

文章编号: 1001- 2486(2008) 01- 0120- 05

小粒野生稻可转化人工染色体文库初步构建及筛选*

王正华¹, 曹筑荣¹, 曹孟良²

(1. 国防科技大学 计算机学院, 湖南 长沙 410073; 2. 国家杂交水稻工程技术研究中心, 湖南 长沙 410125)

摘要:以小粒野生稻核 DNA 为材料构建了一个可转化人工染色体文库, 获得了 5000 个克隆, 平均插入片段约 45 kb。稳定性检测结果表明, 小粒野生稻基因组 DNA 能够在 TAC 载体中稳定存在。基于已克隆抗性基因的保守序列设计探针, 利用菌落杂交的方法, 对文库进行筛选。结果表明, 该文库可以用于抗性基因的筛选。

关键词:可转化人工染色体; 基因组文库; 小粒野生稻

中图分类号: Q94- 33 **文献标识码:** A

The Construction and Screening of Genomic Library Based on Transformable Artificial Chromosome (TAC) Vector in *Oryza. Minuta*

WANG Zheng-hua¹, CAO Zhu-rong¹, CAO Meng-liang²

(1. College of Computer, National Univ. of Defense Technology, Changsha 410073, China;

2. National Hybrid Rice R & D Center, Changsha 410125, China)

Abstract: A transformation-competent artificial chromosome (TAC) library was constructed from the genomic DNA of *oryza. minuta*. This library is composed of 5,000 clones while the average insertion fragment size is 45 kb. Stability test indicated that genome DNA of *Oryza. minuta* was stably existence in the pYLTAC27 carrier. A probe was designed according to the sequences of cloned resistance gene. With the colony hybridization method, the genome library was screened. The result shows that resistance gene can be screened in this library.

Key words: transformation-competent artificial chromosome; genomic library; *oryza. minuta*

稻属(*Oryza*) 现已查明的有 22 种, 分布在世界各地。其中 2 种为栽培稻, 20 种为野生稻。小粒野生稻(*Oryza. Minuta*) ($4n= 48$, BBCC) 原产于亚洲, 主要分布于马来西亚、菲律宾和印度尼西亚。小粒野生稻是多抗性野生稻, 已鉴定出来的有利性状有: 抗褐飞虱、白飞虱、黑尾叶蝉、稻蓟马、稻瘟病、二化螟、白叶枯病、纹枯病和细菌性条斑病^[1]。小粒野生稻是栽培稻改良的优良材料, 目前以小粒野生稻为材料对栽培稻进行改良, 已经获得了抗稻瘟病、抗纹枯病和抗白叶枯病植株。

Liu 结合 PAC 和双元载体的特点, 构建了可转化人工染色体(the Transformation-competent Artificial Chromosome, TAC)^[2]。TAC 具有 P1 质粒和 Ri 复制子, 可以在大肠杆菌和农杆菌中进行穿梭, 在农杆菌介导下能直接将外源基因整合到植物基因中。因此一旦获得目标阳性克隆后, 可以直接进行功能互补实验, 而无须进行亚克隆; 验证功能后含有目的基因的克隆, 即使基因功能未知, 也可以直接进行植物转基因育种工作, 这大大地加快了分子育种的进程。目前以 TAC 为载体构建了一系列基因组文库: 水稻、桃、番茄等^[3- 5]。

为了更好地挖掘和利用小粒野生稻所蕴含的有利基因, 本研究采用可转化人工染色体 pYLTAC27, 初步构建了小粒野生稻的基因组 DNA 文库, 已获得了 5000 多个克隆; 对文库进行的稳定性检测表明, 小粒野生稻基因组 DNA 在 TAC 载体能够稳定存在。

* 收稿日期: 2007- 08- 14

基金项目: 中国博士后基金资助项目(2005037696); 湖南省级重点实验室科研资助项目(05FJ4035)

作者简介: 王正华(1962-), 男, 教授, 博士。

1 材料与方法

1.1 材料

小粒野生稻种植于海南省试验田自然环境中,取其幼叶保存于 -80°C 低温冰箱中。

1.2 小粒野生稻高分子量 DNA 的制备

基本按照 Liu 的程序从细胞核中分离^[6]。

1.3 高分子量 DNA 的部分酶切和回收

取包埋有超高分子量 DNA 的低熔点琼脂糖凝胶 1.0g,用 $0.5\times\text{TE}$ 洗 30min 后,加入到 2ml $1.5\times\text{buffer}$ (15mM Tris-HCl(pH 7.5), 1.5mM dithiothreitol, 75mM NaCl, 0.15mg/ml BSA, 5.25mM spermidine) 和 30U Hind III 中,冰浴 3h,让内切酶均匀地渗入琼脂糖凝胶中,然后加入 10mM 的 MgCl₂,冰上放置 20min, 37°C 温浴 10min,最后用数倍体积冰冷的 TAE 清洗以终止酶切反应^[7]。

