

黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) BAC 文库的构建及连锁群特异克隆的分离^{*}

关媛^{1**} 陈琪^{2**} 潘俊松¹ 李征¹ 何欢乐¹
吴爱忠¹ 宋任涛² 蔡润^{1***}

1. 上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240; 2. 上海大学生命科学学院, 上海 200444

摘要 利用中国华北类型的黄瓜自交系 S94 构建一个 BAC 文库, 该文库包含约 19200 个克隆, 平均插入片段为 105 kb, 大约覆盖黄瓜基因组的 5 倍. 为了使黄瓜的遗传连锁群锚定其染色体, 从黄瓜的 7 个连锁群共选择了 22 个标记, 其中 15 个 SCAR 标记和 7 个 SSR 标记. 利用这些标记用 PCR 的方法筛选 BAC 文库的 DNA 池, 15 个标记筛选到至少 2 个克隆, 共筛选到 60 个 BAC 克隆, 最后确定了 22 个 BAC 克隆作为连锁群特异克隆, 这个 BAC 文库的构建为今后黄瓜基因组研究奠定了基础.

关键词 黄瓜 细菌人工染色体文库 分子标记 PCR 检测 特异克隆

黄瓜 (*Cucumis sativus* L., $2n=14$) 是世界上重要的蔬菜作物, 因其花性型多样, 也是遗传研究的一个模式植物^[1]. 黄瓜有 7 对染色体, 基因组只有 367 Mb^[2], 小于甜瓜 (*C. melo* L.) 和西瓜 [*Citrullus lanatus* (Thunberg) Matsumura and Nakai] 的基因组. 近年来黄瓜基因组研究取得了一定的进展, 目前为止, 黄瓜的分子连锁图谱已经发表了十几张, 涉及 RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeat), SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism) 等标记和一些重要的农艺性状和数量性状位点 (QTLs)^[3-9]. 这些遗传图谱是黄瓜基因组研究的宝贵资源, 它不仅定位重要的农艺性状或 QTL, 更重要的是它可以锚定物理图谱.

细菌人工染色体 (BAC) 文库具有插入片段大、

嵌合率低、遗传稳定性好、易于操作等优点而备受青睐. BAC 文库的构建不仅是进行基因图位克隆的基础^[10,11], 也是物理图谱构建、基因组测序和比较基因组研究的必备条件. 韩国和美国科学家用一个全雌、有限生长类型的日本品种首次构建了两个黄瓜 BAC 文库^[12], 但中国主栽的黄瓜品种属于雌雄异花同株, 无限生长的华北类型.

至今为止, 黄瓜的遗传图谱还未与染色体相对应, 现有的黄瓜遗传图谱上的固定标记 (SSRs 和 SCARs) 也较少. Fazio et al. 发表的黄瓜分子遗传图谱是目前固定标记最多的一张图谱, 包含 7 个连锁群, 有 24 个 SCAR 标记和 14 个 SSR 标记, 每个连锁群上的固定标记为 0—10 个, 平均为 5.4 个^[8]. 本实验室用 F₂ 群体构建的遗传图谱也为 7 个连锁群, 共有 9 个 SCAR 标记和 11 个 SSR 标记, 每个连锁群上的固定标记为 1—7 个^[13]. 目前该图谱每个连锁群上的固定标记已增加到 2—10 个, 平均为 5 个 (结果

2007-06-18 收稿, 2007-08-23 收修稿

* 国家自然科学基金 (批准号: 30671111) 和上海市科委项目 (批准号: 043919317) 资助

** 共同第一作者

*** 通信作者, E-mail: cairun@sjtu.edu.cn

©1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

未发表), 这为筛选连锁群特异的 BAC 克隆提供了基础. 目前, 黄瓜细胞学和分子细胞遗传学的研究已经取得了一定进展^[4-18], 利用 DNA 标记、C 带分析、FISH 技术已建立了黄瓜高解析度的染色体组型^[19]. 本研究中, 我们利用中国广泛种植的华北类型黄瓜品种构建了一个 *Hind*II 部分酶切的 BAC 文库, 并且利用黄瓜遗传图谱每个连锁群上的固定标记 (SCAR 和 SSR) 筛选 BAC 文库得到了特异克隆, 这为今后在 FISH 分析中利用 BAC 克隆杂交染色体, 并将黄瓜遗传连锁群在染色体上的定位奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

