

高纤维强力棉花种质系苏远 7235 BAC 文库的构建

王省芬, 马 骏, 马峙英*, 张桂寅*, 郑拥民

(河北农业大学/河北省作物种质资源重点实验室, 河北保定 071001)

摘要: 苏远 7235 是我国利用异常棉等多个野生种创造的高纤维强力棉花种质系, 是开展棉花纤维品质研究的重要材料。本研究以 pIndigoBAC-5 (*Hind*III-cloning ready) 为载体, 构建了苏远 7235 的细菌人工染色体 (Bacterial Artificial Chromosome, BAC) 文库, 该文库包含 30336 个 BAC 克隆。分析结果表明, 重组克隆苏远 7235 DNA 插入片段为 50-140 kb, 平均 120 kb, 空载率 2.1%, 89.6% 的克隆插入片段大于 100 kb。

关键词: 棉花; 纤维品质; 细菌人工染色体文库

中图分类号: S562.032 **文献标识码:** A

文章编号: 1002-7807(2006)04-0200-04

BAC Library Construction and Characterization of Suyuan 7235, A Cotton Germplasm with High Fiber Strength

WANG Xing-fen, MA Jun, MA Zhi-ying*, ZHANG Gui-yin*, ZHENG Yong-min

(Key laboratory of Crop Germplasm Resources of Hebei Province, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstracts: In this study, bacterial artificial chromosome (BAC) library of Suyuan7235, a cotton germplasm with high fiber strength has been constructed following the partial digestion of genomic DNA with *Hind*III. The pIndigoBAC-5 (*Hind*III-cloning ready) cloning vector was used for the library. The BAC library included 30336 clones. Analysis of 96 recombinants showed that the insert DNA size ranged from 50 to 140 kb, averaged 120kb with less than 2.1% of empty clones. As much as 89.6% clones had inserts over 100 kb. As genomic resources, the library has potential use in further research of fiber strength gene analysis and gene cloning, as well as SSR primer development.

Key words: cotton, fiber quality, bacterial artificial chromosome (BAC) library

随着分子生物学的发展, 鉴定、分离和克隆优良纤维品质基因成为国内外棉花生物技术研究的热点, 而含有大片段 DNA 的 BAC (bacterial artificial chromosome) 文库是开展基因图位克隆^[1]、物理作图^[2-4]、基因组测序^[5]和 SSR 引物开发^[6]的重要基因组资源。目前, 国内外已经在栽培植物中先后构建了水稻、小麦、大麦、大豆、高粱、马铃薯、拟南芥、甘蔗、珍珠粟、柑橘、咖啡树、鹰嘴豆等的 BAC 文库, 大大促进了植物基因组学的研究^[7]。苏远 7235 是我国利用异常棉等多个野生种培育出的高纤维强力种质系, 是开展棉花品质

研究的重要基础材料^[8], 利用苏远 7235 构建棉花分子图谱和定位高纤维强力 QTL 的研究已有报道^[9]。因此, 构建苏远 7235 的细菌人工染色体文库对于鉴定、分离和克隆优良纤维品质基因具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试棉花品种为苏远 7235, 由中国农业科学院棉花研究所种质资源中期库提供。大肠杆菌 DH10B 感受态细胞为 Invitrogen (USA) 公司产

