利用 RFLP 数据进行定向染色体步移

刘秋云

(中山大学生物工程研究中心, 广州 510275)

Jay C. Dunlap

(达特茅斯医学院生化系, 美国 03756)

关键词 染色体步移 RFLP 交换 重组率

染色体步移是分子遗传学一个十分重要的技术, 它在分子克隆上运用得日益广泛。但是, 通常我们不能决定染色体步移的方向, 从两个方向步移既费时又费力。本文阐述了一个能够确定染色体步移方向的方法。借助于这个方法, 在粗糙脉孢霉成功地克隆了 *os-1* 基因。这个方法对其它生物也有借鉴意义。

os-1 突变株对高渗透压敏感, 它在含 4% 氯化钠的固体培养基上不能生长。*os-1* 在表型上与野生型很不相同。*os-1* 突变株的无性孢子聚集成团, 并带橘红或紫色¹⁾。在非允许温度下, 一个温度敏感型 *os-1* 突变(等位基因: NM233t)在含山梨糖和多氧菌素 B 的液体培养基里形成原生质体。山梨糖为 $\beta(1 \sim 3)$ 葡聚糖合成的抑制剂, 多氧菌素 B 是几丁质合成酶的竞争型抑制剂。在允许温度和非抑制条件下, 这些原生质体能够再生细胞壁。*os-1* 是无细胞壁菌株 *Slime* 的必不可少的基因型组成部分。*os-1* 突变改变了细胞壁的通透性及半乳糖胺与葡糖胺的比例。这意味着 *os-1* 突变株的细胞壁的孔径很大。*os-1* 突变还对许多杀真菌剂有抗性, 而野生型则敏感。*os-1*⁺ 的功能尚不知晓, 很可能是细胞壁的重要结构成分。

由于直接克隆 *os-1* 基因比较困难, 我们采用了染色体步移。因为与 *os-1* 相邻的基因 *arg-13* 已被克隆*, 故 *arg-13* 成为了步移的起点。*arg-13* 与 *os-1* 的遗传距离为 5 个图距单位。在粗糙脉孢霉, 90% 的基因组为单一序列, 8% 为重复序列, 2% 为反向重复序列。由于没有太多重复序列的干扰, 长距离染色体步移成功的可能性大大提高。

1 材料和方法

1.1 菌株

41 ~ 238[*os-1*, *prd-4*, *bd a*], 41-91[*os-1*, *prd-4*, *bd a*]

RFLP 菌株为: 野外收集的菌株 Mauriceville-1C-A(FGSC#2225) 与实验室菌株 multicent-2-a(FGSC#4488)。从这两个亲本遗传杂交所产生的 38 个后代分别命名为 FGSC#4450 至 4487^{1), 2)}。

1.2 杀真菌剂

quintozene, 用氯仿溶解, 加入灭菌且冷却的培养基。不同浓度的 quintozene (0.5, 25, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 用来检测野生型, *os-1* 突变株和转化子的敏感性。*os-1* 突变株对低浓度 quintozene 表现出比 *os-1*⁺ 更强的抗性。

1995-03-28 收稿, 1995-06-22 收修改稿

1) Liu Q. Molecular cloning and analysis of *arg-13*, *os-1* and *prd-4*. Ph D thesis, Dartmouth College, 1991

1.3 DNA 抽提、纯化与转化

见参考文献[3].

1.4 染色体步移

基因组文库的 DNA 片断相互重叠. 用插入片断的末端制备探针做 Southern 杂交, 即可从基因组找出重叠克隆. 重复上述过程即可按遗传连续性将相应克隆线性排列. 这个过程就叫染色体步移.

Southern 杂交按 Maniatis (1982) 进行.

1.5 RFLP

亲本之一采用野外收集的菌株, 保证了最大程度的 DNA 多态性. DNA 序列多态性导致限制酶切图谱的改变. 因为粗糙脉孢霉为单倍体, 对于一个位点来说, 每一个后代只从一个亲本继承多态 DNA. 如果不考虑重组, 同一染色体上所有的经典遗传标记和 RFLP 标记将来自于同一个亲本. 重组将使来源于不同亲本的标记基因汇聚在一起. 两个 RFLP 亲本的遗传标记在 38 个后代的分离形式已知^[1,2]. 通过比较上述形式与未知 DNA 片断在 38 个后代的 RFLP 分离形式, 即可判定未知 DNA 片断的遗传位点.

2 结果

在做 RFLP 时, 首先用不同限制酶对亲本基因组 DNA 分别消化, 分别与探针杂交. 在找出能够给予多态性的限制酶之后, 即用此酶对 38 个后代做 RFLP, 以判定其多态性片断的来源.

两个 RFLP 亲本分别简称为 M 和 O. *arg-13* 基因通过亚选择法克隆¹⁾. 用与 *arg-13* 相邻的 DNA 片断 7:12Ba 对亲本做 RFLP, 找到了 *EcoRI* 多态性. 之后对 38 个后代做 RFLP. 多态性片断明显地与位于 1 号染色体右臂的 5SrDNA18 共分离 (见表 1), 与 *arg-13* 的遗传位置相符. *arg-13* 与 5SrDNA 18 之间的重组值为 7.9% (3 个交换/38).

