

黑龙江野鲤细菌人工染色体基因组文库构建

耿波¹, 关云涛², 孙效文¹

(1. 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所 农业部北方鱼类生物工程育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150070; 2. 中国农业科学院 哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150001;)

摘要: 为了开展鲤基因组研究, 深入研究遗传连锁图谱遗传标记的定位及数量性状的定位和克隆, 并最终为分子育种提供服务, 本实验构建了鲤的BAC基因组文库。通过采集黑龙江野鲤(*Cyprinus carpio haematopterus*)全血细胞制备琼脂糖凝胶包埋块的方法获得了高分子量(HMW)DNA。通过BamHI部分酶切和PFGE电泳分离选择获得100~300 kb的DNA片段, 用电洗脱和透析的方法对产物进行浓缩和纯化。纯化的HMW DNA连接到大小为7.2 kb的克隆载体pEZ BAC上。为了评估构建的文库的质量使用一系列引物对文库进行了验证。本研究首次构建黑龙江野鲤的BAC文库, 该库含有46 656个克隆, 插入片段大小在50~300 kb之间, 平均大小在100 kb左右, 覆盖鲤全基因组2.45倍, 调取任一基因的概率为90%左右。获得的BAC克隆, 保存在378块96孔板和27块384孔板中。建立了高效稳定的2步3维PCR筛选黑龙江野鲤BAC文库的方法。本实验为今后进一步进行鲤的功能基因定位及染色体步行、BAC-FISH等研究工作打下重要基础。[中国水产科学, 2009, 16(2): 165-172]

关键词: 黑龙江野鲤; 细菌人工染色体(BAC); 基因组文库; 超级池

中图分类号: S965.116

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2009)02-0165-08

细菌人工染色体BAC的复制子来源于单拷贝质粒F因子, 故BAC在宿主菌内只有极少数拷贝数, 可稳定遗传, 无缺失、重组和嵌合现象^[1-2]。BAC以大肠杆菌为宿主, 转化效率较高, 常规方法(碱裂解)即可分离BAC, 蓝白斑、抗生素、菌落原位杂交等均可用于目的基因筛选, 而且可对克隆在BAC的DNA直接测序。因此, BAC基因组文库的构建对模式生物的基因组研究, 如人类、斑马鱼(*Danio rerio*)、小鼠等作出巨大的贡献, 并在基因组物理图谱构建、BAC-FISH、光学作图、转基因研究、基因的图位克隆、比较基因组研究、基因组测序、着丝粒的研究等方面得到广泛的应用^[3-4]。

鲤作为基因组最大的鱼类, 在进化上具有重要的研究价值。目前国内外尚未开展对鲤整个基因组的研究。根据鲤生产实际和市场需求, 提高鲤的品质和适应性是目前亟待解决的问题。鲤良种选育

的最大问题就是遗传背景不清楚, 严重地影响了鲤良种的保存和鉴定工作的进行。因此, 开展鲤基因组研究计划势在必行。本研究目的在于构建高覆盖率的鲤的BAC基因组文库, 为今后开展鲤基因组、功能基因组及蛋白质组研究做准备, 并为进一步深入研究遗传连锁图谱遗传标记的定位和数量性状的定位和克隆等工作打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验仪器: 96针式DNA复制器(Nelge Nunc International Corp.)由美国加州儿童医学院周一博士友情提供。BIO-RAD micropulser电转化仪, BIO-RAD公司产品。Gene Amp PCR System 9700 PCR仪, Eppendorf Mastercycler Gradient梯度PCR仪, Gene Genius Bio Imaging System凝

收稿日期: 2008-03-06; 修订日期: 2008-06-20.

基金项目: 国家计划(973)项目“重要养殖鱼类品种改良的遗传和发育基础研究”(2004CB117405); 黑龙江水产研究所基本科研业务费项目“鲤鱼BAC基因组文库克隆”(2007HSYZX-SJ-12).

