

doi:10.7668/hbxb.2014.05.005

甘蓝基因组细菌人工染色体文库的构建

邢苗苗^{1,2}, 田多成², 李海龙², 姚丽君³, 冀瑞琴¹, 康俊根²

(1. 沈阳农业大学 园艺学院, 辽宁 沈阳 110866; 2. 北京市农林科学院 蔬菜研究中心, 农业部华北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 北京 100097; 3. 河北农业大学 园艺学院, 河北 保定 071001)

摘要:细菌人工染色体(BAC)文库是克隆甘蓝抗病优质重要基因的基础,以抗枯萎病、富含硫代葡萄糖苷的结球甘蓝自交系 R4P1 为材料,美国 Epicentre 公司的 CopyControl™ pCC1BAC™ 为载体,构建了甘蓝细菌人工染色体文库。该文库有 73 344 个克隆,插入片段平均大小约 97 kb,空载率 <3%,覆盖甘蓝基因组约 10.9 倍,筛选到甘蓝任一基因的概率为 99.99%,这些结果表明,构建的文库质量较好,可用于后续分析。构建的甘蓝 BAC 文库不仅可用于枯萎病基因的克隆,而且为克隆其他重要的功能基因及基因组学等的研究奠定了基础。

关键词:甘蓝;细菌人工染色体文库;枯萎病基因;克隆

中图分类号:Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2014)05-0023-06

Construction of a Bacterial Artificial Chromosome Library from *Brassica oleracea*

XING Miao-miao^{1,2}, TIAN Duo-cheng², LI Hai-long², YAO Li-jun³, JI Rui-qin¹, KANG Jun-gen²

(1. College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; 2. Beijing Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops (North China), Ministry of Agriculture, Beijing 100097, China; 3. College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: Bacterial artificial chromosome library is the foundation of important and high quality disease-resistant gene cloning from *Brassica oleracea*. A bacterial artificial chromosome library was constructed from R4P1, a *Brassica oleracea* varieties highly resisting to fusarium wilt and being in rich of glucosinolates, with the vector CopyControl™ pCC1BAC™. The library consists of 73 344 clones with an average insert size of about 97 kb, and in which the empty clones are under 3%. Thus, the library provides 10.9 haploid genome equivalents, the probability of screening to any gene of *B. oleracea* is 99.99%, these results indicate that this is a high quality BAC library suitable for the following analysis. The BAC library of *B. oleracea* could not only be used for the clone of resistant genes to fusarium wilt, but also lay foundations for isolating other interesting genes and research the genomics of *B. oleracea*, et al.

Key words: *Brassica oleracea*; Bacterial artificial chromosome library; Fusarium wilt resistant gene; Clone

细菌人工染色体(BAC)文库是将生物体全基因组随机打断的 DNA 片段和克隆载体 BAC 进行重组,并转化到大肠杆菌里的 DNA 克隆群体。BAC 文库是 1992 年以后发展起来的^[1],具有嵌合、重排率相对低,转化效率高、稳定性强、易于操作等优点,是目前比较理想的克隆载体。BAC 文库应用于:基因组物理图谱构建、基因的图位克隆、基因组测序、比较基因组研究^[2-3]、转基因技术^[4-5]、荧光原位杂

交(FISH)^[6-7]等。尤其在基因物理图谱构建和基因图位克隆方面应用较广。由于 BAC 插入片段大、易分离等特点,真核生物常利用 BAC 文库搭建克隆重叠群构建基因组物理图谱,目前拟南芥^[8]、大白菜^[9]、水稻^[10-11]、小麦^[12]等植物都已利用 BAC 文库成功构建了基因组物理图谱,加速了大量功能基因的查找分析和图位克隆的进程。BAC 文库的构建及阳性克隆的筛选是图位克隆目的基因的物质基

收稿日期:2014-03-10

基金项目:国家自然科学基金项目(31171958);“十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD02B01;2012BAD50G01);国家高技术研究发展计划项目“863”项目(2012AA100103;2012AA100105;2012AA020103)