部分酶切后的小粒野生稻基因组 DNA 立即加到 1.0% 的琼脂糖凝胶上进行脉冲场电泳。电泳两次进行分离,将 70~130kb 的 DNA 从小到大分成 3 份分别回收,获得 1~3 样品。将样品放入透析袋中,加入适量 TAE,电洗脱回收 DNA。然后在 10% PEG 800 中用半透膜浓缩 3h,快速电泳测定浓度。

1.4 TAC 载体制备和连接反应

按碱裂解法提取 TAC 载体 pYL TAC27,经 CsCl 梯度纯化后,用 Hind III 完全酶切并 CIAP 脱磷酸化处理^[8]。进行连接反应时,将回收的大片段 DNA (70~130kb) 与处理好的载体按照 80~100ng 和 75ng 的量进行连接。将 TAC 载体(50ng/ μl)和插入子(10ng/ μl)混匀,先在 50°C 温浴 1min,然后加入 ligation buffer 和 9U 的 T4 ligase,开始进行反应。反应条件如下: 10°C 时 3min, $10\sim 16^{\circ}\text{C}$ 时 3min, 16°C 时 3min, 18°C 时 1min, 20 个循环, 65°C 温浴 5min 终止反应并将连接产物放在 10% PEG 800 溶液中透析 3h 左右^[7]。

1.5 重组子的转化

取 2 μl 连接产物与 20 μl 的 DH10B 感受态细胞,电击转化。将培养物在含有 50mg/l 的卡那霉素(Km)和 5% 蔗糖的 LB 固体培养基上进行筛选, 37°C 培养 12~16h。

挑取单克隆并保存于 LB 冻存培养液中, 37°C 培养 16h,然后于 -70°C 进行冰箱保存。

1.6 文库的鉴定

文库鉴定包括文库插入片段大小,重组率;克隆的继代稳定性^[9];克隆的穿梭稳定性。从文库中随机挑取 36 个克隆在含 5% 蔗糖、50mg/L 卡那霉素的液体培养中过夜培养。以碱裂解法提取质粒, Hind III 完全酶切后,以 90V, 20°C 电泳 3h,紫外凝胶成像系统成像,对结果进行分析,统计文库的插入片段大小及重组率。挑取合适大小的克隆,在含 5% 蔗糖、50mg/l 卡那霉素的液体培养基中传代培养 100 代,碱裂解法抽提质粒, BamHI、Hind III、Sal I 完全酶切,与 0 代克隆进行比较,检测其继代稳定性。文库的穿梭稳定性分析需要从文库中挑取一定数量的克隆,提取质粒,然后通过电击转化到农杆菌中,再从农杆菌中抽提质粒,电击转化回大肠杆菌,提取质粒,将转化前后的质粒 Hind III 完全酶切,检测穿梭前后克隆是否发生变化。

1.7 文库的杂交筛选

根据已有克隆的抗性基因设计一对引物,上游引物 s2: 5'-ggagggtgtggiaa(a/g)acac-3';下游引物 as3: 5'-iagigc iag igg iag icc-3'。以小粒野生稻基因组为模板,扩增一段序列。扩增条件为: 94°C 预变性 3min, 40 个循环为 94°C 变性 40s, 52.9°C 退火 40s, 72°C 延伸 1min,最后 72°C 延伸 7min。回收目的片段,用生物素标记,制成探针。

将文库用 384 针的复制器印于尼龙膜上,在 25mg/ml 卡那霉素和 5% 蔗糖的 LB 平板上培养过夜,待菌落长至合适大小,将菌落裂解,再在紫外灯下交联,用上述探针进行杂交。

