

关中奶山羊 BAC 文库构建条件研究^{*}

贾玉艳^{1,2}, 陈宏^{2,3}, 邓继先¹

(1 军事医学科学院 生物工程研究所, 北京 100071; 2 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

3 徐州师范大学 生物技术研究, 江苏 徐州 221116)

[摘 要] BAC (bacterial artificial chromosome, 细菌人工染色体) 是一种新发展起来的构建高等生物基因组文库的重要方法。由于关中奶山羊产奶性能好, 成为制备乳腺生物反应器的理想动物之一, 故对关中奶山羊 BAC 文库的构建条件进行了研究。用 *Bam* H I 部分酶切关中奶山羊的基因组, 用 CHEF (箱位匀强电场) 凝胶电泳分离大片段 DNA, 以电透析法回收 DNA 后, 与酶切脱磷的 pBelBAC11 载体连接, 然后电激转化感受态细胞 DH10 β 得到了数千个阳性克隆, 插入片段平均为 30~40 kb。在此过程中摸索了 BAC 载体制备、高分子量 DNA 制备、酶切、连接和电激转化等一系列环节对高效转化产生大片段 DNA 克隆的影响。

[关键词] 细菌人工染色体 (BAC); 基因组文库; 奶山羊

[中图分类号] S827.9⁺4; Q785

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)06-0018-05

构建大片段 DNA 基因组文库对于基因克隆、序列和功能分析、基因组物理图谱绘制、制备乳腺生物反应器和转基因动物研究具有重要作用。细菌人工染色体 (bacterial artificial chromosome, BAC) 是一种新发展起来的构建高等生物大片段 DNA 基因组文库的重要方法^[1~4]。BAC 优于 YAC (酵母人工染色体) 的一个主要优点, 就是 BAC 克隆的嵌合率低。BAC 克隆的插入片段可达 300 kb, 而且 BAC DNA 易于回收, 可用常规碱裂解法提取重组质粒。尽管从携带单拷贝质粒的细菌提取的 BAC DNA 量较低, 但也足以进行限制性酶切、PCR 和 FISH (荧光原位杂交) 分析等。所以建立在大肠杆菌 F 因子基础上的高容量克隆体系 BAC 在许多方面逐渐获得了广泛应用。

关中奶山羊产奶性能好, 是制备乳腺生物反应器的理想动物之一, 所以本试验选用关中奶山羊为研究对象, 摸索其 BAC 文库构建各环节中的一系列影响因素, 以期对整个文库的成功构建奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和外源片段

大肠杆菌 DH10 β (用于培养 BACs 的重组缺陷

菌株) 和质粒 pBelBAC11 由中国军事医学科学院生物工程研究所提供, 外源 DNA 片段为陕西杨凌关中奶山羊的肝脏基因组 DNA。

1.2 BAC 载体的制备

将含有质粒 pBelBAC11 (7.4 kb) 的菌液涂布于含 12.5 μ g/mL 的氯霉素 (CM) LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。单个菌落用牙签接种到 LB 培养液中, 200 r/min, 37 $^{\circ}$ C 震荡过夜, 再用试剂盒 (QIAGEN) 提取质粒。将质粒 pBelBAC11 用 *Bam* H I (TAKARA) 30 $^{\circ}$ C 酶切 5 h, 然后将 CIA P (牛小肠碱性磷酸酶, Promega) 直接加入上述酶切体系中, 37 $^{\circ}$ C 脱磷 30 min, 最后用 PCR 纯化试剂盒 (QIAGEN) 回收酶切脱磷的载体。

1.3 高分子量 DNA 的制备

在干冰存在的条件下, 将山羊的肝脏组织碾成粉末, 悬浮在 PBS 缓冲液中, 振荡混匀, 用 2 层纱布过滤。1000 g 室温离心 5 min, 弃上清液, 将沉淀重新悬浮在 PBS 中。将细胞悬液在 45 $^{\circ}$ C 预热 5 min, 与等体积、等温度的用 PBS 溶解的 1% 低熔点琼脂糖混合。将混合物分装在制备琼脂糖栓的模具里, 冰上放置 15 min, 然后将凝胶栓转移到裂解缓冲液

^{*} [收稿日期] 2003-11-10

[基金项目] 国家 863 重大专项 (2002AA 206621)

[作者简介] 贾玉艳 (1980-), 女, 安徽亳州人, 在读硕士, 主要从事生物技术与动物育种研究。

[通讯作者] 邓继先 (1956-), 男, 湖北荆州市人, 研究员, 博士生导师, 主要从事转基因动物和细胞生物学研究。E-mail: dengjx@lycos.com

