

大豆细胞质雄性不育系配套保持系线粒体基因组 BAC 文库的构建

费晓艳^{1,2}, 赵洪锬¹, 刘晓东¹, 宋任涛³, 李启云¹, 董英山^{1,2}

(1. 吉林大学 植物科学学院, 吉林 长春 130062; 2. 吉林省农业科学院 生物中心, 吉林 长春 130033; 3. 上海大学 生命科学学院, 上海 200444)

摘要:以大豆细胞质雄性不育系配套保持系材料(JLCMS1)的黄花苗为材料,纯化得到线粒体。低熔点琼脂糖包埋线粒体成胶块,消化裂解后用 *Hind* III 部分酶切,通过脉冲场电泳回收 40~60 kb 酶切片段。将回收产物连接到载体 pIndigo-BAC 5,通过电击转化大肠杆菌 DH10B 感受态细胞,获得的 BAC 文库包含 2 000 个单克隆,平均插入片段大小约为 50 kb,约覆盖大豆线粒体基因组 250 倍以上。

关键词:大豆;细胞质雄性不育系;保持系;线粒体基因组;BAC 文库

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2011)03-0401-04

BAC Library Construction for Mitochondrial Genome of A Maintainer (JLCMS1) Associated with Cytoplasmic Male Sterility Soybean

FEI Xiao-yan^{1,2}, ZHAO Hong-kun¹, LIU Xiao-dong¹, SONG Ren-tao³, LI Qi-yun¹, DONG Ying-shan^{1,2}

(1. Jilin Academy of Agricultural Science, Changchun 130033, Jilin; 2. College of Plant Science, Jilin University, Changchun 130062, Jilin; 3. School of Biological Science, Shanghai University, Shanghai 200044, China)

Abstract: A soybean maintainer of the cytoplasmic male sterility soybean (JLCMS1) was used for mitochondria isolation with high purity. Purified mitochondria was embedded into plugs by low melt point agarose, then the plugs was lysed and partially digested by *Hind* III. The DNA fragments between 40 and 60 kb size were selected by pulsed field gel electrophoresis. The size-selection product was ligated to BAC vector pIndigo-BAC5 and then transformed into competent cell of DH10B by electroperation. The constructed BAC library consist of 2 000 clones with an average 50 kb inserts and covered more than 250 times of the soybean mitochondrial genome used in this research.

Key words: Soybean; Cytoplasmic Male Sterility; Maintainer; Mitochondrial Genome; BAC library

杂种优势的利用是提高作物产量的重要育种方法,而近年来大豆细胞质雄性不育系的应用已被证明对大豆杂种优势利用具有重要价值^[1]。细胞质雄性不育一经发现就迅速被用于杂交大豆的开发,孙寰等^[2,3]于 1993 年育成世界上第一个大豆细胞质雄性不育系,并于 1995 年实现“三系”配套。之后又相继出现以“中豆 19”,“XXT”,“N8855”,“N21566”和“N23168”等为不育胞质源育成不育系^[4,9]。但目前对这些不育细胞质的研究还不充分,国内外的大量研究证明线粒体基因组与雄性不育有着密切关系,其嵌合基因和某些特殊片段的缺失可能是造成雄性不育的重要原因。为进一步了解大豆细胞质雄性不育的发生机制,该试验构建了大豆的线粒体基因组 BAC 文库,以期为大豆细胞质雄性不育相关基因的克隆、结构功能研究以及大豆线粒体全基因组的测序提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

大豆细胞质雄性不育系材料(JLCMS1),由吉林省农科院赵丽梅研究员馈赠。

1.2 试验方法

1.2.1 线粒体 DNA 的制备与检测 将含有种子的 3 层发芽纸卷成桶状,放到盛有 1~2 cm 水的烧杯中,28℃暗培养 10 d 左右,得到黄花苗。结合差速离心和密度梯度离心,参考 Bai 等^[8]的方法得到高纯度线粒体,将提取纯化得到的线粒体其中一部分取出直接抽提 DNA^[10]。由于抽提到的线粒体 DNA 的纯度和浓度,在很大程度上决定着构建的 BAC 文库的质量。为了确定抽提到的线粒体 DNA 有无细胞核 DNA 和叶绿体 DNA 的污染,根据已知的基因设计了 3 对引物,它们分别可以扩增大豆细胞核、叶

