

云南药用野生稻 BIBAC 文库的构建及分析

侯思名^{1,2}, 张薇^{1,3}, 翟书华², 岑晓江², 黄兴奇¹, 程在全^{1*}

(1.云南省农业科学院 生物技术与种质资源研究所, 云南 昆明 650205; 2.昆明学院 生命科学与技术系, 云南 昆明 650214; 3.云南大学 生命科学学院, 云南 昆明 650091)

摘 要: 云南药用野生稻具有许多优良性状和有利基因, 其 CC 基因组的优良基因很难通过有性杂交转移到栽培稻(AA 基因组)上, 但可以通过二元细菌人工染色体(BIBAC)以大片段的形式转化到栽培稻中。利用 BIBAC2 载体构建了云南药用野生稻基因组 DNA 文库, 该文库包含 53 760 个克隆, 平均插入片段 76 kb, 保存在 140 块 384 孔板中, 其库容相当于药用野生稻基因组的 5.86 倍。

关 键 词: 云南药用野生稻; 二元细菌人工染色体; 基因组文库

中图分类号: S511.9 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)01-0017-05

Construction and analysis on BIBAC library of *Oryza officinalis*

HOU Si-ming^{1,2}, ZHANG Wei^{1,3}, ZHAI Shu-hua², CEN Xiao-jiang², HUANG Xing-qi¹, CHENG Zai-quan^{1*}

(1.Biotechnology & Genetic Germplasm Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China; 2.College of Life Science and Technology, Kunming University, Kunming 650214, China; 3.College of Life Science, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: *Oryza officinalis* conserved a lot of significant characters and specific genes. Although some excellent genes in *O. officinalis* were difficult to be transferred into cultivated rice by way of common breeding, they might be carried out through BIBAC (binary bacterial artificial chromosome) vector in the form of macro fragments. The genomic BIBAC library of *O. officinalis* was constructed with the vector of BIBAC2 in this research. This library consisted of 53 760 individual clones stored in one hundred forty 384-well plates with an average DNA insert size of 76 kb within the scope of 25–200 kb, equivalent to 5.86 times of genome.

Key words: *Oryza officinalis* in Yunnan; BIBAC vector; genomic library

药用野生稻(*Oryza officinalis* Watt.)是原产中国的 3 种特有的珍稀野生稻种质资源之一, 主要分布于云南、广东、广西、海南等地, 蕴含着栽培稻中所没有的重要基因和丰富的遗传多样性。野生稻种类多、遗传资源丰富、抗逆性较强, 是栽培稻遗传改良和重要基因克隆的基础^[1-2]; 而栽培稻种内遗传基础狭窄, 受现有亲本遗传基础的限制, 长期反复使用类似或相同的亲本, 使很多改良品种具有相同或相似的遗传来源, 容易造成遗传上的单一性。

药用野生稻属 CC 基因组型(染色体数 $2n=24$), 与栽培稻 AA 基因组型差异较大。通过传统的有性杂交方式转移药用野生稻的优良性状和基因, 主要存在杂交不亲和、杂交不育等生殖障碍及重组频率低、不易存活等问题。构建药用野生稻的基因组大分子文库, 开展大片段转化, 可为野生稻优良基因的发掘和利用提供新的技术手段。

构建基因组 DNA 大分子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

收稿日期: 2010-06-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(NSFC30660090); 云南省科技攻关项目(2008C004); 云南省自然科学基金项目(2009ZX08001-007B; 2008ZX08001-001)

作者简介: 侯思名(1969—), 男, 湖北黄石人, 博士, 研究方向为植物遗传育种与基因工程; *通信作者, czquan-99@163.com

隆进行基因功能互补试验,用第2代载体YAC、BAC和PAC等构建基因组文库进行目的基因的筛选,在获得候选克隆后,要进行亚克隆,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缺陷^[3-5]。第3代新型载体二元细菌人工染色体(BIBAC)和TAC(transformation-competent artificial chromosome),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直接导入植物基因组进行功能互补试验,效率比较高。

云南药用野生稻起源于云南,植株具有高度的可塑性,抗病能力强,稻米品质优良。笔者以云南药用野生稻为材料,构建了云南药用野生稻基因组BIBAC文库,使文库中的药用野生稻部分基因组及一些性状(包括一些抗病基因)直接进入水稻获得一批转基因植株,用以分析和分离药用野生稻优良性状和基因,以期拓宽栽培稻的遗传基础服务。

