

水稻广亲和品种核DNA cosmid文库的构建和鉴定

易厚富 刘 兵 范 云 王宏斌 刘良式 王金发*

(中山大学基因工程教育部重点实验室, 生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘要:用改进的方法成功构建了一个高质量的水稻广亲和品种(Cpslo17)的核基因组cosmid文库。文库以SuperCos 1为载体,克隆总数约为12万以上,克隆平均插入片段约40 kb,空载率约为5%,文库容量覆盖水稻单倍基因组约9倍以上。用RFLP标记23D12R作为探针,从文库中分离到一个位于水稻广亲和基因座S₃附近的克隆R2I19。

关键词: 水稻; 广亲和品种; cosmid文库

中图分类号: Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-3395(2001)03-0185-05

THE CONSTRUCTION AND CHARACTERIZATION OF GENOMIC COSMID LIBRARY FOR RICE NUCLEAR DNA OF A WIDE COMPATIBLE VARIETY

YI Hou-fu LIU Bing FAN Yun WANG Hong-bin LIU Liang-shi WANG Jin-fa*

(The Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education, School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: A genomic cosmid library of the wide-compatibility-variety rice (*Oryza sativa* L. Cpslo17) had been generated using vector SuperCos1. The library containing more than 1.0×10^5 recombinants with an average insert size of approximately 40 kb represented more than 9 times haploid genomic equivalents, but 5% clones did not carry any insert. Using RFLP marker 23D12R linked tightly to S₃ as probe to screen library, a new clone R2I19 was isolated and determined.

Key words: Rice; Wide compatible variety; Cosmid library

水稻 (*Oryza sativa* L.) 是我国最重要的粮食作物,利用水稻的杂种优势是提高产量的重要途径之一。1973年我国成功地实现了水稻三系配套,充分利用水稻品种间的杂种优势,使水稻单产量有了一次巨大的飞跃,而水稻亚种间杂种优势具有更大的潜力,但是籼粳杂交结实率低是难以克服的问题。某些具有广亲和特性的生态型,它们与籼、粳亚种都表现出一定程度的亲和性,被认为具有广亲和基因,遗传学和育种学的研究都表明水稻的第6染色体S₃座位应有一个广亲和基因,精确

收稿日期: 2000-12-15

基金项目: 国家“863”高技术计划资助项目(BH-01-02-03)

* 通讯作者 Corresponding author

定位并克隆该基因有助于进一步阐明杂交水稻的机理并改良水稻育性,而构建该品种水稻基因组文库是图位克隆该基因的必要条件之一。为了能够用图位克隆方法克隆到广亲和基因,并与我们已有的YAC^[1]、BAC^[2]文库及若干个大容量的cDNA文库配合使用,我们以水稻广亲和品种为材料构建了cosmid文库,并进行了鉴定和筛选。

1 材料和方法

材料 水稻 (*Oryza sativa* L.) 广亲和品种 Cps1017 种籽由国家杂交水稻中心袁隆平院士惠赠。

菌株和载体 菌株: XL1-Blue MR, 本文库宿主菌, 购自 Stratagene 公司。BHB2688, BHB2690 用于离体包装蛋白提取, 中山大学生物工程中心植物分子遗传室保存种。载体: SuperCos 1 柯斯载体, 购自 Stratagene 公司。

主要试剂 限制性内切核酸酶和连接酶购自大连宝生物工程公司或 New England Biolab 公司; 精氨、亚精氨、苯甲基磺酰氟 (PMSF)、十二烷基肌氨酸钠 (SLS)、蛋白酶 K、低熔点琼脂糖、交变电泳用琼脂糖等均为 Sigma 公司产品。Hybond N⁺ 尼龙膜为 Amersham 公司产品, 随机引物标记试剂盒为 GIBCOBRL 公司产品。

水稻种籽萌发及培养 水稻种籽萌发, 30℃ 暗培养至 4–8 cm 高, 用于细胞核提取; 也可用水稻嫩绿叶 (4–6 叶龄), 但在提取细胞核之前, 暗培养 2–3 d, 以减少淀粉含量。

载体 (SuperCos1) 的制备^[3] 载体 DNA 转化宿主菌 XL-Blue MR, 培养后大量提取质粒 DNA, PEG 法纯化; 取 40 μg DNA 用 *Xba*I 酶切, CIAP 脱磷 (以防止载体间相互连接), 再用 *Bam*HI 切, 得到分别含有一个 cos 位点的左右臂, -80℃ 保存备用。

