

经验交流

基因组 YAC 文库构建方法的几点改进*

杨智勇 匡达人¹⁾

(中国科学院上海细胞生物学研究所, 上海 200031)

黎伶俐 陆 劭 宋明浩 戴和平 龙志高 潘 乾 李麓芸 夏家辉¹⁾

(湖南医科大学医学遗传学国家重点实验室, 长沙 410078)

摘要 以 pJS97、pJS98 为载体, 对中国人基因组 YAC 文库的构建进行了尝试. 建立了一种对小片段 DNA “原位电泳筛选”的方案, 采用多胺溶液处理以减少大片段 DNA 的降解, 使整个建库工作更加简便、有效. 此外, 改进了转化子的挑取和保存的方法, 既简化了操作, 又减少了杂菌污染和交叉污染. 这些改进的方案, 可以推广到其他高等生物基因组 YAC 文库的构建和应用工作.

关键词 酵母人工染色体, YAC 文库构建, 原位电泳筛选

酵母人工染色体 (YAC) 载体、宿主系统^[1]极大地提高了克隆外源 DNA 的能力, 利用酵母同源重组进行基因取代或基因打断, 还有助于研究 YAC 克隆片段的功能^[2]. 目前, YAC 技术、脉冲电泳 (PFGE) 技术以及 PCR 技术, 已成为高等生物基因组研究的锐利武器, 包括基因组 YAC 文库的构建与应用. 然而, 基因组 YAC 文库的构建, 是一个步骤繁多、过程冗长的的工作, 并且常常碰到许多困难: 大片段 DNA 容易降解、酵母菌转化率低、保存转化子的工作量大等等. 我们对建库方法进行了全面的探讨^[3], 发展和建立了多个改进措施, 使建库工作更加简便有效.

1 材料与方法

1.1 常规建库方法

所用的载体为 pJS97 和 pJS98, 宿主菌株为 YPH274^[4]. 质粒的抽提、酶切、脱磷, 基因组 DNA 的制备、部分酶切、与载体的连接, 宿主菌原生质体的制备及转化, 均参照文献 [5] 的方法进行.

1.2 小片段 DNA 的“原位电泳筛选”

将含有 DNA (部分酶切产物或连接产

物^[3]) 的低熔点琼脂糖凝胶块 (6 mm × 2 mm × 8 mm) 放入加样孔中, 在 Bio-Rad 的 CHEF DR II 脉冲仪中进行电泳. 胶浓度为 1%, 缓冲液为 0.5 × TBE, 槽温 15℃, 电压 150 V, 脉冲时间为 30 s. 电泳 0.8 h 之后, 停机, 将胶块夹出, 使胶块沿电泳方向的取向转 180°, 继续电泳 1.2 h.

1.3 多胺溶液的使用

为了减少加热熔化^[3]对胶块中 DNA 的降解作用, 我们在连接缓冲液和琼脂糖酶缓冲液中分别加入了多胺溶液 (多胺: 0.75 mmol/L 亚精氨, 0.3 mmol/L 精氨)^[6].

1.4 转化子的挑取和保存

采用“甘油一步到位”的方案. 转化子在双选择平板^[3]上长出之后, 用无菌牙签将单菌落挑至 1.5 ml 小管, 管内预先装有 0.8 ml YPDG (2% 胰蛋白胨, 1% 酵母抽提粉, 2% 葡萄糖, 20% 甘油), 在 30℃ 下培养 4~5 d, 摇匀、分装, 置 -70℃ 下冻存.

*国家自然科学基金及湖南医科大学遗传学国家重点实验室开放课题经费资助项目.

¹⁾通讯联系人.

收稿日期: 1995-09-25, 修回日期: 1996-04-11

2 结果与讨论

2.1 连接之前和连接产物的片段选择

去除小片段 DNA 的常用方法是蔗糖梯度离心^[7]或浓缩带^[8]。由于蔗糖梯度离心法是在液体中操作, 容易造成大片段 DNA 的降解。浓缩带法需从电泳胶中回收 DNA, 若胶切得少, 将损失许多 DNA; 若胶切得多, 转化时 DNA 的浓度就可能太小而使转化率降低。而且这两种方法都较为繁琐、费时。为此, 我们尝试了一种新的去除小片段 DNA 的方法, 称之为“原位电泳筛除”。我们以含有 AB1380 DNA 的胶块为模型进行脉冲电泳分析 (图 1)。首先在孔 1、孔 2 中加入胶块, 电泳 0.8 h 之后, 将孔 1 的胶转 180°后放入孔 3, 并在孔 4 中放一新胶, 继续电泳 1.2 h。最后, 将孔 3 的胶转移至孔 5, 再置一新胶于孔 6, 电泳 10 h。实验表明, 经过“正”(孔 1)、“反”(孔 3)方向两次电泳分离, 小分子 DNA (小于 300 kb) 已完全去除, 而高分子 DNA 仍大部分保留在胶块中 (孔 5 中的加样孔及其前方浓缩带的总和)。利用这种“原位电泳筛除”的方案, 大大缩短了实验时间 (从通常的 20 h 以上减至 3 h 左右), 片段大小能满足建库需要。此外, 由于克服了浓缩带法可能发生的“过载”的问题, 还有望通过制备高浓度 DNA 胶块的方式提高转化率。关于后一点, 我们正在着手进行。

