

## 中国美利奴细毛羊 BAC 文库的三维 PCR 筛选

吴新东, 陈芳, 李鑫, 邹毅辉, 邱巍, 高剑峰

石河子大学生命科学学院, 石河子 832000

**摘要:** 本研究利用中国美利奴细毛羊全基因组 BAC 文库, 构建了可供快速筛选的两级水平的混合池, 一级混合池和二级混合池(Primary pools and secondary pools)。一级混合池基于每一 384-well 盘而构建, 由盘、行、列三维混合池组成, 二级混合池基于整个 BAC 文库而构建。设计了一种基于 PCR 技术的快速筛选方法, 先筛选二级混合池, 再根据结果筛选相应的一级混合池。利用此方法只需一步共 66 个 PCR 反应即可从 BAC 文库中 7.4 万个克隆中筛选出 1 个阳性克隆, 或三步 100 个以内的 PCR 反应筛选出多个阳性克隆。以绵羊基因组多态性分子标记 BF94-1 为引物, 用一步共 66 个 PCR 反应成功筛选到 1 个阳性克隆 373D13。

**关键词:** 混合池, 三维筛选, BAC 文库, 绵羊

## Three-dimensional PCR-based Screening of Chinese Fine Wool Merino Sheep BAC Library

Xindong Wu, Fang Chen, Xin Li, Yihui Zou, Wei Qiu, and Jianfeng Gao

Life Science College of Shihezi University, Shihezi 832000, China

**Abstract:** For rapid screening, we constructed two levels pools (primary and secondary pools) of the bacterial artificial chromosome (BAC) library of Chinese fine wool merino sheep. The primary pools were based on the individual 384-well microtiter plate and were prepared with a three-dimensional pooling scheme. Three dimension (plate, row and column) pools were made for each. The secondary pools were based on the entire BAC library. We developed a PCR based strategy to identify positive BACs from sheep BAC library. First, we analyzed secondary pools DNAs, according to the result, we analyzed correlative primary pools. It was one-step screening (66 PCR reactions) that we could screen a single positive clone from 74 000 BACs by our method, or three-step screening (less than 100 PCR reactions) could screen more clones. By one-step screening (66 PCR reactions), we screened successfully a positive clone 373D13 with polymorphism marker BF94-1.

**Keywords:** pools, three-dimensional screening, BAC library, sheep

构建基因组文库的克隆载体大致可分为噬菌体系列(如早期的 $\lambda$ 噬菌体、柯斯质粒、P1 噬菌体和 fosmid 等)和人工染色体系列(如 YAC、BAC 等)<sup>[1]</sup>。前者的克隆能力相对较小( $\lambda$ 噬菌体 24 kb 左右, 柯

斯质粒 35~45 kb), 许多真核生物的基因, 上游启动子序列较长, 又含有大而多的内元, 如此庞大而复杂的结构, 难以作为单一片段克隆于这些载体中, 人工染色体可以很好的解决这一问题。在人工染色

**Received:** March 6, 2008; **Accepted:** April 28, 2008

**Supported by:** the Ministry of Science and Technology (No. 2006DFB33750).

**Corresponding author:** Jianfeng Gao. E-mail: jianfengg@shzu.edu.cn

科技部基金(No. 2006DFB33750)资助。

体系列中, 较之于 YAC, BAC 具有如下优点: (1) BAC 重组子在 *E. coli* DH10B 中拷贝数低, 遗传稳定, 极少发生重排(<5%)、缺失及嵌合现象, 便于物理图谱的制作; (2) BAC 电激转化率比 YAC 转化率高 10~100 倍; (3) BAC 以环状超螺旋形式存在, 易于分离提取; (4) BAC 插入片段可直接进行末端测序, 这些优点正好弥补了 YAC 的不足, 所以一经问世便很快替代了 YAC, 被应用于基因组文库的构建<sup>[2]</sup>。

