

大片段 DNA 克隆载体的研究进展

于 洋,蒋世翠,王康宇,薛 菲,张美萍,王 义
(吉林农业大学 生命科学学院,吉林 长春 130118)

摘要: DNA 克隆技术是分子生物学和基因工程研究中非常重要的一项技术。自第一个质粒载体 pSC101 作为第一个克隆载体以来,随着分子生物学技术的迅猛发展克隆载体的整体结构、容载能力和转化效率都有了很大的改善。通过综述克隆载体发展概况,以及大片段 DNA 文库的构建和应用,对大片段 DNA 遗传转化的发展做了展望。

关键词: 克隆载体;BIBAC;大片段 DNA

中图分类号: Q819 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2015)02-0147-04 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2015.02.0147

植物遗传转化表达载体是近年来植物转基因研究过程中极其重要的一项。随着植物基因组计划的实施,相继产生了多个克隆载体,其发展经历可以大致分为三个阶段:质粒、 λ 噬菌体和 cosmid(也称柯斯质粒,粘粒)的第 1 阶段;YAC、PAC 和 BAC 的第 2 阶段;BIBAC 和 TAC 的第 3 阶段。基因组文库是分子克隆和基因组学研究的技术基础,也被称为人工构建的基因“活期储蓄所”,迄今为止经历了一系列文库的发展,目前文库的研究工作已变得越来越重要。本文主要介绍大片段克隆载体 BIBAC 和 TAC 载体系统的发展及应用。

1 克隆载体发展概况

自 1980 年,Hohn 和 Collins^[1] 构建了粘粒载体,经过几十年的发展,出现了许多克隆载体。第一代的载体主要特点是稳定性和转化率较好,容易分离。迄今为止,成功构建 cosmid 文库的报道有很多,如石强等人建立了山羊基因组粘粒文库^[2],并且获得了 3.62×10^5 个克隆,阳性克隆比率高达 97.5%。刘阳等^[3] 构建了茎瘤田菁基因组文库并克隆了田菁豆血红蛋白基因片段。侯芷英^[4] 等用 pHC79 作为载体,建立了 805 菌株无性繁殖系,并且得到 500 多个克隆子。2011 年,小球藻南极株和温带株的基因组文库也构建成

功^[5]。但由于其克隆容量低,只有 45 kb 左右,限制了其发展。第二代的载体 YAC(酵母人工染色体)、BAC(细菌人工染色体),其特点是容载能力提高,可达到 100~350 kb,稳定性高、转化率高,但 YAC 的缺点是易发生嵌合和重组现象、制备复杂、转化效率较低。黎伶俐等人构建了人基因组 YAC 文库^[6],并对一批克隆进行鉴定,其中阳性转化子为 95%。2003 年关伟军等人构建了濒危禽品种 YAC 文库^[7],保存了国家非常重要的基因资源。BAC 的不足是它只有转化选择标记,不存在重组选择标记,还需要进行杂交验证。pBeloBAC11(见图 1)是第二代细菌人工染色体载体(BAC)的代表,它是通过 lacZ 的 α 互补所造成的菌落蓝白色来筛选重组子,这一举措使重组子筛选的操作更加方便。黄胜等人利用载体 pCUGIBAC1,通过 λ RED 介导的 PCR-targeting 方法,成功构建了能够装载链霉菌大片段 DNA 的 BAC 载体 pMSBBACs,并使用 pMSBBACs 载体构建出链霉菌 U27 的基因组 BAC 文库,其平均插入片段大小为 100 kb。经过试验证明,这个质粒可以导入链霉菌模式菌株中,并通过位点特异性重组,整合到染色体中进行异源表达。目前,已经在大豆^[8]、大麦^[9]、水稻^[10]、绒山羊^[11]、仿刺参^[12]和黄瓜^[13]等几十种动植物中构建了 BAC 的基因组文库。

2 大片段 DNA 的克隆载体

第二代克隆载体为植物基因组计划的实施做出了巨大贡献,但其还存在着遗漏目的基因的可能。因此,大片段克隆载体 BIBAC 和 TAC 应运而生。

2.1 双元细菌人工染色体(BIBAC)

