

# 芥菜型油菜品种四川黄籽的 BAC 文库构建与分析

罗松予<sup>1</sup> 罗美中<sup>2</sup> 刘忠松<sup>1</sup>

1. 湖南农业大学油料作物研究所, 长沙 410128; 2. 华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070

**摘要** 为促进黄籽油菜的基因组研究和利用, 构建了芥菜型油菜黄籽品种四川黄籽的高质量 BAC 文库。该文库由 82 944 个单克隆组成, 被保存在 216 块 384 孔板中。质粒酶切检测结果表明, 文库的平均插入片段大小约为 140 kb, 空载率约为 2.5%, 按照芥菜型油菜基因组 1 000 Mb 计算, 文库覆盖度约为油菜基因组的 11.6 倍。BAC 末端序列比对分析结果显示, 克隆被均匀比对到芥菜型油菜的 18 条染色体上, 并且无任何叶绿体、线粒体和细菌基因组 DNA 污染。

**关键词** 芥菜型油菜; 黄籽; 大片段 DNA 制备; BAC 文库; 质粒; 酶切

**中图分类号** S 565.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)05-0043-07

油菜是一类重要的经济作物, 可分为芥菜型油菜、甘蓝型油菜和白菜型油菜三大类型。现阶段我国面临着油菜种植面积持续下降<sup>[1]</sup>、菜籽油供不应求<sup>[2]</sup>等困境, 所以, 提高含油量是油菜育种的重要目标之一。

油菜籽的种皮有黄色、黑色和褐色<sup>[3]</sup>, 黑籽和褐籽油菜品种的含油量要低于黄籽品种<sup>[4]</sup>且黑籽和褐籽品种含油量变异幅度比黄籽品种大<sup>[5]</sup>。芥菜型油菜的黄籽品种起源于中国, 是人工驯化的结果<sup>[5]</sup>。研究发现, 芥菜型油菜的 A9 染色体携带有控制种皮颜色、油脂合成<sup>[6]</sup>、种子大小<sup>[7]</sup>及硫苷合成<sup>[8]</sup>等重要性状的基因。为了找出这些基因, 图位克隆是一种高效可行的途径。

细菌人工染色体 (bacterial artificial chromosome, BAC) 是一种能够克隆大片段 DNA 的载体系统, 具有操作相对简单、嵌合率较低、遗传稳定性好等许多优点<sup>[9]</sup>。BAC 文库在物理图谱构建<sup>[10]</sup>、基因组测序<sup>[11]</sup>、大片段 DNA 属间遗传转化<sup>[12]</sup>、功能基因图位克隆<sup>[13]</sup>和抗菌素基因簇筛选<sup>[14]</sup>等方面得到了大量的应用。近年来, BAC 文库不管是在动物、植物还是微生物的基因组研究中都发挥了重要作用<sup>[15-22]</sup>。随着 BAC 载体体系的不断发展, 适合于各种用途的 BAC 文库得以广泛应用<sup>[23]</sup>, 这将对基因组学及其相关领域的研究产生重要的影响。

本研究以芥菜型油菜地方品种四川黄籽为材料, 构建高质量的大片段 DNA BAC 文库, 以期对芥菜型油菜全基因组测序、克隆及进一步利用其研究控制芥菜型油菜重要农艺性状的关键基因提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

芥菜型油菜地方品种四川黄籽的高代自交系由湖南农业大学刘忠松课题组培育保存。种子萌发并经光照培养 30 d 后, 取嫩叶保存于一 80 °C 冰箱备用。本文库构建使用的载体为 pIndigoBAC536-S<sup>[22]</sup>。文库构建参照 Luo 等<sup>[22]</sup>建立的 BAC 文库构建方法。

### 1.2 高质量基因组 DNA 的制备

首先, 配制 1 L 的 NIB 缓冲液: 蔗糖 171.15 g, 氯化钾 7.45 g, 精胺 0.20 g, 亚精胺 1.02 g, 1 mol/L Tris-HCl 10 mL, 0.5 mol/L EDTA 20 mL。NIB 缓冲液预冷后, 配置 NIBT 缓冲液 [在 NIB 缓冲液中加入体积分数 1% 的 Triton (Triton X-100, Sigma)] 和 NIBM 缓冲液 [在 NIB 缓冲液中加入体积分数 0.15% 的  $\beta$ -巯基乙醇 (2-mercaptoethanol, Sigma)]。

