

小白链霉菌武夷变种 HWM DNA 的制备及最适酶切条件确定

王万群¹, 阿拉坦夫^{1,2}, 展丽然^{1,3}, 石义萍¹, 张克诚¹

(1. 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100094; 2 内蒙古师范大学, 呼和浩特 010022;
3 河北农业大学, 河北 保定 071001)

摘要:为构建小白链霉菌武夷变种 (*Streptomyces albulus* var. *wuyiensis*) 的细菌人工染色体 (bacterial artificial chromosomes, BAC) 文库, 提取了小白链霉菌武夷变种高分子量 DNA (high molecular weight DNA, HMW DNA)。用低熔点琼脂糖 (low melting point agarose, LMP) 包埋小白链霉菌武夷变种菌丝球, 胶块经溶菌酶、蛋白酶 K、两种限制性内切酶 (BamH I、Hind III) 处理后, 使用筛位匀强电场 (CHEF) 凝胶电泳检测 DNA 片段大小。电泳结果显示提取 HMW DNA 完整, 满足构建 BAC 文库的条件, 确定了最适酶切条件为 Hind III 0.2 U 酶切 10 min, 为小白链霉菌武夷变种功能基因的研究奠定了基础。

关键词:高分子量 DNA; 细菌人工染色体; 筛位匀强电场电泳

中图分类号: Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-0864 (2008) S1-0116-04

Preparation of HMW DNA for *Streptomyces albulus* var. *wuyiensis* and Determination of the Optimum Conditions for Restriction Enzyme Digestion

WANG Wan-qun¹, A-la-tan-fu^{1,2}, ZHAN Li-ran^{1,3}, SHI Yi-ping¹, ZHANG Ke-cheng¹

(1. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094; 2. Inner Mongolia Normal University, Huhhot 010022; 3. Agricultural University of Hebei, Hebei Baoding 071001, China)

Abstract: In order to construct bacterial artificial chromosomes library of *Streptomyces albulus* var. *wuyiensis*, we extracted high molecular weight DNA (HMW DNA) from *Streptomyces albulus* var. *wuyiensis* Mycelium pellet of *Streptomyces albulus* var. *wuyiensis* was embedded in low melting point agarose. The agarose block was treated by lysozyme, proteinase K and restriction enzyme. Contour-clamped homogeneous electric field (CHEF) gel electrophoresis was performed for prepared DNA plugs. Electrophoresis analysis shows no degradation of HMW DNA isolated, which meets the demand of construction of BAC library. The optimum condition for digestion was determined as 0.2 U Hind III digesting for 10 min. HMW DNA preparation is a basis of functional genomics research of *Streptomyces albulus* var. *wuyiensis*.

Key words: high molecular weight DNA; bacterial artificial chromosomes library; CHEF gel electrophoresis

链霉菌 (*Streptomyces*) 是一类高 G+C 含量革兰氏阳性细菌, 属放线菌目 (*Actinomycetales*), 链霉菌科 (*Streptomycetaceae*), 链霉菌属 (*Streptomyces*)^[1], 具有复杂的形态分化周期。伴随形态分化, 链霉菌能够产生种类繁多的次级代谢产物, 如抗生素、酶抑制剂、免疫调节剂和色素等。目前已发现的 11 900 余种抗生素中约 50% 是由链霉

菌产生的^[2], 其中许多在医药、农业或畜牧业中得到应用。小白链霉菌武夷变种 (*Streptomyces albulus* var. *wuyiensis*) 可产生一种广谱、高效、低毒的核苷类农用抗生素武夷菌素, 它对蔬菜、水果、粮食和一些经济作物的真菌病害, 如: 白粉病、番茄叶霉病、番茄灰霉病、黄瓜黑星病、大豆灰斑病、柑橘疮痂病等具有良好的防治效果^[3,4]。由