黄瓜自交系 S94 由上海交通大学农业与生物学院提供, 它属于中国广泛种植的华北类型, 抗霜霉病. S94 是雌雄异花同株, 强雄性, 无限生长, 果瘤大而密, 果刺多.

1.2 方法

1.2.1 BAC 文库的构建 将 S94 植株种在人工气候室中, 生长 4—7 周, 然后暗培养 48 h, 收集 50 g 叶片液氮研磨, 然后分离核, 制成琼脂糖胶块^[20]. 琼脂糖胶块用裂解液裂解 48 h 后, 用预冷的 Tris-EDTA 洗两次待用. BAC 文库构建方法见文献 [21, 22], 按载体 (pIndigoBAC-5, EPICENTRE 公司): 插入片段为 7:1 (摩尔浓度比), 于 4℃ 下连接过夜. 连接产物经脱盐后进行电击转化大肠杆菌感受态 DH10B (Invitrogen 公司)^[21], 将 60 μL 转化物涂布于含 12.5 μg/mL 氯霉素的 LB 固体平板上, 37℃ 培养 16 h, 用以计算文库的总容量及检测文库的插入片段大小. 控制转化物的量, 使每个平板大约长出 200 个克隆, 共涂菌培养 96 个平板. 将平板上的菌落刮到 96 孔板的培养基中, 得到的菌液即为 200 个克隆的混和. 这样约 19200 个克隆保存于 1 块 96 孔板中.

随机挑取 100 个克隆接种到 3 mL 含氯霉素 (12.5 μg/mL) 的 LB 培养基中 37℃ 培养过夜, 用碱裂解法提取质粒 DNA, *Not* I 酶切后, 脉冲电场凝胶电泳检测插入片段的大小^[21].

1.2.2 文库的混池 为方便 PCR 检测, 建立了黄

瓜 BAC 文库的三维 PCR 筛选体系, 方法参考文献^[22]. 首先把 96 孔板的每孔包含的 200 个克隆看作是一维池, 然后将 96 孔板的纵列和横列分别并样, 构成二维池和三维池. 用碱裂解法提取二维池和三维池的质粒, 将其作为模板进行 PCR, 以确定目的克隆在 96 孔板的具体位置; 然后从该孔中取少量菌液涂布到含氯霉素 (12.5 μg/mL) 的 LB 平板上, 37℃ 培养 16 h 后随机挑取克隆作为模板, 通过 PCR 筛选得到目标单克隆. PCR 体系为: 质粒 DNA 0.5 μL, 引物 0.5 μmol/L, 200 μmol/L dNTPs, 2 mmol/L MgCl₂, 1× *Taq* 缓冲液, 0.5 U *Taq* DNA 聚合酶 (上海 Promega 公司产品), 总反应体系为 10 μL. 反应的程序如下: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 相应退火温度 30 s, 72℃ 1 min, 40 个循环; 72℃ 5 min. PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶成像系统成像.

1.2.3 连锁群特异克隆的分离 在用 F₂ 群体构建的黄瓜遗传连锁图谱上 (结果未发表), 从每个连锁群选取 2—4 个分子标记, 7 个连锁群共选择了 22 个标记, 其中 15 个 SCAR 标记和 7 个 SSR 标记. 在 SCAR 标记中, 5 个 SCAR 标记来自于美国 Staub 教授的实验室 (<http://www.vcru.wisc.edu/staublab>), 即 AI4SCAR, AO12SCAR, BC403SCAR, AN5SCAR, C1SCAR. 7 个 SCAR 标记是从 RAPD 标记转化得来, 其中 6 个 SCAR 标记来自本实验室已发表的遗传图谱^[13], 标记 S_H12 来自未发表的遗传图谱, 其引物序列分别为: 5'-ACG CGC ATG TTT AGC TAC TT-3' (S_H12F) 和 5'-ACG CGC ATG TTA ACA CGA GA-3' (S_H12R). 其余 3 个 SCAR 标记和 7 个 SSR 标记均来自于发表的文献^[8, 23-25] (见表 1). 所有引物从 S94 上均可获得扩增产物.

