水稻 5460F 细菌人工染色体文库的构建和鉴定

曲雪萍^{*} 伏健民^{*} 李传友 贾建航 金德敏
王倩 杨仁崔^④ 王斌^{*}

(中国科学院遗传研究所, 北京 100101; ④福建农业大学遗传研究所, 福州 350002. ^{*} 并列第一作者, [•] 联系人)

摘要 温敏核不育(thermo-sensitive genic male sterile, TGMS) 水稻在杂交水稻生产中具有重要的应用价值. 前人的研究表明, 该不育性状是由隐性单基因控制的, 本室首次把该基因定位于水稻的第 8 染色体, 并将其命名为 *tms1*. 为了构建覆盖 *tms1* 基因区域的精细物理图谱并最终克隆 *tms1* 基因, 利用 1 个改进的载体 pECBAC1 进行了温敏核不育水稻 5460S 的可育恢复突变体 5460F 细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome, BAC) 文库的构建. 该文库由 16 896 个克隆构成, 克隆片段平均大小为 119 kb, 相当于水稻基因组大小的 4.7 倍, 无叶绿体 DNA 和线粒体 DNA 的污染. 利用与 *tms1* 基因紧密连锁的 3 个单拷贝 AFLP 标记为混合探针, 对 BAC 文库进行筛选, 共得到 8 个阳性克隆.

关键词 水稻 温敏核不育 细菌人工染色体文库

以光、温敏核不育系为基础的两系法杂交水稻具有制种程序简单、组合选配自由、无不良胞质效应等优点, 比传统的三系法具有更广阔的应用前景, 但目前对水稻温敏和光敏核不育在分子水平上所知甚少, 限制了它们的进一步应用. 分离和克隆这两个基因并在分子水平上解析由它们调控的雄性不育的遗传机制, 将会极大地促进水稻遗传学的发展, 并为水稻杂种优势利用开辟新的途径.

近年来, 图位克隆法(map-based cloning) 已逐渐成为分离表达产物和调控特性均未知基因的重要方法之一, 用这一方法分离基因有两个关键环节: 一是寻找与目标基因紧密连锁的分子标记; 二是构建高质量、容易操作的大片段基因组文库, 如 BAC 文库、酵母人工染色体(yeast artificial chromosome, YAC) 文库. 由于 BAC 具有遗传稳定性好、嵌合现象出现少、容易操作、转化效率高、筛选基因方便等优点, 弥补了 YAC 的不足, 已成为目前构建大片段基因组文库应用最广泛的载体系统^[1~4].

目前利用图位克隆法已成功分离了大量的显性基因^[5,6], 但迄今为止尚未见控制农作物重要农艺性状的隐性基因被分离的报道, 而很多农作物重要农艺性状是由隐性基因控制的, 如何定位克隆这类基因已成为研究者面临的新问题. 前人的研究表明, 温敏核不育水稻的不育性状是由隐性单基因控制的, 我们实验室首次把该基因定位于水稻的第 8 染色体并将其命名为 *tms1*^[7]. 近来通过 AFLP 分析已找到一些与 *tms1* 基因紧密连锁的分子标记^[8]. 为了克隆 *tms1* 基因, 本实验室已利用第 1 代 BAC 载体 pBeloBAC11 构建了温敏核不育水稻 5460S 的 BAC 文库¹⁾, 由于 *tms1* 基因为隐性基因, 为便于在克隆到该基因后进行功能互补验证实验, 本研究用新一代 BAC 载体 pECBAC1 构建了 5460S 的可育恢复突变体 5460F 的 BAC 文库.

1) 邱芳, 金德敏, 伏健民, 等. 温敏核不育水稻 5460S 细菌人工染色体文库的构建和鉴定. 中国科学(已接收)

1 材料与方法

() 植物材料. 水稻材料为 5460F. 5460F 是温敏核不育水稻 5460S 的可育恢复突变体. 5460S 和 5460F 是 1 对等位突变体.

