

文章编号: 1004-7271(2004)02-0107-04

黑龙江镜鲤基因组 DNA 文库的构建

杨亮亮^{1,2}, 孙效文²

(1. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090;
2. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要 纯化镜鲤体组织的高分子量基因组 DNA, 经限制性内切酶 *Sau3A I* 部分消化后, 10%~40% 蔗糖密度梯度离心分离并回收 9~23kb 的 DNA 片段。以 λ DASH II 为克隆载体, 与 9~23kb 的 DNA 片段进行连接和包装, 构建了镜鲤的基因组 DNA 文库。随机选取 5 个独立的噬菌斑, 提取 DNA 后用 *EcoR I* 与 *BamH I* 进行酶切分析, 证明克隆插入率为 100%。经测定, 该文库的滴度是 10^8 pfu/mL。根据公式 $N = \ln(1-P)/\ln(1-f)$, 99% 的镜鲤基因组包含在该基因组文库中。以鲤 IGF- II 基因探针对该基因组文库进行 Southern 杂交, 筛选到相关的阳性克隆, 证明这是一个较为完整的镜鲤基因组 DNA 文库。

关键词 镜鲤; 基因组; DNA 文库

中图分类号 S917 文献标识码: A

Construction of genomic DNA library of the mirror carp

YANG Liang-liang, SUN Xiao-wen

(1. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;
2. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Science, Harbin 150070, China)

Abstract High molecular weight genomic DNA from the mirror carp was extracted and partially digested with *Sau3A I*. 9-23kb DNA fragments were collected by 10%-40% sucrose gradient centrifugation and ligated into λ DASH II vector. Recombination DNA was packaged. The construction of the genomic DNA library in mirror carp was completed. 5 separated plaques were selected randomly. The extracted DNA was analyzed by the digestion of *EcoR I* and *BamH I*. The results show the recombination rate is 100%. The titer of the library is 10^8 pfu/mL and according to the formula $N = \ln(1-P)/\ln(1-f)$, the genomic DNA library consists 99% genome of mirror carp. The Southern blot were carried out with the probe of common carp IGF- II in the library. Many positive clones proved that this is a completed genomic DNA library of mirror carp.

Key words mirror carp; genomic; DNA library

建立一个完整的基因组 DNA 文库是开展分子生物学研究的基础工作, 是分离特定基因, 特别是分离高等真核生物基因的有效手段。特定基因的分离和克隆对研究基因的结构、表达、调节机制以及生产出对科学、医学及工农业都极其重要的生物分子具有十分重要的意义。

镜鲤作为我国一大水产养殖品种, 其生长、抗病等机理的分子生物学研究对促进生产有着举足轻重的意义。本研究构建了镜鲤基因组 DNA 文库, 以分离镜鲤的重要基因, 并对该文库特性进行了分析。

1 材料和方法

1.1 鲤鱼材料

以镜鲤为实验材料,取其肝脏作为基因组 DNA 提取材料。

1.2 基因组 DNA 抽提

取镜鲤肝组织 5g,在有液氮的不锈钢钵中研成粉末状,溶入 50mL 裂解液中(10mmol/L EDTA, pH 8.0; 200 μ g/mL Proteinase K; 0.5% Sarcosyl)。搅拌均匀,在 50 $^{\circ}$ C 水浴中消化 3h。加酚/氯仿抽提,经透析后,用 0.4% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定 DNA 分子量大小^[1]。

1.3 基因组 DNA 的部分消化和 9~23kb 片段的回收

先进行一系列小规模实验来确定产生 9~23kb 片段的最佳酶量。取 200 μ g 高分子量 DNA 用 Sau3A I 酶进行部分消化,经酚/氯仿抽提,乙醇沉淀后,部分酶切样品小心加在 10%~40% 蔗糖密度梯度上,20 $^{\circ}$ C 25000r/min 离心 22h,分管收集梯度离心样品,0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析含有 9~23kb DNA 片段的管子^[2]。

1.4 DNA 体外连接和包装

噬菌体 DASH II 载体和包装蛋白从 Stratagene 公司购买,在离心管中加入 1 μ g 的 Lambda DASH II 载体,0.3 μ g 的 9~23kb 酶切片段,0.5 μ L 10 \times 连接缓冲液,2U 的 T4 DNA 连接反应 4 $^{\circ}$ C 过夜。加入一份刚融化的包装蛋白,22 $^{\circ}$ C 保温 2h,后加入 500 μ L SM 缓冲液,加入 20 μ L 氯仿,混合后离心去残渣,4 $^{\circ}$ C 贮存,同时测定文库滴度,进行文库扩增。

