

## 陆地棉雄性不育恢复系 18R 的 BAC 文库构建

周 焘, 郭红媛, 张 锐, 梁成真, 石雅丽, 郭三堆\*

(中国农业科学院生物技术研究所/国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程, 北京 100081)

**摘要:** 18R 雄性不育恢复系农艺性状优良, 恢复性状稳定, 对不育系能够 100% 恢复, 是研究棉花三系互作的重要材料。本研究以 pCC1BAC(*Bam*HI) 为载体, 构建了 18R 的细菌人工染色体(BAC)文库。建立的文库包含 139,200 个 BAC 克隆。分析结果表明, BAC 文库 DNA 插入片段为 50~200 kb, 91% 的克隆插入片段为 80~150 kb, 平均 102 kb, 空载率 < 2%, 覆盖 6.3 倍基因组。

**关键词:** 棉花; 18R; 雄性不育恢复系; 细菌人工染色体文库

**中图分类号:** S562.035.02 **文献标识码:** A

**文章编号:** 1002-7807(2009)03-0252-03

## BAC Library Construction of 18R, A Fertility Restorer Line for *Gossypium hirsutum* Cytoplasmic Male Sterility

ZHOU Tao, GUO Hong-yuan, ZHANG Rui, LIANG Cheng-zhen, SHI Ya-li, GUO San-wei\*

(Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences/National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Beijing 100081, China)

**Abstract:** *Gossypium hirsutum* 18R, the male parent of transgenic three lines insect-resistant hybrid cotton Yinmian 2, is an excellent fertility restorer line for cotton cytoplasmic male sterility (CMS). Its agriculture characters are outstanding, on the other hand, its fertility restore rate for cotton CMS is 100%. It's important material for cotton three lines research. We constructed a high quality bacterial chromosome (BAC) library of 18R with pCC1BAC(*Bam*HI) cloning vector, the library included 139200 clones. Analysis showed that the inserted DNA size of BAC library ranged from 50 to 200 kb, the inserted DNA size of 91% clones ranged from 80 kb to 150 kb, averaged 102 kb. The empty clone was less than 2% in the library. The library size was equivalent to 6.3 times cotton genome size.

**Key words:** cotton; 18R; fertility restorer line; bacterial artificial chromosome (BAC) library

细菌人工染色体文库<sup>[1]</sup>是基因组研究的常用技术手段,与 Cosmid 文库和 YAC 文库相比,具有插入片段大,稳定性好,嵌合体比例低,操作简单等优点。目前已经在棉花<sup>[2-3]</sup>、水稻<sup>[4-5]</sup>、玉米<sup>[6]</sup>、大豆<sup>[7-8]</sup>、高粱<sup>[9]</sup>、黍<sup>[10]</sup>和番茄<sup>[11]</sup>等作物中建立了 BAC 文库,为测序、基因图位克隆、分子标记、物理作图、基因结构和调控等研究提供了一个重要的技术平台。为了对棉花恢复系进行更深入的基因组学研究,对重要性状基因进行克隆、研究和应用,本文对陆地棉雄性不育恢复系 18R 构建了 BAC 文库。

### 1 材料和方法

#### 1.1 试验材料

供试棉花材料为中国农业科学院生物技术研究所保存的陆地棉优良雄性不育恢复系 18R, BAC 克隆载体采用 EPICENTRE 公司的 Copy-Control™ pCC1BAC™(*Bam*HI) Cloning Kit。

#### 1.2 试验方法

**1.2.1 细胞核 DNA 的制备。**取 18R 50 g 叶片在液氮中研磨成粉;加入 500 mL 预冷的含 0.15% β-巯基乙醇和 0.5% Triton X-100 的 1×

收稿日期: 2008-01-30

作者简介:周焘(1980-),男,博士研究生,zhouchuandi@sohu.com; \* 通讯作者,gsdui@mail.caas.net.cn

基金项目:国家自然科学基金(30771371)

