

## 用克隆池 PCR 法筛选小麦-簇毛麦易位系 6VS/6AL 基因组 TAC 文库获得抗病基因候选克隆

秦根基<sup>1</sup> 陈佩度<sup>1\*</sup> 刘耀光<sup>2</sup> 方玉达<sup>1</sup> 刘大钧<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(南京农业大学细胞遗传所,南京 210095) <sup>2</sup>(华南农业大学生命科学学院遗传工程研究室,广州 510642)

**摘 要** 用根据抗病基因保守区设计的一对简并性引物,从小麦-簇毛麦易位系 6VS/6AL cDNA 中 PCR 扩增获得一个具有抗病基因核苷酸结合位点(Nucleotide binding site, NBS)结构特点的 DNA 片段克隆 N7。从小麦-簇毛麦易位系 6VS/6AL 基因组 TAC(Transformation-competent artificial chromosome, TAC)文库的 22 块 96 孔板提取所有 2112 个克隆池(每个池含约 1000 个克隆)的质粒,再根据 N7 的核苷酸序列设计一对特异引物,用克隆池 PCR(pooled PCR)法经分级筛选从文库中获得一个阳性克隆。以 N7 为探针,通过 Southern 杂交证实了该 TAC 克隆为真正含有抗病候选基因的克隆。研究结果表明克隆池 PCR 法对克隆数目巨大的基因组文库的筛选很有效。

**关键词** 小麦-簇毛麦易位系,小麦基因组 TAC 文库,克隆池 PCR 筛选,抗病候选基因  
中图分类号 Q943 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)03-0313-05

文库构建和文库筛选是基因克隆的基本环节。用于大片段基因组文库构建的载体有酵母人工染色体(Yeast artificial chromosome, YAC)<sup>[1]</sup>、细菌人工染色体(Bacterial artificial chromosome, BAC)<sup>[2]</sup>、源于 P1 的人工染色体(P1-derived artificial chromosome, PAC)<sup>[3]</sup>、双元细菌人工染色体(Binary-BAC system)<sup>[4]</sup>、可转化人工染色体(Transformation-competent artificial chromosome, TAC)<sup>[5]</sup>。TAC 是 Liu *et al.*<sup>[5]</sup> 结合 PAC 载体和双元载体的特点构建的能够插入大片段 DNA 并能在大肠杆菌(*Escherichia coli*)和农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)中稳定存在的可转化的人工染色体。该载体与 YAC、BAC 或 PAC 所构建的文库相比,一个突出的优点是不需要在目的克隆获得后做繁琐并有可能导致目的基因丢失的亚克隆工作,不需在基因获得后重新构建转化载体,而是可以直接通过农杆菌转化植物,进行功能互补试验。利用 TAC 载体,方玉达、刘耀光等<sup>[6]</sup>成功构建了含有高抗白粉病基因 Pm21 的小麦-簇毛麦易位系 6VS/6AL 基因组 TAC 文库。该文库平均插入片段为 35kb 左右,包括 210 万个克隆,以混合克隆池的形式保存于 22 块 96 孔板中,每个克隆池包含约 1000 个

克隆。

传统的筛库方法是将克隆高密度影印到尼龙膜上进行菌落原位杂交筛选。由于小麦基因组大,约为  $1.6 \times 10^{10}$  bp。如果上述文库以单克隆形式保存,则约需 5000 多块 384 孔板(通常还需做 2 套拷贝)。如果用机械手做成  $16 \times 384$  高密度膜则需约 300 多张膜。这种工作量和所需要的资金是让任何一个实验室都难以承受的。因此在构建小麦-簇毛麦易位系 6VS/6AL 基因组文库中,采用了约 1000 个克隆放在一起的混合池保存的方法。但由于克隆是混合保存的,某一特定的克隆只占每个克隆池的 1/1000,用菌落原位杂交筛选时的杂交信号就过弱。Liu *et al.*<sup>[7]</sup> 发展了一种称为克隆池 PCR(Pooled PCR)法用于筛选混合保存的基因组文库,并利用该方法从小麦“中国春”基因组 TAC 混合文库中筛选到含有 I-型硫素(Type I thionin)基因和几个属于多基因家族的 CAB 基因克隆。本研究根据一个 NBS 序列设计了一对特异引物,用克隆池 PCR 法成功地从小麦-簇毛麦 6VS/6AL 混合文库中筛选到一个含有 NBS 的抗病基因候选 TAC 克隆,并通过 Southern 杂交证明其为真正的阳性克隆。