1.5 噬菌斑 Southern 杂交

用顶层琼脂糖(10g/L 蛋白胨、8g/L NaCl、6g/L 琼脂糖)制备噬菌斑平板。硝酸纤维素膜覆盖于噬菌斑平板上 5min,揭起后依次放在被变性液(0.2mol/L NaOH、1.5mol/L NaCl)和中和液(0.4mol/L Tris-HCl pH7.6、2 倍 SSC)浸透的滤纸上,各 5min,80 $^{\circ}$ C 烘干 1h,用于杂交。杂交的探针为鲤鱼 IGF-II 基因,采用末端标记法标记。室温下洗液(2 倍 SSC,0.1% SDS)洗膜两次,放射自显影^[2]。

1.6 噬菌体 DNA 制备与限制性酶切分析

随机挑取 5 个独立的噬菌斑,分别与 LE392 混合培养后,抽提噬菌体 DNA 分别用 EcoR I 和 BamH I 消化,0.8% 琼脂糖电泳分析。

2 结果

2.1 基因组的制备、消化和分级分离

基因组文库构建首先要求获得高分子量基因组 DNA,透析后经 0.4% 琼脂糖凝胶电泳检测,有一条亮带,大小在 100kb 以上,说明抽提的基因组 DNA 符合构建基因组文库的要求。

在部分酶切消化预实验中,1 μ g 的基因组 DNA 与 0.007U 的 Sau3A I 在 37 $^{\circ}$ C 温育 1h 的酶切产物经 0.8% 琼脂糖电泳检测,大部分的 DNA 片段集中在 9~23kb 间,如图 1 所示,所以大规模的 DNA 消化应在此条件下,产物经 10%~40% 蔗糖密度梯度离心,共收集 20 管,90% 的 9~23kb 片段集中在 5~9 管,如图片 2。回收 5~7 管 DNA 片段,0.8% 琼脂糖

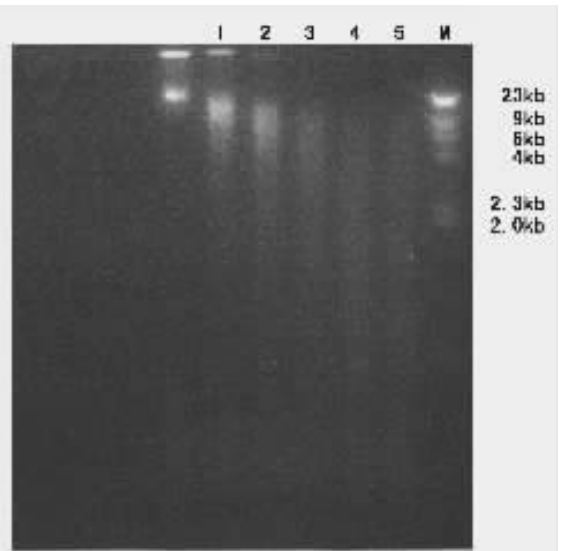


图 1 Sau3A I 酶切预试验

Fig.1 Pre-experiment of Sau3A I digestion
M:Marker 泳道 1-5 依次增加酶量消化结果

凝胶电泳检测 ,如图 3 所示 ,片段大小在 9 ~ 23kb 间。

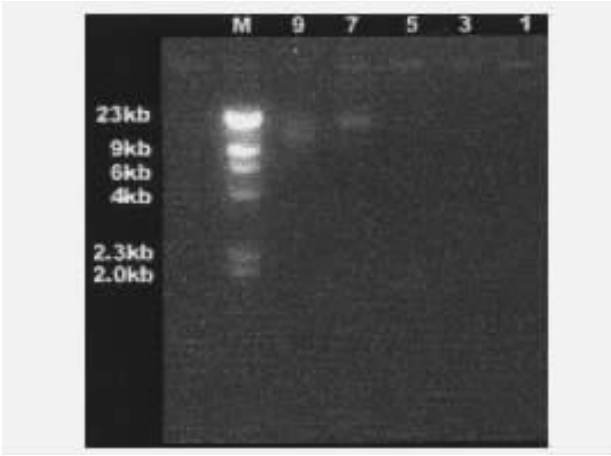


图 2 蔗糖密度梯度离心结果

Fig.2 The result of sucrose gradient centrifugation

M :Marker 泳道 1 - 9 :梯度离心酶切的片段

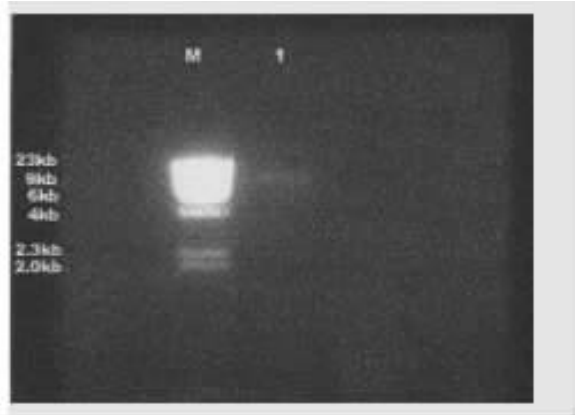


图 3 回收 DNA 片段

Fig.3 Reclaiming of DNA fragments

M :Marker Lane 1 :回收的 DNA 片段

2.2 DNA 片段的体外连接和包装

使用去磷酸化的 DASH II 载体可降低非重组噬菌体背景 ,λDASH II 野生型在 P2 原噬菌体溶原株中生长受限制 ,而通过一段外源 DNA 对填充片段置换就产生了 Spi - 重组噬菌体 ,能在 P2 溶原的大肠杆菌中生长 ,非重组噬菌体背景也可降低。连接后包装产物滴度为 10^8 pfu/mL。

