



中华人民共和国国家标准

GB/T 25170—2010

畜禽基因组 BAC 文库构建与 保存技术规程

Technical regulation of farm animals genome BAC library
construction and preservation

2010-09-26 发布

2011-03-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国畜牧业标准化技术委员会(SAC/TC 274)归口。

本标准起草单位:中国农业科学院北京畜牧兽医研究所。

本标准主要起草人:关伟军、马月辉、刘长青、潘春留、刘洪坤、甫亚斌、余露露。

畜禽基因组 BAC 文库构建与 保存技术规程

1 范围

本标准规定了畜禽基因组 BAC 文库构建方法。

本标准适用于猪、牛、羊、马、驴、鸡、鸭、鹅等畜禽的基因组 BAC 文库构建与保存。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

基因组文库 genome library

用重组 DNA 技术将某种生物细胞的核 DNA 的全部片段随机地连接到载体上,再转移至适当的宿主细胞中,通过细胞增殖而形成的各个片段的无性繁殖系的总集。

3.2

细菌人工染色体 bacterial artificial chromosome, BAC

以大肠杆菌致育因子为基础,利用现代重组 DNA 技术体外人工合成的具有容纳高分子量外源 DNA 的特性载体。

3.3

DNA 连接 DNA ligation

在 DNA 连接酶催化下,靶 DNA 片段与载体 DNA 相邻的 5'端磷酸与 3'端羟基之间形成磷酸二酯键的过程。

3.4

感受态细胞 competent cells

在特定条件下细胞膜通透性发生改变,允许外源 DNA 进入细胞内的特殊状态下的受体细胞。

3.5

电转化 electrotransformation

在高压脉冲的作用下,将外源 DNA 导入感受态细胞的过程。

3.6

脉冲场凝胶电泳 pulse field gel electrophoresis, PFGE

利用脉冲场电泳系统电场方向周期性交替变化的功能而分离和鉴定生物大分子的技术。

3.7

重组体 recombinant

两种以上不同来源的 DNA 片段连接所形成的杂种 DNA 分子。

4 试剂及溶液配制

除另有规定外,试剂为分析纯或生化试剂。实验用水要符合 GB/T 6682 中一级水的要求。

4.1 LB 培养冻存缓冲液(luria-bertani media)

360 mmol/L K_2HPO_4 , 13.2 mmol/L KH_2PO_4 , 1.7 mmol/L 柠檬酸钠, 0.4 mmol/L $MgSO_4$, 6.8 mmol/L $(NH_4)_2SO_4$, 4.4% 甘油, 定容至 100 mL, 应用时以冻存缓冲液与 LB 液体培养基 1:9 的比例配制。

4.2 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷贮存液(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside, X-gal)

用二甲基甲酰胺溶解 X-gal, 配成 20 mg/mL 贮存液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

4.3 1 mol/L Tris-Cl

121.10 g/L Tris 碱溶于 800 mL/L 双蒸水(double distilled H_2O , dd H_2O)中, 用 HCl 调 pH 至 8.0, 定容至 1 000 mL, 高压灭菌。

4.4 内切酶缓冲液

10 mg/mL BSA, 10 $\times$ 酶反应缓冲液, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L 亚精胺。

4.5 SOC 培养基

称取 20.00 g 胰化蛋白胨, 5.00 g 酵母提取物, 0.50 g NaCl, 量取 2.5 mL 1 mol/L KCl, 10 mL 2 mol/L $MgSO_4$ 或 $MgCl_2$, 溶于 980 mL dd H_2O , 高压灭菌后冷却至 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下, 加入 10 mL 2 mol/L 葡萄糖溶液。

4.6 异丙基硫代- β -D-半乳糖苷溶液(isopro pylthio- β -D-galactoside, IPTG)

称取 1.00 g IPTG 溶于 5.0 mL 双蒸水中, 过滤除菌装成 1 mL/份, 贮存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

4.7 琼脂糖块储存液

800 mL dd H_2O 中加入 186.10 g 乙二胺四乙酸二钠(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA), 在磁力搅拌器上搅拌, 调 pH 至 8.0 后, 加 dd H_2O 定容至 1 000 mL, 高压灭菌。

4.8 CsCl 密度梯度离心纯化液

3.3 mL 饱和 CsCl, 加灭菌石蜡油至总体积 10 mL。

4.9 十二烷基肌氨酸钠缓冲液(N-Dodecanoyl-N-methylglycine sodium salt, NDS)

称取 186.00 g EDTA 和 1.20 g Tris-Cl, 溶于 700 mL dd H_2O 中, 调 pH 至 8.0, 加入 NDS 调 pH 至 9.5, 用 dd H_2O 定容至 1 L, 过滤灭菌。

4.10 抗凝剂(柠檬酸钠葡萄糖液)

