

棉花晋 A 细胞质雄性不育系及其保持系 线粒体基因组文库的构建

黄晋玲^{1,2}, 胡建斌^{1,2}, 张锐¹, 郭三堆¹

(¹中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081; ²山西农业大学农学院, 山西太谷 030801)

摘要: 【目的】构建棉花晋 A 细胞质雄性不育系及其保持系的线粒体 BAC 文库, 为研究棉花线粒体基因组结构以及棉花细胞质雄性不育的形成机理提供基础。【方法】在借鉴其它作物的线粒体基因组 BAC 文库构建方法的基础上, 对棉花线粒体 DNA 的提取及其 BAC 文库的构建进行探索和优化, 构建了棉花晋 A 细胞质雄性不育系及其保持系的线粒体 BAC 文库, 并采用同源克隆的方法克隆棉花线粒体的功能基因。【结果】构建的不育系和保持系的线粒体基因组文库分别包括 2 600 个克隆, 插入 DNA 片段大小在 10.3 kb 和 37.5 kb 之间, 平均分别为 22.29 kb 和 21.36 kb。重组子的覆盖率分别达到棉花线粒体基因组的 79 倍和 76 倍。获得了 3 个棉花线粒体功能基因序列, 通过比较, 证明晋 A 不育系与其保持系的这 3 个基因序列无差异; 以这 3 个基因为探针筛选文库, 均获得阳性克隆。【结论】分别构建了棉花晋 A 细胞质雄性不育系及其保持系线粒体基因组的 BAC 文库。获得了晋 A 不育系与其保持系的 *orfB*, *cox I* 和 *nad4L* 3 个基因的全序列, 通过比较, 证明晋 A 不育系与其保持系在 *orfB*, *cox I* 和 *nad4L* 基因全序列上无差异。

关键词: 棉花; 细胞质雄性不育; 线粒体基因组; 细菌人工染色体 (BAC) 文库

BAC Library Construction for Mitochondrial Genome of JA Cytoplasmic Male Sterile and Maintainer Lines in Cotton

HUANG Jin-ling^{1,2}, HU Jian-bin^{1,2}, ZHANG Rui¹, GUO San-dui¹

(¹Biotechnology Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; ²College of Agronomy, Shanxi Agricultural University, Taihu 030801, Shanxi)

Abstract: 【Objective】The experiment was carried out to construct mitochondrial genome BAC libraries of cotton JA cytoplasmic male sterile (JA CMS) and its maintainer lines (JB). 【Method】Based on the methods used for constructing mitochondrial genome libraries of other crops, a high-efficient technology system of BAC library construction was established. This system consists of isolation of mitochondrion, preparation of high-molecular weight (HMW) mtDNA, partial digestion of megabase DNA, selection of digested fragment and highly-efficient transformation. A set of primers were designed according to the conserved sequence of the *orfB*, *cox I* and *nad4L* coding region in other plants, and subsequently used to amplify these mitochondrial genes in cotton. The PCR products were cloned into vectors and further sequenced in both direction. 【Result】Two mitochondrial genome BAC libraries were constructed using cotton JA CMS and JB. Each library contains about 2 600 clones. The average insert size was 22.29 kb for JA CMS library and 21.36 kb for JB, ranging from 10.3 kb to 37.5 kb. The two libraries covered cotton mitochondrial genome by 79 and 76 folds, respectively. The genes *orfB*, *cox I* and *nad4L* were amplified using mitochondrial DNA as template, and their sequences were no different between JA CMS and JB. The coding sequences of mitochondrial genes *orfB*, *cox I* and *nad4L* cloned were used as probes to screen the two libraries, and the positive clones were identified by colony *in situ* hybridization. 【Conclusion】Two mitochondrial genome BAC libraries of cotton JA CMS and JB were constructed respectively. The obtained full-length DNA sequence of *orfB*, *cox I* and *nad4L* from JA CMS and JB showed no difference.

收稿日期: 2007-04-16; 接受日期: 2007-05-25

基金项目: 国家“863”项目 (AA211050)

作者简介: 黄晋玲 (1965-), 女, 山东邹城人, 副教授, 博士。研究方向为作物遗传育种。Tel: 0354-6288445; E-mail: hjl2003ie@yahoo.com.cn。
通讯作者郭三堆 (1950-), 男, 山西晋城人, 研究员。研究方向为棉花分子设计育种。Tel: 010-62136406; E-mail: gsdui@mail.caas.net.cn

