

YAC 介导的天蚕丝素基因向家蚕的转移

—— I. 天蚕 YAC 基因库的构建与丝素基因克隆的鉴定

唐恒立 柴建华^① 李振刚

(中国科学技术大学生物系, 合肥 230027; ^①复旦大学遗传学研究所, 上海 200433)

摘 要

天蚕 (*Antheraea yamamai*) 是一种经济价值极高的绢丝昆虫, 其丝心蛋白基因的表达调控也是研究发育和分化控制的极好模型, 对其丝素基因及其相关基因的研究具有重要的理论和实际意义. 以天蚕五龄期幼虫的后丝腺为材料, pYAC4 为载体构建了插入片段平均长度为 570kb 的天蚕 YAC 基因库, 并以多聚酶链式反应 (PCR) 方法对该基因库进行筛选, 得到了一组天蚕丝素基因的 YAC 克隆. 其中 Afy-1 全长为 440kb, 覆盖了整个丝素基因的编码区及上、下游调控序列, 并在 50 代后仍然保持稳定.

关键词 天蚕、酵母人工染色体、丝素基因、聚合酶链式反应

天蚕 (*Antheraea yamamai*) 是天蚕蛾科柞蚕属的一种大型野生绢丝昆虫. 天蚕丝质光泽, 质地轻柔而结实, 无折痕, 具天然淡绿色彩, 被誉为“丝中女皇”, 国际市场上价格高于家蚕丝的数十倍. 然而, 由于其人工驯化较晚, 目前尚不能大规模人工饲养, 小批人工饲养成功的天蚕丝的产量受到很大影响, 限制了这种名贵丝资源的利用. 分子水平的研究表明, 天蚕与家蚕的丝素基因在核心区的序列有很大歧异^[1], 两者丝质的差别在很大程度上是这种基因水平上差异的外在体现. 因此, 如果能通过基因转移的手段改良家蚕的丝质, 使之大量生产具有天蚕丝优良性状的蚕丝, 将会有重要的理论和实际价值. 在以柞蚕为受体的试验性工作 (李振刚等, 1989) 中, 含有天蚕丝素基因的染色质片段转移到受体中后, 后代柞蚕的丝素氨基酸组成接近天蚕, 遗憾的是外源性状在传代中很快被丢失, 因而未能得到稳定的变异体.

酵母人工染色体 (Yeast Artificial Chromosome, YAC) 是近年发展起来的一种大容量的基因工程载体^[2], 其不仅被广泛应用于高等生物基因组的作图^[3], 而且在真核基因的功能研究中有着广阔的前景. 人的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G6PD) 基因、白细胞普通抗原 (LCA, CD45) 及次黄嘌呤磷酸核糖转移酶等真核基因以 YAC 转移表达的成功暗示了 YAC 在转基因研究中的可能作用^[4-6]. 天蚕丝素基因全长约为 10kb, 虽然能以常规方法克隆, 但单个克隆

中包含完整的基因编码及调控顺序的机率较小,而基因的完整性则正是转移所必需的。选用 YAC 来克隆则可大大提高这一机率,而且由于同源重组的频率与片段的长度(亦即同源位点的数目)成正相关,因而较大的外源基因片段具有更多的整合入受体基因组的机会。基于上述考虑,我们以 pYAC4 构建了天蚕的分子克隆库,并以 PCR 方法对天蚕 YAC 库进行筛选,得到了适合于转移研究的丝素基因 YAC 克隆。

1 材料与方 法

1.1 天蚕完整染色体 DNA 的提取

实验用天蚕购自山东省蚕种研究所(烟台)。完整染色体 DNA 的提取以琼脂糖包块法进行。五龄末期天蚕的后丝腺细胞核经蔗糖密度梯度离心纯化后包埋于 1% 的低熔点琼脂糖块中,每块内含 15—20 μ g 染色体 DNA。包埋块在 50 $^{\circ}$ C 经 ESP 溶液(0.4mol/L EDTA, 1% Sarkosyl, 1mg/ml proteinase K)消化 2—3 天,以含 40 μ g/ml PMSF(苯甲基磺酰氟)的 TE (10mmol/L Tris, 1mmol/L EDTA, pH 8.0)溶液漂洗灭活 Proteinase K, 无菌 TE 充分透析以除去 PMSF。处理好的包块储存于 0.5mol/L EDTA 中。