2 结果与分析

2.1 可转化人工染色体文库的构建

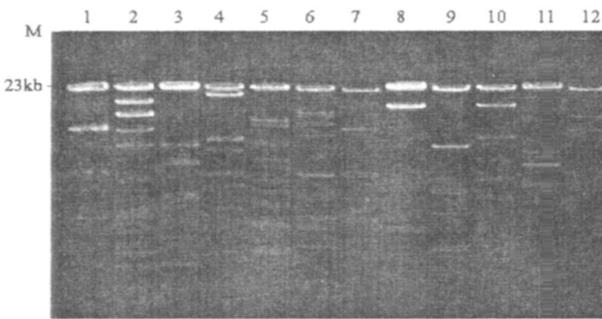
用于文库构建的高分子量 DNA 在大量酶切前, 经过了预分离, 除去了叶绿体与线粒体 DNA; 分离了降解的小片段 DNA, 确保回收的 DNA 片段, 均为限制性酶切所产生的。

部分酶切后的野生稻基因组 DNA 与 TAC 载体 pYLAC27 连接后通过电击倒入大肠杆菌 DH10B 中。每次电击后得到大约 500- 1500 个克隆, 效率与 Liu^[7] 报道的一致。电击 5 次, 共得到了约 5000 个克隆, 挑取单克隆并保存在 384 孔板中。

2.2 文库的限制性酶切分析

从文库中随机挑取 36 个克隆在含 5% 蔗糖、50mg/l 卡那霉素的液体培养基中过夜培养。以碱裂解法提取质粒, Hind III 完全酶切后, 以 90V, 20℃ 电泳 3h, 电泳结果如图 1 所示。由图 1 可知, 文库的插入片段约 45kb, 转化的重组率很高, 阳性率几乎为 100%。

对文库克隆的插入片段统计分析, 结果如图 2, 克隆主要分布在 40- 70kb, 占文库克隆总量的 58%, 有 23% 的克隆小于 40kb, 19% 的克隆大于 70kb。



M: λ DNA Hind III marker; 1- 12: 随机挑取的克隆被 Hind III 酶切
图 1 文库的限制性酶切分析

Fig. 1 Analysis size of inserted fragment DNA in library

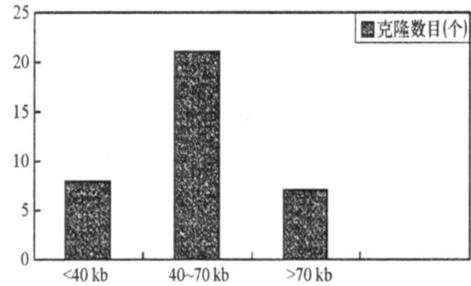
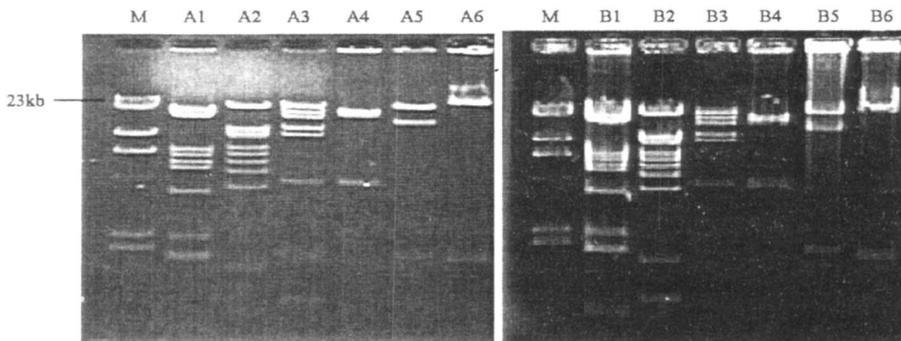


图 2 插入片段大小

Fig. 2 Insert size distribution of pYLAC27 library

2.3 TAC 克隆继代培养的稳定性分析

选取大小分别为 70kb、15kb 的 2 个克隆, 连续培养 100 代, 提取 0 代和 100 代 TAC 克隆的质粒, 分别用 3 种限制性内切酶 BamH I、Hind III、Sal I 完全酶切, 电泳显示 0 代克隆与 100 代克隆酶切条带一致, 见图 3。由此可见构建的文库在连续传代培养的情况下是稳定存在的, 小粒野生稻基因组 DNA 可以在 TAC 载体中稳定存在。