收稿日期: 2008-01-24; 修回日期: 2008-02-29

基金项目: 公益性行业科研专项“生太康复型农田绿色控害技术体系 组建与创新”(200803032) 国家科技支撑计划项目“重大病虫害生物防治新技术”(2006AD08A02) 资助。

作者简介: 王万群, 硕士研究生, 从事武夷菌素产生菌分子生物学的研究。E-mail: wanqun1980@126.com。通讯作者: 张克诚, 博士, 硕士生导师, 从事生物农药、农用抗生素的研究。Tel: 010-62815942; E-mail: zhangkecheng@sina.com

于目前常规育种方法已经不能满足工业化生产的需要,因此明确小白链霉菌武夷变种的表达产物和调控相关基因,有利于应用基因改良方法进行分子技术育种,以提高武夷菌素的效价及产量。

链霉菌中,某一特定次生代谢途径相关的基因通常以基因簇(cluster)的形式存在于线状染色体上^[5,6],基因簇中包含有形成次级代谢产物所需要的大量遗传信息^[7,8],克隆载体必须有接受并稳定遗传 100 kb以上 DNA片段的能力,才能携带完整的基因簇。构建 BAC文库(bacterial artificial chromosomes)是目前常被用来克隆不同生物 DNA大片段的方法^[9~11],构建高质量、容易操作的大片段基因组 BAC文库是分离表达产物和调控方式均未知基因的有效方法。而成功构建 BAC文库的一个重要因素是制备 Mb级的高分子量 DNA(HWM DNA),并保护 DNA在制备过程中避免物理剪切损伤^[12]。而传统的 DNA提取方法如浓盐法、阴离子表面活性剂法、苯酚抽提法等均无法避免制备过程中的物理剪切损伤。本研究使用 LMP包埋法制备 DNA,可以有效防止物理剪切对 DNA的损伤^[12]。通过应用 LMP包埋法成功提取了小白链霉菌武夷变种 HWM DNA,并确定了最适酶切条件,为构建小白链霉菌武夷变种 BAC文库奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 菌株

小白链霉菌武夷变种(*Streptomyces albulus* var. *wuyiensis*),本实验室分离、保存。

1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶 Hind III、BamH I、Lambda ladder PFG marker购自 NEB公司,蛋白酶 K购自 Merck公司,Tris base、EDTA、溶菌酶、低熔点琼脂糖为进口分装,其余试剂均为国产分析纯。脉冲场电泳仪 CHEF Mapper XA, BioRad公司,凝胶成像系统 Eagle Eye1 System, Stratagene公司。

1.3 小白链霉菌武夷变种 HWM DNA提取

HWM DNA的提取根据 Kiese r的方法^[13]适当改进。

1.3.1 培养条件及前处理 1 mL小白链霉菌武夷变种孢子悬液接种到含 25 mL YEME[34% (w/v)

v)蔗糖, 5 mmol · L⁻¹ MgCl₂, 0.5%甘氨酸(w/v)培养基的 250 mL三角瓶中,加入灭菌的不锈钢丝圈以利于通气和分散细胞^[14]。28 ℃, 200 rpm培养 40 h。培养物 3 000 mp离心去除上清,用 0.3 mol · L⁻¹蔗糖反复洗沉淀两次,3 000 mp离心去除上清。

1.3.2 胶块制备 菌体沉淀重悬于 5 mL TE25 suc buffer(0.3 mol · L⁻¹蔗糖、25 mmol · L⁻¹ Tris、25 mmol · L⁻¹ EDTA, pH8.0)中,取 0.1 mL悬液与 0.6 mL TE25 suc buffer混合后,加入等体积 1.5%低熔点琼脂糖(LMP),室温下注入模具,待凝固后置于 4 ℃冷却 30 min,使其充分凝固。将凝固的胶块转移到 5 mL含有 1 mg · mL⁻¹溶菌酶的 TE25 suc buffer中,37 ℃孵育 2 h。再将胶块转移到含 1 mg · mL⁻¹蛋白酶 K的 NDS[0.5 mol · L⁻¹ EDTA、10 mmol · L⁻¹ Tris、1% laurylsarcosine (w/t), pH9.0]中,50 ℃预消化 1 h,继续于 50 ℃孵育 24 h。胶块转移到 10 mL冰预冷的 TE(含 0.1 mmol · L⁻¹ PMSF)中,4 ℃放置 1 h以钝化蛋白酶 K。用 10 mL冰预冷的 TE缓冲液洗 3次,每次在 4 ℃放置至少 1h^[13]。

