

# 水稻核基因组 DNA 的 YAC 克隆和鉴定

王春新 王金发 刘文华 黄雯 刘良式

(中山大学生命科学院 广州 510275)

**摘要** 将 EcoR I 部分消化的水稻 (*Oryza sativa* L.) 细胞核高分子量 DNA 电泳分部, 回收大于 200kb 的片段, 与内切酶消化过的酵母人工染色体 (YAC) 双质粒载体 pJS97, pJS98 DNA 连接, 转化酵母 YPH252 感受态原生质球, 用 Ura<sup>-</sup>, Trp<sup>-</sup> 双选择培养基直接筛选转化子, 已获得 2 000 多个克隆。转化子 DNA 的 Southern 杂交显示插入片段在 200~820kb 范围。

**关键词** 水稻, 酵母人工染色体克隆, Mb DNA

1987 年, Burke 和 Olson 以自主复制序列 (ARS), 着丝点序列 (CEN) 和端粒序列 (TEL) 为基础, 加入可在大肠杆菌中行使功能的复制起点 (ORI)、以及在酵母细胞中的选择标记, 成功地构建了酵母人工染色体 (YAC), 并以此作为克隆运载体与高分子量外源 DNA 连接, 转化酵母细胞。Southern 杂交显示转化子插入片段可大于 100kb, 超过当时其它所有载体所能克隆的容量<sup>(1)</sup>。经过短短几年的发展, YAC 克隆片段的大小已经可以达到 1 000kb<sup>(2)</sup>, 而且在运载体上设置若干特异引物序列便于应用 PCR 方法筛选克隆, 使 YAC 克隆系统在高分子量 DNA 文库构建、染色体走步、建立覆盖整个基因组的重叠群 (Contig)<sup>(3)</sup>、复杂基因的组织结构分析<sup>(4)</sup> 等方面显示出重要的作用。YAC 文库的构建已成为以分子图谱为基础的基因克隆方案 (Map-based gene cloning) 的一种基础性工作。从国际上人类基因组计划的最近进展看, YAC 文库显然是基因组作图的一种强有力工具。虽然 Cosmid、P1、BAC 等克隆系统与之配合应是必要的策略<sup>(5)</sup>。

然而, YAC 克隆系统由于其技术难度高, 使许多研究者望而生畏。特别是植物材料, 由于有一层细胞壁, 要获得 Megabase 级的高分子量 DNA 并不容易。接着将几百 kb 大片段 DNA 和运载体连接产物的转化成功也是难度很高的。本文用 YAC 克隆水稻细胞核来源的高分子量 DNA, 所提供的思路和技术对以植物为对象的研究者可能有一些意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

1.1.1 水稻 (广亲和品种 Cps1017) 种籽由广东仲凯农业技术学院蔡业统老师提供。

1.1.2 电泳系统: CHEF-DR™ I 交变电泳系统, Pulsewave<sup>®</sup> 760 转换器及 Model 200/2.0 稳压系统均购自美国 Bio-Rad 公司。

1.1.3 菌株和运载体: YPH252 (MAT.ura3-52 lys2-801, amber, ade2-101, ochre

trp1- $\Delta$ 1, his 3- $\Delta$ 200 leu2 $\Delta$ 1) 及双质粒载体 pJS97, pJS98 均由美国 Cornell 医学研究所李洪华博士惠赠。

**1.1.4 培养基:** YPD 培养基见文献 [6]。AHC 培养基: 0.67% 含氮基础培养基 (YNB), 1% 酪蛋白酸水解物, 2% 葡萄糖 (固体培养基加 2% 琼脂)。

**1.1.5 试剂:** 多胺, 二硫苏糖醇 (DTT), 小牛血清白蛋白 (BSA), 蛋白酶 K, 蛋白酶 E, 溶壁酶 (Lyticase), 低融点琼脂糖 (LMA), 交变电泳用琼脂糖, 苯甲基磺酰氟 (PMSF),  $\beta$ -巯基乙醇 ( $\beta$ -ME) 均购自 Sigma 公司; YNB, 转化用琼脂为 Difco 公司产品; 酪蛋白酸水解物购自 MERCK 公司; 各种内切酶购自 GIBCO BRL 公司和 Bio-labs 公司; T4 DNA 连接酶为华美生物工程公司产品; 菌落杂交用硝酸纤维素膜购自 Bio-Rad 公司; Nick-translation 标记盒为 Promega 公司产品;  $\alpha$ - $^{32}$ P-dCTP 购自北京福瑞生物工程公司; 酵母抽提物, 蛋白胨为 Oxiod 公司产品。