1.2 天蚕基因组 DNA 的酶切大片段的获得

1.2.1 部分酶切指示实验 DNA 包块以 TE 在室温洗 3—5 次,每次 30min; 无菌水洗 30 min, 1 $\times$ 内切酶缓冲液平衡 30min; 将平衡好的包块转移至 2ml 离心管中,每管加入 100 μ l 包块, 80 μ l 无菌水, 17 μ l $\times 10$ High Reaction buffer, EcoRI 的量在 10—40units 之间变动。结果表明每 15 μ g DNA 以 20units 的 EcoRI 消化 4h 可获得较多 400—800kb 的酶切片段。

1.2.2 600kb 以上大片段的回收 按上述最适条件大规模酶切天蚕基因组 DNA, 酶切片段以均质电场脉冲电泳(CHEF-DR II, BIO-RAD)分离,回收区凝胶以低熔点琼脂糖配制,不加 EBr。恒压 180V, pulse time = 50s, 12h, 无菌手术刀切割回收含 600kb 以上大片段的 LMP agarose 窄带供连接。

1.3 连接与转化

1.3.1 YAC 臂与 DNA 大分子的连接 pYAC4 由 Washington Univ. 的 M. V. Olson 等构建并惠赠。载体以 BamHI 和 EcoRI 做双酶切,碱性磷酸酶脱磷以避免载体的自身连接。回收的低熔点胶块以加入精胺和亚精胺的 1 $\times$ 连接缓冲液室温浸洗 3 次,每次 30min, 胶块 68 $^{\circ}$ C 10min 融化后,加入等量的 YAC 载体臂 DNA, 37 $^{\circ}$ C 平衡 2h。加入 1/10 体积的 10 $\times$ Ligation buffer, 小心混匀后加入 T4 DNA Ligase, 酶量为常规液体连接反应的 10 倍, 14 $^{\circ}$ C 反应 16h 以上。68 $^{\circ}$ C 10min 融化胶块,按 5unit/ml 胶的量加入琼脂糖酶(Agarase, New England Biolabs), 37 $^{\circ}$ C 消化 3h, 即可直接用于转化。

1.3.2 酵母原生质体的制备与转化 YAC 克隆的宿主细胞采用酿酒酵母(*S. cerevisiae*) AB1380。酵母的原生质体的制备与转化采用 Burgers 等的方法^[7]。待初级转化子长出后,挑取红色克隆点种于 RF(-ura, -trp) 平板,作为双重筛选。基因库保存于 96 孔板中。

1.4 YAC 基因库的鉴定

1.4.1 酵母完整染色体 DNA 的制备 随机挑取 80—100 个转化子克隆进行插入片段平均大小的鉴定。单菌落从 RF 平板上接种于 20ml AHC 培养液中, 30 $^{\circ}$ C 振荡培养至静止期。4000r/min, 10min 收集细胞, 少量 SCE 悬浮(3×10^9 cells/ml), 包埋于含 8mg/ml Novozyme 的

LMP agarose 中, 37°C 消化过夜. 经此处理的凝胶块转移至 ESP 溶液 50°C 消化 2—3 天, 4°C 保存.

1.4.2 DNA 印迹杂交 酵母染色体 DNA 以脉冲电泳进行分离, 电泳条件: 200V, 60s 走 15h 后, 90s 再走 9h, 酿酒酵母的各条染色体可得到较好的分离. 电泳好的胶在紫外灯下拍照, 常规变性、中和后转移到尼龙膜 (Hybond, N+) 上, 转好的膜放在经 0.4N NaOH 饱和的 2 层滤纸上固定 20min, 稍干后 4°C 保存备用.