称取嫩叶 50 g 至预冷好的大研钵中, 加入液氮

收稿日期: 2019-03-11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30971799)

罗松予, 硕士研究生. 研究方向: 油菜分子育种. E-mail: 269732369@qq.com

通信作者: 刘忠松, 博士, 教授. 研究方向: 油菜分子育种. E-mail: 1261503610@qq.com

冷却,用研棒研磨嫩叶至粉末状,倒入装有 600 mL NIBM 缓冲液的大烧瓶中,用玻璃棒轻轻搅拌 15 min,用 4 层纱布和 1 层 Miracloth(475855-1R, Milipore, Germany)进行第 1 次过滤,随后用 1 层 Miracloth 进行第 2 次过滤,并加入 150 mL 配置好的 NIBT 缓冲液,继续轻轻搅拌 15 min。

将滤液分装至 16 个 50 mL 离心管中,4 ℃、4 800 r/min 离心 15 min。完成第 1 次离心后,弃上清,加少量 NIBTM 缓冲液重悬沉淀,两两合一,加入 40 mL NIBTM 缓冲液继续离心,重复此步骤至剩下最后 1 管,弃上清,加入少量预留的 NIB 缓冲液重悬沉淀,并与等体积的 1% 低熔点琼脂糖凝胶(Agrose L.M.P, Biosharp)在 45 ℃ 条件下混匀,用 1 mL 移液枪将胶液注入制胶模具中,待其凝固后即成为 DNA plug(包埋块)。将制备好的包埋块装入加有蛋白酶 K 溶液的 50 mL 离心管中,55 ℃ 消化 48 h,期间更换 1 次蛋白酶 K 溶液。

用  $T_{10}E_{10}$  (10 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA) 和 TE (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA) 分别对包埋块进行 2 次清洗,每次清洗时间为 1 h,在  $T_{10}E_{10}$  清洗时需加入 1 mmol/L PMSF(苯甲基磺酰氟),最后保存于 4 ℃ 备用。

### 1.3 预酶切及大量酶切(DNA 片段第 1 次筛选)

将包埋块装入 50 mL 离心管中,并加入 ddH<sub>2</sub>O 冰上振荡洗涤 1 h。配制 8 个酶切体系的 mix[80 μL 亚精胺(40 mmol/L)、80 μL 10×Buffer、200 μL ddH<sub>2</sub>O],并分装至 8 个 1.5 mL 的离心管中(45 μL/管)。每管加入 1/2 块(约 50 μL)切碎的包埋块,用手指轻弹数次使其与酶切体系充分混匀,放于冰上静置 40 min。在每个体系中加入不同浓度的酶(设置酶切浓度梯度:HindⅢ 酶的原始浓度为 10 U/μL,用 1×Buffer 进行稀释),迅速混匀,在冰上静置 90 min,随后转移至 37 ℃ 水浴锅进行 13 min 酶切。酶切后加入 10 μL 0.5 mol/L 的 EDTA 溶液,置于冰上 10 min 终止酶切反应。对酶切产物进行脉冲场电泳检测,脉冲场电泳参数为:0.5×TBE,14 ℃,1~50 s,120°,16 h。

根据预酶切结果,选择最合适的酶稀释浓度进行大量酶切。取 8 块包埋块,配置 16 份最适酶切体系,酶切完成后全部转入凝胶板的一个中央长孔中,并在两旁胶孔中点 λ ladder PFG 分子质量标记(NEB),进行脉冲场电泳。操作步骤和脉冲场电泳

参数同预酶切。

### 1.4 DNA 片段的第 2 次筛选

脉冲场电泳完成后取出胶块,垂直切下两侧包括分子质量标记和样品胶孔边缘各 0.5 cm 的 2 个胶块,用溴化乙锭(EB)染色 20~30 min,剩余的胶块放于 4 ℃ 保存。用荧光标尺标记分子质量标记与胶条对应的位置,在未用 EB 染色的大胶块上切下对应位置大小 100~300 kb 的胶条,并均分为上下 2 块(标记为 a、b, a<b)。