## 1.2 方法

**1.2.1 水稻高分子量 DNA 制备:** 水稻黄化苗加液氮研磨, 按每克材料加入 20ml 抽提缓冲液 (20mmol/L Tris-HCl pH7.6, 50mmol/L EDTA pH8.0, 20mmol/L  $\beta$ -ME, 40% Glycerol, 0.1% BSA, 0.5% Triton X-100), 冰上抽提 30min, 尼龙布过滤, 滤液用 5000r/min 离心 10min 收集沉淀。粗核悬浮液铺在 25%, 45%, 60% 蔗糖不连续梯度, 4000r/min 离心 20min, 吸出 45% 与 60% 界面上的核。将处理好的核悬浮液与 2% 低融点琼脂糖混合包埋成胶块, 胶块用 ESP 溶液 (0.5mol/L EDTA pH8.0, 1% Sarkosine, 2mg/ml 蛋白酶 K), 50 $^{\circ}$ C 消化 48h, TE<sub>50</sub> (10mmol/L Tris-HCl pH7.6, 50mmol/L EDTA pH8.0) 洗涤 48h, 置于 0.5mol/L EDTA 中 4 $^{\circ}$ C 保存。

**1.2.2 水稻高分子量 DNA 部分消化和回收:** 含有高分子量 DNA 的胶块, 依次用过量 TE<sub>10</sub>P (10mmol/L Tris-HCl pH7.6, 10mmol/L EDTA, 1mmol/L PMSF), TE, 无菌水, 预消化液充分洗涤平衡, 最后每 1/4~1/6 胶块加 100 $\mu$ l 消化液, EcoR I 0.001~40u, 37 $^{\circ}$ C 消化 10h。加 0.5mol/L EDTA 终止反应, 并用 TE<sub>50</sub> (10mmol/L Tris-HCl pH7.6, 50mmol/L EDTA pH8.0) 反复洗涤两次。电泳观察决定消化的合适酶量, 大量消化时, 按比例加大酶量, 控制电泳条件, 使大于 200kb 的 DNA 片段集中在限制区, 浓缩成一条带, 根据分子量标记确定其位置, 挖胶回收。

**1.2.3 载体处理:** pJS97, pJS98 DNA 先用 EcoR I 完全消化, 再分别用 Cla I, Sal I 消化, 然后进行碱性磷酸酶 (CIP) 处理, 每一步均经过酚抽提、乙醇沉淀, 最后用无菌水溶解, 使浓度为 1 $\mu$ g/ $\mu$ l。

**1.2.4 连接转化:** EcoR I 部分消化好的回收胶块, 用过量 1 $\times$  连接缓冲液多次平衡, 65 $^{\circ}$ C 融化胶块, 冷至 37 $^{\circ}$ C 加入处理好的载体 DNA (双载体 DNA 与外源 DNA 用量比为 1:1:1), 然后加入 10 $\times$  连接缓冲液与 T4 DNA 连接酶, 37 $^{\circ}$ C 平衡 1~2h, 再降至 16 $^{\circ}$ C 过夜。

转化按 Burgers 的原生质球转化法<sup>[7]</sup>。5ml 过夜种子液转接至 50ml YPD 中, 培养 2~3h, 低速离心。分别用 20ml 无菌水, 1mol/L 山梨醇洗涤菌体, 继而用 20ml SPEM 悬浮, 加入 100 $\mu$ l Lyticase (10u/ $\mu$ l) 破壁 20min, 低速离心。分别用 20ml 1mol/L 山梨醇, STC 洗, 最后用 2ml STC 悬浮。每 100 $\mu$ l 悬浮液中加 1ng 质粒 DNA 作正对照或不超过 10 $\mu$ l 连接 DNA, 加 5 $\mu$ g 小牛胸腺 DNA, 1 $\mu$ l 100 $\times$  多胺, 室温放置 10min。加入 1ml PEG

