

EFFECTS OF FCS AND BSA ON ULTRASTRUCTURE OF IN VITRO PRODUCED BOVINE EMBRYOS

LIU Dong Jun* YANG Dong Shan* Qi Mu Ge** BOU Shor Gan*

(* Key Laboratory of Education Ministry of China for Mammal Reproduction Biology and Biotechnology, NeiMongol University, Huhhot 010021 ** Electron Microscope Center of NeiMongol Medicine College, Huhhot 010059)

ABSTRACT Bovine IVF embryos were cultured in SOF + FCS, SOF + BSA and SOF + PVA respectively. The embryos at 2-cell, 4-cell, 8-cell stage embryos, morulae and blastocysts from each culture system were collected and prepared for observation in transmission electron microscope, so that to understand the effects of the supplement of serum or BSA or not in culture system on the ultrastructure of embryos. It was observed that many lipid droplets existed in the cytoplasm of embryos cultured in every system at whole developmental stage, and the results indicated that the accumulation of cytoplasmic lipid droplets was mainly caused by the in vitro culture condition. The supplement of serum in culture system did not further promoted the accumulation of lipid droplets, on the contrary could avoided the integration of many droplets to bigger ones. There was no significant difference on cell junction of embryos cultured in different system. Apoptotic bodies were observed in morulae and blastocysts in the embryos cultured in SOF + FCS and SOF + BSA, this result showed that the apoptosis in embryo cells was mainly caused by the composition in serum. The development of microvillis on the surface of embryo could be affected with the lacking of serum or BSA in the culture system.

Key words: Bovine IVF embryos Ultrastructure Development

实验技术

应用滤纸吸附-PCR 法和改进的亚克隆方法快速筛选 克隆甜橙细胞壁酸性转化酶基因(CS-CWI)***

安新民* 徐昌杰* 张上隆* 陶俊** 陈俊伟*

(* 浙江大学华家池校区园艺系 杭州 310029 ** 扬州大学园艺系 扬州 225009)

摘要 根据 GenBank 中已知的植物细胞壁转化酶基因的保守区序列设计一对 PCR 引物, 分别以滤纸(吸附有甜橙基因组噬菌体文库 LB 平板的噬菌体)和 Top agarose(滤纸吸附后的 LB 平板)的 SM 洗脱液为模板, 仅通过 7 次 PCR 就快速、准确、经济地筛选出 CSCWI 阳性克隆。提取该阳性克隆的 DNA 并进行 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切, 通过 PCR 方法鉴定阳性酶切条带并回收, 利用 Taq DNA 聚合酶的聚合活性和 3' 末端转移酶活性, 改变该片段使其含有 3' 腺苷酸(A)突出末端, 与 pUCm-T 载体实现了高效连接。阳性噬菌斑克隆及阳性条带的正确性得到测序的验证, 表明滤纸吸附-PCR 法和改进的亚克隆方法可正确和高效地应用于 PCR 筛选文库和亚克隆。

关键词: 滤纸吸附 PCR 筛选文库 亚克隆

传统的文库筛选方法是利用合适的放射性或非放射性标记的 DNA 探针, 通过噬菌斑原位杂交筛选出阳性噬菌体, 存在操作繁琐、工作量大、需时较长、费用较高、易产生杂交背景干扰、易得到假阳性克隆等缺点, 使用同位素标记的探针还有放射污染之嫌。应用 PCR 法筛选文库偶见于近期文献^[1-5], 本研究在此基础上采用滤纸吸附法, 解决了筛选过程中难以获得阳性克隆单噬菌斑的问题并极大地提

高了筛选效率, 成功地从甜橙基因组 DNA 文库中筛选出细胞壁转化酶基因。采用滤纸吸附-PCR 法筛选文库具有快速、简便、灵敏、准确、特异性强并且较为经济等优点。