将 2 块胶条并排放入制胶模具中,倒入用 TBE 配置好的琼脂糖凝胶。待其凝固后,再次进行脉冲场电泳。脉冲场电泳参数为:0.5×TBE,14 ℃,1~4 s,120°,18 h。

### 1.5 胶条回收及 DNA 电洗脱回收

脉冲场电泳完成后,按照第 1 次筛选方法回收胶条,并将 a、b 胶块平均切成上下 2 块,分别命名为 a1、a2、b1、b2,4 块胶条宽度均为 0.5 cm 左右,放入装有 0.5×TAE 的 50 mL 离心管中,在 4 ℃ 条件下处理 3 h。

从 TAE 中取出处理好的胶条,将每块胶条切成 2 段,其中一段装入准备好的透析袋中(另一段放回到 0.5×TAE 中,4 ℃ 保存备用),用夹子夹好,并加入 150 μL TAE 溶液,放入电泳槽中进行电泳。电泳条件为:U=125 V, I=500 mA, P=300 W, 4 ℃, 3.5 h。电泳完成后反向电泳 2 min,以防 DNA 粘在透析袋上。将透析袋中的电泳产物(DNA)吸出至离心管保存,并检测 DNA 浓度。

### 1.6 连接与脱盐

1) 连接。取适量回收的 DNA 与预先制备好的 BAC 载体进行混合,轻轻拨动管壁数次以使两者充分混合,65 ℃ 保温 15 min,室温放置 5 min,随后分别加入 T4 连接酶 buffer 和 T4 连接酶。混匀后置于 16 ℃ 循环水浴锅中连接 16~20 h。完成连接后,取出连接产物并置于 65 ℃ 干浴锅中保温 15 min,终止连接。

2) 脱盐胶的制备。1% 琼脂糖、2% 葡萄糖、高温溶解并混合后,用移液枪吸入 1.5 mL 的离心管中,接近凝固时插入另一支 1.5 mL 离心管,待完全凝固后拔出插入的离心管,使其形成 1 个小窝,放置于冰上备用。

3) 脱盐。将终止反应的连接产物吸入制备好的脱盐胶孔中,冰上静置 1 h。处理完成后吸出产物

并于4℃保存备用。

## 1.7 转化

先进行选预转化,吸取2 μL连接产物和18 μL DH10B(Invitrogen)商业感受态细胞至电转化杯中,混匀后用325 V电压进行电激,随后转移至含500 μL商业感受态细胞自带的SOC培养基的15 mL离心管中,置于37℃摇床中复苏55 min。复苏完成后置于冰上,涂布在LB固体培养基上(固体培养基中加入12.5 μg/mL CM(Chloramphenicol),100 μg/mL IPTG(isopropyl β-D-thiogalactoside),80 μg/mL X-gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside),37℃过夜培养。

观察蓝斑和白斑克隆数,如果蓝斑不多而白斑数量达到1 000个/500 μL以上,即挑取一定数量的菌落,接种到装有2 mL LB培养基的离心管中,37℃、250 r/min摇床过夜培养,16 h后待菌液浑浊进行集菌,采用碱裂解法提取质粒。提取的质粒加35 μL ddH<sub>2</sub>O溶解并用I-Sce I酶切检测插入片段。每个酶切体系为:1.5 μL Buffer(10×),0.1 μL I-Sce I(10 U/μL),8.4 μL ddH<sub>2</sub>O,5 μL DNA,混匀后放入37℃水浴锅中酶切3.5 h。最后进行脉冲场电泳,脉冲场电泳参数为:0.5×TBE,14℃,5~15 s,120°,16 h。如检测结果符合预期,则可进行大量转化。

## 1.8 克隆的挑取、文库质量检测及末端序列检测

大量转化后,根据转化效率选择合适的转化产物体积进行涂皿(以每个直径16 cm的大皿含1 000个单菌落为宜),待单菌落长好于4℃过夜,使蓝斑充分显蓝。用牙签挑取白色单斑至装有冰冻培养基的384孔板中,孔板标记好后放于37℃培养过夜。翌日逐一检查是否漏挑或者污染。

