

通过染色体步查建立水稻 G200 座位的重叠群

黄 雯 王春新 李 焱 刘良式

(中山大学生命科学院 广州 510275)

摘 要 分别以 G200 及其旁侧区的 Y2587L、Y4073L 和 L688 片段为探针筛选水稻基因组 YAC 文库,共得到 4 个阳性克隆,均与 G200、Y2587L 和 Y4073L 座位重叠,插入片段的大小为 240~650kb。用反向 PCR 法分离 YAC 克隆插入片段的末端序列,并利用这些末端序列确定克隆的方向以及进行染色体步查,共筛选到 7 个 YAC 克隆,建立了一个 8 厘摩(cM)的 G200 YAC 重叠群。

关键词 水稻 G200 座位,重叠群,染色体步查,YAC 文库

学科分类号 Q 784

高等植物的基因组比较复杂。所以,对于许多作用机制和产物目前仍然未知的基因,很难通过常规途径进行基因克隆。图位基因克隆(Map-based gene cloning or positional cloning)似乎能解决这一难题。它的原理早在 10 年以前就已提出^[1],但由于当时所用的文库插入片段较小,单个克隆中往往未能包含完整的基因,而且各种动植物的遗传图上可利用的标记非常少,所以一直未有成功的结果报道。近年来,高密度 DNA 分子标记连锁图的构建以及大片段 DNA 文库的建立,为直接定位和克隆基因提供了可能^[2~4]。

图位基因克隆的关键步骤之一是通过染色体步查建立重叠群(Contig)。利用与目标基因紧密连锁的 DNA 分子标记为探针筛选 YAC 文库,可以分别得到一系列 YAC 克隆。这些克隆之间有部分片段是重叠的,因此称为重叠群。在两个重叠群之间会出现空隙,需要通过染色体步查的技术来填补。该技术从分离 YAC 克隆插入片段的左、右末端入手,以它们为探针再次筛选 YAC 文库,获得新的克隆即为沿着染色体步查了一步。重复这一过程,就能一步一步地将空隙填满,并有希望得到含有目标基因的 YAC 克隆。拟南芥菜的第 4 染色体^[5]和水稻的第 6 染色体^[6]都已建立了重叠群图谱,染色体覆盖率分别为 90% 和 60%,这些工作为图位基因克隆打下了良好的基础。

本文报道了水稻第 6 染色体 G200 座位重叠群的建立以及进行染色体步查的结果,得到一个 8 厘摩(cM)左右的 YAC 重叠群。在水稻第 6 染色体的 G200 区附近,从 R1954(19.0cM)到 P106(49.6cM)大约 30cM 的范围,只有非常有限(6 个)的分子标记^[7],而这个区存在着若干重要的农艺性状基因,有待在分子水平上深入研究。因此本研究的目的在于探索在某个有兴趣的染色体区段增加分子标记的有效途径,例如通过在该区建立一个比较大的重叠群,进而将重叠群中的末端序列转换为新的分子标记。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 YAC 文库滤膜及 YAC 克隆：由日本水稻基因组计划(RGP)馈赠。该文库一套 5 张滤膜,共 6 932 个克隆。水稻材料是 *Oryza sativa* L. cv. Nipponbare, 克隆载体分别为 pYAC4 和 pYAC55, 克隆位点相应地为 EcoRI 和 NotI, 宿主菌为 *S. cerevisiae* AB1380^[8]。

1.1.2 菌种和质粒：DH5 α [*supE44, Δ lacU169 (ϕ 80lacZ Δ M15), *hsdR17, recA1 end A1, gyrA96, thi-1, rel A1*], DNA 分子标记克隆 G200、Y4073L、Y2587L、L688 由 RGP 馈赠, 转化 DH5 α 中保存。*

1.1.3 试剂及试剂盒：Taq DNA 聚合酶, 10 \times PCR 缓冲液, 15mmol/L MgCl₂ 购自华美公司, 限制酶购自 Boehringer 公司、GIBCO 公司及华美公司; RNA 酶, 溶菌酶, 溶壁酶(lyticase), 蛋白酶 E, 蛋白胨, 酵母抽提物, 琼脂粉, 琼脂糖, 明胶, SDS, β -巯基乙醇(β -ME), 山梨醇, 二巯基苏糖醇(DTT), 十二烷基肌氨酸(N-lauroylsarcosine), 亚精胺(spermidine), 小牛血清白蛋白(BSA), 苯甲基磺酰氟(PMSF), 脉冲场电泳专用琼脂糖等购自 Sigma 公司, [α -³²P]dCTP 购自北京福瑞生物工程公司, 尼龙膜购自 Bio-Rad 公司。其他试剂均为国产。