1 材料与方法

1.1 材料

药用野生稻为孟定类型,来源于云南耿马孟定遮旬亚热带雨林区,种植于云南省农业生物技术重点实验室温室。

CIAP碱性磷酸酶、T₄DNA ligase为Fermentas产品;NotI购自宝生物公司;其他限制性内切酶购自Fermentas公司。分子量标准Lambda Ladder PEG Marker(N0340S)购自新西兰BioLabas公司。农杆菌C0R308、大肠杆菌DH10B为云南省农业科学院生物所保存。克隆载体BIBAC2由美国Cornell大学赠送。

1.2 方法

取幼穗期幼嫩叶片提取药用野生稻基因组DNA。

1.2.1 药用野生稻目标大片段的获得

参照文献[6]的方法,有改动。

1.2.2 基因组DNA琼脂糖块的制备

参照文献[6]的方法,有改动。

1.2.3 琼脂糖块最佳部分酶切条件的摸索

主要考虑限制性内切酶的用量和酶切时间。分别用不同的酶浓度和不同的酶切时间进行酶切预试验。

取上述琼脂糖块6个,每个琼脂糖块被切成均等的8小片,放入酶切平衡液中平衡后,转到1.5 mL离心管中,每管放入16小片,加入150 μ L的酶切消化液消化。

按照1.0、2.0、5.0、12.0、15.0、30.0 u的酶浓度单位加限制性内切酶BamHI。混匀后冰上放置2 h,37 $^{\circ}$ C,分别酶切15、20、25、30、60 min。反应完毕后立即加入1/10体积的0.5 mol/L的EDTA(pH 8.0)终止反应。

用脉冲电泳分析酶切效果,选择部分酶切后DNA片段大小集中在60~200 kb时的酶切浓度为最佳条件。

1.2.4 大片段DNA的部分酶切和目标片段的回收

按照摸索的条件,用限制性内切酶大量酶切包埋于琼脂糖块中的基因组DNA。脉冲电泳回收透析袋中的DNA。

1.2.5 BIBAC2载体质粒的大量提取与纯化

BIBAC2载体质粒按碱裂解法提取。先用CsCl-EtBr梯度平衡离心法纯化闭环DNA质粒,再用PEG沉淀法进行第2次纯化。BamHI完全酶切,酶切后用CIAP碱性磷酸酶去除磷酸。定量后等份分装,贮存于-20 $^{\circ}$ C备用。

1.2.6 连接

取回收的大片段DNA与BIBAC2载体进行连接,载体与大片段在60 $^{\circ}$ C下温浴10 min,室温冷却15 min后,再加入T₄DNA ligase。连接体系10 μ L。连接产物脱盐、浓缩。

1.2.7 电激转化和阳性菌落的保存

用大肠杆菌DH10B感受态细胞电激转化,涂布于含50 mg/mL的卡那霉素和5%蔗糖的LB平板中,37 $^{\circ}$ C,12~18 h。挑取阳性克隆于384孔板中,-80 $^{\circ}$ C保存。

1.2.8 BIBAC文库的分析鉴定

1) 鉴定插入片段大小。从平板中随机挑取50

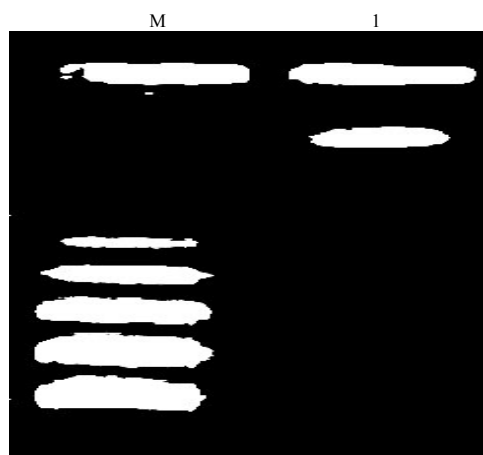
个白色克隆,分别接种到 1 mL 含 50 mg/mL 卡那霉素和 5%蔗糖的 LB 培养基中,37 °C 培养过夜,用碱裂解法提取质粒。提取的质粒用 *NotI* 进行酶切,37 °C 下,2~4 h,或过夜。65 °C 水浴 10 min 分离黏性末端。酶切片段用脉冲电泳分离,EB 染色后,紫外灯下检测插入的 DNA 片段的大小。