收稿日期 2001-11-12, 修回日期 2002-02-20。

基金项目 国家“863”高技术研究发展计划研究项目(No. Z-17-04-01), 国家转基因植物研究与产业化专项(No. J00-A-002)。

\* 通讯作者。Tel 86-25-4396026; Fax 86-25-4395344; E-mail: pdchen@njau.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

携有抗白粉病基因 Pm21 的小麦-簇毛麦易位系 6VS/6AL 由南京农业大学细胞遗传所选育保存。小麦-簇毛麦易位系 6VS/6AL 基因组 TAC 文库由方玉达、刘耀光等<sup>[6]</sup>构建。

### 1.2 NBS 序列的获得和特异引物设计

根据植物 R 基因保守区 NBS 的 P-loop 区和其下游疏水区 GLPL 设计了一对简并性引物,为: CIN001 :5'-GGNGGNAT( T/C/A )GGIAA( A/G )ACIAC-3'; CIN004 :5'-NA( G/A )NGCIA( G/A )IGGIA( G/A )ICC-3'。用这对引物以 30ng 小麦-簇毛麦易位系 6VS/6AL cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。PCR 扩增反应总体积为 25 $\mu$ L,反应混合液组成为:10mmol/L Tris-HCl( pH8.3 ) 50mmol/L KCl、2.0mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.2mmol/L dNTPs、Taq DNA 聚合酶 1u, CIN001 为 5 pmol, CIN004 为 20pmol。最后加水补至 25 $\mu$ L。反应在 PCR 仪 PE9600 上进行,首先 95 $^{\circ}$ C 预变性 2min,再进行 40 个循环(94 $^{\circ}$ C 1min、56 $^{\circ}$ C 1min、72 $^{\circ}$ C 1min 30s),最后 10min 补平。PCR 产物回收后,用 pGEMT-Easy Vector Systems( Promega )试剂盒克隆,经测序和序列分析,获得一条 NBS 序列 N7。根据 N7 的序列设计一对特异引物用于筛选小麦-簇毛麦易位系 6VS/6AL 基因组 TAC 文库,引物为:N7-P1 :5'-CTAGCAAAGCAAGTCTAT CATGC-3', N7-P2 :5'-TCCAGATGAGGATGG CATAAATC-3'。

### 1.3 文库的筛选

用碱裂解法提取小麦-簇毛麦易位系 6VS/6AL 基因组 TAC 文库 22 块 96 孔板共 2112 份混合质粒。为减少 PCR 筛选工作量,按图 2 所示吸取第 1~6 块板,第 7~12 块板,第 13~17 块板和第 18~22 块板的每孔 5 $\mu$ L 质粒溶液到 4 块 96 孔板相应的孔中,每孔加入 160 $\mu$ L 1/2 TE 稀释,分别制备成用于扩增的初级克隆池 I 号板、II 号板、III 号板、IV 号板。用 N7-P1 和 N7-P2 进行分级筛选,获得可能的阳性单克隆。PCR 扩增反应总体积为 25 $\mu$ L,反应混合液组成为:10mmol/L Tris-HCl( pH8.3 ) 50mmol/L KCl、2.0mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.2mmol/L dNTPs、Taq DNA 聚合酶 1u 模板为 1~10ng 质粒,N7-P1 和 N7-P2 均为 5 pmol。最后加水补至 25 $\mu$ L。反应在 PCR 仪 PE9600 上进行,首先 95 $^{\circ}$ C 预变性 2min,再进行 30 个循环(94 $^{\circ}$ C 30s、59 $^{\circ}$ C 30s、72 $^{\circ}$ C 1min),最后 72 $^{\circ}$ C 10min。

