

细菌人工染色体 (BAC) 及其分析和修饰方法简介

黄 粤 刘德培* 梁植权

(中国医学科学院基础医学研究所 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005)
(中国协和医科大学基础医学院)

摘要 细菌人工染色体是一种新发展起来的 DNA 载体系统, 它具有容量大、遗传特性稳定、易于操作等优点. 在基因文库构建和基因功能分析等方面有广泛的应用. 综述了近年来发展起来的对 BAC 进行分析和修饰的一些方法.

关键词 细菌人工染色体, 定位修饰, 同源重组

学科分类号 Q71

1 细菌人工染色体载体的构建

用于 DNA 片段克隆的载体系统 (vector) 一直是分子生物学中不可或缺的重要工具. 历经数十年的发展, 先后建立了质粒 (plasmid), 粘粒 (cosmid), 酵母人工染色体 (yeast artificial chromosom, YAC) 等系统. 它们在今天的分子生物学研究中都有着广泛的应用, 对促进分子生物学研究的迅速发展起到了重要作用. 但随着研究的深入, 以上系统也逐渐显现了它们的一些固有缺陷: 质粒系统容量小 (< 15 kb), 只适用于一般基因的克隆, 很少用于 DNA 文库 (DNA library) 的构建, 尤其是真核生物的文库构建. 粘粒容量虽有所增大 (< 45 kb), 但对于一些较大的基因簇 (gene cluster) 的研究仍然无能为力. YAC 系统容量很大 (可至数 Mb), 已被广泛应用于 DNA 文库的构建和基因簇研究, 但其易于发生重组, 缺乏稳定性及制备工艺的繁琐限制了它的使用^[1]. 能否建立一种容量大, 能够稳定遗传且易于操作的载体系统成为众多分子生物学工作者的愿望. 20 世纪 90 年代发展起来的细菌人工染色体 (bacterial artificial chromosome, BAC), 正是这样一种载体系统^[1, 2]. BAC 载体是建立在大肠杆菌的 F 因子 (F factor) 的基础上, F 因子亦称 F 质粒, 是一种“性质粒”, 它可将宿主染色体基因转移至另一宿主细胞, 它本身转移到 F⁻ 宿主细胞后可使后者成为 F⁺ 细胞, 天然 F 因子是超螺旋闭环 DNA 分子, 在宿主中只有 1~2 个拷贝, 自身大小约 100 kb, 编码近百个蛋白质. 在包装了大肠杆菌基因组 DNA 后大小可至上千 kb. 人工构建的 BAC 载体, 例如 pBeloBAC1^[3], 大小只有 7.4 kb, 保留了与 F 因子的自主复制、

拷贝数控制以及质粒分配等基本功能相关的基因: oriS、repE、parA、parB 和 parC. 其外源 DNA 片段的容量最大可至 300 kb 以上. 可应用于基因组文库构建和大的基因簇的相关研究. 一些公司, 如 Genetics Research Company, 有完整的人和部分动物的 BAC 文库以及杂交筛选的高密度尼龙膜出售. 如何应用 BAC 载体构建基因组文库及筛选^[4], 在此不复赘言. 本文重点介绍对 BAC 克隆进行分析、修饰的一些方法.

2 BAC 克隆的常用分析方法

获得包含某段基因或 DNA 序列的 BAC 克隆后, 用常用的碱裂解法 (广泛应用于质粒 DNA 的制备) 即可方便地制备 BAC DNA, 利用载体两端的限制性内切酶 *Not* I 位点可分离出绝大多数插入片段, 经脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 分析即可获知插入片段的大小. 对少数在插入片段中包含 *Not* I 位点的 BAC 克隆, 则可借助载体上的 *cos*N 位点用 λ 末端酶来线性化 BAC DNA. BAC 载体两端的 Sp6 和 T7 引物序列可用于 BAC DNA 的直接测序, 方法和普通质粒测序近似^[5]. 测序结果经序列比较后, 对定位该插入片段两端的 DNA 序列很有帮助. 利用 BAC DNA 直接标记的探针, 对相应的细胞进行原位荧光杂交 (FISH), 即可较准确地了解它在染色体上的具体位置, 并能有助于判断其是否为嵌合体^[5]. 要具体了解 BAC 中的插入片段特征, 当然要进行详细的物理图谱分析, BAC DNA 的易制备性使这一过程可快速地进行. 除常规的物理图

* 通讯联系人.

