇晃 48 h,充分裂解细胞核膜。裂解后的 plug 放在 20 倍体积冰冷的 T₁₀E₁ (含 0.1 mmol/L 苯甲基磺酰氟 PMSF) 中^[11],置于冰上 1 h,重复洗 3

*基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (3006900)、国家自然科学基金项目 (30460019)、云南省自然科学基金重点项目 (2004C0010Z) 和云南大学 211 工程二期建设及植物学博士点资助。

作者简介: 阿新祥 (1979 -), 女, 云南大学生命科学学院硕士研究生, 植物生理与分子生物学方向。 * 通讯作者: 黄兴奇。E-mail: xingqh2 @public.km.yn.cn; Tel: 0871-5130681

Received (收稿日期): 2004-04-29, Accepted (接受日期): 2004-11-16.

次,处理好的 plug 放入 T₁₀E₁ 中,4 ℃ 储存备用。

1.4 文库的构建

用 0.8 U *Eco*R 酶,37 ℃ 下酶切 8 min,按下列条件^[17]脉冲电泳:温度 12.5 ℃,泵 80,电泳角度 120°,脉冲时间 5~50 s,电压 6 V/cm,电泳时间 18 h。切下 DNA 分子量在 100~300 kb 之间的胶条于透析袋中,电泳透析回收 DNA 大片段。大片段 DNA 与载体以 4:1 浓度连接后与大肠杆菌感受态细胞进行电激转化(转化条件为 1.5 kV,25 mF,200 μs),将转化物悬浮于 1 mL SOC 液中,37 ℃ 摇床培养 1 h。涂于培养平板上,37 ℃ 培养 24~36 h。人工挑取白色菌落,接种于含氯霉素冻存培养基 80 μL 的 384 孔的细胞培养板中,37 ℃ 静置培养过夜。-70 ℃ 保存。

1.5 文库鉴定与分析

随机挑取若干单个白色克隆分别接种到含氯霉素的 LB 培养基中,培养菌液。碱裂解法提取质粒 DNA,*Not*I 酶解后,脉冲电泳^[17]温度 12.5 ℃,泵 80,脉冲角度 120°,脉冲时间 5~15 s,脉冲电压 6 V/cm,电泳时间 16 h。EB 染色,在紫外光下检测插入的 DNA 片段大小。为检测 BAC 克隆的稳定性,随机挑选 4 个 BAC 克隆做继代培养,分别提取第 1 代和第 100 代细菌培养物中 BAC 克隆质粒 DNA,*Not*I 酶解后,脉冲电泳检查 BAC 克隆在继代培养前后是否有变化。

2 结果与分析

2.1 高分子量 DNA 的获得

按照下列浓度梯度(0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.5、2.0、5.0,酶浓度单位为 U)加限制性消化酶 *Eco*R,37 ℃ 下分别酶切 6、8、9、10、12 min 等,部分酶切的 DNA 片段大小主要集中在 100~300 kb 的酶浓度为最佳酶切浓度,经多次实验比较,认为酶切时间 8 min 时较适宜的酶切浓度在 0.6~1.0 U 之间,其中 0.8 U 为最佳酶切浓度。

通过不同方法的比较研究,建立了一种有效提取野生稻核基因组大片段 DNA 的技术体系,重复性好,每次都能获得大量的大片段 DNA。大片段 DNA 浓度通过与 DNA 浓度梯度比较来确定。

2.2 核基因组大片段 DNA 的连接转化

通过多次的连接转化实验,优化了野生稻核基因组大片段 DNA 的连接转化条件,即 25 ng 的 pCC1BACTM Vector 与约 100 ng 的大片段连接,2 μL 连接产物与 50 μL EP1300 感受态细胞混匀后电激转化效果最好,每次转化都能够得到较多的白色克隆,而出现的蓝色克隆很少,都少于 1%,符合 BAC 文库构建所要求的转化标准。

2.3 BAC 文库的限制性酶切分析

随机挑取 80 个克隆,限制酶 *Not*I 酶切检测,每个克隆子都含有插入片段(图 1),其大小分布在 40~200 kb 之间,平均长度约为 80 kb(图 2)。根据保存的 25 000 个克隆计算,所建云南疣粒野生稻文库的容量约为疣粒野生稻基因组 DNA

