技术与方法 Techniques and Methods

云南药用野生稻核基因组细菌人工染色体(BAC)文库的构建与分析

阿新祥[1] 吴成军[2] 鄢波[2] 程在全[2] 姚春馨[2] 黄兴奇[2] 陈善娜[1,*]
[1]云南大学生命科学学院，昆明 650091；[2]云南省农业科学院生物技术研究所，昆明 650223

Construction and Analysis of Genomic Bacterial Artificial Chromosome (BAC) Library of *Oryza officinalis* in Yunnan

A Xin-Xiang[1], WU Cheng-Jun[2], YAN Bo[2], CHENG Zai-Quan[2], YAO Chun-Xin[2], HUANG Xing-Qi[2], CHEN Shan-Na[1,*]
[1]College of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091; [2]Biotechnology Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223

提要 通过云南药用野生稻核基因组BAC文库的构建，保存处于濒危状态的云南药用野生稻遗传资源。该文库包含27 500个克隆，随机挑取80个克隆检测，插入片段平均大小为80 kb，文库容量相当于水稻基因组大小的5.1倍。
关键词 云南药用野生稻；细菌人工染色体(BAC)文库

我国有3种野生稻，即普通野生稻(*Oryza rufipogon*)、药用野生稻(*O. officinalis*)和疣粒野生稻(*O. granulata*)。野生稻是水稻育种的重要物质基础。但云南的野生稻和全国其它的野生稻一样，已处于濒危状态[1]。

细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome，BAC)是新近发展起来的一种载体系统，具有克隆容量大、遗传特性稳定、转化效率高、易于操作等优点，在基因组文库构建和基因的快速克隆等方面已得到广泛应用。目前，包括大多数重要农作物在内的几十种植物(http://hbz.tamu.edu)、动物[2,3]甚至线粒体等细胞器[4]的BAC文库已构建完毕或正在构建。国内，BAC文库的构建及应用也得到了快速发展[4~10]。

云南药用野生稻核基因组BAC文库构建的目的在于有效、永久保存和利用其基因资源，快速克隆重要经济和抗逆性状基因。

材料与方法

野外采集的药用野生稻(*Oryza officinalis*)种植于温室中，收集嫩叶用于提取核基因组DNA。

仪器主要有：高速冷冻离心机(Beckman公司)、脉冲场电泳仪(BIO-RAD公司)、电泳仪、电激转化仪(CHEF，BIO-RAD公司)、凝胶成像系统GDS-7501(UVP公司)等。

溶液和试剂主要有DNA提取贮存液(10×HB)：0.1 mol·L^{-1} Tris、0.8 mol·L^{-1} KCl、0.1 mol·L^{-1} EDTA、10 mmol·L^{-1} 精胺、10 mmol·L^{-1} 亚精胺，pH 9.4~9.5，贮存于4℃冰箱中备用。1×HB：10×HB、0.5 mol·L^{-1} 蔗糖、0.15% β-巯基乙醇。洗涤液：1×HB、0.5%聚乙二醇辛基苯基醚、0.5 mol·L^{-1} 蔗糖、0.15% β-巯基乙醇。裂解液：0.5 mol·L^{-1} EDTA(pH 9.0~9.3)、1%十二烷基肌氨酸钠、0.5 mol·L^{-1} 蛋白酶K。SOC培养基：2%蛋白胨、0.5%酵母粉、10 mmol·L^{-1} NaCl、2.5 mmol·L^{-1} KCl、20 mmol·L^{-1} 葡萄糖、10 mmol·L^{-1} $MgSO_4$、10 mmol·L^{-1} $MgCl_2$。采用美国Epicentre公司的CopyControl™ BAC克隆试剂盒，包括：CopyControl™ pCC1BAC™ 载体、Fast-Link™ DNA连接酶、Fast-Link™ 100×连接缓冲液、EP1300感受态细胞、ATP等。氯霉素、精胺和亚精胺为Sigma公司产品，琼脂糖、λ Ladder PFG分子量标准购自New England Biolabs公司。

制备高分子量核基因组DNA时，参照Zhang[11]的方法提取细胞核。收集的细胞核液于45℃水浴

收稿 2004-05-08 **修定** 2004-12-01
资助 国家自然科学基金重点项目(3006900)、国家自然科学基金(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项目。
* 通讯作者(E-mail: shnchen@ynu.edu.cn, Tel: 0871-5034670)。