Tel: 010-65296415, E-mail: Liudp@public.east.cn.net

收稿日期: 2000-06-22, 接受日期: 2000-08-23

谱分析方法外, 因 BAC 载体上有单一的 loxP 位点 (它是 Cre 重组酶的作用位点), 可利用它更方便快速地进行图谱分析 (图 1). 首先利用人工合成并进行了末端标记的含 loxP 序列的短 DNA 片段和 Cre 重组酶线性化 BAC DNA, 再用相应的限制性内切酶进行不完全酶切, 即可获得长度不等的 DNA 片段, 经 PFGE 分离后进行放射自显影, 只有末端含标记的 loxP 序列的 DNA 片段会在 X 光片上显带, 它们即是 BAC DNA 上以 loxP 位点为固定端该限制性内切酶产生的依次减小的 DNA 片段, 由此即可获知该限制性内切酶在 BAC DNA 上的具体酶切位点. 而且上述线性化过程是可双向分别进行的 (依据设计的含 loxP 序列的 DNA 短片段的不同), 两者的最终结果可互相验证, 确保无误^[6].

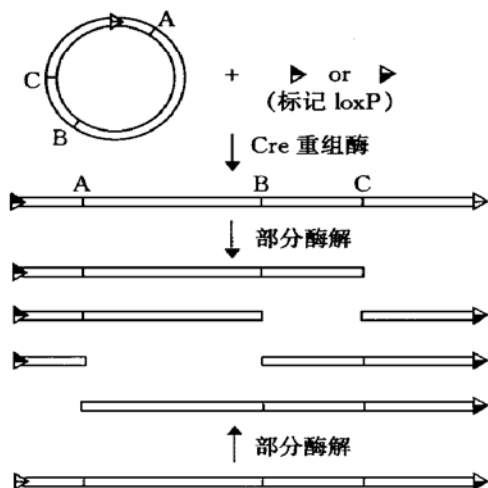


Fig. 1 Physical mapping strategy for BAC DNA using Cre-loxP system^[6]

图 1 Cre-loxP 介导的 BAC DNA 物理图谱分析原理图

三角形符号代表 loxP 片段, 其中涂黑部分代表用³²P 末端标记短片段的上链和下链.

3 BAC 克隆的常用的定位修饰方法

许多基因和基因簇, 如 α 珠蛋白基因簇、 β 珠蛋白基因簇、载脂蛋白基因家族等, 它们的整个基因座位跨度达几十、甚至上百 kb. BAC 载体的大容量性可以在一个单一克隆中包含完整的基因座位. 而以 BAC 介导的转基因动物研究^[7-11]使基因表达调控研究达到一个新的水平, 可以更准确地分析它们的调控机制, 定位更多新的调控元件. 而要达到这一目的, 对相应的 BAC DNA 进行精确的定位修饰是其前提条件. 在常规的质粒修饰中常用的酶切、连接、定点突变等方法因 BAC DNA 的大分

子量特性而无法实施, 而近几年发展起来的一些新方法使这一目标得以实现^[12-15], 这里重点介绍其中三种.