作者简介:邢苗苗(1989-),女,山西运城人,在读硕士,主要从事蔬菜遗传育种与分子生物学研究。

通讯作者:康俊根(1972-),男,山西忻州人,研究员,博士,硕士生导师,主要从事蔬菜遗传育种与分子生物学研究。

冀瑞琴(1976-),女,山西寿阳人,副教授,博士,硕士生导师,主要从事蔬菜遗传育种与分子生物学研究。

础^[13-14],水稻白叶枯病抗性基因 *Xa-21* 的克隆就是成功的例子之一^[15],西瓜^[16-17]、大麦^[18]、蜜柚^[19]、棉花^[20]等物种也已通过 BAC 文库筛选出了相关基因的阳性克隆,为克隆基因奠定了基础。

甘蓝 (*Brassica oleracea* var. *capitata*) 为十字花科 (Cruciferae) 芸薹属 (*Brassica*) 甘蓝种 (*B. oleracea*, $2n = 2x = 18$, CC), 起源于地中海至北海沿岸, 由不结球甘蓝演化而来, 其营养价值高, 尤其是含有能有效预防癌症的次生代谢物硫代葡萄糖苷^[21], 是我国主要的蔬菜作物之一。目前, BAC 文库在甘蓝中的应用主要是国外一些研究者利用 BAC 文库筛选、比较分析甘蓝、拟南芥和白菜中的同源基因。Vicente 等^[22]根据拟南芥中的抗病同源基因设计 4 个甘蓝抗病相似基因探针筛选甘蓝和拟南芥 BAC 文库, 分析表明抗病同源基因在 2 个品种基因组上的位点一致。Gao 等^[23]比较分析了青花菜 BAC 文库中包含主要的脂肪族芥子油苷基因的克隆 B21H13 和其在拟南芥中的同源区域, 发现在十字花科蔬菜进化过程中, 基因和染色体水平上都发生了大的重排。并通过包含 8 个基因和 15 个转座元件的青花菜 BAC 克隆片段 B19N3 和其在拟南芥对应的序列进行比较分析, 说明染色体数目和染色体上的重排及转座元件的变异是导致 2 个品种分离的原因, 同时 2 个品种又保留了相应基因的一般共线性^[24]。Dan 等^[25]将包含参与脂肪族硫苷途径的主要基因的 5 个克隆进行测序, 并与拟南芥和白菜中相似序列进行比较分析后, 也得出了同样的结论。

以上的研究均是利用甘蓝 BAC 文库, 对白菜、拟南芥和甘蓝等同源物种进行比较基因组学分析, 以了解基因功能、表达机理和物种进化。由于甘蓝全基因组序列尚未公布, 前人的研究仅限于抗病基因、脂肪族硫苷等一些同源区域的比较, 通过甘蓝 BAC 构建物理图谱、BAC 克隆筛选和测序, 将有利于各功能基因的图位克隆, 了解各自的调控机制, 进一步加快甘蓝新品种培育的进程。为此, 北京市农林科学院蔬菜研究中心甘蓝课题组以高抗枯萎病、富含硫代葡萄糖苷的结球甘蓝自交系 R4P1 为材料构建了甘蓝全基因组 BAC 文库, 构建的 BAC 文库不仅可用于甘蓝抗枯萎病基因的克隆, 还将用于甘蓝其他功能基因的克隆及基因组学的研究。

1 材料和方法

1.1 试验材料的准备

供试材料为北京市农林科学院蔬菜研究中心甘蓝抗枯萎病品种 R4P1, 高抗枯萎病、易抽薹、晚熟、

扁球、富含硫代葡萄糖苷。播种于蛭石、草炭比例为 1:2 的营养钵中, 遮光处理, 幼苗第一片真叶展开时, 收集幼嫩的真叶, 迅速液氮冷冻备用。

构建文库的载体为美国 Epicentre 公司的 Copy Control™ pCC1BAC™ Vector; 感受态细胞采用 Epicentre 公司的 EPI100 菌株。

