

泡桐基因文库的构建及actin基因同源顺序的亚克隆*

孙 威 孔繁瑞 林友刚 李继耕

(中国科学院遗传研究所)

摘要 以 λ EMBL₃ DNA为载体, LE392为宿主菌, 建立了木本植物毛泡桐(*Paulownia tomentosa* (Thunb) Steudel) 丛枝病抗病品系 C161 基因文库, 命名为[λ E₃/PTS (Bam-Sau)]。其包装效价达到 1.1×10^6 pfu, 重组率为 98%。用动物肌动蛋白(actin)基因为探针, 从这一基因库中筛选出 3.9 Kb 的泡桐 DNA 同源顺序进行亚克隆。所得结果表明: 动物 actin 基因在木本植物基因组中存在一定的同源性。

关键词 泡桐; 基因文库; λ EMBL₃ 载体; 肌动蛋白基因

肌动蛋白(actin)是真核生物中广泛存在的蛋白质, 又是高度保守的多基因族。有关 actin 基因的研究开始于 80 年代初期。人们主要侧重于对 actin 基因家族的组成、序列保守性以及不同 actin 基因之间的分化速度等方面的研究, 这一研究对于追寻真核基因的功能和调控的进化途径是很有意义的。

选用泡桐抗丛枝病品系为材料, 建立基因文库, 并从中分离出与 actin 基因具有同源性的片段。其意义, 一是由于泡桐属于木本植物玄参科, 在进化树上分枝较晚, 对研究 actin 基因的结构、功能及调节的进化不失为一个好材料; 二是为从此基因库中筛选抗病基因, 为在林业中开展抗病育种工作奠定基础。

一、材料与方法

(一) 材料

1. 泡桐品种: 毛泡桐(*Paulownia tomentosa* (Thunb) Steudel) 抗丛枝病品系 C161。

2. 噬菌体和菌种:

(1) λ EMBL₃ 噬菌体 h λ s bam 1°b 189 (int (linker) nin nin L44 Δ (sHind III 3-sHind III 5) S α trp E) int (linker) Δ (int-c III) KH 54S RI 4° nin 5S R15°。

(2) 宿主大肠杆菌

LE392: F⁻ hsd R 514 γ k⁻mk⁻, Sup E44, Sup F58, lec r, or (lac IZY)6, gal

本文于 1988 年 11 月 26 日收到。

* 泡桐品种由协作单位中国林业科学研究院林业研究所泡桐组提供。

K2, gal T22, met B1, trp R55, λ^- 。

L95: Sup E, SupF, trp R⁻, met B, γk^-mk^- , P2。

(3) 溶源菌株大肠杆菌

BHB 2688: N205 recA⁻($\gamma imm434$, CI ts857, b₂, red⁻, Eam, Sam/ γ)。

BHB 2690: N205 recA⁻($\gamma imm434$, CI ts857, b₂, red⁻, Dam, Sam/ γ)。

3. 探针: 动物肌动蛋白基因0.9 Kb cDNA 重组于 pBR322 的 Pst I 位点。

4. 质粒载体 pUC19, 限制性内切酶及 T₄DNA 连接酶均购自华美公司。

(二) 方法

1. 用 λ EMBL₃ 构建泡桐基因文库的基本步骤按照 Maniatis 等人的方法^[1]。

2. 泡桐核DNA的制备及目的片段回收: 泡桐核DNA的制备在 Stout 等人方法的基础上进行^[2]。50 g 新鲜泡桐叶片于液氮内迅速研磨, 加 200 ml 缓冲液 A (400 mM 蔗糖, 20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 2 mM CaCl₂, 2% 阿拉伯胶, 4 nM 正辛醇, 2mg/ml PVP-400), 匀浆、过滤。滤液于 450 × g 离心 15 min。沉淀用缓冲液 A 洗一次, 缓冲液 B (400 mM 蔗糖, 20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 2 mM CaCl₂, 2% 阿拉伯胶, 4 nM 正辛醇, 0.15% Triton X-100) 和缓冲液 C (200 mM 蔗糖, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2 mM CaCl₂) 各洗两次后, 悬浮于 5 ml 缓冲液 C, 并加 5 ml NaCl, 10 ml 缓冲液 D (10 mM Tris-HCl (pH 5.8), 0.5% SDS, 10 mM EDTA-Na₂, 10 mM NaCl, 200 μg/ml proteinase K), 37 °C 保温 2 h, 继续在 37 °C 对 D 液透析过夜。透析后离心除沉淀。上清液用苯酚和氯仿抽提后, 于 -20 °C 乙醇沉淀过夜。此 DNA 粗制品经过 Sepharose 4B 层析柱除去 RNA 及其它小分子, 即得到纯化的高分子量核 DNA 样品。

