

小麦染色体显微切割及 HMW-GS1Dx5 亚基基因克隆*

田 毅^{1**} 卢一凡² 邓继先² 刘广田¹

¹(中国农业大学植物科技学院 北京 100094)

²(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

关键词 染色体, 显微切割, HMW-GS1Dx5

分类号 Q784 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)02-0255-58

宏伟的人类基因组计划以及随之而来的动物、植物(如水稻等)基因组计划为克隆有益基因提供了新方法和思路,其中一个令人瞩目的领域是染色体显微切割。该技术起始于 80 年代早期,首次应用显微切割和微克隆的是 Scalenghe 等在果蝇多线染色体上进行的。随后在哺乳动物和人上应用,分离得到小鼠 t 复合体微克隆及小鼠 X 染色体的微克隆。近 10 年的时间该技术使得特异性基因克隆获得突破。在人类、动物上取得了许多令人瞩目的成就。Sandery 第一次将此技术引入植物,其用微细玻璃针剥离黑麦 B 组染色体,通过微克隆的操作得到一个区别于 A 组染色体的克隆。近年来显微切割和微克隆在植物上的研究日渐活跃。在燕麦、小麦上都有研究,技术也在日臻完善^[3-7]。这种方法作为一种新的获得目的基因技术,克隆具有优良性状未知基因具有重要意义。本研究以普通小麦钢 82-122(*Triticum aestivum* $2n=42$)为材料,通过染色体显微切割技术切割 1D 染色体,得到高分子量麦谷蛋白(HMW-GS)1Dx5 亚基基因片段。这一方法的建立,为我们在今后的工作获得新基因特异性探针打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

普通小麦钢 82-122(*Triticum aestivum* $2n=42$),由中国农业科学院品种资源研究所惠赠。质粒 pGEM-7Z、宿主菌 JM103 为军事医学科学院生物工程研究所细胞工程研究室提供。限制酶, T4DNA 连接酶, $4 \times$ dNTP, 蛋白酶 K, TaqDNA 聚合酶等购自中国华美生物公司和 Promega 公司。其它主要生化试剂为美国 Promega 或 Sigma 公司产品。相差显微镜为日本 Olympus BH-2。细胞显微操作仪为日本岛津公司产品。

1.2 方法

1.2.1 染色体制片及分带:材料准备、根尖收取、固定、染色和压片按常规操作。

1.2.2 染色体显微切割:将制好的玻璃针(直径 $1 \sim 2 \mu\text{m}$)安装在显微操作仪操作臂上。在另一操作臂上安装一个尖端直径为 $15 \sim 20 \mu\text{m}$ 的吸管,并与一微量注射器相连。在显微镜下选择出分散良好、便于切割的分裂相染色体。转入倒置显微镜寻找所要切割的染色体,再通过显微操作仪使微细玻璃针对准所切割的区段进行切割,将切割片段利用玻璃针的吸附力将其吸附,针折断于装有收集液的离心管,或通过微量吸管吸取切割片段,转移至小离心管中。每一染色体区段切割染色体 $30 \sim 40$ 条。

1.2.3 切割的染色体 DNA 消化:把切割的染色体放于 $20 \mu\text{L}$ 收集液(含 $5 \text{mg}/\mu\text{L}$ 蛋白酶 K)中。将管置

* 国家“九五”攻关农业项目资助(No:96-002-02-03-02)。

** 现工作单位:中国医学科学院心血管病研究所生化室,北京 100037。

收稿日期:1997-11-10, 修回日期:1999-01-11。

60℃消化 2h。加入等量的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提。离心取上清液,置-20℃备用。

1.2.4 PCR 扩增:参照已发表的小麦 HMW-GS1Dx5 基因序列^[4]设计了一对引物。引物由北京赛百盛生物工程公司合成。引物 1:5'-GGCTAAGCGGTTAGTCCTCTTTGT-3',引物 2:5'-CTGGCCGTTGCG-GAGAAGCTTG-3'。PCR 扩增反应体系:引物 1 和引物 2 各 1μL;5mmol/L dNTP 2μL;10×buffer:5μL;模板(消化好的 1D 染色体 DNA)20μL;加水补至 50 μL。94℃变性 5min。冰浴 5 min,加入 Taq 酶(3-5U)0.5μL。反应程序:94℃变性 1 min;58℃退火 3 min;72℃延伸 2 min。35 次循环后,72℃延伸 10 min。第二轮 PCR 扩增取第一轮 PCR 扩增产物 2 μL 做模板。第三轮 PCR 同上。取 10μL PCR 扩增产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,紫外灯下观察。