溶液, 室温 10min, 低速离心。加 150 $\mu$ l SOS 悬浮, 30 $^{\circ}$ C 保温 40min。加 5ml 上层培养基 (46 $^{\circ}$ C 预保温), 混匀, 迅速倒入底层培养基上, 30 $^{\circ}$ C 倒置培养。2~3d 可见转化子, 5~7d 挑出转化子。

**1.2.5 转化子的鉴定和筛选:** 将转化子点种在 AHC 培养基上, 每 3 个月转接一次。长期保存时, 将转化子接到 YPD 培养基中, 30 $^{\circ}$ C 振荡过夜, 加入 15% 甘油, 液氮速冻, 置于一 70 $^{\circ}$ C。转化子鉴定采用 Southern 杂交和原位杂交。

(1) 菌落原位杂交: 转化子用灭菌牙签点种在 AHC 固体平板上, 30 $^{\circ}$ C 培养 16~24h, 将菌落复印到灭菌的硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上, 转移至新的培养基继续培养 12h。NC 膜用预裂解液 (10mol/L Tris-HAc pH8.0, 1mol/L 山梨醇, 20mmol/L EDTA, 50mmol/L DTT) 处理 5min, 裂解液 (预裂解液中加入 1%  $\beta$ -ME, 50u/ml lyticase, 不加 DTT) 37 $^{\circ}$ C 处理 8~12h, 变性液 (0.5mol/L NaOH) 处理 40min, 中和液 (0.5mol/L Tris-HCl pH7.6/2 $\times$ SSC) 中和 50min, 2 $\times$ SSC 洗涤 10min, 80 $^{\circ}$ C 2 h 烘干。

(2) Southern 杂交: 转化子染色体 DNA 提取参见文献 [10], 进行交变电泳分部, 用毛细管吸印法转移到 NC 膜上, 按 Sambrook<sup>[11]</sup> 方法进行杂交和放射自显影。

(3) 探针标记: 质粒 pUC8 DNA 和修剪过的水稻总 DNA 直接用于探针制备, 采用 Promega 公司的 Nick-translation 标记盒作同位素标记。

## 2 结果与讨论

### 2.1 高分子量 DNA 的制备与消化

构建水稻核基因组 YAC 文库关键之一是获得高分子量的 DNA, 我们发展了一个简便易行的操作程序。该程序的要点是配制一个良好的等渗缓冲系列溶液伴随细胞核纯化的不同步骤, 使核的回收率高。而且极注意对内源核酸酶的抑制, 因而控制 DNA 断裂, 使降解程度达到最低。提取过程除特别指明外, 均应在冰上进行, 以抑制内源核酸酶活性。ESP 处理时间可缩短至 8h, 即可使 DNA 释放。改用蛋白酶 E (4mg/ml) 37 $^{\circ}$ C 消化代替昂贵的蛋白酶 K, 也可取得同样效果。释放的 DNA 分子量在 200~3000kb 之间。在交变电泳图谱上可以看到大量集中在 2 200kb 区 (图版 I-A)。本程序重复性好, 产率高, 通常一次制备可以得到毫克产量的 DNA 胶块。

在进行内切酶消化时, 特别强调胶块必须充分洗涤, 洗涤溶液中的 PMSF 是为了除去蛋白酶活性。内切酶消化液中补加 DTT, Spermidine 及 BSA 可提高胶块中的 DNA 消化效率, 重复性亦好, 其终浓度可降至 1mmol/L DTT, 3 mmol/L Spermidine。我们曾进行过三种部分消化方法的比较: (1) 固定消化时间, 采用不同的酶量; (2) 固定酶量, 采用不同的消化时间; (3) 固定消化时间及酶量, 而改变消化缓冲液中  $Mg^{++}$  的浓度, 此法重复性好<sup>[12]</sup>, 但实际操作时较麻烦, 所以通常采用前两种方法, 结果见图版 I-B。经内切酶部分消化的胶块用电泳分部, 电泳后, 不将整个胶块染色, 而将分子量标记及其中一个泳道切下来染色观察, 然后在未染色胶块相应部位切下 DNA 区带。这样可避免紫外线对高分子量 DNA 的损伤, 有利于下一部的连接和转化。