() 大分子量核 DNA 的制备. 按照本室发展的快速、简便的方法^[9] 制备高纯度大分子量核 DNA, 具体操作如下: 取水稻黄化苗 20 g, 液氮研磨, 加入 200 mL 1×HB 溶液(0.01 mol/L Tris-HCl, 0.08 mol/L KCl, 0.01 mol/L EDTA, 1 mmol/L 精氨, 1 mmol/L 亚精氨, 0.5 mol/L 蔗糖, 0.15% β-巯基乙醇, pH= 9.4~ 9.5), 搅拌均匀, 2 层纱布、1 层 Mirocloth 过滤, 1 800 × g 离心 20 min, 沉淀用 1×HB 溶液悬浮, 与等体积的 1% 低熔点琼脂糖于 45 °C 混匀, 加入可制成胶块的模具中, 4 °C 凝固 1 h, 取出胶块, 置于 5 倍体积的裂解液(0.5 mol/L EDTA pH= 9.0~ 9.3, 1% sodium lauryl sarcosine, 1 mg/mL 蛋白酶 K) 中 50 °C 裂解 24~ 48 h, 然后把胶块用 0.5 mol/L EDTA (pH= 9.0~ 9.3) 溶液洗 1 遍, 再置于 4 °C 的 0.05 mol/L EDTA (pH= 8.0) 溶液中 1 h, 最后进行脉冲电泳, 用 1% 的低熔点琼脂糖回收 2 Mb 以上的 DNA 片段, 保存于 0.5 mol/L EDTA (pH= 8.0) 溶液中.

() BAC 载体 pECBAC1 的制备. BAC 载体 pECBAC1 大量制备参考 Wang 等人^[2] 的方法. 用氯化铯-溴化乙锭梯度平衡离心法纯化大量提取的质粒 DNA, 获得的闭环 DNA 用 *EcoR* iv 进行消化, 消化完全的 pECBAC1 DNA 用 HK 磷酸酶(Epicenter, USA) 按操作说明书进行脱磷.

() BAC 文库的构建. 将已纯化的大分子量 DNA 凝胶块置于 40 倍体积含 1 mmol/L PMSF 的 TE 中, 50 °C 温育 1 h, 重复 1 次; 然后于 40 倍体积的 TE 中漂洗 2 次, 再置于 10 倍体积的消化液中(1×*EcoR* iv 缓冲液+ 4 mmol/L 亚精胺) 4 °C 温育 30 min, 然后每块凝胶加 200 μL 消化液、1U *EcoR* iv, 冰上温育 2 h; 最后, 37 °C 消化 10 min, 消化后用冰冷的 TE 洗涤 2 次以终止反应. 通过脉冲电泳(CHEF, BIO-RAD: 琼脂糖 1%, 缓冲液 0.5×TBE, 脉冲时间 60~ 90 s, 脉冲电压 4.5 V/cm, 脉冲角度 120°, 电泳时间 18 h, 温度 11 °C) 检查酶切效果, 切下 200~ 600 kb 处的低熔点琼脂糖凝胶块, 通过控制适当的脉冲电泳条件(CHEF, BIO-RAD: 琼脂糖 1%, 缓冲液 0.5×TBE, 脉冲时间 5 s, 脉冲电压 4.5 V/cm, 脉冲角度 120°, 电泳时间 15 h, 温度 11 °C) 使大于 200 kb 的 DNA 片段压缩成 1 条带, 切下此处的低熔点琼脂糖凝胶块置于 4 °C TE 溶液中平衡 2 h. 凝胶块经琼脂糖酶(Epicentre, USA) 消化为液体后与脱磷载体按一定比例进行混合, 用 T4 DNA 连接酶(Boehringer, Germany) 进行连接, 参考 Zhang 等人^[3] 的方法用 Cell-Porator(Gibco, BRL) 电激转化仪进行转化, 通过蓝白斑筛选挑取白斑(重组子) 直接接种到含有 80 μL 培养液(LB, 6 mmol/L K₂HPO₄, 13.2 mmol/L KH₂PO₄, 1.7 mmol/L citrate sodium, 12.5 μg/mL 氯霉素, 0.4 mmol/L MgSO₄, 6.8 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 4.4% glycerol) 的 384 孔培养平板上(Nunc, 384 Well Plate), 37 °C 摇动过夜后, 贮存于 -70 °C 冰箱中.

() 高密度膜的制备和 BAC 文库的筛选. 用 384 针的 Replicator 分 4 次将 4 个 384 孔培养平板中的 1 536 个克隆直接转移至尼龙膜上, 尼龙膜放入 LB 培养基平板上(+ 12.5 μg/mL 氯霉素) 培养约 18 h, 至克隆生长到直径 2~ 3 mm 左右, 参考 Nizetic 等人^[10] 的实验方法用碱裂解法进行膜的处理. 以与 *tmsl* 基因紧密连锁的 3 个单拷贝 AFLP 标记为混合探针筛选 BAC 文库.