Key words: Cotton; Cytoplasmic male sterility; Mitochondrial genome; BAC library

0 引言

【研究意义】细胞质雄性不育 (cytoplasmic male sterility, CMS) 是植物不能产生有功能花粉的母性遗传现象, 是植物杂种优势利用的基础。构建线粒体基因组文库, 是克隆线粒体基因、研究线粒体基因组结构和 CMS 形成机理的重要基础工作。【前人研究进展】人们在至少 150 种不同植物中发现了 CMS, 并且在玉米^[1,2]、向日葵^[3]、水稻^[4-6]、矮牵牛^[7-9]、高粱^[10]、小麦^[11]、萝卜^[12]和菜豆^[13]中对其进行了深入的研究。在至今所研究的植物中, 细胞质雄性不育性状是与线粒体 DNA 的重组相关的^[14-17], 重组产生的嵌合基因干扰了花粉的正常发育。高等植物的线粒体基因组十分复杂, 无论是结构上的不均一性、重复序列、高频率重组, 还是在功能行使的过程中出现的蛋白质翻译的起始、RNA 编辑、ATP 的产生、自身的进化形成等, 其中都有许多不明机理等待人们去探讨。植物线粒体基因组结构和功能的揭示将无疑会促进与之相关的细胞质雄性不育现象的解释。【本研究切入点】棉花是世界上最重要的经济作物之一, 构建棉花线粒体基因组文库是一项费时、费力的工程。原因在于: 1、线粒体是细胞质中的细胞器, 通过分离获得大量的完整的线粒体 DNA 是一件非常困难的事情; 2、高等植物线粒体基因组有其结构的特殊性; 3、棉花富含棉酚、单宁等次生代谢物质, 没有现成的、可以利用的棉花线粒体 DNA 的提取程序。【拟解决的关键问题】因此, 借鉴玉米^[18]、水稻^[19]的线粒体基因组 BAC 文库的构建方法, 笔者对棉花线粒体的提取、DNA 插入片段的制备、连接转化等过程进行探索和优化, 以期构建棉花晋 A 细胞质雄性不育系及其保持系的线粒体 BAC 文库, 为研究棉花线粒体基因的结构以及棉花 CMS 的形成机理提供基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

棉花晋 A 细胞质雄性不育系及其保持系。

1.2 方法

1.2.1 高分子量线粒体 DNA 的制备 将棉花晋 A 细胞质雄性不育系及其保持系的种子经浓硫酸脱绒后, 种在灭菌的营养土中, 30℃ 黑暗培养 6~10 d, 收取黄化苗, 采用差速离心和蔗糖密度梯度离心获得高纯度

的线粒体, 具体操作方法参见黄晋玲等^[20]、Zhang^[21]的方法。

向线粒体悬浮液中加入等体积的 1.5% 低熔点琼脂糖凝胶, 轻柔混匀后, 迅速将混合液加到冰上预冷的 plug mold 中。将 plug mold 于 4℃ 冰箱中冷却, 以充分凝固; 胶块凝固后转移到裂解液中, 加入蛋白酶 K, 终浓度为 1 mg·ml⁻¹, 于 42℃ 轻柔振荡温浴 36~48 h, 中间换一次裂解液; 去除裂解液, 加入一定量的含有 PMSF (终浓度 1 mmol·L⁻¹) 的 T₁₀E₁₀ 中, 在冰上轻柔振荡 2 h, 中间换一次溶液。然后再转入 T₁₀E₁ 中冰上轻柔振荡清洗 4 次 (1 h/次), 以除去 PMSF 和 EDTA。胶块可直接保存在 4℃, 以备酶切和克隆。

1.2.2 胶块质量检测 取 1/2 胶块, 以一定量的 λDNA 作为标准进行脉冲场电泳检测。采用 0.5×TBE 为电极缓冲液, 电泳条件为: 0.5×TBE 配制的 1% 的低熔点琼脂糖凝胶; 温度 11℃; 起始脉冲 15 s; 终止脉冲 15 s; 脉冲时间 14 h; 电压 6 V/cm; 角度 120°; 泵 70。电泳结束后, 用终浓度为 0.5 μg·ml⁻¹ 的 EB 水溶液摇染 30 min, 水洗 30 min; 凝胶成像系统进行图象捕捉, 检测胶块质量, 并估算胶块中的 DNA 浓度。

1.2.3 部分酶切最佳酶用量的确定和酶切 DNA 片段的选择 将每半个胶块切成小块, 加入酶切缓冲液和不同的酶量的 HindIII, 在 37℃ 水浴锅中温浴 30 min, 然后加入 0.5 mol·L⁻¹ EDTA (pH 8.0) 终止酶反应。将酶切后的小胶块进行脉冲电泳确定部分酶切最佳酶用量, 在此酶浓度下, 绝大部分 DNA 片段应集中在 20~40 kb 之间。

采用最佳酶切量对 DNA 胶块进行酶切, 酶切后的 DNA 进行脉冲电泳分离 20~40 kb 之间的大片段 DNA。脉冲电泳条件为: 1% 低熔点琼脂糖凝胶; 11℃; 起始脉冲 15 s; 终止脉冲 15 s; 脉冲时间 14 h; 电压 6 V/cm; 角度 120; 泵 70。

1.2.4 连接、转化及菌落保存 将外源 DNA 与载体 pIndigoBAC-5 Vector (Hind III Cloning-Ready) 按摩尔比 1 : 0.5、1 : 1、1 : 2、1 : 4、1 : 8 混合, 总 DNA 量约 0.1~0.2 μg, 加连接缓冲液和一个单位的 T₄DNA 连接酶 (NEB), 整个反应体积为 50 μl, 16℃ 反应 12 h。