(0.5 mol/L EDTA, pH 9.0~9.3, 1% 十二烷基肌氨酸钠, 1 mg/mL 蛋白酶K) 中, 50℃ 温育 48 h, 隔天换液 1 次^[5]。再用 pH 9.0~9.3 的 0.5 mol/L EDTA 于 50℃ 温育 1 h, 然后用 pH 8.0 的 0.05 mol/L EDTA 冰育凝胶柱 1 h, 最后在 4℃ 下保存于 pH 8.0 的 0.05 mol/L EDTA 中。

1.4 高分子量DNA的纯化

琼脂糖凝胶柱在酶切之前, 需进一步纯化 DNA, 灭活蛋白酶K。用含 1 mmol/L PMSF (苯甲基磺酰氟) 的 TE (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 洗琼脂糖柱 3 次, 再用 TE 洗 3 次, 将琼脂糖柱保存在 4℃ 的 TE 中。

1.5 部分酶切条件的优化与DNA大片段的回收

在 200 μL 的 *Bam*HI 反应缓冲液中, 将 1/3 的凝胶柱 (约 30 μL) 进行部分酶切, 分别加入 4.5, 9.0, 18.0, 36.0 U 的 *Bam*HI (TA KARA), 冰育 1 h, 使酶能充分扩散到凝胶柱中, 然后 30℃ 酶切 6 min, 最后向反应体系中加入 20 μL pH 8.0 的 0.5 mol/L EDTA 终止酶切反应。对酶切产物进行 CHEF 凝胶电泳, 电泳条件为 1% 琼脂糖凝胶, 0.5 × TBE (45 mmol/L Tris, 45 mmol/L 硼酸, 5 mmol/L EDTA), 180 V, 12 s, 24 h, 其中前 14 h 为 50 s 脉冲, 后 10 h 为 90 s 脉冲。电泳结果见图 1。

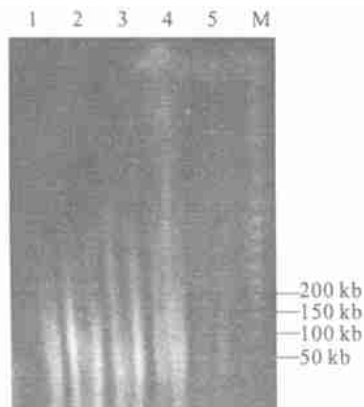


图1 部分酶切包埋在琼脂糖柱中的高分子量DNA

M. λ -DNA 串联体Marker; 1~4 用 *Bam*HI 部分酶切的基因组DNA (1.36 u; 2.18 u; 3.9 u; 4.45 u); 5 基因组DNA

Fig 1 Partially digested high molecular weight DNA in agarose plugs

M. Lambda concatemer Marker; 1-4 Genomic DNA partially digested with *Bam*HI (1.36 u; 2.18 u; 3.9 u; 4.45 u); 5 Genomic DNA

图1表明, 4.5 U *Bam*HI, 30℃ 酶切 6 min 的效果最为理想, 以此进行大规模酶切反应和电泳, 然

后从凝胶中切下 50~100 kb 的DNA, 用电透析法回收DNA。

1.6 回收DNA浓度的确定

将回收的DNA与已知浓度的 λ DNA (华美公司) 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 经EB染色, 根据亮度估计回收的DNA浓度。具体做法是将浓度为 15 ng/μL λ DNA 作为标准加样 1 μL, 回收的DNA 各加样 10 μL, 电泳后估计样品 3 和 4 的浓度约为 1.5 ng/μL, 样品 2 由于DNA浓度很小, 看不到条带纹 (图2)。

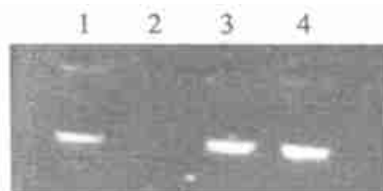


图2 回收大片断DNA的电泳图谱

1. λ DNA; 2~4 回收的山羊DNA s

Fig 2 Electrophoresis patterns of extracted big fragment DNA s

1. λ DNA; 2-4 Extracted goat DNA s

1.7 连接与转化

将回收的DNA与酶切脱磷的线性 pBe-lbBAC11 按 1:5~1:10 的物质的量之比混合, 16℃ 连接过夜。然后将连接混合物在 65℃ 加热 10 min 灭活 T_4 DNA 连接酶。