作者简介: 耿波(1975-), 女, 助理研究员, 博士, 从事鱼类分子生物学研究. E-mail: ppgeng@sohu.com

通讯作者: 孙效文(1955-), 博士生导师, 研究方向: 鱼类基因工程. E-mail: sunxw2002@163.com

胶成像系统,为基因有限公司产品。DY-4B型交变脉冲电泳仪,江苏省兴化市分析仪器厂。核酸自动工作站(robotic liquid handling system) Multi PTOBE II PLOS, PERKIN ELMER 公司, USA。试剂购自上海生物工程有限公司和哈尔滨宝泰克公司。

实验样品:构建BAC文库所用的黑龙江野鲤为本实验室自黑龙江采集的野鲤在鱼池内繁殖饲养品系。

1.2 高分子量(HMW) DNA的提取

用10 mL注射器采集4条黑龙江野鲤的全血,每尾采2 mL左右(含有抗凝剂,抗凝剂与全血比例为1:10)。将4尾野鲤的全血混合在50 mL离心管内,用没有二价阳离子的PBS洗涤(可加入5 mmol/L的EDTA作为抗凝血剂),反复颠倒混匀。1 000~1 500 r/min, 4℃离心10 min。小心倒出上清。加入10 mL PBS重悬细胞。重复用PBS洗涤及离心步骤,直至沉淀中无红细胞。加入1 mL PBS,轻轻重悬细胞。取出10 μ L细胞稀释到990 mL盐水或PBS中,将10 μ L细胞液加入血球计数板计算每格的细胞数,从而计算最初细胞沉淀的每单位体积的细胞数。每个DNA包块含有20 mg DNA,最终体积的细胞数为20 mg/(40 μ L)。包块的另一半体积为2%低融点琼脂糖,包块的总体积为80 μ L,其中低融点琼脂糖的终质量分数为1%。如果细胞悬液的体积超过了终体积的一半,可以重复前面的步骤,用适量的PBS重悬细胞。用水浴融化2%的琼脂糖,将融化的琼脂糖转移到55℃,至少平衡10 min。将细胞悬液置于37℃、2~3 min平衡,中间轻轻摇晃。迅速将等体积的2%低融点琼脂糖加入细胞悬液中,来回颠倒混匀,迅速用移液器(1 000 μ L)将之加入模块中。每个孔中加80 mL,置于4℃、5~10 min使胶完全凝固。用塑料梳子将细长的胶/细胞模块推出,置于50 mL的细胞裂解液中。37℃消化1 h,更换裂解液,在37℃消化24~48 h。用肉眼观察是否裂解完全。如果胶块呈现红褐色,应该更换裂解液后继续消化至胶块呈半透明状。将消化彻底的胶块放在贮存液(20%NDS)中,室温平衡及反复摇晃2 h。更换新鲜的贮存液,将之保存在4℃至少可以1年以上。检测DNA的质

量,可将1/4的胶块用脉冲场凝胶电泳(Pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)来检测。1%琼脂糖胶,0.5×TBE,转换时间10~60 s(6 V/cm)脉冲,14℃室温^[5-6]。使用 λ Marker作为分子量标准。

1.3 部分酶切

1.3.1 酶切条件的建立 在正式酶切之前,对酶切的DNA浓度、酶量、反应时间等条件进行摸索。将一个DNA包埋块均匀分成8份置于含有1 mL TE的1.5 mL离心管中,室温平衡1 h,吸出上清后,加入3倍体积的酶切缓冲液(10×*Bam*H I酶切缓冲液,1/10 BSA)在冰上平衡1 h后,将上清吸出,重新加入3倍体积酶切缓冲液及酶,在冰上至少平衡3 h后,于37℃进行酶切反应。设酶量梯度,每管加入1/8 DNA plug,设不同酶量分别为10 U、8 U、4 U、2 U、1 U、0.5 U、0.25 U、0.125 U、0 U不等,同时酶切时间设有10 min、30 min、1 h、2 h、3 h、12 h、18 h。对酶切前后的处理条件进行了摸索。同时,对酶切后PFGE电泳的条件也进行了摸索,对不同的电泳的时间、电压大小、脉冲转换时间做了比较和优化。