() 水稻 BAC 克隆的鉴定. 随机挑选 220 个 BAC 克隆分别接种于 5 mL 含有 12.5 μg/mL 氯霉素的 LB 培养基中, 37 °C 培养过夜, 参考 Sambrook 等人^[11] 的方法提取质粒 DNA, *Not* iv 酶解后, 脉冲电泳(脉冲条件为: 琼脂糖 1%, 缓冲液 0.5×TBE, 脉冲电压 5 V/cm, 脉冲时

间 5~15 s, 脉冲角度 120°, 电泳时间 13 h, 温度 12.5 °C) 检查插入片段的大小, 统计库容量. 为了确定该文库插入片段是否来源于水稻 5460F 基因组 DNA, 随机挑选 18 个 BAC 克隆, 进行 *Not* I 酶切, 并以水稻 5460F 基因组 DNA 为探针进行 Southern 杂交分析. 为了检查该文库是否含有细胞器 DNA 的污染, 随机挑选 382 个克隆转移至 1 张尼龙膜上, 以高粱叶绿体 *psbA* 基因和玉米线粒体 *atp 6* 基因为阳性对照, 并以此为混合探针进行菌落原位杂交分析. 为检测 BAC 克隆的稳定性, 随机挑选 5 个 BAC 克隆分别接种于 5 mL 含有 12.5 µg/mL 氯霉素的 LB 培养基中, 37 °C 培养过夜后, 取 5 µL 培养液接种于 5 mL 含有 12.5 µg/mL 氯霉素的 LB 培养基中, 37 °C 培养过夜, 重复以上操作至第 5 天, 分别提取第 1 天(0 代) 和第 5 天(100 代) 细菌培养物中 BAC 克隆的质粒 DNA, *Not* I 酶解后, 脉冲电泳检查 BAC 克隆在继代培养前后是否有所变化.

2 实验结果

2.1 大分子量 DNA 的制备

构建高质量 BAC 文库的关键之一是获得高纯度的大分子量 DNA. 由图 1 看出, 采用本实验室改进方法制备的大分子量 DNA 纯度很高, 分子量在 2.2 Mb 以上, 基本上不含有小分子量 DNA, 避免了小分子量 DNA 对后续实验的干扰. 同时, 大分子量 DNA 需要经过部分酶切才能用于 BAC 文库的构建, 如图 1 所示, 由改进方法制备的大分子量 DNA 很容易被限制性内切酶消化, 仅需 1U *Eco*RI 37 °C 酶切 10 min, 即可获得集中在 200~600 kb 范围内的酶切产物, 且重复性很好. 而按 Zhang 等人^[12]方法制备的 DNA 要获得同样的酶切效果, 需要使用 10 倍以上的酶量和 3 倍以上的时间.

2.2 BAC 文库的鉴定

由于较小的外源 DNA 片段优先与 BAC 载体连接, 为了提高 BAC 克隆插入片段的大小, 许多研究者尝试用脉冲电泳二次回收的大片段 DNA 进行 BAC 库的构建, 但转化效率极低. 水稻 5460F BAC 文库来源于 4 个连接产物, 其中 1 个来自脉冲电泳一次回收所得的大分子 DNA 与载体的连接产物, 其余 3 个来自脉冲电泳二次回收所得的大分子 DNA 与载体的连接产物, 从 2 种不同连接体系获得的 BAC 克隆中各随机挑选 110 个, 鉴定其插入片段的大小, 结果如图 2 所示. 利用脉冲电泳进行大片段 DNA 的二次回收, 虽然转化效率较一次回收大为降低, 但可以去除小分子量 DNA, 提高 BAC 克隆插入片段的大小, 保证 BAC 文库的质量. 经统计, 该文库含有 16 896 个 BAC 克隆, 平均插入片段大小为 119 kb, 相当于水稻基因组大小的 4.7 倍, 达到了建库所要求的库容理论值.

为了进一步鉴定该文库, 随机挑选 18 个 BAC 克隆, 进行 *Not* I 酶切, 并以水稻 5460F 核基因组 DNA 为探针进行 Southern 杂交分析. 如图 3(a) 所示, 所有 BAC 克隆至少有 2 个 *Not* I 酶切片段, *Not* I 酶切位点在水稻中出现的频率较其他植物略高, 可能是由水稻基因组中较高的 GC 含量和较低的 C 甲基化程度所致^[13]. 如图 3(b) 所示, 18 个 BAC 克隆在 *Not* I 酶切片段处均有杂交信号, 说明 BAC 克隆的插入片段全部来源于水稻 5460F 核基因组 DNA, 无假阳性克

图1 水稻大分子量 DNA 的部分酶切图谱

1——粗提的大分子量 DNA, 2——脉冲电泳纯化的大分子量 DNA, 3——*Eco*RI 部分酶切大分子量 DNA, M—— λ ladder(48.5 kb)

隆,保证了库的质量.