含量 430 Mb(参照水稻)的 4.6 倍。达到了建库所要求的理论值。

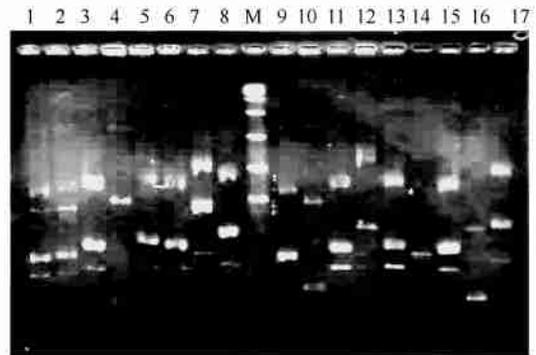


图 1 BAC 克隆 *Not*I 酶切图谱

Fig. 1 FIGE analysis of BACs digested with restriction enzyme *Not*I

M: -ladder; 1-17: BAC clones digested with *Not*I

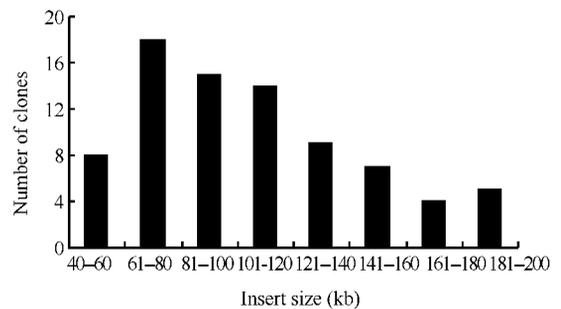


图 2 BAC 文库插入片段的分布(80 个克隆分析结果)

Fig. 2 Distribution of insert sizes of clones in the BAC library (80 BAC clones were checked for insert sizes)

2.4 文库的稳定性分析

BAC 载体系统较 YAC 的优点之一,就是其插入片段非常稳定。图 3 表明,随机挑取文库中 4 个克隆经继代培养,结果第 100 代插入片段的酶切图谱较第 1 代的无任何明显差异,充分说明所构建的云南疣粒野生稻 BAC 文库是稳定的。

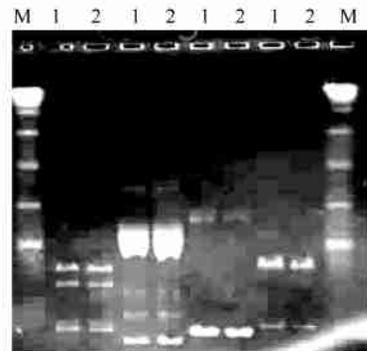


图 3 BAC 克隆的稳定性检测

Fig. 3 Checking the steadity of BAC clones

M 为 -ladder; 1 为第 1 代; 2 为第 100 代。

M: -ladder; 1: first generation; 2: one hundredth generation.

3 讨论

BAC文库的发展已历经 10 多年,技术日趋完善^[1]。尽管如此,构建 BAC 文库仍然是一件十分费时费力而又涉及多种分子生物学技术的工作。高分子量基因组 DNA 的制备是构建 BAC 文库的一大难关,关键一步是将细胞核包埋在琼脂糖凝胶块中的质量,包括细胞核的质量和浓度、琼脂糖凝胶的浓度等因素。若细胞核在包埋之前破裂、细胞核浓度太低、琼脂糖浓度过高等,都会造成失败。为了防止细胞核的破裂用于建库的组织始终在液氮中研磨且不能研磨得过细,细胞核的悬浮也必须动作轻柔。包埋的琼脂糖浓度过高会影响酶切效果,甚至造成无法酶切。研磨时液氮充分,大片段的操作除酶切外全部在 4℃ 以下进行,这样就有效防止了 DNA 的物理损伤和降解。选用绿色嫩叶为原材料,对粗提细胞核进行洗涤时,可以减少叶绿体的污染情况,纯净的细胞核是浅黄色,若颜色偏绿,可通过增加洗涤次数和降低离心速度来减少叶绿体的污染。在进行脉冲电泳分离后切下的片段太大连接效率就太低。故切下大小为 100~300 kb 的片段,连接效率高,产生的白色菌落多,蓝色菌落很少。本研究用手工挑取文库,所以文库中几乎没有蓝色菌落,但是挑取的速度太慢。因为受时间和条件的限制只挑取了 25 000 个克隆,但已覆盖整个疣粒野生稻基因组的 4.6 倍,足以用来做进一步研究。

构建云南疣粒野生稻基因组 DNA 的 BAC 文库,对于云南疣粒野生稻遗传资源的保护和研究具有非常重要的作用。一方面对于用刚刚兴起的保护生物学原理和技术来保护处于濒危状态的云南野生稻资源,在分子水平上是一种完善和补充;另一方面又可以用来做疣粒野生稻功能基因的分离与克隆等,为进一步发掘和利用云南疣粒野生稻中的有利基因奠定了基础。