本文 2002 年 3 月 4 日收到, 3 月 25 日接受。

** 国家自然科学基金重点项目(批准号: 39730340, 30170648)资助。

E-mail: anxinmin@sohu.com

获得阳性噬菌斑后,为了测定全序列,必须进行亚克隆,亚克隆的常规方法是对重组 λ DNA 进行单酶切,然后通过 Southern 杂交鉴定阳性条带后与同样单酶切的载体进行连接。而进行双酶切则往往可以获得满意的条带。但目标片段是否是双酶切产物需要鉴定。本研究利用 Taq DNA 聚合酶的聚合活性和 3' 末端转移酶活性,可使某些酶切组合的酶切产物 3' 末端突出 A 碱基,从而易于与 T-Vector 连接,免除阳性片段是否属于双酶切产物的鉴定以及双酶切载体的制备,简化了操作步骤,降低了成本,快速高效地进行亚克隆。另外,对阳性酶切条带和阳性重组质粒的鉴定也采用 PCR 法,进一步提高了亚克隆的效率。

材料与方法

1. 材料

1) 甜橙基因组 DNA 文库 甜橙基因组文库的构建及特性已另文发表^[6]。

2) 引物 根据植物细胞壁酸性转化酶基因(cell wall acid invertase) (AF00521、AY045776、AF043346、Z35163、X69321、AB004558、AF420223、AJ277458、X81834、AF030420)的保守区序列设计上游引物(5' TACCATCTAT-TCTACCAGTACAA 3')和下游引物(5' AAAAAATCAG-GACACTCCACAT 3')。

2. 方法

1) Lambda 噬菌体的固体培养及 DNA 模板的准备 噬菌体的固体培养按 Promega 公司提供的“Genomic Cloning Manual”进行。改用滤纸吸附法从平板上先回收部分噬菌体(具体步骤见结果部分),剩余的噬菌体再按“Genomic Cloning Manual”进行回收。回收的噬菌体可直接作为 PCR 反应的模板。

2) PCR 反应 50 μ l PCR 反应体系包括 1 μ l 噬菌体(DNA 模板),各 0.2 μ mol/L 上游引物和下游引物,1 \times PCR 反应缓冲液,2 mmol/L MgCl₂, 200 μ mol/L dNTPs 和 2 单位 Taq DNA 聚合酶。PCR 循环条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min,94 $^{\circ}$ C 变性 40s,50 $^{\circ}$ C 退火 40s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1min,共进行 35 轮循环。

3) 凝胶中 DNA 的回收 采用 QIAquick™ Gel Extraction Kit(QIAGEN),按说明书进行。

4) 酶切产物 3' 末端的加工 25 μ l 反应体系包括:回收的酶切产物(充分干燥,体积忽略不计),18.25 μ l ddH₂O, 2.5 μ l 10 \times PCR buffer, 2 μ l 25 mmol/L MgCl₂, 2 μ l 2.5 mmol/L dNTPs 和 0.25 μ l Taq DNA 聚合酶(5U/ μ l)。72 $^{\circ}$ C 反应 2h,获得 3' 末端突出 A 碱基的 DNA 片段。

5) 加工后的酶切产物重组入质粒载体 经加工的酶切产物与 pUCm-T 载体(购自上海生工)连接,连接产物转化大肠杆菌 TG1 菌株感受态细胞(自己制备),通过蓝白斑筛

选、质粒长度和酶切鉴定获得重组质粒^[7]。

6) DNA 序列测定及结果分析 DNA 序列委托上海生物工程技术有限公司测定。DNA 序列分析采用 Seq Aid II 软件包进行。

结 果

1. 噬菌体文库的 PCR 筛选

在一块直径为 9cm 的 LB 平板上培养 10⁶ 个噬菌斑,然后取同等大小的无菌滤纸分 8 等份后置于噬菌体平板上,在培养皿底部外表面标记好滤纸小份的位置,放置 1min 后用无菌镊子依次将滤纸取出分别装入 1.5ml 离心管,加入 400 μ l SM 洗脱滤纸,洗脱液作为第一次 PCR 反应的 DNA 模板。PCR 检测表明,第 3、7 和 8 小份滤纸中含有目标噬菌体。将第 3 份滤纸片曾接触过的顶层琼脂糖(含噬菌体)分成 30 小份,分别用 20 μ l SM 洗脱,洗脱液作为第二次 PCR 的模板。PCR 检测表明,3-1 和 3-21 呈阳性。