将 2 μl 连接产物与 20 μl ElectroMax DH10B™ 感受态细胞混匀, 进行电击转化。系统参数设置为: 2.5 kV, 200Ω, 25 μF。

电击结束后,立即加入 1 ml SOC 培养基,于 37℃ 225 r/min 下复苏 1 h,取适量复苏液涂布于 LB 固体选择培养基 (X/I/C) 表面,于 37℃ 培养。放在室温至兰色菌落清楚出现,统计转化效率与重组率。

用无菌牙签将白色菌落逐个点入小孔内,37℃ 静置培养过夜,然后放置于 -70℃ 保存。每个文库保存 2 600 个菌落。

1.3 基因文库评价

随机挑取 90 个重组克隆,划平板培养,挑单菌落于 LB+CMR 液体选择培养基中培养过夜。提取质粒 DNA,经限制性内切酶 *Not* I 酶切后进行脉冲电泳检测,以检测插入片段的大小。

随机选择 5 个克隆分别接种于 50 ml 含氯霉素的 LB 培养基,于 37℃、250 r/min 摇动过夜培养,连续培养 5 代,提取 0、20、40、60、80、100 代的质粒 DNA,用 *Hind*III 酶切,1% 琼脂糖凝胶检测插入片段稳定性。

1.4 棉花线粒体功能基因的克隆和杂交探针的制备

1.4.1 PCR 扩增 至今为止,未见有棉花线粒体功能基因的序列报道,因此从 Genbank 上搜寻其它植物的线粒体功能基因的序列,根据不同植物的这些同源基因的保守序列设计引物,进行 PCR 扩增。用于扩增的引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primers sequence of PCR

基因片段 Gene fragment	引物序列 Primer sequence	扩增片段大小 Fragment amplified (bp)
<i>orfB</i>	F: 5'-ATGCCTCAACTGGATAAATT-3' R: 5'-TTAAAAACCGATGCTTCCTT-3'	471
<i>cox I</i>	F: 5'-CTCCTGTGATGCAGCGG-3' R: 5'-AACAAGCTTCTACGATAG-3'	1576
<i>atpA</i>	F: 5'-TCAGTTGGAGATGGG-3' R: 5'-AGAAGCCGTTGACAGC-3'	1264
<i>nad4L</i>	F: 5'-CTCTTACATTCTACGTTCCCG-3' R: 5'-GGTAACTTTCTAGGAGTCATG-3'	348
<i>orf25</i>	F: 5'-GAAAGATAAAGATAAGCTTT-3' R: 5'-TCTTCTGTTAGCATGAACATG-3'	457
<i>atp6</i>	F: 5'-CTCATTCACAAATCCATCTT-3' R: 5'-GCTTGTAATATAGCTACTCC-3'	639

引物由上海博亚生物技术有限公司合成。提取的棉花 mtDNA 作为模板进行 PCR 扩增。

1.4.2 PCR 产物的回收 在 1.5% 的琼脂糖凝胶上分离 PCR 扩增产物,并回收目的条带。采用 DNA 凝胶

回收试剂盒回收扩增片段。

1.4.3 PCR 回收产物的连接与转化 将扩增片段与 pGM-T vector 连接,转化大肠杆菌 DH5 α 。将连接、转化产物转移到加入适量的 X-Gal 和 IPTG 和相应抗生素的 LB 固体培养基上,倒置平板于 37℃ 培养^[22]。

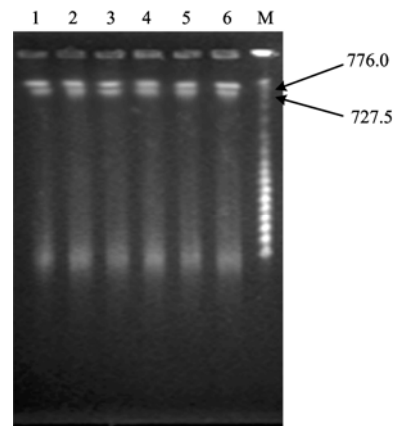
1.4.4 序列测定 挑取单菌落,提取质粒 DNA,进行序列测定。对所获得的序列在 Genbank 上进行 blast 比对,确认序列。

1.4.5 杂交探针的制备 采用 DIG DNA labeling and Detection Kit 标记探针。

2 结果与分析

2.1 线粒体 DNA 质量检测

提取的棉花 mtDNA,其分子量、纯度和产量均较高,分子量达 700 kb 以上 (图 1),可满足构建线粒体基因组文库的需要。



M: Lambda ladder PFG marker; 1, 2, 3, 4, 5, 6: 琼脂糖包埋的 mtDNA
M: Lambda ladder PFG marker; 1, 2, 3, 4, 5, 6: mtDNA from plug