称取 0.48 g 柠檬酸、1.32 g 柠檬酸钠、1.47 g 葡萄糖, 用 dd H_2O 定容至 100 mL, 高压灭菌。

4.11 氯霉素

乙醇配制, 工作浓度为 12.5 $\mu\text{g/mL}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

4.12 Tris(10 mmol/L pH8.0)-EDTA(1.0 mmol/L pH8.0)缓冲液, TE

10 mmol/L pH8.0 Tris-Cl, 1.0 mmol/L pH8.0 EDTA, 高压灭菌, 室温保存。

4.13 LB 液体培养基

称取 10.00 g 细菌培养用胰蛋白胨、5.00 g 细菌培养用酵母提取物、10.00 g NaCl 溶于 800 mL dd H_2O 中, 调 pH 至 7.4, 定容至 1 L, 高压灭菌。

4.14 LB 固体培养基

称取 10.00 g 细菌培养用胰蛋白胨、5.00 g 细菌培养用酵母提取物、10.00 g NaCl, 溶于 800 mL dd H_2O 中, 调 pH 至 7.4, 加入 15.00 g 细胞培养用琼脂, 定容至 1 L, 高压灭菌。

4.15 含特定抗生素培养基

按照 4.14 的方法配制好 LB 固体培养基, 高压灭菌后待其不烫手时, 按 2 mL 培养基: 1 μL 氯霉素(12.5 $\mu\text{g/mL}$)的比例添加氯霉素, 倒 20 mL 培养基于 90 mm 培养板中。待培养基凝固后, 将 40 μL

X-gal 和 7 μ L IPTG 混匀后,均匀涂于培养基表面,超净台里晾干备用。

4.16 碱裂解液 I

50 mmol/L 葡萄糖,25 mmol/L pH8.0 Tris-Cl,10 mmol/L pH8.0 EDTA,定容至 1 L,高压灭菌,4 $^{\circ}$ C 保存。

4.17 碱裂解液 II

0.2 mol/L NaOH,1% SDS,现用现配。

4.18 碱裂解液 III

1.32 mol/L 乙酸甲,4 $^{\circ}$ C 保存。

5 主要仪器、设备

水浴锅、电热恒温鼓风干燥箱、培养箱、电子天平、-80 $^{\circ}$ C 低温冰箱、超纯水仪、低温离心机、凝胶自动成像分析系统和脉冲电泳仪等。

6 基因组 BAC 文库构建

6.1 高分子量 DNA 制备

6.1.1 细胞收集

6.1.1.1 家禽血细胞的收集

采集 3.0 mL~5.0 mL 畜禽新鲜血液,立即注入含 1 mL 肝素钠(500 U/mL)或柠檬酸钠葡萄糖的离心管中抗凝。4 $^{\circ}$ C 下,4 500g 离心 5 min,弃上清,加入等体积预冷的 pH7.0 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS),混匀。上述血细胞收集步骤重复离心 3 次后,加入 1.0 mL PBS 重悬细胞。重悬细胞后计数,将血细胞密度稀释到 1.0×10^8 个/mL~ 2.5×10^8 个/mL。

6.1.1.2 家畜血细胞的收集

采集 10 mL~20 mL 家畜新鲜血液,加入等体积红细胞裂解液,37 $^{\circ}$ C 下放置 1 h,4 $^{\circ}$ C 下,583g 离心 5 min,其余步骤同 6.1.1.1。

6.1.1.3 畜禽其他组织细胞收集

在干冰或液氮存在的条件下,将新鲜的畜禽组织碾成粉末,悬浮在 PBS 中,振荡混匀,用两层纱布过滤。其余步骤同 6.1.1.1。

6.1.2 细胞裂解

取细胞密度为 1.0×10^8 个/mL~ 2.5×10^8 个/mL 的悬液和 1%低熔点琼脂糖在 45 $^{\circ}$ C 下放置 5 min 后,等体积混匀,隔 3 min~5 min 再混匀一次。将 100 μ L 混合液置于专用模具中,4 $^{\circ}$ C 下放置 15 min~30 min 形成凝胶块。将凝胶块置于含有 0.1 mg/mL 蛋白酶 K 和 30 mL 1% NDS 缓冲液中,50 $^{\circ}$ C 下水浴 3 h 后更换相同缓冲液,再 50 $^{\circ}$ C 水浴 24 h~28 h。用 30 mL TE 缓冲液(pH7.6)在 30 min 内洗涤 3 次(冰上操作)以去除 TE 缓冲液,置于 1.0 mmol/L 苯甲基磺酰氟(phenyl methyl sulfonyl fluoride, PMSF)中,50 $^{\circ}$ C 下水浴 30 min,中间换液一次。将凝胶块储存于 0.5 mol/L EDTA(pH8.0)中 4 $^{\circ}$ C 可保存半年。

