

主要淡水养殖鱼类基因文库的构建

王朝元 汤伏生

(中国水产科学研究院长江水产研究所, 沙市 434000)

摘要 本研究构建了青鱼、草鱼、鲤、鲫、鳊、三角鲂等六种鱼的基因文库。 λ_{EMBL_3} 为载体,用上述各种鱼—肝组织制备大片段染色体DNA,部分酶解的染色体DNA与载体DNA连接,重组DNA经过体外包装,构成基因文库。各种鱼的染色体DNA重组斑数均约在 1×10^6 左右,文库中基因的覆盖率高于99%。

关键词 青鱼,草鱼,鲤,鲫,鳊,三角鲂,基因文库,DNA

应用S. N. Cohen等人建立的DNA重组技术,将鱼细胞内染色体DNA重组克隆构建基因文库,这不仅是保存鱼类遗传信息的有效途径,也是克隆鱼类目的基因的基础工作。近年来,国外学者为分离大麻哈鱼^[2]、虹鳟^[3]、鲤^[4]等的生长激素基因,进行了这些鱼的染色体基因文库或cDNA文库的构建。我国学者也进行了黄盖鲮^[1]等鱼的基因文库构建工作,在分子水平上保存了这些鱼类的种质资源,同时为进行这些鱼的目的基因克隆打下了基础。

材料与方 法

(一)实验鱼、菌种及试剂

本实验所用的实验鱼青鱼、草鱼、鲤、鲫、鳊、三角鲂均来自本所实验场。所用基因工程菌株E. Coli BHB2688, E. Coli BHB2690, E. Coli K802, E. Coli LE392,噬菌体 λ_{EMBL_3} 分别来自蒋耀青、陈永福、薛国雄先生实验室。

Proteinase K, T₄ DNA ligase, CIP(小牛肠道磷酸酯酶), Sau3A1, EcoR1, BamH1均使用Sigma公司产品。DTT, Putrescine, β -mercaptoethanol, ATP均为进口产品。其它试剂均为国产AR级。

(二)鱼类染色体大片段DNA的制备

采用Maniatis等^[5]和Davis等^[6]介绍的有关方法进行大片段DNA抽提,然后经TE透析,透析液体积为样品的50倍,透析三次,每次12小时。此时透析液OD₂₇₀ < 0.05,将此液稀释200倍进行240~300nm扫描,测试结果见图1,由于操作中稀释较大,必须进行浓缩后方可进行以下的工作。

收稿日期:1994—03—02。

(三) 包装蛋白的制备及保存

采用 Maniatis 等介绍的有关方法进行。包装蛋白通常应保存于 -80°C , 但由于种种原因有时达不到 -80°C 。本文将包装蛋白分装后放入液氮中, 待温度达到 -80°C 以下后, 将其迅速存放于 -20°C 冰箱, 其效价至少可以保存 4 个月不变, 结果见表 1。

表 1 包装蛋白 -20°C 保存实验结果

Table 1 Result of the titer of package extracts preserved at -20°C

保存时间 Time	30 天 30 days	60 天 60 days	90 天 90 days	120 天 120 days
效价 Titer	5.0×10^8	4.6×10^8	5.2×10^8	4.8×10^8

(四) 载体 DNA 的制备

取适量 λ_{EMBL_3} DNA ($50\mu\text{g} \sim 70\mu\text{g}$), 浓度 ($0.1 \sim 0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 加入 $10 \times \text{BamH1}$ 反应缓冲液 1/10 体积, 加入 $3\text{U}/\mu\text{g}$ λ_{EMBL_3} DNA 的 BamH1 , 37°C 保温过夜, 电泳检查三条带是否清晰, 有无未被切动的情况。

将体系中补加一定量的 NaCl 及 $\text{Tris. Cl}(\text{pH}7.5)$ 溶液, 使之达到 EcoR1 的高盐反应体系。 [10mM NaCl , $50\text{mM Tris. Cl}(\text{pH}7.5)$, 10mM MgCl_2 , 1mM DTT], 加入 EcoR1 , 浓度为 $3\text{U}/\mu\text{g DNA}$, 37°C 保温 12 小时。