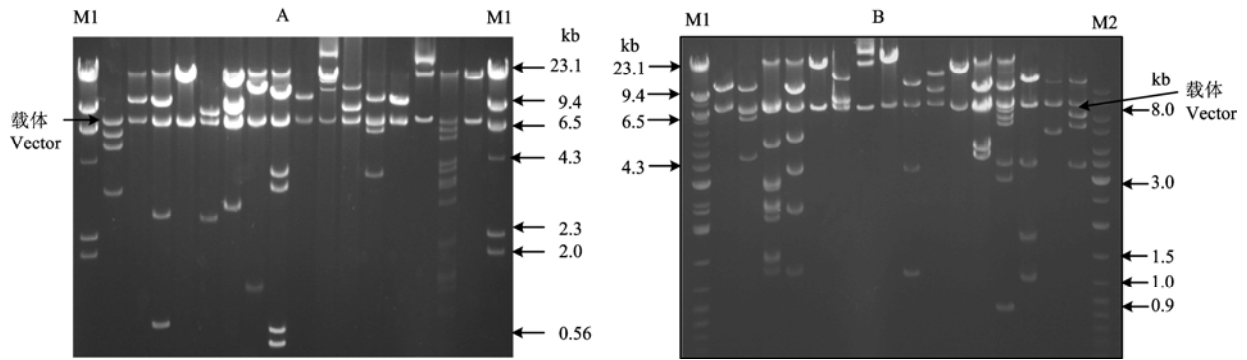
图 1 棉花 mtDNA 胶块脉冲电泳图谱

Fig. 1 PFGE of cotton mtDNA

2.2 插入片段大小检测

从每个 BAC 文库中随机抽取 90 个克隆,酶切后电泳显示每个克隆全部有插入片段 (图 2),插入片段的大小在 10.3 kb 和 37.5 kb 之间。以此估测的不育系和保持系 BAC 文库插入片段的平均大小分别为 22.29 kb 和 21.36 kb。

如果棉花线粒体基因组总长度以 700 kb 计算^[23],重组子的覆盖率达到棉花线粒体基因组的 79 倍和 76 倍。



M1: λ HindIII marker; M2: Gene Ruler™ DNA ladder mix

图 2 A 和 B 分别是不育系和保持系线粒体基因组 BAC 文库插入片段的电泳检测结果

Fig. 2 A and B showed respectively the size range of DNA inserts of BAC clones, which were random selected from mitochondrial genome libraries of sterile and maintainer lines

2.3 插入片段稳定性检测

两个 BAC 文库插入片段稳定性检测酶切图谱见图 3。结果表明，每个克隆的各个世代的酶切图谱完

全相同，没有缺失、重组等现象出现，从而证明 BAC 克隆是稳定的，至少可以在大肠杆菌中稳定遗传到 100 代。

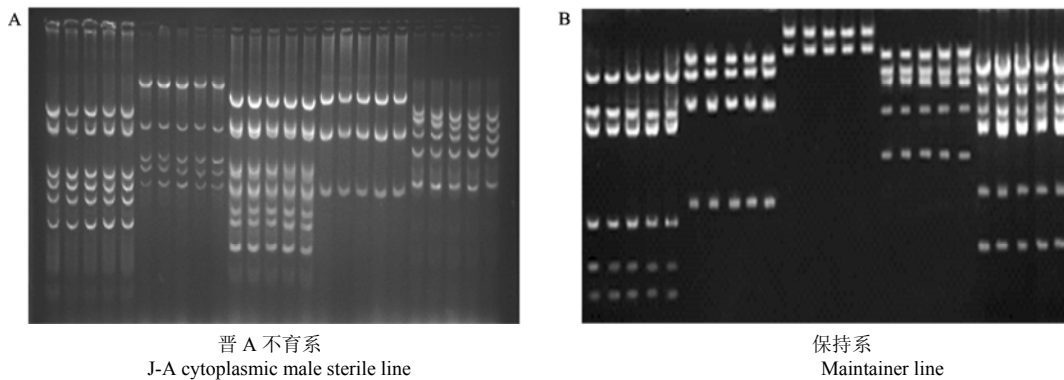


图 3 BAC 克隆稳定性分析

Fig. 3 The stability test of five clones cultured for 1, 2, 3, 4 and 5 d, respectively. DNAs were isolated, digested by HindIII and electrophoresed on 1% agarose gel

2.4 棉花线粒体功能基因 orfB、cox I 和 nad4L 的序列

从 Genbank 上搜寻其它植物的线粒体功能基因 orfB、cox I、atpA、nad4L、orf25 和 atp6 的序列，根据不同植物的这些同源基因的保守序列设计引物，笔者用晋 A 不育系及其保持系的线粒体 DNA 作模板进行 PCR 扩增，获得了大小分别为 471, 1 576, 1 264, 348, 457 和 639 bp 的线粒体基因或基因片段。其中 orfB、cox I 和 nad4L 为全基因序列（图 4），而 atpA、

orf25 和 atp6 仅获得了基因的部分序列，故在此不再表述。

将这些 PCR 扩增产物连接到 pGM-T 载体上，进行序列测定（图 5），并与其它植物的相应基因的序列进行比对，以确定其真实性。测序结果表明，棉花的 orfB、cox I 和 nad4L 等 3 个线粒体功能基因与其它作物具有高度的同源性（表 2），晋 A 不育系与其保持系的 3 个功能基因序列无差异。