以高粱叶绿体 *psbA* 基因和玉米线粒体 *atp6* 基因为混合探针进行菌落原位杂交,检查细胞器DNA对BAC库的污染,结果如图4所示,随机挑选的382个克隆均无杂交信号,而2个阳性对照均有强烈的杂交信号,说明水稻5460F BAC文库基本排除了细胞器DNA的污染.

YAC克隆虽插入片段很大,但插入片段内部存在的缺失、分子重排等现象制约了它的应用^[4]. BAC载体系统较YAC的明显优点之一就是其插入片段在大肠杆菌中非常稳定.图5表明,随机挑选的5个克隆经连续培养5 d(约100代),其插入片段的酶切图谱较第1天(0代)无任何明显差异,充分说明5460F BAC文库是稳定的.

利用与 *tms1* 基因紧密连锁的3个单拷贝标记为混合探针,从该文库中共筛选出8个阳性克隆,说明该BAC文库具有很好的代表性和实用性.

3 讨论

目前以 pBeloBAC11 为载体国内外已构建了几个水稻 BAC 文库^[2,3],与这些已建成的水稻 BAC 文库相比,本文构建的水稻 5460F BAC 文库具有以下几个突出的特点:

(1) 温敏核不育水稻是我国最先发现的一种特殊的种质资源,在已构建的水稻 BAC 文库中没有该基因的存在.

(2) 水稻 5460F BAC 文库采用了新一代 BAC 载体 pECBAC1. pECBAC1 和 pBeloBAC11 相比较增加了 1 个 *EcoR* *iv* 单克隆位点,这一位点的引入在以下几个方面具有独到的优势^[14]: 首先, *EcoR* *iv* 是一个酶切效果非常稳定的限制性内切酶, *EcoR* *iv* 和 *EcoR* *iv* 甲基化酶的结合使用可以较好的控制酶切条件,产生重复性很好的部分酶切效果,这对于高质量大片段基因组文库的构建是极其重要的;其次, pECBAC1 中 *EcoR* *iv* 单克隆位点的引入可以与 RARE 酶切技术结合,从基因组中克隆特定的 *EcoR* *iv* 酶切片段;另外, *EcoR* *iv* 单克隆位点的引入可以与新一代的分子标记技术 AFLP 的酶切位点统一起来, AFLP 技术的突出优点之一是多态性检出率高,在对染色体上某个

图2 BAC克隆插入片段分布图
转化效率为: 一次回收——158个转化子/μL连接产物,
二次回收——87个转化子/μL连接产物

图3 BAC克隆的Southern杂交分析
(a) BAC克隆 *Not* *iv* 酶切图谱; (b) 以水稻 5460F 基因组 DNA 为探针的 Southern 杂交. M ——λ ladder (48.5kb), 1~18 ——BAC 克隆/*Not* *iv*

图4 BAC 克隆细胞器 DNA 污染的检测

A——高粱叶绿体 *psbA* 基因(阳性对照), B——玉米线粒体 *atp6* 基因(阳性对照)

图5 BAC 克隆的稳定性检测

M—— λ ladder(48.5kb), a~e——BAC 克隆
/Not iv, 1——0代, 2——100代

特定区域构建高密度分子标记图谱时, 2个相邻 AFLP 标记之间的距离可以达到或小于 50 kb, 而 BAC 文库中每个克隆的插入片段的平均大小一般大于 100 kb, 这样可以将目的基因定位于 2个相邻的 AFLP 标记之间, 减少了在利用图位克隆策略克隆基因时染色体步行的步骤.

(3) 采用本实验室发展的一种快速制备植物高纯度大分子量 DNA 的方法, 进行了 5460F BAC 文库的构建. 该方法简便易行, 制备的 DNA 纯度很高, 易于被限制性内切酶部分和完全消化, 且酶切具有很好的重复性. 利用这一方法大大提高了 5460F BAC 文库构建的速度和质量.

(4) 探索了大量制备高质量 BAC 载体、获得高效连接产物、提高转化效率的方法, 优化了构建 BAC 文库的条件.

(5) 排除了 BAC 文库中细胞器 DNA 的污染. 以前报道的 BAC 文库都不同程度的存在细胞器 DNA 的污染. BAC 文库中细胞器 DNA 的污染, 不仅会降低库容量, 还会增加重叠克隆群的建立、图位克隆基因等后续工作的难度.