1.3.2 野鲤基因组DNA部分酶切 消化包埋在低融点琼脂糖中的高分子量DNA之前,用10~20倍体积的预冷的TE(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)^[7]平衡1 h后,加入3倍体积的酶切缓冲液,在4℃平衡1 h,后弃溶液,重新加入3倍体积的酶切缓冲液和相应量的酶*Bam*H I在冰上至少平衡3 h(-3℃过夜平衡)以上,置于37℃反应1 h。反应结束后加入1/10体积的0.5 mol/L pH 8.0 EDTA终止反应。酶切反应体系:DNA 1 plug,酶切缓冲液64 μ L, BSA 6.4 μ L, *Bam*H I 1 μ L(10 U/ μ L), ddH₂O 570 μ L。侧孔加入 λ /*Eco*R I marker和 λ Ladder作为分子量标准对照。酶切后立即将反应管插入冰中,加入1/10体积0.5 mol/L pH 8.0 EDTA终止反应。PFGE观察酶切结果,0.5×TBE,11℃,120 V,90 s转换时间,过夜。回收50~300 kb大小的DNA片段,保存胶块在0.5 mol/L pH 8.0 EDTA中。

1.4 HMW DNA纯化

通过电洗脱和30%PEG8000浓缩进行。通过

0.8%琼脂糖凝胶电泳观察DNA产物浓度。

1.5 连接

连接反应体系总共100 μL 。(1)首先混合以液体: DNA 85 μL , H_2O 10 μL , $10\times$ 连接缓冲液1 μL , pEZ BAC vector (25 ng/ μL) 总共98 μL 。(2)将混合物于55 $^{\circ}\text{C}$ 加热2 min,冷却至室温。(3)加入2 μL ClongSmart 连接酶,慢慢搅动混合均匀,16 $^{\circ}\text{C}$ 孵育4 h。(4)将连接反应物于65 $^{\circ}\text{C}$ 加热15 min变性连接反应,室温冷却15 s,然后在0~4 $^{\circ}\text{C}$ 冷却15 s,以降低管内水蒸气的温度。(5)将连接产物快速离心,分装成小包装冻存在-20 $^{\circ}\text{C}$ 准备进行转化。

1.6 电转化

高效电转化感受态细胞的制备参见Bio-rad电转化仪使用说明和分子克隆。使用提供的Lucigen's *E. coli* Replicator Electrocompetent cells和自制感受态细胞。这些细胞转化对照pUC19能产生 2×10^{10} CFU/ μg 。电转化如下面的程序。标准转化时间是3.5~4.5 ms。电转化设空载体对照,阴性对照(Lambda *Bam*H I insert)及阳性对照。使用Bio-Rad micro pulser #165-2100,1mmol/L cuvette,10 uF600 Ohms1800 Volts。

1.7 BAC克隆的调取及长期保存

(1)用无菌牙签将平板上的白色菌落挑至96孔板,每个菌落一个孔,每孔加入200 μL 含12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氯霉素的LB培养冻存液(36 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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,4.4%甘油),放置37 $^{\circ}\text{C}$ 空气摇床中温育24 h,将96孔板进行系统编号后,置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中长期保存。

(2)用无菌牙签将96孔板中保存的BAC克隆分别转至384孔板,每4块96孔板转到一块384孔板,384孔板上加入100 μL 含12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素的LB培养冻存液,放于37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中温育过夜。将384孔板系统编号,保存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中。

1.8 BAC文库的鉴定

(1)BAC文库质粒的提取,用0.7%琼脂糖凝胶电泳初步检测提取的DNA的大小及浓度。

(2)酶切鉴定:采用BAC载体两端存在的*Not* I进行酶切,酶切体系为:BAC DNA 10 μL , H_2O 3.2 μL , $10\times$ *Not* I 反应液1.5 μL , *Not* I (10 U/ μL) 0.3 μL 。于37 $^{\circ}\text{C}$ 反应3 h后加入1/10体积的 $10\times$ 上样缓冲液终止反应,置于65 $^{\circ}\text{C}$,10 min灭活后立即插入冰中。以 λ Ladder 及 λ 双切Marker为分子量标准通过1%PFGE观察插入片段的大小和浓度,12.5 $^{\circ}\text{C}$,第1次转换时间为5 s,第2次转换时间为15 s,6 V/cm,16 h。

