

小麦-簇毛麦 6VS/6AL 易位系可转化人工染色体(TAC)文库的构建

方玉达¹ 刘耀光² 吴 豪² 张群宇² 陈佩度¹ 刘大钧¹

(南京农业大学作物细胞遗传农业部重点开放实验室 南京 210095)

(华南农业大学生物技术学院 广州 510642)

摘 要 可转化人工染色体(Transformation-competent Artificial Chromosome, TAC)是具有克隆和转移大片段基因能力的新型载体,是植物基因克隆和转化的有效工具。为了克隆小麦抗白粉病基因和其它基因,本研究用 TAC 载体 pYL TAC17 构建了带有抗白粉病基因 *Pm21* 的小麦-簇毛麦 6VS/6AL 易位系的基因组 DNA 文库。该文库包含 210 万个克隆,平均插入片段 35kb,库容相当于普通小麦基因组的 4.9 倍。本文库以约 1000 个克隆组成 1 个混合池的方式保存在 22 块 96 孔平板,可用 PCR 方法进行文库的筛选。

关键词 可转化人工染色体,基因组文库,小麦

中图分类号 Q943 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)04-0433-04

构建基因组 DNA 文库是基因克隆和基因组研究的基础。新基因的克隆通常需要对候选克隆进行基因功能互补试验。而用 YAC、BAC 和 PAC 等基因组文库进行目的基因的筛选,在获得候选克隆后,通常要进行亚克隆,然后对每个亚克隆逐一进行基因功能互补试验,不仅工作量大,而且有遗漏目的基因的危险。从根癌农杆菌 T-DNA 转移的分子机制看,T-DNA 链是在 *virD2* 和 *virE2* 蛋白的引导和保护下以 T-链蛋白复合体形式转移和靶向植物细胞核并整合的,这就为完整的大片段 DNA 导入植物基因组提供了基础。Miranda 等^[1]将根癌农杆菌 Ti 质粒 T-DNA 的右边界序列方向颠倒,T-DNA 链的极性颠倒了,结果一段 160kb 长的 Ti 质粒 DNA 导入到植物细胞中去。Hamilton 等^[2,3]结合根癌农杆菌介导转化双元载体和细菌人工染色体(BAC)载体的特点,构建了一种“双元 BAC 载体”(binary BAC,简称 BIBAC)。BIBAC 有大肠杆菌 F 因子和发根农杆菌 Ri 质粒的复制子,因此能在大肠杆菌和根癌农杆菌中以单拷贝形式复制。LIU 等^[4]结合 PAC 载体和双元载体的特点,构建了植物可转化人工染色体(Transformation-competent artificial chromosome, TAC)载体。TAC 载体含 P1 质粒和 Ri 质粒 pRiA4 的复制子,能在大肠杆菌和根癌农杆菌中以单拷贝形式复制。TAC 载体中的 P1 裂解复制子可被 IPTG 诱导产生多拷贝,利于克隆 DNA 的提取和文

库筛选。BIBAC 已被用于将一段长 150kb 的人基因组 DNA 在农杆菌的介导下导入烟草基因组并稳定遗传^[2]。TAC 载体已被证明能够高效率地转化拟南芥,并能将长约 80kb、含重力感应基因 *SGR1* 的克隆导入拟南芥重力感应突变体 *sgr1*,使转化体恢复正常的重力感应性^[4]。因此 BIBAC 和 TAC 不仅能作为大片段基因组文库的载体,而且能通过根癌农杆菌介导将克隆片段导入植物基因组直接进行功能互补试验,省去了亚克隆的步骤。

近年来,根癌农杆菌介导转化法在单子叶植物上得到了成功的应用。Chan 等^[5]首次报道根癌农杆菌转化禾谷类作物水稻得到转基因植株,并提供了分子和遗传分析的证据。Hiei 等^[6]报道用根癌农杆菌转化粳稻成熟胚诱导而来的愈伤组织得到大量形态正常且可育的转基因水稻植株。接着 Rashid 等^[7]和 Dong 等^[8]用相似的方法成功转化了籼稻和 Javanica 稻。Ishida 等^[9]用含“超级双元载体”的根癌农杆菌转化玉米未成熟胚得到形态正常且大多数可育的转基因植株。1997 年,Tingay 等^[10]和 Cheng 等^[11]分别报道了根癌农杆菌介导的大麦和小麦转化。最近,我们已用大片段 TAC 克隆成功地转化了水稻(尚未发表结果)。