References

- [1] Zeng Y-W(曾亚文), Chen Y(陈勇), Xu F-R(徐福荣), Liang B(梁斌). Extinction state and research of three type wild rice in Yunnan. *Yunnan Agricultural Science & Technology*(云南农业科技), 1999, 2: 10 - 12 (in Chinese)
- [2] Collins J, Hohn B. Cosmids: a type of plasmid gene-cloning vector that is packageable in vitro in bacteriophage lambda heads. *PNAS*, 1978, 75: 4 242 - 4 246
- [3] Burke D T, Carle G F, Olson M V. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science*, 1987, 236: 806 - 811
- [4] Shizuya H, Birren B, Kim U, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y, Simon M. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *PNAS*, 1992, 89: 8 794 - 8 797
- [5] Lambrecht B, Gonze M, Morales D, Meulemans G. Comparison of biological activities of natural and recombinant chicken interferon gamma. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1999, 70 (3-4): 257 - 267
- [6] Osoegawa K, Tatenno M, Woon P Y, Frengen E, Mammoser A G, Catanese J J, Hayashizaki Y, de Jong P J. Bacterial artificial chromosome libraries for mouse sequencing and functional analysis. *Genome Res*, 2000, 10 (1): 116 - 128
- [7] Zhang F-D(张方东), Zheng Y-L(郑用珺), Cao Z-G(曹志刚). Construction of a bacterial artificial chromosome library for CMS S mitochondrial genome of maize. *Chinese Science Bulletin*(科学通报), 2000, 45(7): 729 - 735 (in Chinese)
- [8] Peng K-M(彭开蔓), Zhang H-B(张洪斌), Zhang Q-F(张启发). A BAC library constructed to the rice cultivar "Minghui 63" for cloning genes of agronomic importance. *Acta Botanica Sinica*(植物学报), 1998, 40(12): 1 108 - 1 114
- [9] Qu X-P(曲雪萍), Fu J-M(伏建民), Li C-Y(李传友), Jia J-H(贾建航), Jin D-M(金德敏), Wang Q(王倩), Yang R-C(杨仁崔), Wang B(王斌). Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library for 5460F of rice. *Chinese Science Bulletin*(科学通报), 1999, 44: 1 532 - 1 537 (in Chinese)
- [10] Qiu F(邱芳), Jin D-M(金德敏), Fu J-M(伏建民), Zhang C-L(张超良), Xie W-W(谢纬武), Yang R-C(杨仁崔), Zhang H-B(张洪斌), Wang B(王斌). Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library for thermosensitive genic male sterile of rice 5460S. *Science in China*(Series C)(中国科学 C 辑), 1999, 29(5): 518 - 524(in Chinese with English abstract)
- [11] Wang W-M(王文明), Jiang G-H(江光怀), Wang S-Q(王世全), Zhu L-H(朱立煌), Zhai W-X(翟文学). Construction of a deep coverage rice BAC library and identification of clones associated disease-resistant genes. *Acta Genetica Sinica*(遗传学报), 2001, 28(2): 120 - 128 (in Chinese with English abstract)
- [12] Chen F G, Zhang X Y, Xia G M. Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library for *Triticum boeoticum*. *Acta Botanica Sinica*(植物学报), 2002, 44(4): 451 - 456
- [13] Qin R(覃瑞), Wei W-H(魏文辉), Ning S-B(宁顺斌), Jin W-W(金危危), He G-Q(何光全), Song Y-C(宋运淳). The physical location of *Gnr2* and *Gnr6* in *O. officinalis* with BAC-FISH based on Comparative RFLP map of wild rice, *O. officinalis* and cultivated rice, *O. sativa*. *Scientia Agricultura Sinica*(中国农业科学), 2001, 34(1): 1 - 4 (in Chinese with English abstract)
- [14] Fu B-Y(傅彬英), Yang D-C(杨代常), Zhu Y-G(朱英国), Li Z-K(黎志康). Construction of the physical map of *Pt-2(t)*, resistance gene in rice. *Acta Genetica Sinica*(遗传学报), 2000, 27(9): 787 - 791 (in Chinese with English abstract)
- [15] Yi P(易平), Wang L(汪莉), Wan C-X(万翠香), Zhu Y-G(朱英国). BAC library construction for mitochondrial genome of sterile and maintainer lines from HL rice. *Acta Agronomica Sinica*(作物学报), 2002, 28(6): 756 - 759 (in Chinese with English abstract)
- [16] Hu Z(胡正), Xu F-S(徐芳森), Zhao J-W(赵建伟), Meng J-L(孟金陵). Construction of a *Brassica napus* bacterial artificial chromosome library and identification of clones linked to boron efficiency gene. *Acta Agronomica Sinica*(作物学报), 2003, 29(4): 486 - 490
- [17] Zhang H B. Construction and Manipulation of Large-insert Bacterial Clone Libraries - Manual. Texas A&M University, Texas, USA. 2000, 6