品。克隆载体 pIndigoBAC-5 (HindIII-cloning ready) 为 Epicentre Technologies (USA) 公司产品。

1.2 试验方法

1.2.1 高分子量基因组 DNA 的提取。取在人工培养室培养一周的棉花幼苗子叶 25 g, 于液氮中研磨 1 h。将粉末转入预冷的 250 mL 1×HB (含 TritonX-100, 含 0.15%β-巯基乙醇) 缓冲液中, 冰上搅拌 15 min, 然后过滤到预冷的 50 mL 离心管中。4℃, 4500 r·min⁻¹, 离心 20 min。弃上清, 加 1 mL 预冷的 1×HB (不含 TritonX-100, 含 0.15%β-巯基乙醇) 悬浮沉淀, 然后加满 1×HB 缓冲液, 4℃, 4500 r·min⁻¹, 离心 15 min, 重复此步骤 3 次。弃上清, 用 1×HB (不含 TritonX-100 和 β-巯基乙醇) 缓冲液悬浮细胞核, 4℃, 4500 r·min⁻¹, 离心 15 min。弃上清, 加入适量预冷的 1×HB 缓冲液 (不含 TritonX-100 和 β-巯基乙醇) 调整细胞核的浓度至溶液呈透明状。将 plug mold 置于冰上预冷, 细胞核悬浮液置于 45℃ 水浴 5 min。向细胞核悬浮液中加入等体积的 1.5% 低熔点琼脂糖, 混匀后, 迅速加入预冷的 plug mold 中, 置于冰上冷却 30 min。将胶块转移到含有蛋白酶 K 的裂解缓冲液中。在杂交炉中 50℃ 裂解 18 h。更换一次裂解缓冲液, 在杂交炉中 50℃ 裂解 21 h。去除裂解缓冲液, 加入含有 1 mmol·L⁻¹ PMSF 的 T₁₀E₁₀ 中, 冰上振荡 1 h, 重复 1 次。转入 T₁₀E₁ 中, 冰上振荡清洗 4 次, 每次 1 h。将胶块转至 T₁₀E₁ 中于 4℃ 保存。取 1/2、1/4、1/8 胶块进行脉冲电泳检测 (BioRad CHEF DR11, USA), 条件如下: 0.5×TBE 配制的 1% 琼脂糖凝胶, 温度 11℃, 起始脉冲 50 s, 终止脉冲 50 s, 脉冲时间 18 h, 电压 6v/cm, 角度 120°, 泵 80。电泳结束后, 溴化乙锭染色, 估计胶块中 DNA 的浓度。

1.2.2 部分酶切最佳酶量的确定和片段选择。用不同用量 (0、0.4、1、2、3、4、6、8、10、18U) 的限制性内切酶 *Hind* III 对包埋于琼脂糖凝胶块中的高分子量 DNA 进行部分酶切, 确定能产生所需范围片段的内切酶用量。用筛选出的最适内切酶用量对 6 块胶块进行大量酶切, 采用两次片段选择的方法进行酶切片段的选择。以 λ DNA ladder marker (New England, Biolabs) 标记 DNA 片段大小。经第一次脉冲场凝胶电泳分离后, 分别切下含 100~200 kb、200~300 kb、300~400

kb 间的 DNA 大片段凝胶块进行第二次脉冲场凝胶电泳分离。第一次分离时的脉冲电泳条件为: 1% 琼脂糖凝胶, 11℃, 起始脉冲 50 s, 终止脉冲 50 s, 脉冲时间 18 h, 电压 6V/cm, 角度 120°, 泵 80。第二次分离时的脉冲电泳条件为: 1% 琼脂糖凝胶, 11℃, 起始脉冲 3 s, 终止脉冲 5 s, 脉冲时间 16 h, 电压 6V/cm, 角度 120°, 泵 80。经第二次分离后, 切下含有目的片段的凝胶, 用电洗脱仪洗脱大片段 DNA, 持续 2 h。用 0.8% 琼脂糖凝胶检测大片段 DNA 的浓度, 若浓度太小, 则用 10% PEG8000 透析 90 min, 以提高 DNA 的浓度。

1.2.3 连接及转化。按载体与插入片段 5:1、10:1、15:1 的摩尔比进行连接 (16℃, 16 h)。连接产物用 ddH₂O 透析 2 h, 再用 30% PEG8000 透析 30 min, 以达到脱盐和浓缩的目的。采用 Gibco BRL 公司的 Cell-porator Electroporation System 将 2 μl 连接产物转化到 20 μl 的大肠杆菌 DH10B 感受态细胞中, 转化条件为 350V、4kΩ、fast、330 μF。将转化产物转移到 1 mL SOC 培养基中, 37℃, 225 r·min⁻¹ 培养 1 h。培养液涂于 X/I/C LB 固体选择培养基上, 37℃, 培养 16~24 h。