缺口转移探针标记试剂盒购自 Promega 公司; 寡核苷酸标记试剂盒(Oligolabelling Kit)购自 Pharmacia 公司。

1.1.4 仪器：480 型 DNA 扩增仪购自 Perkin Elmer 公司, 紫外分析仪购自 Pharmacia 公司, 杂交炉购自 Robbins Scientific 公司, CHEF II 型脉冲场电泳仪购自 Bio-Rad 公司。

1.2 方 法

1.2.1 YAC 滤膜的筛选：若滤膜是首次使用, 需先用 5 \times SSC 在 50 $^{\circ}$ C 漂洗 1h, 洗去膜上的菌体残渣。杂交及洗膜方法见文献[9], 将滤膜用保鲜膜包裹后趁湿压片, -30 $^{\circ}$ C 放射自显影。冲片后将膜同样用保鲜膜包裹, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.2 初筛克隆的 PCR 鉴定：制备酵母总 DNA, 以其为模板进行 PCR 扩增。G200、Y4073L、Y2587L 和 L688 的引物根据 GenBank 公布的序列自行设计, 分别为 G200: 5' CACTAATTCACCTGGTGCTACTGC 和 5' CGACATAATCACTACTCCAGGCC, Y4073L: 5' AGGCTGCTGCAACAACAG 和 5' CTCCAATAGCCCACGTAC, Y2587L: 5' CATCTTGACGCCAAATCAG 和 5' GAACAGGAAGTGGGCTAAGG, L688: 5' AATACGACTCACTATAG 和 5' TGTGGGTTAGCATTCTTCTC。反应混合物为 10mmol/L Tris-Cl pH8.3, 50mmol/L KCl, 2.5mmol/L MgCl₂, 0.01% 明胶, 0.2mmol/L dNTPs, 0.5 μ mol/L 引物, 50~100ng 模板 DNA, 1u Taq DNA 聚合酶, 超纯水补足体积至 20 μ l, 最后加 20 μ l 矿物油覆盖表面。反应程序: 第一个循环为 94 $^{\circ}$ C 变性 5min, 58 $^{\circ}$ C 退火 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2min; 后 30 个循环为 94 $^{\circ}$ C 变性 1min, 58 $^{\circ}$ C 退火 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2min, 72 $^{\circ}$ C 再延伸 7min, 最后 4 $^{\circ}$ C 保温。扩增产物加 4 μ l 加样缓冲液, 移去矿物油后于 1% 琼脂糖凝胶中电泳分部, 溴化乙锭(EB)染色后在紫外灯下观察并照相。

1.2.3 酵母总 DNA 的微量提取：参见文献[10]并略有改动。在加入 200 μ l 5mol/L 乙酸钾溶液之后, 放冰上至少 1h。10 000r/min 离心 15min, 上清液用等体积的酚/氯仿抽提

一次。用无水乙醇沉淀 10min, 70% 乙醇洗 1 次, 抽干后溶于 300 μ l TE, 加入 2 μ l RNase (10mg/ml) 37 $^{\circ}$ C 处理 1h。等体积异丙醇沉淀, 即刻离心, 70% 乙醇洗 1 次, 抽干, 溶于 10 μ l TE 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.4 酵母染色体 DNA 胶块的制备: 取 3ml 过夜培养物, 低速离心收菌, 用 1ml TE₅₀^[11] 洗涤 2 次。加入 1~2 倍体积 YRB 缓冲液(1 mol/L 山梨醇, 20mmol/L Tris-Cl pH7.5), 1% 体积 β -ME 和 20u/ml 溶壁酶, 37 $^{\circ}$ C 温育 1~7h。加入等体积 50 $^{\circ}$ C 预热的 1% 低熔点琼脂糖(用 YRB 缓冲液配制), 迅速混匀, 加入模具中, 4 $^{\circ}$ C 放置 20min, 制成胶块。将胶块浸于 1ml ES 溶液(0.5 mol/L EDTA pH8.0, 1% sacorsine), 37 $^{\circ}$ C 处理 1~2h, 换新的 ES 溶液, 加蛋白酶 E 至 0.2mg/ml, 37 $^{\circ}$ C 处理过夜。TE₅₀ 洗涤两次, 每次 2h, 换新的 TE₅₀, 保存于 4 $^{\circ}$ C。