### 2.2 载体处理和外源 DNA 的连接反应

我们使用的酵母人工染色体运载体是 pJS97 和 pJS98 双质粒系统 (图 1), 它们含有

酵母细胞中保持自主复制的元件 ARSH4, 行使染色体端粒功能的元件 TEL 序列, pJS97 带有着丝粒序列 CEN4 和选择标记 URA3, 以及一个抑制基因 Sup11; pJS98 不带着丝粒片段, 但带另一选择标记 TRP1, 每个质粒各有一组多酶切点的连接接头。为了减少载体 DNA 分子自身连接或相互间连接, 我们采用 pJS97 先用 EcoR I 再用 Cla I 消化, pJS98 则先用 EcoR I 再用 Sal I 消化, 然后用碱性磷酸酶处理, 脱去其 5' 端磷酸的方案。在预备实验中, 我们亦曾尝试用 EcoR I, Sal I 同时酶切 (使用合适缓冲液), 然后用 CIP 脱磷, 甚至将内切酶与 CIP 同时使用处理载体 DNA, 效果良好。但为了保险起见, 还是逐一进行酶消化和脱磷处理, 以保证绝大多数载体分子都是真正可用的。

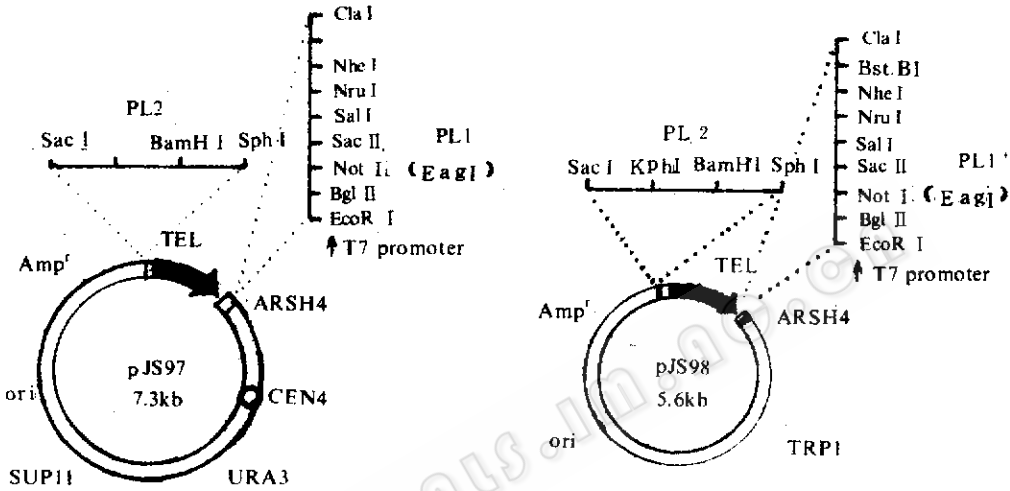


图 1 酵母人工染色体双质粒载体

Fig. 1 Yeast artificial chromosome vectors

有关高分子量 DNA 片段的连接, 文献中进行过很多探讨, 考虑的因素包括在连接反应系统中外源 DNA 片段与载体 DNA 的克分子比例, 在保持低熔点琼脂糖处于液态、半固态温度下连接酶的稳定性, 以及连接酶的用量等。一般连接反应的条件主要有以下几组: (1) 37°C 1h 之后, 25°C 连接过夜<sup>[14]</sup>; (2) 37°C 1h 之后, 16°C 连接过夜<sup>[15]</sup>; (3) 37°C 过夜<sup>[16]</sup>; (4) 用 Agarase 液化胶块, 连接反应在 4°C 进行<sup>[17]</sup>。由于 EcoR I 粘性末端的退火温度较低, 37°C 连接显然不行, 尽管有人观察到连接酶在 37°C 保温 24h 仍有活性<sup>[16]</sup>。而 Agarase 处理后, 要进行酚抽, 难以避免 DNA 分子的损伤。经过若干比较之后, 我们采取在 65°C 胶块融化状态下加入运载体 DNA, 然后自然温度平衡降至 37°C, 此过程需 2 h 以上。再加入连接缓冲液与连接酶, 平衡 1 h 以上。这种操作使反应体系自动混匀, 而无需人工混匀。