1.4 最适酶切条件确定

将 20 U · μL⁻¹的限制性内切酶 Hind III和 BamH I用新配置的酶切缓冲液分别稀释 800倍即 0.025 U · μL⁻¹。

取 3个用 TE缓冲液洗过的胶块置于灭菌的培养皿中,用新手术刀片将胶块切成大小相等的 9小块(每小块体积大约 30 μL),切割需在冰上迅速进行^[15]。

将小胶块分别转移到 1.5 mL EP管中,加入 1倍酶切缓冲液(含 0.1体积 DTT) 500 μL,冰上平衡 2 h,期间翻转几次。小心除去酶切缓冲液,更换新配置的 1倍酶切缓冲液(含 0.1体积 DTT) 500 μL,冰上再平衡 2 h,期间翻转几次。之后,将小胶块转移到 1.5 mL EP管中,分别加入 17 μL 10倍酶切缓冲液、100 μL H₂O、2 μL DTT稀释的限制性内切酶 Hind III或 BamH I,再加入 ddH₂O使总体积为 170 μL(Hind III加入量见表 1, BamH I加入量见表 2)。

混匀后于冰上平衡 2 h,使酶充分渗入胶块中,37 ℃酶切 10 min,之后在每个 EP管中分别加入 0.1 体积 0.5 mol · L⁻¹ EDTA(pH8.0)终止反应。

表 1 限制性内切酶 Hind III 加入量

Table 1 Amount of restriction enzyme Hind III

EP管号 EP tube No.	1	2	3	4
加酶体积 Volume of restriction enzyme	4 μ L	8 μ L	12 μ L	16 μ L
加酶量 Units of restriction enzyme	0.1 U	0.2 U	0.3 U	0.4 U

表 2 限制性内切酶 Bam H I 加入量

Table 2 Amount of restriction enzyme BamH I

EP管号 EP tube No.	5	6	7	8
加酶体积 Volume of restriction enzyme	4 μ L	8 μ L	12 μ L	16 μ L
加酶量 Units of restriction enzyme	0.1 U	0.2 U	0.3 U	0.5 U

酶切完成后,进行脉冲电泳确定部分酶切最适量,电泳条件如下:0.5倍 TBE 为电泳缓冲液,0.1倍琼脂糖(0.5倍 TBE 配制),14 \times ,起始脉冲 30 s,终止脉冲 3 min 15 s,电压 6 v \cdot cm $^{-1}$,电泳时间 24 h。电泳结束后,用 0.5 μ g \cdot mL $^{-1}$ EB 水溶液染色 30 min,清水漂洗 30 min,凝胶成像系统检测。

2 结果与分析

2.1 HWM DNA 提取

实验中根据 Kieser 的方法^[13]加以改进,将原文献中包埋孢子悬液的低熔点琼脂糖浓度由 1% 增加到 1.5%,目的是加大胶块硬度,便于后续步骤操作;且在酶切时加入 0.1 倍体积的 DTT,防止 DNA 被氧化。方法改进后,总 DNA 的提取效率明显提高(见图 1)。

使用改进 LMP 包埋法提取的小白链霉菌武夷变种 HWM DNA,总 DNA 可达到完整的 Mb 级,在箱位匀强电场凝胶电泳过程中,总 DNA 样品不能走出加样孔,没有降解条带出现(图 2, 0 道),该 DNA 符合构建 BAC 文库的要求。