1.2.5 YAC 克隆插入片段大小的确定: 制备酵母染色体 DNA 胶块, 进行脉冲场凝胶电泳。脉冲时间采用 60s, 电压 190V, 电泳 20h, 缓冲液温度为 14 $^{\circ}$ C。电泳结束后 EB 染色观察并照相, 按常规方法^[12] 转移至尼龙膜上。以质粒 pBR322 为探针进行杂交。杂交温度及时间与滤膜的原位杂交相同。洗膜条件为 0.5% BSA, 5% SDS, 40mmol/L Na₃PO₄ pH6.8, 1mmol/L EDTA 室温洗 30min, 换新的洗膜液 65 $^{\circ}$ C 洗 30min, 晾干后于 -30 $^{\circ}$ C 放射自显影。

1.2.6 反向 PCR 法(inverse-PCR)分离 YAC 克隆插入片段的末端序列: 分别用 TaqI (分离左端), HindIII 或 PstI (分离右端) 消化酵母总 DNA, 反应体积为 50 μ l, 酶的用量为 20u。在适宜的温度下消化 2h, 等体积酚/氯仿抽提 1 次。取 1 μ l 水相用于连接反应: 1 μ l 消化的 DNA, 1 μ l 10 \times 连接缓冲液, 1 μ l 10mmol/L ATP, 1u T4DNA 连接酶, 加 ddH₂O 补至 10 μ l, 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。取 1 μ l 连接产物进行 PCR 反应。PCR 反应中的引物必须与消化酵母总 DNA 时所用的酶配对, 分别为 TaqI: 5' GGACGGGTGTGGTCGCCATGAT 和 5' GTAGC-CAAGTTGGTTAAGG; HindIII: 5' AGTCGAACGCCGATCTCAA 和 5' GGAAGAACGAAG-GAAGGAGC; PstI: 5' AGTCGAACGCCGATCTCAA 和 5' AAACCTCAACGAGCTGGACGC。反应混合物为 10mmol/L Tris-Cl pH8.3, 50mmol/L KCl, 2.5mmol/L MgCl₂, 0.2mmol/L dNTPs, 0.25 μ mol/L 引物, 1 μ l 连接产物, 超纯水补足体积至 19 μ l, 20 μ l 矿物油覆盖表面, 92 $^{\circ}$ C 热启动 5min, 趁热加入 1 μ l Taq DNA 聚合酶(1u), 反应程序为 92 $^{\circ}$ C 变性 1min, 60 $^{\circ}$ C 退火 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 3min, 共 35 个循环, 最后 4 $^{\circ}$ C 保温。取 5 μ l 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。若发现一次扩增的产物浓度太低可进行二次扩增, 反应体系与一次扩增时相同, 只是将模板改为 1 μ l 一次扩增的产物, 反应程序不变。

2 结果与讨论

2.1 YAC 文库的筛选及阳性克隆的鉴定

G200 及其旁侧区的分子标记 Y2587L、Y4073L 和 L688 来源于日本 RGP, 它们均位于水稻第 6 染色体上部 32~34cM 区^[7], 从上到下依次为 L688、G200、Y4073L、Y2587L。其中 Y2587L 和 Y4073L 分别是两个 YAC 克隆(Y2587 和 Y4073) 插入片段的左端序列。分别以这四个分子标记为探针筛选水稻基因组 YAC 文库。根据杂交信号挑选初筛阳性克隆, 然后制备它们的总 DNA, 通过点杂交和 PCR 扩增进行复筛。共得到 4 个阳性克

隆,据其位置分别命名为 Y1810、Y2587、Y3827 和 Y4073。它们均与 Y2587L、Y4073L 和 G200 这 3 个座位重叠,可用于建立重叠群。L688 没有筛选到任何阳性的 YAC 克隆,这一结果与 RGP 的相符^[13]。他们将其拥有的 1383 个 DNA 分子标记中的 1285 个用于筛选 YAC 文库,发现有 7% 的标记无法从该文库中筛选到任何 YAC 克隆^[14]。究其原因一是该文库可能没有覆盖整个基因组,二是染色体上某些区域由于结构上的原因难于被克隆。