收稿日期:2011-02-24

基金项目:国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(2006AA10Z120,2009AA101106)。

第一作者简介:费晓艳(1986-),女,在读硕士,研究方向为植物分子生物学。E-mail:fei-xiaoyan@163.com。

通讯作者:董英山(1963-),男,研究员,博士生导师,从事农业生物技术及作物种质资源研究与利用。E-mail:ysdong@cjaas.com。

€ x T † ^ x ½ q • • 5 6 Å 0 | } Ñ z äê
 u ā, ÿ ð \$ ^ Y Z
 ā, ÿ " ÿð

5 6	L 8	Å 0 }	Æ" b c & ñ
ö	p	ÿ "	ð

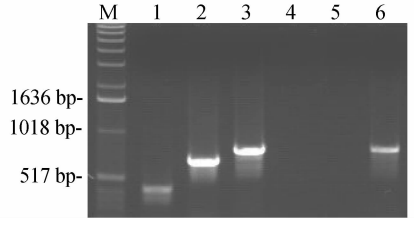
ý ð ú	„ ...V	öö ö ööööööööööööö ööööööö	äää
	ÿ" "	óðð öðð ööööööööööööö ööööööö	
ò	• € x	öö ööööö ö ööööö ööööö ööööö	ééä
	ò !	ó ööööööööööööööööööö ööööööö	
òp	† ^ x	öö ööööööööööööööööööö ööööööö ö	ééä
	û !	ó ööööööööööööööööööööö ööööööö	

, , { w } f † ^ x - Á m ^ » f % . ó y ð ê -
 ā 7 ³ ñ á á á á ä è ú ß̂ - í ò ç â è ú ß̂ ÷ é %
 q Ť â © † ^ x ð » Ý ... 4 á æ ' q ã Û
 q ā ß j ì í î ï ð ñ ä Š á á â ð Õ, / 0 á ú á
 Ä + á " ä æ ð ð ð ð ð ð ð ð ð ð ð ð ð ð ð ð ð
 q Ö H ā 7 ³ á ä % è ú ß̂ q ó ó ð á ä % è ú ß̂
 q • Ž y ú á ÷ é % æ q ã Û q N M • 5 ½ § " (á
 Ä ä ç ú @ | 1 ä ç á Ö H Ò + ä è ê ÷ K ä ä í x
 Ö q ô T ä ä ä x Ö q ä ä ä è ú ß̂ q ÿ ü ö ä
 ä ç ' 5 é ä è @ ä 3 4 ä - ô 5 é ä ä ä ä
 ä ä ... C Ä - 3 ô * ä æ - ~ @ - è
 ä % ä % ä , c { ó y ð % 1 ? [° , K € • & • y *
 K ä _ d } Ö y • € • " A ê ½ ' ÿ ! ÿ ää
 q O — á á % ö Ò + á " ä , * 6 Q ê % ö ñ + á
 ä ä í x Ö q ÷ Ä y * ä 7 ³ @ 7 ä ä ä ä ä
 ä % ç - K ç í x Ö - 3 q ž ä % è ú ß̂ q
 ñ ð q ä 7 ³ # ù ÷ Ä ... ä á / 0 ä ½ ç C
 ä ä ä é ' — a æ ä B ... # ä ä ä x Ö q
 ä % è ú ß̂ q ó ó ð ð ð ð ð ð ð ð ð ð ð ð ð ð ð ð ð
 + ô 7 é ä • , 7 Ì ð 3 4 Q ó ä % ^ ñ ð ä ä Û Ì í î ï ð ä ä ä ä ä Û è è ß̂ ä
 v T , 7 ä % ä ä Û , 7 ä ä ä 7 ± . ä è ä Ä
 ä ä ä Z è