BAC 文库主要用于基因组物理图谱的制作、基因组序列测定及诸多基因的克隆和功能研究等<sup>[3]</sup>, 主要的筛选方法有放射性杂交、荧光原位杂交、PCR 等<sup>[4]</sup>。但无论哪种方法, 从数以十万计甚至百万计的 BAC 克隆中筛选出极少数的用于深入研究的目标克隆, 构建一套三维混合池可以大大提高筛选效率<sup>[5]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

中国美利奴细毛羊 BAC 文库, 由中国科学院遗传发育研究所与石河子大学共建<sup>[6]</sup>(刘海波等), 该文库以 pCC1BAC/*Hind* III 为载体, 克隆总数约为 19 万, 约 7.8 倍基因组覆盖率, 有序排列在 496 个 384-well 冻存盘中。对 337 个随机挑取的白色克隆进行的 *Not* I 酶切分析表明文库克隆的平均插入片段大小约为 133 kb, 非重组率为 3.2%。理论上, 从该文库中找到任意单拷贝序列的概率为 99.93%。Southern 杂交证实文库克隆片段来源真实。连续多次传代培养实验证实文库克隆的遗传稳定性好。本研究选取该文库 168 个 384-well 盘(约 3 倍基因组覆盖率)作为混合池构建及筛选的材料。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 细菌培养

将 LB 培养基(氯霉素 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )用  $8 \times 200 \mu\text{L}$  移液器加到无菌的 96-well 培养板中, 每孔 800  $\mu\text{L}$ 。每次取出 1 盘 384-well 文库冻存盘, 室温解冻后用 96 孔微孔板复制器接种到 4 个 96-well 培养盘中。接种完毕, 用封口膜将培养盘封好, 盖上盖子, 用皮筋匝好装箱, 37 $^{\circ}\text{C}$ , 200 r/min 培养 24 h。

#### 1.2.2 一级混合池的构建<sup>[5,7,8]</sup>

用  $12 \times$  移液器吸取对应于文库盘第 A 行的 96-well 培养盘中的菌液各 200  $\mu\text{L}$  混合在一起, 标号为 Px-R-A(x 为盘号), 第 B 至 P 行分别标号为 Px-R-B

至 Px-R-P, 共 16 个混合池, 各分装 2 管。同理, 用  $8 \times$  移液器吸取应于文库盘第 1 列的 96-well 培养盘中的菌液各 200  $\mu\text{L}$ , 标号为 Px-C-1, 第 2 至 24 列分别标号为 Px-C-2 至 Px-C-24, 共 24 个混合池, 各分装 2 管。将 4 个 96-well 培养盘中所有剩余的菌液混合起来, 标号为 Px, 共一个混合池, 分装 2 管。以上各混合池 5000 r/min, 离心 7 min, 弃上清, -80 $^{\circ}\text{C}$  保存。后续 167 盘按同样的方法构建一级混合池。

#### 1.2.3 二级混合池的构建<sup>[5,7,8]</sup>

取出一份按 1.2.2 的方法构建好的一级混合池, 将 168 盘的 R-A 合并为一个二级混合池, 标号为 SPT-R-A。同理, 168 盘的 R-B 至 R-P 行分别合并为一个二级混合池, 依次标号为 SPT-R-B 至 SPT-R-P, 共 16 个二级行混合池。同理构建 24 个二级列混合池, 标号为 SPT-C-1 至 SPT-C-24。将 168 个一级盘混合池按 12 列  $\times$  14 行的方式从左到右, 依上而下的顺序排列(表 1), 用构建一级行列混合池的方法构建盘的二级行、列混合池, 依次标号为 SPP-C-1 至 SPP-C-12, SPP-R-A 至 SPP-R-N, 共 12 个盘的二级列混合池, 14 个盘的二级行混合池。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	007	008	009	010	011	012	013	014	015	016	029	030
B	031	032	033	034	035	036	047	048	049	050	051	052
C	053	054	055	056	057	058	059	060	061	062	063	064
D	065	066	137	138	139	140	141	142	153	154	155	157
E	158	159	160	161	162	163	164	165	166	173	174	175
F	176	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209
G	210	211	212	213	214	215	216	235	236	237	238	247
H	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	288	289
I	290	291	292	293	294	295	296	317	318	319	320	321
J	322	323	324	325	326	330	331	332	333	334	335	336
K	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348
L	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360
M	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372
N	373	374	375	376	419	420	421	422	423	424	425	426