随机挑选部分克隆接菌培养,提取质粒并酶切进行脉冲场电泳,根据结果统计文库空载率和插入片段的平均大小,按照芥菜型油菜基因组1 000 Mb计算文库的覆盖度。

随机提取克隆质粒,进行末端测序,将测序结果用Blastn和BWA软件与芥菜型油菜基因组序列<sup>[23]</sup>(NCBI Assembly数据库检索号:GCA\_001687265.1)进行比对,检查克隆在芥菜型油菜基因组染色体上的分布情况,同时用Blastn搜索NCBI nr数据库检测是否有叶绿体、线粒体和细菌DNA污染。

## 1.9 文库复制及混合池构建

将培养好的384孔板贴好标签并用复制叉进行复制,复制2套(1套备用,1套构建混合池),每复制1次用75%和95%的乙醇分别处理2次,再进行下一块板的复制,复制好后于37℃培养箱过夜,培养好后依次检查,于-80℃冰箱保存。

复制的第2套用作混合池构建。将每块384孔板中菌液混合到一起,保存于50 mL离心管中,贴上标签,并吸取4 mL至2个2 mL离心管中培养,用作混合池质粒提取。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因组DNA的提取

高质量的基因组DNA是构建大片段DNA BAC文库的基本保证。为获得无叶绿体和线粒体DNA污染的高质量基因组DNA,采用低熔点琼脂糖包埋细胞核的方法。将通过4次离心收集得到的细胞核沉淀溶于1.5 mL NIB缓冲液中,然后加入等体积的低熔点琼脂糖凝胶,使细胞核均匀地包裹在内,经磨具成型后共获得30块包埋块,随后将包埋块置于50 mL离心管中,加入蛋白酶K溶液50℃处理24 h,并更换溶液重复1次,去除蛋白质,最终得到芥菜型油菜品种四川黄籽的基因组DNA。脉冲电泳检测表明所提DNA质量和DNA浓度达到构建BAC文库的要求。

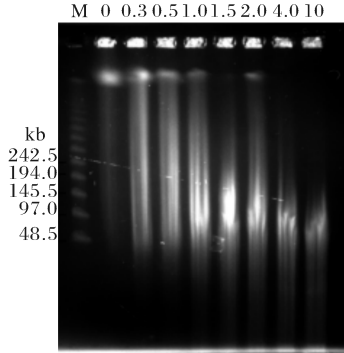
### 2.2 基因组DNA预酶切

用HindIII作为基因组DNA部分酶解的限制性内切酶。通过固定酶解时间、改变酶浓度的方法对部分酶解的条件进行了摸索。试验设置的酶切浓度梯度为:0、0.3、0.5、1.0、1.5、2.0、4.0、10 U/μL,酶切时间为13 min。图1为部分酶解检测结果,0 U/μL泳道是对照,没有加入内切酶,DNA紧凑不拖带,说明提取的DNA质量好,没有降解,10 U/μL泳道的DNA则已完全酶解,酶浓度为0.5 U/μL泳道的DNA酶解较为合适,在120~300 kb处浓度较高,有利于大片段DNA回收。

### 2.3 大片段DNA第1次筛选

根据预酶切结果,选择酶切浓度为0.5 U/μL,酶切时间13 min进行大量酶切。将8块包埋块清洗后,每块分成2份,放入16个酶切体系中进行酶解反应,然后通过脉冲电泳进行分离。图2为包含分子质量标记和样品边缘各约0.5 cm的电泳结果。

从图 2 可以看出,DNA 酶解合适,且浓度较高。选择 120~250 kb 大小的片段,即荧光标记尺 5.0~7.0 cm 处对应的部分,在未染色胶块上切下对应位置的胶条,并上下一分为二,下半部分命名为 a,上半部分命名为 b。



M 为  $\lambda$  ladder PFG 分子质量标记(NEB),每半块包埋块分别用 0、0.3、0.5、1.0、1.5、2.0、4.0、10 U/ $\mu$ L *Hind* III 于 37 °C 酶解 13 min。M is  $\lambda$  ladder PFG marker (NEB).Each half-plug was digested with 0、0.3、0.5、1.0、1.5、2.0、4.0、10 U/ $\mu$ L *Hind* III, respectively, at 37 °C for 13 min.