ä % ä % ä , ! » [° + ¼ ½ " " , ž • ñ • y * q }
 * 3 4 ä • * q Ò + € • & • y * è 6 Q † ^ x
 5 6 Ö 9 ñ ä ï • - q , 7 Ì ð 3 4 ó ä % ^ ñ ð ä
 ä Û Ì í î ï ð ä ä ä ä ä 7 j • ± . ä % ä ä Û P Ì
 Û è è ß̂ ä P Ì Û è è ß̂ ä 7 ± . ä è è
 Ü 8 F q 3 è ä 5 ž ä ä ð è ä b c q Ò + ¾ ù
 á 9 „ è * ä Ì ð 9 „ q O — Ó Ö ó y ð b c ä ä è
 ` 9 „ : * M P Ò + ... ä Ó Ö q ó y ð 2 3 ` 9
 „ : * M P ä ç é Ö ä % ù @ | 1 * ä W Ó Ö q
 ó y ð Ž Ä è

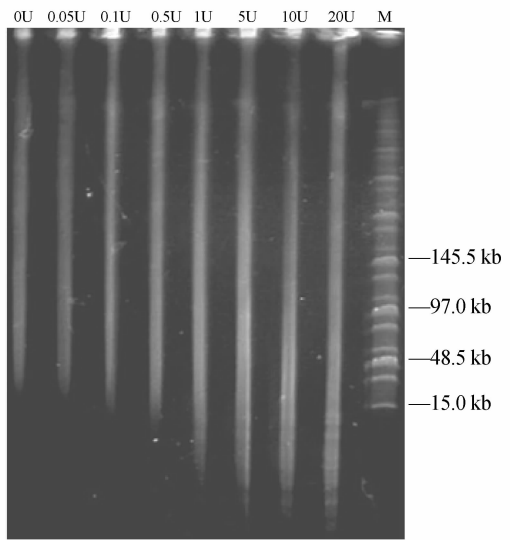
ä % ä % ä ¾ - H I , w x ø Š ð ò ç á ÷ Ä ä è
 A ö y ð ö y ö Ú ÿ & T M š » á ò à ä ¶ : x „
 ... ó ÷ ä ä ñ ç æ A ø # ! Ü ÿ è x ù b c 9 w x Ü
 5 6 ä Š ä ä Š ä ä Š ç ä ä Š è f ° / f # ç Ö ä 7 ³
 T ç Ö y ä - r ô ú É # p e x Ö ç ä » ù ä K ä è ' 3
 4 5 ç Ö ä ä è ç Ö 6 0 - • f 1 € • • f T Ž 8
 ... € • Ì ç Ý è ç Ý 3 4 ð - ¶ : x ä ä » ù ä Ö
 6 0 ä » ù ä ñ ç Š ð ó ö ÿ " Ü Ì n Ý ä
 ä % ä ñ ç Š ð ó í - 3 ä ä è ä ä è ß̂ ä è Ì - ...
 < ; # ù ä ù ð ò ' ¶ 5 ä ä é ' ' ¶ ä ä B ... M
 ä ä ä » ù Ì K ž Ä Ä p á ä ä % » è ù ß̂ ä q ù ñ Ø Ä
 ½ ä ä é ' ÷ C ' ¶ ä ä ä é p q ð » Ü Ü M á ž
 Ä Ä p á ä ä % » è ù ß̂ ä q ù ñ ³ x ' ¶ 5 q è è <
 Ä * ä ~ ä ä ä % » Ü ä ä é ' ' ¶ c ½ ... - < Ö h
 Ì ç M Z p # = . Ö Ø Ž Ä Q ä ç Ü á ß ä ä — T M è
 ä % ä % ä , ñ ð ò ç Ä b » % V = , ` — T M R S * á ^ Ü
 M ä ä ä % R S Ö h á ä ù ž Ä Ä p á ä ä % » è ù ß̂ ä
 q ù ñ ' ¶ 5 * ä ä é ' ' ¶ ä ä ä B ... Ä Ö H — Ö M †
 ^ è ñ ð ò R S ÿ ° y * ... ä - , 7 / Ì ð Ñ " x ù
 b c q & ñ è , 7 Ì ð 3 4 Q ó ä % ^ ñ ð ä ä Û Ì í î
 ï ð ä ä ä ä Û ç è ß̂ ä v T , 7 ä % ä ä Û , 7
 ä ä ä 7 ± . ä ä ä Ä ä ä ä Z è