第一种方法称为 RecA 蛋白辅助的限制性内切酶 (RecA-assisted restriction endonuclease, RARE^[16]) 切割方法^[12]. 它基于这样的原理: RecA 蛋白在体外可辅助寡核苷酸片段 (约 50 nt) 与互补的 DNA 双链形成三链结构, 当用特定的甲基化酶处理该 DNA 时, 未形成三链结构的 DNA 双链区域中的相应限制性内切酶位点均被甲基化, 而三链结构中的酶切位点则被保护而未甲基化. 然后使甲基化酶和 RecA 蛋白热失活, 相应的三链结构也随之消失, 暴露出其中的未甲基化酶切位点, 再加入相应的限制性内切酶消化即可切割出所需的 DNA 片段. 将其亚克隆到普通质粒载体上即可进行所需的各种修饰: 删除、替换、点突变等等. 而失去了这一段 DNA 片段的 BAC DNA 经连接后再转化到相应的菌株中得以保存, 经新一轮的 RARE 处理 (这次用的寡核苷酸片段是按与切割下的那段 DNA 片段两端相邻的 DNA 序列设计) 后, 即可将修饰后的 DNA 片段连接回 BAC DNA 中, 再转化到相应菌株中, 从而最终得到修饰了的 BAC 克隆 (图 2). 利用该方法不仅可对 BAC DNA 进行上述修饰, 还可以将包含同一基因座位中不同片段的两个 BAC 克隆嫁接成一个包含完整基因座位的 BAC

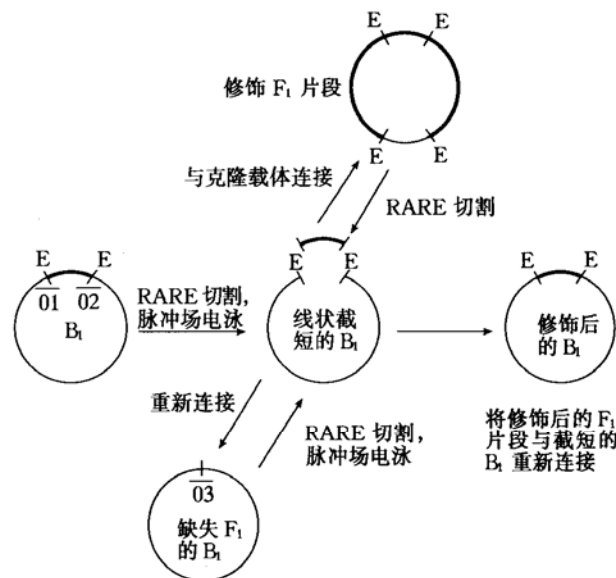


Fig. 2 Strategy for targeted BAC (B_1) modification by using RARE cleavage^[12]

图 2 利用 RARE 切割法对 BAC (B_1) 进行定位修饰的原理图 01、02 和 03 是与不同的 EcoRI 位点邻近序列互补的 60-mer 的寡核苷酸.

克隆. 该方法在体外进行, 因涉及到线性化的大片 DNA 分子操作: 回收、连接、转化等, 所以过程较为繁琐, 需要十分小心.

第二种方法是利用同源重组在包含 BAC 的大肠杆菌体内直接修饰 BAC DNA^[13], 比第一种方法更为方便高效. 这种方法主要是利用一种温度敏感型的穿梭载体 (shuttle vector), 它在 30℃ 时可在宿主菌中顺利复制自己, 而在 43℃ 培养环境中会从宿主菌中丢失. 穿梭载体中还包含一个大肠杆菌的 *recA*⁺ 基因, 它的表达产物可克服因为 BAC 的宿主菌是重组缺陷型 (*recA*⁻) 而不能有效进行同源重组的弊端. 这里以从 BAC 中删除一段 DNA 序列为例介绍这种方法的应用 (图 3). 首先, 用 PCR 方法从要删除的 DNA 序列两侧分别扩增出一段 DNA 序列 (A 和 B), 其长度均要大于 250 bp, 这样以下的同源重组反应才能有效进行. 获得 A 和 B 后, 先后将其连接到上述的穿梭载体 pSV1-RecA (四环素抗性) 中, 注意它们仍按其在大肠杆菌中一致的内源方向来排列. 另外, 因为 pSV1-RecA 是单一拷贝质粒, 其制备、纯化、连接效率均较低. 所以 A 和 B 序列的连接可先在制备载体 pBV 中操作, 其多克隆载体两端均有一个 *Sal*I 位点, 可将连接后的 A 和 B 序列以 *Sal*I 分离出后克隆到 pSV1-RecA 的 *Sal*I 位点中去. 这样可大大简化实验过程. 其次, 将克隆了 A 和 B 的 pSV1-