1.2.4 重组克隆的分析。随机挑取单克隆, 采用碱裂解法提取质粒 DNA, 经 *Not*I 酶切后进行脉冲场电泳检测。脉冲条件为: 1% 琼脂糖凝胶, 11℃, 起始脉冲 5 s, 终止脉冲 15 s, 脉冲时间 16 h, 电压 6V/cm, 角度 120°, 泵 70。电泳结束后, 用终浓度为 0.5 μg·mL⁻¹ 溴化乙锭染色 30 min, 再用 ddH₂O 冲洗 30 min。检测插入片段大小和空载率。

2 结果与分析

2.1 DNA 包埋胶块的质量与浓度

本研究在 1×HB 缓冲液中加入 DIECA 和 PVP40, 用于抑制棉花叶片中酚氧化酶的活性和除去酚类物质, 明显提高了 DNA 包埋胶块 (plug) 的质量。电泳结果表明, 制备的 plug 质量好, 浓度高, DNA 降解较少 (图 1)。

2.2 最佳酶用量的确定

本研究是通过在特定时间内 (30 min) 改变酶用量 (0~18U) 对克隆 DNA 进行部分酶切。电泳结果表明: 限制性内切酶 *Hind* III 的用量在 3~4U 之间, 酶切效果最好, 酶切后的大部分 DNA 片段集中在 100~400 kb 之间 (图 2)。

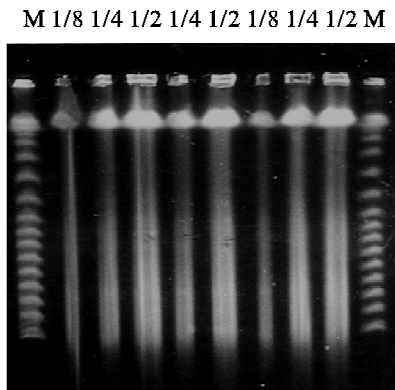


图 1 胶块电泳结果

Fig. 1 PFGE products of DNA plugs

2.3 大量酶切后 DNA 片段的两次选择

本研究利用 3.5U 的内切酶 *Hind*III 用量对 plug 进行了大量酶切,第一次选择切下 100~400 kb 的大片段,经脉冲场电泳检测证明,酶切后产生的大部分 DNA 片段都集中在 100~400 kb 之间(图 3)。将 100~400 kb 范围内的主带切成

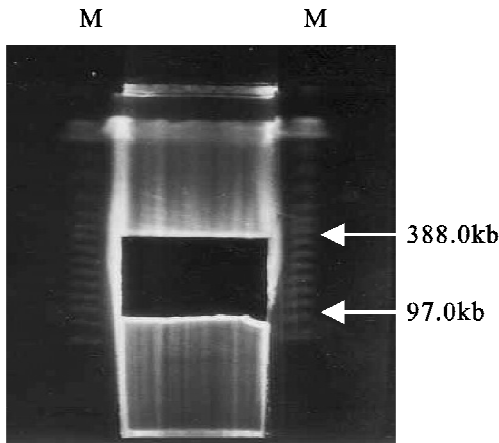


图 3 大片段第一次选择的脉冲电泳结果

Fig. 3 PFGE products of 1st selection for large DNA fragment

2.4 连接与转化

载体和大片段 DNA 的连接比例直接影响连接产物的转化效率。本研究设立 5 : 1、10 : 1 和 15 : 1 的载体和大片段 DNA 摩尔比梯度,经转化验证表明摩尔比 10 : 1 时较合适。转化率高,一次转化可获得 1200 个克隆($cfu/\mu l > 2$),而且重组率也很高,产生的非重组体非常少。利用按这一比例得到的连接产物进行了大量转化,构建了该品种的 BAC 文库,该文库共含有 30336 个克隆。