ä , W X - . /
 ä % ä , s Ä (ó y ð * š)
 d ÿ ð 6 0 € • Ì í î ï ð Ì ð f „ ä ² Ý
 í ä 3 ' ä ï & ' q 5 6 Ö ó y ð Q Ä Ä ± ä ...
 V é € x T † ^ x ½ q 5 6 , Ä " P • e q F q
 3 è ä ï ° á q & ' † ^ x ó y ð Q Ä Ä ± ä
 ' † ^ x ½ q ò p 5 6 Ä " P • e q F q 3 è ä
 ' Ä Ì Ç ä 3 ° M q † ^ x ó y ð ; Ä 9 » ä V 5
 6 Ö ó y ð T • € x ó y ð q € > è



ü ö ä ó y ð f % • ç è ä ä ð ä ð ö Ä " 5 6 f ° Q ý ð ú ä Š
 ò ä ò p ä Ä Q & ' 5 6 Ö ó y ð ð ä æ ð è ð ö Ä " 5 6 f ° Q
 ý ð ú ä ò ä ò p ä Ä Q † ^ x ó y ð è
 ü ö ä ó y ð ü ä ä ß̂ ä ó ! ó y ð \$ "
 ! ! à ý ð ú ä ò ò % " ! ! \$ " á Š
 ! ! ! # ä ä æ ß̂ è ó ! lö ý ð
 \$ " ! ! ý ð ú ä ò ä ò p \$! ! à
 E ä , s Ä (R ä * š)
 ö ä ä , ó ! ! ! " ! &

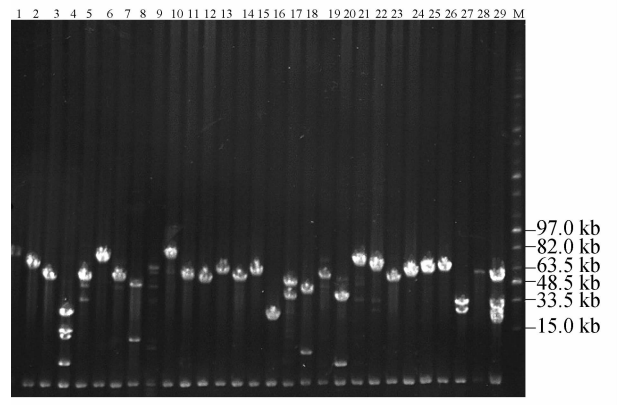
ã%ã, s Á < ó y ð * S B
 b c Á C ç ® q ò À € • y * ã ñ á — æ è
 à%ãçéã%ãéã%ãéãéçéããT äã y . d ãæ%ì í
 Í ì Ò + € • y * â 7 Ī Đ L Ñ “ T : Wu á Ö
 f & ñ b c q } * y . ê Ý í ä 3 ´ äã ãæ%ì
 Í Í ì Ò + æ ÷ Á q — . Q à%ãç T à%ã
 ± â y * ... ó y ð b c & ñ 9 ! y * ± • , 5 † Á
 u Ý ê . Q ç ì ½ ± â y * ... ó y ð b c q ? @
 ‡ > 5 † ç ÷ : u ä ´ ± U . € • v Ý ° y * ô
 ð — . Q à%ç ± y * ... & > f b c & ñ f * Á
 èã†éã Þ . ê . K ä ± â y * ... q & > f b
 c f * K æ † çã Þ . æ ´ : W ĩ ä y . €
 • & . > f y * ê