Hamilton 等^[14] 综合了 BAC 载体 pBAC108L

收稿日期:2014-12-20

基金项目:国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(2013AA102604-3)

第一作者简介:于洋(1988-),女,吉林省长春市人,在读硕士,从事植物分子生物学与基因工程研究。E-mail:835312991@qq.com。

通讯作者:王义(1964-),男,博士,教授,硕士生导师,从事药用植物细胞工程研究。E-mail:wanglaoshi2007@tom.com。

和 Ti 质粒二者的特点,在 1996 年建立了 BIBAC(binary BAC library)。其优点:①在大肠杆菌(*E. coli*)和农杆菌(*Agrobacterium*)中的稳定性高;②通过农杆菌介导法可直接把外源基因转到植株内;③进行非同一物种之间的转化;④直接用来转化。BIBAC 最明显的优势是它可以直接转化植物,且一次可同时转化 10~30 个基因。

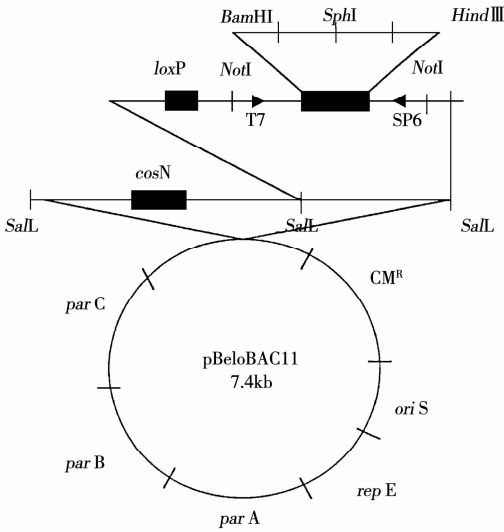


图 1 pBeloBAC11 基因图
Fig. 1 pBeloBAC11 gene map

目前,地在西红柿^[15]、水稻^[16]、毛竹^[17]以及人参^[18]中已经成功构建了 BIBAC 文库。成志伟^[19]等人构建了东乡野生稻 BIBAC 基因组文库,平均插入片段达到 65 kb。Zhang 等成功构建了拟南芥的基因组文库,平均插入片段大小为 162 kb,覆盖了基因组的 14.6 倍,共获得了 11 520 个独立克隆。成志伟等人构建了东乡野生稻 BIBAC 基因组文库,平均插入片段达到 65 kb。侯思名等利用 BIBAC2 成功构建了云南药用野生稻的基因组文库,其插入片段平均 76 kb,其中包括 53 760 个克隆。BIBAC 大片段基因组文库是研究基因组结构和功能的基础,推动了植物基因组学的发展。

2.2 可转化人工细菌染色体(TAC)

1999 年, Liu 等建立了 pYLTAC7 和 pYLTAC17 两个 TAC 载体,为了不同手提材料的筛选,以 hpt 为筛选标记,又构建了 pLYTAC27 载体。

TAC 载体的特点是:①*E. coli*、*Agrobacterium* 中稳定性好;②可以克隆 100~300 kb 大片段 DNA;③易于操作;④可进行遗传转化。TAC 载

体不仅与细菌人工染色体和酵母人工染色体一样能够用于大片段 DNA 文库的构建,而且在构建好的 TAC 文库中筛选获得目标阳性克隆之后,可以直接利用农杆菌介导法将目的基因转到植物基因组内,不需要进行亚克隆的工作,重新构建转化载体。目前,已经成功地在籼稻品种 H359^[20]、黑籽南瓜^[21]、非洲野生稻^[22]、拟南芥及番茄^[23]中建立了基因组文库。赵立军^[24]构建了多枝赖草的基因组文库。Liu^[25]等应用载体 pLYTAC27 构建了“明恢 63”基因组文库,证明这个载体可以有效作用于单子叶植物的图位克隆及其功能分析。2000 年,成功构建了 3 个平均插入片段大小分别为 46、65 和 120 kb 的中国春小麦 TAC 文库。郭熙志^[26]在 2004 年成功构建了百脉根的基因组 TAC 文库,并得到 6 个阳性克隆。