图 1 芥菜型油菜品种四川黄籽基因组 DNA 部分酶切

Fig.1 Partial digestions of genomic DNA from *Brassica juncea* variety Sichuan Yellow Seed

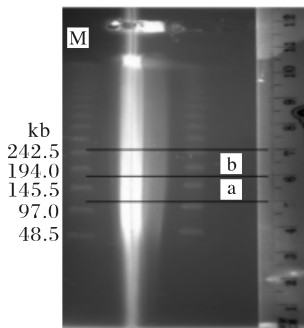


图 2 芥菜型油菜四川黄籽品种基因组大片段 DNA 第 1 次筛选

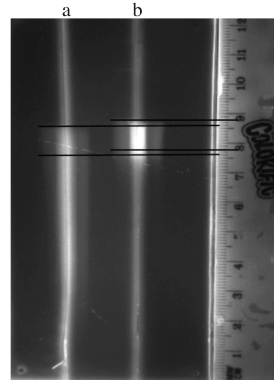
Fig.2 The first selection of large size DNA fragments of *Brassica juncea* variety Sichuan Yellow Seed genome

2.4 大片段 DNA 第 2 次筛选及 DNA 回收

为去除夹带的小片段 DNA,对回收的 a、b 2 块胶条 DNA 进行了第 2 次筛选。图 3 左侧为 a,右侧为 b,其中 a 片段选取 7.6~8.6 cm 区段,b 片段选取 7.8~8.8 cm 区段,并将切下的胶条再次平均分成 a1、a2 和 b1、b2。

a1、a2、b1、b2 胶条电洗脱回收后分别得到 175、160、165、165  $\mu$ L DNA。图 4 为电泳检测各回收

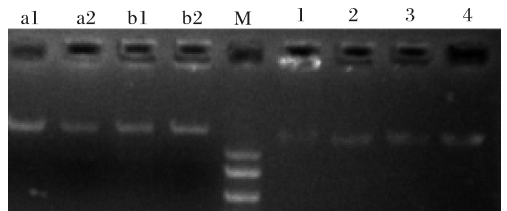
DNA 的浓度,a1、a2、b1、b2 各片段的洗脱产物浓度均大于 1 ng/ $\mu$ L,可用于下一步试验。



左侧为第 1 次筛选中 a 胶条分离结果,右侧为第 1 次筛选中 b 胶条分离结果。The left strip is the gel fraction a from the first screening,the right strip is the gel fraction b from the first screening.

图 3 芥菜型油菜品种四川黄籽基因组大片段 DNA 第 2 次筛选

Fig.3 The second selection of large size fragments of *Brassica juncea* variety Sichuan Yellow Seed genome



M 为 Trans 2 000 分子质量标记,M 左边分别为 a1、a2、b1、b2 DNA 浓度检测结果,M 右边分别为 1、2、3、4 ng/ $\mu$ L 对照。M is Trans 2 000 marker.The left side of M is the concentration detection results of a1、a2、b1 and b2, respectively.The right side of M is the concentration standards of 1,2,3 and 4 ng/ $\mu$ L, respectively.

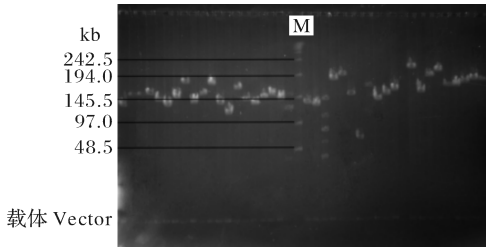
图 4 回收 DNA 的浓度检测

Fig.4 Concentration measurement of the recovered DNA fragments

2.5 连接、脱盐和预转化

回收的大片段 DNA 与载体在 16 °C 水浴连接 17 h 后,取出进行脱盐,然后进行电激转化,并在 37 °C 复苏 55 min;最后将复苏产物涂布在固体培养基上培养,统计每个预转化总克隆数,结果如下:a1 共 1 380 个,a2 共 1 315 个,b1 共 1 030 个,b2 共 810 个。4 个转化中蓝斑数量均较少,a1 转化效率最高,依次是 a2、b1 和 b2,符合基因组 DNA 片段越大、转化效率越低的规律。从每个转化产物中随机挑拣 10 个菌落进行插入片段检测,结果见图 5。从

图 5 可看出,插入片段均较大,其中 a1 和 a2 片段大小较为合适,条带均匀整齐且没有空载,故选择 a1 和 a2 进行大量转化。



M 为 λ ladder PFG 分子质量标记 (NEB); 载体为 pIndigoBAC536-S 载体带。下同。M is λ ladder PFG marker (NEB); Vector is pIndigoBAC536-S band. The same as follows.