2) 检测 BIBAC 克隆的稳定性。随机挑选出 2 个阳性克隆,分别接种到含 50 mg/mL 卡那霉素和 5%蔗糖的 LB 培养基中,37 °C 连续继代培养 5 d,用碱裂解法分别提取第 0 代和第 100 代 BIBAC 克隆的质粒 DNA。把第 0 代和第 100 代质粒电转到农杆菌 COR308 中,28 °C 连续继代培养 10 d,再用碱裂解法分别提取第 0 代和第 100 代 BIBAC2 克隆的质粒 DNA。所有第 0 代和第 100 代的质粒都用 *BamHI* 和 *HindIII* 进行酶切,利用脉冲电泳检测 BIBAC 克隆中外源 DNA 在大肠杆菌和农杆菌继代培养中的稳定性。

2 结果与分析

2.1 药用野生稻基因组 DNA 琼脂糖块的检测

脉冲电泳检测提取的基因组 DNA。从图 1 的结果看,所提取的基因组 DNA 滞后于分子量标准中最高条带 291.0 kb,表明 DNA 的相对分子质量很大。出现一整齐条带,且无降解现象,表明 DNA 的质量相对较好,能满足后续试验的要求。



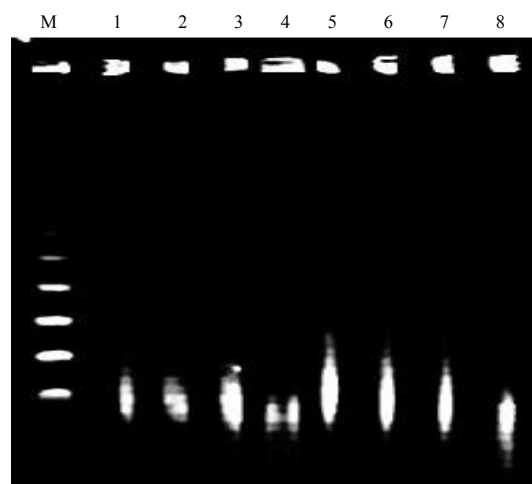
M Lambda Ladder PEG Marker(N0340S); 1 药用野生稻。

图 1 药用野生稻基因组 DNA 的检测图谱

Fig.1 Patterns of genome DNA of *Oryza officinalis*

2.2 大片段 DNA 的部分酶切检测

药用野生稻基因组 DNA 用 *BamHI* 在不同浓度和不同时间下进行酶切,随着酶浓度的增大和酶切时间的延长,酶切后得到的片段越小。图 2 显示的是不同酶切时间和酶切浓度下的酶切电泳图谱。其中 1~4 和 5~8 各为一组,酶切时间分别为 30 和 25 min,泳道 1 和 5 的酶切浓度为 1.0 U, 2 和 6 的酶切浓度为 2.0 U, 3 和 6 的酶切浓度为 5.0 U, 4 和 8 的酶切浓度为 12.0 U。从图中可看出,25 min 1.0 U 时的酶切结果与预期的片段相近。



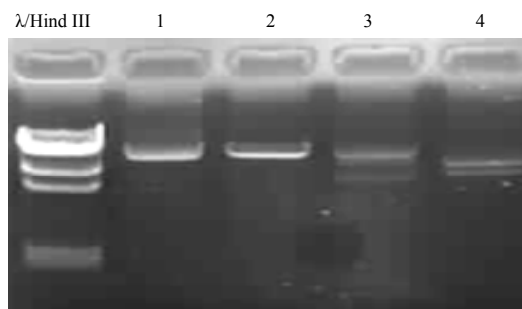
M 为 Lambda Ladder PEG Marker(N0340S); 1~8 对应不同的酶切浓度和时间。

图 2 大片段 DNA 部分酶切图谱

Fig.2 Patterns of partial digestion genome DNA

2.3 BIBAC 质粒酶切检测验证

质粒经过提取与纯化后,分别用 *BamHI*、*SalI*、*EcoRI* 酶切检测 BIBAC 载体的完整性。图 3 结果表明,载体结构完整,经过处理的载体可以用于后续的文库构建。