小麦-簇毛麦 6VS/6AL 易位系中的 6VS 染色体臂携带有抗白粉病基因 *Pm21*^[12]。为了分离该基因,我们构建了小麦-簇毛麦 6VS/6AL 易位系的

基因组 TAC 文库。从该文库中筛选的含 *P_m21* 基因的候选克隆将能直接用于小麦的遗传转化,进行功能互补测验。

1 材料与方 法

1.1 植物材料

小麦-簇毛麦 6VS/6AL 易位系由南京农业大学细胞遗传研究所培育和保存。

1.2 仪器设备

主要仪器有 Beckman 高速冷冻离心机,电场反转电泳仪 Programmable power Inverter PPI-200(MJ Research),LKB 2297 MACRODRIVE 5 电泳仪,电激仪 Cell-Porator(Gibco-BRL)等。

1.3 试剂和溶液

T4 DNA 连接酶为日本 Takara 产品,HK 脱磷酸酶为 Epicenter 产品,*Hind*III 为 Promega 产品,卡那霉素、Supermidine 和 Spermine 为 Sigma 产品,琼脂糖酶、PFGE marker 购自 New England Biolabs 公司。

1.4 菌株和载体

构建文库的大肠杆菌菌株是 DH10B,本研究使用的 TAC 载体 pYLTAC17 是 pYLTAC7^[4]的改进型(刘耀光等,未发表结果),即用 Act1 5'/bar 取代了 pYLTAC7 中的 Pnos/HPT 作为转化体选择标记。

1.5 小麦高分子量 DNA 的制备

基本按照 Liu 等^[13]的程序从细胞核中分离。

1.6 高分子量 DNA 的部分酶解和分离回收

取包埋有超高分子量 DNA 的低熔点琼脂糖凝胶 1.5g,用 1/3×TE 洗 30min 后,加 300μL 10×mol/L 缓冲液,1 mg/mL BSA 和 2 mol/L 亚精胺,加蒸馏水至 3 mL 和 300 u *Hind*III。冰浴 3 h 让内切酶均匀地渗入琼脂糖凝胶中,然后 37℃ 保温 12 min。用冷却的 TE 溶液洗凝胶 2 次以停止酶切反应。

部分酶切后的小麦基因组 DNA 立即加到 0.8% 的低熔点琼脂糖胶上进行反转电场电泳(Field inversion gel electrophoresis,FIGE)。将从 10kb 到 100kb 范围的 DNA 从小到大分成 7 份分别回收,获得组份 1~7 样品。各组份放入含 30 mol/L NaCl 的 TE 溶液中 4℃ 平衡 2 h,切成小块放入 1.5 mL 离心管中 4℃ 保存备用。

1.7 TAC 载体的制备和连接反应

按碱裂解法提取 TAC 载体质粒 pYLTAC17,经 CsCl 梯度纯化,*Hind*III 完全酶切,HK 脱磷酸酶处理,用含 TE 溶液透析,经定量后备用。

取组份 3,4,6 各 100 mg,68℃ 10 min 溶化低

熔点琼脂糖,降温至 40℃ 后各加 1 u 的琼脂糖酶,40℃ 保温 1 h。用切除端部的移液头转移到圆盘透析膜(孔径 0.02 μm,Millipore)上对含 20 mol/L NaCl 的 2/3×TE 溶液在 4℃ 透析约 30min。在 PCR 反应管中,各加入 86μL 插入子 DNA(约 2~3ng/μL),4μL 的载体 DNA(50 ng/μL),放入 PCR 仪,50℃ 1 min。降温至 16℃,加 10×连接缓冲液 10 μL,T4 DNA 连接酶 200 u,按下列程序进行连接反应:16℃ 5min,4℃ 2min,从 4℃ 经历 5min 升温至 22℃,22℃ 1min,15~20 循环,然后 65℃ 10 min。将连接反应液转移到圆盘透析膜上对 1/4×TE 溶液在 4℃ 透析约 3~4 h。