2.5 BAC 文库原位杂交分析

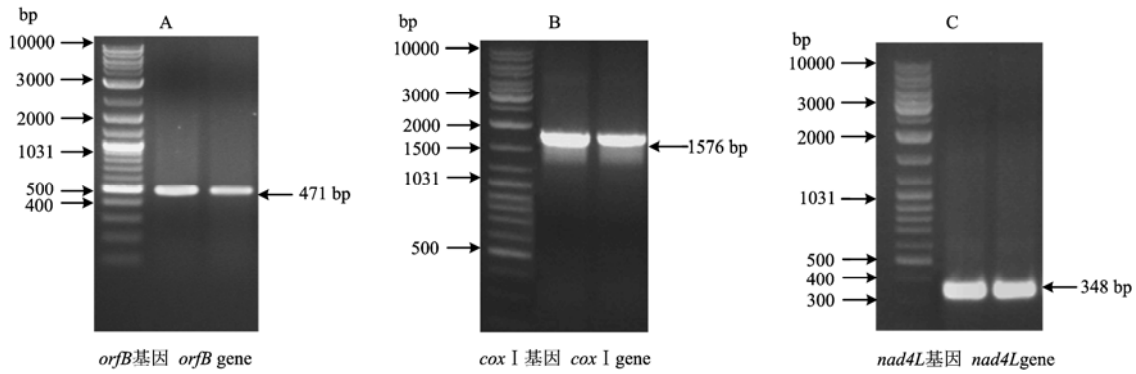


图 4 线粒体功能基因 PCR 扩增片段

Fig. 4 PCR amplification fragment of mitochondria functional genes

orfB 基因序列(471 bp) *orfB* gene sequence (471 bp)

```

1  ATGCCTCAAC TGGATAAATT GACTTATTTT TCACAATTCT TCTGGTTATG CCTTTTCCTC
61  TTTATTTTCT ATATTCCAAT ATGCAATGAT GGAGATGGAG TACTTGGGAT CAGCAGAATT
121 CTAAAACTAC GGAACCAACT GCTTTCACAC CGGGGGAACA ACATCCGGAG AAAGGACCCC
181 AAGAGTTTGG AGGATATCTT GAGAAAAGGT TTTAGCACCG GTGTATCCTA TATGGACTCT
241 ACTTTATTCG AAGTATCCCA ATGGTGTAAAG GCTGTCGACT TATTGGGAAA AAAGAGGAAA
301 ATAACCTTGA TCTCTTGTTT CGGAGAAATA AGTGGCTCAC GCGGAATAGA AAGAAACATA
361 TTCTATTTGA TCTCGAAGTC CTCCTATAGC AATCCTGGAT GGGGGATCAC TTGTAGGAAT
421 GACATAATGC TAATCCATGT TCCACACGGC CAAGGAAGCA TCGGTTTTTA A

```

cox I 基因序列(1 576 bp) *cox I* gene sequence (1 576 bp)

```

1  ATGACAAATC TGGTTCGATG GCTGTTCCCC ACTAACCACA AGGATATAGG GACTCTATAT
61  TTCATCTTCG GTGCCATTGC TGGAGTGATG GGCACATGCT TCTCAGTACT GATTCTGATG
121 GAATTAGCAC GACCCGGCGA TCAAATCTTT GGTGGAATC ATCAACTTTA TAATGTTTTA
181 ATAACGGCTC ACGCTTTTTT AATGATCTTT TTTATGGTTA TGCCGGCGAT GATAGGTGGA
241 TCTGGTAATT GGTGTGTTCC GATTCTGATA GGTGCACCTG ACATGGCATT TCCGCGATTA
301 AATAATATTT CATTCTGGTT GTTGCCACCA AGTCTCTTGC TCCTATTAAG CTCAGCCTTA
361 GTAGAAGTGG GTAGCGGCAC TGGGTGGACG GTCTATCCCG CCTTAAGCGG TATTACCAGC
421 CATTCTGGAG GAGCAGTTGA TTCAGCAATT TCTAGTCTTC ATCTATCTGG TGTTCGTCC
481 ATTTTAGGTT CTATCAATTT TATAACAAT ATCTCCAACA TGCGTGGACC TGGAATGACT
541 ATGCATAGAT CACCCCTTTT TGTGTTGGTCC GTTCTAGTGA CAGCATTCCC ACTTTTATTA
601 TCACTTCCGG TACTGGCAGG GGCAATTACC ATGTTATTAA CCGATCGAAA CTTTAATACA
661 ACCTTTTCTG ATCCCGCTGG AGGGGGAGAC CCCATATTAT ACCAGCATCT CTTTCGGTTT
721 TTTCGGTCAT CCAGAGGTGT ATATCCCAT TTTGCTTGA TCCGGTATCA TAAGTCATAT
781 CGTTTCGACT TTTTCGGGAA AACCCGTCTT CGGGTATCTA GGCATGGTTT ATGCCATGAT
841 CAGTATAGGT GTTCTTGGAT TTCTTGTTTG GGCTCATCAT ATGTTTACTG TGGGCTTAGA
901 CGTTGATACC CGTGCCTACT TCACCGCAGC TACCATGATC ATAGCTGTCC CCACTGGAAT
961 AAAAATCTTT AGTFTGGATCG CTACCATGTG GGGAGGTTTCG ATACAATACA AAAACACCCA
1021 TGTTATTTGC TGTAGGGTTC ATCTTTTGT TCACCATAGG GGGACTCACT GGAATAGTCC
1081 CGGCAAAATC TGGCTAGAC ATTGCTCTAC ATGATACTTA TTATGTGGTT GCACATTTCC
1141 ATTATGTAAT TTCTATGGGA GCCGTTTTTG CTTTATTTGC AGGATTTTAC TATTGGGTGG
1201 GTAAAATCTT TGGTCGGACA TACCCTGAAA CTTTAGGTCA AATCCATTTT TGGATCACTT
1261 TTTTCGGGGT TAATCTGACC TTCTTTCCCA TGCATTCTT AGGGCTTTCC GGTATGCCAC
1321 GTCGCATTCC CGATTATCCA GATGCTTACG CTGGATGGAA TGCCCTTAGC AGTTTTGGCT
1381 CTTATATATC CGTAGTTGGG ATTTGTCTGT TCTTCGTGGT CGTAACAATA ACTTCAAGCA
1441 GTGGAATAAA CAAAAGATGT GCTCCAAGTC CTGGGCTGTG TGAACAGAAT TCAACCCAC
1501 CGGAATGGAT GGTACAAAGT CCTCCTGCTT TTCATACTTT TGGAGAACTT CCAGCTATCA
1561 AGGAGACGAA AAGCTA