纯化的泡桐 DNA 样品经过限制性内切酶 Sau3A 酶解, 回收 15~20 Kb 之间的目的片段。

3. 制备 λ EMBL₃DNA 和包装蛋白抽提物参照 Maniatis 等人的方法^[3], 并按照 Enquist 的方法^[4]对载体 cos 顺序完整性进行鉴定。

4. DNA 的连接、体外包装和重组体鉴定: 限制性内切酶 BamHI 和 EcoRI 双酶解的 λ EMBL₃DNA 与脱磷酸化的 15~20 Kb 目的 DNA 片段以不同的比例混合连接。方法参照 Frischauf^[6]。连接混合物用包装提取物直接包装^[6], 测定包装效价。用 LE392 作为宿主侵染后, 分别接种一定量的噬菌斑置 L95 宿主菌的 LB 培养皿上鉴定重组子。达到一定重组率的包装产物, 经过扩增^[7]成为永久基因文库。

5. 与 actin 基因同源顺序的筛选和亚克隆: 标记的 actin 基因质粒作为放射性探针, 同重组噬菌斑进行原位杂交^[8,9]。杂交获得的阳性重组子经不同的限制性内切酶完全酶解后, 用同一探针再次杂交。发现内切酶 Pst I 酶解后有一强阳性带, 大小为 3.9 Kb。选择这一特定 DNA 片段, 以 pUC19 为载体, 直接转化感受态大肠杆菌 JM83, 进行次级克隆。感受态 JM83 的制备参照 Mendel 的方法^[10]。

克隆菌落用 Holines 等人的方法^[11]提取重组质粒 DNA, Pst I 酶解后 Southern 转移到硝酸纤维素膜, 用 α -³²P-dCTP 标记的 actin 基因探针杂交鉴定。

二、结 果

(一) 泡桐大分子核 DNA 的制备

采用条件比较温和的方法提取叶片中的大分子核 DNA, 其纯度、产率及酶解效果都达到了建库要求。粗制品的产率约为 20~30 $\mu\text{g/g}$ 叶片。粗制品中含有大量 RNA 小分子污染及部分蛋白质, 这给以后内切酶消化及连接带来一定困难。经 Sepharose 4B 纯化的 DNA, 纯度有所提高, 内切酶消化时所用酶量减少, 酶解效果也更佳。纯化 DNA 分子的紫外吸收曲线呈明显的核酸吸收特性, $A_{260}/A_{280} = 1.87$ 。纯化后的泡桐 DNA 经不同量的 Sau 3A 酶解, 可以选择出获得 20 Kb 片段的最佳条件(图 1)。

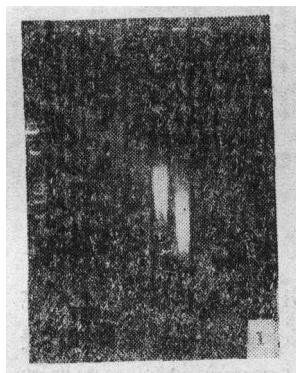


图 1 泡桐 DNA 经不同量的 Sau3A 酶解后, 0.4% agarose 电泳

(二) 泡桐基因文库的构建及鉴定

包装蛋白与重组 DNA 体外混合包装, 侵染宿主菌 LE392 后, 产生噬菌斑数为 1.1×10^6 pfu/ μg DNA。如果按照一般高等植物基因组平均大小为 2.5 pg/细胞 (2.3×10^6 Kb) 计算^[12], 根据公式:

$$N = \ln(1-p) / \ln(1-f/g)$$

插入片段 f 为 20 Kb, g 为基因组大小 (Kb), 要使基因库以 99% 的概率 (p) 覆盖整个基因组, 理论上需要重组子数 N 为 5.3×10^5 pfu/ μg , 本试验所得基因库的重组数大大超过了理论值, 此基因库经扩增后命名为 $[\lambda E_3/\text{PTS}(\text{Bam-Sau})]$ 。