1.2.5 PCR 产物的克隆、质粒 DNA 的提取、限制酶消化、DNA 片段的回收和感受态细胞的制备及 DNA 的转化、探针标记、菌落原位杂交按文献[2]操作。

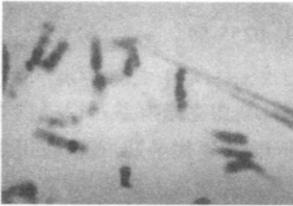


图 1 普通小麦钢 82-122 1D 染色体长臂的显微切割

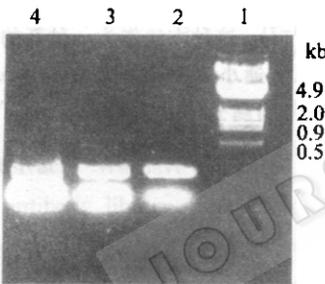


图 2 切割染色体的 PCR 扩增结果

1. λ DNA/*Hind*III + *Eco*RI Marker
2,3,4. 第三轮 PCR 扩增结果
(上样量分别为 2、5 和 8μL)

1.2.6 序列分析:利用质粒快速提取纯化试剂盒制备模板,序列测定按试剂盒说明操作。

2 结 果

2.1 1D 染色体的显微切割

与小麦标准 C-分带图谱对照,找到欲切割的 1D 染色体。将制好的微细玻璃针固定于操作臂上,向下倾斜 45°左右,使针尖轻触玻片,但并不使其折断。控制调节旋钮,使针尖对准欲切割的 1D 染色体长臂端。依靠微细调节向前轻移玻璃针,慢慢进行切割,见图 1。

凭借微细玻璃针的静电吸附作用,将切割下的染色体片段吸附于玻璃针,或用吸管将其吸附,取下玻璃针或吸管折断于装有蛋白酶 K 的小离心管中。共切割小麦 1D 染色体长臂 30~40 条,放于收集液中,处理后作模板进行 PCR 扩增。

2.2 高分子量谷蛋白 5 亚基部分基因片段的 PCR 扩增

参照发表的小麦高分子量谷蛋白 5 亚基核苷酸序列^[1],设计了引物。引物 1 位于该基因的 5' 区,含有起始密码子 ATG。引物 2 位于该基因的前半部,扩增区域为 400bp。

用染色体切割的片段做 PCR 模板进行扩增。第一轮扩增后,经电泳检查,扩增产量很低。为提高扩增产量,以第一次 PCR 产物作模板,进行第二、三轮 PCR,使产量大大提高,结果见图 2。以显微切割的 30~40 条染色体为模板,成功地获得了扩增产物。

2.3 PCR 产物的克隆

将 PCR 产物经低溶点琼脂糖凝胶电泳回收,插入 pGEM-7Z 载体 *Sma*I 位点。克隆程序如图 3。经菌落原位杂交,挑选出阳性克隆。抽提质粒 DNA 进行酶切鉴定。酶切结果表明是正确的,将该重组质粒命名为 pGHMW,酶切结果见图 4。

2.4 PCR 扩增产物的序列测定

对扩增出的 HMW-GS1Dx5 基因片段进行了序列测定。结果见图 5。

与国外文献发表结果^[1]进行比较发现只有一处突变。因此我们利用染色体显微切割的方法可以完整而正确地克隆出所需的基因。

3 讨 论

染色体显微切割是采用微细玻璃针做为切割工具。传统的玻璃针是用微量玻璃管制成的^[3]。

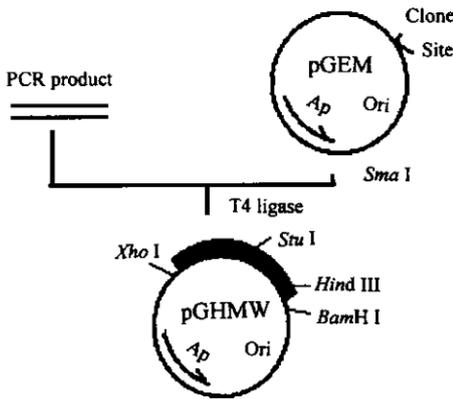


图 3 重组质粒 pGHMW 的克隆程序

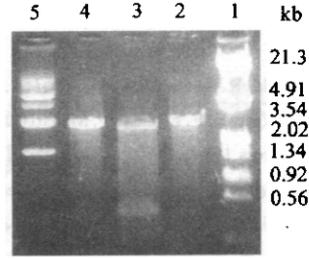


图 4 重组质粒 pGHMW 的酶切鉴定

1. λ DNA/*Hind*III + *Eco*RI Marker
2. pGHMW 的 *Stu*I 酶切结果
3. pGHMW 的 *Bam*HI + *Xho*I 酶切结果
4. pGHMW 的 *Hind*III 酶切结果
5. pGHMW 重组质粒 DNA