1.9 超级池的构建

1.9.1 超级池的构建 使用96针式DNA复制器按顺序构建超级池,每20个96孔板构建一个,并做好相应的纪录。对于保存在384孔板中的克隆,每20个384孔板分成4个区构建成4个超级池^[8]。具体操作如下:取出保存在-86 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中的96孔板或384孔板,放在冰上融化,用消毒灭菌的96针式DNA复制器完整的蘸取96孔板或384孔板一个区中的菌液,然后将之插入含有200 μL LB培养基中(含有冻存培养基和氯霉素),充分混匀后,将96针式DNA复制器用70%乙醇消毒2次以上,放凉后转移下一块96孔板或384孔板相应的区,重复该过程。然后将混合菌液的96孔板在37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床内培养过夜,保存在-86 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内以供使用。

1.9.2 三维筛选池的构建

(1)利用核酸自动工作站从构建好的BAC文库中吸取10 μL 左右菌液构建相应的克隆池。

(2)每10个96孔板合并成一个96孔板池,即10个板的同一个孔位置合并到相应相同的孔内如板1~10的A1孔合并成板池A1。

(3)每8个96孔板合并成一个列池,即每个板同一个列合并到列池该列的同一个孔内,每个板的列合并后排列在同一排内,如96孔板1号的第1列的8个孔都合并到列池第1排孔A1,第2列的8个孔都合并到列池第1排孔A2,依次类推。2号板合并到第2排。

(4)每12个96孔板合并成1个行池,即每个板同一个行合并到列池该行的同一个孔内,每个板的行合并后排列在同一列内,如96孔板1号的第一行A1-

A12的12个孔都合并到行池第1列1A孔,第2行B1-B12的12个孔都合并到行池第1列1B孔,依次类推。2号板合并到第2列。

(5) 每10个384孔板合并成一个384孔板池;每16个384孔板合并成一个列池;每24个384孔板合并成一个行池。

2 结果与分析

2.1 高分子量HMW DNA的提取

收集4尾养殖在哈尔滨江北养殖基地的人工驯化野鲤的血细胞共5~6 mL(含10%肝素钠)用PBS清洗重悬后包埋在低熔点琼脂糖中,最终体积约为1.5 mL PBS,加入1.5 mL 2%低熔点琼脂糖,用LDS进行体外裂解,获得了较好的HMW DNA。血细胞计数理论值为 $1 \times 10^5/\mu\text{L}$,本实验用血球计数器的实测值为 $4 \times 10^4/\mu\text{L}$,血细胞浓度基本符合要求。通过PFGE电泳分析,得到的HMW DNA基本没有降解,大小在500 kb以上,浓度在10 $\mu\text{g}/\text{plug}$ 左右。HMW DNA电泳图见图1。

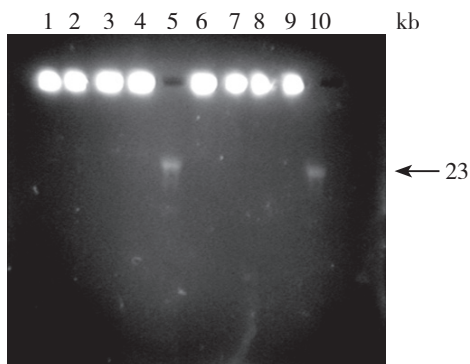


图1 黑龙江野鲤HMW DNA

1-4,6-9为DNA;5和10为 λ /Hind III marker;电泳条件100 V,60 s;转换时间18 h,11 $^{\circ}\text{C}$ 。

Fig. 1 HMW DNA of *C. carpio haematopterus*
Lanes 1-4 and 6-9 are HMW DNA, and lanes 5 and 10 are λ /Hind III marker. The condition of electrophoresis is 100 V, 60 s; pulse time 18 h, 11 $^{\circ}\text{C}$.

2.2 酶切条件的建立

对每1/8块DNA plug添加的酶量倍比稀释到0.015 U,进行酶切效率测定。经过多次摸索,每个DNA plug使用10 U的酶在37 $^{\circ}\text{C}$ 反应1 h酶切效果

最好,得到的片段大小大部分在50~300 kb之间。具体的酶切反应条件是:DNA 1 plug,酶切缓冲液64 μL , BSA 6.4 μL , BamH I 1 μL (10 U/ μL), ddH₂O 570 μL 。