M 为 λ Hind III 分子量标准; 1 未酶切的 BIBAC 质粒; 2~4 *BamHI*、*SalI*、*EcoRI* 酶切后的带型。

图 3 BIBAC 载体质粒酶切验证

Fig.3 Identification of BIBAC vector

2.4 BIBAC 克隆中插入片段大小的鉴定

从 LB 平板中随机挑取 50 个菌落,碱裂解法提取质粒后进行酶切鉴定,脉冲电泳估算插入片段的大小和检测空载率。图 4 是药用野生稻 BIBAC 文库插入片段的分布情况,从图中可以看出,酶切片段大小以 50~100 bp 居多,在 20~50 bp 也集中了一定数量的酶切片段,与预期的用于构建文库的酶切片段大小接近。

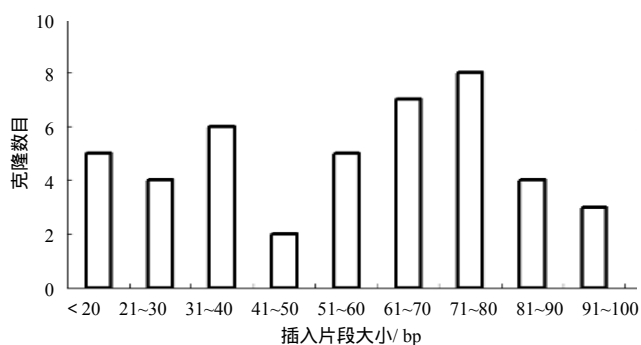
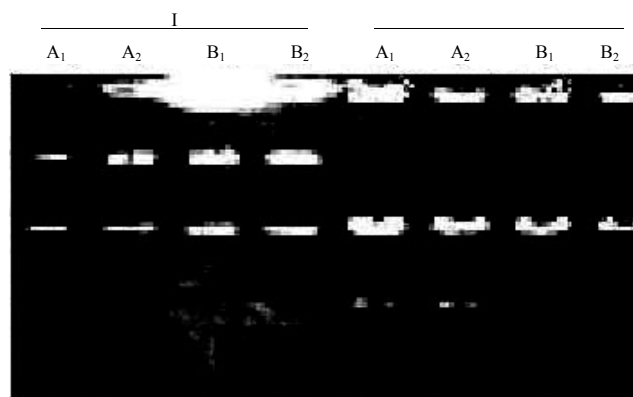


图 4 BIBAC 文库插入片段的分布

Fig.4 Size distribution of insert fragments in BIBAC library

2.5 BIBAC 克隆的稳定性检测

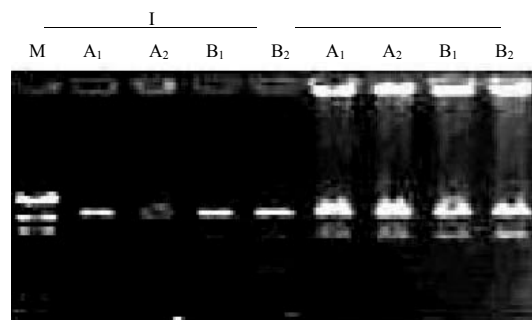
比较 2 个随机克隆在大肠杆菌和农杆菌中的第 0 代和第 100 代的质粒的酶切图谱,结果显示,各代中没有发现任何变化(图 5,图 6),表明药用野生稻基因组 DNA 可以在 BIBAC 克隆中稳定存在。



M 为 λ Hind III 分子量标准; I、II 为不同的克隆; A₁、A₂ 分别代表大肠杆菌中的 0 代和 100 代; B₁、B₂ 分别代表农杆菌中的 0 代和 100 代。

图 5 BIBAC 克隆的 BamHI 酶切检测

Fig.5 Stability detection of BIBAC clones digested with BamHI



M 为 λ Hind III 分子量标准; I、II 为不同的克隆; A₁、A₂ 分别代表大肠杆菌中的 0 代和 100 代; B₁、B₂ 分别代表农杆菌中的 0 代和 100 代。