将连接混合物转移到 0.025 μm 的微孔滤膜 (Millipore) 上, 用 0.5 × TE (将 TE 溶液稀释 1 倍) 冰上透析 2 h, 除去 T_4 DNA 连接酶和缓冲液中的离子。再用 0.5 × TE + 30% PEG8000 (聚乙二醇) 冰上透析 30 min^[6], 浓缩连接混合物中的DNA。取 2 μL 透析后的连接物转化 20 μL 的电激感受态大肠杆菌 DH10 β 使用 D-RAD 电击仪和 0.1 cm 的电激杯, 电激转化条件为 13 kV/cm, 100 Ω , 25 μ F。将电穿孔后的细胞重悬浮在 1 mL 的 SOC 培养基 (20 g/L 胰化蛋白胨, 5 g/L 酵母抽提物, 0.5 g/L NaCl, 2.5 mmol/L KCl, 10 mmol/L MgCl₂, 20 mmol/L 葡萄糖, 10 mmol/L MgSO₄, pH 7.0) 中, 37℃, 225 r/min 震荡 1 h 后, 涂布在含有 12.5 μg/mL 的氯霉素 LB 平板上。37℃ 温育 18~24 h, 通过蓝白斑筛选, 鉴别可能的重组克隆^[7]。

用牙签挑取白色菌落, 接种到 5 mL 含 12.5 μg/mL 氯霉素的 LB 液体培养液中, 37℃ 震荡过夜。用试剂盒 (VITAGEN) 提取质粒 DNA 后,

N ot I 37 酶切 5 h, 然后通过 CHEF 凝胶电泳判断重组克隆的插入片段大小^[8]。

2 结 果

随机挑取 12 个白斑进行重组子的鉴定。在 180

V, 15 条件下, 先 5 s 脉冲电泳 5 h, 再 15 s 脉冲电泳 10 h, 结果如图 3 所示。由图 3 可知, 插入片段的平均大小在 30 kb 左右, 表明转化产生的重组效率很高, 阳性率几乎达 100%。

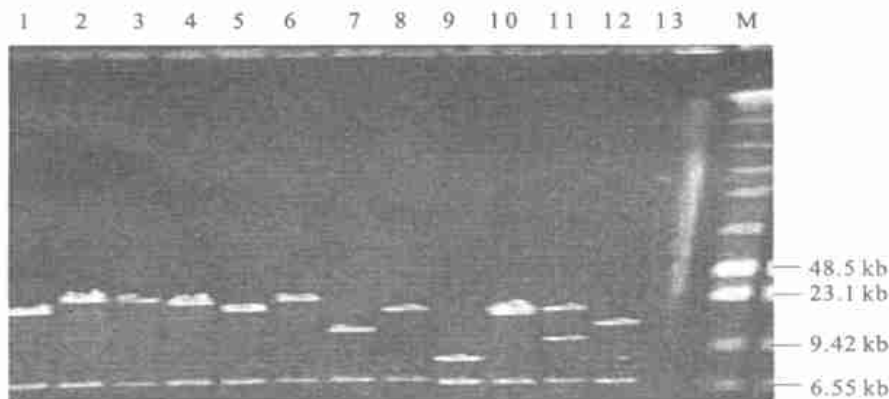


图 3 通过 CHEF 分析的山羊 BAC 克隆的 *N ot I* 酶切结果

M. 低分子量脉冲电泳 Marker (NEW ENGLAND Biolabs); 1~12 随机挑选的来自一次尺度选择的重组 BAC 克隆的 *N ot I* 酶切产物; 13 基因 DNA; 6.55 kb 处的带是载体 DNA

Fig 3 Results of goat BAC clones digested with *N ot I* by CHEF electrophoresis

M. Low range PFGM Marker (NEW ENGLAND Biolabs); 1-12 Randomly picked recombinant BAC clones digested with *N ot I* derived from one size selected; 13 Genomic DNA; Vector was located 6.55 kb

3 讨 论

在乳腺生物反应器制备中, 常常将携带目的基因的质粒载体与乳蛋白的一些调控元件人为拼凑在一起, 这样可能会导致一些调控元件未被发现^[9]。为了保持表达调控序列的天然状态, 减少人为的组装, 因而有必要利用整个区域的调控序列来表达外源基因^[9]。要克隆整个区域, 就需要大容量的载体, BAC 系统正好符合这个要求。所以山羊基因组 BAC 文库的建立, 对于人们筛选并获得含有完整天然调控序列的乳蛋白基因的克隆十分重要。本研究通过对关奶山羊 BAC 文库的构建条件的初步研究, 摸索出了一系列影响高效转化的因素。