通过上述两次 PCR,如果不考虑各噬菌斑大小之间的差异,那么阳性噬菌斑的出现频率上升至 240 倍。测定 3-1 小份的滴度后取 2 \times 10⁴ 个噬菌体分子在固体 LB 平板上培养成噬菌斑。重复上述方法,PCR 检测表明 3-1-4、3-1-5 和 3-1-6 呈阳性。将 3-1-5 顶层琼脂糖分成 24 份回收,经 PCR 检测表明 3-1-5-2、3-1-5-15 和 3-1-5-22 呈阳性。测定 3-1-5-22 小份的滴度后取 400-500 噬菌体分子在平板上培养,PCR 检测 3-1-5-22-3、3-1-5-22-4、3-1-5-22-5、3-1-5-22-7 和 3-1-5-22-8 呈阳性。用无菌牙签从 3-1-5-22-3 中挑取 64 个噬菌斑溶于 10 μ l 噬菌体缓冲液中,组成 8 \times 8 方阵,同一行取出部分噬菌体合并成一混合样(依次编号为 A-H),经 PCR 检测表明混合样 F 呈阳性,将 F 行的 8 个样品进行 PCR 检测,结果表明 F6 和 F8 均呈阳性(图 1)。取 F6 进行纯化和鉴定获得阳性单克隆。

Mix	1	2	3	4	5	6	7	8
A	-	-	-	-	-	-	-	-
B	-	-	-	-	-	-	-	-
C	-	-	-	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-	-	-
F	*	-	-	-	-	+	-	+
G	-	-	-	-	-	-	-	-
H	-	-	-	-	-	-	-	-

图 1 PCR 法筛选文库的 8 \times 8 方阵

*. 阳性混合 λ 噬菌体; +. 阳性 λ 噬菌体。

2. 亚克隆方法的改进

将获得的阳性噬菌体大量培养,提取噬菌体 DNA,用 *EcoR* V 和 *Hind* III 双酶切获得长度大于 564bp 的 8 条带(图 2), PCR 检测表明 1028bp 的条带为阳性条带(图 2 中第二泳道)。按前文所述方法回收 DNA 并加工阳性片段的末端,结果获得 3' 末端加 A 的片段,继而将该片段克隆入 pUCm-T 载体。经长度和酶切(*EcoR* V 和 *Hind* III 双酶切)鉴定获得重组质粒(图 2)。

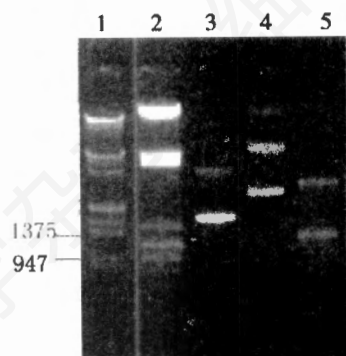


图 2 基因片段重组入 pUCm-T

1. λ /E + H Marker, 2. 阳性 λ 噬菌体 DNA 用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切, 3. pUC19, 4. 重组质粒, 5. 重组质粒用 *EcoR* V 和 *Hind* III 双酶切。

3. 基因序列分析

测定重组质粒的序列,表明所克隆的片段长 1034bp,其序列如图 3 所示,其中 1 至 406 碱基为非编码区,407 至 1034 碱基属编码区。GenBank 中进行 Blast 检索结果表明该片段属于细胞壁酸性转化酶基因,该序列涵盖了 we 已获得的甜橙细胞壁酸性转化酶基因(*Citrus sinensis* cell wall acid invertase, CS-CWI, 524bp)片段^[8],其重叠部分核苷酸和编码的氨基酸序列完全一致。上述结果表明我们采用的 PCR 法筛选文库和改进的亚克隆方法是正确有效的。