2.5 插入片段的检测

对 BAC 文库随机取样,采用碱裂解法提取了 96 个克隆质粒 DNA,并对插入片段进行了分析。

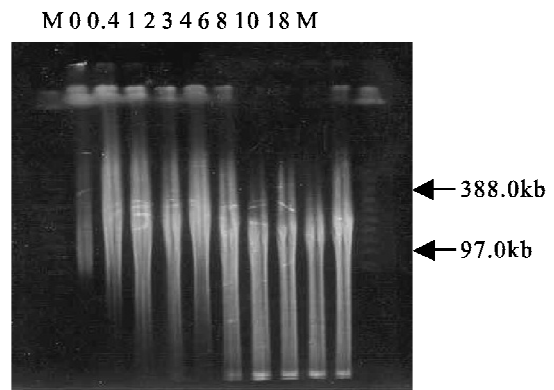


图 2 限制性内切酶(*Hind*III)用量电泳结果

Fig. 2 PFGE products of different *Hind*III dosages

100~200 kb、200~300 kb、300~400 kb,进行第二次片段选择。经脉冲场电泳,对照 Marker 切下大、中片段。小片段 DNA 由于片段太小没有主带,所以没有进行切除回收。从图 4 可以看出,经过两次选择,有效的去除了较小的片段。

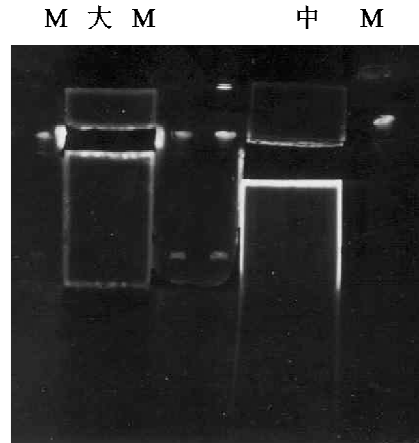


图 4 大片段第二次选择的脉冲电泳结果

结果表明其插入片段介于 50~140kb 之间,平均为 120 kb(图 5)。

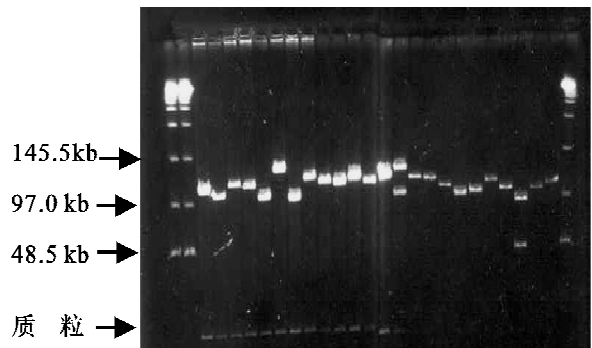


图 5 苏远 7235 BAC 克隆插入片段大小

Fig. 5 Insert size of Suyuan7235 BAC recombinants

对苏远 7235 重组克隆插入片段的分布情况进行进一步分析表明,在 96 个重组克隆中,空载率为 2.1%,小于 60 kb 的克隆(1 个)占 1.0%,60~80 kb 的克隆占 2.1%(2 个),80~100 kb 的克隆占 7.3%(7 个),100~120 kb 的克隆占 72.9%(70 个),120~140 kb 的克隆占 15.6%(15 个),大于 140 kb 的克隆占 1.0%(1 个),89.6% 的克隆大于或等于 100 kb。在该文库中插入片段近似正态分布,100 kb 左右的片段占大多数(图 6)。