YAC 左右臂探针来自 PBR322, 以随机引物法标记. 预杂交及杂交均在杂交炉 (Hybaid pven, UK) 中进行; 尼龙膜及尼龙网在 2×SSC 中浸洗, 排除气泡, 相间卷入杂交管, 加 20ml 预杂交液 (0.5mol/L 磷酸钠缓冲液, 7% SDS, 1mmol/L EDTA, 0.1mg/ml 鲑鱼精 DNA), 65°C 3h, 倒出预杂交液, 与变性后的探针 DNA 混匀后倒回管内, 65°C 16—24h. 膜以 2×SSC-0.1% SDS 和 1×SSC-0.1% SDS 洗至本底几乎没有, 置于有增感屏的 X 光片夹中,

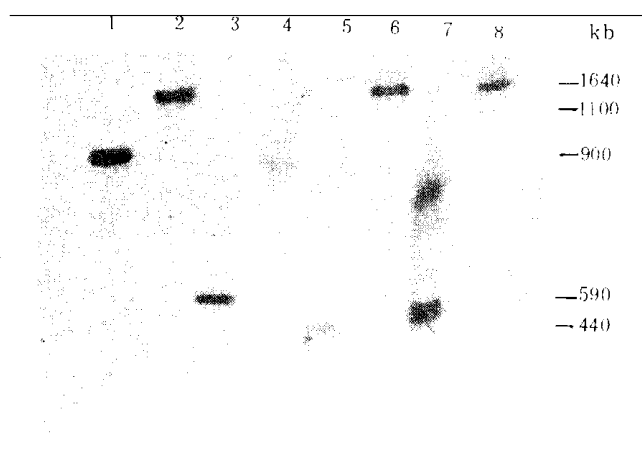


图 1 YAC 插入片段大小的分布
杂交探针为 PBR322 DNA

—70°C 放置 2—3 天, 冲洗得杂交 X 光片 (图 1).

1.5 丝素基因 YAC 克隆的筛选与鉴定

目的克隆的筛选以 PCR 法进行. 保存于细胞培养板的转化子用 96 针接种板转接于硝酸纤维素膜上, 将膜置 AHC 平板上让克隆生长 4 天, 用 SCE 溶液将细胞洗下, 分组抽提其总 DNA 用于 PCR 筛选; 酵母细胞经 Lyticase 和 SDS 处理后, 加入高盐 (KAc) 使蛋白沉淀, 上清液转移至新管后以异丙醇沉淀, 经 RNase A 处理后即可作为模板.

PCR 引物根据已知的天蚕丝素基因 5' 端序列人工合成: 5'-TGTTTCATGATAGGGGTT-

TAA-3' 和 5'-TCATTACCAGAAAGATGTGG-3', 反应条件为: 94°C 变性 30s, 55°C 退火 45s, 70°C 延伸 90s, 30 个循环, 1.5% 的琼脂糖胶电泳检测反应产物.

从 PCR 筛选到的两个阳性克隆 Afy-1, Afy-2 中选取长度为 440kb 的 Afy-1 作进一步的鉴定: 克隆的酵母总 DNA 包块以 MluI 完全酶切后脉冲电泳分离以 PCR 产物为探针进行 southern 杂交, 电泳条件为 200V, 5—15s, 20h. 目的克隆及 YAC 库稳定性的鉴定采用 Bruin 等 (1992) 的方法^[9]: 单菌落接种于 5ml AHC 培养液中, 30°C 振荡培养至 1.2×10^8 细胞/ml, 2.5μl 该培养液转接于 25ml AHC 中, 30°C 振荡培养至接近饱和 (O.D. 600>7) 时为 12—14 代, 后依次类推. 每 12.5 代时制作总 DNA 包块用于插入片段大小检测.