在连接反应之后, 有的研究者进行一次连接产物电泳回收, 以除去未连接的分子, 提高转化 DNA 的有效浓度, 降低假阳性转化子。考虑到所使用的 pJS97, pJS98 双质粒载体, 转化子是在 Ura<sup>-</sup>, Trp<sup>-</sup> 选择平板上一次选择, 而 pJS97, pJS98 双分子同时转化进宿主菌的机率较低, 这可从对照平板上看出, 回收连接过的分子量高达 250~500kb 的 DNA 分子要保持其完整性, 要达到适于下一步转化用的浓度存在技术上的困难, 我们暂时未予采用, 下一步转化我们将会进行电泳回收连接产物的试验。

### 2.3 酵母原生质球转化

目前作为构建 YAC 文库的酵母宿主细胞, 一般采用酵母原生质球的方法, 即用溶壁酶除去细胞的大部分细胞壁而成为原生质球, 在 PEG 和  $\text{CaCl}_2$  存在下摄取外源 DNA 分子。然而制备的原生质球的质量与酵母细胞培养物的生长状态、所用酶的浓度, 处理时间都有密切关系。实际的操作是: 将过夜培养种子液接到若干个 50ml YPD 三角瓶中, 分别继续振荡 2~3h, 即可保证其中有一个含有适宜的细胞数。酶的浓度要作实验摸索, 与酶的来源、活性、贮藏时间的长短有关, 一般采用的浓度范围以使细胞在 20min 内转变为原生质球的比率达 80%~90% 时为宜。在光学显微镜下, 很难观察和计数原生质球的情况, 实际上多数情况依靠实验者的经验。我们特别强调几点: (1) 各个离心步骤均宜低速; (2) PEG 处理后应离心去除并尽量吸除干净, 因 PEG 对再生有影响。(3) 与原生质球混合的上层琼脂温度以 46℃ 为最佳。上层培养基可减少用量到 5ml, 琼脂宜用质量好的厂家产品。一般 2~3d 后可见转化子出现, 但 3~5d 才大量出现, 菌落生长丰满。共进行过 6 次连接产物的转化实验, 得到 2200 个转子, 若先用  $\text{Ura}^-$  选择平板选择转化子, 会明显提高转化子的数量, 因为载体上 Trp 启动子活性较弱, Trp 可诱导提高其启动子活性 (图版 1-C)。有人发现<sup>[16]</sup>,  $\text{Ura}^-$  平板选择的转化子有 95% 以上同时是  $\text{Trp}^+$ 。

### 2.4 转化子的鉴定和 YAC 克隆的筛选

本实验中曾用三种方法即原位杂交、点杂交和 Southern 杂交进行转化子的鉴定, 目的在于掌握 YAC 文库的大量筛选的技术方法。菌落原位杂交目前仍然是一种主要的初筛方法, 然而如果探针多则相当耗时。Schkessingers 研究小组 5 个成员用 30 个探针对于 YAC 文库进行筛选, 花了整整一年时间, 与之相比, 用 PCR 方法 3 个人用了不到一年就进行 236 个探针初筛, 效率高得多。然而, 这需要知道 DNA 探针序列信息并合成适宜的引物<sup>[5]</sup>。为了提高 PCR 筛选程序的效率, 用复合池 (multipool) 筛选程序, 可以在很短的时间筛选 23 000 个 YAC 克隆<sup>[19]</sup>。Southern 杂交筛选本来被认为是一种比较精确的方法, 但十分耗费财力, 经过 Mendez 的改进<sup>[20]</sup>, 将 384 个克隆混成一个 pool 制备 DNA 样本, 经 PFGE 电泳, 由于可安排在一块胶板上跑三列 50 行的样品, 只需转移三张尼龙膜, 即可将 57 000 个克隆筛一遍, 而且在获得杂交信号的同时, 还可以估计阳性克隆中 YAC 插入片段的大小。