氯仿抽提三次, 轻摇, 离心取水相, 酒精沉淀 DNA。

结 果

(一) 大片段 DNA 的扫描

结果见图 1

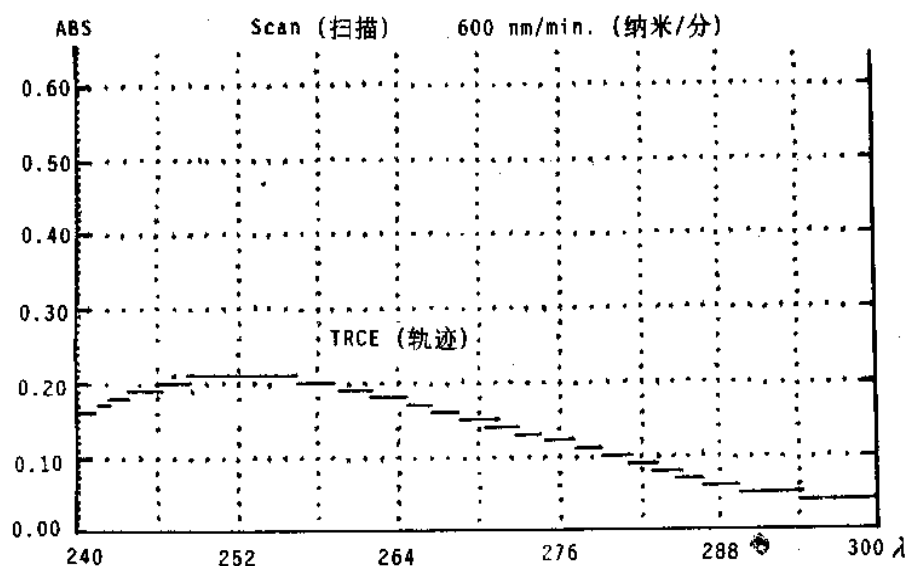


图 1 鲫染色体 DNA 分光光度计 240~300nm 扫描结果

Fig. 1 Scanning result (240~300nm) of black bream genomic DNA in spectrophotometer

透析后 DNA 液的 $OD_{280}=0.0507$, $OD_{260}=0.0907$ 。 $OD_{260}/OD_{280}=1.97$ 。这表明染色体 DNA 纯度很高(比例大于 1.80 即说明纯度很高)。所得 DNA 浓度为 $97.77\mu\text{g}/\text{ml}$, DNA 浓度稍稀,必须经过浓缩后方可进行下一步工作。

(二)大片段染色体 DNA 电泳,部分酶解及电泳回收

结果见图 2—4。图 2 表明染色体 DNA 片段大于 50kb,符合构建基因文库的需要,经部分酶解预实验(见图 3)后,部分酶解产生的 DNA 片段经琼脂糖凝胶电泳回收,得到的 DNA 片段见图 4。回收结果表明片段大小约为 20kb,较为理想。



图 2 鲫大片段染色体 DNA,左为 mark DNA(50kb)

Fig. 2 Large pieces of genomic DNA of black bream, the left is the marker(50kb)

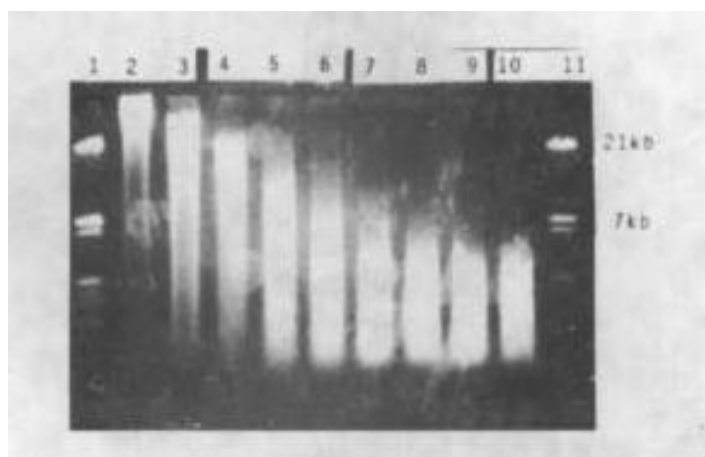


图 3 鲫染色体 DNA 部分酶解

Fig. 3 Partially digested genomic DNA of black bream



图4 鲫染色体 DNA20kb 片段(右),左边为 mark DNA

Fig. 4 The 20kb fragments of black bream genomic DNA, the left is marker DNA

(三)载体 DNA 制备

结果见图5,中间一道即为载体 DNA,结果较好。左第一道为野生 λ DNA,右第一道野生 λ DNA 经 EcoR1 酶切片段。



图5 λ DNA 的制备

Fig. 5 The preparation of λ_{EMBL_3} DNA

(四)文库中重组斑数

文库构建所需重组克隆数计算如下:

$$N = \frac{L_n(1-p)}{L_n(1-f)}$$

P——文库中克隆基因占全基因数的比例($P=0.99$)

f——克隆片段大小与全基因大小之比

一般鱼的染色体 DNA 约为 3×10^9 bp,文库中克隆片段大小为 1.7×10^4 bp(17kb)

所以:

$$N = \frac{\ln(1-0.99)}{\ln(1-\frac{1.7 \times 10^4}{3 \times 10^9})} = 8.8 \times 10^5$$

按理论计算,每种鱼基因文库所需最少重组噬斑数为 8.8×10^5 个。本文中各种鱼的重组斑数见表 2。

表 2 各种鱼基因文库重组斑数

Table 2 Number of recombinant phages in the six genomic libraries

DNA 来源 DNA resource	青 鱼 Black carp	草 鱼 Grass carp	鲤 Common carp	鲫 Goldfish	鳊 White bream	三角鲂 Black bream
文库中重组体总数 Numbers of recombinant phages in each genomic library	1.2×10^6	1.0×10^6	1.25×10^6	1.15×10^6	0.97×10^6	1.1×10^6