按照建立的酶切反应条件进行大量酶切,得到大量的目的大小片段的DNA酶切产物,见图2、图3。

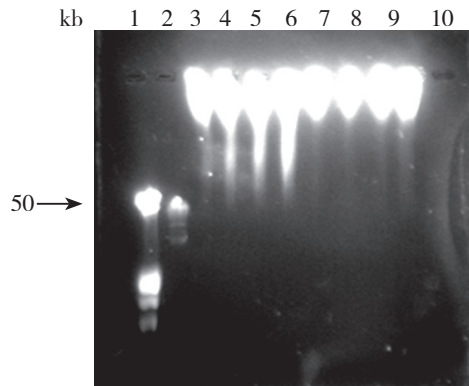


图2 黑龙江野鲤HMW DNA不同时间反应图谱

1: λ mix marker; 2: λ -ladder marker; 3-6: HMW DNA用0.25 U酶量酶切,消化时间依次为15 min,20 min,30 min,1 h; 7-10: HMW DNA用0.1 U酶量酶切,消化时间依次为15 min,20 min,30 min,1 h。

Fig. 2 Enzyme digests reaction with different enzyme quantity during different time for HMW DNA of *C. carpio haematopterus*

Lane 1 means λ mix marker; lane 2 means λ -ladder marker lanes; lanes 3-6 mean enzyme digest reaction with 0.25 U enzyme quantity and the react time is 15 min, 20 min, 30 min, 1 h in turns; lanes 7-10 mean enzyme digest reaction with 0.1 U enzyme quantity and the react time is 15 min, 20 min, 30 min, 1 h in turns.



图3 黑龙江野鲤HMW DNA大量酶切结果

Fig. 3 Result of a mass enzyme digest of *C. carpio haematopterus* HMW DNA

2.3 酶切产物的纯化

选择酶切产物中的100~300 kb DNA片段进行电洗脱和纯化处理,成功地将从低

熔点琼脂糖上洗脱,将500 μL 电洗脱产物浓缩至50 μL ,浓缩产物经电泳观察浓度约为100 ng/ μL (图4)。

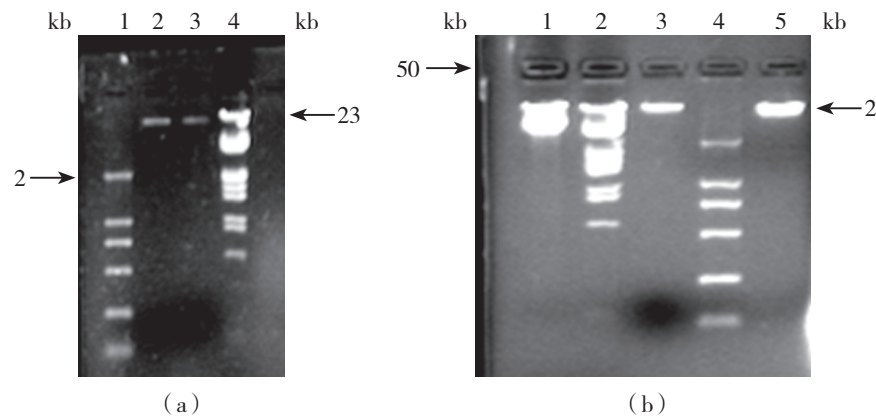


图4 酶切产物的电洗脱结果

(a) 中1为DL2000分子量标准,2-3为酶切电洗脱产物,4为 $\lambda/\text{EcoR I} + \text{Hind III}$ 双切分子量标准;(b) 中1为 λ mix 分子量标准,2为 $\lambda/\text{EcoR I} + \text{Hind III}$ 双切分子量标准,4为DL2000分子量标准,3和5为酶切电洗脱产物。

Fig. 4 Result of electroelution of digested products

(a) Lane 1 means; lanes 2-3 are the product of electroelution; lane 4 is λ molecular weight standard with *EcoR I* and *Hind III* digestion. (b) Lane 1 is the λ mix molecular weight standard; lane 2 is λ molecular weight standard with *EcoR I* and *Hind III* digestion; lane 4 is DL2000 molecular weight standard and lanes 3 and 5 are the product of electroelution.