2 结果与讨论

2.1 天蚕 YAC 基因库的构建

YAC 库分两次构成, 共得到转化子克隆 1728 个, 经鉴定平均长度为 570kb. 由于天蚕的基因组为 3×10^8 bp, 因此该基因库覆盖了基因组 3.2 次 (3.2 hits). 在基因功能性研究中, 较大的克隆片段更为有利. 因此我们在选择性分离酶切片段时采用了较长的脉冲时间和较高的电

压以便回收到 600kb 以上的大片段用于连接, 由于大片段的转化效率受到限制, 我们只得到 200—400 个转化子/ μgDNA 。对于提高转化效率的方法目前说法不一。根据我们的经验, 多胺对总的转化效率没有明显影响, 而使用 *Lyticase* 比用 *Novozym 234* 来制备原生质体的效果要好。另外, 连接时载体臂与待克隆片段的质量比不能超过 1.5:1, 否则会明显提高转化的“背景”, 从而降低红色克隆的实际得率。基因库保存用 96 孔细胞培养板, 虽然转接的工作量很大, 但此法保存的 YAC 库中每个克隆均有一定的位置和坐标, 有利于对其进行系统分析(如 PCR 和高密度点阵筛选等)。

2.2 插入片段平均大小的鉴定

外源 DNA 插入片段的平均大小是衡量一个 YAC 库质量的重要标准。早期 YAC 库的平均大小多为 200—300kb, 近年随着克隆技术的改进, 很多实验室的人基因组 YAC 库平均长度达到 700—900kb。我们在连接反应中加入多胺, 起到了提高平均长度的作用, 平均长度也有 570kb。值得注意的是, 尽管我们回收大于 600kb 的片段进行连接, 却有大约 40% 的克隆的插入片段长度远小于这个数字, 除了回收时可能混有较小片段的因素外, 造成这种偏差(bias)的原因可能在于连接反应前短暂的高温处理导致了大片段 DNA 的断裂(多胺对提高平均大小的作用就在于其能使细长的大分子 DNA 的构型变得紧密从而免于降解)^[9]。但这些较小的断片如何能与载体连接让人费解。有一种可能就是断片与载体共转化入宿主后, 在酵母的重组修复系统的作用下发生连接, 经选择后得以稳定。Green 等在研究嵌合 YAC(Chimeric YAC)时发现有的嵌合 YAC 两个非连锁片段的连接处没有原克隆酶的位点^[10], 提示了这种体内连接方式的存在。

2.3 丝素基因克隆的筛选与鉴定

YAC 库的筛选方法多种多样。我们作为一种尝试, 选用了目前在国外广泛应用的 PCR 系统筛选法^[11]。首先以每块 96 孔板为一组进行初筛, 确定阳性板后再以该板的每行和每列为单位扩增, 最后根据阳性行号和阳性列号来定出单个阳性克隆。我们以此方法分离到两个克隆, *Afy-1* 和 *Afy-2*。选取 *Afy-1* 作进一步的分析, 这个长度为 440kb 的克隆不仅在 PCR 反应中扩增出的片段与以天蚕总 DNA 为模板时的 PCR 产物的大小完全相同(图 2), 而且能与后者的 PCR 产物杂交。

天蚕丝素基因的 mRNA 长达 9.5kb, 没有现成的 cDNA 克隆可利用。我们采取了一种变通的方法来确定 *Afy-1* 是否覆盖了丝素基因的全长。原理如图 3 所示。分析 PCR 产物的核苷酸序列发现其中有一个稀切点酶 *MluI* 的位点, 如果以 PCR 产物和 PBR322 为探针与经 *MluI* 完全酶切的 *Afy-1* DNA 杂交, 各自得到两条带, 只要其中两条不等的两个小带之和大于 20kb 则表明 *Afy-1* 覆盖了 *fibroin* 基因的全部编码区和上、下游至少 5kb 的调控区域。鉴定结果如图 4, 证明 *Afy-1* 的确包括了完整的丝素基因和很长的上、下游序列, 适合于转移研究。