为了进一步证明此基因库的有效性, 除了计算理论值外, 还用宿主菌 L95 进行了筛选。L95 是溶源菌, 只有插入外源片段的 λEMBL_3 , 才能侵染 L95。从 LE392 为宿主的培养皿中, 随机挑取 500 个噬菌斑置 L95 的培养皿中, 过夜培养后, 有 98% 产生噬菌斑, 这就证明此基因库中有 98% 的重组子。

(三) actin 基因同源顺序的亚克隆

以比放射值为 10^7 cpm/ μg 的 pBR322-actin DNA 为探针, 从泡桐基因库筛选出一个阳性斑点, 扩增后第二次杂交, 出现多个与 actin 基因有同源性的阳性斑点。由于它们来源于同一重组子, 将这一克隆命名为 $\lambda E_3\text{pA}$ 。图 2 显示两次原位杂交结果。

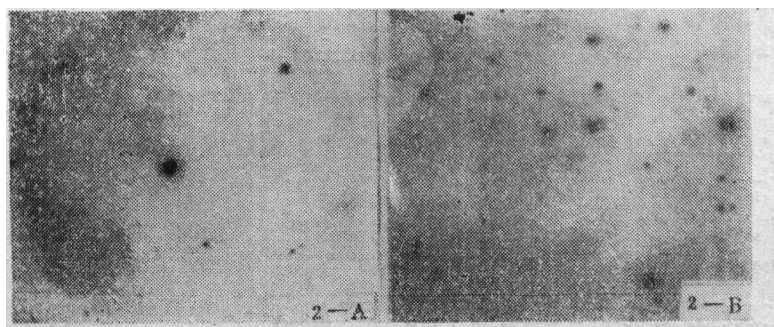


图 2 2-A 泡桐基因库与 actin 基因原位杂交, 2-B 阳性斑点扩增后再次杂交

用单斑分离的方法将此克隆扩增后,提取重组DNA,经几种不同的限制性内切酶酶解,0.8%琼脂糖凝胶电泳后,以 actin 基因为探针进一步杂交。结果表明,在杂交阳性带中, Pst I 酶解片段有一强阳性带,大小为3.9 Kb。选它作为外源片段进行亚克隆,所得结果如图3。

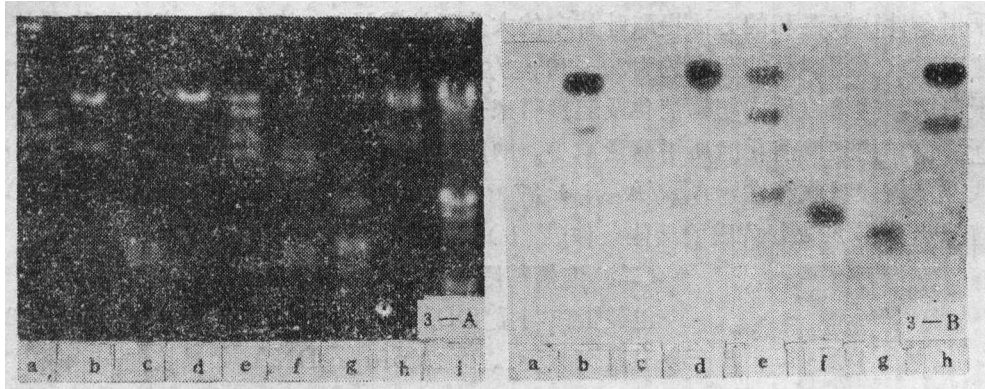


图3 3-A λ E, pA DNA酶解产物; 3-B 酶解产物与 actin 基因杂交
a.对照, b.BamHI, c.Sau3A, d.未酶解, e.Sal I,
f.Pst I, g.Hind III, h.EcoR I, i.Marker