(6) 5460F BAC 文库是一个高质量 BAC 文库. 5460F BAC 文库插入片段的平均大小为 119 kb, 克隆总数为 16 896 个, 库容量约为水稻单倍体核基因组的 4.7 倍, 从理论上讲, 用任何 1 个单拷贝探针筛选 5460F BAC 文库, 获得阳性克隆的概率都大于 99%. 我们用与 *tms1* 基因紧密连锁的 3 个单拷贝 AFLP 标记为混合探针筛选 5460F BAC 文库, 共得到 8 个阳性克隆, 说明 5460F BAC 文库已达到构建高质量基因组文库的要求.

总之, 水稻 5460F BAC 文库的成功构建, 一方面为生物大片段基因组文库的建立在技术上摸索了新的路子, 为定位克隆 *tms1* 基因提供了条件; 另一方面为水稻基因组精细图谱的构建、许多重要基因的克隆、基因功能的鉴定及染色体结构与功能关系的研究奠定了基础. 对该文库的详细分析及覆盖 *tms1* 基因区域重叠克隆群的构建正在进行之中.

参 考 文 献

- 1 Woo S S, Jiang J M, Gill B S, et al. Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of *Sorghum bicolor*. Nucleic Acids Research, 1994, 22(22): 4922~ 4931
- 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. The Plant Journal, 1995, 7(3): 101~ 109
- 3 Zhang H B, Choi S D, Woo S S, et al. Construction and characterization of two rice bacterial artificial chromosome libraries from the parents of a permanent recombinant inbred mapping population. Molecular Breed, 1996, 2: 11~ 24
- 4 Frijters A C J, Zhang Z, Damme M, et al. Construction of a bacterial artificial chromosome library containing large *EcoR* iv and *Hind* Ⅲ genomic fragment of lettuce. Theor Appl Genet, 1997, 94: 390~ 399
- 5 Song W Y, Wang G L, Chen L L, et al. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene *Xa-21*. Science, 1995, 270: 1804~ 1806
- 6 Dixon M S, Jones D A, Keddie J S, et al. The tomato *G-2* disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. Cell, 1996, 84: 451~ 459
- 7 Wang B, Xu W W, Wang J Z, et al. Tagging and mapping the thermosensitive genic male-sterile gene in rice with molecular markers. Theor Appl Genet, 1995, 91: 1111~ 1114
- 8 Wang B, Li C Y, Zheng H G, et al. Primary study on rice AFLP analysis-optimization of reaction conditions and analysis of TGMS rice allelic mutant lines. Acta Botanica Sinica, 1999, 41(5): 502~ 507
- 9 伏健民, 邱芳, 谢伟武, 等. 植物高纯度大分子量 DNA 的快速、简便制备方法. 科学通报, 1998, 43(23): 2570~ 2572
- 10 Nezet D, Dmanac R, Lehrach H, et al. An improved bacterial colony lysis procedure enables direct DNA hybridization using short (10, 11 bases) oligonucleotides to cosmid. Nucleic Acids Research, 1990, 19: 182
- 11 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, et al. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 12 Zhang H B, Zhao X, Ding X, et al. Preparation of megabase-size DNA from plant nuclei. The Plant Journal, 1995, 7: 175~ 184
- 13 Wu K S, Roder M S, Canal M W, et al. Isolation of plant DNA for PFGE. In: Bumeister M, Ulanorsky L eds. Methods in Molecular Biology, Vol 12. Totowa, NJ: Humana Press, 1992. 145~ 157
- 14 Ferrin L J, Camerini-Otero R D. Long-range mapping of gaps and telomeres with *RecA* assisted restriction endonuclease (RARE) cleavage. Nature, 1994, 6: 379~ 383

(1998-11-06 收稿, 1999-01-29 收修改稿)

中国大陆地壳运动的背景场

朱文耀 程宗颐 王小亚 熊永清

(中国科学院上海天文台, 上海 200030)

摘要 中国地壳运动是在全球地壳运动背景场中发生的, 为了研究中国大陆地壳构造运动的背景, 利用中国大陆及其周围地区的国际 GPS 地球动力学服务网的 12 个 IGS 站 3 年多(1995 年 5 月~ 1996 年 6 月)的 GPS 观测资料测定了这些 IGS 站的水平位移速率, 并由此初步分析了中国大陆周围各块体对中国大陆地壳运动的影响。

关键词 GPS 测量 中国大陆地壳运动 背景场

中国大陆处于欧亚板块的东南角区, 受太平洋和印度洋板块以及欧亚板块本体围限, 其独

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1999-44-14-1532>