表 1 用于检测黄瓜 BAC 文库的连锁群固定标记

标记名称	标记类型	片段 (bp)	连锁群 ^{a)}	标记来源
S_S13-2	SCAR	700	1	[13]
C162	SSR	269	1	[23]
AI4SCAR	SCAR	1200	1	Staub Lab ^{b)}
AO12SCAR	SCAR	1300	1	Staub Lab ^{b)}
CSWCT25	SSR	357	2	[25]
CS30	EST-SSR	151	2	[24]
BC403SCAR	SCAR	774	2	Staub Lab ^{b)}

续表

标记名称	标记类型	片段 (bp)	连锁群 ^{a)}	标记来源
S_ AV14	SCAR	494	2	[13]
S_ BE5-3	SCAR	281	3	[13]
CS8	EST-SSR	180	3	[24]
S_ AB14	SCAR	534	4	[13]
S_ AU18-1	SCAR	409	4	[13]
CSWACC02	SSR	227	4	[25]
L19-2-SCAR	SCAR	1000	5	[8]
CS5	EST-SSR	299	5	[24]
AN5SCAR	SCAR	875	5	Staub Lab ^{b)}
BC526-SCAR	SCAR	970	6	[8]
C1SCAR	SCAR	372	6	Staub Lab ^{b)}
S_ BC526-2	SCAR	219	6	[13]
BC515SCAR	SCAR	650	7	[8]
CSWCT11	SSR	226	7	[25]
S_ H12	SCAR	767	7	本实验室 ^{b)}

a) 连锁群编号的确定参考文献[13]; b) 标记来自未发表文献

2 结果与分析

2.1 黄瓜 BAC 文库构建

用黄瓜自交系 S94 构建了 BAC 文库, 这个文库包含大约 19200 个克隆. 为了鉴定文库插入片段大小, 随机挑取 100 个克隆, 经 *Not*I 酶切, 通过脉冲电场凝胶电泳检测, 观察到 90% 的克隆含有插入片段, 插入片段大小分布于 80—140 kb 之间, 平均插入为 105 kb 左右(图 1). 根据平均插入片段(约 105 kb)和文库的总容量, 整个文库覆盖了约 1814 Mb 基因组序列, 按照黄瓜基因组 367 Mb 计算, 该文库覆盖基因组约 5 倍.