图 5 预转化随机 BAC 克隆插入片段检测

Fig.5 The insert size detection of random BAC clones from test transformation

### 2.6 文库构建及质量检测

1) 文库的构建。完成对连接产物 a1 和 a2 的大量转化,统计部分转化的白斑数量,其中连接产物 a1 白斑数量约为 1 300 个,连接产物 a2 白斑数量为 1 240 个。将单菌落挑拣至装有冰冻培养基的 384 孔板中,共挑取  $216 \times 384 = 82\ 944$  个克隆,置于  $-80\ ^\circ\text{C}$  冰箱中保存。

2) 文库插入片段大小及空载检测。从所构建的芥菜型油菜品种四川黄籽文库中随机挑取 320 个克隆进行插入片段大小检测,共检测出 8 个空载,空载率约为 2.5%,插入片段平均大小为 140 kb。按照芥菜型油菜基因组 1 000 Mb 计算,本文库覆盖度约为油菜基因组的 11.6 倍。图 6 为部分克隆的检测结果。图 7 为 320 个克隆的插入片段分布图,可以看出,大部分插入片段聚集在 131~150 kb。

3) BAC 末端序列分析。为进一步检测所构建文库的质量,随机挑取 310 个克隆进行单末端测序,成功获得 289 个序列,其中 75 个序列长度  $\geq 1\ 000$  bp,196 个在 500~1 000 bp,只有 18 个  $< 500$  bp,序列平均长度为 847 bp,最短 234 bp,最长 1 162 bp。用 Blastn 对序列进行搜索,未检测到叶绿体、线粒体和细菌 DNA 的污染;与芥菜型油菜基因组序列进行比对后发现,其中 190 个末端比对在芥菜型油菜基因组序列的 18 条染色体上(图 8),94 个比对在 scaffold 序列上,5 个未比对上。未比对上的序列可能是由于品种间存在序列差异或者芥菜型油菜参考基因组序列不完整所致。

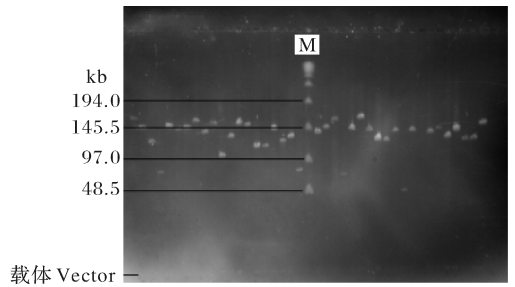


图 6 芥菜型油菜品种四川黄籽 BAC 文库随机克隆插入片段检测

Fig.6 The insert size detection of random BAC clones from the BAC library of *Brassica juncea* variety Sichuan Yellow Seed

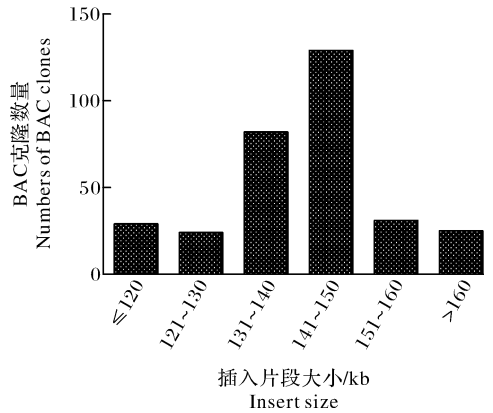
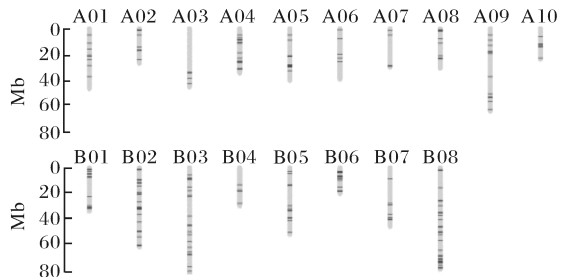