由于 YAC DNA 通常与酵母的染色体 DNA 混杂在一起,难以分辨,所以必须通过杂交才能确定它的大小,即制备酵母染色体 DNA,经脉冲电场泳分部后 Southern 转移和杂交。探针可用 pBR322 质粒 DNA,因为它与 YAC 载体有同源序列^[15],能特异地与 YAC DNA 结合。由分子量标准可以得出这些 YAC 克隆的插入片段分别为:Y2587 = 650kb, Y3827 = 310kb, Y4073 = 240kb(图版 I-1)。Y1810 这个克隆比较特殊,在同一条泳道上有不止一条杂交带,其中最大的为 420kb。这很可能是由于 YAC 插入片段的部分缺失造成的。Dunford 曾经就此类问题进行过专门的研究^[16]。他指出,植物基因组中重复 DNA 顺序的存在会影响它在 YAC 中的稳定性,即含有重复 DNA 顺序的 YAC 插入片段会因重组而缺失部分序列,使同一个宿主中出现大小不同的两个 YAC。其后的实验证明 Y1810 中确实存在着重复 DNA 顺序(结果未显示)。这种 YAC 克隆对染色体步查或图位基因克隆都没有用处,因为难以弄清究竟哪一个 YAC 可以利用,所以只好舍弃。

RGP 的 YAC 文库插入片段长度在 100kb~1Mb,平均长度为 350kb^[8]。Kurata 认为在他们的 RFLP 图中,遗传图距与物理图距的关系是 1cM 相当于 240kb^[7]。那么,这 3 个 YAC 克隆可覆盖水稻第 6 染色体 G200 座位附近 3cM 左右的距离,这对于进行染色体步查及图位基因克隆都相当有利。

2.2 建立 YAC 重叠群

建立重叠群的第一步是分离 YAC 克隆插入片段的末端序列。本文采用反向 PCR 法,即利用 YAC 载体左、右臂上的一段已知序列设计引物,酵母总 DNA 经过内切酶消化和自我环化之后进行 PCR 扩增,于是将与载体臂相连的一段末端序列分离出来。引物序列应设计在酶切位点的近旁,使扩增产物中的载体序列尽可能少。有时一对引物无效(没有扩增产物),说明在克隆位点附近不存在该内切酶的位点,使末端序列太长,一般的 PCR 无法扩增。这时就要换另一对引物或是换用另一种分离末端的方法。如果事先按照内切酶/引物配对的情况多合成几对引物,那么成功的把握就大些。

根据实验的需要设计了 3 对引物(详见材料与方法),试图分离 Y3827 插入片段的两个末端以及 Y2587 插入片段的右端。结果分别得到了 Y3827 的左端(Y3827L)和 Y2587 的右端(Y2587R)序列,图版 I-2 所示的是一次扩增和二次扩增之后的电泳分部情况。分别回收这 2 个片段作为探针与 EcoRI 消化的 YAC DNA 进行 Southern 杂交,它们分别只与 Y3827 和 Y2587 的 DNA 产生强杂交信号(图版 I-3),说明 Y3827L 和 Y2587R 分别位于 Y3827 的左端和 Y2587 的右端,即分别位于这个重叠群的两端。因为,如果它们位于该重叠群的内部,就应该与其他的克隆也有杂交。用这两个片段作为探针与不同酶消化的水稻 DNA 进行 Southern 杂交,结果表明它们均为单拷贝序列(结果未显示)。

从上述结果可以排出这 3 个 YAC 克隆的次序,初步建立了一个重叠群(图 1)。这个

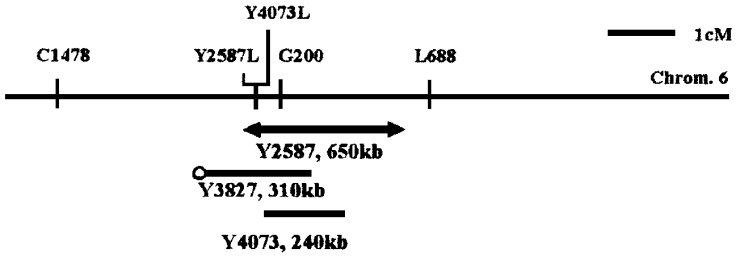


图 1 初步建立的 G200 座位的 YAC 重叠群

Fig.1 YAC contig encompassing G200 locus

重叠群位于水稻第 6 染色体上分子标记 Y2587 与 L688 之间,最左端是 Y3827L,最右端是 Y2587R,两个末端之间的图距约为 3cM。

2.3 通过染色体步查扩大重叠群

染色体步查的技术包括分离 YAC 克隆插入片段的末端序列,以及以其为探针重复文库筛选的工作。以 Y3827L 和 Y2587R 为探针再次筛选水稻基因组 YAC 文库, Y3827L 筛选到 5 个阳性信号, Y2587R 筛选到 9 个。获得 YAC 克隆后制备其染色体 DNA,再经脉冲场交变电泳分部, Southern 转移和杂交, 分别以 Y3827L 和 Y2587R 为探针进行复筛。Y2587R 筛选到 5 个阳性克隆, 分别为 Y1042(100kb), Y4448(450kb), Y4494(320kb), Y5856(1.1Mb)和 Y6946(100kb)。图版 I-4 显示了 Y2587R 的筛选结果。Y3827L 筛选到 2 个阳性克隆, 分别为 Y3536(450kb)和 Y4520(350kb)(结果未显示)。根据这些克隆插入片段的大小粗略地计算, 可以得出此重叠群已经从两个方向扩大到接近 8cM(约 2Mb 图 2), 证明染色体步查成功。

