

一种高通量提取棉花 BAC-DNA 的方法

A High Throughput Approach for Cotton BAC-DNA Isolation

王 凯, 张燕洁, 张天真

(南京农业大学棉花研究所 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095)

从文库中筛选目标克隆组成重叠克隆群(contigs)是利用 BAC(bacterial artificial chromosome)文库构建物理图谱,进一步进行图位克隆的重要步骤。文库的筛选按原理可分为探针杂交法和 PCR 法两种。与探针杂交法相比 PCR 法具有周期短,灵敏度高,操作简单的特点,因此得到广泛应用。但是,即使利用各种混合策略,相对于数万文库克隆来说,BAC-DNA 的提取仍是 PCR 法筛选文库不可避免的问题。因此,我们开发了一种高通量的 BAC-DNA 提取方法,实现在 8 h 内完成多达 960 个样品的高通量提取,DNA 产量达到 4~6 μg ,样品无交叉污染并且避免了手工提取极易产生的样品混淆的错误。

1 材料和方法

1.1 BAC 文库

BAC 文库混合池由美国农业部南方平原农业研究中心 John Z Yu 博士提供,分别按行和列混合成 2224 个 RP Pools(24 个单克隆/Pool)和 3336 个 CP Pools(16 个单克隆/Pool)。

1.2 培养与提取的主要仪器设备

MultiPROBE II EX 核酸蛋白自动纯化及样品制备工作站;MicroMix5 震动混合仪;Eppendorf 5810R 离心机带有 A-4-62 96 孔板离心转子;2.2 ml 96 深孔板及配套树脂橡胶盖。

1.3 细菌的培养及 BAC-DNA 的提取

于 96 深孔板每孔加入 1ml 2 \times TY 液体培养基(含 12.5 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 氯霉素),用灭菌牙签将文库接种于深孔板中,盖上橡胶盖,37 $^{\circ}\text{C}$ 250 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 24 h。

将培养好的深孔板于 Eppendorf 离心机 4000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min(4 $^{\circ}\text{C}$);揭掉橡胶盖,迅速倒转深孔板并用纸巾敷于孔口,吸净残液;开动工作站及震动混合仪(High Speed),加入 150 μl 冰预

冷的溶液 I(50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Glucose;25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8.0;10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, pH 8.0),震动 2 min 重悬;加入新配的 300 μl 溶液 II(0.2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH;1% SDS),震动(High Speed)5 s,置冰上 5 min;加入 225 μl 冰预冷的溶液 III(3 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸钾;11.5% 冰乙酸),震动(Low Speed)10 s,冰浴 10 min;4000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min(30 $^{\circ}\text{C}$);吸取 400 μl 上清于另一深孔板;为充分去除不溶沉淀,再一次离心 15 min(30 $^{\circ}\text{C}$);吸取上清 325 μl ;加入 325 μl 冰预冷异丙醇,-20 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀过夜;4000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,倒转深孔板并用纸巾吸干孔口残留异丙醇;加入 500 μl 70% 乙醇,震动(Low Speed)2 min,离心后倒掉上清,擦干孔口,在室温下干燥;加入 50 μl 含 0.25 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ RNaseTE(pH 8.0)室温重悬,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4 SSR 标记 PCR 法筛选文库

为方便快捷筛选文库,我们利用了两维法筛选策略:将每 24 个 CP pools 混合成一个 Plate pool(384 个单克隆)。标记先在 Plate pools 中筛选,再分别筛选与阳性 Plate pool 相应的 CP pools 和 RP pools 以确定阳性单克隆。

PCR 反应参考 Cai 等(1995)和张军等(1995)的方法略加修改:引物的量增加至 1.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$;按标记重新设定退火温度(55~57 $^{\circ}\text{C}$)。多标记 PCR(multiplex PCR)参考 Nguyen 等(2004)的方法:首先选择 T_m 相同且多态位点不重叠的 2~4 个标记,反应总体积为 20 μl ,其它各成分浓度不变,反应程序及电泳检测同上所述。