1.2 BAC 文库构建方法

1.2.1 细胞核 DNA 的提取、包埋 (plugs) 和处理

取遮光处理的幼嫩真叶 25 g, 于液氮中研磨成粉; 将粉末转入 100 mL 预冷的 $1 \times$ HB 中 (含 0.1% β -巯基乙醇 + 10% Triton-100), 冰上轻轻涡旋 10 min, 然后用 2 层纱布和 2 层 Microcloth 过滤到预冷的 50 mL 离心管中; 滤液在 4 °C, 4 500 r/min 下离心 20 min。弃上清, 得到含细胞核的沉淀。用 5 mL 核离析液悬浮细胞核, 合并各离心管的溶液, 4 °C, 4 500 r/min 离心 10 min, 重复一次; 加入不含 β -巯基乙醇和 Triton-100 的核离析液 1 mL; 42 °C 水浴 3 min, 迅速加入等体积的 1.5% 的低熔点琼脂糖, 轻轻混匀, 加入 Plug mold 中, 冰上 30 min, 制备成胶块。将冷凝后的包埋块转移到含有蛋白酶 K 的裂解缓冲液中 (含 1% Sarcosyl, 50 mg Proteinase K, 0.4 mol/L EDTA), 在杂交炉 50 °C 裂解 22 h。更换一次裂解缓冲液, 在杂交炉中 50 °C 继续裂解 22 h。去除裂解液, 加入 TE 缓冲液, 冰上振荡 2 h。更换 TE 缓冲液, 冰上振荡洗涤 2 次, 每次 1 h。利用脉冲电泳进行纯化, 去除降解的 DNA。

1.2.2 高分子量 DNA 的部分酶切与组分的选择

用 20, 40 U 的 *Hind* III 分别酶切 2 个胶块, 置于 37 °C 水浴中酶切反应 1 h, 用 1/10 体积的 0.5 mol/L EDTA 终止反应。脉冲电泳条件为: 电压 6 V/cm, 起始脉冲 60 s, 终止脉冲 90 s, 脉冲时间 12 h。根据脉冲电泳图确定最佳酶切条件。进一步大量酶切高分子量 DNA, 回收 100 ~ 300 kb 的片段。第 1 次选择 100 ~ 300 kb 的 DNA, 然后分成两部分 (100 ~ 200, 200 ~ 300 kb), 分别进行第 2 次电泳, 电泳后选择合适组分将 DNA 胶块切割下来回收。第 1 次电泳条件同酶切, 第 2 次电泳条件为: 10 s, 3 s, 8 h。

1.2.3 电洗脱法回收 DNA 将透析袋剪成合适的大小 (10 ~ 20 cm), 用冰冷的去离子水浸泡 1 d 之后再用冰冷的 $0.5 \times$ TBE 浸泡 1 d, 备用。将切下的含 DNA 的胶条分别放进一端扎好的透析袋中, 加入适量的 $0.5 \times$ TBE 电泳液, 赶走气泡, 夹好袋口。将透析袋刚好浸没于 $0.5 \times$ TBE 的电泳槽中进行电泳, 使 DNA 分子迁移出凝胶, 进入透析袋的溶液中。结束后将透析袋旋转 180°, 电泳 30 s, 以解离透析袋上

的 DNA 分子。将透析袋放入 4 ℃ 的 0.5 × TE 中 2 h。中间更换 1 次 TE 溶液。用枪头小心地吸出透析袋中的液体,以不同浓度的 λDNA 为对照,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的浓度。

1.2.4 基因组 DNA 和载体 DNA 的连接 按照试剂盒说明将电洗脱回收的大片段 DNA 与经酶切脱磷酸化后的载体以 1:10 进行连接,连接体系为:载体 10 ng,部分酶切的大片段 DNA 100 ng,10 × Buffer 10 μL,T4 连接酶 1 μL(NEB),加 ddH₂O 至 100 μL,16 ℃ 连接过夜。65 ℃ 温育 15 min,完全灭活 T4 DNA 连接酶的活性。将连接产物用 0.5 × TE 于 4 ℃ 下透析 3 h。取 2 μL 连接产物进行电击转化。

1.2.5 电转化 将电击杯置于冰上预冷,取 20 μL 冰上解冻的大肠杆菌 EPI 300 感受态加入 2 μL 连接物,混匀,冰上放置 5 min;进行电击转化,电击条件为:电阻 200 Ω,电压梯度 1.4 kV/cm,电容 25 μF;立即向电击杯中加入 1 mL 37 ℃ 预热的 SOC 培养基,混匀,转移到 1.5 mL 的离心管中,37 ℃ 复苏 1 h 后,将转化产物涂布于 LB 琼脂板上(LB 琼脂板含 12.5 μg/mL 氯霉素,60 μg/mL X-gal 和 15 μg/mL IPTG),37 ℃ 倒置培养 24 h。通过蓝白斑筛选,鉴别可能的重组克隆。