### 1.4 可能的阳性单克隆的 Southern 杂交鉴定

用碱裂解法大量提取可能的阳性单克隆的质粒,用 Hind III、BamH I、Sal I、Xba I、Pst I、EcoR I、EcoRV 等酶切,酶切产物在 0.7% 琼脂糖胶上电泳后,用 0.4mol/L NaOH 毛细管法转移到 Hybond N<sup>+</sup> 尼龙膜上,用宝生物工程公司 BcaBEST DNA 聚合酶标记 N7 DNA 片段作探针,在杂交袋中 65 $^{\circ}$ C 杂交 14~16 h,杂交完后,用 0.2 $\times$  SSC 0.1 $\times$  SDS 洗液 65 $^{\circ}$ C 下洗 30min,换洗膜液,再洗 30min,用保鲜膜包好杂交膜,Kodak K 磷屏上曝光 2 h,用 Molecular Image( Bio-Rad 公司)系统扫描,记录结果。

## 2 结果

### 2.1 NBS 序列的获得

用根据 NBS 的 P-loop 区和其下游疏水区 GLPL 设计的一对简并性引物,从小麦-簇毛麦易位系 6VS/6AL cDNA 中扩增获得一条具有 NBS 结构特征的序列 N7,见图 1。用 blast2.0 在 GenBank 中比较其氨基酸序列,表明该序列与已克隆的小麦抗叶锈病基因 Yr10,大麦抗白粉病基因 Mla1 和 Mla6 在长 169 个氨基酸的保守区 NBS 段有高于 60% 的相似性,推测它们可能是同一个基因家族的成员。

```

1  GGGGGATCGGGAAAGCAGCTCTAGCAAAGCAAGTCTATCATGCGATTGGAAAGCCAAATTTTCATGTGCA
1  GGGGGATCGGGAAAGCAGCTCTAGCAAAGCAAGTCTATCATGCGATTGGAAAGCCAAATTTTCATGTGCA
70  GCTTTTGTGTCGGTTTTCTCGAAATCCTGATATGAGAAAGATTCTAAGAGATATTGCTCAAGGAGTGGG
24  A F V S V S R N P D M R K I L R D I A Q G V G
139  TTCACAGACAGCCACCGGATGATGATGTGCAACAATTGATCAGTAAACTCAGGCAACATCTTAAAAAC
47  F T D S P P D D D V Q Q L I S K L R Q H L K N
208  GAAAGGTACTTTTGTGTAATTGATGATGTGTGGAGCGCGGCGATGGGAAACTATCAGCGCTGTATTA
70  E R Y E V V N I E E D D V W E S A D V W E T I R L V L
277  TTGATAATAATAACCGATGGGAGTAGAATTACTACTAACACGTAATACTGAAGTTGCATCATGTTGT
93  L N N N N H G S R R R R R R R R R R R R N T E V A S C C
346  TCTTCAGGTGGTGGTCATGTTTATAAAATGGAACCCCTTACGTTTGTGACTGCCAAAAGTTGTTTTT
116  S E Y G G H V Y K M E P L T F D D S K R L F F
415  AGAAGAACATTTGGTCTGAGGATTTATGCCATCCTCATCTGAAAAAGTCTCTAATGACATATTAAGA
139  R R T F G P E D L C H P H L E K V S N D I L R
484  AAATGTTGGGCTCCGCTTCGC
162  K C S G L L P R F A

```

图 1 N7 的核苷酸序列和推断的氨基酸序列

Fig.1 The nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of N7

The nucleotide sequence was aligned up and the deduced amino acid sequence was down. The primers were underlined. The shaded areas were the four conserved domains, P-Loop, kinase2, kinase3a and the downstream GLPL domain of NBS

### 2.2 小麦-簇毛麦易位系 6VS/6AL 基因组 TAC 文库的筛选

含有 NBS 的 TAC 克隆筛选全过程见图 2。首先用特异引物 N7-P1 和 N7-P2 筛选初级克隆池,发现 I 号板的 C7 为阳性初级克隆池。将组成该池的原先的克隆池,分别进行 PCR,发现第 4 号板的 C7 为阳性克隆池。取第 4 号板的 C7 的保存菌铺平板,收取 40~60 个克隆为一个单克隆池,提取质粒。以小