对我们所获得的 2200 个克隆 (预期还未足以覆盖一个水稻的基因组) 用前述三种方法进行鉴定或初筛, 当用 pUC8 DNA 探针 (pJS97 和 pJS98 载体均由 pUC8 衍生而来) 作原位杂交鉴定时, 宿主负对照是清楚的, 强杂交信号菌落约占 80% (图版 1-D), 初步说明重组子比例为八成。然后随机挑取菌落提取它们的 DNA 作点杂交 (图版 1-E), 大部分阳性信号彼此一致, 但亦有不一致的结果, 用转化子的完整 DNA 进行 Southern 杂交 (pUC8 作探针), 10 个转化子中有 6 个显示杂交带, 其分子量分别为 200, 380, 500, 600, 700, 740 和 820kb (图版 1-G), 说明插入片段大小是比较理想的。我们曾用水稻第 6 染色体的一些 RFLP 探针和重复 DNA 克隆片段作探针, 得到一些初筛克隆, 由此说明本实验的 YAC 克隆水稻高分子量的工作系统是成功的。顺便提及: 用于原位杂交的菌落不宜过大。一个平板可转印 2~3 张 NC 膜。转上菌落后, 在新鲜培养基上培养不要超过 12h, 否则破壁较困难。各步处理时, 尽量避免液体流到膜的正面。虽然有关文献认为变性

10min 足够, 我们发现变性 40min 以上才会有好的杂交结果。预杂交前用预洗液 (50mmol/L Tris-HCl pH8.0, 1mol/L NaCl, 1mmol/L EDTA, 0.1% SDS) 42℃洗涤 60min, 将菌体残片洗去, 减少假阳性出现。

### 参 考 文 献

- [1] Burke D T, Carle G F, Olson M V. *Science*, 1987, **326**: 806.
- [2] Chumakov I, Rigault P. *Nature Genet*, 1992, **1**: 222.
- [3] Ward E R, Jen G C. *Plant Mol Biol*, 1990, **14**: 561.
- [4] Pavan W J, Hieter P, Reeves R H. *Gene*, 1991, **106**: 125.
- [5] Cook-Deegan R M, Guyer M, Belinda J F *et al.* *Genomics*, 1990, **7**: 654.
- [6] Sherman F. *Methods in Enzymology*, 1991, **194**: 13.
- [7] Burgers P M, Percival K J. *Anal Biochem*, 1987, **163**: 391.
- [8] Browstein B H, Silverman G A, Burke D T *et al.* *Science*, 1989, **244**: 1348.
- [9] Sherman F, Fink G R, Hicks J B. *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986.
- [10] Anad R, Villasante A, Tyler-Smith C. *Nucl Acids Res*, 1989, **17**: 3425.
- [11] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T *et al.* *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [12] Birren B, Lai E. *Pulsed Field Gel Electrophoresis*. Harcourt Bruce Jovanohch Publishers, 1992.
- [13] Shero J H, Mc Cormick M A, Antonarkis S E *et al.* *Genomics*, 1991, **10**: 505.
- [14] 匡达人, 夏家辉, 杨智勇等. *高技术通讯*, 1993, **2**: 27.
- [15] Burke D T, Olson M V. *Methods in Enzymology*, 1991, **194**: 251.
- [16] Imai T, Olson M V. *Genomics*, 1990, **8**: 297.
- [17] Martin G B, Ganai M W, Tanksley S D. *Mol Gen Genet*, 1992, **233**: 25.
- [18] Mc Cormick M K, Shero J H, Khan Y W *et al.* *Technique*, 1990, **2**: 65.
- [19] Green E D, Olson M V. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **87**: 3425.
- [20] Mendz M J, Klapholz S. *Genomics*, 1991, **10**: 661.