#### 1.2.4 质粒提取

按 pCC1BAC 试剂盒说明书及 <http://bacpac.chori.org/bacpacmini.htm> 的 BAC/PAC 提取方案提取 68 个二级混合池质粒, 用 30  $\mu\text{L}$  TE 溶解。一级混合池质粒需要用到时另行提取(参看“分析”部分)。

#### 1.2.5 PCR 筛选

以绵羊基因组多态性分子标记 BF94-1 为引物,

F (5'-3'): CAACGGTCTGCAACCGAATTACC; R(5'-3'): CAATCCGTGGGTTGGAACACAA, 用 PCR 方法分别筛选 SPP-C、R 及 SPT-C、R, 反应体系: 2.0  $\mu$ L 模板 DNA, 0.5  $\mu$ L *Taq* DNA 聚合酶, 1.0  $\mu$ L dNTPs (2.5 mmol/L each), 各 1  $\mu$ L 正向和反向引物(5  $\mu$ mol/L), 1.2  $\mu$ L  $MgCl_2$  (25 mmol/L), 2  $\mu$ L 10 $\times$  PCR Buffer, 加去离子水至 20  $\mu$ L。PCR 程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 然后按(95 $^{\circ}$ C/30 s; 52 $^{\circ}$ C/30 s; 72 $^{\circ}$ C/30 s)进行 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。最后对筛选出的克隆单独进行 PCR 验证。

## 2 结果与分析

### 2.1 结果

绵羊 3 倍基因组文库 7.4 万个克隆按盘、行、列的三维结构被构建成两级水平的混合池, 其中一

级盘、行、列混合池分别为 168、3072 和 4608 个, 二级盘、行、列混合池分别为 26、16 和 24 个。

以 BF94-1 为引物, 筛选 SPP-C、R 及 SPT-C、R, 结果 SPP-C-1、SPP-R-N; SPT-C13、SPT-R-D 出现预期的 186~198 bp 的条带(图 1), SPP-C-1 与 SPP-R-N 的交汇处在 12 列  $\times$  14 行的盘混合池(表 1)中为第 373 盘, 因此, 阳性克隆为 373D13。最后用 BF94-1 对克隆 373D13 进行单独的 PCR 验证, 结果如图 2。

### 2.2 分析

由于本研究所用文库为 3 倍基因组覆盖率, 因此在筛选 SPP-C、R 及 SPT-C、R 后可能会有 1~5 个混合池出现条带, 此时就会因组合方式的增多而出现较多的“假”阳性, 同时也会使后续的筛选变得复杂。这时就需要启用相应的一级混合池<sup>[8]</sup>。

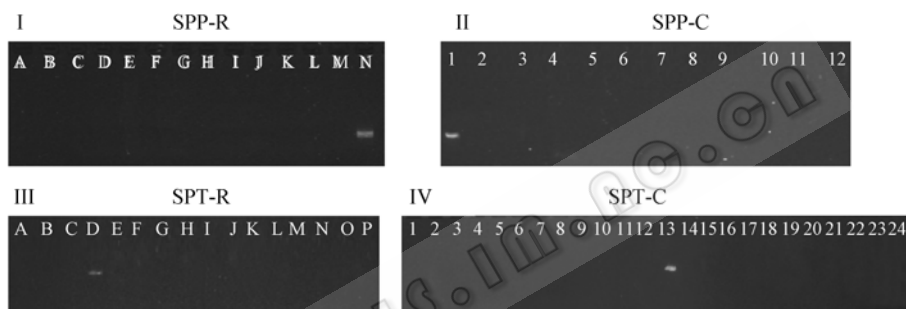


图 1 一步 PCR 从 BAC 文库混合池中筛选含标记 BF94-1 的阳性克隆

Fig. 1 One-step PCR screening of BAC library pools for marker BF94-1

SPP-R-N crosses SPP-C1 was the positive plate 373 according to the Table 1, that was, 373D13 was the positive clone