3.1 BAC 载体制备

BAC 载体的制备是构建文库的一个关键, 应设计一系列试验以确定载体完全消化所需的最小酶量及最短酶作用时间。酶用量过大可能会导致非特异性酶切, 结果产生很高比例的假阳性, 使整个文库的空载率过高^[10]。对酶切后的载体脱磷也很必要, 脱磷不足载体易自连, 空载率升高; 反之, 会损伤载体, 使之与外源 DNA 的连接能力下降, 结果导致白斑比例很高, 空载率也相应提高。载体脱磷之后应立即使用, 以减少载体的自身降解, 提高连接效率。

3.2 高分子量 DNA 的制备

高分子量 DNA 的制备是构建文库的一个难点。用碾磨处理动物组织可减少了对基因组 DNA 的损害。为防止细胞核的破裂, 组织不能碾磨过细, 细胞的悬浮要动作轻柔。包埋在琼脂糖凝胶栓里的细胞数目大约为 $(5 \sim 7) \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$, 包埋的细胞浓度会直接影响 DNA 的消化和连接。细胞浓度太大, 导致 DNA 很难被酶切; 反之, 会使连接效率降低。包埋细胞的琼脂糖浓度也很重要, 琼脂糖浓度太高, 会影响酶切效果, 甚至无法酶切; 反之, 凝胶栓很难成型, 不易操作。一般把细胞悬液与 1% 的琼脂糖凝胶等体积混合, 酶切的效果很好。为了使琼脂糖酶能充分扩散到凝胶栓内, 一方面需要把酶和凝胶栓在冰上共同孵育 1 h, 另一方面需增加酶和凝胶栓接触的表面积。本试验将一块凝胶栓分成 3 份, 各取 1/3 进行部分酶切条件的优化, 发现明显比整块凝胶栓酶切效果好, 而且节约了每次做试验的样品, 使样品能最大限度用于 DNA 的回收。

3.3 大片段 DNA 的回收

大片段 DNA 一般采用琼脂糖酶消化法或电透析法回收。Strong 等^[11]报道, 对于高分子量 DNA 的回收, 采用电透析法^[12]得到的 DNA 比用 β -琼脂糖酶 I 处理得到的更完整, 尤其当 DNA 片段非常大时, 差异更显著。电透析法回收 DNA 使用普通琼脂

糖,而琼脂糖酶回收DNA 必须使用低熔点琼脂糖。电透析法还可避免凝胶于65℃融化时对DNA 分子的损伤。所以,电透析法对于大规模文库的构建更经济有效。

以往脉冲电泳用TAE缓冲液分离部分消化的DNA,因为TBE中的硼酸根离子会抑制随后的连接反应^[13]。但0.5×TBE缓冲能力最强,能得到理想的分辨率,可在回收DNA后用0.5×TE溶液置换0.5×TBE除去硼酸根离子。DNA的回收有一次尺度选择和二次尺度选择(尺度选择即脉冲电泳)。一次尺度选择,可减少DNA的损失,但会产生小片段与大片段的共迁移,回收片段中含有相当比例的小片段,它会与载体优先连接,从而使整个文库的克隆偏小。二次尺度选择能除去一部分小片段,使回收的DNA片段大小比较均匀,但DNA的损失很大,转化效率较一次选择降低十至几十倍。本试验获得的克隆插入片段平均在30 kb左右,主要原因可能是回收的DNA片段不大(50~100 kb),只进行了一次尺度选择,小片段陷在大片段里没有除去,使得小片段与载体优先连接,所以克隆尺度偏小,但转化产生的重组效率很高。只要提高回收大片段DNA的浓度,进行二次尺度选择,再优化连接转化条件,就有望得到更大的BAC克隆。

3.4 连接

最高的转化效率与精确的连接条件相关,因此

各种参数,如连接时间、载体和插入片段浓度、T₄ DNA连接酶浓度,均被优化以获得最佳的转化效率^[14]。为避免电激转化过程中弧光放电的发生,将连接混合物在低盐缓冲液(0.5×TE)中悬滴透析除去连接体系的各种离子,但这样会导致连接体系体积增大,浓度降低,重组子的数量减少,所以有必要进一步浓缩。Kazutoyo等^[14]的试验证明,运用30%的PEG8000浓缩连接体系,可得到较高的转化效率。根据每次连接体系的不同,连接体系在冰上浓缩的时间也需要摸索,以获得达到最适DNA浓度的时间。连接体系浓缩后较浓缩前更容易降解和聚集,所以浓缩后应尽快转化。连接酶的存在也会影响电激转化效率,将连接酶在65℃灭活10 min,能提高转化效率。