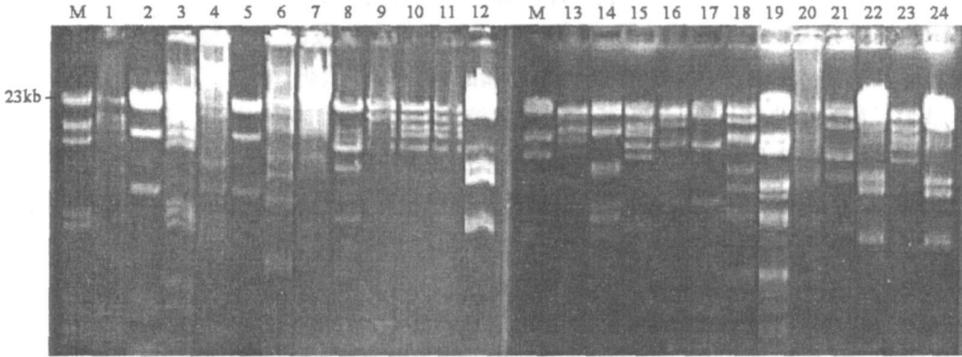


M: λ Hind III marker; A1- A6: 第 0 代克隆的酶切分析; B1- 6: 第 100 代克隆的酶切分析
图 3 第 0 代和第 100 代质粒酶切图

Fig. 3 Physical maps of the 0th generation and the 100th generation recombinant DNA

2.4 TAC 克隆穿梭培养的稳定性分析

从文库中随机挑取 12 个克隆进行质粒的分离。通过电转化的方法导入农杆菌菌株 EHA105 中。从农杆菌转化子中重新分离, 再转到大肠杆菌 DH10B 中。限制酶切分析这些质粒以鉴定其稳定性。电泳结果如图 4 所示, 穿梭后的质粒与穿梭前的质粒酶切的电泳图谱大部分一致, 少数克隆出现不稳定现象。



M: λ Hind III marker; 1- 12: 穿梭前的质粒 Hind III 酶切图; 13- 24: 穿梭后的质粒 Hind III 酶切图

图 4 穿梭前后质粒酶切图

Fig. 4 Physical maps of recombinant DNA and recombinant DNA after shuttle

2.5 文库的杂交筛选

将小粒野生稻基因组文库复制到杂交膜上, 按前述方法制备的探针杂交过夜, 并用 Phototope-star Detection Kit 显色, 在 X 光底片上成像, 见图 5。杂交得到的阳性克隆, 进一步通过 PCR 检测确认。测序后用生物信息学软件进行分析, 得到 2 个候选克隆。

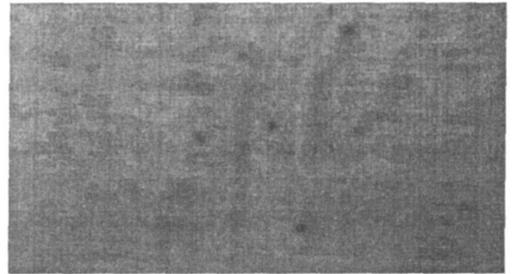


图 5 膜杂交结果

Fig. 5 The result of hybrid

3 讨论

构建大片段 DNA 插入文库是进行基因克隆和基因组研究的基础, 使用的载体一般是人工染色体, 主要有酵母人工染色体 (Yeast Artificial Chromosome, YAC)、PI 衍生的

人工染色体 (PI-derived Artificial Chromosome, PAC) 和细菌人工染色体 (Bacteria Artificial Chromosome, BAC)。YAC 是第一个真正意义上的人工染色体, 优点是插入片段大, 最大可连接 700 kb 的片段。日本水稻基因组计划用日本晴 (Nipponbare) 构建了包含 7000 个克隆的 YAC 文库, 平均插入片段为 350 kb。但 YAC 克隆具有转化效率低、易形成嵌合体、稳定性差以及插入片段回收困难等缺点。PAC 和 BAC 克隆载体系统, 不仅保留了 YAC 载体容量大的特点, 而且还具有稳定遗传, 质粒易于分离、转化效率高及文库筛选方便的优点, 成为了物理作图和图位克隆的主要载体工具。但是, 利用 YAC、PAC 和 BAC 系统进行目的基因功能验证时, 在获得候选克隆后要亚克隆, 并需要对每个亚克隆进行功能互补实验, 工作量大, 而且存在遗失目的基因的危险。

TAC 载体能够携带大片段 DNA, 并具有直接进行植物转化的功能, 将之应用于植物工程领域, 具有巨大的发展潜力和优越性。相对于 YAC 而言, TAC 载体是环状质粒, 独立于染色体之外, 它的复制不受染色体的影响, 不会发生重组导致的嵌合现象。TAC 载体具有大肠杆菌和农杆菌的复制子, 可以在两者之间穿梭复制, 非常稳定。它的多克隆位点设在果聚蔗糖酶 sacB 基因中间, 可用 5% 的蔗糖作负筛选标记, 降低空载体的自连效率。在 TAC 载体的多克隆位点两边有 T-DNA 的左右边界序列, 它在农杆菌的介导下能直接将外源基因整合到植物基因组中。因此, 在获得目标克隆后, 可以直接用目标克隆对突变体进行转化互补实验, 大大加快了实验进程^[10]。