2.3 DNA 文库特性分析

噬菌体 DNA 的 EcoR I 和 BamH I 酶切分析表明 ,所有的克隆都含有插入片段 ,插入率为 100%(图 4 ,图 5)。

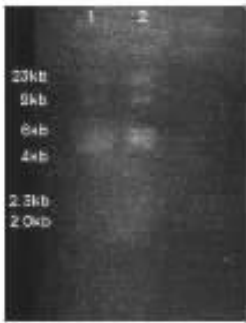


图 4 基因库噬菌体 DNA EcoR I 酶切

Fig.4 Analysis of inset DNA fragments of

Mirror carp genomic DNA library by EcoR I

泳道 1 - 2 :噬菌体 DNA EcoR I 酶切

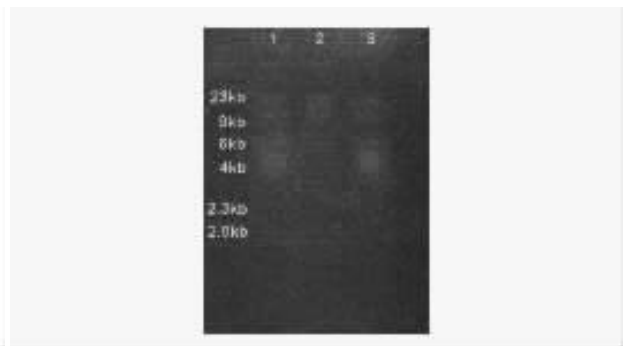


图 5 基因库噬菌体 DNA BamH I 酶切

Fig.5 Analysis of inset DNA fragments of

Mirror carp genomic DNA library by BamH I

泳道 1 - 3 :噬菌体 DNA BamH I 酶切

为检测镜鲤基因组文库的代表性 ,本试验以鲤 IGF - II 基因作为探针进行 Southern 杂交 ,结果表明该文库中存在众多包含该基因的克隆。具有的阳性信号噬菌斑数每个平板超过 40 个。

3 讨论

基因组 DNA 文库的构建成功在很大程度上取决于高分子量 DNA 的抽提 ,因为较长的 DNA 片段经

酶切后,两端均为粘性末端的比例较大,与载体臂相对应的粘性末端匹配,易连接形成重组 DNA,有助于提高基因的重现性^[3]。本文镜鲤高分子量的 DNA 抽提是在 EDTA 作用下,蛋白酶 K 消化细胞,酚/氯仿抽提后经透析去除低分子量杂质获得的。酶切消化的大规模试验中,反应条件由于体积的增加,与预试验反应条件有一定变化,需要适当延长反应时间,本试验的 9~23kb 片段的大规模制备是利用预试验得到的最佳酶量消化 1.5h 得到的。该文库滴度为 10^8 pfu/mL。根据公式 $N = \ln(1 - P) / \ln(1 - f)$ (其中 p 为期望概率, f 为单个重组体中的插入片段在基因组中所占的分额比值, N 是所需要的重组体数目)计算出在该文库中任一给定 DNA 序列的概率为 99%^[4]。酶切分析表明所随机挑选的克隆均为重组克隆,可见构建的 DNA 文库非重组背景很低。检测文库代表性杂交试验选用了鲤 IGF - II 基因,该基因在动物生长过程中起着重要作用,与生长速度呈正相关^[5]。噬菌斑 Southern 杂交筛选到 IGF - II 基因,且阳性克隆数目较多。从上述结果表明,所构建的基因组 DNA 文库非重组背景较低,具有较强的代表性,是一个比较完整的镜鲤基因组 DNA 文库。

参考文献:

- [1] Yang Z Y, Zhang Q Q. Construction of a genomic DNA library of *Dunaliella salina* [J]. Acta Phytophysiologica Sinica, 2000, 26(1): 75 - 78.
- [2] 黄培堂, 朱厚础, 张兆山, 等. 分子克隆试验指南(第三版) [M]. 北京: 科学出版社, 2002. 224 - 233.
- [3] Brian S, Richard C P, Normen D. Representation of DNA sequences in recombinant DNA libraries prepared by restriction enzyme partial digestion [J]. Gene, 1982, 19: 201 - 209.
- [4] 颜子颖, 王海林. 精编分子生物学试验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 1998. 75 - 161.
- [5] 任明强, 胥清富, 王子荣, 等. 添喂海南霉素对山羊肝脏胰岛素样生长因子的影响 [J]. 动物营养学报, 1999, 11(1): 259.