```

nad4L 基因序列(303 bp) *nad4L* gene sequence (303 bp)

```

1  TTAACCTTGA ATGCTATTAA TAAATCTTAC AGCAATAGTC CCTCGGACTC GGAAAGTAAT
61  AACGAAAATG GCTAACCCAA TAGCGGATTC CGCAGCTGCC ACCGTTGGAA CCAATGAAGC
121 AAATGATTGA CCCATCATAT CATCCAAAGA AACAGAAAAT ACCAAAAAGT TCGAATTAAC
181 AGCTAATAAC ATTGATTCAA TTGGCATTGA CATAATAGGA ATATTTCTGC TATTAAGGAG
241 GATTCCCCGA ATACCTAAAA TAGAAATGAT CATCGAAAAT GTGAAATATT TGATAAGATC
301 CGT

```

图 5 棉花线粒体 *orfB*、*cox I* 和 *nad4L* 基因序列Fig. 5 Nucleotide sequences of mitochondrial gene *orfB*, *cox I* and *nad4L* in cotton

表 2 *orfB*、*cox I* 和 *nad4L* 基因片段的 BLAST 比对Table 2 The contrast of *orfB*, *cox I* and *nad4L* with BLAST

基因 Gene	扩增片段长度 Amplified length	来源作物 Crops	基因长度 Gene length (bp)	同源性 Conservation (%)
<i>orfB</i>	471 bp	拟南芥 Arabidopsis	477	89
		烟草 Tobacco	471	92
		油菜 Oilseed rape	477	89
		小麦 Wheat	471	84
		水稻 Rice	468	84
<i>cox I</i>	1576 bp	拟南芥 Arabidopsis	1584	96
		烟草 Tobacco	1584	97
		油菜 Oilseed rape	1584	96
		小麦 Wheat	1575	95
		水稻 Rice	1575	95
<i>nad4L</i>	303 bp	拟南芥 Arabidopsis	303	97
		烟草 Tobacco	303	96
		油菜 Oilseed rape	303	97
		小麦 Wheat	303	94
		水稻 Rice	303	94

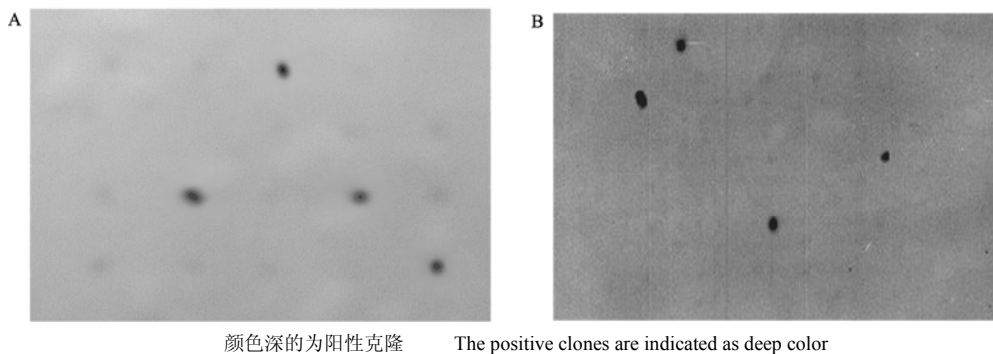
利用棉花的线粒体功能基因或片段：*orfB*、*cox I* 和 *nad4L* 对所构建的 BAC 文库进行菌落原位杂交，均筛选到了阳性克隆（图 6），从而证实了文库的完整性。