RecA 转化到含有待修饰的 BAC DNA 的感受态大肠杆菌中, 用含两种抗生素 (氯霉素和四环素) 的 LB 平板于 30℃ 培养后筛选到成功转化的单克隆菌落. 选取数个单克隆再次涂布于双抗性 LB 平板上, 43℃ 培养后, 只有那些发生同源重组 (利用 A 或者 B 序列) 将 pSV1-RecA 共整合到 BAC DNA 上的克隆才能在此环境中生存, 未发生重组的克隆会在复制中失去 pSV1-RecA 质粒而不能抵抗四环素的选择压力. 利用限制性内切酶酶切鉴定或 DNA 印迹鉴定这些克隆以确证其发生同源重组. 然后将鉴定好的阳性克隆在只含氯霉素的 LB 平板上于 43℃ 培养, 以便让发生第二次同源重组 (利用 A 或者 B 序列) 的克隆可以生长, 且分离出的 pSV1-RecA 质粒会在复制过程中丢失. 在此平板上生长的单克隆再次划线于含镰孢菌酸 (fusaric acid, FA) 和氯霉素的平板上, 镰孢菌酸是一种针对四环素的负筛选剂, 含有四环素抗性基因的细菌是不能在含镰孢菌酸的平板上生长的. 所以在上述平板上只有发生二次同源重组并失去 pSV1-RecA 质粒的克隆才能生长. 如果第二次重组利用的同源片段 (A 或者 B) 与第一次相同, 则 BAC DNA 未被修饰仍和原始 BAC DNA 相同. 而如果与第一次重组不同, 则原始 BAC DNA 中 A、B 之间的 DNA 片段会被删除掉, 获得我们想要的突变体 BAC DNA. 利用 DNA 印迹可准确鉴定出该突变体 BAC DNA.

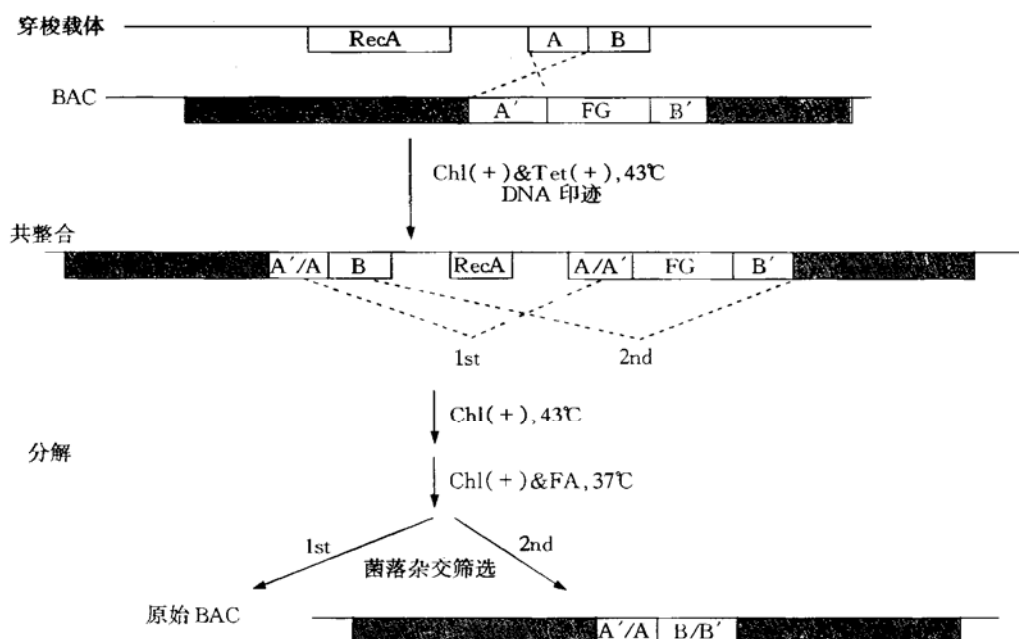


Fig. 3 Strategy for targeted BAC modification mediated by homologous recombination^[13]