水稻 33–50 kb 片段的获得 水稻黄化苗或嫩绿叶加液氮研磨成粉末, 加入匀浆缓冲液, 缓慢搅拌 30 min, 分别经 150, 300, 350 目的尼龙筛布过滤, 1800 ×g 离心 20 min 收集, 再用匀浆缓冲液洗 2–3 次, 用低熔点琼脂糖包埋成琼脂糖胶块 (plugs), 再用 20 倍裂解缓冲液 50℃ 处理 48 h, 用 20 倍 TE₁₀ 置冰上洗 8 次, 前 4 次加入 1 mmol/L PMSF, 置冰上用部分酶切缓冲液平衡两次, 每次 1 h, 再进行部分酶切^[4]。酶切产物用低熔点琼脂糖凝胶电泳分离, 切下 33–50 kb 的区段, 经 β-agarase 消化, 离心超滤浓缩 DNA, 然后对 TES 进行透析。超滤和透析步骤反复进行两次, 以降低离子浓度等。

文库构建 采用 Sambrook 等方法^[5] 从 BHB2688 和 BHB2690 提取包装蛋白, 贮于液氮中备用。在外源与载体连接时, 比例约 1: 5–1: 10, 16℃ 连接 18 h。按 Stratagene 公司提供的方案进行离体包装; 转染受体、涂氨苄抗性平板。

文库质量检测 and 保存 随机挑选 100 个克隆提取质粒 DNA^[5], 分别用 *Eco*RI 和 *Not*I 酶切、电泳, 以检测空载率和外源片段的大小。

以低拷贝的水稻根部表达序列和单拷贝的水稻 BAC 克隆末端为探针, 用菌落原位杂交法^[5] 对文库进行筛选。

文库保存采用 384 孔板法, 即菌落培养至直径 1 mm 左右, 用牙签将菌落转移至含有抗冻抗性培养基的 384 孔板中, 37℃ 培养过夜, Parafilm 膜封好, 置 -70℃ 冰箱保存。

广亲和基因座附近克隆的筛选 分离并检测与水稻广亲和基因座 (S₃ 区) 紧密连锁分子标记 BAC 克隆 23D12 的右末端, 以其为探针文库高密度膜进行初筛、复筛, 得到一个阳性克隆, 命名为 R2I19, 并采用 Haberhausen 等的方法^[6] 克隆了该克隆的左右末端。

2 结果和讨论

2.1 Megabase级大片段核DNA的获得

在cosmid文库构建时,大片段基因组DNA的分离是技术难点,我们借鉴了YAC、BAC等大片段基因组文库构建的方法,先分离细胞核,然后将其包埋成琼脂块。为了获得较高纯度的细胞核,使用Triton X-100破裂叶绿体^[7],并用多重尼龙筛网过滤后分级分离。从包埋的细胞核中所得的高质量核DNA经适当处理后,易于被限制性内切核酸酶消化,1-10 000 U L⁻¹的*Mbo* I 消化5 min,即可得到呈梯度分布的酶切片段(图1)。

2.2 大片段DNA的部分酶切

构建λ、cosmid、P1和PAC文库时,使用4碱基的内切核酸酶,如:*Sau*3AI及其同裂酶*Mbo*I。我们比较了*Sau*3AI与其同裂酶*Mbo*I的酶切位点特性(表1)^[8]。已知在植物中DNA甲基化主要发生在对称序列的胞嘧啶上,如CpG和CpNpG这样具有对称性结构的C上,在一些植物基因组中约80%的CpG中C是被修饰的^[9],而序列GATC后为G的机率为1/4,后为NpG的机率又为3/16,那么GATC中的C的修饰程度是相当高的(理论上约为20%~35%)。对于水稻这样的小基因组中C甲基化约有18.5%^[10],而*Mbo*I对C甲基化相对*Sau*3AI不敏感(表1中带下划线的C)。据此推论,我们进行了完全酶切比较,结果表明*Mbo*I切割水稻核DNA比*Sau*3AI频率更高(图2),这说明可供*Mbo*I酶切的位点较*Sau*3AI多,这样用*Mbo*I酶切随机性更大。