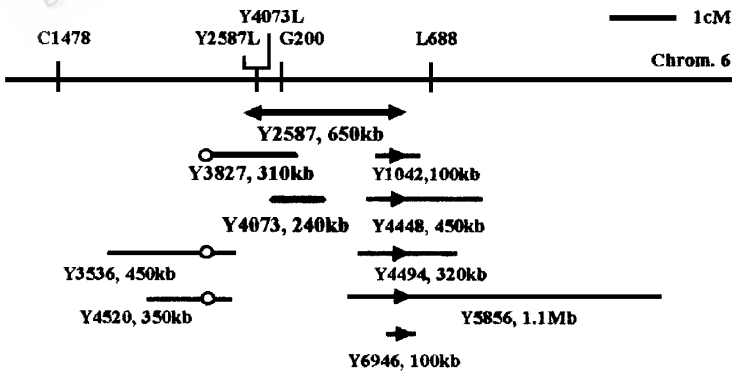


图 2 综合染色体步查结果之后的 G200 YAC 重叠群

Fig.2 Final YAC contig encompassing G200 locus synthesized with the results of chromosome walking

从上述结果可以看到, 我们通过建立 G200 座位的重叠群, 共获得 11 个 YAC 克隆, 其中有 6 个日本的 RGP 曾报道过^[13], 另外 5 个则是首次报道。从理论上说, 我们在这个区将可以增加 10 个新的分子标记。将它们转换为 STS(Sequence tagged sites)的工作正

在进行之中。

致 谢 本实验所用 YAC 文库滤膜及 YAC 克隆由日本水稻基因组计划 (RGP Japan) 馈赠, 谨此表示感谢!

参 考 文 献

- 1 Coulson A. Proc Natl Acad Sci USA, 1986 **83** :7821
- 2 Arondel V, Lemieux B, Hwang I *et al.* Science, 1992 **258** :1353
- 3 Cai D G, Kleine M, Kifle S *et al.* Science, 1997 **275** :832
- 4 Sweigard J A, Carroll A M, Kang S *et al.* The Plant Cell, 1995 **7** :1221
- 5 Schmidt R, West J, Cnops G *et al.* Plant J, 1996 **9** :755
- 6 Antonio B A, Umehara Y, Tanoue H *et al.* Rice Genome, 1996 **5** :5
- 7 Kurata N, Nagamura Y, Yamamoto K *et al.* Nature Genetics, 1994 **8** :365
- 8 Umehara Y, Inagaki A, Tanoue H *et al.* Mol Breed, 1995 **1** :79
- 9 Hoheisel J D, Maier E, Mott R *et al.* Cell, 1993 **73** :109
- 10 Ausubel F M, Brent R, Kingston R E *et al.* Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 1990
- 11 王春新, 王金发, 刘文华等. 生物工程学报, 1996 **12** :11
- 12 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T *et al.* Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 13 Mehara *et al.* Genome Research, 1996 **6** :935~942 (Internet via the WWW at <http://bank.dna.affrc.go.jp>)
- 14 Wang Z X, Umehara Y, Tanoue H *et al.* Rice Genome, 1996 **5** :3
- 15 Burke D T, Carle G F, Olson M V. Science, 1987 **236** :806
- 16 Dunford R, Vilageliu L, Moore G. Plant Mol Biol, 1993 **21** :1187

Construction of a YAC Contig Encompassing G200 Locus via Chromosome Walking

Huang Wen Wang Chunxin Li Yan Liu Liangshi
(Zhongshan University, School of Life Sciences, Guangzhou 510275)

Abstract A YAC contig was constructed by screening a rice genomic YAC library with G200, Y2587L, Y4073L and L688 RFLP markers as probes. 4 positive clones with the sizes ranged from 240kb to 650kb were obtained. The end fragments of YAC inserts were isolated via inverse-PCR, with whom a YAC contig of 3cM was initially established. Chromosome walking was performed with the two distal end-fragments of the YAC contig and some positive YAC clones were obtained and identified. Thus the G200 contig was extended to about 8cM.

Key words Rice G200 locus, contig, chromosome walking, YAC library