1.8 TAC 克隆导入大肠杆菌和阳性菌落收集

通过电激法将 TAC 克隆导入 *E. coli* DH10B,电激参数为 voltage:300V;charge:fast;voltage booster resistance:2kΩ;capacitance:330μF;impedance:low。每次电激将 1 μL 连接反应物与 20 μL DH10B 感受态细胞混合。电激后,将菌体转入 1.5 mL SOC 中,37℃、150~200 r/min 培养 70 min。将相同组份的转化细胞混合,取 20 μL 涂布在含 25 μg/mL 卡那霉素和 5% 蔗糖的 LB 平皿上,37℃ 培养过夜,计算各组份 TAC 克隆的滴度。然后将各组份的转化细胞按每平皿约 1000 个克隆涂布在含 25 μg/L 卡那霉素和 5% 蔗糖的 LB 平皿上,37℃ 培养 10~12 h。每平皿加 1 mL 保存液(含 36 mol/L K₂HPO₄,13.2 mol/L KH₂PO₄,1.7 mol/L 柠檬酸,0.4 mol/L MgSO₄,6.8 mol/L (NH₄)₂SO₄,4.4%(V/V)甘油,20 μg/mL 卡那霉素的 LB 溶液),从平皿表面用涂布器刮下菌落,每个平皿一式 4 份各取 150 μL 放入 4 块 96 孔酶标板中。将文库 37℃ 培养 3~4 h 后置于 -70℃ 冰箱中保存。

1.9 TAC 克隆的限制酶切分析

以碱裂法提取 TAC 克隆质粒 DNA,用 *Hind*III 和 *Not*I 酶切,用 0.8% 琼脂糖胶进行反转电场电泳。用 FX 分子成像系统(BioRad)及其 Quantity1 分析软件分析电泳图像和计算插入片段大小。

2 结 果

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 是从小麦幼苗的细胞核中提取的。在核分离过程中,除去了绝大多数叶绿体和线粒体,减少了细胞器 DNA 的污染。

部分酶切后的小麦基因组 DNA 与 TAC 载体 pYLTAC17 连接后通过电激法导入大肠杆菌

DH10B 中。每次电激可得到约 5000~10000 个克隆。所构建的小麦 TAC 文库共收集在 22 块 96 孔板中,每个孔约 1000 个克隆,共包括约 210 万个克隆。构建文库所用的 DNA 来自平均分子量略有不同的 3 个组份,其中用组份三获得约 62 万个克隆,组份四约 100 万个克隆,组份六约 48 万个克隆。

2.2 TAC 克隆的限制酶切分析

我们从来源于组分三、四、六的文库中分别随机检测了 10 个、20 个和 10 个 TAC 克隆,全部含有插入子,其大小分布在 10~85 kb 之间,平均长度约 35kb(图 1,图 2)。据此计算,本文库的容量为普通小麦基因组 DNA 含量(1C)的 4.9 倍。

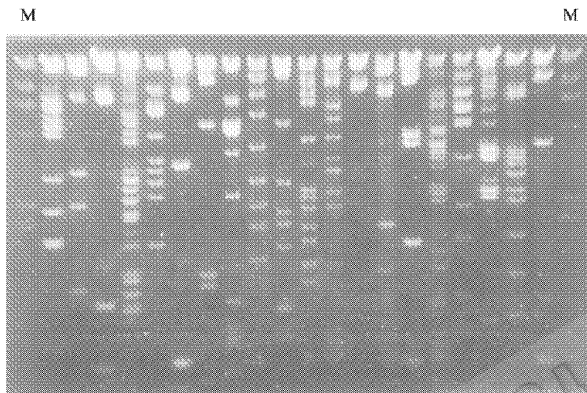


图 1 TAC 克隆的 *Hind*III 酶切及反转电场电泳分析结果

Fig. 1 FGE analysis of TACs digested with restriction enzyme *Hind*III
The largest band(23kb) is the vector and the others are insert fragments.
M λ -*Hind*III molecular marker