图 7 芥菜型油菜品种四川黄籽 BAC 文库插入片段大小的分布

Fig.7 Insert size distribution of *Brassica juncea* variety Sichuan Yellow Seed BAC library



上半部分为芥菜型油菜 A 基因组 10 条染色体,下半部分为芥菜型油菜 B 基因组 8 条染色体。The upper part is the 10 chromosomes of *Brassica juncea* A genome. The lower part is the 8 chromosomes of *Brassica juncea* B genome.

图 8 BAC 末端序列在芥菜型油菜基因组上的分布图  
Fig.8 BAC end sequence distribution on the *Brassica juncea* genome

## 3 讨论

构建 BAC 文库最重要的步骤是高质量 DNA

的提取,本研究采用包埋法将大片段 DNA 包裹在低熔点琼脂糖凝胶中,起到保护 DNA 的作用,使其不容易断裂。植物的基因组 DNA 提取相对于细菌和动物 DNA 的提取更加复杂。植物基因组 DNA 提取的第 1 步是采用液氮研磨嫩叶将细胞壁破除,获得细胞核,并使用 Triton-100 选择性破除叶绿体和线粒体膜,使叶绿体和线粒体基因组 DNA 提前释放到溶液中,从而在离心回收细胞核的过程中被去除。另外,芥菜型油菜中含有大量酚类物质,需要在 NIB 缓冲液中添加还原试剂 PVP40 和  $\beta$ -巯基乙醇,达到防止 DNA 氧化的作用。本研究通过这些处理,得到了高质量的芥菜型油菜品种四川黄籽基因组 DNA。

大片段 DNA 的制备需要采用部分酶解的方法。预酶切是为了摸索部分酶解所需的最适酶浓度和时间,最佳的条件应该是产生的条带具有连续性、分布均匀且在 120~300 kb 相对浓度较高,这样可以保证酶切片段大小的全面性、片段的均一性以及 DNA 浓度稳定性。在大量酶切操作中,所有操作用具和操作步骤应与预酶切时的条件保持一致,特别是在酶浓度稀释时要按照预酶切稀释顺序进行,这样就可以获得最佳的酶切效果,得到最适大小的酶切片段。

黄籽油菜品种相比黑籽油菜品种具有更多的优势。本研究为四川黄籽油菜品种构建了一个片段长,无叶绿体、线粒体和细菌 DNA 污染,基因组覆盖度高和克隆随机性强的高质量 BAC 文库,为下一步四川黄籽油菜品种的基因克隆和基因组研究奠定基础。