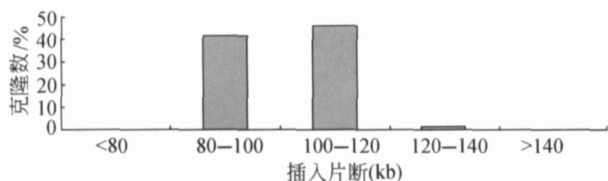


图 1 黄瓜 BAC 文库随机挑选克隆的插入片段大小分布

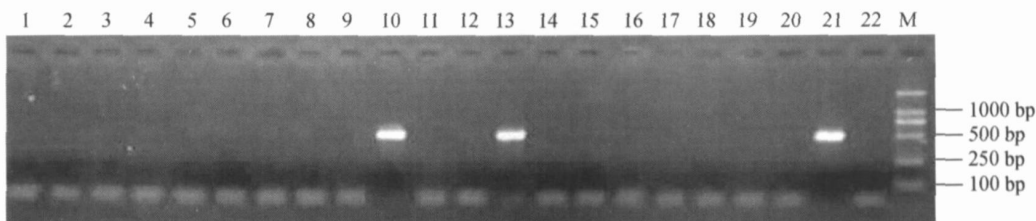


图 2 S_ AV14 标记在黄瓜 BAC 文库池 DNA 中的扩增

1—12 为二维池 13—20 为三维池, 21 为 S94DNA, 22 为阴性对照, M 为 DL2000

2.2 BAC 文库的检测

为了评价文库质量和分离与遗传连锁群上固定标记对应的 BAC 克隆, 我们用 PCR 的方法检测文库, 利用从黄瓜遗传图谱上 7 个连锁群选出的 22 个标记筛选了 BAC 文库的 DNA 池. 通过两轮 PCR 筛选, 得到了目的单克隆. 图 2 示标记之一 S_ AV14 对黄瓜 BAC 文库池 DNA 扩增的结果.

2.3 连锁群特异 BAC 克隆的分离

这 22 个标记每个得到 1—9 个 BAC 克隆, 共得到 60 个克隆, 得到 1 个克隆的标记有 7 个, 有 15 个标记得到的克隆至少两个. 从这 60 个克隆中, 为下一步应用于 FISH 技术杂交黄瓜染色体, 我们挑选了 22 个克隆作为连锁群特异的 BAC 克隆(表 2).

表 2 用连锁群固定标记鉴定的黄瓜 BAC 克隆

标记名称	BAC 克隆数	标记名称	BAC 克隆数
S_ S13-2	2	S_ AU18-2	2
C162	1	CSWACC02	3
AI4SCAR	2	L19-2-SCAR	4
A012SCAR	2	CS5	1
CSWCT25	1	AN5SCAR	1
CS30	1	BC526-SCAR	5
BC403SCAR	2	C1SCAR	3
S_ AV14	1	S_ BC526-2	3
S_ BE5-3	9	BC515SCAR	4
CS8	4	CSWCT11	5
S_ AB14	1	S_ H12	3
合计	60	平均	2.73

3 讨论

我们构建的黄瓜 BAC 文库有 19200 个克隆, 平均插入片段为 105 kb, 覆盖黄瓜基因组大约 5 倍, 说明发现任何一个 DNA 序列的可能性为 99%. BAC 文库插入片段大小在 100—200 kb 之间, 完全

可用于物理定位, 通过 FISH 技术在染色体上的定位, 以及分离紧密连锁的多态性标记、基因表达的调控元件等研究^[26]. 这个黄瓜 BAC 文库是用中国广泛种植的华北类型黄瓜材料构建的, 其材料具有雌雄异花同株, 无限生长、刺瘤大而且密的特点, 并且抗黄瓜霜霉病, 这与已经构建的黄瓜 BAC 文库所选的材料有所不同, 这个黄瓜品种为全雌, 有限生长类型, 抗黄瓜霜霉病^[2]. 由于我们所选的材料是本实验室 F₂ 和重组自交系群体构建遗传图谱的亲本之一, 所以为染色体和遗传图谱的对应奠定了基础, 同时也为图位克隆基因及构建目标基因的物理图谱提供了可能. BAC 载体通常有 *EcoR* I, *Bam* HI 和 *Hind* III 3 个酶切位点^[27], 2005 年构建的两个黄瓜 BAC 文库分别使用的是 *EcoR* I 和 *Bam* HI^[13], 而我们使用的是 *Hind* III 不同的限制性内切酶进行部分酶切会产生不同的基因组区域, 并且我们的文库与以前构建的两个黄瓜 BAC 文库覆盖黄瓜基因组的倍数相同, 均大约为 5 倍, 所以这个文库也可以和其他两个 BAC 文库进行互补使用, 共同推进黄瓜基因组的研究.