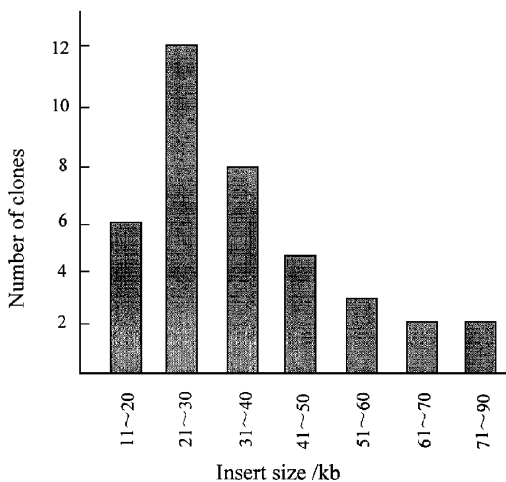


图 2 TAC 文库插入片段分子量分布 (40 个克隆的分析结果)

Fig. 2 Size distribution of clones in the TAC library (data from analysis of 40 clones)

3 讨论

普通小麦-簇毛麦 6VS/6VL 易位系含抗白粉病 *Pm21* 基因,本文库的构建为 *Pm21* 和其它小麦有用基因的候选克隆的筛选和功能测验提供了基础。

小麦基因组庞大,构建其完整的基因组文库必须有高的克隆效率作保证。我们从基因组 DNA 和载体的制备及连接转化各个步骤条件都加以优化。从细胞核中分离 DNA,该方法比从原生质体中分离 DNA 简单可靠,并减少了细胞器 DNA 的混入。常用的 DNA 连接反应温度为 16℃、4℃ 或 22~25℃。在 4℃ 条件下,反应体系中 DNA 分子末端之间易形成可供连接酶作用的底物,然而在此温度下酶活性较低。在 22℃ 时,连接酶活性虽高,但 DNA 分子运动快,不易形成稳定的可供连接的底物,一般只适用于高浓度 DNA 分子间的线状连接。利用 PCR 仪在 4℃、16℃ 和 22℃ 间进行温度循环,使这两个因素得到优化,提高了 DNA 连接效率。采用电激法转化大肠杆菌不仅可提高转化效率,而且对大质粒有效进入宿主菌体也是必需的。

质粒 pYLTAC17 中的 *sacB* 基因编码果聚糖蔗糖酶(Levansucrase),催化从蔗糖转移果糖残基到各种受体蛋白上,影响受体的正常功能。当琼脂培养基中含 5% 蔗糖时,*sacB* 基因产物能使大肠杆菌和农杆菌致死。当外源 DNA 插入 pYLTAC17 的克隆位点后,*sacB* 基因失活,阳性克隆在含 5% 蔗糖的琼脂培养基上正常生长,而未插入外源 DNA 的阴性克隆则致死。这大大方便了阳性 TAC 克隆的筛选和收集,特别是本研究采用克隆群体收集法,*sacB* 基因选择可避免空载体克隆的混入。

所构建的文库插入片段长度应当根据不同研究目标加以设计。如果太长则候选克隆的进一步分析工作量,且较大片段(>70kb)克隆的构建效率很低,难以获得大量克隆。如果太短则克隆数太多,筛选工作量,有时还不能包含目的基因的全序列。小麦的基因组很大,重复序列多,用染色体步移的图位克隆方法分离基因难度极大。由于构建本文库的主要目的不是为了用于染色体步移,而是用于以基因片段探针筛选出含有完整基因的克隆,我们设计的文库大部分克隆的插入片段长度为 20~40kb。即能在很大程度上包含候选基因的编码序列和调控序列以及侧翼序列(Flanking sequence),或可包含基因簇。较大插入片段中候选基因的原始侧翼序列提供了一个缓冲区,当整合入宿主基因组后,可能减少