中预热5 min，加入等体积45℃预热的1%低熔点琼脂糖混匀。将上述混合液快速分装入琼脂糖凝胶块模子中，静置凝固约1 h，形成琼脂糖凝胶块(Plug)。将Plug转移到5~10倍的含蛋白酶K裂解溶液中，在50℃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$T_{10}E_1$(含0.1 mmol·L^{-1}苯甲基磺酰氟)中[8]，置于冰上1 h，重复洗3次。再用无苯甲基磺酰氟的冰冷的$T_{10}E_1$洗3次。此时，Plug中包含制备好的高分子量基因组DNA，将Plug放入$T_{10}E_1$中，于4℃下储存备用。

构建文库时，用0.8 U *Eco*RI酶，37℃下酶切8 min，按下列条件脉冲电泳[11]：温度12.5℃，电泳角度120°，脉冲时间5~50 s，电压6 V·cm^{-1}，电泳时间18 h。切下DNA分子量在100~300 kb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(条件为：1.5 kV，25 mF，200 Ω)，转化物悬浮于1 mL SOC培养基中，放在37℃摇床上培养1 h。涂于培养平板上，37℃下培养24~36 h。人工挑取白色菌落，直接接种到含有80 μL冻存培养液的384孔培养平板上，37℃下培养至培养液变浑浊，贮存于-70℃冰箱中。

文库鉴定与分析时，随机挑取若干单个白色克隆分别接种到含氯霉素(12.5 mg·mL^{-1})的LB培养基中培养。用碱裂解法提取质粒DNA，*Not*I酶解后，脉冲电泳[11](条件为：温度12.5℃，脉冲角度120°，脉冲时间5~15 s，脉冲电压6 V·cm^{-1}，电泳时间16 h)。溴化乙锭(EB)染色，于紫外光下检测插入的DNA片段大小。检测BAC克隆的稳定性时，随机挑选3个BAC克隆分别接种于5 mL含氯霉素(12.5 μg·mL^{-1})的LB培养基中进行继代培养，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。

实验结果

1　高分子量DNA的获得

按下列浓度梯度(0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.5、2.0、5.0 U)加限制性消化酶*Eco*RI，于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的酶浓度为最佳酶浓度。经过多次实验比较，确定酶切时间8 min的较适宜酶浓度为0.6~1.0 U，其中0.8 U为最佳酶浓度。

据此，我们建立了一种有效的提取野生稻核基因组大片段DNA的技术体系，重复性好，每次都能够获得大量的大片段DNA。通过与λ DNA浓度梯度比较来确定大片段DNA浓度(图1)。

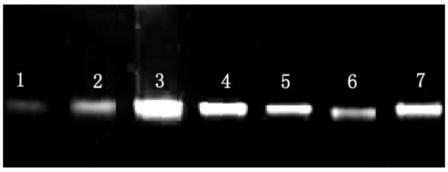

图1　大片段DNA

1~3分别为10、20、50 ng λ DNA；4~7为大片段DNA。

2　核基因组大片段DNA的连接转化

通过多次连接转化实验，优化了野生稻核基因组大片段DNA的连接转化条件，以25 ng的pCC1BAC™载体与约100 ng的大片段连接；2 μL连接产物与50 μL感受态细胞混匀后电激转化的效果为最好，每次转化都能够得到较多的白色克隆，出现的蓝色克隆都少于1%，符合BAC文库构建所要求的转化标准。

3　BAC文库的限制性酶切分析

随机挑取80个克隆，以限制酶*Not*I酶切检测，每个克隆子都含有插入片段(图2)，其大小分布在40~200 kb，平均长度约为80 kb(图3)。据此计算，所建云南药用野生稻文库的容量约为药用野生稻基因组DNA含量430 Mb(参照水稻基因组)的5.1倍，达到了建库所要求的理论值。

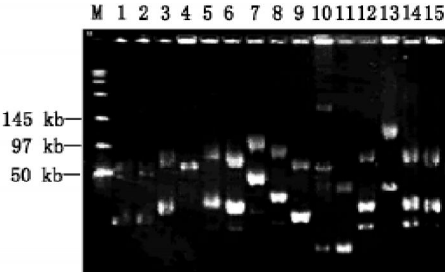

图2　BAC克隆 *Not*I酶切图谱

M：λ DNA梯级分子量标准；1~15：BAC克隆/*Not*I。

4　文库的稳定性分析

BAC载体系统较YAC的明显优点之一就是其

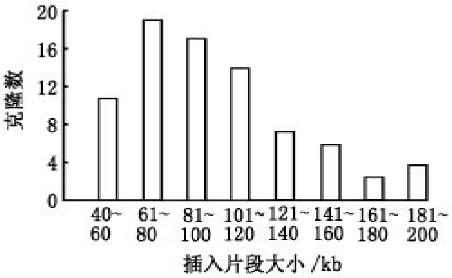

图3 BAC文库插入片段的分布

80个克隆分析结果。

插入片段非常稳定。图4表明，随机挑取文库中3个克隆经继代培养，第100代插入片段的酶切图谱与第1代的无任何明显差异，说明所构建的云南药用野生稻BAC文库是稳定的。