表 1 几种克隆载体的性质比较

Table 1 Comaration on several cloning vector			
载体 Carrier	宿主细胞 Host cell	遗传稳定性 Hereditary stability	载体容量/kb Capacity of carrier
质粒 Plasmid	大肠杆菌	稳定	15~20
YAC	酵母	不稳定	350~1000
BAC	大肠杆菌	稳定	100~300
BIBAC	大肠杆菌/农杆菌	稳定	100~300
TAC	大肠杆菌/农杆菌	稳定	100

3 大片段 DNA 文库的构建

构建基因组 DNA 大片段文库对于真核生物的物理作图、基因结构和基因组测序等研究具有举足轻重的作用。基因组文库的发展主要依赖于克隆载体的发展,利用这些载体已成功构建了许多基因组文库。

3.1 载体的制备

载体的制备在文库构建中是非常重要的一环,其质量的高低直接影响后续的连接和转化等问题。利用碱裂解法提取载体,CsCl 连续梯度纯化,酶切后 HK 去磷酸化处理。载体的纯度越高越好,后续的构建工作越顺利文库的质量也越高。转化效率也受脱磷影响,载体脱磷不足,转化率也相应降低,因此脱磷工作是非常必要的。进行脱磷后的载体不能在一 80℃ 长期保存,会产生降解现象。此外,也不能进行反复冻融,冻融次数多也会影响载体的效率。

3.2 高分子量(HMW)DNA 的制备

选取适当的材料样品,放在加有液氮的研钵中充分研磨直至粉末状。在研磨的过程中要保证液氮充足,否则 DNA 容易发生降解。去除细胞器和杂质的方法主要有两个,一个是用核提取液将其去除,另一个是提取细胞核裂解后直接通过一次脉冲电泳,回收 MB 级 DNA。由于第二种方法既简便,除杂的效果又好,所以常用第二种方法。大片段 DNA 的回收一般采用电透析法,不仅得到的 DNA 更加完整,而且还能避免熔化时对 DNA 的损伤。

3.3 大片段 DNA 与载体的连接

大片段与载体连接的比例随着生物物种间的不同而不同。在连接之前要摸索出最佳的连接条件,如连接时间和酶浓度等,以确保会得到较理想的转化率。

3.4 重组载体转化受体感受态细胞

在构建文库中,电击转化是一种常用的方法。电转化率受一些条件因素影响,如片段大小、pH、电压、电极间距、温度和连接酶等。片段越小,电击转化率越高,可能性越大。所以,在电转化前摸索好最佳的转化条件是很必要的。

3.5 阳性克隆的保存

阳性克隆保存常用的有两种方法,即人工法和全自动工作台技术(robotics)两种。后一种的操作更加简单,结果更加精确严密,但是它价格昂贵成本高,所以一般采用人工法。然而对于规模巨大的文库来说,克隆池也是一个较好的方法。

4 大片段 DNA 文库的鉴定

基因组文库构建完成以后,对构建成的文库进行质量评估是非常有必要的。插入片段平均大小、空载率和嵌合率、细胞器的污染程度、基因组的覆盖率等都是文库鉴定的检测内容。空载率和嵌合率直接影响着文库的质量,一个相对好的文库来说,空载率一般要在 5% 以下,嵌合率越低基因组文库质量越高。

5 大片段 DNA 的应用

1987 年,以大片段 DNA 克隆到 YAC 载体上为开端,大片段 DNA 基因组文库技术经过不断发展,到现今已有不可替代的地位。植物大片段 DNA 已在许多方面的研究中起到了非常重要的作用。

5.1 图位克隆

图位克隆,又称定位克隆,是 Alan Coulson 在

1986 年首次提出的一种分离基因的有效方法。它可通过目的基因的位置就能进行基因分离,不需要基因的顺序以及表达产物等的信息要求。利用图位克隆技术进行基因克隆,关键是能否高效地将候选克隆 DNA 片段进行互补实验,以确定目的基因的特定片段。由于用来转化植物的常用载体所携带的片段一般不超过 25 kb,所以利用容量小的载体构建亚克隆文库的工作就变得艰难。