高分子量 DNA 插入片段的制备是构建 BAC 文库的关键所在, 由于细胞核要包埋在琼脂糖凝胶块中进行原位裂解^[28], 因此, 包埋的细胞核的质量和浓度决定了最终高分子量 DNA 的质量和浓度, 而植物材料的选取直接影响细胞核的质量. 由于黄瓜叶片组织中含有较多的次级代谢产物, 大大降低了细胞核质量, 因此本研究选用经过暗培养处理的黄瓜幼嫩组织为材料来制备高分子量 DNA. 幼嫩组织代谢产物较少, 制备的细胞核较为纯净, 提高了细胞核的质量. 为了尽量去除制备的高分子量插入片段中的小片段 DNA, 提高 BAC 克隆插入片段的大小, 采用两次分离回收的方法, 在第一次分离后切下位于 100—300 kb 的片段, 电洗脱回收进行第二次分离, 这样就大大减少了小片段 DNA 的含量, 提高了文库的平均插入片段大小.

为了提高筛选效率, 采用了混池策略, 可以缩短时间和减少实验花费, 更方便去分离候选克隆, 也适合于大范围用以 PCR 为基础的标记进行文库的筛选. 将 19200 个原始克隆存入一个 96 孔板, 每个孔包含约 200 个克隆. 由于文库的单克隆是混和的, 所以不能将单克隆点在滤膜上, 这使 RFLP 标

记及同位素的标记使用不便, 但是这样为文库的保存及以后文库的拷贝提供了便利, 并大大减少了构建文库后混池的流程. 文库每个横向的池包含 2400 个克隆, 纵向的池包含 1600 个克隆, 采用 22 个分子标记通过两轮的筛选就得到了 60 个 BAC 克隆, 为遗传图谱的连锁群在染色体上的定位奠定了基础.

黄瓜遗传图谱目前存在的问题是固定标记少, 平均每个连锁群为 5 个^[8]. 由于连锁群上固定标记分布的不均匀, 也为筛选连锁群特异的 BAC 克隆带来困难. 黄瓜基因组包含大量的重复序列^[12], 一些标记得到的阳性克隆太多, 而且由于文库酶切位点的问题, 个别标记也筛选不到阳性克隆, 所以能用的标记不多. 但是可以利用这些连锁群特异的 BAC 克隆进行末端测序, 开发新的固定标记, 为今后的图谱整合及基因定位奠定基础.

致谢 感谢美国 Wisconsin University 的 Staub J. E. 教授提供部分 SCAR 标记序列及对连锁群特异克隆筛选工作提供建议.

参 考 文 献

- 1 Malepszy S, Niemirowicz-Szczyt K. Sex determination in cucumber (*Cucumis sativus*) as a model system for molecular biology. *Plant Sci*, 1991, 80: 39—47
- 2 Arumuganathan K, Earle ED. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Rep*, 1991, 9: 208—218
- 3 Kennard WC, Poetter K, Dijkhuizen A, et al. Linkages among RFLP, RAPD, isozyme, disease-resistance, and morphological markers in narrow and wide crosses of cucumber. *Theor Appl Genet*, 1994, 89: 42—48
- 4 Meglic V, Staub JE. Inheritance and linkage relationships of allozyme and morphological loci in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Theor Appl Genet*, 1996, 92: 865—872
- 5 Serquen FC, Bacher J, Staub JE. Mapping and QTL analysis of horticultural traits in a narrow cross in cucumber (*Cucumis sativus* L.) using random amplified polymorphic DNA makers. *Molecular Breeding*, 1997, 3(4): 257—268
- 6 Park YH, Sensoy S, Wye C, et al. A genetic map of cucumber composed of RAPDs, RFLPs, AFLPs, and loci conditioning resistance to papaya ringspot and zucchini yellow mosaic viruses. *Genome*, 2000, 43(6): 1003—1010
- 7 Bradeen JM, Staub JE, Wye C, et al. Towards an expanded and integrated linkage map of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Ge-*

