

细菌人工染色体文库的构建与鉴定

周向梅¹, 关伟军²

(1. 中国农业大学动物医学院, 北京 100094; 2. 中国农业科学院畜牧研究所, 北京 100094)

摘要:细菌人工染色体是继λ噬菌体、黏粒、噬菌体人工染色体、酵母人工染色体等载体系统之后发展起来的DNA载体系统,以其容量大、遗传特性稳定、嵌合体少、插入片段易回收、操作简便等优点,而被广泛应用于基因组较大的真核生物基因组研究中,并发挥着前所未有的重要作用。因此本文概括性地阐述了细菌人工染色体的发展,以及利用此载体构建基因组文库的机理和程序及其鉴定方法。

关键词:细菌人工染色体;文库构建;鉴定

中图分类号:S188 **文献标识码:**A

文章编号:1008-0864(2003)03-0040-04

由于真核生物基因组十分庞大,因此对于真核基因组的研究,必须有一系列能容纳大片段基因组DNA的载体,最初人们构建真核基因组文库大多使用λ噬菌体(λphage)和黏粒(cosmid)作为克隆载体,二者容纳外源DNA片段的最大能力分别是25 kb和45 kb。尽管这两种系统克隆效率高,但由于插入的DNA片段较小及克隆的DNA片段不稳定,因此限制了它们在染色体步行(chromosome walking)中的应用^[1]。1987年酵母人工染色体(yeast artificial chromosome, YAC)构建成功^[2],这种载体可插入上千kb左右的外源DNA,但利用YACs有嵌合、重排和缺失现象,其插入片段的分离较难,转化效率低等缺陷。为了克服YAC的上述不足,又相继出现了3个候补克隆载体,如噬菌体P1克隆系统(bacteriophage P1 clones)^[3],P1衍生人工染色体(P1-derived Artificial chromosome, PAC)^[4]和细菌人工染色体(Bacterial artificial chromosome, BAC)^[5]等载体系统,其中目前被认为比较理想的是细菌人工染色体,它是1992年以来发展起来的一种新型克隆载体,用于构建人、动物、植物核基因组DNA大片段插入文库。由于它具有以上载体系统无可比拟的优点而迅速得到广泛应用。

基因组文库是用重组DNA技术将某种生物细胞的核DNA的全部片段随机地连接到基因载体上,再转移至适当的宿主细胞中,通过细胞增殖而形成的各个片段的无性繁殖系的总集。其目的在于便于纯

化、贮存和广泛深入的分子生物学研究。构建基因文库时,一个最重要的指标就是它能在多大程度上代表起始材料,即它是否能覆盖所有原初序列。如果某些序列,如缺少限制性酶切位点的重复序列未被克隆,这样的文库就不具代表性。同样如果文库中未能含有足量的克隆,则极有可能会丢失某些基因。因此,文库建成后采用行之有效的鉴定方法来验证其质量也是至关重要的。本文就细菌人工染色体的发展,文库的构建机理和程序及鉴定方法进行概括性地论述,试图对相关研究提供参考。

1 细菌人工染色体(BAC)载体的构建

1.1 人工染色体的发展

DNA克隆技术是分子生物学研究中重要的技术手段之一。自1973年Cohen^[6]构建了第一个质粒载体Psc101以来,越来越多的克隆载体相继涌现,使得克隆载体的整体结构和克隆效率有了很大改善。基于生物体的许多重要性状牵涉到复杂的生理生化反应系列,在大多数情况下受多基因或基因簇的控制,往往与几百—几万kb DNA片段密切相关。特别是庞大基因组的物理图谱和基因图谱的绘制也涉及到大片段DNA的研究,因此,提高载体的容纳量,一直是克隆载体重要发展方向之一。随着脉冲交变电泳技术的发展^[7]以及基因组研究的日益深入,对容量大,并且能独立、稳定存在和遗传的人工染色体的研究已得到了迅速的发展。所谓人工染色体,是指一类能在生物细胞中独立、稳定存在和遗传的人工重组DNA分子,它至少应具备三种功能元件的类似组份:复制起始点(origin of replication),着丝点(centromere)和端粒(telomere)。1983年, Murray^[8]把酵母染色体的着丝点、自主复制序列和端粒三者连接在一起,构建成了第一个人工染色体,称为酵母人工染色体(yeast artificial chromosome, YAC)。在此基础上, Burke^[2]构建了第一个YAC载体,它可插入上千kb左右的外源DNA,是大片段基因组文库构建、染色体