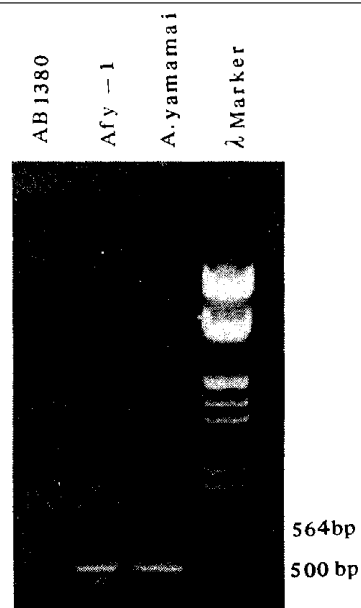


图2 以 *Afy-1* 为模板的 PCR 结果
其中天蚕和宿主酵母的总 DNA 分别用来作阳性及阴性对照

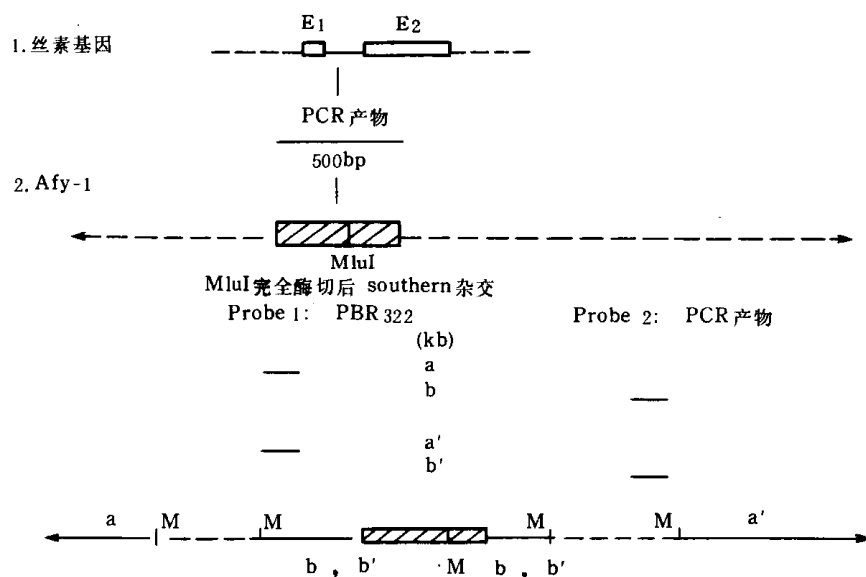


图 3 Afy-1 克隆的鉴定原理

当图中的不同探针杂交得出大小不同的片段时,可将两片段长度相加得确证覆盖的起码长度,该数字大于 20kb 时则至少超过完整的编码序列上下各 5kb(载体臂为 5kb 左右),图中虚线为未知长度