染色体位置效应的影响,提高候选基因的表达效率^[3,4]。

本研究构建的基因组文库总克隆数约为 210 万个,平均分子量约 35kb,插入片段总和大约相当于小麦基因组(1.5×10^{10} bp/1C)的 4.9 倍。如此大数目的文库显然难以使用通常的每个克隆单独保存和高密度杂交膜筛选的策略。为便于文库的保存和筛选,我们将约 1000 个 TAC 克隆混合构成一个池

(pool)放入 96 孔版的一个孔中,每块版包含约 9~10 万个克隆。目的基因的筛选方法是首先用 PCR 选出阳性池,再进一步通过菌落原位杂交筛选出含目的基因的克隆。每个池的培养、质粒提取、和 PCR 扩增都以 96 孔板为单位来进行操作,快速方便。

通过根癌农杆菌介导将 TAC 克隆转化小麦以及用抗性基因保守序列探针筛选本文库的工作正在进行中。

参 考 文 献

- [1] Miranda A ,Janssen G ,Hodges L *et al.* *J Bacteriol* ,1992 ,**174** :2288~2297
- [2] Hamilton C M ,Frery A ,Lewis C *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* ,1996 ,**93** :9975~9979
- [3] Hamilton C M . *Gene* ,1997 ,**200** :107~116
- [4] LIU Y G ,Shinano Y ,Fukaki H *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* ,1999 ,**96** :6535~6540
- [5] Chan M T ,Chang H H ,Ho S L *et al.* *Plant Mol Biol* ,1993 ,**22** :491~506
- [6] Hiei Y ,Ohta H ,Komari T ,Kumashiro T . *Plant J* ,1994 ,**6** :271~282
- [7] Ishida Y ,Saito H ,Ohta S *et al.* *Nature Biotechnol* ,1996 ,**14** :745~750
- [8] Dong J ,Teng W ,Buchholz W G *et al.* *Molecular Breeding* ,1996 ,**2** :267~276
- [9] Rashid H ,Yokoi S ,Toriyama K *et al.* *Plant Cell Rep* ,1996 ,**15** :727~730
- [10] Tingay S ,McElroy D ,Kalla R *et al.* *Plant J* ,1997 ,**11** :1369~1376
- [11] Cheng M ,Fry J E ,Pang S Z *et al.* *Plant Physiol* ,1997 ,**95** :426~434
- [12] LIU D J ,Chen P D ,Proc 7th Int Wheat Symp.(Cambridge UK) ,1988 ,pp. 335~361
- [13] LIU Y G ,Whittler R F . *Nucl Acids Res* ,1994 ,**22** :2168~2169

Construction of a Transformation-competent Artificial Chromosome (TAC) Library of a Wheat-*Haynaldia villosa* Translocation Line

FANG Yu-Da¹ LIU Yao-Guang² WU Hao² ZHANG Qun-Yu² CHEN Pei-Du¹ LIU Da-Jun¹

¹(Key Laboratory of Crop Cytogenetics ,Ministry of Agricultural ,Nanjing Agricultural University ,Nanjing 210095)

²(Genetic Engineering Laboratory ,College of Biotechnology ,South China Agricultural University ,Guangzhou 510642)

Abstract Transformation-competent artificial chromosome(TAC) vector is able to clone and transfer large DNA fragments in plants and is a powerful tool for plant gene isolation and transformation. To clone important genes from wheat , a TAC genomic library was constructed from nuclear DNA of a 6VS/6AL wheat-*Haynaldia villosa* translocation line that harbor the gene *Pm21* for resistance to powdery mildew. The library consists of 2.1×10^6 clones with an average DNA insert size of 35kb and represents in total 4.9 genome equivalents. The library was stored as clone pools in 96-well plates , and each pool contained about 1000 clones. TAC clones containing gen(s) of interest can be screened by a pooled-PCR/colony-hybridization strategy.

Key words Transformation-competent artificial chromosome ,genomic DNA library ,wheat