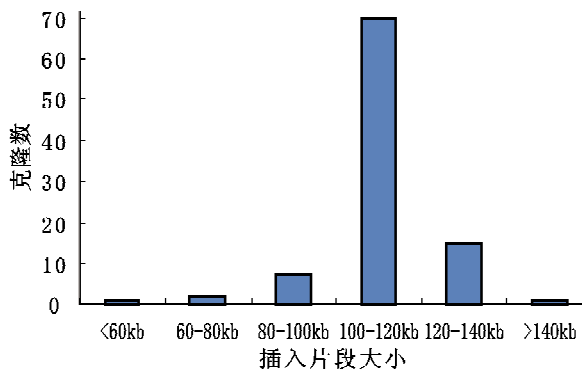


图 6 苏远 7235 BAC 文库插入片段分布图

Fig. 6 Insert size distribution of clones in the BAC library

3 讨论

按照棉花单倍体基因组 2250 Mb 计算,本研究构建的苏远 7235 的 BAC 文库覆盖棉花单倍体基因组 1.6 倍,克隆到某个基因序列的概率达 80.0%。棉花种质材料苏远 7235BAC 文库的构建,为深入开展棉花基因组学研究提供了重要且可持续利用的基因组资源。基于本研究建立的 BAC 文库,利用国内外已有分子标记和探针,钓取和分析含有重要性状基因的 BAC 克隆,是克隆重要基因、发掘分子标记、深入开展棉花功能和比较基因组学研究的基础和关键^[7],也为棉花 SSR 引物的开发提供了重要的基础资源。目前我们已向国内其它单位提供该文库,正在进行棉花高纤维强力基因的分析 and 克隆。在国外,构建了鹰嘴豆的 BAC 文库^[6],利用 8 个人工合成的寡核苷酸,即 SSR (GA)10、(GAA)7、(AT)10、(TAA)7、(TGA)7、(CA)10、(CAA)7 和 (CCA)7 对该文库进行了筛选,将阳性克隆再次亚克隆、测序,开发出 233 个 SSR 引物,并利用鹰嘴豆 DNA 为模板和 PCR 技术对引物进行了验证,为鹰嘴豆分子育种和基因组学研究提供了重要工具。利用构建的绿豆 BAC 文库开发出与抗象鼻虫基因紧密连锁的 2 个 PCR 标

记,能够更有效地用于 MAS 育种^[10]。

在文库构建技术环节上,本研究采用电洗脱仪对凝胶中的 DNA 进行回收。电洗脱仪洗脱既简单又快速,降低了对 DNA 的损伤程度,而且能够从较多的凝胶中得到含高浓度 DNA 的溶液,从而可以大大提高连接效率。另外,大片段 DNA 和载体的连接比例亦是影响转化率的重要因素,获得大批连接产物之前必须依据载体和外源 DNA 的浓度进行预备实验,确立适宜的连接摩尔比。

参考文献:

- [1] GIRAUDAT J, Hauge B, Valon C, et al. Isolation of the *Arabidopsis* *ABI3* gene by positional cloning [J]. *Plant Cell*, 1992, 4: 1251-1261.
- [2] MOZO T, Dewar K, Dunn P, et al. A complete BAC-based physical map of the *Arabidopsis thaliana* genome[J]. *Nat Genet*, 1999, 22: 271-5.
- [3] WU C, Sun S, Nimmakayala P, et al. A BAC- and BIBAC-based physical map of the soybean genome [J]. *Genome Research*, 2004, 14(2): 319-326.
- [4] WU C, Nimmakayala P, Santos F A, et al. Construction and characterization of a soybean bacterial artificial chromosome library and use of multiple complementary libraries for genome physical mapping [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 108: 1432-2242.
- [5] OSOEGAWA K, Mammoser A G, Wu C Y, et al. A bacterial artificial chromosome library for sequencing the complete human genome [J]. *Genome Research*, 2001, 11(3): 483-496.
- [6] LICHTENZVEIG J, Scheuring C, Dodge J, et al. Construction of BAC and BIBAC libraries and their applications for generation of SSR markers for genome analysis of chickpea, *Cicer arietinum* L [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 110: 492 - 510.
- [7] 王省芬,郑拥民,张桂寅,等. 棉花细菌人工染色体文库构建的方法优化 [J]. *棉花学报*, 2004, 16(3): 170-174.
- [8] 庞朝友,杜雄明,马峙英. 具有野生棉外源基因的陆地棉特异地种质创造与利用进展 [J]. *棉花学报*, 2005, 17(3): 171-177.
- [9] ZHANG T Z, YUAN Y L, John Yu, et al. Molecular tagging of a major QTL for fiber strength in Upland cotton and its marker-assisted selection [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 106(2): 262-268-2242.
- [10] MIYAGI M, Humphry M, Ma Z Y, et al. Construction of bacterial artificial chromosome libraries and their application in developing PCR-based markers closely linked to a major locus conditioning bruchid resistance in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 110(1): 151-156.