2.2 最适酶切条件确定

箱位匀强电场凝胶电泳结果显示(见图 1),使用 BamH I 酶切总 DNA,随着酶量加大,所得片段逐渐变小(图 2, 5~8 道),0.1~0.3 U 酶量部分酶切所得 DNA 片段在小且不集中,0.4 U 酶量

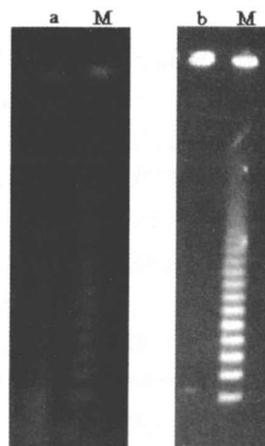


图 1 总 DNA 提取方法的改进效果

Fig 1 The improved effect of total DNA extraction method

M: Lambda ladder PFG marker;

a: 改进前提取的总 DNA;

b: 改进后提取的总 DNA。

M: Lambda ladder PFG marker;

a: Total DNA extracted by original method;

b: Total DNA extracted by improved method

酶切时, DNA 片段主要分布在 70 kb 以下,不符合构建小白链霉菌武夷变种 BAC 文库的要求。使用 0.2 U Hind III 酶切时,酶切后大片段主要分布在 100~240 kb 范围内(图 2, 2 道),符合构建小白链霉菌武夷变种 BAC 文库的要求,确定为最佳酶切用量。

3 讨论

HWM DNA 的制备是能否成功构建小白链霉菌武夷变种 BAC 文库的前提条件,若制备的 DNA 片段不能达到 100 kb 以上,则不能包括完整的基因簇,也就无法进行小白链霉菌武夷变种功能基因的研究。提取 HWM DNA 不能使用传统的 DNA 提取手段,因为 DNA 片段极易被外力打断,使得到片段过小(约 20 kb)。所以采用低熔点琼脂糖包埋方法,从菌丝球包埋到 DNA 分离、纯化都在胶块中进行。

本实验发现在制备高分子量 DNA 时操作要动作轻微,尤其在转移小胶块的过程中尤其要注意,不要弹 EP 管壁来移动小胶块,因为振动会使 DNA 片段断裂,使得到片段过小。因此在操作过程中,宜先吸干 EP 管中缓冲液,再用 100 μ L 的

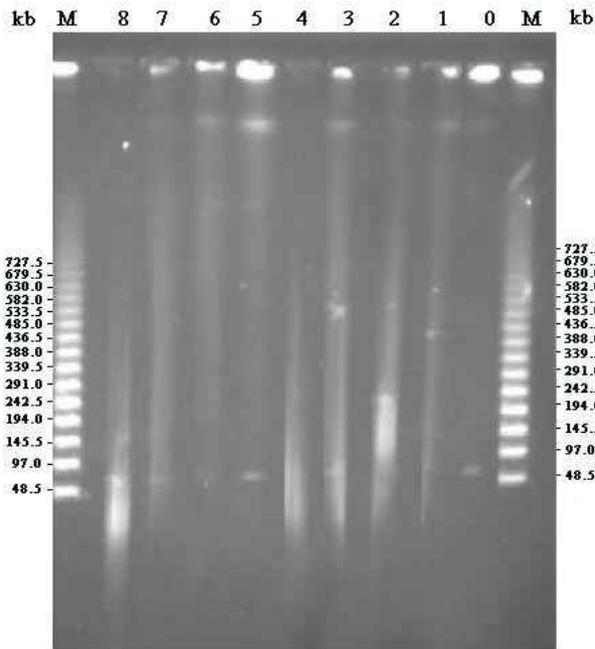


图 2 箱位匀强电场凝胶电泳图

Fig 2 CHEF gel electrophoresis image

M: Lambda ladder PFG marker;

0: 总 DNA;

1 ~ 8: 部分酶切, 编号与表一、表二管号相对应。

M: Lambda ladder PFG marker;

0: Total DNA;

1 ~ 8: Partial enzyme digested total DNA, corresponding to Table 1 and Table 2.