图 3 利用同源重组定位修饰 BAC DNA 的原理图

FG: 待删除的 DNA 片段; Chl: 氯霉素; Tet: 四环素; FA: 镰孢菌酸

第三种方法是将“ET cloning”技术应用在BAC的修饰上^[15]。“ET cloning”是近年发展起来的一种基于同源重组原理在大肠杆菌中直接修饰各类DNA分子的新技术^[17]。较之传统的酶切,连接,转化的方案更加快速方便,而且应用范围更广泛。因为这种同源重组是RecE和RecT蛋白介导的,所以称之为“ET cloning”。早期的“ET cloning”操作只能在*sbcA*菌株中有效进行,而通常BAC的宿主菌(如DH10B)不允许进行这种修饰(它们是*recBC*⁺类型)。为此构建了质粒pBAD-ET γ 和pBAD- $\alpha\beta\gamma$ 。pBAD-ET γ 中包括阿拉伯糖诱导启动子(pBAD)控制下的截短的*recE*基因;组成型强启动子EM7控制下的*recT*基因以及组成型启动子Tn5控制下的*red γ* 基因。*recE*和*recT*基因表达产物介导ET-cloning的进行,而*red γ* 基因产物抑制RecBC蛋白对线状DNA片段的降解作用。将pBAD-ET γ 质粒转化到*recBC*⁺型菌株中即可使它们也能顺利进行“ET cloning”操作。pBAD- $\alpha\beta\gamma$ 质粒是在pBAD-ET γ 基础上发展起来的,用 λ 噬菌体的*red α* 和*red β* 基因分别替代了功能上相近的*recE*和*recT*基因,它的重组效率是pBAD-ET γ 的1到3倍。这里同样以从BAC中删除一段DNA序列为例介绍这种方法的应用(图4)。首先将pBAD- $\alpha\beta\gamma$ 质粒转化到BAC的宿主细胞中,利用氯霉素和氨苄青霉素共同筛选出转化子。随后利用阿拉伯糖诱导*red α* 的表达,并制成感受态细胞。同时,利用PCR扩增出卡那霉素抗性基因(*kan*)表达片段,所用引物两端分别包含与BAC DNA上待删除片段(A)两端相同的序列(c和d,各50 nt)以及FRT片段(FLP位点特异重组酶的靶位点)。将该线状DNA转化到上述感受态细胞中,在Red α 和Red β 介导下完成重组反应,使目的片段被*Kan*表达片段所代替,利用卡那霉素和氯霉素筛选到该重组子,同时pBAD- $\alpha\beta\gamma$ 质粒因为缺乏氨苄青霉素的选择压力而丢失。将重组后的BAC DNA转化到294-FLP细胞中,通过FLP重组酶的作用使两个FRT片段间的*Kan*片段被切除,从而最终获得目的片段(A)被缺失的重组体BAC DNA。

另外,将大片段外源DNA导入哺乳动物细胞也是基因功能研究的重要手段,但以YAC为基础这一技术一直是低效和费时的。随着BAC的应用和发展,其易制备和纯化的特点使获得转染量级和纯度的DNA变得容易和快速,同时对BAC进行的一些修饰使其更方便应用于上述研究。Baker等^[18]