1.3 插入片段大小的分析

随机挑取 BAC 克隆 16 个,按照碱裂解法提取质粒,*Not* I 酶切检测插入片段的大小和空载率。若检测的 BAC 克隆插入片段大小和空载率符合要求,则进行连接产物的大规模转化,挑取的克隆储存在含 80 μL 冻存液的 384 孔板中,-80 ℃ 保存。

2 结果与分析

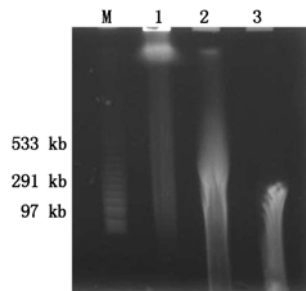
2.1 甘蓝基因组 DNA 的提取及质量检测

为了保证甘蓝基因组中不受叶绿体 DNA 的污染,播种的甘蓝材料采用遮光处理,在第一片真叶展开时收集第一片细嫩真叶,参考 Zhang^[26] 和 Ma^[27] 的方法提取核 DNA,包埋在 Plug 里,经蛋白酶 K 消化后电泳检测 DNA 质量,所得到的 DNA 分子量远大于 600 kb(图 1 第 1 泳道),降解少,适用于 BAC 文库的构建。

2.2 最佳酶切条件的选择

BAC 文库构建需要不完全酶切,即控制好酶的浓度和酶切时间,将高分子量 DNA 随机打断使片段大小集中在所需的范围内,然后通过脉冲场电泳找到合适长度的 DNA 片段,酶切太过或不够则得到的目标 DNA 片段不足。一般来说,BAC 文库最适宜的插入片段长度为 100 ~ 300 kb,为保证 BAC 文库

的片段长度,根据经验选取了 2 个梯度的 *Hind* III 酶浓度,酶切整个胶块 1 h。图 1 中 2,3 泳道分别为 20,40 U 的 *Hind* III 酶切 1 h 后的电泳条带,可看出在 20 U,1 h 酶切条件下,条带大小集中在 300 ~ 500 kb,不符合建库要求,而在条件 40 U,1 h 下条带主要集中在 100 ~ 300 kb,是需要的目的条带。所以选择的最佳酶切条件为:40 U,1 h。



M. Marker NBE N0340 s;1 泳道. 甘蓝基因组 DNA; 2~3 泳道. 分别为 20,40 U *Hind* III 酶。

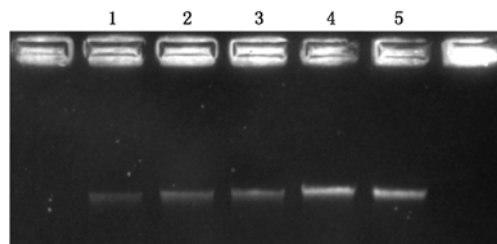
M. Marker NBE N0340 s;1 lane. Genomic DNA from *Brassica oleracea*;2-3 lanes. 20,40 U *Hind* III enzyme, respectively.

图 1 甘蓝 DNA 的检测及最佳酶切条件的确定

Fig.1 Determination of DNA from *Brassica oleracea* and determination of optimal partial digestion conditions

2.3 回收 DNA 浓度的确定

大片段 DNA 和载体以 1:10 的比例进行连接可提高连接产物的转化效率,为了确定连接所用的大片段 DNA 的用量,用不同量的 λDNA 作为对照来确定回收的 DNA 片段的浓度。由图 2 可看出 4,5 泳道均比第 3 个泳道条带亮,经计算回收的 DNA 浓度 >5 ng/μL,能够满足连接的需要。



1~3 泳道. λDNA 分别上量为 20,30,40 ng;4~5 泳道. 8 μL 回收的 DNA。
1-3 lanes. λDNA of 20,30,40 ng, respectively;
4-5 lanes. 8 μL DNA extraction from agarose.