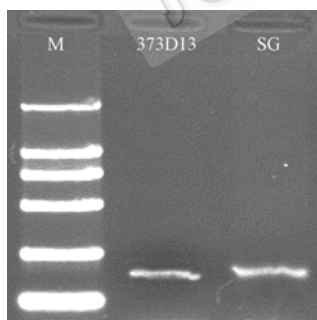


图 2 373D13 的 PCR 确证

Fig. 1 PCR confirming of 373D13

M: marker DL2000; SG: sheep genome

如, 第 1 步 PCR 筛选 SPP-(C、R)和 SPT-(C、R)后, SPP- R-C、E、I 和 SPP- C-6、10(图 3A、3B); SPT-R-D、H、M 和 SPT-C-4、13、23(图 3C、3D) 出现条带。在二级盘混合池(SPP-)中 R-C、R-E、R-I 与 C-6、C-10 交汇处在 12 列  $\times$  14 行的阵列中为第

058、062、163、173、295 和 319 盘(表 1), 第 2 步将这 6 个盘的一级盘混合池单独进行 PCR 扩增, 结果第 058、173 和 319 盘出现条带(图 3E)。因此说明阳性克隆位于第 058、173 和 295 号盘。

第 3 步筛选需启用 058、173 和 295 的一级行混合池 R-D、E、J 及一级列混合池 C3、9、20 为模板进行 PCR 扩增, 电泳结果如图 3F, 058 号盘中的 R-H 与 C-4, 173 号盘中的 R-D 与 C-23, 295 号盘中的 R-M 与 C-13 出现预期条带。说明 058 号盘第 H 行第 4 列, 173 号盘第 D 行第 23 列, 295 号盘第 M 行第 13 列即 058H4、173D23 和 295M13 为含目的片段的 BAC 克隆。

由此可见, 用本筛选系统从文库中 7.4 万个克隆中只需 3 步共 92(66+6+18)个 PCR 反应即可准确筛选出 3 个阳性克隆, 平均约 30 个 PCR 反应便可筛选出正目的克隆, 可见该筛选方法效率之高。

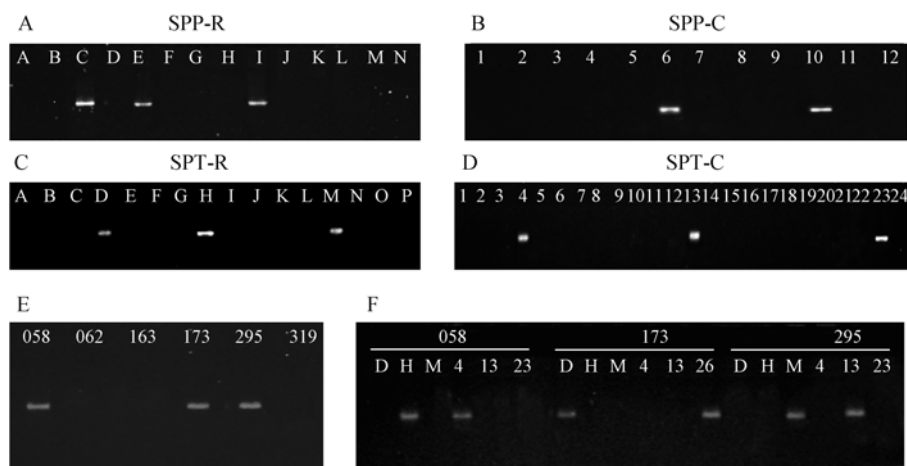


图3 三步 PCR 从 BAC 文库混合池中筛选多个阳性克隆

Fig. 3 Identifying abundant positive clones by three-step PCR screening of BAC library pools