但我们在实际操作中发现,用强度较大空心玻璃管大的微细玻璃棒制针效果较好。用微细玻璃棒代替微细空心玻璃管,是较为理想的。

操作中 DNA 的损失是染色体显微切割和微克隆技术中的一个主要问题。传统的方法^[3]是将切割后的染色体置于油室之内,油室装有蛋白酶 K 和 SDS,又加入酚、氯仿进行抽提,片段的克隆也在油室中操作。许多学者均采用这一程序^[5-7]。这种方法操作过程中 DNA 损失比较多。我们参照 Albani 等^[4]的方法并加以改进。把吸附的染色体片段的针尖

直接折断于 0.5 mL 已装有染色体收集液的离心管中,蛋白酶 K 消化,用酚:氯仿抽提后,以此作为模板进行 PCR 扩增,避免油室操作,大大降低了其繁琐性,取得较为理想的效果。

染色体切割片段做模板进行 PCR 扩增,以进一步克隆获得特异性探针。在实际操作中,由于染色体片段数目少,基因拷贝数过低,难以使 PCR 获得成功。我们采用降低退火温度和增加反应循环数等未能提高 PCR 的产量^[8]。而通过多轮扩增,获得了较为理想的产量。

对克隆的中国小麦钢 82-122 高分子量麦谷蛋白 1Dx5 亚基因的序列分析表明,有一处与国外报道不一致。可能反映出在进化过程中品种之间的差异。我们尚不清楚这种差别是由 PCR 扩增造成的,还是在中国小麦中所特有的。

采用染色体显微切割和微克隆的方法成功地获得了小麦高分子量谷蛋白 1Dx5 亚基因片段,不仅说明这一方法的可行性,而且也证明利用这一方法获得特异性探针是未来克隆优良基因的较好途径。我们克隆的小麦高分子量谷蛋白 1Dx5 亚基探针不仅为品种鉴定以及此基因的结构和功能研究提供了基础材料,也为其表达研究奠定基础。

GGCTAAGCGG	TTAGTCCTCT	TTGTGGCGGT	AGTCGTCGCC
CTCGTGGCTC	TCACCGTCGC	TGAAGGTGAG	GCCTCTGAGC
AACTACAGTG	TGAGCGCGAG	CTCCAGGAGC	TCCAGGAGCG
CGAGCTCAAG	GCATGCCAGC	AGGTCATGGA	CCAGCAGCTC
CGAGACATTA	GCCCCGAGTG	CCACCCCGTC	GTCGTCAGCC
CGGTCGCGGG	ACAATACGAG	CAGCAAATCG	TGGTGCCGCC
CAAGGGCGGA	TCTTCTACC	CCGGCGAGAC	CACGCCACCG
CAGCAACTCC	AACAACGTAT	ATTTTGGGGA	ATACCTGCAC
TACTAAAAAG	GTACTACCCA	AGTGTA ACTT	CTCCGAGCA
GGTTTCATAC	TATCCAGGCC	AAGCTTCTCC	GCAACGGCCA

图 5 pGHMW 序列分析结果

图为所测定小麦钢 82-122 HMW-GS1Dx5 序列,

— 为国外^[1]发表序列, * 处 T 突变为 A

参 考 文 献

- [1] S. Takashi, R. Antoni, P. David *et al.* *J. Cereal. Sci.* 1994, **16**:67~70.
- [2] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Manatis. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.
- [3] F. Scalenghe, E. Tusco, T. E. Edstrom *et al.* *Chromosoma*. 1981, **82**:205~216.
- [4] D. Albani, M. J. Cote, K. C. Armstrong *et al.* *Plant J.* 1993, **4**:899~903.
- [5] A. Weith, H. Winking, B. Brackman *et al.* *EMBO J.* 1987, **6**:1295~1300.
- [6] H-J. Ludecke, G. Senger, U. Claussen *et al.* *Nature*. 1989, **238**:348~350.
- [7] H-J. Ludecke, G. Senger, U. Claussen *et al.* *Hum. Genet.* 1990, **84**:512~516.
- [8] W Rychik, W. J. Spencer, D. Rhoads. *Nucleic Acids Res.* 1990, **18**:6490~6412.

The Cloning of HMW-GS1Dx5 Gene Fragement Using Chromosome Microdissection in Wheat*

Tian Chai¹ Lu Yifan² Deng Jixian² Liu Guangtian¹

¹(Department of Plant, Chinese Agriculture University, Beijing 100094)

²(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071)

Abstract After C-banding of common wheat Gang 82 - 122 was been analyzed and 1D chromosome where HMW-GS1Dx5 located could be recognized, the 1D chromosome long arms were microdissected with Cell Manipulation instrument, and HMW-GS1Dx5 gene 5' region 400bp sequence was obtained using PCR amplification. Sequence analysis showed that this sequence was correct. Therefore, we established the method of getting plants genes by microdissection and microcloning.

Key words Chromosome, microdissected, HMW-GS1Dx5

* Supported by National 95 Agriculture Fund.