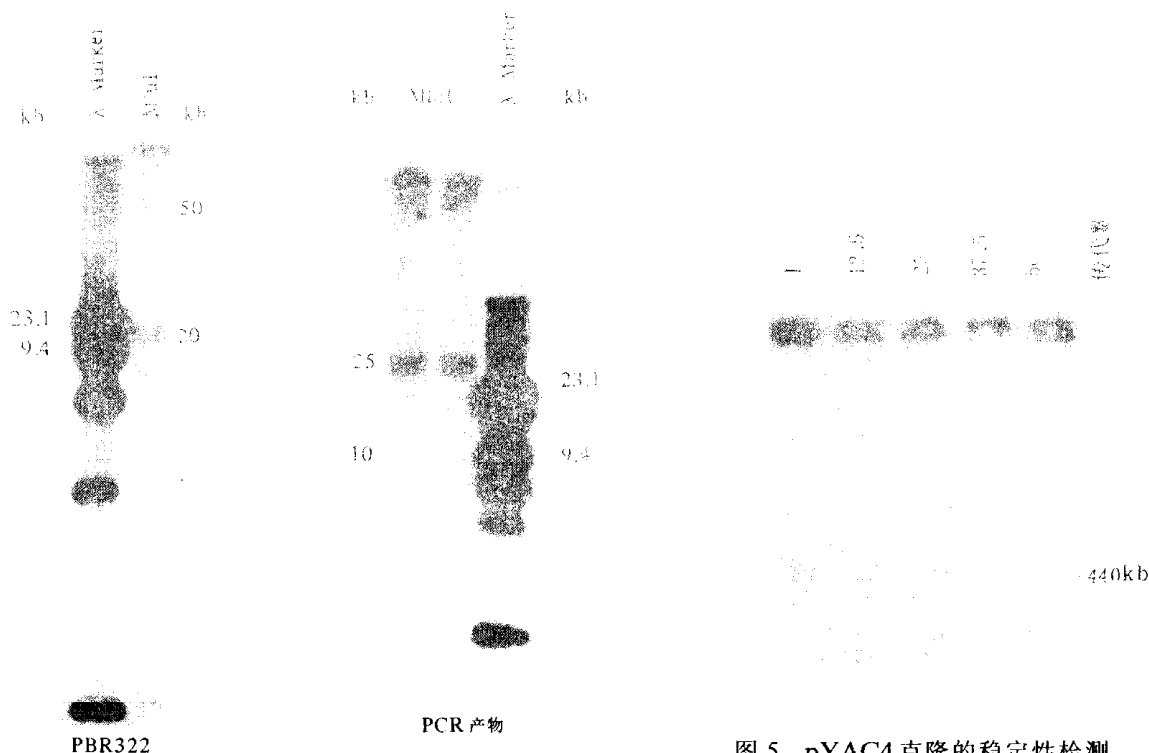


图 4 Afy-1 的鉴定结果(参见图 3)

图 5 pYAC4 克隆的稳定性检测
50 代内未发现明显的缺失与重排

2.4 天蚕 pYAC4 克隆稳定性的检测

构建一个新物种的 YAC 库,克隆是否稳定是必须检测的. 我们选取目的克隆 Afy-1 和鉴定大小时发现的最大克隆 Ay16 为代表检查了 pYAC4 天蚕克隆的稳定程度,从图 5 可以看出,

在 AHC(-ura, -trp) 培养液中传代 50 代后, 克隆仍然相当稳定, 未发现明显的缺失与重排. 目前 YAC 克隆体系的另一重要问题即嵌合 YAC 的比例较高, 考虑到嵌合 YAC 对基因转移的影响没有其妨碍基因作图那么严重, 我们没有进行这方面的分析.

致谢 魏 勇和林云富对本工作进行了许多有益的讨论并提出一些建议, 作者深表感谢.

参 考 文 献

- [1] Tamura, T., Inoue, H., Suzuki, Y., *Molecular and General Genetics*, 1987, **207**: 189—195.
- [2] Burke, D. T., Carle, G. F., Olson, M. V., *Science*, 1987, **236**: 806—812.
- [3] Schlessinger, D., *Trends in Genetics*, 1990, **6**: 248—258.
- [4] Eliceiri, B. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, **88**: 2179—2183.
- [5] Fernandez-Luna, J. L. et al., *Genomics*, 1991, **10**: 756—764.
- [6] Huxley, C. et al., *Genomics*, 1991, **9**: 742—750.
- [7] Burgers, D. M. J., Percival, K. J., *Analytical Biochemistry*, 1987, **163**: 391—397.
- [8] Bruin, D., Lanzer, M., Ravetch, J. V., *Genomics*, 1992, **14**: 332—339.
- [9] Lee, J. T. et al., *Genomics*, 1992, **12**: 526—533.
- [10] Green, E. D. et al., *Genomics*, 1991, **11**: 658—669.
- [11] Green, E. D., Olson, M. V., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, **87**: 1213—1217.