3 讨论

3.1 插入片段大小的估测和稳定性检测

大部分克隆的插入片段不包含 *Not I* 酶切位点，这是双子叶植物基因组的典型特征^[24,25]。在其它植物基因组 BAC 文库插入片段大小的估测时，往往采用 BAC DNA 用限制性内切酶 *Not I* 酶切。但在笔者的研究中，对随机所选克隆提取的 BAC DNA 采用 *Not I* 酶切，所有 BAC 克隆至少有 2 个 *Not I* 酶切片段，而有些图谱却显示出较多的条带。这表明在棉花线粒体基因组中的某些区段含有较多的 *Not I* 酶切位点，这可能是棉花线粒体基因组中较高的 GC 含量和较低的 C 甲基化所致^[26]。

在黏粒文库中，克隆 DNA 会发生重排。这是由于大肠杆菌携带的重组子拷贝数很高，容易产生一些

图 6 A 和 B 分别是 *cox I* 基因筛选基因文库菌落原位杂交结果Fig. 6 A and B respectively showed screening results of the libraries with *cox I* gene as probe

短的、缺失的克隆，而这些克隆复制的速度往往超过亲代^[21]。而笔者构建的棉花线粒体基因组文库，经过严格的培养至 100 代，重组 DNA 在继代过程中能高度稳定遗传，没有发现重组、嵌合、缺失等现象。通过染色体原位杂交试验证明，BAC 没有或极少产生嵌合体^[18,19]。所有这些都表明，笔者所构建的 BAC 文库是高质量的。

3.2 转化效率

电击转化对盐离子的浓度是很敏感的，因此电击转化时，降低盐离子的浓度是至关重要的。研究中，

将连接产物通过 Millipore 公司的 0.025 μm 滤膜进行透析，达到脱盐的目的，从而得到较高的转化效率。

连接体系中大片段 DNA 的浓度是影响连接和转化效率的又一个关键因素，所得 DNA 不经浓缩，直接与载体连接，所转化出的克隆数较少。试验证明反应体系中大片段 DNA 浓度为 3 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ 以上，则具有较高的转化效率。

载体与大片段 DNA 的连接比例也是影响转化效率的重要体因素。在文库的构建中，笔者采用不同的

载体与插入片段比例进行转化, 并对它们的转化效率进行比较, 发现载体与插入片段的比例不同, 则转化效率不同。采用载体与大片段 DNA 的比例为 1 : 8, 则会得到较高的转化效率, 采用 1 : 8 的载体与插入片段比例的转化效率是 1 : 4 载体与插入片段比例的 6~8 倍, 而且重组率达到 98.9%。

4 结论

本试验在借鉴其它作物 BAC 文库的构建方法后, 建立了一套高效的线粒体基因组 BAC 文库构建的技术体系, 包括线粒体的分离、高质量大片段 DNA 的获得、部分酶切最佳条件的确定、片段大小的选择、高效的连接与转化体系等。分别构建了棉花晋 A 细胞质雄性不育系及其保持系线粒体基因组的 BAC 文库。获得了晋 A 不育系与其保持系的 *orfB*, *cox I* 和 *nad4L* 3 个基因的全序列, 通过比较, 证明晋 A 不育系与其保持系在 *orfB*、*cox I* 和 *nad4L* 基因全序列上无差异。