从 *arg-13* 开始的染色体步移只选择了一个方向. 已知 *os-1* 位于 *arg-13* 与 5SrDNA 18 之间¹⁾. 如果步移朝着正确的方向, 即朝 5SrDNA18, 则步移所获得的 DNA 片断与 5SrDNA18 的遗传距离将随步移的推进而逐步减小 (见图 1). 故此可以判别步移方向.

在确证步移方向正确之后, 随即用所获得的 DNA 克隆转化 *os-1* 突变株. 三个粘粒能够表型获救 *os-1* 突变株. 转化

图1 确定染色体步移方向

A: 利用重组率可以确定染色体步移方向. 如果步移由起始点开始朝向标记, 则步移探针与标记之间的重组率将逐步变小. 如果步移背向标记, 则步移探针与标记之间的重组率将逐步变大. 故根据重组率即可判定步移方向. B: 重组率可以根据 RFLP 数据计算. 起始点 7:12B 与 18 的重组率为 7.9% (3/38), 步移探针 21:5H 与 18 的重组率为 5.3% (2/38), 则步移是朝着 18 进行的, 而 *os-1* 位于 18 与 *arg-13* 之间, 故步移方向是正确的. LGIR 代表连锁群 I 右臂

1) 见 256 页脚注

子能够生长在高渗的 (4%NaCl) 斜面上, 表型亦与野生型相同, 转化子不抗 quitozene, 亦与野生型相同. 亚克隆表明 os-1 基因长度在 9 kb 与 14 kb 之间.

表 1 步移起始点与步移探针的 RFLP 分布^{a)}

FGSC#	I	18	21:5Ha	7:12Ba
4450	M	M	M	M
4451	O	O	O	O
4452	M	M	M	M
4453	M	O	O	O
4454	M	O	O	O
4455	O	O	O	O
4456	O	O	O	O
4457	M	M	M	M
4458	M	M	O	O
4459	M	M	M	M
4460	O	O	M	M
4461	O	O	O	O
4462	—	M	M	M
4463	O	O	O	O
4464	M	O	O	O
4465	O	M	M	M
4466	M	M	M	M
4467	M	M	M	M
4468	M	O	O	O
4469	M	M	M	M
4470	M	M	M	O
4471	M	O	O	O
4472	O	O	O	O
4473	M	O	O	O
4474	M	M	M	M
4475	O	O	O	O
4476	O	M	M	M
4477	O	O	O	O
4478	O	O	O	O
4479	—	M	M	M
4480	M	O	O	O
4481	O	M	M	M
4482	O	O	O	O
4483	M	M	M	M
4484	O	O	O	O
4485	O	O	O	O
4486	O	O	O	O
4487	M	M	M	M

a) RFLP 杂交的后代编号为 4450 至 4487. I 和 18 为 5S rDNA (位于染色体 1 上). 7:12Ba 为与 arg-13 相邻的 RFLP 标记, 21:5Ha 为染色体步移后挑选的 DNA 片断, 用来作 RFLP. M, O 分别代表两个亲本. 对每一个后代而言, 经典和分子标记或来源于 M, 或来源于 O. 如果标记之间紧密连锁, 则它们将有十分相似的分离形式, 即共分离. 21:5Ha 与 18 之间有 2 个交换, 而 7:12Ba 与 18 之间有 3 个交换, 故 21:5Ha 位于 18 与 7:12Ba 之间. 7:12Ba 与 21:5Ha 的 RFLP 数据均依据 EcoRI 多态性. — 为无数据. MO 或 OM 示重组事件.

3 讨论

在做染色体步移时,选用的探针应是单拷贝,否则步移会跳到其它染色体上.我们的步移探针均与基因组 DNA 的酶切片断进行了杂交,表明只有一条带或两条带.如果基因文库出现了间隙,则须有另一文库填补.另外,我们在步移中发现有一粘粒 21:3D,其插入片断分别来源于两条染色体.这可能是在构建基因文库时,这些略小的片断污染了 40 kb 的 DNA 组分,并相互连接所致.决定步移是否出现跳跃时,我们采用了 RFLP 定位.

os-1 突变株曾用来制备用于转化的原生质体.一般认为 os-1 为一细胞壁结构基因突变.其渗透压敏感性、胞壁孔径的改变以及对杀真菌剂的抗性(许多杀真菌剂通过细胞壁起作用)均支持上述假设.os-1 也表现出了比 os-1⁺ 快的菌落式生长.os-1 转化子的表型获救频率只有 10% 至 20%,可能与整合的位点或其它因素有关.

在计算重组值时,我们利用了单交换.虽然有双交换的可能性,但如果没有重组热点,在较短遗传距离内发生双交换的概率是很小的.本文所阐述的策略对于长染色体步移来说是很有用处的.它不仅适用于单倍体生物,也适用于双倍体生物.

参 考 文 献

- 1 Metzenberg R L, Stevens J N, Selker E U. A RFLP map for *neurospora crassa*. *Neurospora Newsletter*, 1984, 31: 35~39
- 2 Metzenberg R L, Stevens J N, Selker E U. A restriction fragment length polymorphism map for *neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82: 2067~2071
- 3 Liu Q, Dunlap J C. A rapid and efficient approach for *neurospora crassa* transformation using low melting point agarose purified DNA. *Fungal Genetics Newsletter*, 1988, 35: 24~25