3.5 电激转化

电激转化的效率,即每次转化产生的重组子数量,是对构建文库的每个环节进行优化的最终目标。在电激转化过程中,温度、电穿孔参数(电压梯度、电阻)、宿主细胞(遗传背景、生长条件)、脉冲后处理等因素会影响电激转化效率。低温操作有利于提高转化效率;低电场强度、低电阻能提高大片段DNA的转化效率。随着DNA片段尺度的增加,电激效率也随之降低。DH10β是重组缺陷型的BAC宿主菌,电激后应立即转移到SOC培养液中,时间过长会导致转化效率大大降低。

[参考文献]

- [1] 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[J]. Proc Natl Acad Sci, 1992, 89: 8794- 8797.
- [2] Woo S, Jiang J, Gill, et al Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of *Sorghum bicolor*[J]. Nucleic Acids Res, 1994, 25: 4922- 4931.
- [3] Wang G, Holsten T E, Song W Y, et al Construction of a rice bacterial artificial chromosome library and identification of clones linked to the Xa-21 disease resistance locus[J]. Plant, 1995, 7: 525- 533.
- [4] Cai L, Taylor J F, Wing R A, et al Construction and characterization of a bovine bacterial artificial chromosome library[J]. Genomics, 1995, 29: 413- 425.
- [5] 王文明, 江光怀, 王世全, 等. 高覆盖率水稻BAC库的构建及抗病基因相关克隆的筛选[J]. 遗传学报, 2001, 28(2): 120- 128.
- [6] Chen fan-guo, Zhang xue-yong, Xia guang-min, et al Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library for *Triticum boeoticum* [J]. Acta Botanica, 2002, 44(4): 451- 456.
- [7] Regis Zimmer, Ann M, Verrinder Gibbins Construction and characterization of a large-fragment chicken bacterial artificial chromosome library[J]. Genomics, 1997, 42: 217- 226.
- [8] Kim U J, Birren B, Slepak T, et al Construction and characterization of a human bacterial artificial chromosome[J]. Genomics, 1996, 34(2): 213- 218.
- [9] 陈红星, 杨晓, 黄培堂. 乳腺生物反应器制备中表达载体发展[J]. 生物工程学报, 2002, 18(2): 136- 139.
- [10] 姜涛, 刘越, 孔秀英, 等. 关于细菌人工染色体(BAC)文库载体DNA制备的研究[J]. 遗传学报, 2000, 29(12): 1126- 1131.
- [11] Strong S J, Ohta Y, Litman G W, et al Marked improvement of PAC and BAC cloning is achieved using electroelution of pulsed-field gel-separated partial digests of genomic DNA [J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25: 3959- 3961.

- [12] Scott J, Yuko Ohta, Gary W, et al Marked improvement of PAC and BAC cloning is achieved using electroelution of pulsed-field gel-separated partial digests of genomic DNA [J]. *Nucleic Acids research*, 1997, 25(19): 3959- 3961.
- [13] Ioannou P A, Amemiya C T, Garnes J, et al A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments [J]. *Nat Gentet*, 1994, 6: 84- 89.
- [14] Kazutoyo O, Peng Y W, Zhao B, et al An improved approach for construction of bacterial artificial chromosome libraries[J]. *Genomics*, 1998, 52: 1- 8.

Exploration for condition research of construction of bacterial artificial chromosome (BAC) library of Guanzhong milk goat

JIA Yu-yan^{1, 2}, CHEN Hong^{2, 3}, DENG Jixian¹

(1 Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China;

2 College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

3 Institute of Biotechnology, Xuzhou Normal University, Xuzhou, Jiangsu 221116, China)

Abstract: A new vector system-BAC (bacterial artificial chromosome) was developed into an important method for the construction of complex genomic library. Because Guanzhong milk goats have good milk efficiency, and are ideal animals to construct mammary gland bio-reactors, we explored for conditions to construct Guanzhong milk goat BAC library. We partially digested genomic DNA of guanzhong milk goat, separated large DNA in CHEF (contour-clamped homogeneous electric field), extracted DNA with electroelution, ligated to pBelBAC11 digested with *Bam*H I, transformed competent cell DH10 β with large DNA by electroporation, acquired thousands of positive clones, average inserted fragments ranged from 30 kb to 40 kb. In this course, we explored many factors which influenced high efficient transforming of large DNA, such as preparation of BAC in vector and high molecular weight DNA, partial digestion, ligation, electroporation, and provided a basis of construction of the whole library.

Key words: BAC (Bacterial artificial chromosome); genome library; goat