讨 论

文库筛选的方法有多种,但大多存在工作量大,时间长,费用较高,采用同位素标记探针杂交的方法产生放射污染等缺点。PCR 是一种快速灵敏的分子生物学技术,我们根据 GenBank 已发表的植物细胞壁酸性转化酶基因序列的保守区设计一对 PCR 引物,仅通过 7 次 PCR 就从甜橙基因组文库中筛选出甜橙细胞壁转化酶基因的阳性克隆。说明这是一种快速、灵敏、简便、经济而有效的文库筛选方法。

本研究对 PCR 筛选文库的方法作了改进,就

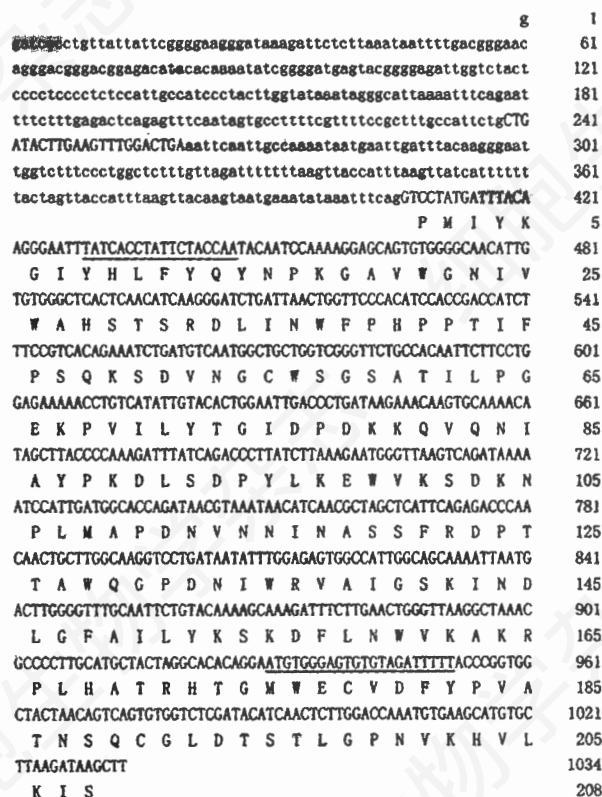


图 3 甜橙细胞壁酸性转化酶基因部分序列(划线部分为引物序列,黑影部分为 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点)

是对同一平板上的噬菌斑进行两次回收并进行 PCR(先是通过滤纸吸附回收部分噬菌体,然后通过 SM 洗脱的标准方法回收剩余的噬菌体)而不是常规方法的一次,虽然表面上看改动似乎很小,但对于成功分离哪些繁殖速度较慢的阳性噬菌体单斑却是至关重要的,同时由于将阳性噬菌体缩小到更小的范围内,可加快筛选的进程。应用常规的每个平板只进行一次 PCR 的文库筛选方法,我们成功地从柑桔基因组 DNA 文库中分离到包含辣椒红/辣椒玉红素合成酶同源基因的阳性噬菌体单斑^[4],但同样方法应用于筛选包含酸性转化酶基因的阳性噬菌体单斑时,则陷入了阳性噬菌体出现机率难以提高的死循环中,后来应用了本文所述改进方法后才得以实现。推测这是由于目标噬菌体繁殖较慢所致,这在后来得到了证实,笔者在繁殖所获得的该阳性噬菌体时确实发现其生长速度相当慢。目标噬菌体的繁殖速度极大地影响了文库筛选的进度,理论上讲,假设目标噬菌体的繁殖速度是混合噬菌体平均繁殖速度的 $1/n$,每个平板上的噬菌体又刚好分成 n 份进行回收检测,那么筛选前后阳性噬菌体的出现频率是相同的,如果份数小于 n 或相近,则极有可能在筛选时丢失该目标噬菌体,只有将平板上的噬

菌体分成比 n 大得多的份数才可加快筛选进程,我们通过两次分别回收的方法,将份数扩大到 200-500。应用改进后的方法,我们近来又从文库中分离了甜橙液泡酸性转化酶基因和番茄红素 β 环化酶基因(另文发表)。