构建基因组文库需要连接产物对大肠杆菌有较高的转化效率,由此我们对实验的各个步骤进行了优化。首先在处理载体的过程中,采用载体酶切前后转化 DH10B 的克隆数目来判断酶切的效果,载体通过与 Hind III 酶切的 λ DNA 进行连接来判断去磷酸化的效果和质量,便于判断载体处理的优劣及是否可用于文库的构建。在提取高分子量的 DNA 的过程中使用大口枪头进行操作,避免了机械力等对大片段 DNA 的剪切作用。另外我们发现,在酶切前对植物的基因组 DNA 进行预分离,可以避免细胞器 DNA 对基因组的污染,同时能够确保酶切后回收的片段确为限制性酶切所产生的。

TAC 载体能够连接大于 100kb 的片段,目前已有应用携带大片段 TAC 载体成功整合并互补植物表型的报告。但如果插入片段太大 (> 70 kb),则克隆的构建效率很低,难以获得大量克隆。构建本文库的目的不是为了染色体步移,而是用于基因筛选和植物转化。我们把文库插入片段尽力控制在 50 kb 左右,避免了由于插入片段太大重组克隆转入农杆菌出现的不稳定现象^[1]。对文库进行了稳定性检测,结果表明小粒野生稻基因组 DNA 可以在 TAC 载体中稳定存在,这对以后的突变体库构建是有利的。

参 考 文 献:

- [1] 曹孟良. 全基因组嵌入突变体库用于挖掘野生稻的有利基因及超级杂交稻分子育种策略[J]. 分子植物育种, 2005, 3(6): 869- 876.
- [2] Liu Y G, Shirano Y, Fukaki H, et al. Complementation of Plant Mutants with Large Genomic DNA Fragments by a Transformation-competent Artificial Chromosome Vector Accelerates Positional Cloning[J]. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1999, 96: 6535- 6540.
- [3] Liu Y G, Liu H M, Chen L T, et al. Development of New Transformation-competent Artificial Chromosome Vectors and Rice Genomic Libraries for Efficient Gene Cloning[J]. Gene, 2002, 282(1- 2): 247- 255.
- [4] Liang F S, Zhang K C, Yu Z W, et al. Construction, Characterization, and Screening of a Transformation-competent Artificial Chromosome Library of Peach[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2004, 22: 37- 48.
- [5] Qu S, Coaker G, Francis D, et al. Development of a New Transformation-competent Artificial Chromosome (TAC) Vector and Construction of Tomato and Rice TAC libraries[J]. Molecular Breeding, 2003, 12(4): 297- 308(12).
- [6] Liu Y G, Whittler R F. Rapid Preparation of Megabase Plant DNA from Nuclei in Agarose Plugs and Microbeads[J]. Nucl. Acids Res., 1994, 22: 2168- 2169.
- [7] Liu Y G, Liu H M, Chen L T, et al. Development of New Transformation-competent Artificial Chromosome Vectors and Rice Genomic Libraries for Efficient Gene Cloning[J]. Gene, 2002, 282(1- 2): 247- 255.
- [8] Zhang H B. Construction and Manipulation of Large-insert Bacterial Clone Libraries-manual[D]. Texas A&M University, Texas, USA, 2000.
- [9] Wang G L, Holsten T E, Song W Y, et al. Construction of a Rice Bacterial Artificial Chromosome Library and Identification of Clones Linked to the Xa- 21 Disease Resistance Locus[J]. The Plant Journal, 1995, 7: 525- 533.
- [10] Liu Y G, Nagaki K, Fujita M, et al. Development of an Efficient Maintenance and Screening System for Large-insert Genomic DNA Libraries of Hexaploid Wheat in a Transformation-competent Artificial Chromosome (TAC) Vector[J]. The Plant Journal, 2000, 23: 687- 695.
- [11] Song J, Badeen J M, Naess S K, et al. BIBAC and TAC Clones Containing Potato Genomic DNA Fragments Larger than 100kb Are Not Stable in Agrobacterium[J]. Theor. Appl. Genet., 2003, 107: 958- 964.