References

- [1] Prioli L M, Huang J, Levings C S III. The plant mitochondrial open reading frame *orf221* encodes a membrane-bound protein. *Plant Molecular Biology*, 1993, 23: 287-295.
- [2] Heazlewood J L, Whelan J, Millar A H. The products of the mitochondrial *orf25* and *orfB* genes are F₀ components in the plant F₁F₀ ATP synthase. *Federation of European Biochemical Societies Letter*, 2003, 540: 201-205.
- [3] Siculella L, Palmer J D. Physical and gene organization of mitochondrial DNA in fertile and male sterile sunflower, CMS-associated alterations in structure and transcription of the *atp6* gene. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16: 3787-3799.
- [4] Kadowaki K, Suzuki T, Kazama S. A chimeric gene containing the 5' portion of *atp6* is associated with cytoplasmic male-sterility of rice. *Molecular Genetics and Genomics*, 1990, 224: 10-16.
- [5] Notsu Y, Masood Nishikawa T, Kubo N, Akiduki G, Nakazono M, Hirai A, Kadowaki K. The complete sequence of the rice (*Oryza sativa* L.) mitochondrial genome: frequent DNA sequence acquisition and loss during the evolution of flowering plants. *Molecular Genetics and Genomics*, 2002, 268: 434-445.
- [6] Wang Z H, Zou Y J, Li X Y, Zhang Q Y, Chen L T, Wu H, Su D H, Chen Y L, Guo J X, Luo D, Long Y M. Cytoplasmic male sterility of rice with Boro II cytoplasm is caused by a cytotoxic peptide and is restored by two related PPR motif genes via distinct modes of mRNA silencing. *The Plant Cell*, 2006, 18: 676-687.
- [7] Young E G, Hanson M R, Dierks P M. Sequence and transcription analysis of the *Petunia* mitochondrial gene for the ATP synthase proteolipid subunit. *Nucleic Acids Research*, 1986, 14: 7995-8006.
- [8] Hanson M R, Wilson R K, Bentolila S, Kohler R H, Chen H C. Mitochondrial gene organization and expression in *Petunia* male fertile and sterile plants. *The Journal of Heredity*, 1999, 90: 362-368.
- [9] Hanson M R, Bentolila S. Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development. *The Plant Cell*, 2004, 16: S154-S169.
- [10] Tang H V, Pring D R, Yan B. Sorghum mitochondrial *orf25* and a related chimeric configuration of a male-sterile cytoplasm. *Current Genetics*, 1996, 29: 265-274.
- [11] Hedgcoth C, El-Shehawi A M, Wei P, Clarkson M, Tammlis D. A chimeric open reading frame associated with cytoplasmic male sterility in alloplasmic wheat with *Triticum timopheevi* mitochondria is present in several *Triticum* and *Aegilops* species, barley, and rye. *Current Genetics*, 2002, 41: 357-365.
- [12] Makaroff C A, Apel I J, Palmer J D. Characterization of radish mitochondrial *atpA*: influence of nuclear background on transcription of *atpA*-associated sequences and relationship with male sterility. *Plant Molecular Biology*, 1990, 15: 735-746.
- [13] Sarria R, Lyznik A, Vallejos C E, Mackenzie S A. A cytoplasmic male sterility-associated mitochondrial peptide in common bean is post-translationally regulated. *The Plant Cell*, 1998, 10: 1217-1228.
- [14] Dieterich J H, Braun H P, Schmitz U K. Alloplasmic male sterility in *Brassica napus* (CMS Tournefortii-Stiewe) is associated with a special gene arrangement around a novel *atp9* gene. *Molecular Genetics and Genomics*, 2003, 269: 723-731.
- [15] Eckardt N A. Cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *The Plant Cell*, 2006, 18: 515-517.
- [16] Gallagher L, Betz S K, Chase C D. Mitochondrial RNA editing truncates a chimeric open reading frame associated with S male-sterility in maize. *Current Genetics*, 2002, 42: 179-184.
- [17] Handa H. The complete nucleotide sequence and RNA editing content of the mitochondrial genome of rapeseed (*Brassica napus* L.): comparative analysis of the mitochondrial genomes of rapeseed and *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31: 5907-5916.
- [18] Zhang F D, Zheng Y L, Cao Z G. Construction of bacterial artificial chromosome library of S-type CMS maize mitochondria. *Chinese Science Bulletin*, 2000, 45: 1692-1697.
- [19] 易平, 汪莉, 万翠香, 朱英国. 红莲型水稻不育系和保持系线粒体基因组 BAC 文库的构建. *作物学报*, 2002, 28: 756-759.

Yi P, Wang L, Wan C X, Zhu Y G. BAC library construction for

- mitochondrial genome of sterile and maintainer lines from HL rice. *Acta Agronomica Sinica*, 2002, 28: 756-759. (in Chinese)
- [20] 黄晋玲, 胡建斌, 张 锐, 郭三堆. 制备棉花高分子量线粒体DNA的方法. *棉花学报*, 2007, 19: 74-75.
- Huang J L, Hu J B, Zhang R, Guo S D. Preparation approach of high-molecular weight mtDNA from cotton. *Cotton Science*, 2007, 19: 74-75. (in Chinese)
- [21] Zhang H B, Zhao X, Ding X, Paterson A H, Wing R A. Preparation of megabase DNA from plant nuclei. *Plant Journal*, 1995, 7: 175-184.
- [22] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* (3rd ed). NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000: 87-102.
- [23] Hsu C L, Mullin B C. Physical characterization of mitochondrial DNA from cotton. *Plant Molecular Biology*, 1989, 13: 467-468.
- [24] Choi S D, Creelman R, Mullet J, Wing R A. Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library from *Arabidopsis thaliana*. *Weeds World*, 1995, 2: 17-20.
- [25] Tomkins J P, Mahalingam R, Smith H, Goicoechea J L, Knap H T, Wing R A. A bacterial artificial chromosome library for soybean PI 437654 and identification of clones associated with cyst nematode resistance. *Plant Molecular Biology*, 1999, 41: 25-32.
- [26] Wu K S, Roder M S, Canal, M W. Isolation of plant DNA for PFGE. In: Burmeister M, Ulanorsky L (ed). *Pulsed-field Gel Electrophoresis*, Totowa: Humana Press, 1992, 12: 145-157.

(责任编辑 于 竞)