(A~D): the first step PCR screening result, SPP-R-C, E, I crosses SPP-C-6, 10 is plate 058, 062, 163, 173, 295 and 319 according to the Table1; (E): the second step PCR screening result, the positive plates were 058, 173 and 295; (F): the third step PCR screening result, the positive clones were 058H4, 173D23 and 295M13

### 3 讨论

细菌培养过程中, 应注意避免克隆间的相互污染, 因为相互之间, 尤其是临近克隆之间的污染会造成假阳性克隆增多<sup>[9]</sup>, 从而导致筛选次数增多, 96-well 培养盘中出现相互污染时应做好记录, 出现四次以上相互污染的应重新接种。培养时应尽量减少培养基的挥发, 特别是注意其不均等挥发, 不均等挥发将导致克隆在盘混合池中缺失。接种完封上封口膜、盖好盖子后用皮筋匝牢可以有效遏制不均等挥发。

混合池构建过程中, 将 192 个盘的一级混合池按 12 列 × 16 行的方式排列并用一级混合池的构建方法构建盘的二级混合池可以减少确定阳性盘所需的 PCR 反应, 逐盘筛选需 192 个 PCR 反应, 而本方法只需 26(12+14)个 PCR 反应。

筛选时, 如图 3-III、IV, 二级行、列混合池出现 3 个行, 3 个列, 说明有 9 种可能的组合方式, 如果分别筛选 3 个阳性盘中的这 9 个克隆, 需要 27(3 × 9) 个 PCR 反应, 而启用一级混合池进行筛选(图 3)只需 18(3 × 9)个反应。当然, 本例还不足以显示启用一级混合池的优势, 但当文库的基因组覆盖率较高或用简并引物筛选文库时<sup>[10]</sup>, 筛选二级行、列混合池后将会出现更多的阳性行、列, 其可能的组合也会相应增多, 这时启用一级混合池就会显示出极大的优势。当然, 在是否启用一级混合池上要看第一、二步的具体结果来机动对待。因此这一方法并非按固

有的模式机械的运用, 而是针对不同的情况具有相对的机动性。另外, 本方法不仅适用于基因组文库的筛选, 也同样适用于细菌的高通量筛选。

### REFERENCES

- [1] Libert F, Lefort A, Okimoto R, *et al.* Construction of a bovine genomic library of large yeast artificial chromosome clones. *Genomics*, 1993, **18**: 270–276.
- [2] Zimmer R, Gibbins AMV. Construction and characterization of a large-fragment chicken bacterial artificial chromosome library. *Genomics*, 1997, **42**: 217–226.
- [3] Wang Q, Wang B. Progress in bacterial artificial chromosome research. *J Chin Biotech*, 2002, **22**(3): 18–24. 王倩, 王斌. 细菌人工染色体的研究和应用. 中国生物工程杂志, 2002, **22**(3): 18–24.
- [4] Crooijmans RP, Vrebalov J, Dijkhof RJ, *et al.* Two-dimensional screening of the Wageningen chicken BAC library. *Mamm Genome*, 2000, **11**: 360–363.
- [5] Bruno WJ, Knill DJ, Balding DC, *et al.* Efficient pooling designs for library screening. *Genomics*, 1995, **26**: 21–30.
- [6] Liu HB, Liu K, Wang JF, *et al.* A BAC clone-based physical map of ovine major histocompatibility complex. *Genomics*, 2006, **88**(1): 88–95.
- [7] Asakawa S, Abe I, Kudoh Y, *et al.* Human BAC library: construction and rapid screening. *Gene*, 1997, **191**: 69–79.
- [8] Hu H, Li T, Mu J, *et al.* A high efficient approach used for BAC-contig extension of *Oryza sativa* with PCR screening the BAC clone pools. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2002, **34**(3): 358–364.
- [9] He CF, Takao KS. PCR-based screening BAC library and direct end sequencing of BAC clones. *Acta Gene Sin*, 2004, **31**(11): 1262–1267.
- [10] Xu JC, Yang DC, Domingo J, *et al.* Screening for overlapping bacterial artificial chromosome clones by PCR analysis with an arbitrary primer. *Genetics*, 1998, **95**: 5661–5666.