克隆池的质粒为模板,进行 PCR 扩增,发现第 11 号小克隆池为阳性。将第 11 号小克隆池的保存菌再

铺平板,以单克隆菌为模板,最终发现第 88 号单克隆为阳性,将该单克隆记为 NBS-TAC。

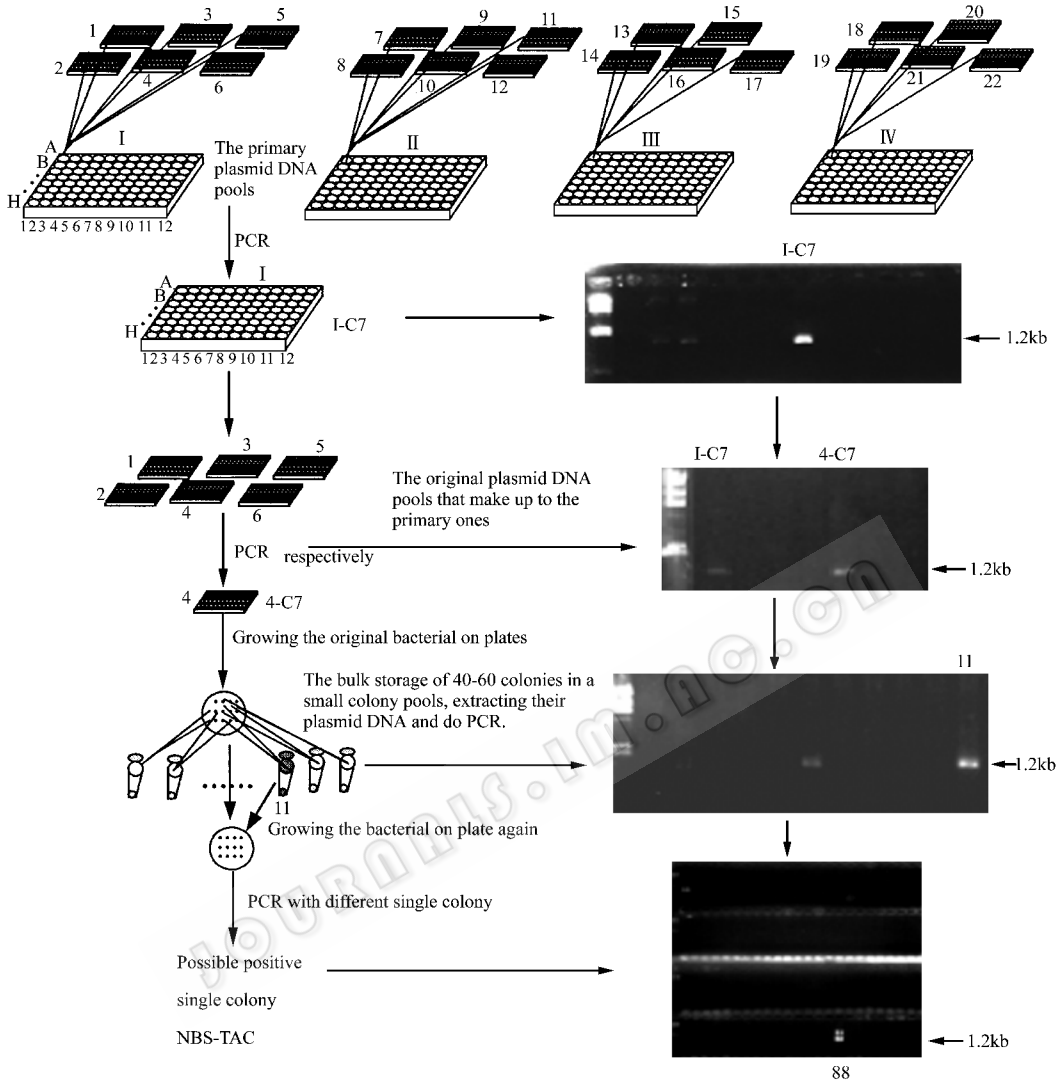


图 2 从 6VS/6AL 基因组 TAC 文库筛选出含有 NBS 的 TAC 克隆 NBS-TAC

Fig.2 The schematic depiction of the screening of the NBS-TAC containing NBS domain from the translocation line 6VS/6AL TAC library