2 结果与讨论

2.1 细菌在 96 孔板中培养条件的优化

为了获得高产量的 BAC-DNA,我们选用 LB

及其改进成的 $2\times$ TY丰富培养基进行不同培养时间对比以求获得最佳效果。于同一深孔板分别加入两种培养基各半,接种后 37°C $250\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养不同时间(12、14、16、18、20、22、24、26 h),测定细胞浓度(OD_{600}),提取DNA后测定DNA产量(OD_{260})。结果显示:不同的培养时间, $2\times$ TY丰富培养基中细胞浓度和BAC-DNA的产量都高于LB培养基;并且在24 h两种培养基细胞生长都达到饱和状态,DNA的产量亦不再增加;但较短的培养时间(12~16 h),会大大降低DNA的产量。因此,选择 $2\times$ TY丰富培养基培养24 h进行细菌培养。

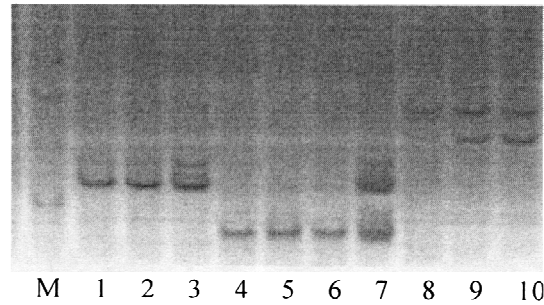
2.2 BAC-DNA的提取

利用一套自动化移液系统(MultiPROBE II EX),该移液系统具有自动、精确的移液操作特点。因此,应用此系统和96孔板不但大大减少操作时间,杜绝了样品的混淆,而且标准化的操作也提高了提取的BAC-DNA的质量。为了更好的去除不溶的细胞碎片、基因组DNA等杂质,将离心温度设为 30°C ,时间为15 min。结果发现:不溶杂质在此条件下较 $4\sim 20^{\circ}\text{C}$ 或更短的离心时间(5~10 min)能够显著地被沉淀;另外,增加了一次离心、吸取上清的步骤,这也是最为关键的一步,因为第一次除非吸取很少的上清液($200\sim 250\ \mu\text{l}$),否则很难得到澄清的液体,而增加一次吸取步骤后,既去除了杂质又避免造成DNA的损失。

2.3 PCR法筛选文库

PCR反应条件及DNA的质量都会影响阳性克隆的筛选。因此,在原有SSR标记的反应条件基础上增加了引物的量,并依不同标记重新设定退火温度,以提高PCR的特异性。同时,为了提

高筛选的效率,在筛选过程中应用了两维的筛选策略和多标记PCR,每个模板DNA含有384个单克隆,2~4个标记引物,PCR扩增后得到了特异性高,条带清晰的扩增产物(图1)。这说明,提取的BAC-DNA完全满足SSR标记PCR法筛选BAC文库的要求。



M: Marker; 1、4、8: 分别为 BNL1438、NAU694、BNL4094 三个 SSR 标记的对照 TM-1; 2、3、5、6、7: 为 BNL1438、NAU694 两个 SSR 标记混合筛选的阳性 Plate pool(384 个单克隆), 其中 7 为具有两个标记的阳性 Plate pool; 9、10: 为 SSR 标记 BNL4094 的两个阳性 Plate pool

图 1 SSR 标记 PCR 法筛选文库 DNA

Fig. 1 PCR screening of BAC clones with SSR

总之,随着植物基因组研究的发展,基因文库尤其是BAC文库技术将被更多的应用,而大量的BAC-DNA的提取将是研究者不可避免的问题。以往手工提取方法费时、费力并且易出错,本文介绍了一种高通量的BAC-DNA提取方法,旨在为研究者实现快速、准确、自动化的BAC-DNA提取从而更好的利用BAC文库技术提供帮助。