移液器将小胶块从 EP 管底部拉开, 然后用干净的手术刀片将 EP 管底部割掉, 用 tip 头将小胶块从 EP 管底部推出, 这样做可避免在转移小胶块过程中的振动, 因此制备的总 DNA 没有降解。

从最适酶切条件可以看出, 小白链霉菌武夷变种 DNA 对限制性内切酶非常敏感, 在操作过程中要防止体系外内切酶的污染, 否则极易造成 DNA 的降解, 进而影响后续实验。本实验成功制备了小白链霉菌武夷变种高分子量 DNA, 并确定了最适酶切条件, 为小白链霉菌武夷变种 BAC 文库构建及功能基因的研究奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Garrity G, Julia B, Timothy L. Bergey's manual of systematic bacteriology (2nd ed) [M]. New York: Springer-Verlag, 2003, 252 - 253
- [2] Kieser T, Bibb M, Buttner M, et al. Practical Streptomyces genetics [M]. England, Norwich: The John Innes Foundation, 2000, 2
- [3] 黄仲生, 杨玉茹. 生物农药 Bo-10 防治黄瓜白粉病 [J]. 生物防治通报, 1985, 1 (4): 47.
- [4] 孙延忠, 曾洪梅, 石义萍, 等. 武夷菌素对番茄灰霉菌 (*Botrytis cinerea*) 的作用方式 [J]. 植物病理学报, 2003, 33 (5): 434 - 438.
- [5] Challis G L, Hopwood D A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species [J]. PNAS, 2003, 100 (2): 14555 - 14561.
- [6] Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, et al. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis* [J]. Nature Biotechnol, 2003, 21 (5): 526 - 531.
- [7] Schwecke T, Aparicio J F, Mohar I, et al. The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin [J]. PNAS, 1995, 92 (17): 7839 - 7843.
- [8] August P, Tang L, Yoon Y, et al. Biosynthesis of the ansamycin antibiotic rifamycin: deductions from the molecular analysis of the rif biosynthetic gene cluster of *Amicocla topsis mediterranei* S699 [J]. Chem Biol, 1998, 5 (2): 69 - 79.
- [9] Xu Y, Jiang L, Murray B, et al. Enterococcus faecalis antigens in human infections [J]. Infect Immun, 1997, 65 (10): 4207 - 4215.
- [10] Brosch R, Stephen V, Alain B, et al. Use of a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv bacterial artificial chromosome library for genome mapping, sequencing, and comparative genomics [J]. Infect Immun, 1998, 66 (5): 2221 - 2229.
- [11] Rondon M, Raffel S, Goodman R, et al. Towards functional genomics in bacteria: analysis of expression in *Escherichia coli* from a bacterial artificial chromosome library of *Bacillus cereus* [J]. PNAS, 1999, 96 (11): 6451 - 6455.
- [12] Zhang H B. Construction and manipulation of large-insert bacterial clone libraries: a laboratory manual [M]. USA, Texas: Texas A & M University, college situation, 2000, 2 - 3.
- [13] Kieser M, Kieser T, Hopwood D. A combined genetic and physical map of the *Streptomyces coelicolor* A3 (2) chromosome [J]. Journal of Bacteriology, 1992, 174 (17): 5496 - 5507.
- [14] Hopwood D, Bibb M, Chater K, et al. Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual [M]. United Kingdom Norwich: John Innes Foundation, 1985, 4 - 5.
- [15] 邵铁梅. Zwittermicin A 生物合成基因簇的研究 [D]. 河北农业大学, 博士学位论文, 2005.