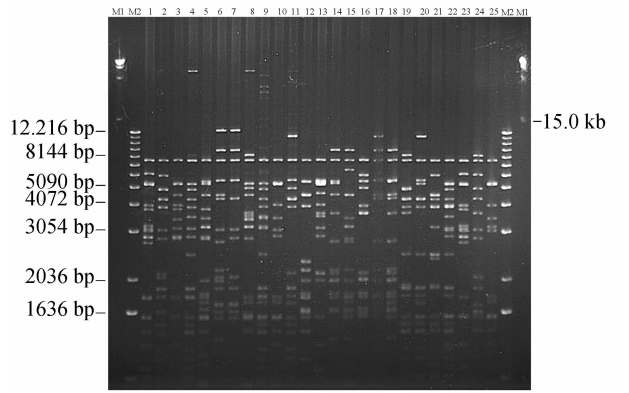
, , ü š ž > , 7 / ĩ Ò Ī Đ f % . ç è ðã†æĐ ° ó ° —
 àéã%ãçéã%ãéã%ãéãéçéããT äã q ÷ Á d ãæ%ì í í ì Ò
 + y * ê
 , , ü ó ú ø y ö ö ü à ã ß è ú ó ! " !
 ÷ Á àéã%ãçéã%ãéã%ãéãéçéãã äã ! ! äæ " à
 E ä , ì í ... B ñ ð T ĩ
 õ %ã, ó ! ! ! ! !

ã%ã, U t * V W † x
 ç Ö p e c > * ä v x T x 8 ó y ð q , ¼ ä
 Ö = > ç Ý O < ê Q v : W } * ç Ö , ¼ æ ´ W
 b c Á C ç ® q ò À ä ² ³ ´ ^ m 3 4 • ® ± ä
 õ x 8 ó y ð 9 w x q , ¼ Q ã š ç € • ç Ö ± é Þ
 q R S ~ F } o äç Ý O < 9 » äãäã è ð ñ ã c
 d ç Ö 6 0 € • • f T Ž 8 j k ä ĩ o C ç Ö 6
 0 * @ % Ž À ä C Ī - c > * Ī - 3 - A ‡ > ä
 ® ± ° » ç Ý < äæ è
 à%æ ñ ð ò H Q À X * š >
 æ Z p Ê —™ ä äã%õ ð R S äã ^ Ù M Z p
 * q äãã%õ ð R S äã x û b c & ñ € • f „ ê ,

7 / Ī Đ ± ² z > Z p q Ø , x û b c & ñ f í
 Á äã†éã Þ . æ Ø , Ñ Q çã äı w < ñ Á
 ä Ũ ä » Á æ æ Z p Ñ ý F & ' „ ... †) ^ ç &
 ÿ ‡ ^ x 5 6 Ö äçã ĩ ĩ ½ ê
 í ä T í æ f ° Q — ý ! Ä T ÷ Á d ñ ð ò
 R S € • Ý ° y * q , 7 Ī Đ ± ² ê ž • Ī Đ ±
 ² d Z p x û b c & ñ f í € • f „ á çãä†
 ‡ êê Ũ R S q x û b c & Á äã äçç Ũ q R S x û
 b c & Á çã ä ñ ÷ Á K R S ½ q y * ĩ j
 9 o â y * ... 3 ê õ ¹ y Ũ äã — Á ´ Z p q - B
 í ä T ñ ð ò R S < C æ q [\ ä Q & ' ‡ ^ x 5 6
 Ö " | Ž W 5 • ê



, , ü š ž > , 7 / ĩ Ò Ī Đ f % . ç è ðã†æĐ ° ð á Q
 äé% ñ ð ò Z p ð R S . ý ! Ä Ý ° y * ... Ī Đ ê
 , , ü ó ú ø y ö ö ü à ã ß æ ú ó äæ ñ ð ò
 ! ! \$! ý ! Ä à
 E ä , ý ! Ä ... B h i Y Z U t ! !
 õ %ã, õ # " ! ! ! ! \$! ý ! Ä



, , ü ä š ž > , 7 / ĩ Ò Ī Đ f % . ç è ð ü ä ó ä ó y ð f
 % . ç è ðã†äçĐ ° ð á Q äç% ñ ð ò Z p ð R S . ÷ Á
 Ý ° y * ... Ī Đ ê
 , , ü ä ó ú ø y ö ö ü ó ü ä ó ä ó y ð ú à ã ß ä ç
 ú ó ä ç ñ ð ò ! ! \$! ÷ Á ä
 E æ ñ ð ò + , ÷ Á ... B E Ž
 õ %æ ñ ð ò ! \$! ÷ Á