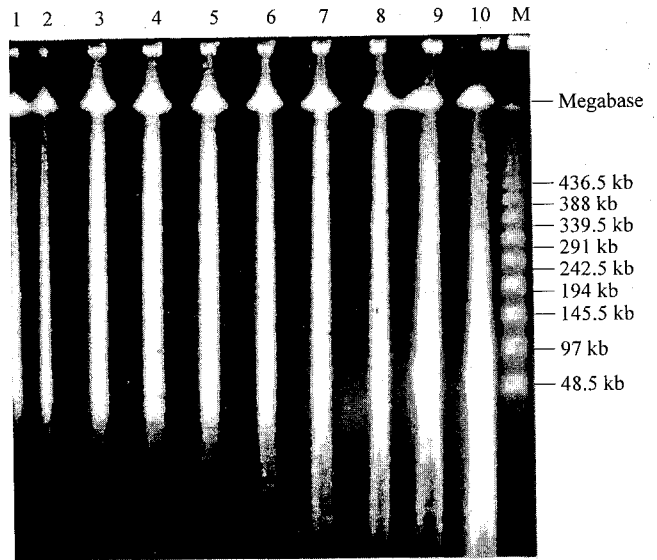


图1 *Mbo*I对Mb级DNA的部分酶切
Fig. 1 Megabase DNA digested partially by *Mbo*I
Restriction enzymes concentration (U ml⁻¹) of *Mbo*I for lane 1 to 10 are: 0, 0.05, 0.1, 0.25, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, M: Marker.

表1 *Sau*3AI和*Mbo*I对其识别位点甲基化敏感性比较

Table 1 Comparison of the sensitivity to methylation between *Mbo*I and *Sau*3AI at restriction sites

酶	识别位点	可切割的甲基化位点	敏感的甲基化位点
Enzymes	Recognized sites	Unsensitive methylated sites	Sensitive methylated sites
<i>Mbo</i> I	GATC	GAT ^m C	G ^m ATC
		GAT ^m C	GA ^m UC
		GAT ^m C	GAT ^m C
<i>Sau</i> 3AI	GATC	G ^m ATC	GAT ^m C
		GAT ^m C	GAT ^m C
		GAT ^m C	GAT ^m C

2.3 文库质量检测及广亲和基因座(S₂区)相关克隆的分离

我们随机挑取100个克隆,提取质粒DNA,分别用*EcoRI*和*NotI*酶切,经普通凝胶电泳和PFGE检测发现5个克隆无外源插入片段,空载率约为5%,造成空载的原因尚不清楚。脉冲场电泳检测插入外源片段平均大小接近40 kb(图3)。

根据定位分析的结果,目前与广亲和基因紧密连锁的分子标记有23D12R和A30,其中以23D12R更为紧密,因此我们用质粒拯救法分离了BAC克隆23D12的右末端23D12R,大小为1.8 kb左右,经鉴定为单拷贝。23d13R为探针对文库进行初筛、复筛,得到一阳性克隆R2I19,插入片段分子量约为40 kb。现已分离了其左右末端,鉴定工作正在进行中。

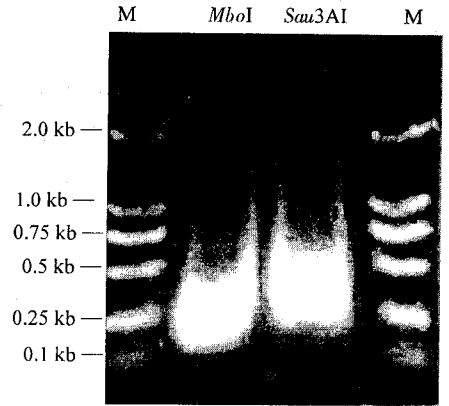


图2 *MboI*和*Sau3AI*对水稻总DNA的酶消化
Fig. 2 Digestion of rice total DNA with *MboI* and *Sau3AI*
M: marker, DL2000