- nome, 2001, 44: 111—119
- 8 Fazio G, Staub JE, Stevens MR. Genetic mapping and QTL analysis of horticultural traits in cucumber (*Cucumis sativus* L.) using recombinant inbred lines. *Theor Appl Genet*, 2003, 107: 864—874
 - 9 Pan JS, Wang G, Li XZ, et al. Construction of a genetic map with SRAP markers and localization of the gene responsible for the first-flower-node trait in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Progress In Natural Science*, 2005, 15(5): 407—413
 - 10 Frary A, Nesbitt TC, Grandillo S, et al. *fw2.2*: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science*, 2000, 289: 85—88
 - 11 Li XY, Qian Q, Fu ZM, et al. Control of tillering in rice. *Nature*, 2003, 422: 618—621
 - 12 Nam YW, Lee JR, Song KH, et al. Construction of two BAC libraries from cucumber (*Cucumis sativus* L.) and identification of clones linked to yield component quantitative trait loci. *Theor Appl Genet*, 2005, 111: 150—161
 - 13 Yuan XJ, Li XZ, Pan JS, et al. Genetic linkage map construction and location of QTLs for fruit-related traits in cucumber. *Plant Breeding*, 2007, doi: 10. 1111/j. 1439—0523. 2007. 01426. x
 - 14 Hoshi Y, Plader W, Malepszy S. New C-banding pattern for chromosome identification in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Breeding*, 1998, 117: 77—82
 - 15 Hoshi Y, Plader W, Malepszy S. Physical mapping of 45S rRNA gene loci in the cucumber (*Cucumis sativus* L.) using fluorescence *in situ* hybridization. *Caryologia*, 1999, 52: 49—57
 - 16 Chen JF, Staub JE, Jiang J. A reevaluation of karyotype in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Genet Resour Crop Evol*, 1998, 45: 301—305
 - 17 Chen JF, Staub JE, Adelberg JW, et al. Physical mapping of 45S rRNA genes in *Cucumis* species by fluorescence *in situ* hybridization. *Can J Bot*, 1999, 77: 389—393
 - 18 Koo DH, Hur Y, Jin DC, et al. Karyotype analysis of a Korean cucumber cultivar (*Cucumis sativus* L. cv. Winter Long) using C-banding and bicolor fluorescence *in situ* hybridization. *Mol Cells*, 2002, 13: 413—418
 - 19 Koo DH, Choi HW, Cho J, et al. A high-resolution karyotype of cucumber (*Cucumis sativus* L. 'Winter Long') revealed by C-banding, pachytene analysis, and RAPD-aided fluorescence *in situ* hybridization. *Genome*, 2005, 48: 534—540
 - 20 Zhang HB, Zhao X, Ding X, et al. Preparation of megabase-size DNA from plant nuclei. *Plant J*, 1995, 7: 175—184
 - 21 Luo M, Wing RA. An improved method for plant BAC library construction. *Methods Mol Biol*, 2003, 236: 3—20
 - 22 陈琪, 邓一文, 黄彬彬, 等. 抗稻瘟病水稻细菌人工染色体文库的构建与鉴定. *上海大学学报(自然科学版)*, 2007, 13(3): 325—330
 - 23 Sakata Y, Kubo N, Morishita M, et al. QTL analysis of powdery mildew resistance in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Theor Appl Genet*, 2006, 112(2): 243—250
 - 24 Kong Q, Xiang C, Yu Z. Development of EST-SSRs in *Cucumis sativus* from sequence database. *Molecular Ecology Notes*, 2006, 6: 1234—1236
 - 25 Fazio G, Staub JE, Chung SM. Development and characterization of PCR markers in cucumber. *J Amer Soc Hort Sci*, 2002, 127(4): 545—557
 - 26 Ota T, Amemiya CT. A nonradioactive method for improved restriction analysis and fingerprinting of large PI artificial chromosome clones. *Genet Anal*, 1996, 12: 173—178
 - 27 Shizuya H, Kouros-Mehr H. The development and applications of the bacterial artificial chromosome cloning system. *Keio J Med*, 2001, 50(1): 26—30
 - 28 Luo M, Wang Y, Frisch D, et al. Melon bacterial artificial chromosome (BAC) library construction using an improved method and identification of clones linked to the locus conferring resistance to melon Fusarium wilt (*Fom-2*). *Genome*, 2001, 44: 154—162