### 2.3 阳性单克隆的 Southern 杂交鉴定

用不同的 6 碱基酶酶切 NBS-TAC 质粒。将酶切质粒 DNA 转到尼龙膜上后,用含有 NBS 结构域的

N7 作探针进行 Southern 杂交,各酶切均杂交出不同大小的带,说明该克隆为含有 N7 的真正的阳性单克隆(见图 3)。

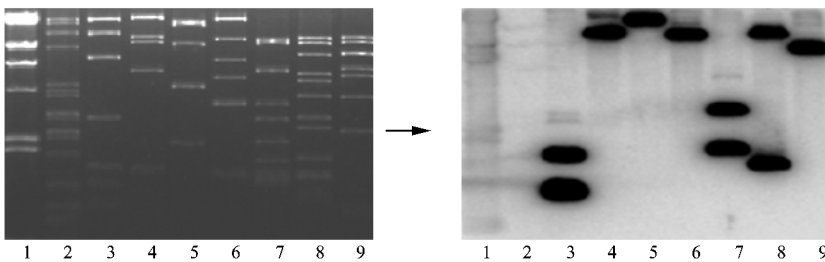


图 3 NBS-TAC 的 Southern 杂交鉴定

Fig.3 The southern hybridization patterns of NBS-TAC plasmid DNA

The left showed the patterns of NBS-TAC digested by different restriction enzymes. The right was the corresponding results hybridized with the resistance gene analog N7. lane1 was  $\lambda$ /EcoRI + HindIII Marker, lane2 was the check (a rice TAC plasmid DNA was digested by HindIII), lane3 to lane9 were the NBS-TAC plasmid DNA digested by HindIII, BamHI, SalI, XbaI, PstI, EcoRI and

### 3 讨 论

小麦基因组大,重复序列多,其基因组大小为  $1.6 \times 10^{10}$  bp,是水稻基因组的近 40 倍,因此构建小麦基因组文库特别是小片段基因组文库,一直较难。能够装载大片段 DNA 的人工染色体载体的发展,使构建小麦基因组文库不再像以前那样令人望而生畏。Liu *et al.*<sup>[7]</sup>利用克隆池混合保存法构建了平均插入片段为 46、65 和 120kb 的小麦“中国春”基因组 TAC 文库,覆盖小麦基因组 3 倍。同时小麦-簇毛麦易位系 6VS/6AL 的基因组 TAC 文库也以每个克隆池大约含 1000 个克隆的混合保存方式得以构建(方玉达、刘耀光等)<sup>[6]</sup>。虽然利用克隆池混合保存法构建了小麦基因组文库,但利用其克隆基因还有两个难题。第一,与其他作物相比,由于其重复序列含量高,使图位克隆基因必经的染色体步移(Chromosome walking)或重叠克隆群(Contigs)的构建非常困难。为了减少染色体步移,寻找与目的基因在物理位置上非常临近的标记或目的基因的一部分序列是非常必要的。根据已克隆 R 基因的保守区设计引物,通过 PCR 获得具有已克隆抗病基因保守结构域的抗病基因类似序列(Resistance Gene Analog, RGA),希望能获得某一 R 基因的一部分或某一 R 基因簇位点紧密连锁的标记,再以此为入口,筛选基因组文库,有可能经过少数几次染色体步移就能够着陆(Landing)到某一 R 基因或直接着陆某一 R 基因;第二,虽然混合保存的基因组文库在构建时比单克隆保存的文库节省了很多资金和劳力,但由于每个克隆在克隆池中所占比率很低,因此用传统的菌落原位杂交筛选文库就比较困难,Liu *et al.*<sup>[7]</sup>发展了一种利用 PCR 筛选混合保存的基因组文库的方法,并成功地从混合保存的小麦基因组 TAC 文库中筛选到目的基因。

克隆池 PCR 法筛选文库与传统的菌落原位杂交法相比,有以下优点。首先,用克隆池 PCR 法不需要用同位素,仅做 PCR-琼脂糖凝胶电泳检测即能达到目的,而菌落原位杂交需要将菌落影印到尼龙膜上,再用同位素进行标记杂交,也受到一些特殊设备如点膜设备的限制;第二,当某一个文库的所有克隆池的质粒提取出来后,也可用质粒保存文库。本研究在筛选含有 NBS 的 TAC 克隆 NBS-TAC 时,所保存的可能含有阳性克隆的克隆池的菌大部分已死

去,剩下的菌经筛选未发现可能的阳性小克隆池,如果没有提取的质粒,则 NBS-TAC 将筛选不到;第三,当某一文库的所有克隆池的质粒提取后,以后再筛选其他的基因时,只需直接做 PCR 即可,而不需再费时费力提取质粒了;第四,对于与大肠杆菌基因组 DNA 有部分同源性的 DNA 序列,用菌落原位杂交筛选时,则背景往往很深而掩盖了阳性克隆的信息,只能通过克隆池 PCR 法来筛选。