6.1.3 基因组 DNA 酶切与回收

将凝胶块在 4 $^{\circ}$ C 下用 30 mL TE 缓冲液浸泡 3 h~4 h,中间换液 3 次~4 次。置于 1 mL 的适宜限制性内切酶缓冲液中,冰浴 1 h,中间换液 1 次。分别移至不同酶量(1 U~20 U)的酶切缓冲液中,冰上渗透 1 h 后,37 $^{\circ}$ C 下酶切 10 min~30 min,用 1/10 体积 0.5 mol/L EDTA(pH8.0)终止反应。将不完全消化的 DNA 凝胶块在 0.5 $\times$ TBE 中,13 $^{\circ}$ C,180 V~120 V,120 $^{\circ}$ 角,脉冲时间 60 s~10 s 条件下进行 PFGE 电泳,电泳时间 16 h~24 h。

6.1.4 最适 DNA 片段获得

6.1.4.1 第一次电泳选择

用 1%琼脂糖凝胶电泳分离酶切获得的大分子量 DNA,电泳条件同 6.1.3,电泳时间 24 h。电泳结

束后,取出凝胶,将 DNA 分子量标尺与相邻胶切下,在 $0.5\times\text{TBE}$ 中染色 40 min 后。置于长波紫外灯下观察,用标尺测量并标记凝胶块所需回收的分子量的片段(100 kb~400 kb)。

6.1.4.2 第二次电泳选择

将未染色的样品条带切成 100 kb~200 kb、200 kb~300 kb 和 300 kb~400 kb 三段。

用新的 1%琼脂糖凝胶进行第二次脉冲电泳,电泳条件同第一次电泳选择条件。根据 DNA 分子量标尺切下各条带中 100 kb~400 kb 的 DNA 片段,用 TE 洗 2 次~3 次,保存在 0.5 mol/L EDTA 中。

6.1.5 电洗脱

6.1.5.1 透析袋处理

透析袋在 2%(质量浓度)NaHCO₃ 和 1 mmol/L EDTA(pH8.0)溶液中煮沸 10 min,用蒸馏水彻底漂洗,再置于 1 mmol/L EDTA(pH8.0)中煮沸 10 min 后冷却,4 ℃下保存于纯水中。

6.1.5.2 电泳

将不同大小范围 DNA 胶条分别放入一透析袋中,用 $0.5\times\text{TBE}$ 充满透析袋,浸泡在 $0.5\times\text{TBE}$ 的电泳槽中,13 ℃,120°角,4 V/cm~5 V/cm 电泳 3 h,使 DNA 分子从凝胶中移出。将透析袋旋转 180°,再电泳 30 s~1 min,以解析透析袋上的 DNA 分子。

6.1.5.3 电泳后处理

电泳结束后将透析袋在 4 ℃下 $0.5\times\text{TE}$ 中透析 12 h,从透析袋中将回收的 DNA 溶液吸出,依照一定的分子量标尺对回收的基因组 DNA 进行定量。保存于 4 ℃,一周内使用。

6.2 BAC 质粒载体制备

6.2.1 BAC 载体制备

SDS 碱裂解法制备 BAC 载体。将含有适当 BAC 质粒的菌液涂布于含 12.5 μg/mL 的氯霉素的 LB 平板上,37 ℃培养 12 h。挑单个菌落接种到 LB 液体培养液中,200 r/min,37 ℃振荡过夜。将 6 mL 培养物,4 ℃下,20 000g 离心 1 min,收集细菌。细菌沉淀悬浮于碱裂解液 I 中,剧烈振荡。加新配制的碱裂解液 II 于细菌悬液中,颠倒混匀,放置于冰上。加碱裂解液 III,颠倒混匀。4 ℃下,20 000g 离心 30 min,取上清,加入 0.6 倍体积的异丙醇,混匀,室温放置 10 min。4 ℃下,20 000g 离心 30 min,回收核酸沉淀。用 70%的乙醇涮洗管底及管壁,室温干燥 DNA 沉淀。用 TE(pH8.0)溶解核酸沉淀。

6.2.2 超螺旋质粒纯化

密度梯度离心法纯化超螺旋质粒。每毫升 DNA 样品加 1.00 g 固体 CsCl,至完全溶解。加 λ DNA 和 CsCl 溶液,混匀,加石蜡油,800 000g 离心 24 h 后,可见两条相隔约 4 mm 的清晰条带,弃石蜡油和部分溶液,吸取线环式质粒和超螺旋质粒于一离心管中。收集液体于透析袋中,依次用 2.0 L $0.5\times\text{TE}$ 透析 3 h,4 L $0.5\times\text{TE}$ 透析 4 h,4 L $0.5\times\text{TE}$ 透析 12 h。收集液体,4 ℃保存。