2.4 连接和转化

参照试剂盒提供的连接体系在16 $^{\circ}\text{C}$ 进行2次连接反应,共获得连接产物200 μL 。用浓缩纯化的连接产物在电压情况下进行电击条件的摸索。结果表明,1.8 kV/cm转化效率最高。电转化每次设阳性质粒对照和空载体对照,转化产物先预涂一块含有1.25 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素的LB固体培养基上,经24~48 h 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养后测定转化效率。剩余的转化产物加入30%甘油冻存在-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

2.5 BAC克隆的培养和保存

经过不断地连接、转化、涂板培养和挑菌工作,共获得46 656个克隆。获得的BAC克隆,保存在378块96孔板和27块384孔板中,-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存。

2.6 BAC库插入片段的鉴定

对构建好的野鲤的BAC文库,随机挑取30个克隆进行插入片段的阳性克隆率及插入片段大小的鉴定。检测到阳性插入率在94%左右,插入片段大小在50~300 kb之间,平均大小在100 kb左右。

2.7 超级池及三维筛选池的构建

每20块96孔板构建成一个超级池;将384孔板分成4个区,每20个384孔板相应的区构建成4个超级池。共构建了24个超级池,经37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床100 r/min培养16~24 h后,保存在-86 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

利用核酸自动工作站,超级池对应的BAC板(96孔或384孔)构建三维筛选池。共构建了22个板池,18个行池,28个列池。这些超级池和三维筛选池的构建为今后从该库中调取功能基因进行BAC重叠群的研究等工作奠定了基础。

3 讨论

由于BAC弥补了YAC的不足,具有遗传稳定性好、嵌合率低、转化效率高和重组DNA易分离等优点,近年来已成为构建大片段基因组文库和大尺度生物基因组物理作图中应用最广泛的载体系统。为了对复杂的基因组进行测序分析,需要构建高度重复的BAC文库。通过利用高度重复随机克隆,就能装配一套最低限度的重叠克隆群。虽然目前大片段

文库构建技术已经十分成熟,但是相对于普通文库的构建来说,依然存在几点技术上的难题。其中构建高度重复的BAC文库的2个最关键环节是克隆载体和分子量插入片段的制备。

(1) 克隆HMW DNA对酶切条件和克隆载体的要求较高。Osoegawa等^[6]的研究结果表明,设计一系列实验以确定载体完全消化所需最少酶用量及最佳酶作用时间是非常重要的。如果酶用量过大可能导致非特异性酶切或产生星号活性。这种非特异性酶切虽然在整个酶切反应体系中发生的几率很小,但结果却会产生很高比例的假阳性,从而导致整个文库的空载率过高。载体的质量直接关系着文库中空白载体的比例和文库的质量,载体的纯度越高,获得阳性克隆的概率越高。由于现在生物技术的发展,高效的克隆载体完全可以通过试剂公司提供,对BAC文库的构建完成提供了前提保障。

(2) 高分子量的大小均一的插入片段是构建BAC文库最关键的环节之一^[9-10]。首先要获得高质量的完整基因组DNA,这是构建BAC的最基本的条件,确保每个DNA片段的末端都是酶切产生的黏性末端;其次,要将酶切产生后的大小片段分开。由于载体有优先连接较小片段的趋势,所以在连接的时候应尽量避免在插入片段中混有太多的小片段。片段太小或太大都是不适合的。片段太小建库所需的费用就增加很多(重复次数、克隆数、保存等),而片段太大又会降低连接转化的效率。因为多数片段太大,连接效率太低,其中的小片段优先连接,而这类小片段经2次分离后量很少,故连接和转化效率低,产生的白色菌落少。在连接反应之后,使用透析膜透析浓缩增加连接物的浓度,可明显提高转化效率。透析之后应立即转化,避免反复冻融。所有没有插入片段的克隆,有一个Not I酶切位点,而且大多数不能用克隆的酶消化,因此这些背景克隆丢失了sac B启动子或部分开放阅读框。通过改良的PFGE方法能轻易的减少问题DNA片段,可降低非重组克隆的背景水平。