将绿色荧光蛋白基因(GFP)和荧光素酶基因(*luciferase*)分别引入BAC载体中,由它们构建的BAC克隆可通过腺病毒颗粒辅助载体转染细胞,利用上述报告基因可方便地筛选到阳性转化子。长达170 kb的BAC DNA片段可成功地进行转染,其效率可接近5~10 kb的小DNA片段的转染效率。但是这种方法不能直接用于现有的BAC克隆,需要重新酶切、连接和转化。Kim等^[19]利用BAC载体上的loxP位点,在体外使用Cre重组酶直接将报告筛选基因整合到BAC克隆中,修饰后的BAC DNA可直接用于转染细胞,转染效率可达1%~6%。

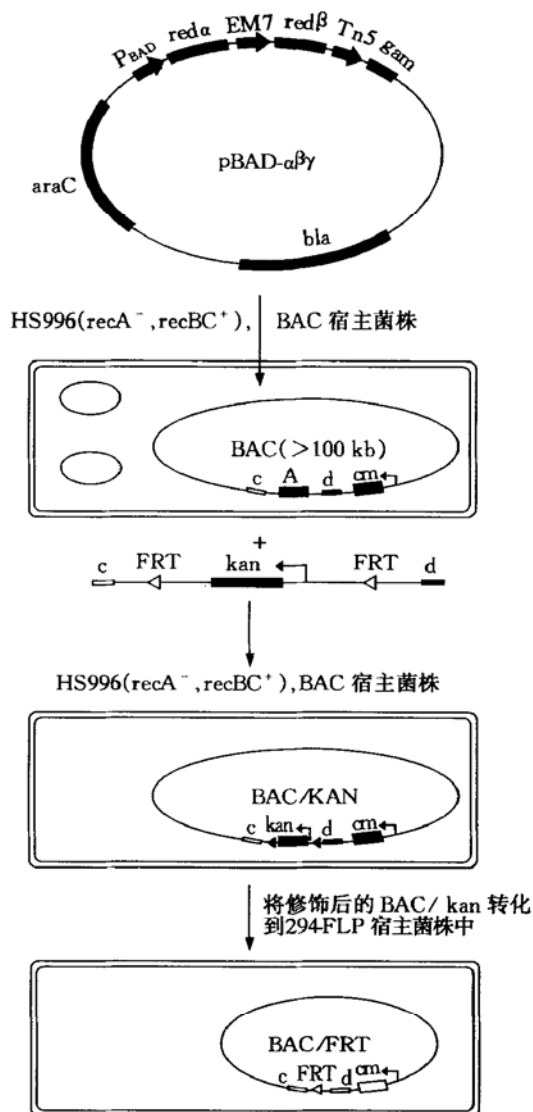


Fig. 4 Strategy for targeted BAC modification by using “ET cloning” with the plasmid pBAD- $\alpha\beta\gamma$ ^[15]