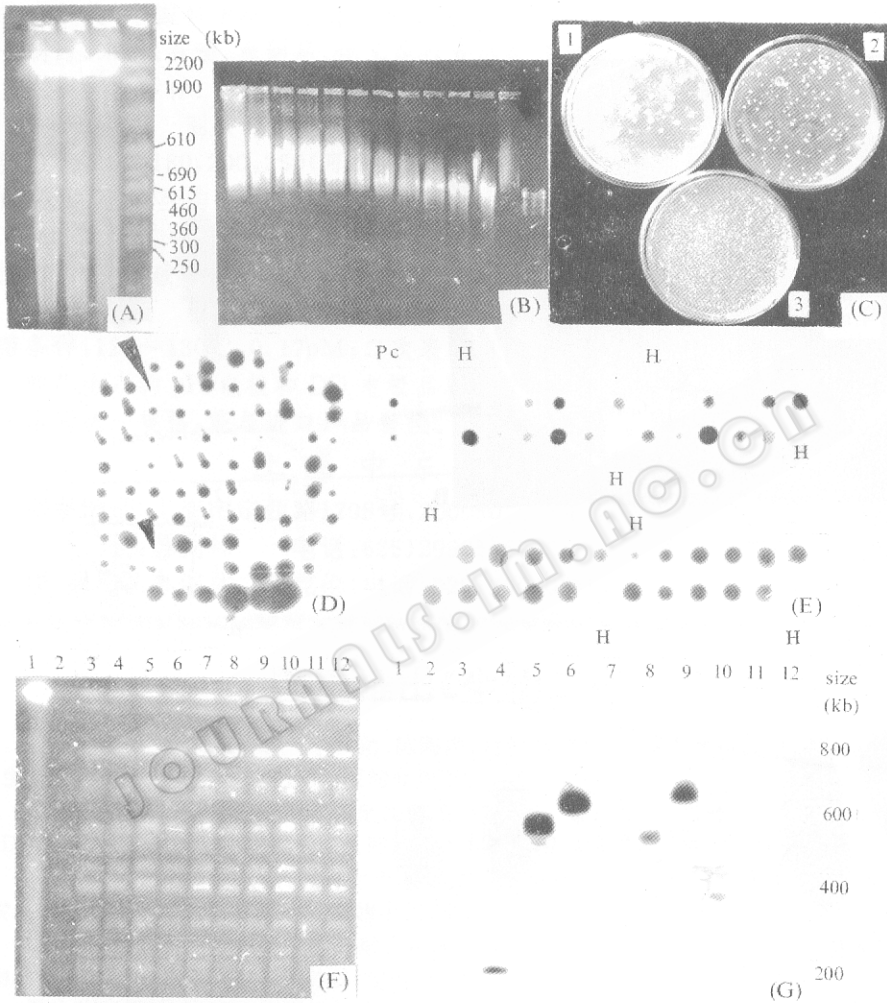
## Yeast Artificial Chromosome (YAC) Cloning of HMW DNA from Rice Nuclei

Wang Chunxin Wang Jinfan Liu Wenhua Huang Wen Liu Liangshi

(Zhongshan University, School of Life Science, Guangzhou 510275)

**Abstract** A protocol to purify nuclei from etiolated seedlings of rice has been developed in order to obtain highly qualitative megabase DNA for the YAC cloning. Agarose gel blocks embedded nuclei were digested with proteinase E and the HMW DNA up to 1000kb was released. EcoR I partially digested DNA was fractionated on 1% low-point-melting agarose gel, and recovered with size larger than 200kb. The recovered DNA was ligated to dephosphorylated vectors pJS97 and pJS98 DNA, and then transformed into yeast spheroplast. Over 2 000 transformants were obtained. Colony hybridization using pUC8 and rice total DNA as probes showed that the ratio of recombinants was about 80%. The size of inserted fragments was from 200 to 820kb indicated by Southern hybridization.

**Key words** Rice YAC cloning, pulsed field gel electrophoresis, megabase DNA



A. HMW DNA isolated from rice etiolated seedlings

1~3. HMW DNAs, 4. Yeast chromosome molecular marker

B. Partial digestion of HMW DNA with EcoR I

C. Transformants and regeneration of spheroplast

1. Ura<sup>-</sup> Trp<sup>-</sup>, 2. Ura<sup>-</sup> Trp<sup>+</sup>, 3. Ura<sup>+</sup> Trp<sup>+</sup>

D. Colony hybridization using pUC8 as a probe. Negative control was indicated by arrow

E. Dot blot of transformants probing with pUC8 (top) or rice total DNA (bottom)

Pc: Positive control, H: Host

F. EB stained electrophoresis pattern before hybridization

1. Rice DNA, 2. Host, 3~12. Randomly selected transformants

G. Southern hybridization pattern