(3) 转化过程也是很重要的步骤之一^[11]。感受

态细胞制备时细胞培养时间和处理细胞的过程都需严格要求,要在生长对数和对数期收获细胞,并且处理细胞要尽可能保持细胞的完整性,避免破裂。并且感受态细胞不能反复冻融。转化的准备工作一定要充分。转化的操作要熟练,整个过程要越快越好,并且在电击后迅速加入复苏培养基,动作越迅速转化效率越高。从电击到将细胞加入培养基的时间是非常关键的,即使拖延1 min也能降低转化效率3倍,拖延10 min转化效率会降低20倍。同时对转化的环境也有要求,要求低离子强度。所以要在准备DNA和感受态细胞时特别注意除盐。转化温度以0~4℃为宜,转化前电击杯、感受态细胞及质粒要冰浴,托架也先预冻。电转化是一个很复杂的过程,尽管所有的事项均注意到了,电转化仍然可能出现问題,如电击杯被击穿、没有电流等问題。在本实验中也出现过类似的情况,如同样的连接产物,在不同的感受态细胞中转化出不同的结果。所以转化的时候还要尽量使用新鲜制备的同一批次制备的感受态细胞。

尽管BAC载体理论上可容纳300 kb的外源片段,但迄今所有的BAC文库平均插入片段的大小均在100~150 kb左右,尚未见平均插入片段大于200 kb的报道。一般认为转化条件是影响大片段基因组文库插入片段大小的关键因素,Allouis^[12]等的实验也证明了这一点,因此如何改进目前的转化条件以提高BAC文库平均插入片段的大小是急需解决的一个问题。

(4) BAC文库的筛选有2种方法,PCR和杂交。对于功能基因的筛选,从2步3维PCR筛选到的结果比从高密度杂交获得的结果更为可靠,假阳性少,而且方法简便快速易于操作。但是对于构建大区域的物理重叠群,用高密度膜进行杂交筛选阳性克隆可以一次得到一个标记的所有重叠克隆,更有利于快速的构建BAC重叠群。因此为了最大限度地发挥文库的作用,在对BAC文库进行筛选的时候,要尽量根据需求选择方法,避免浪费和提高效率。

(5) 目前构建成功的BAC文库可以分为3类:构

建整个核基因组的BAC文库,绝大部分BAC文库属于此类;构建部分基因组的BAC文库;构建BAC池(pools)。针对不同的研究目的可以采用不同类型的BAC文库,如构建完整基因组的物理图谱需要一个或多个文库的大量克隆,需采用第一类BAC文库;对于图位克隆或寻找目标基因区域的遗传标记仅需少量的克隆,可采用第二类或第三类。

由于本实验构建的鲤鱼BAC文库的目的并不是为了全基因组测序,而主要是用于鲤性状相关功能基因的调取、定位克隆、FISH等方面的研究,因此不需要构建覆盖基因组4倍以上的完整BAC文库。

参考文献:

- [1] Kim U J, Shizuya H, de Jong P J, et al. Stable propagation of cosmid sized human DNA inserts in an F factor based vector [J]. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20: 1 083–1 085.
- [2] Shizuya H, Birren B, Kim U J, et al. Cloning and stable maintenance of 300-kilo-base-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector [J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, 1992, 89: 8 794–8 797.
- [3] Liu H B, Liu K, Wang J F, et al. A BAC clone-based physical map of ovine major histocompatibility complex[J]. *Genomics*, 2006, 88: 88–95.
- [4] Chang J Z, Hui J P, Shao B G, et al. Giant panda BAC library construction and assembly of a 650-kb contig spanning major histocompatibility complex class II region [J]. *BMC Genomics*, 2007, 8: 315.
- [5] Katagiri T, Asakawa S, Minagawa S, et al. Construction and characterization of BAC libraries for three fish species: rainbow trout, carp and tilapia [J]. *Animal Genetics*, 2001, 32: 200–204.
- [6] Osoegawa K, Woon P Y, Zhao B, et al. An improved approach for construction of bacterial artificial chromosome libraries [J]. *Genomics*, 1998, 52(1): 1–8.
- [7] Shuichi A, Izumi A, Yoshiki K, et al. Human BAClibrary: construction and rapid screening [J]. *Gene*, 1997, 191: 69–79.
- [8] Cenci S, Somma S, Chantret N, et al. PCR identification of durum wheat BAC clones containing genes coding for carotenoid biosynthesis enzymes and their chromosome localization [J]. *Genome*, 2004, 47: 911–917.
- [9] Jim T, Baoli Z, Eirik F, et al. A highly redundant BAC library of Atlantic salmon (*Salmo salar*): an important tool for salmon projects [J]. *BMC Genomics*, 2005, 6(50): 1 471–2 164.
- [10] Kim U J, Birren B W, Slepak T, et al. Construction and characterization of a human bacterial artificial chromosome library [J]. *Genomics*, 1996, 34: 213–218.
- [11] Jimenez L V, Kang B K, deBruyn B, et al. Characterization of an *Aedes aegypti* bacterial artificial chromosome (BAC) library and chromosomal assignment of BAC clones for physical mapping quantitative trait loci that influence Plasmodium susceptibility [J]. *Insect Molecular Biology*, 2004, 13(1): 37–44.
- [12] Allouis S, Qi X, Lindup S, et al. Construction of a BAC library of pearl millet, *Pennisetum glaucum* [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 102: 1 200–1 205.

Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) genomic library of Heilongjiang River carps (*C. carpio haematopterus*)

GENG Bo¹, GUAN Yun-tao², SUN Xiao-wen¹

(1. Hei Longjiang Fishery Research Institute, Chinese Academic of Fishery Sciences, Harbin 150070, China; 2. National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

Abstract: As the development of the genome, it is important to identify the genomic mechanisms for specific traits of fish. Traits of importance might be related to growth, disease resistance, good conversion efficiency, color or taste. To identify genomic regions responsible for specific traits, genomic large insert libraries have previously proven to be of crucial importance. Here we constructed a highly redundant genomic bacterial artificial chromosome (BAC) library using high molecular weight DNA from a Heilong River wild carp (*Cyprinus carpio haematopterus*) mainly distributing in Heilong River. Its popular name is carp or oil carp. *C. carpio haematopterus* is groundfish and likes to live in slightly turbid water. It has a broad distribution and is one of the chief catch fishes and cultural fishes. *C. carpio haematopterus* has fine characters such as strong antireversion force (cold-resistance and disease resistance), genetic diversity and so on and often used to cross breeding and cells and embedding in low-melting-point (LMP) agarose plugs. Firstly we determined the optimal partial digestion conditions for BAC cloning by varying the concentration of the restriction enzyme, the time of digestion with the same amount of the restriction enzyme. The partial digestion of HMW DNA is to generate equality size DNA fragments followed twice size selection. Finally we performed size-selection for *BamH* I restricted DNA Fragments from 100–300 kb with PFGE and eluted DNA with electroelution from the agarose gel slice and then purified them with dialysis and condensed with PEG8000. The purified HMW DNA was ligated to the vector pEZ BAC with 7.2 kb. Screening of the BAC library with mix primers was carried out to confirm the library quality. We constructed the BAC library of Heilong River carps for the first time. This BAC library consists of 46,656 BAC clones in total, and the insert DNA size is about 50~300 kb, the average of size is about 100 kb. The genome coverage of the BAC library is 2.45 and the possibility to find a single-copy gene in the library is about 90 percent. All these BAC clones are preserved in 378 pieces of 96-well plates and 27 pieces of 384-well plates. Superpools, plate pools, row pools and line pools are used to demonstrate the ability of the library to identify specific genes and genetics markers using two-step polymerase chain reaction (PCR). Although the linkage and QTL-mapping in common carps are now yielding results, the resource for physical mapping and positional cloning are not well developed. *C. carpio haematopterus* is both commercially important as well as popular subject for basic research. Here we describe the construction of a new BAC library for *C. carpio haematopterus*. A high coverage of a BAC library is critical for screening of any particular genes. Based on the average insert size, the total number of clones of the library, and the haploid genome size of carp, we estimated the coverage of the carp BAC library. The construction of the BAC library requires specialized equipment and skills, and investment of 3–6 months in the laboratory work. Our BAC libraries will be available to interested researchers upon request. The BAC library will facilitate the identification of genes controlling important traits in carps and is expected to be an important resource for genetic mapping, and sequencing of the carp genome. [Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16 (2): 165–172]

Key words: Heilongjiang River carp (*C. carpio haematopterus*); bacterial artificial chromosome (BAC); genomic library; superpool

Corresponding author: SUN Xiao-wen. E-mail: sunxw2002@163.com