图 2 回收的 DNA 浓度检测

Fig.2 Determination of DNA concentration with lambda DNA contrast gels

2.4 文库构建

载体为美国 Epicentre 公司的 CopyControl™ pCC1BAC™ vector,结构图见图 3 酶切位点为 *Hind* III 383。该载体来源于 pBeloBACII 和 plndigoBAC 这 2 种载体,不仅含有作为抗性选择标记的氯霉素抗性基因位点和用于蓝白斑筛选的 LacZ,而且具有高拷贝复制起始原点 oriV,可受诱导使 BAC 质粒扩增为

多拷贝。在构建文库前载体需经 *Hind* III 酶切并进行脱磷酸化处理, 10 ng/ μ L 分装。脱磷酸化即将单酶切后的产物 5' 端突出的磷酸基团消化掉, 目的是为了防止载体发生自连, 便于载体与目标片段的连接。以 1:10 的比例将 DNA 与处理后的载体进行连接转化涂板, 通过蓝白斑筛选鉴别可能的重组克隆, 本试验获得的克隆共贮存在 191 个 384 孔板中, 经计算总克隆数为 73 344 个。

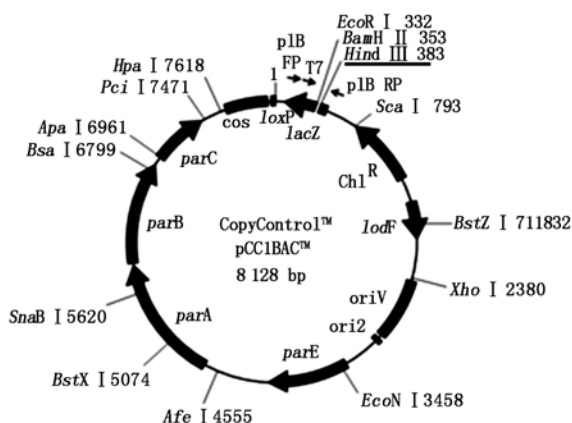


图3 Copy Control™ pCC1BAC™ 载体结构示意图

Fig. 3 Structure diagram of CopyControl™
pCC1BAC™ vector

2.5 文库质量检测

连接产物大规模转化后涂板, 挑取的克隆储存在含 80 μ L 冻存液的 384 孔板中, -80°C 保存。由于载体在 *Hind* III 383 插入位点两端各有一个 *Not* I 位点, 因此, 以 *Not* I 消化后可以将插入片段释放出来。经统计总克隆数, 73 344 个中空载率 <3%。为验证构建的甘蓝 BAC 文库插入片段的大小, 随机挑取了 16 个 BAC 克隆, 经 *Not* I 酶切检测, 插入片段的平均大小约 97 kb (图 4), 经计算文库覆盖约 10.9 倍的甘蓝基因组, 筛选到甘蓝任一基因的概率为 99.99%。表明构建的甘蓝 BAC 文库质量较好, 可用于后续的研究。

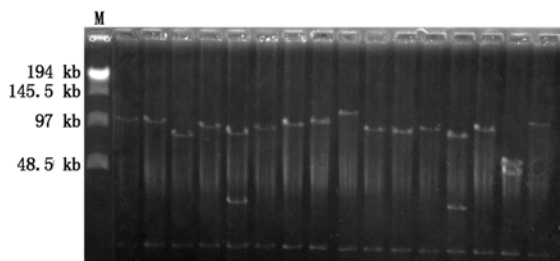


图4 BAC 克隆插入片段大小检测

Fig. 4 Evaluation of insert size of BAC clones

3 讨论

构建 BAC 文库的关键之一是提取高质量的核 DNA。在植物细胞中, 叶绿体的基因组拷贝可能包

括了大部分的 DNA, 为了降低细胞器 DNA 的影响, Nam 等^[17]在采样前将黄瓜在黑暗中处理了 2 d, 本试验也采用了遮光处理, 并且取的是刚长出的幼嫩的第一片真叶, 它所含营养物质较少, 可有效避免叶绿体 DNA 的影响; 另外在提取高分子量 DNA 时, 加入的 10% Triton-100 也可以优先裂解叶绿体和线粒体, 这些都利于高纯度核 DNA 的获得, 本试验获得的甘蓝基因组 DNA 远大于 600 kb 且降解少, 说明提取的 DNA 质量高。高效的载体是 BAC 文库构建成功的另一关键因素, 本试验采用的载体与构建西瓜 BAC 的载体^[16]及甘蓝型油菜的^[28]一样, 均是 CopyControl™ pCC1BAC™, 它来源于 pBeloBACII 和 pIndigoBAC 2 种载体, 不仅含有作为抗性选择标记的氯霉素抗性基因位点和用于蓝白斑筛选的 *LacZ*, 而且具有高拷贝复制起始原点 *oriV*, 可受诱导使 BAC 质粒扩增为多拷贝。