从转化培养皿中挑选重组亚克隆,分别提取质粒,并与对照 pUC19 同时电泳,从中挑选出不同大小的重组质粒,用 Pst I 酶解后,与分离的 actin 基因(不含质粒)杂交。结果表明,其中一个重组克隆的插入片段与 actin 基因具有同源性(图4)。从而证明我们确实得到了泡桐基因组中 actin 基因同源顺序的亚克隆。

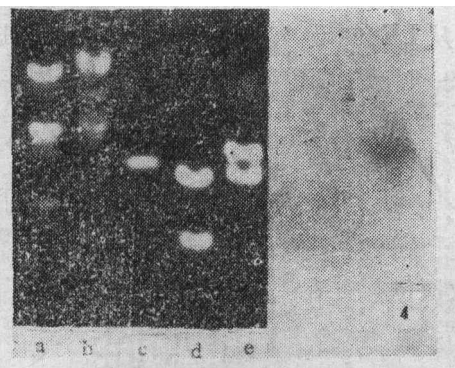


图4 重组克隆酶解后与 actin 基因杂交
a和b Marker, c pUC19; d和e重组克隆

三、讨 论

(一) 关于大分子核 DNA 的制备

泡桐是多年生乔木,同许多高等植物一样,其细胞中有大量的多糖、色素及多酚类物质,同时还有细胞壁不易破碎的特点。泡桐又不同于单子叶植物或一些双子叶经济作物,它只能取材于叶片,且多糖物质含量更高。这些特性给泡桐 DNA 的纯化带来很多困难。为使用比较简单的方法,制备出纯度高、分子量大、产率高的 DNA,选用了 Stout 等人的方法,并予以必要的修改。通过低速离心分离获得核沉淀,其 DNA 制品经电泳检验为单一条带,酶解后呈弥散状。朱祯等人曾用高熔点胶电泳分析及离心后染色分析均未检出质体 DNA 的污染¹⁾。因此用这一方法纯化核 DNA,尽管比较繁琐,但效果很稳定。用这一方法制备的楸树、杨树及榆树 DNA,其分子量、产率及纯度均获得了满意结果。

实验中还发现,泡桐DNA粗制品中加入 CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)反复沉淀,可

1) 此结果发表在中国科学院遗传研究所年报,1985年,133。

以除去一部分多糖, 达到进一步纯化的目的。从紫外吸收光谱的变化, 可以看到这一结果。这对于多糖物质含量较高的木本植物 DNA 的纯化是有必要的。

(二) 关于泡桐基因文库的构建

本文所采用的 λ EMBL₃ 载体, 是从 λ 1059 衍生来的。除了可以通过 Spi⁺ 表型的变化有效筛选重组子的优点外, 还消除了用 ColE1 质粒型探针而造成的高本底误差。此外, λ EMBL₃ 载体的置换位点是15个核苷酸的多切点区, 经过双酶解, 可产生不同的粘性末端。这样, 在不回收双臂直接连接的情况下, 减少了中间片段与外源DNA片段的竞争机会。

重组噬菌体由于缺失了 red gam 基因, 成为 Spi⁻ 表型, 可以侵染 P₂ 溶源菌, 非重组噬菌体便会被淘汰。这种不用分离双臂的技术操作简单, 而且重组后, 如果重组位点消失, 邻近的位点将会切出插入的外源 DNA 片段。

一个基因库构建的成功与否, 不仅在于噬菌斑的多少和重组值的大小, 更在于能否从这个基因库中获得所需要的基因。为此, 我们以 actin 基因为探针, 对泡桐基因组的同源顺序进行了分离, 并获得了可信赖的结果。这一实验不仅验证了基因库的有效性, 而且证明动物 actin 基因在木本植物基因组中具有一定的同源性。