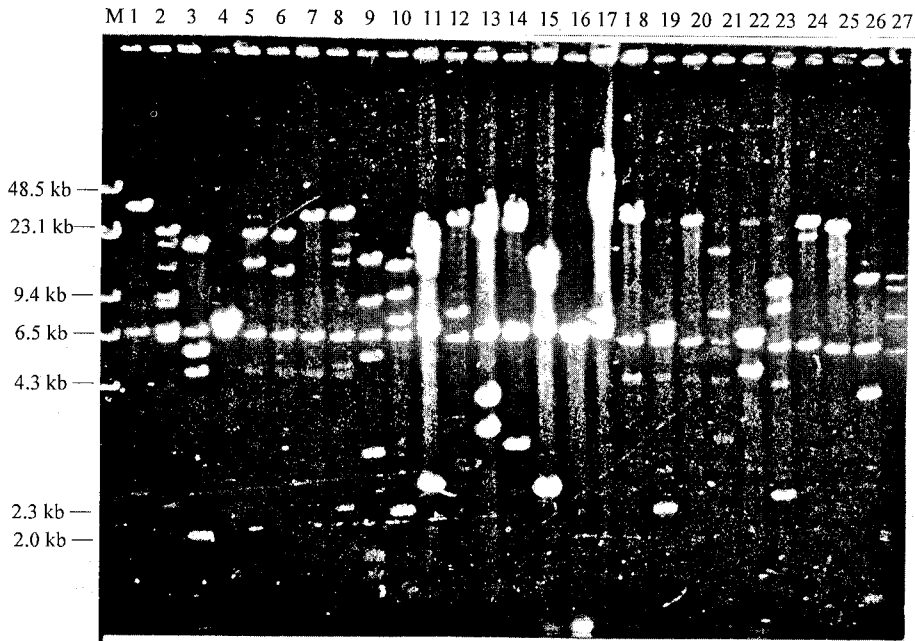


图3 *NotI*对部分cosmid克隆的酶切电泳检测
Fig. 3 Electrophoresis detection of some cosmid clones with *NotI* digestion
M: λ /HindIII, 1 to 27: Digestion of differential cosmid clones with *NotI*

2.4 文库保存

Cosmid文库的保存是一项重要的工作,传统的方法均存在这样或那样的不足^[9]。我们借鉴了大片段文库保存的方法,将文库的全部12万余克隆,分别以三种方式:每个孔点一个,二个和三个转接入384孔板中37°C培养,并于-70°C冰箱保存,在保存过程中省去了通常的扩增步骤,使筛选和

定位都比较方便。

致谢 日本RGP惠赠R2349克隆, 华中农业大学作物遗传育种国家重点实验室刘克德博士惠赠BAC23D12克隆, 华南农业大学刘耀光教授给予启发性建议, 特此感谢。

参考文献:

- [1] 王春新, 王金发, 刘文华, 等. 水稻核基因组DNA的YAC克隆和鉴定 [J]. 生物工程学报, 1996, 12 (1): 11-16.
- [2] Wang G L, 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 J, 1995, 7 (3): 525-533.
- [3] Sambrook J, Fritsch E R, Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [4] Liu Y G, Mitsukawa N, Vazquez-Tello A, et al. Generation of a high-quality P1 library of *Arabidopsis* suitable for chromosome walking [J]. Plant J, 1995, 7 (2): 351-358.
- [5] Nezet D, Drmanac R, Lehrach H. An improved bacterial colony lysis procedure enables direct DNA hybridization using short (10, 11 bases) oligonucleotides to cosmids [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 19 (1): 182.
- [6] Haberhausen G, Muller U. A rapid and efficient method for the cloning of cosmid end-pieces [J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23 (8): 1441-1442.
- [7] Liu Y G, Whittier R. Rapid preparation of megabase plant DNA from nuclei in agarose plugs and microbeads [J]. Nucleic Acids Res, 1994, 22 (11): 2168-2169.
- [8] McClelland M, Nelson M, Raschke E. Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases [J]. Nucleic Acids Res, 1994, 22 (17): 3640-3659.
- [9] Finnegan D J, Genger R K, Peacock W J et al. DNA methylation in plants [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1998, 49: 223-247.
- [10] Wu K S, Roder M S, Canal M W, et al. Isolation of plant DNA for PFGE [M]. Totowa: Human Press, 1992.

《干旱地区农业研究》2002年征订启事

《干旱地区农业研究》由教育部主管, 西北农林科技大学主办, 是全面反映我国干旱、半干旱及湿润易旱区农业科学技术研究新成果、新理论、新技术及国外有关最新研究进展的学术性期刊。本刊为农业科学中文核心期刊, 被多个数据库或检索系统收录。

本刊主要刊登有关干旱、半干旱及半湿润易旱地区的旱农耕作与栽培、土壤培肥与施肥、作物与土壤水分动态、节水灌溉、旱区资源开发利用、作物抗旱生理、综合评述、国外旱农动态等内容。以旱作农业为重点, 重视水资源合理利用和灌溉农业的发展; 应用科学研究与应用基础科学研究并重是本刊的主要特色。适合广大从事旱农研究的专家、学者、科技人员、生产管理工作者和农林及有关院校师生阅读参考。本刊在新的一年里继续承揽广告业务, 有意者请及时与编辑部联系。

本刊为国内外公开发行, 为国际大16开本, 128页, 每期定价8.00元, 全年32元。全国各地邮局均可订阅, 邮发代号: 52-97。漏订者可直接汇款至编辑部补订。地址: 陕西省杨凌 西北农林科技大学西农校区96号信箱; 邮编: 712100, 电话: (029) 7092370; E-mail: yangy@nwsuaf.edu.cn。国外总发行: 北京中国图书进出口总公司。