6.2.3 BAC 载体酶切和去磷酸化

用适当的限制性内切酶进行酶切,反应体系为 20 μL 10×缓冲液;100 μL(5 μg~10 μg)载体 DNA;1 μL 40 mmol/L 亚精胺;适当的限制性内切酶;用 ddH₂O 定容至 150 μL,37 ℃下酶切 6 h 后,加入 2.0 μL 1 U/μL 牛小肠碱性磷酸酶(calf intestinal alkaline phosphatase, CIAP)和 20 μL 10×CIAP 缓冲液,用 ddH₂O 定容至 190 μL,37 ℃放置 1 h 后,70 ℃反应 15 min,进行去磷酸化。通过低熔点琼脂糖凝胶电泳分离载体 DNA,染色,紫外灯显示条带,经融化凝胶和酚、三氯甲烷抽提进行载体 DNA 的回收。

6.2.4 载体脱磷效果检测

分别用 T4 DNA 连接酶和 T4 DNA 连接酶缓冲液及 T4 多核苷酸激酶对所制备的载体于 16 ℃自连 12 h。取 1.5 μL~2.0 μL 连接产物加到 18 μL~20 μL 适当的感受态细胞中,37 ℃下,在 SOC 培养基中,200 r/min 下培养 1 h。将转化的菌液适量涂布于含有氯霉素、IPTG 和 X-gal 的 LB 固体培养基表面,于 37 ℃下放置 24 h~36 h,检测脱磷效率。

6.2.5 载体连接率检测

16℃下,将制备的载体与经酶切的λ DNA在T4 DNA连接酶的作用下连接12 h。反应体系为1.0 μL T4 DNA连接酶;10 μL 2倍连接酶缓冲液;10 μL(约25 ng)载体DNA;2.5 μL(约100 ng)100 kb标准外源片段。把灭活后的连接产物加到适当的感受态细胞中,经培养后取适量菌液涂布于含氯霉素、IPTG和X-gal的LB固体培养基表面,37℃下,培养24 h~36 h。随机挑取若干个白色菌落于3 mL LB液体培养基中培养12 h。提取少量质粒DNA,经酶切后进行脉冲电泳检测,电泳条件同酶切回收,电泳时间24 h。脉冲结束后,经染色,检测外源片段插入情况。

6.3 感受态细胞制备

取-80℃冰箱中保存的适当的菌种复苏,培养至光密度值(optical density, OD₆₀₀)约为0.72~0.76后,置于冰水混合物中骤冷,4℃下1 000g离心10 min,弃上清。用ddH₂O重悬菌体,4℃下1 000g离心10 min,弃上清。加10%甘油重悬,4℃1 000g离心10 min,重复2次,弃上清,用残存管底的甘油悬浮细胞,4℃下1 000g离心2 min,弃上清,用1.0 mL 10%甘油重悬细胞以每管100 μL分装于离心管中,-80℃保存。

6.4 基因组DNA和载体DNA的连接

将回收的大片段DNA与30 ng制备好的载体以1:2~1:3的比率连接,连接体系含400 U的T4 DNA连接酶,16℃下连接12 h。65℃温育15 min,将连接产物转移到0.025 μm的透析膜中央,用0.5×TE 4℃透析2 h。从透析膜上回收透析产物,再用0.5×TE+30%的PEG 8 000 4℃透析30 min,浓缩连接混合物中的DNA。

6.5 电转化

将适当的感受态细胞置于冰上解冻后,取20 μL感受态细胞,加入2.0 μL重组体连接物,冰上放置1 min~5 min。将混合液加入预冷的电击杯中,电击。取出电转化后的细胞移至1 mL 37℃的SOC培养基中,混匀,37℃下225 r/min培养1 h~1.5 h。铺于含有氯霉素、IPTG和X-gal的固体LB培养基表面,37℃倒置培养24 h。随机挑选白斑,用酶切鉴定插入大小,片段大小应在100 kb以上,转化次数在50次左右,可以进行大量连接和转化。转化后的菌液用含10%甘油的LB冻存液,以每份500 μL分装,于-80℃保存。

7 基因组BAC文库的保存

取出转化的冻存菌液,于冰上融化。取适量菌液涂于氯霉素板上,37℃培养24 h。将LB培养冻存液以每孔110 μL,加到384孔培养板中。将氯霉素平板上的白色菌落挑至384孔板,每孔1个菌落。将384孔板置于专用摇床中,37℃下培养24 h。取出384孔板进行编号,即为文库母板。将文库母板置于-80℃冰箱中长期保存。

8 文库的扩增及应用

应用自动平板复制器将已构建好的文库母本复制若干份,复制完成后将384孔板置于专用摇床中,37℃下培养24 h,-80℃保存工作文库,进行后续相关研究。