HB 缓冲液(Washing buffer,  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Maleic acid;  $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl;  $0.3\%$  Tween-20), 冰上搅拌 20 min; 过滤到预冷的离心瓶中;  $4^\circ\text{C}$ ,  $1800 \text{ g}$ , 离心 20 min; 弃上清, 加入少量  $1\times$  HB, 悬浮沉淀, 溶液转入 50 mL 的离心管, 加满  $1\times$  HB;  $4^\circ\text{C}$ ,  $57 \text{ g}$ , 离心 2 min; 上清  $4^\circ\text{C}$ ,  $1800 \text{ g}$ , 离心 20 min; 用  $1\times$  HB 清洗沉淀 3 次,  $4^\circ\text{C}$ ,  $1800 \text{ g}$ , 离心 20 min; 弃上清,  $1\times$  HB 悬浮沉淀。  $45^\circ\text{C}$  水浴 5 min; 加入等体积低熔点琼脂糖凝胶, 倒入 plug mold 于  $4^\circ\text{C}$  冷却; 将凝固的胶块加入  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Proteinase K,  $50^\circ\text{C}$  温育 24~48 h; 去除裂解液, 加入 50 mL 含  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  PMSF 的  $\text{T}_{10}\text{E}_{10}$  ( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl,  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA) 溶液, 冰上振摇 1 h, 重复 1 次; 用  $\text{T}_{10}\text{E}_1$  溶液 50 mL 在冰上振摇 1 h, 反复清洗至去除 PMSF 和 EDTA, 胶块用于酶切或  $4^\circ\text{C}$  保存。

**1.2.2 大片段 DNA 的获得。** 将胶块分割成等大的 3 个小胶块( $1/3$  plug); 将其全部浸入 1 mL 酶切缓冲液 I 中, 冰上平衡 1 h(重复 1 次); 将每个  $1/3$  plug 分割成等大的 3 份( $1/9$  plug); 将每个  $1/3$  plug 浸没于 170 mL 酶切缓冲液 II 中, 加入 5 U BamHI, 冰上平衡 1 h;  $37^\circ\text{C}$  反应 30 min; 加入  $1/4$  体积 EDTA 溶液, 终止反应; 将酶切后的胶块进行脉冲场凝胶电泳(PFGE), 电泳条件为:  $1\%$  琼脂糖凝胶,  $12^\circ\text{C}$ , 起始脉冲 1 s, 终止脉冲 40 s, 脉冲时间 16 h,  $6 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ , 角度  $120^\circ$ , 泵 70; 电泳结束后切取含 100~350 kb 大片段 DNA 的胶块; 所得胶块进行二次脉冲场凝胶电泳, 电泳条件为:  $1\%$  琼脂糖凝胶,  $12^\circ\text{C}$ , 起始脉冲 3 s, 终止脉冲 5 s, 脉冲时间 16 h,  $6 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ , 角度  $120^\circ$ , 泵 70; 电泳结束后切下含有目的片段的凝胶, 装入两端封好的透析袋; 进行脉冲场凝胶电泳, 电泳条件为:  $12^\circ\text{C}$ , 起始脉冲 30 s, 终止脉冲 30 s, 脉冲时间 3 h,  $6 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ , 角度  $120^\circ$ , 泵 70; 将整个胶块水平旋转  $180^\circ$ , 进行脉冲场凝胶电泳, 电泳条件为:  $12^\circ\text{C}$ , 起始脉冲 30 s, 终止脉冲 30 s, 脉冲时间 1 min,  $6 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ , 角度  $120^\circ$ , 泵 70; 将透析袋中的溶液用于连接。

**1.2.3 大片段 DNA 与 BAC 载体的连接与转化。** 连接体系如下: 载体 25 ng, DNA 100 ng, 连接酶 2 U,  $10\times$  buffer  $10 \mu\text{L}$ ,  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ATP  $1 \mu\text{L}$ , 无菌水加至  $100 \mu\text{L}$ 。  $16^\circ\text{C}$  连接 12 h; 将连接产物脱盐; 将  $0.025 \mu\text{m}$  滤膜放入 20 mL  $10\%$  PEG8000 的平皿中, 将连接产物转移到滤膜上,  $4^\circ\text{C}$  放置 30 min 浓缩, 取  $2 \mu\text{L}$  加入  $20 \mu\text{L}$  DH10B 感受态细胞, 混匀后转入预冷的 2 mm 电击杯电击, 参数为:  $2500 \text{ V}$ ,  $25 \mu\text{F}$ ,  $200 \Omega$ , 2 mm; 电击后