## 参 考 文 献

- [1] 刘成,黄杰,冷博峰,等.我国油菜产业现状、发展困境及建议[J].中国农业大学学报,2017,22(12):203-210.
- [2] 王舒娟.我国油菜生产效率的 DEA 分析:基于生物柴油发展的背景[J].粮食经济研究,2016,2(1):35-42.
- [3] 陈翠萍,肖麓,赵志刚,等.黄籽油菜种皮颜色研究进展[J].河南农业科学,2015,44(9):1-6.
- [4] 刘忠松,官春云,严明理,等.油菜黄籽形成的分子机制研究[J].作物研究,2015,29(6):694-701.
- [5] 刘后利.对油菜品质改良的看法[J].作物杂志,1992(3):6-7.
- [6] ZHAO J, HUANG J X, CHEN F, et al. Molecular mapping of *Arabidopsis thaliana* lipid-related orthologous genes in *Brassica napus* [J]. Theoretical and applied genetics, 2012, 124(2): 407-421.
- [7] YANG P, SHU C, CHEN L, et al. Identification of a major QTL for silique length and seed weight in oilseed rape (*Brassica napus* L.) [J]. Theoretical and applied genetics, 2012, 125(2):285-296.
- [8] FENG J, LONG Y, SHI L, et al. Characterization of metabolite quantitative trait loci and metabolic networks that control glucosinolate concentration in the seeds and leaves of *Brassica napus* [J]. New phytologist, 2012, 193(1):96-108.
- [9] 李海权,刁现民.基因组细菌人工染色体文库(BAC)的构建及应用[J].生物技术通报,2005(1):6-11.
- [10] PAN Y L, WANG X M, LIU L, et al. Whole genome mapping with feature sets from high-throughput sequencing data [J/OL]. PLoS One, 2016, 11(9): e0161583 [2019-03-11]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161583>.
- [11] ZHANG J, CHEN L L, XING F, et al. Extensive sequence divergence between the reference genomes of two elite indica rice varieties Zhenshan 97 and Minghui 63 [J/OL]. PNAS, 2016, 113(35): 5163-5171 [2019-03-11]. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1611012113>.
- [12] 刘芳瑛,陆赢,王卓,等.芥菜型油菜 A9 染色体 BAC 物理图谱构建及比较基因组分析[J].作物研究,2016,30(4):347-352;481.
- [13] WANG Y F, ZENG H Y, ZOU X, et al. Transformation of rice with large maize genomic DNA fragments containing high content repetitive sequences [J]. Plant cell reports, 2015, 34(6): 1049-1061.
- [14] 任斐.细菌人工染色体基因组文库的构建及应用[J].河南科技学院学报(自然科学版),2010,38(1):44-48.
- [15] 杨学.放线菌和矮牵牛 BAC 文库的构建及相关基因的筛选 [D].武汉:华中农业大学,2018.
- [16] 伍艳芳,江香梅,徐海宁,等.樟树细菌人工染色体(BAC)文库的构建及质量检测[J].分子植物育种,2016,14(9):2481-2487.
- [17] 王照,邵奎东,祁琪,等.鼠疫菌 EV76 株 BAC 基因组文库的构建[J].中国地方病防治杂志,2019,34(1):17-18.
- [18] 武亚磊.雷蒙德氏棉、达尔文氏棉 BAC 文库的构建及特异单克隆的筛选 [D].郑州:郑州大学,2016.
- [19] 徐长江.苦芥 BAC 文库的构建及 BAC 末端序列分析 [D].贵阳:贵州师范大学,2016.
- [20] 王起明,孙焯超,厉申捷,等.白眉长臂猿基因组 BAC 文库的构建[J].绍兴文理学院学报(自然科学版),2015,35(4):13-15;44.
- [21] SHI X, ZENG H Y, XUE Y D, et al. A pair of new BAC and B1-BAC vectors that facilitate BAC/BIBAC library construction and intact large genomic DNA insert exchange [J/OL]. Plant methods, 2011, 7(1): 33 [2019-03-11]. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-7-33>.
- [22] LUO M Z, WING R A. An improved method for plant BAC library construction [J]. Methods in molecular biology, 2003, 236:3-20.

- [23] YANG J H, LIU D Y, WANG X W, et al. The genome sequence of allopolyploid *Brassica juncea* and analysis of differential homeolog gene expression influencing selection[J]. *Nature genetics*, 2016, 48(10): 1225-1232.

## Construction and characterization of BAC library of oilseed *Brassica juncea* variety Sichuan Yellow Seed

LUO Songyu<sup>1</sup> LUO Meizhong<sup>2</sup> LIU Zhongsong<sup>1</sup>

1. *Oil Crops Research Institute, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;*

2. *College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

**Abstract** A high-quality BAC library of the oilseed *Brassica juncea* variety Sichuan Yellow Seed was constructed to accelerate the study and utilization of the yellow-seed rapeseed genome. The library contains 82 944 clones and is stored in 216×384 microtiter plates. The results of restriction enzyme digestion of plasmid showed that the average insert size of the library was about 140 kb and the empty-vector rate was about 2.5%. Based on the *Brassica juncea* genome size of 1 000 Mb, the library covers about 11.6× genomes. The results of Blast analysis of the BAC end sequences showed that the clones were evenly mapped onto the 18 chromosomes of the *Brassica juncea* genome. No chloroplast, mitochondria and bacterium genome DNA contamination was found.

**Keywords** *Brassica juncea*; Yellow Seed; preparing large-size DNA fragments; BAC; plasmid; enzyme digestion

(责任编辑: 张志钰)