本研究根据来源于小麦的一个含有 NBS 结构域的 RGA 序列,设计特异引物,用克隆池 PCR 法成功地从混合保存的小麦-簇毛麦易位系 6VS/6AL 的基因组 TAC 文库中筛选到了一个插入片段约 40kb 的 TAC 克隆,进一步 Southern 杂交检测表明它是含有 NBS 的抗病候选基因 TAC 克隆,这为克隆有功能的 R 基因和构建某一 R 基因位点精细物理图打下了基础,本研究证明用克隆池 PCR 法筛选大数目克隆的基因组文库是切实可行的。直接通过农杆菌介导法来转化本研究获得的 TAC 克隆进行功能互补试验正在进行中。

### REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Murray A W, Szostak J W. Construction of artificial chromosomes in yeast. *Nature*, 1983, **305**: 189 ~ 193
- [ 2 ] Shizuya H, Birren B, Kim U *et al.* Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**( 18 ): 8794 ~ 8797
- [ 3 ] Sternberg N. A bacteriophage P1 cloning system for the isolation, amplification and recovery of DNA fragments as large as 100kbp. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 103 ~ 107
- [ 4 ] Hamilton C M. A binary-BAC system for plant transformation with high molecular weight DNA into plant chromosomes. *Gene*, 1997, **200**( 1 ~ 2 ): 107 ~ 116
- [ 5 ] 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. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 6535 ~ 6540
- [ 6 ] FANG Y D(方玉达), LIU Y Q(刘耀光), ZHANG Q Y(张群宇) *et al.* The construction of the transformation-competent artificial chromosome (TAC) library for the Triticum aestivum-Haynaldia villosa translocation line 6VS/6AL. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报) 2000, **16**( 4 ): 433 ~ 436
- [ 7 ] 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. *The Plant Journal*, 2000, **23**( 5 ): 687 ~ 695

## Screening for Resistance Gene Candidate from a Genomic TAC Library of *Triticum aestivum*-*Haynaldia villosa* Translocation Line 6VS/6AL by Pooled PCR

QIN Gen-Ji<sup>1</sup> CHEN Pei-Du<sup>1\*</sup> LIU Yao-Guang<sup>2</sup> FANG Yu-Da<sup>1</sup> LIU Da-Jun<sup>1</sup>

<sup>1</sup>( Cytogenetics Institute , Nanjing Agricultural University , Nanjing 210095 ,China )

<sup>2</sup>( Genetic Engineering Laboratory ,College of Life Science , South China Agricultural University , Guangzhou 510642 ,China )

**Abstract** A pair of degenerate primers were designed based on NBS ( nucleotide binding site , NBS ) domain of resistance ( R ) gene and used to perform PCR with cDNA from the translocation line 6VS/6AL of *Triticum aestivum*-*Haynaldia villosa* . A clone ( N7 ) characterized with NBS was obtained by sequencing analysis. Two specific primers were designed from the N7 sequence and used to screen a genomic TAC ( transformation-competent artificial chromosome , TAC ) library of 6VS/6AL consisting of ca.  $2 \times 10^6$  clones. The library was stored as clone pools in twenty-two 96-well plates , each well containing approximately 1000 TAC clones. TAC plasmids were prepared from all the 2112 pools. Using a pooled PCR screening procedure , a positive TAC clone having a 40 kb insert was obtained. The positive clone was confirmed by Southern hybridization with the NBS fragment as a probe. The results indicate that the pooled PCR method is effective for screening of genomic libraries having large number of clones.

**Key words** *Triticum aestivum*-*Haynaldia villosa* translocation line , wheat genomic TAC library , pooled PCR screening , resistance gene candidate

Received : 11-12-2001

This work was supported by Grant from the State 863 High Technology R&D Project of China ( No.Z-17-04-01 ) and the National Special Project for Research and Industrialization of Transgenic Plant ( No.J00-A-002 ) .

\* Corresponding author. Tel 86-25-4396026 ;Fax 86-25-4395344 ;E-mail pdchen@njau.edu.cn