加入 1 mL SOC 培养基重悬细胞并转入培养管,  $37^\circ\text{C}$ ,  $220 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  培养 1 h; 取  $100 \mu\text{L}$  复苏液均匀地涂布在含  $12.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  氯霉素、 $14 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IPTG 和  $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  X-gal 的固体 LB 培养基表面;  $37^\circ\text{C}$  培养 24 h。

**1.2.4 单克隆的挑取与保存。** 挑取白斑, 接种于含冻存缓冲液的细菌培养板中,  $37^\circ\text{C}$  培养 16 h,  $-70^\circ\text{C}$  保存。

**1.2.5 BAC 单克隆插入 DNA 片段大小的鉴定。** 随机挑取单克隆, 提取质粒 DNA, NotI 酶切后进行脉冲场电泳检测。电泳条件为:  $1\%$  琼脂糖凝胶,  $12^\circ\text{C}$ , 起始脉冲 1 s, 终止脉冲 25 s, 脉冲时间 16 h,  $6 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ , 角度  $120^\circ$ , 泵 70; 对照 Marker 确定插入 DNA 片段大小。

## 2 结果与分析

### 2.1 高质量细胞核 DNA 的制备

试验制备细胞核所采用的方法使核 DNA 没有受到酚类物质的影响而褐化, 较好地解决了以棉花为材料, 提取细胞核 DNA 过程中酚氧化后以共价形式结合到核 DNA 上的问题; 大片段 DNA 主要集中在 700 kb 以上, 主带清晰, 机械断裂少, 这为后续试验的顺利进行奠定了良好的基础。

### 2.2 连接体系的建立

连接体系中大片段 DNA 与载体的质量比是影响连接效率的一个关键因素, 本试验确定大片段 DNA 与载体的最佳质量比为 4:1。

### 2.3 转化

浓缩是转化过程中最为关键的一个步骤, 将浓缩前、后的连接产物分别与感受态进行转化。取  $100 \mu\text{L}$  转化后的复苏液, 涂在有氯霉素的 LB 固体培养基上;  $37^\circ\text{C}$  培养 18~24 h; 结果表明浓缩的连接产物产生的克隆数远大于未浓缩的, 一个转化可以得到一万个左右的克隆。

### 2.4 BAC 文库的质量检测

**2.4.1 插入片段大小分析。** 随机挑取 100 个单克隆, 对其提取质粒并酶切鉴定插入片段大小。结果表明: 插入片段分布于 50~200 kb 范围内, 其中 80~150 kb 占 91%, 平均插入片段约为 102 kb, 空载率  $<2\%$ (图 1)。

**2.4.2 BAC 克隆稳定性的分析。** 随机挑取 4 个 BAC 单菌落进行继代培养(每天 12 h); 提取从第一天到第五天的 BAC 质粒 DNA, 分别进行 NotI 酶切后进行脉冲场凝胶电泳; 结果表明, 不同时期 BAC 克隆的酶切带形一致完好, 没有变化。因此, 认为经过 5 d 的继代培养, BAC 克隆可以在

寄主大肠杆菌中稳定保存至少 100 代。

**2.4.3 其它细胞器对 BAC 文库污染情况的检测。**为检测文库中受胞质 DNA 的污染情况,随机选择 384 个 BAC 克隆,将其点在 Hybond-N+(Amersham Biosciences)尼龙膜上,37℃过夜培养后,裂解细胞,以线粒体基因作探针,进行菌落原位杂交,结果显示本实验构建的 BAC 文库受线粒体 DNA 的污染小。