DNA 部分酶切所用的最佳酶浓度和时间是获取所需目的片段的保证, 酶浓度和酶切时间因品种而异, 本试验选择的 40 U, 1 h, 虽然是针对整个 plug 而言, 但与大白菜 BAC 文库构建中 1/3 plug 所需的 1.5 ~ 2.5 U, 30 min^[29]及甘蓝型油菜的 1/8 plug 所需的 1.2 U, 8 min^[28]等的酶切条件相差很大。

酶切电泳后的条带常因小分子量的 DNA 吸附在大分子量 DNA 上而导致回收的目的片段偏小, 所以理论上讲经多次电泳回收可提高 DNA 的整齐度, 但这同时又会降低 DNA 的浓度, 目前最常用的是二次电泳法回收 DNA。陈凡国等^[30]也研究发现, 相对于一次电泳法, 二次选择法得到的片段连接转化后转化效率及插入片段整齐度高, 空载率低, 因此, 本试验选取了二次电泳法, 在将第一次电泳选取的 100 ~ 200, 200 ~ 300 kb 组分别进行第二次电泳后, 条带大小分别为 48.5 ~ 97, 97 ~ 145.5 kb, 然后选取合适组分进行连接转化, 检测插入片段的平均大小为 97 kb。

高质量和高覆盖率的 BAC 文库将为后续的研究提供保障, 本试验所构建的甘蓝 BAC 文库的所有指标均符合要求, 空载率 <3%, 克隆总数为 73 344 个, 插入片段的平均大小为 97 kb, 甘蓝基因组大小约为 6.5 亿, 覆盖甘蓝基因组 10.9 倍, 根据经验公式 $N = \ln(1-p)/\ln(1-f)$ ^[31-32] (其中 N : 基因组文库最低所含克隆数; p : 任一基因被克隆的概率; f : 克隆片段的平均大小/生物基因组的大小) 筛选到甘蓝任一基因的概率为 99.99%。成功构建的甘蓝 BAC 文库将为基因的图位克隆、物理图谱的构建、基因组测序、比较基因组学分析等提供必要的技术

平台。利用 BAC 文库进行基因图位克隆的前提是找到与目标基因紧密连锁的分子标记,并用遗传作图和物理作图将目标基因定位在染色体的特定位置。目前在甘蓝中与许多重要基因紧密连锁的分子标记被开发,有的已被定位,如甘蓝枯萎病^[33-34]、根肿病^[35]、硫苷代谢途径基因、霜霉病、花发育相关基因等^[36],这些都可用于筛选文库,克隆相关的基因。总之,本试验构建的甘蓝 BAC 文库应用广泛,将是长期深入研究甘蓝基因组学的一个有利的工具。

参考文献:

- [1] Shizuya H, Birren B, Kim U J, *et al.* Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector [J]. *Proceedings of the National Academy Sciences of the USA*, 1992, 89(18): 8794 - 8797.
- [2] 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.
- [3] 王晓虹, 金黎明. 细菌人工染色体文库的构建及应用[J]. *生物技术通讯*, 2005, 16(6): 668 - 671.
- [4] Probst F J, Fridell R A, Raphael Y, *et al.* Correction of deafness in shaker-2 mice by an unconventional myosin in a BAC transgene [J]. *Science*, 1998, 280(5368): 1444.
- [5] Schibler L, Roig A, Mahé M F, *et al.* A first generation bovine BAC-based physical map [J]. *Genetics Selection Evolution*, 2004, 36(1): 105 - 122.
- [6] Jiang J M, Gill B S, Wang G L, *et al.* Metaphase and interphase fluorescence in situ hybridization mapping of the rice genome with bacterial artificial chromosomes [J]. *Proceedings of the National Academy Sciences of the USA*, 1995, 92(10): 4487 - 4491.
- [7] 陶勇生, 张祖新, 程友林, 等. 水稻 BAC 在玉米有丝分裂染色体上 FISH 杂交体系的构建[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2007, 23(1): 80 - 84.
- [8] Mozo T, Dewar K, Dunn P, *et al.* A complete BAC-based physical map of the *Arabidopsis thaliana* genome [J]. *Nature Genetics*, 1999, 22(3): 271 - 275.
- [9] Mun J H, Kwon S J, Yang T J, *et al.* The first generation of a BAC-based physical map of *Brassica rapa* [J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 280.
- [10] Zhu H, Blackmon B P, Sasimowski M, *et al.* Physical map and organization of chromosome 7 in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea* [J]. *Genome Research*, 1999, 9(8): 739 - 750.
- [11] 林海艳. 水稻基因组 BAC 物理图谱构建以及相关数据库、分析查询系统的本地搭建[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
- [12] Paux E, Sourdille P, Salse J, *et al.* A physical map of the 1-gigabase bread wheat chromosome 3B [J]. *Science*, 2008, 322(5898): 101 - 104.
- [13] Gonzalez J, Nefedov M, Bosdet I, *et al.* A BAC-based physical map of the *Drosophila buzzatii* genome [J]. *Genome Research*, 2005, 15(6): 885 - 892.
- [14] Tanksley S D, Ganai M W, Marti G B. Chromosome mapping: a paradigm for map-based gene cloning in plants with large genomes [J]. *Trends in Genetics*, 1995, 11(2): 63 - 68.
- [15] Song W Y, Wang G L, Chen L L, *et al.* A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21* [J]. *Science*, 1995, 270(15): 8405 - 8407.
- [16] T Joobeur, G Gusmini, X Zhang, *et al.* Construction of a watermelon BAC library and identification of SSRs anchored to melon or *Arabidopsis* genomes [J]. *Theor Appl Genet*, 2006, 112: 1553 - 1562.
- [17] Nam Y W, Lee J R, Song K H, *et al.* Construction of two BAC libraries from cucumber (*Cucumis sativus* L.) and identification of clones linked to yield component quantitative trait loci [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2005, 111(1): 150 - 161.
- [18] Yu Y, Tomkins J P, Waugh R, *et al.* A bacterial artificial chromosome library for barley (*Hordeum vulgare* L.) and the identification of clones containing putative resistance genes [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 101(7): 1093 - 1099.
- [19] 潘腾飞, 潘东明, 姜翠翠, 等. 琯溪蜜柚 BAC 文库的构建和汁胞粒化相关基因的筛选 [J]. *中国农业科学*, 2010, 43(18): 3791 - 3797.
- [20] 王文生, 王省芬, 马峙英, 等. 棉花抗黄萎病相关基因筛选与亚克隆文库构建 [J]. *华北农学报*, 2006, 21(Z1): 147 - 150.
- [21] 董莉, 任雪松, 李成琼, 等. 甘蓝硫甙组分和含量分析 [J]. *西南大学学报: 自然科学版*, 2012, 34(12): 34 - 38.
- [22] Vicente J G, King G J. Characterization of disease resistance gene-like sequences in *Brassica oleracea* L [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 02: 555 - 563.
- [23] Gao M Q, Li G Y, Potter D, *et al.* Comparative analysis of a *Brassica* BAC clone containing several major aliphatic glucosinolate genes with its corresponding *Arabidopsis* sequence [J]. *Plant Cell Reports*, 2006, 25(6): 592 - 598.
- [24] Gao M Q, Li Q Y, McCombie W R, *et al.* Comparative analysis of a transposon-rich *Brassica oleracea* BAC clone with its corresponding sequence in *A. thaliana* [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2005, 111(5): 949 - 955.
- [25] Dan Q, Gao M Q, Li G Y, *et al.* Comparative sequence analysis of *Brassica oleracea* with similar sequences in *B. rapa* and *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Reports*, 2009, 28(4): 649 - 661.
- [26] Zhang H B, Zhao X P, Ding X L, *et al.* Preparation of megabase-sized DNA from plant nuclei [J]. *Plant Journal*, 1995, 7(1): 175 - 184.
- [27] Ma Z Y, Song W, Peter J S, *et al.* Non-gridded library: A new approach for BAC (bacterial artificial chromosome) exploitation in hexaploid wheat (*Triticum aestivum*) [J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(24): 106.
- [28] 陈书元, 晁金泉, 徐有明, 等. 甘蓝型油菜-新疆野生油菜二体异附加系 BAC 文库的构建 [J]. *中国油料作物学报*, 2008, 30(2): 137 - 142.
- [29] 冯大领, 石学萍, 杨煜, 等. 大白菜细菌人工染色体文库的构建及鉴定 [J]. *园艺学报*, 2011, 38(1): 151 -