图 6 BIBAC 克隆的 Hind III 酶切检测

Fig.6 Stability detection of BIBAC clones digested with Hind III

3 讨论

本研究所构建的云南药用野生稻 BIBAC 文库,总克隆数为 53 760 个,保存在 140 块 384 孔板中,至少覆盖了 5.86 倍药用野生稻基因组。

载体制备直接影响到文库的构建,只有高质量的载体才可能有高效率的连接和高质量的文库^[7]。大量粗提的载体含有部分的细菌基因组 DNA 和线性化的质粒 DNA,通常采用 CsCl-EtBr 梯度平衡超离心法纯化,可以得到高纯度的超螺旋闭环质粒 DNA,最终获得较高的连接效率和较低的空载率^[8-13]。另外,在载体酶切后进行脱磷处理,可减少或避免空载体出现。本试验过程中大量粗提的载体质粒单独使用 CsCl-EtBr 梯度平衡离心法纯化后,总有 1 段较小片段的 DNA 混杂其中,经过连接后转化效率不高,但在使用 CsCl-EtBr 梯度平衡离心法纯化,辅助以 PEG 沉淀法纯化载体质粒后,小片段杂质部分就不复存在了。说明以上两种方法联合使用比单一用 CsCl-EtBr 梯度平衡离心法纯化更能得到较好的质粒载体,而且载体的连接效率高,每微升载体连接后可获得 3 000~4 000 左右的克隆。

载体的酶切程度和去磷酸化处理的把握也很重要,载体的酶切要彻底但不能过度,酶切不彻底或过度都不能获得较高的连接效率。另外,在对 DNA 的酶切过程中,笔者使用了较低浓度的限制性内切酶但用了稍长的时间酶切,实际效果好于较高的酶浓度以较短时间的酶切。本试验中,获得基因组 DNA 后没有进行脱盐,但在酶切成大片段后进

行连接前脱盐, 同样得到了较好的连接效果。

参考文献:

- [1] Hamilton C M, Frar Y A, XU Y, et al. Construction of tomato genomic DNA libraries in a binary BAC (BIBAC) vector[J]. Plant J, 1999, 18: 232-229.
- [2] 秦学毅, 朱汝财, 唐健淮, 等. 药用野生稻对褐飞虱抗性基因的遗传分析及利用研究[J]. 遗传资源学报, 2007, 8(1): 41-45.
- [3] Liu Y G, Whittier R F. Rapid preparation of megabase plant DNA from nuclei in agarose plugs and microbeads [J]. Nucleic Acids Res, 1994, 22(11): 2168-2169.
- [4] Osoeqawa K, Woon PY, Zhao B, et al. An improved approach for construction of bacterial artificial chromosome libraries[J]. Genomics, 1998, 52(1): 1-8.
- [5] 何瑞锋, 丁毅. 交变脉冲电场凝胶电泳与植物大分子 DNA 的制备[J]. 植物学通报, 1999(1): 87-89.
- [6] Carol M Hamilton. A binary-BAC system for plant transformation with high molecular weight DNA[J]. Gene, 1997, 200: 107-116.
- [7] 方玉达, 刘耀光, 吴豪, 等. 小麦 - 簇毛麦 6VS/6AL 易位系可转化人工染色体(TAC)文库的构建[J]. 生物工程学报, 2000, 16(4): 433-436.
- [8] Chang Y-L, Henriquez X, Preuss D, et al. A plant-transformation-competent BIBAC library from the *Arabidopsis thaliana* Landsberg ecotype for functional and comparative genomics[J]. Theor Appl Genet, 2003, 106: 269-276.
- [9] Meksem K, Zobrist K, Ruben E, et al. Two large-insert soybean genomic libraries constructed in a binary vector: Applications in chromosome walking and genome wide physical mapping[J]. Theor Appl Genet, 2000, 101: 747-755.
- [10] Xu Y-H, Zhu Y-Y, Zhou H-C, et al. Identification of a 98 kb DNA segment containing the rice *Eui* gene controlling uppermost internode elongation, and construction of a TAC transgene sublibrary[J]. Mol Gen Genomics, 2004, 272: 149-155.
- [11] He Ruifeng, Wang Yuanyuan, Shi Zhenying, et al. Construction of a genomic library of wild rice and *Agrobacterium*-mediated transformation of large insert DNA linked to BPH resistance locus[J]. Gene, 2003, 321: 121-132.
- [12] 徐粤宇, 周玉雷, 宋琳琳, 等. 多枝赖草基因组可转化人工染色体(TAC)文库的构建和鉴定[J]. 中国科学: C 辑, 2008, 38(4): 328-336.
- [13] Steven R Larson, Chantel Scheuring, Parminder Kaur, et al. BAC library development for allotetraploid *Leymus* (Triticeae) wildryes enable comparative genetic analysis of lax-barrenstalk1 orthogene sequences and growth habit QTLs[J]. Plant Science, 2009, 177: 427-438.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 易来宾