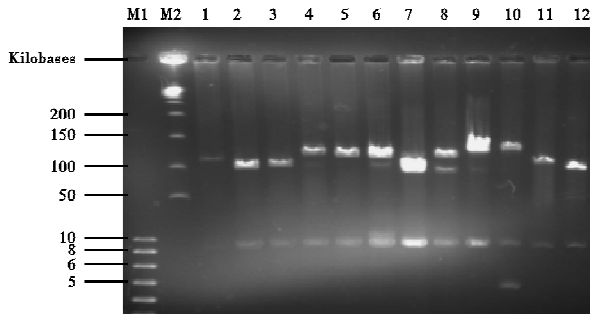


图 1 脉冲场凝胶电泳分析插入片段

Fig. 1 PFGE analysis of the randomly picked clones

### 3 讨论

本研究是国内外首次以具有高配合力的陆地棉雄性不育系为材料构建 BAC 文库,在构建文库过程中改良了细胞核的制备方法,解决了提取细胞核 DNA 过程中酚氧化后以共价形式结合到核 DNA 上的问题。构建的 BAC 文库包括 300 块 384 孔细菌培养板,250 块 96 孔细菌培养板,共 139,200 个 BAC 克隆,插入片段分布于 50~200 kb 范围内,其中 80~150 kb 占 91%,平均插入片段大小约为 102 kb,空载率 < 2%,插入片段稳定,细胞器 DNA 污染小,基因组覆盖率高达 6.3 倍。以该 BAC 文库作为棉花功能基因组学的技术平台,为阐明三系杂交棉的遗传基础及分子机理,克隆和利用相关功能基因奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] SHIZUYA H, Birren B, Kim U J, et al. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector[J]. Proceedings of the National Academic Science U. S. A, 1992, 89(18): 8794-8797.
- [2] 郑拥民,王省芬,张桂寅,等. 高产优质抗病棉花品种中棉所 12 细菌人工染色体(BAC)文库构建[J]. 河北农业大学学报,2004,27(3):17-20.  
ZHENG Yong-min, Wang Xing-fen, Zhang Gui-yin, et al. BAC library construction of Zhongmiansuo 12 with high yield, high quality and disease resistance [J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2004,27(3):17-20.
- [3] 王省芬,马 骏,马峙英,等. 高纤维强力棉花种质系苏远 7235 BAC 文库的构建[J]. 棉花学报,2006, 18(4):200-203.  
WANG Xing-fen, Ma Jun, Ma Zhi-ying, et al. BAC library construction and characterization of Suyuan 7235, a cotton germplasm with high fiber strength [J]. Cotton Science, 2006, 18(4): 200-203.
- [4] NAKAMURA S, Asakawa S, Ohmido N, et al. Construction of an 800-kb contig in the near-centromeric region of the rice blast resistance gene Pi-ta2 using a highly representative rice BAC library[J]. Mol Gen Genet, 1997, 254(6): 611-620.
- [5] 彭开蔓,张洪斌,张启发. 优良水稻品种“明恢 63” BAC 文库的构建[J]. 植物学报,1998,40(12):1108-1114.  
PENG Kai-man, Zhang Hong-bin, Zhang Qi-fa. A BAC library constructed to the rice cultivar "Minghui 63" for cloning genes of agronomic importance[J]. Acta Botanica Sinica, 1998, 40(12): 1108-1114.
- [6] FU Hui-hua, Dooner H K. A gene-enriched BAC library for cloning large allele-specific fragments from maize: isolation of a 240-kb contig of the bronze region[J]. Genome Res, 2000, 10(6): 866-873.
- [7] DANESH D, Peuela S, Mudge J, et al. A bacterial artificial chromosome library for soybean and identification of clones near a major cyst nematode resistance gene [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1998, 96(2): 196-202.
- [8] SALIMATH S S, Bhattacharyya M K. Generation of a soybean BAC library, and identification of DNA sequences tightly linked to the Rps1-k disease resistance gene [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1999, 98(5): 712-720.
- [9] WOO S S, Jiang Ji-ming, Gill B S, et al. Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library for *Sorghum bicolor* [J]. Nucleic Acids Research, 1994, 22(23): 4922-4931.
- [10] FRIJTER A, Zhang Zhi, Damme M, et al. Cloning and stable maintenance of DNA fragments over 300 kb in *Escherichia coli* with conventional plasmid-based vectors[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1997, 94: 390-399.
- [11] HAMILTON C M, Frary A, Xu Yi-min, et al. Construction of tomato genomic DNA libraries in a binary BAC (BIBAC) vector [J]. The Plant Journal, 1999, 18(2): 223-229. ●