5.2 基因组测序

许多测序工作都是在文库构建的基础上展开的,如人类基因组及水稻基因组的测序工作也已顺利完成了。通常来说测序采用的是鸟枪法和 BAC-by-BAC。鸟枪法的成本相对较低,速度也较快,而 BAC-by-BAC 则是更精确,有利于高精度测序。也有测序是结合二者的特点,即 BAC-鸟枪法。

5.3 比较基因组学

比较基因组学(comparative genomics)是通过不同物种的已知基因与基因组结构相比较,来了解基因的功能、表达机理以及物种进化。有 3 种方法来比较基因组,分别是 DNA 微阵列、生物信息学和 BAC 阵列(BAC arrays)。

5.4 分子标记

DNA 分子标记技术经过数年的发展,现已是生物学科中非常重要的一项分子技术。目前,已经产生多种 DNA 分子标记技术,如 RFLP、AFLP 和 RAPD 等。

这项技术不受外界环境、季节的限制,有较好的多态性,易于观察记录和遗传稳定等优点。

过去,常规的植物育种是依靠植株的表型来选择,DNA 分子标记技术的出现打破了这种局面,出现了分子育种这一新的阶段。利用分子标记技术可以对植物品种进行改良,提高了育种的效率,为植物遗传育种的研究做出了贡献。

传统的转基因体系不能把大片段 DNA 转到植物中,BIBAC 和 TAC 载体使这个成为可能,它们可直接用来制备转基因植物。Lin^[27]等利用供体载体 pYLSV、pYLV 和受体载体 pYLTAC747,构建了可连接和转移多个基因的转化载体系统。Liu 等^[28]在拟南芥 TAC 文库的基础上,选出两个可能含有 SGR 1 的大小为 75 和 80 kb 的 TAC 质粒,将携带有 80 kb 的 TAC 质粒转化 sgr1 突变体进行互补试验,结果获得了上千个转化体,成功地将含有重力感应基因

SGR1 的大片段 DNA 转到拟南芥重力感应缺陷型中,使其恢复了对重力的感应性。Bancroft 等^[29]构建了 pCLD04541 双元载体。另外,在豆科模式植物百脉根和花卉模式植物金鱼草^[30]中也构建了可转化植物的大片段 DNA 文库,可用于关键基因克隆和基因组图谱的绘制。

6 展望

植物大片段 DNA 的研究,已成为植物分子生物学研究的一个重要阶段,它也是从单基因研究向多基因研究的一个过渡。分子生物学高速发展,大片段基因组文库也已在分子生物学和遗传学等学科的发展中起到了非常重要的作用,对基因功能研究有着很大的推进作用。在许多植物中,大片段 DNA 已经用于遗传转化,如灵芝、水稻、番茄和花生等,打破传统的育种方法得到转基因植株。然而国内大片段 DNA 的研究相对国外起步较晚,还面临着许多挑战,比如,如何提高农杆菌介导的植物遗传转化率低的问题,转化后的外源基因能否在植物中高效表达等。相信在今后的发展中,大片段 DNA 的作用会越来越重要,所面临的困难也会迎刃而解,为分子生物学的发展做出巨大贡献,更让人们未来的转基因植物充满期待。

参考文献:

- [1] Hohn B, Collins J. A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments[J]. Gene, 1980, 11: 291.
- [2] 张大鹏,石强,刘铁铮,等.用粘粒载体构建山羊基因组文库[J].江苏农业学报,2003,19(2):104-108.
- [3] 刘阳,范云六,田菁(*Sesbania rostrata*) cosmid 基因组文库的建立和豆血红蛋白基因序列的克隆[J].中国农业科学,1991,24(5):77-82.
- [4] 侯芷英,范明远,刘延清.用粘粒载体克隆霍乱弧菌染色体基因方法的建立[J].中国微生物学杂志,1990,2(3):50-56.
- [5] 王雅丽,徐旭东.小球藻南极株和温带株基因组 cosmid 文库的构建[J].水生生物学报,2011,35(6):1063-1066.
- [6] 黎伶俐,夏家辉,潘乾,等.中国人基因组 YAC 文库的构建及首批克隆鉴定[J].当代医师,1996(3):20-21.
- [7] 关伟军,马月辉.濒危畜禽品种 YAC 基因组文库的构建[J].中国农业科技导报,2003,5(4):77-79.
- [8] Fu huihua, Dooner H K. Construction of soybean seed pod-specific BAC library materials[J]. Genome Research, 2000, 10: 866-873.
- [9] Song J Q, Dong F G, Jiang J M. Barley BAC library construction and three-dimensional mixed pool HvGW2 Screening[J]. Genome, 2000, 43: 199-204.
- [10] Woo S S, Jiang J M, Gill B S, et al. Construction and identification of blast resistance in rice BAC library[J]. Nucleic Acid Research, 1994, 22(22): 4922-4931.

- [11] 刘志红. 绒山羊 BAC 文库的构建与鉴定以及绒毛生长发育相关基因的筛选[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2009.
- [12] 刘进. 仿刺参 *Apostichopus japonicus* 基因组 BAC 文库的构建研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
- [13] 关媛, 陈琪, 潘俊松, 等. 黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) BAC 文库的构建及连锁群特异克隆的分离[J]. 自然科学进展, 2008, 18(2): 211-215.
- [14] Hamilton C M, Frary A, Lewis C, et al. Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosome[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(18): 9975-9979.
- [15] Hamilton C M, Frary A, XU Y, et al. Construction of tomato genomics DNA libraries in a binary-BAC (BIBAC) vector[J]. Plant Journal, 1999, 18: 223-229.
- [16] 何瑞峰. 药用野生稻基因组文库构建与大片段 DNA 转化[D]. 武汉: 武汉大学, 2003.
- [17] 管雨, 杨洋, 张智俊, 等. 毛竹大片段双元细菌人工染色体基因组文库的构建[J]. 浙江农林大学学报, 2011, 28(4): 527-532.
- [18] Zhang M P, Zhang H B, Wang Y. A plant-transformation-competent BIBAC library of ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) for functional genomics research and characterization of genes involved in ginsenoside biosynthesis[J]. Molecular Breeding, 2013, 31(3): 685-692.
- [19] 成志伟, 曹筑荣, 陈良碧, 等. 东乡野生稻双元细菌人工染色体 (BIBAC) 文库的构建[J]. 生物技术通报, 2006(S): 272-275.
- [20] 刘华清, 周君丽, 段远霖, 等. 籼稻品种 H359 基因组可转化人工染色体 (TAC) 文库的构建[J]. 分子植物育种, 2003(1): 27-32.
- [21] 杨正安, 丁玉梅, 张应华. 黑籽南瓜基因组可转化人工染色体 (TAC) 文库的构建及分析[J]. 农业生物技术学报, 2012, 20(2): 211-217.
- [22] 李亚宁. 粳稻全基因组物理图谱及非洲野生稻 BIBAC/TAC 文库的构建[D]. 保定: 河北农业大学, 2004.
- [23] Qu S, Coaker G, Francis D, et al. Development of a new transformation-competent artificial chromosome (TAC) vector and construction of tomato and rice TAC libraries[J]. Molecular Breeding, 2003, 12(4): 297-308.
- [24] 赵立军. 多枝赖草基因组 TAC 文库的构建[D]. 石家庄: 河北师范大学, 2005.
- [25] Liu Y G, Nagaki K, Fujita M, et al. Development of an efficient maintenance and screening system for large-insert genomic DNA libraries of hexaploid wheat in a transformation-competent artificial chromosome (TAC) vector[J]. Plant Journal, 2000, 23: 687-695.
- [26] 郭熙志, 刘耀光, 罗达. 以可转化人工染色体 (TAC) 载体为基础的百脉根基因组文库的构建及筛选[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2004, 30(2): 234-238.
- [27] Lin L, Liu Y G, Xu X P, et al. Efficient linking and transfer of multiple genes by a multigene assembly and transformation vector system [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(10): 5962-5967.