参 考 文 献

- [1] Maniatis, T. et al., 1978, The isolation of structural genes from libraries of eucaryotic DNA, *Cell*, 15(2):687.
- [2] Stout, J. T. et al., 1977, Nuclei and chromatin from plant tissues, In: *Methods in Cell Biology*, A Subsidiary of Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, 16:90.
- [3] Maniatis, T. et al., 1982, In: *Molecular Cloning*, A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 282.
- [4] Enquist, L. et al., 1979, In vitro packing of λ dam vectors and their use in cloning DNA fragments, In: *Methods in Enzymology*, A Subsidiary of Harcourt Brace Jovanovich, Publisher, 68:281.
- [5] Frichavf, R. L. et al., 1982, Structure and flanking regions of soybean seed protein genes, *Cell*, 29(2):651.
- [6] Collines, J. et al., 1979, E. coli plasmids packageable in vitro in λ bacteriophage particles, In: *Methods in enzymology*, A Subsidiary of Harcourt Brace Jovanovich, Publisher, 68:309.
- [7] Karn, J. et al., 1980, Novel bacteriophage cloning vector, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 77(9):5172.
- [8] Righy, P. W. J. et al., 1977, Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I, *J. Mol. Biol.*, 113(1):237.
- [9] Benton, W. D. et al., 1977, Screening λ gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ, *Science*, 196(4286):180.
- [10] Mandel, M. et al., 1970, Calcium-dependent bacteriophage DNA infection, *J. Mol. Biol.*, 53(1):159.
- [11] Holines, D. S. et al., 1981, A rapid boiling method of the preparation of bacterial plasmids, *Anal Biochem.*, 114(1):193.
- [12] Lehiniger, J. et al., 1981, In: *Biochemistry*, Addisonwesley Publishing Company, 860.

CONSTRUCTION OF PAULOWNIA GENOME LIBRARY AND SUBCLONING OF THE SPECIAL DNA FRAGMENT HOMOLOGOUS TO ACTIN GENE

Sun Wei Kong Fanrui Lin Yougang Li Jigeng

(*Institute of Genetics, Academia Sinica*)

Abstract This work is concerned in the construction of genome library of a resistant strain of *Paulownia tomentosa* to mycoplasma-like organisms (MLO). Large random DNA fragments are joined to phage lambda EMBL₃ vectors by its polylinker. The recombinant molecules are packaged into *E. coli* LE392 in vitro and amplified to establish a permanent library. The efficiency of 1.1×10^8 pfu/ μ g DNA was attained. Among them there are 98 % recombinant. Using the chicken actin gene as a hybridization probe, a special clone from this library was screened. By restriction endonuclease cleavage analysis and hybridization experiments, a 3.9 Kb DNA fragment homologous to actin gene was subcloned into pUC19.

Key words paulownia; genome library; phage lambda EMBL₃ vector; actin gene

赴土耳其考察造林及水土保持工程简介

根据中土两国政府签署的科技交流协议, 国家科委批准并资助由林业部中国林业科学研究院副研究员马文元、助理研究员兰再平组团, 赴土耳其进行造林及水土保持工程学术考察。自1990年5月24日至6月7日, 从土耳其的安那托力亚高原中部干旱区向南到托鲁斯山脉, 经地中海沿岸向西到爱琴海沿岸和安那托力亚高原西端的群山区, 先后对安卡拉(Ankara)、阿弗昂(Afyon)、康雅(Konya)、布桑弟(Pozanti)、塔苏斯(Tarsus)、阿达那(Adana)、阿那木尔(Anamur)、阿拉尼亚(Alanya)、安塔利亚(Antalya)、布尔顿(Burdur)、丹尼斯利(Denizli)、伊斯米尔(Izmir) 12个省的树种组成及分布、苗圃、造林项目、水土保持工程、沿海治沙及防护林工程及部分天然林进行了广泛的实地考察和学术交流, 考察团所到之处, 都有土方林业技术人员的陪同, 并受到土耳其林业总局下属的各级单位的热情招待。圆满地完成了预定的计划。通过这次考察, 对土耳其内陆干旱地区的树种选择、育苗造林技术; 对山区以工程措施和生物措施相结合的水土流失治理方法; 对地中海沿岸沙地和流动沙丘的固定方法、防护林营造技术、树种结构等内容都有了比较详细的了解, 从中学习到很多成功的技术和经验。

(冉)