- 158.
- [30] 陈凡国,姜涛,张学勇. BAC 文库构建中的几个技术问题探讨[J]. 生物技术,2002,12(2):28-29.
- [31] Zhang H B. Manual for construction and manipulation of large insert bacterial clone libraries (unpublished) [M]. Texas:Texas A & M University,2000.
- [32] Peterson D G,Tomkins J P,Frisch D A,et al. Construction of plant bacterial artificial chromosome (BAC) libraries: An illustrated guide [J]. Agricultural Research Magazine,2000,5:1-100.
- [33] Pu Z J,Shimizu M,Zhang Y J,et al. Genetic mapping of a fusarium wilt resistance gene in *Brassica oleracea* [J]. Molecular Breeding,2012,30(2):809-818.
- [34] 朱洪运,颜建明,郁继华,等. 结球甘蓝 AFLP、SSR、SRAP 标记高密度遗传图谱构建[J]. 华北农学报,2013,28(3):82-87.
- [35] Tomita H,Motoki S,Doullah M A,et al. Accumulation of quantitative trait loci conferring broad spectrum clubroot resistance in *Brassica oleracea* [J]. Molecular Breeding,2013,32(4):889-900.
- [36] Gao M Q,Li G Y,Yang B,et al. High-density *Brassica oleracea* linkage map: identification of useful new linkages [J]. Theoretical and Applied Genetics,2007,115(2):277-287.

欢迎订阅 2015 年《中国农业科学》中、英文版

《中国农业科学》中、英文版是由农业部主管、中国农业科学院与中国农学会共同主办的综合性学术期刊。主要刊登农牧业基础科学和应用基础科学研究论文、综述、简报等。设有作物遗传育种·种质资源·分子遗传学;耕作栽培·生理生化·农业信息技术;植物保护;土壤肥料·节水灌溉·农业生态环境;园艺;贮藏·保鲜·加工;畜牧·兽医·资源昆虫等栏目。读者对象为国内外农业科研院(所)、大专院校的科研、教学与管理人员。

《中国农业科学》中文版为半月刊,影响因子、总被引频次连续多年居全国农业科技期刊最前列或前列位次。为北京大学图书馆 1992—2011 年连续 6 次遴选的核心期刊,位居《中文核心期刊要目总览》“农业综合类核心期刊表”的首位。1999—2008、2013—2014 年获“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金”资助。1999 年获“首届国家期刊奖”,2003、2005 年获“第二、三届国家期刊奖提名奖”;2002—2013 年先后 11 次被中国科学技术信息研究所授予“百种中国杰出学术期刊”称号;2009 年获中国期刊协会/中国出版科学研究院“新中国 60 年有影响力的期刊”称号;2010、2013 年荣获“第二、三届中国出版政府奖期刊提名奖”,2013 年获新闻出版广电总局“百强科技期刊”称号;2012、2013 年获清华大学图书馆等“2012、2013 中国最具国际影响力学术期刊”称号。

《中国农业科学》中文版大 16 开,每月 1、16 日出版,国内外公开发行。每期 208 页,定价 49.50 元,全年定价 1188.00 元。国内统一连续出版物号:CN11-1328/S,国际标准连续出版物号:ISSN 0578-1752,邮发代号:2-138,国外代号:BM43。

《中国农业科学》英文版(Agricultural Sciences in China,ASA),2002 年创刊,月刊。2012 年更名为《农业科学学报》(Journal of Integrative Agriculture,JIA)。2006 年 1 月起与国际著名出版集团 Elsevier 合作,全文数据在 ScienceDirect 平台面向世界发行。2009 年被 SCI 收录,2013 年 JIA 影响因子为 0.625。

JIA 大 16 开,每月 20 日出版,国内外公开发行。每期 180 页,国内订价 80.00 元,全年 960.00 元。国内统一连续出版物号:CN 10-1039/S,国际标准连续出版物号:ISSN 2095-3119,邮发代号:2-851,国外代号:1591M。

《中国农业科学》中、英文版均可通过全国各地邮局订阅,也可向编辑部直接订购。

地址:北京中关村南大街 12 号《中国农业科学》编辑部 邮编:100081

电话:010-82109808,82106281,82105098 传真:010-82106247

网址:www.ChinaAgriSci.com E-mail:zgnykx@caas.cn

联系人:林鉴非