图4 利用质粒 pBAD- $\alpha\beta\gamma$ 使“ET cloning”应用于BAC进行定位修饰的原理图

bla: 氨苄青霉素抗性基因; cm: 氯霉素抗性基因; kan: 卡那霉素抗性基因。

总之, 由于 BAC 系统自身的优点及其相关的分析、修饰方法的建立和发展, 它将更广泛地应用在基因克隆、基因文库构建、基因功能分析、基因表达调控等方面的研究中。

参 考 文 献

- 1 Monaco A P, Larin Z. YACs, BACs, PACs and MACs: artificial chromosomes as research tools. *Trends in Biotech*, 1994, **12** (7): 280~ 286
- 2 Shizuya H, Birren B, Kim U J, *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 Kim U J, Birren B, Slepak T, *et al.* Construction and characterization of a human bacterial artificial chromosome library. *Genomics*, 1996, **34** (2): 213~ 218
- 4 Asakawa S, Abe I, Kudoh Y, *et al.* Human BAC library: construction and rapid screening. *Gene*, 1997, **191** (1): 69~ 79
- 5 Hanson R E, Zwick M S, Choi S, *et al.* Fluorescent *in situ* hybridization of a bacterial artificial chromosome. *Genome*, 1995, **38** (4): 646~ 651
- 6 Mullins L J, Kotelevtseva N, Boyd A C, *et al.* Efficient Cre-lox linearisation of BACs: applications to physical mapping and generation of transgenic animals. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25** (12): 2539~ 2540
- 7 Antoch M P, Song E J, Chang A M, *et al.* Functional identification of the mouse circadian *Clock* gene by transgenic BAC rescue. *Cell*, 1997, **89** (4): 655~ 667
- 8 Nielsen L B, McCormick S P, Pierotti V, *et al.* Human apolipoprotein B transgenic mice generated with 207- and 145-kilobase pair bacterial artificial chromosomes. Evidence that a distant 5'-element confers appropriate transgene expression in the intestine. *J Biol Chem*, 1997, **272** (47): 29752~ 29758
- 9 Probst F J, Raphael Y, Saunders T L, *et al.* Correction of deafness in shaker-2 mice by an unconventional myosin in a BAC transgene. *Science*, 1998, **280** (5368): 1444~ 1447
- 10 Kaufman R M, Pham C T, Ley T J, *et al.* Transgenic analysis of a 100-kb human beta-globin cluster-containing DNA fragment propagated as a bacterial artificial chromosome. *Blood*, 1999, **94** (9): 3178~ 3184
- 11 Yang X W, Wynder C, Doughty M L, *et al.* BAC-mediated gene-dosage analysis reveals a role for Zfp1 (Ru49/Zfp38) in progenitor cell proliferation in cerebellum and skin. *Nat Genet*, 1999, **22** (4): 327~ 335
- 12 Boren J, Lee I, Callow M J, *et al.* A simple and efficient method for making site-directed mutants, deletions, and fusions of large DNA such as P1 and BAC clones. *Genome Res*, 1996, **6** (11): 1123~ 1130
- 13 Yang X W, Model P, Heintz N, *et al.* Homologous recombination based modification in *Escherichia coli* and germline transmission in transgenic mice of a bacterial artificial chromosome. *Nat Biotechnol*, 1997, **15** (9): 859~ 865
- 14 Jessen J R, Meng A, McFarlane R J, *et al.* Modification of bacterial artificial chromosomes through chi^r-stimulated homologous recombination and its application in zebrafish transgenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (9): 5121~ 5126
- 15 Muylers J P P, Zhang Y, Testa G, *et al.* Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination. *Nucleic Acids Res*, 1999, **27** (6): 1555~ 1557
- 16 Ferrin L J, Camerini-Otero R D. Selective cleavage of human DNA: RecA-assisted restriction endonuclease (RARE) cleavage. *Science*, 1991, **254** (5037): 1494~ 1497
- 17 Zhang Y, Buchholz F, Muylers J P P, *et al.* A new logic for DNA engineering using recombination in *E. coli*. *Nat Genet*, 1998, **20** (2): 123~ 128
- 18 Baker A, Cotton M. Delivery of bacterial artificial chromosomes into mammalian cells with psoralen-inactivated adenovirus carrier. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25** (10): 1950~ 1956
- 19 Kim S Y, Horrigan S K, Altenhofen J L, *et al.* Modification of bacterial artificial chromosome clones using Cre recombinase: introduction of selectable markers for expression in eukaryotic cells. *Genome Res*, 1998, **8** (4): 404~ 412

Advances in Analysis and Modification of Bacterial Artificial Chromosome

HUANG Yue, LIU De-Pei*, LIANG Zhi-Quan (Liang Chih-Chuan)

(National Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences,
Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100005, China)

Abstract As a new developmental vector system, the bacterial artificial chromosome (BAC) have several advantages larger capacity, hereditary stability and easy handling, etc. It has been extensively used in construction of genomic library and analysis of gene function. Some new methods of analysis and modification of BAC were reviewed.

Key words bacterial artificial chromosome, site-directed modification, homologous recombination

* Corresponding author. Tel: 86-10-65296415, E-mail: Liudp@public.east.cn.net