收稿日期:2003-05-13

作者简介:周向梅,女,1973年生,兽医师,在读博士,主要研究方向为动物基础病理。

步移或登陆、物理图谱构建和基因组结构分析等的有力工具。但由于 YACs 有嵌合、重排、缺失、插入片段分离较难和转化效率低等不足,使 YAC 的应用和研究工作受到限制,这促使科学家们积极去研究构建新的人工染色体。目前已成功构建并应用的人工染色体主要有:酵母人工染色体^[8]、细菌人工染色体^[5]、P1 衍生人工染色体^[3]、哺乳动物人工染色体(MAC, mammal artificial chromosome)^[9]和人类人工染色体(HAC, human artificial chromosome)^[10]。另外,植物人工染色体(PAC, plant artificial chromosome)的构建也在进行中。

近年来得到广泛应用的人工染色体主要是 YAC、BAC 和 PAC。比较而言,BAC 具有嵌合、重排频率相对较低;外源 DNA 能较稳定遗传;转化效率高(10⁹—10¹⁰ 转化子/ μ gDNA);转化前又无需对重组子 DNA 进行包装;重组 DNA 容易分离等优点,因而弥补了 YAC 的不足,已得到了迅速发展和广泛的应用。

1.2 BAC 载体构建机理

细菌人工染色体是以大肠杆菌致育因子(F 因子)为基础的合成载体。F 因子的下述特性使其作为基因组 DNA 的高容量载体具有独特的魅力:①低拷贝数(1—2 个分子/细胞),含 parA、parB、parC 基因确保细胞在分裂时,F 因子 DNA 分子能精确地分配到子代细胞。ParB 负责排斥细胞中的外源性 F 质粒。BAC 的低拷贝数加上细胞的隔绝环境,限制了细胞内质粒分子间的重排。实际上这意味着重组 BAC 中外源 DNA 的重排水平和嵌合程度低。②能扩增非常大的 DNA 片段。自然发生的 F 因子能携带 1/4 的大肠杆菌染色体而不显张力或不稳定。③易于操作。由于 F 因子呈闭环结构,所以可以用一些熟悉的技术将它直接从大肠杆菌中分离出来。通常 5 mL 菌液中获得的 BAC DNA 足以用于限制酶切分析、PCR 和荧光原位杂交。另外,载体还含有决定 DNA 复制起始和方向的基因 oriS 和 repC 及氯霉素抗性基因 Cmr。载体中的 lacZ 元件使人们能够利用颜色差异区分重组子。LoxP 和 cosN 位点使克隆序列易于回收。限制性位点能够用于大片段基因组 DNA 的克隆^[11]。例如人工构建的 BAC 载体 pBeloBAC11^[12],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 300kb 以上,可应用于基因组文库构建和大的基因簇的相关研究,见图 1 所示。

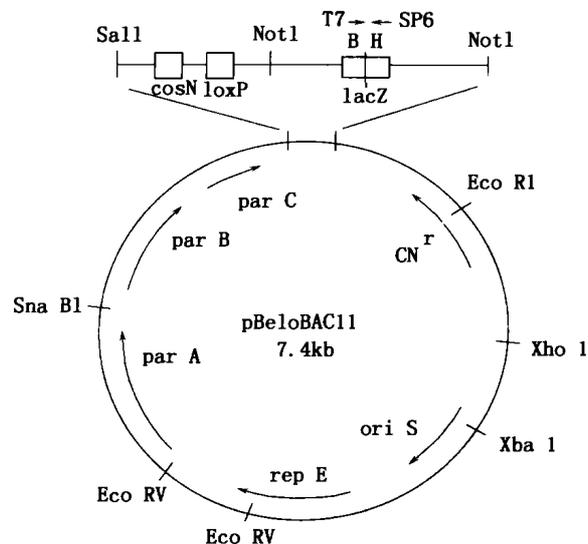


图 1 BAC 载体 pBeloBAC11 基因图

Fig. 1 Structure of pBeloBAC11 vecto

2 BAC 文库的构建程序

2.1 BAC 载体的制备

载体的质量直接关系到文库中空载体的比例和文库的质量,载体的纯度越高,获得阳性克隆的概率越高。为减少或避免空白载体的比例,对载体进行脱磷处理要彻底^[13]。但脱磷后的载体于 -80℃ 不能长时间保存,否则将导致载体迅速降解。

2.2 高分子量 DNA 的制备

在制备高分子量 DNA 时,一般在液氮中将组织研磨成粉末,或通过离心获得血细胞。为了保护核 DNA 免受降解,常采取将细胞核包埋在低熔点琼脂糖中形成栓塞或与低熔点琼脂糖、矿物油混合形成微粒^[1,13,14]。

2.3 高分子量 DNA 的部分消化

首先进行酶切反应最佳酶浓度梯度预试验,然后进行小规模和中等规模酶切,选择最佳酶切反应条件。其目的是产生大小比较集中的片段,一般进行两次片段选择^[1,13,14]。