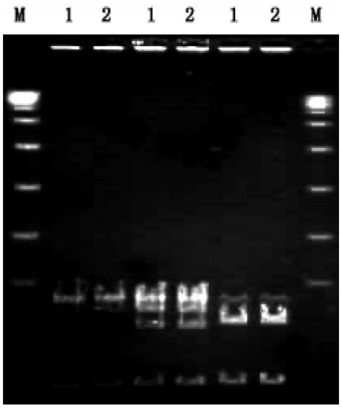

图4 BAC克隆的稳定性

M为λ DNA梯级分子量标准；1为第1代；2为第100代。

讨　论

BAC文库构建对于基因组较大的真核生物基因组学研究很重要，构建过程中涉及的步骤较多，难度大，其中的任何一个环节发生错误都有可能造成整个实验前功尽弃。

高分子量核基因组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。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。大片段的操作除酶切外全部在冰上进行，这样就有效防止DNA的物理损伤和降解。选用绿色新发的嫩叶为原材料，对粗提细胞核进行洗涤可以减少叶绿体的污染。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。

该文库平均插入大小为80 kb。理论上，BAC文库最大插入片段在300 kb以上。但是目前已报道的BAC文库插入大片段平均大小范围都只在80~160 kb。本文尽管在增大插入片段上做了不少努力，用200~400 kb的大片段构建文库时，也只有极少克隆达到200 kb，远小于300 kb。这可能是回收的大片段并非是真正酶切下来的，而是机械切断导致连接不上所造成的；也可能与转化参数有关，大分子不易进入大肠杆菌。我们认为适当减小电场强度可提高大分子DNA的转化效率。提高插入片段平均大小，使其接近理论值是我们今后进一步研究的目标。

本文库包含27 500个克隆，覆盖整个药用野生稻基因组的5.1倍，不仅较完整地保存了云南药用野生稻核基因组，而且可用于药用野生稻重要性状基因及全基因组的物理作图、重要农艺性状基因的图位克隆、基因结构及功能分析等研究。

参考文献

1 曾亚文，陈勇，徐福荣等. 云南三种野生稻的濒危现状与研究利用. 云南农业科技，1999，(2)：10~12

2 Lambrecht B, Gonze M, Morales D et al. Comparison of biological activities of natural and recombinant chicken interferon-gamma. Veterinarya Immun Immunopathol, 1999, 70(3,4): 257~267

3 Osoegawa K, Tateno M, Woon PY et al. Bacterial artificial chromosome libraries for mouse sequencing and functional analysis. Genome Res, 2000, 10(1): 116~28

4 张东方，郑用琏，曹志刚. 玉米S组CMS线粒体基因组细菌人工染色体文库的构建. 科学通报，2000，45 (7)：729~735

5 Peng KM, Zhang HB, Zhang QF. A BAC library constructed to the rice cultivar "Minghui 63" for cloning genes of agronomic importance. Acta Bot Sin, 1998, 40(12): 1108~1114

6 曲雪萍，伏建民，李传友等. 水稻5460F细菌人工染色体文库的构建和鉴定. 科学通报，1999，44：1532~1537

7 王文明，江光怀，王世全等. 高覆盖率水稻BAC文库的构建及抗病基因相关克隆的筛选. 遗传学报，2001，28(2)：120~128

8 Chen FG, Zhang XY, Xia GM et al. Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library for *Triticuma boeoticum*. Acta Bot Sin, 2002, 44(4): 451~456

9 易平，汪莉，万翠香等. 红莲型水稻不育系和保持系线粒体基因组BAC文库的构建. 作物学报，2002，28(6)：756~759

10 Hu Z, Xu FS, Zhao JW et al. Construction of a *Brassica napus* bacterial artificial choromsome library and identification of clones linked to borom efficiency gene. Acta Agron Sin, 2003, 29(4): 486~490

11 Zhang HB. Construction and manipulation of large-insert bacterial clone libraries—Manual. Texas, USA: Texas A&M University, 2000.6