伊犁河谷设施蔬菜发展对策

张学超,常文静,唐式敏

(伊犁州农业科学研究所,新疆 伊宁 835000)

摘要:通过概述伊犁河谷设施蔬菜生产现状,指出发展中存在的主要问题,即基础设施不完善、栽培技术不规范、多数设施蔬菜产品没有达到绿色和无公害标准、组织化程度低等,探讨了伊犁河谷设施蔬菜的可持续发展对策,包括制定优惠政策鼓励发展,提高设施蔬菜科技含量,发展绿色、无公害蔬菜,实现标准化生产,推进产业化经营发展。

关键词:伊犁河谷;设施蔬菜;蔬菜生产

中图分类号:S626 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2015)02-0151-03 **DOI:**10.11942/j.issn1002-2767.2015.02.0151

设施农业是发展现代农业的重要组成部分,是促进农业增效、农民增收和加快农村发展的重要手段,是实现农业产业结构优化升级的有效途径^[1]。近年来,伊犁河谷以设施蔬菜为主要发展模式的设施农业进入快速发展阶段,设施蔬菜面积不断扩大,单产水平逐步提高,效益也快速增加,呈现出良好的发展状态。分析伊犁河谷设施蔬菜生产发展现状,探讨存在的主要问题,提出今后发展的对策和建议,对伊犁河谷设施蔬菜产业的持续、健康发展具有一定的参考意义。

1 伊犁河谷设施蔬菜生产发展现状

伊犁河谷的设施农业起始于 20 世纪 80 年代后期,当时主要是以塑料拱棚为主,进入 90 年代以后,各级政府加大对设施农业的投入和扶持力度,制定和出台了一系列的优惠政策,以日光温室为主要模式的设施农业进入快速发展的阶段,进入 2000 年以来,伊犁河谷设施农业开始规模化发展,到 2013 年设施农业面积达到 1.1 万 hm²,其中日光温室面积达 0.52 万 hm²。从日光温室种植情况来看,主要是以蔬菜为主,已形成 18 个千亩连片温室生产基地,86 个百亩连片生产基地,建有保鲜库 20 座,仓储能力 6 万 t,登记备案出口蔬菜基地 29 个。

收稿日期:2014-12-23

第一作者简介:张学超(1972-),男,河南省浉池县人,农业推广硕士,高级农艺师,从事园艺作物研究。E-mail:zhangxuechao678@16.com。

[28] Liu Y G, Shirano Y, Fukaki H, et al. Complementation of plant mutants with large genomic DNA fragments by a transformation-competent artificial chromosome vector accelerates positional cloning[J]. PANS USA, 1999, 69: 6535-654.

[29] Bancroft I, Love K, Bent E, et al. A strategy involving the use of high redundancy YAC subclone libraries facilitates the contiguous representation in cosmid and BAC clones of 117 Mb of the genome of the plant Arabidopsis thaliana[J]. Weeds World, 1997, 4(2):1-9.

[30] Zhou J L, Wang F, Ma W SH, et al. Structural and transcriptional analysis of S-locus F-box genes in Antirrhinum[J]. Sexual Plant Reproduction, 2003, 16: 165-177.

Research Progress of Large Fragment DNA Cloning Vector

YU Yang, JIANG Shi-cui, WANG Kang-yu, XUE Fei, ZHANG Mei-ping, WANG Yi
(College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

Abstract: DNA cloning techniques is a very important technology in molecular biology and genetic engineering research. Since the first pSC101 plasmid cloning vector as the first cloning vector, the rapid development of molecular biology techniques, the overall structure of the cloning vector, the capacity-load capacity and conversion efficiency had been greatly improved. Through the reviews of the development situation of the cloning vector, as well as construction and application of large fragments of DNA libraries, and large pieces of DNA genetic transformation of development were put forward.

Keywords: cloning vector; BIBAC; large fragment DNA