2.4 大片段 DNA 与载体连接

大片段 DNA 是否能有效连接在载体上主要取决于插入 DNA 片段与载体的比例,对于不同生物采用的比例不同,大多数 BAC 文库采用 1:5—15(摩尔比)^[5,13,14]。

2.5 重组载体转化受体细胞

对于转化大肠杆菌而言,电转化是目前使用最普通的一种手段。电转化效率与插入片段的大小有关,

插入片段越大,转化效率越低;反之,越高。此外,转化条件也直接影响转化效率、插入片段大小及假阳性克隆的含量。

2.6 阳性克隆的挑选

可通过 lacZ 的 α -互补所形成的蓝白菌落筛选阳性克隆。阳性克隆的分检有人工和全自动分子生物学工作台技术(robotics)两种。

3 BAC 文库的鉴定

文库构建完成后,需要对文库进行评价,评价一个 BAC 文库质量高低的标准是文库中克隆的数量,插入片段大小,细胞器 DNA 的含量,及假阳性克隆的含量。

3.1 BAC 文库的筛选

目的是检验构建的 BAC 文库是否具有很好的代表性和实用性。用与目的基因紧密连锁的单拷贝标记探针筛选 BAC 文库。

3.2 BAC 克隆的鉴定

从文库中随机挑选一定量的 BAC 克隆,提取质粒 DNA,酶切后,脉冲电泳检查插入片段的大小。以 Southern 杂交来检验 BAC 克隆插入片段是否来源于原材料。检验假阳性克隆,保证库的质量。

3.3 BAC 克隆的稳定性鉴定

挑选几个较大的 BAC 克隆(分子量分别为 140 和 250kb),分别接种在培养基上,连续继代培养后,分别提取第 0 代和第 100 代 BAC 克隆的质粒 DNA,酶切后,脉冲电泳检查 BAC 克隆中外源 DNA 在继代培养中是否存在和发生突变。

3.4 检查 BAC 文库是否含有细胞器 DNA 的污染

核 DNA 文库混杂细胞器 DNA 的污染,不仅会降低实际库容量,还可能会误导染色体步查走向错误方向^[15]。采用脉冲电泳纯化法制备高纯度大分子量 DNA,进行 BAC 文库的构建,可以从根本上避免细胞器 DNA 的污染。同时以线粒体基因为探针与 BAC 克隆进行菌落原位杂交,检验 BAC 克隆有无细胞器 DNA 的污染。

3.5 BAC 末端的分离

无论是进行基因组分析还是染色体步查,都需要分离 BAC 克隆左右末端。分离 BAC 克隆末端比较常用的方法包括质粒获救^[16]、反向 PCR^[17]和 TAIL PCR 法^[18]。前两种方法都需要酶切和连接,操作复杂,有时由于在多克隆位点附近没有相应内切酶的切点,会无法得到末端序列。最近刘耀光发展的 TAIL

PCR 技术,利用克隆载体多克隆位点的附近序列,合成与其互补的 3 个长特异性引物和 3—6 个随机兼并性引物,通过 3 个 PCR 扩增反应,结合两高一低复性温度的高级循环,来达到扩增特异性克隆末端片段的目的。该技术操作简单,敏感度高,适用范围广,是目前理想的分离 BAC 末端的方法。有的 BAC 分离出多个末端,可以分别进行克隆。这些末端序列一方面正在进行定位,试图丰富该区域的分子标记,另一方面用来筛选 BAC 文库,以期建立一个较大的 BAC 重叠群。

参 考 文 献

- [1] Cai Li, Taylor J. F., Wing R. A. et al. Construction and Characterization of a Bovine Bacterial Artificial Chromosome Library [J]. Genomics, 1995,29:413—425
- [2] Burke D. T., Carle G. F., Olsen M. V. Cloning of Large Segments of Exogenous DNA into Yeast by Means of Artificial Chromosome Vectors[J]. Science, 1987,236:806—812
- [3] Sternberg N. Bacteriophage—P1 Cloning System for the Isolation, Amplification, and Recovery of DNA Fragments as Large as 100 Kilobase Pairs[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. 1990,87:103—107
- [4] 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. Genet. 1994,6(1):84—89
- [5] Shizuya H., Birren B., Kim U J, et al. Cloning and Stable Maintenance of 300—kilobase—pair Fragments of Human DNA in E. coli using an F—factor—based vector[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992,89:8794—8797
- [6] Cohen S. N., Chang A. C., Boyer H. W. et al. Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids in Vitro[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. 1973,70:3240—3244
- [7] Shwartz D. C., Cantor C. R. Separation of Yeast Chromosome—sized DNAs by Pulsed Field Gradient gel Electrophoresis[J]. Cell, 1984,37:67—75
- [8] Murray N. E., Murray K. Manipulation of Restriction Targets in Phage Lambda to form Receptor Chromosomes for DNA Fragments[J]. Nature. 1974,251:476—481
- [9] Farr C. J. et al. Generation of a Human X—derived minichromosome using Telomere—associated Chromosome Fragmentation[J]. The EMBO J, 1995,14:5444—5454
- [10] Harrington J. J. et al. Formation of de Novo Centromeres and Construction of First—generation Human Artificial Microchromosomes[J]. Nature Genet, 1997,15:345—355
- [11] Joseph Sambrook, David W. Russell. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- [12] Kim U. J., Birren B. W., Slepak T. et al. Construction and Characterization of a Human Bacterial Artificial Chromosome Library[J]. Genomics, 1996,34:213—218