从文库中筛选出的阳性克隆需进一步酶切亚克隆,基因亚克隆的方法通常是将 DNA 和载体用相同的酶进行消化,然后用连接酶连接。我们利用 Taq DNA 聚合酶聚合时 3' 末端加 A 的特性对阳性噬菌体 DNA 的酶切 (*BamH* I 和 *Hind* III 双酶切) 片段进行加工,获得 3' 末端突出 A 的产物,该产物极易克隆入 pUCm-T 载体。此法适用于那些酶切后可产生 3' 凹端的内切酶,除了上文提及的 *BamH* I 和 *Hind* III,常用的此类内切酶还有 *Bgl* II、*Cla* I、*EcoR* I、*Nco* I、*Nde* I、*Not* I、*Sal* I、

Xba I 和 *Xho* I 等,应用该方法可有效地提高酶切片段的连接效率。

参 考 文 献

- [1] Israel DI, 1993. *Nucleic Acids Research*, 21: 2627-2631.
- [2] Munroe DJ, et al., 1995. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:2209-2213.
- [3] 陈大明等, 1999, 浙江大学博士学位论文.
- [4] 徐昌杰等, 2001, 实验生物学报, 34(2):147-150.
- [5] 刘建喜等, 2001, 农业生物技术学报, 9(3): 279-281.
- [6] 陈大明等, 2000, 园艺学报, 27(6):401-405.
- [7] Sambrook J, et al., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (2nd ed), Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [8] 安新民等, 2001, 果树学报, 18(4):189-193.

QUICK SCREENING CITRUS SINENSIS GENOMIC DNA LIBRARY AND CLONING BY FILTER PAPER ABSORPTION-PCR AND IMPROVED SUBCLONING METHOD

AN Xin Min* XU Chang Jie* ZHANG Shang Long* TAO Jun*** CHEN Jun Wei*
(* Department of Horticulture, Huajiachi Campus, Zhejiang University, Hangzhou 310029;
**Department of Horticulture, Yangzhou University, Yangzhou 225009)

ABSTRACT A pair of PCR primers designed according to conserved regions of plant cell wall acid invertases were used to screen *Citrus sinensis* genomic DNA library. A positive plaque of Lambda phage was obtained after only seven PCR reactions. The phage was cultured and Lambda DNA was isolated, the DNA was then digested with *BamH* I and *Hind* III, and a positive fragment was identified by PCR and then recovered. The fragment was modified with Taq DNA Polymerase, and as a result, the modified fragment holds a 3'-overhang A and was successfully cloned into pUCm-T vector. The authenticity of the positive phage and fragment was confirmed by sequencing. It is suggested that Taq DNA polymerase can be applied in an improved efficient method for both screening library by PCR and fragment subcloning.

Key words: Filter paper absorption PCR DNA library screen Subclone

致 读 者

《细胞生物学杂志》已在 2002 年改出双月刊(大开本 64 页),顺利实现了从季刊到双月刊的转换。改刊后的杂志受到了读者的欢迎,来稿量显著增加。我们衷心感谢大家的厚爱,谢谢你们的支持。在新的一年里希望继续得到大家的关心和帮助,热忱欢迎对本刊多多提出意见和建议。

本刊被国际六大检索系统之一的美国化学文摘(CA)收录;国内被中国科学引文数据库、中国生物学文摘、中国学术期刊文摘、科技部西南信息中心等收录,是中国自然科学生物学领域内的核心期刊。

本刊宗旨为:介绍细胞生物学及细胞生物技术的最新知识和进展,刊登这一研究领域的国内外研究动态、综述、研究报告、实验技术方法(译文由本刊约稿),并报道中国及地方细胞生物学学会的各种活动、消息,以促进国内细胞生物学及其相关学科的发展,为社会主义现代化建设服务。栏目设置为:专论与综述、研究工作、研究简报、实验技术、经验交流、名词讨论、科学史简介、教学园地、产品介绍等。

欢迎来稿。来稿(文字稿)请一式两份,并附单位介绍信。

全国各地邮局均可办理订阅本刊(邮发代号 4-296),如您错过邮局订阅时间或不便在邮局订阅,请直接与编辑部联系,本刊可代办邮购。

本刊承接与学科领域相关的各种广告,同时欢迎在本刊发布信息、消息、新书介绍等,欢迎洽谈。