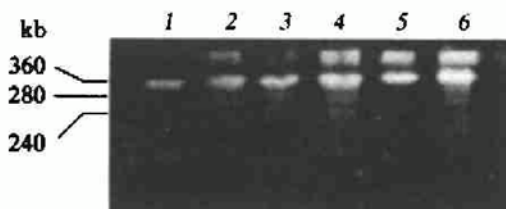


图 1 利用“原位电泳筛除”法去除 300 kb 以下的小分子 DNA。

“原位电泳筛除”方案是根据含 DNA 的胶块沿泳动方向具有一定的厚度而设计的。在电场作用下, 不同大小的 DNA 以不同的速率迁移, 小分子 DNA 移动较快。由于 DNA 均匀

分布于胶块之中, 当处于落后位置的小分子 DNA 最终离开胶块时, 处于靠前位置的大分子 DNA 也同时泳出了加样孔^[3], 造成了这部分 DNA 的损失。采用“原位电泳筛除”法, 首先沿“正”方向以较短的电泳时间去除一部分小分子 DNA, 并使所有的 DNA 离开原来的位置前移, 然后, 沿“反”方向以较长的电泳时间去除剩余的小分子 DNA, 而大分子 DNA 得以较多地保留在胶块之中。我们认为, 根据胶块的不同厚度以及去除特定范围的小分子 DNA 的不同需要, 可以设计出不同的脉冲时间、电压, “正”、“反”方向电泳的时间及次数, 既达到筛选的目的, 又最大限度地保留所需要的大分子 DNA。

2.2 多胺溶液减少高分子 DNA 的降解作用

为了减轻 68°C 融化琼脂糖时对高分子 DNA 的降解作用, McCormick 等推荐使用多胺溶液, 然而, 他们同时指出, 多胺的存在有可能使转化率降低 5 倍^[6]。我们的严格的平行实验表明, 使用多胺溶液确能减轻高分子 DNA 的降解, 而且似乎无损于转化率 (结果未显示)。我们认为, 高分子 DNA 的降解无疑将损失一部分正确连接的 YACs, 而且, “断裂 (broken) DNA”的增多将使文库的嵌合克隆率增加^[5]。因此, 我们在建库时采用了多胺溶液。

2.3 转化子的生成和保存

保存转化子的常用的方法是将转化子挑到装有液体培养基 (选择性的或完全的) 的管中, 培养至一定浓度后加入终浓度为 20% 的甘油, 混匀后分装。我们采用“甘油一步到位”的方案, 省却了加甘油、用吸嘴 (Tips) 打匀的步骤, 大大减少了工作量 (假设从吸取甘油溶液到小心混匀菌体需要 30 s 的时间, 那么, 对于一个库容量 3 万的文库来说, 这一貌似平淡无奇的步骤需要花费 250 h!), 降低了劳动强度 (这一过程必须在严格无菌的条件下进行, 而如果采用“甘油一步到位”的方案, 则“混匀”可以在进入无菌室分装之前完成, 并且可以很方便地通过颠转 Eppendorf 管架同

时混匀数百管)。更重要的,减少操作步骤是避免发生杂菌污染或交叉污染的积极措施。

参 考 文 献

- 1 Burke D T, Carle G F, Olson M V. *Science*, 1987; **236**: 806
- 2 Silverman G A, Green E D, Young R L *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; **87**: 9913
- 3 匡达人, 夏家辉, 杨智勇等. 高技术通讯, 1993; **3** (2): 27
- 4 Shero J H, McCormick M K, Antonarakis S E *et al.* *Genomics*, 1991; **10**: 505
- 5 Haldi M, Perrot V, Saumier M *et al.* *Genomics*, 1994; **24**: 478
- 6 McCormick M K, Shero J H, Cheung M C *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; **86**: 9991
- 7 Imai T, Olson M V. *Genomics*, 1990; **8**: 297
- 8 Larin Z, Mpnaco A P, Lehrach H. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; **88**: 4123

Some Improved Methods for the Construction of Genomic YAC Library. Yang Zhiyong, Kuang Daren (*Shanghai Institute of Cell Biology, Academia Sinica, Shanghai 200031, China*); Li Lingli, Lu Shao, Song Minghao, Dai Heping, Long Zhigao, Pan Qian, Li Luyun, Xia Jiahui (*State Key Laboratory of Medical*

Genetics, Hunan Medical University, Changsha 410078, China).

Abstract A Chinese human genomic YAC (yeast artificial chromosome) library is being constructed with pJS97 and pJS98 as cloning vectors. An easier and more efficient protocol has been made successfully to protect the high molecular weight DNA from being degraded by using polyamines solution and to remove smaller DNA by setting up a new method called "in situ electrophoretic size-fractionation". Furthermore, the glycerol at the final concentration of 20% is introduced directly into the medium used to grow the transformants, which would both simplify the operation and reduce the chance of contamination with other microorganisms or cross-contamination of YAC clones. Such improved methods can be used in the construction and application of other genomic YAC libraries.

Key words yeast artificial chromosome, construction, *in situ* electrophoretic sizefractionation

信息服务

《生物化学与生物物理进展》是中国科学引文数据库首批收录的 315 种期刊之一。

《中国科学引文索引》印刷版和光盘版已于近日出版。若想了解以上两种产品的详细情况及引文数据库的服务情况,可与中国科学引文数据库联系。

联系地址: 北京中关村科学院南路 8 号

中国科学院文献情报中心中国科学引文数据库课题组

邮编: 100080 电话: 62564354 传真: 62566846