- [13] Frijters A. C. J., Zhang Z., Damme M. V. et al. Construction of a Bacterial Artificial Chromosome Library Containing Large EcoRI and HindIII Genomic Fragments of Lettuce[J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 390-399
- [14] Régis Zimmer and Ann M. Verrinder Gibbins. Construction and Characterization of a Large-Fragment Chicken Bacterial Artificial Chromosome Library[J]. *Genomics*, 1997, 42(2): 217-226
- [15] Zhang H. B., Choi S. D., Woo S. S., et al. Construction and Characterization of Two Rice Bacterial Chromosome Libraries from the Parents of a Permanent Recombinant Inbred Mapping Population[J]. *Mol Breed*, 1996, 2: 11-24
- [16] Jiang J., Gill B S., Wang G L., et al. Metaphase and interphase fluorescence in situ hybridization mapping of the rice genome with bacterial artificial chromosomes[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1995, 92: 4487-4491
- [17] Silverman G A., Ye R D., Pollock K M., et al. Use of Yeast Artificial Chromosome Clones for Mapping and Walking Within Human Chromosome Segment 18q21. 3[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 7485-7489
- [18] Liu Y G., Whittier R F. Thermal Asymmetric Interlaced PCR: Automatable amplification and Sequencing of Insert end Fragment from P1 and YAC Clones for Chromosome Walking[J]. *Genomics*, 1995, 25: 674-681

Construction and Identification of Bacterial Artificial Chromosome Library, a Review

ZHOU Xiang-mei¹, GUAN Wei-jun²

(1. China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. China Academy of Agriculture Science, Beijing 100094, China)

Abstract: The construction of DNA vector systems such as λ bacteriophage, cosmid, P1-derived artificial chromosome, yeast artificial chromosome, bacterial artificial chromosome (BAC) system has been developed as another powerful DNA vector system. Being capable of inserting large fragments, maintaining the stability of inserted DNA in *E. coli*, producing few chimeras, recovering inserted DNA from *E. coli* cells, and being easy in library construction, BAC is being widely used and producing unprecedented effect in the research of larger eukaryote genomes. This paper presents a brief introduction to the development of BAC, and the mechanism and process of BAC library construction and identification.

Key words: bacterial artificial chromosome; BAC library construction; identification

【征订】

权威的专业技术指导 超强的可持续操作

欢迎订阅 2004 年《北京瓜菜报》

一报在手专家伴左右 一报在手致富有奔头

《北方瓜菜报》是一份具有高效农业特色、包含大农业所涉及各领域内容的科技类报纸。

《北方瓜菜报》出版几年来一直受到广大读者的喜爱,并得到了各有关单位、新闻界人士和农民朋友的支持,内容也越来越丰富,质量越来越好。报纸以大量的市场信息、典型的致富例子、优良的瓜果品种展示、实用的栽培植保技术成为广大读者了解政策、提高科学种植水平、寻找致富门路的挚友,成为农业科技工作者补充和更新知识的窗口,成为从事农业管理、经营人员组织生产、预测市场行情的助手。

2004 年,《北方瓜菜报》将继续坚持“新型农业的信息性、知识存储的资料性、实用技术的科学性、农经政策的指导性”原则,不断提高自身业务素质 and 知识水平,深入田间地头采写流汗珠的、冒热气的、风吹雨打的活生生的新闻,并在原有的基础上增加花卉、药材等的栽培、植保技术及信息等方面的内容,使《北方瓜菜报》内容更加丰富,版面更加美观,实用性更强。

面对新的一年,报社的全体人员以更加饱满的工作热情、昂扬的斗志,广交四海挚友,期待您订阅《北方瓜菜报》,愿《北方瓜菜报》能成为您忠实的朋友。

《北方瓜菜报》为周刊,“四加二”彩色印刷,每周三出版,全年订价 48.36 元。可到当地邮局直接订阅,全国统一刊号: CN15-0075, 邮代号: 15-28

凡订阅 2004 年度全年报纸者,凭订报收据可获赠 50 册科技图书或 5 张科技光盘,详见 2004 年第一期报纸。

地址:内蒙古乌兰浩特市普惠西街 邮编:137400

电话:0482-8211044

广告发行热线:13305441518