讨 论

1. 鱼类染色体大片断 DNA 制备 提取大片段 DNA 最根本的一步是蛋白酶消化作用。Davis 等^[6]强调所使用蛋白酶必须是粉剂。在实验中,我们发现使用粉剂的效果并不十分理想。因为加入的蛋白酶为粉剂,而细胞裂解液中分子量核酸很多,其它固形物量也很大,所以加入的蛋白酶需要特别长时间分散并溶解,经过搅拌也会长时间集于一处,不利于其发生作用。而 Maniatis 等^[5]介绍的方法中,加入蛋白酶为溶于水的 20mg/ml 蛋白酶水剂,同样存在上述水溶解之蛋白酶与粘性特强的核酸混合液不易搅拌均匀的问题,而且蛋白酶的使用量偏小,消化蛋白所需时间特别长,蛋白不易去尽。本文设计将此步骤改为加入已溶于 RSB 的蛋白酶 K,用量与 Davis 等介绍的相同,现配现用,效果良好。由于溶解核酸的溶液与溶解蛋白酶的溶液 pH,离子浓度均相近,所以蛋白酶渗入核酸粘液速度更快。

用蛋白酶消化 2—4 小时对于组织匀浆细胞来说,时间太短,这时溶液粘度特别大,肉眼可见大量不均匀块悬浮于其中。如果此时即进行抽提,核酸损失很多,即使是被消化作用除去蛋白质后较纯净的大片段核酸也容易与未消化的染色体连在一块,被抽提到界面而被弃掉。所以,消化时间应延长到 8—12 小时或更长,此时溶液中块状较少,粘度大,但比刚破细胞时小。此时用酚抽提,蛋白较易去尽, DNA 得率较高。

用各种方法制备大片段的染色体 DNA 各有利弊。用 SDS 破细胞,蛋白酶消化制备大片段 DNA 是最常用的方法,但抽提过程十分重要。抽提时有机相与水相混合很慢,花时间很长,一般需要不停地摇动离心管。本实验采用在灭菌的磨口三角瓶中进行抽提,将等体积酚加入核酸混合液中后放于摇床中缓缓旋转式摇动,每次二十分钟左右,两相界面消失,离心分离效果较好。抽提过程必须是缓慢的,否则 DNA 片段受损伤的程度增大,片段变小,不利于以后的实验。

2. 两臂的制备 λ_{EMBL_3} DNA 为双酶切位点载体,需要二种酶 BamH1 及 EcoR1 酶切,两种酶切的反应缓冲液相差很远,一般资料推荐先将 λ_{EMBL_3} DNA 用 BamH1 酶切,然后抽提,酒精沉淀后重溶,再将反应体系调到 EcoR1 反应缓冲体系,再进行酶切,沉淀重溶,得到除去中

间片段的两臂。这种方法无疑是精确的,但一般每次酶解 λ_{EMBL_3} DNA 量有限,经过两次抽提,沉淀,DNA 量损失很大,而且 DNA 的完整性易受机械损伤。本文采用了一种只需一次抽提和沉淀的方法制备双臂。用本法制备两臂,只需一次沉淀,DNA 得率较高,操作步骤简单。实验表明,这种方法得到的载体 DNA 完整性较好,本底不高,适应于做文库。

参 考 文 献

- [1] 蒋耀清等,1989. 黄鳝瓣抗冻蛋白的分离与 cDNA 克隆. 遗传,11(6):33.
- [2] Sekine, S. and Mizukami, T., 1985. Cloning and expression of cDNA for salmon growth hormone in *Escherichia coli*. Proc Natl. Acad. Sci. USA. 82:4306—4310.
- [3] Rentier-Delrue, F. 1989. Molecular cloning and characterization of two forms of trout growth hormone cDNA; Expression and Secretion of tGH- I by *Escherichia coli*. DNA, 8(2):109—117.
- [4] Koren, Y. *et al*, 1989. Carp growth hormone: Molecular cloning and sequencing of cDNA. Gene, 77:309—315.
- [5] Maniatis, T. *et al*, 1987. Molecular cloning, 280—281, 264—267. Cold Spring Harbor Laboratory.
- [6] Davis, L. G. *et al*, 1986. Molecular Biology, 47—50. Elsevier.

CONSTRUCTION OF THE GENOMIC LIBRARIES OF PRIMARILY CULTIVATED FRESHWATER FISHES

Wang Chaoyuan Tang Fusheng

(Changjiang Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery sciences, Shashi 434000)

ABSTRACT Genomic libraries of six kinds of fishes, Black carp (*Mylopharyngodon piceus*), Grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*), Common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus), Goldfish (*Carassius auratus*), White bream (*Parabramis pekinensis*) and Black bream (*Megalobrama terminalis*) were constructed. λ_{EMBL_3} phage DNA was used as vector DNA. Large pieces of genomic DNAs were prepared from liver tissues of these fishes. Partially enzymolysed genomic DNAs were connected with vector DNA; the recombinant DNAs were packaged in vitro and genomic libraries were completed.

In this study, the number of each of the recombinant λ phage plaques of these six kinds of fishes were approximately 1×10^6 . The gene coverage in these libraries is above 99%.

KEYWORDS Black carp, Grass carp, Common carp, Goldfish, White bream, Black bream, Gene library, DNA