

尼罗罗非鱼微阵列 Fosmid 基因组文库的构建及基因筛选

李明辉[#], 吴风瑞[#], 熊传奇, 曾 圣, 杨世杰, 叶 凯, 蒋汶洮,
孙运侶, 黄宝锋, 魏莹莹, 焦 静, 顾 源, 王德寿^{*}

(西南大学生命科学学院,淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室,重庆 400715)

摘要:以 pCC2FOS 为载体构建尼罗罗非鱼 Fosmid 基因组文库,共挑选 115 200 个单菌落,保存在 300 块 384 孔样品板中,构建 4 800 个行池、7 200 个列池、300 个板池和 25 个超级池,形成微阵列,并对其进行复制备份。该文库插入片段平均长度约为 40 kb,覆盖约罗非鱼基因组的 3 倍。连续传代实验研究表明,文库具有良好的稳定性。由于构建超级池-板池-行、列池三级池系统形成的微阵列,有助于快速、准确、有效地筛选目的基因,仅需 77 个 PCR 反应(超级池 25+板池 12+行池 16+列池 24)就能筛选到含有目的基因的一个单克隆,解决了普遍存在的文库筛选难题。通过文库尝试筛选 18 个与性别分化和生长相关基因,均获得 2~5 个阳性克隆,说明文库具有较好的实用性。

关键词:尼罗罗非鱼;基因组文库;微阵列;基因筛选

中图分类号:Q 785; S 917

文献标识码:A

高分子量基因组文库(genomic library with high molecular weight inserts)是开展基因组学研究,如基因的图位克隆^[1]、物理图谱的构建^[2]、分子标记的发掘^[3-4]、染色体定位^[5]、全基因组测序和比较基因组学研究^[3]等的必备工具。稳定的大片段基因组文库是生物基因组结构和功能分析的基础。Fosmid 载体系统是近年来应用较为广泛的构建大片段文库的新载体,其含有大肠杆菌 F 因子的黏粒(cosmid)^[6],既具有黏粒载体增殖与包装效率高的优点,又有大肠杆菌 F 因子单拷贝、稳定性高、随机性好的特性;同时载体上又有一个可诱导的 *oriV* 高拷贝复制起始点,需要时可诱导达到高拷贝(50 个左右),便于下游指纹图谱、末端测序、染色体定位等工作的开展。与细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome, BAC)相比,Fosmid 载体可诱导增殖,便于操作。目前已广泛应用于条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)^[6]、大猩猩(*Pongo pygmaeus*)^[7]、绿头鸭(*Anas*

platyrhynchos)^[5]、海鞘(*Botryllus schlosseri*)^[1]、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)^[8]、长臂猿(*Nomascus leucogenys*)^[9]、黄瓜(*Cucumis sativus*)^[10]和半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)^[11]等物种基因组文库的构建,大大促进了这些物种功能基因组学研究,但在鱼类的应用较少。此外,由于 Fosmid 克隆插入片段较大(30~50 kb),成为制备单拷贝探针的理想材料。WANG 等^[11]采用荧光原位杂交技术(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)成功将半滑舌鳎 4 个 Fosmid 克隆进行染色体定位;ZHNAG 等^[12]成功地将 Fosmid 克隆定位到栉孔扇贝的染色体上,实现对栉孔扇贝 5 对染色体的区分。

尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)隶属于鲈形目(Perciformes),丽鱼科(Cichlidae),罗非鱼属(*Oreochromis*),具有适应性强,繁殖力高,抗病力强和肉味鲜美等特点,是联合国粮农组织向世界各国推荐的优良养殖对象。目前,我国已成为全球最

收稿日期:2010-09-28 修回日期:2010-11-11

资助项目:农业部“九四八”项目(2010-Z56);国家“八六三”高科技研究发展计划(2007AA10Z165);国家自然科学基金委员会与香港研究资助局联合科研基金(30831160508);国家自然科学基金(3087195,30770272,31030063);教育部博士点基金项目(20090182110008);重庆市科委攻关项目(CSTC,2008AC1016);重庆市自然科学基金项目(CSTC,2008BB1006)

作者简介:李明辉,吴风瑞为同等贡献作者

通讯作者:王德寿,Tel:023-68253702,E-mail:wdeshou@swu.edu.cn

大的尼罗罗非鱼生产国和出口国。尼罗罗非鱼在生长速度上显示明显的性别二态性,雄鱼比雌鱼生长快约50%。因此,通过对其性别决定与分化的分子机制的研究^[13-14],建立分子辅助选育技术(marker-assisted selection),获得全雄种群进行单性养殖以提高产量与经济效益是水产养殖的发展方向^[15]。尼罗罗非鱼基因组信息相对缺乏,制约了许多研究工作的深入开展,因此 Fosmid 文库的构建不仅可用于筛选雌、雄性别特异的 DNA 片段标记,进而通过基因组步移分离与性别决定和分化相关基因,阐明尼罗罗非鱼性别决定的分子机制,建立分子标记辅助选育技术;还可以为构建遗传连锁图谱和数量性状基因座位(quantitative trait loci, QTL)定位等方面起到辅助作用,为培育出抗病、抗寒、生长快速、肉味鲜美的良种鱼奠定基础。本研究以 pCC2FOS 为载体成功构建尼罗罗非鱼的大片段基因组文库,为该物种后续的基因组学研究、性别决定的分子机制、分子标记和遗传改良育种等研究工作的深入开展提供重要的工具。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验用尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)于2007年从日本国立基础生物学研究所引进,在西南大学(重庆北碚)培育建系。选取10月龄雄鱼一尾,活体解剖后取精巢、肌肉和鳍条3个样品,无水乙醇脱水后,4℃保存。

1.2 主要试剂

本实验采用美国 Epicentre 公司 CopyControl™ Fosmid 文库构建试剂盒,限制性内切酶 *Not* I、*Eco*R I 和 *Hind* III、T₄ DNA 连接酶试剂盒购自 TaKaRa 公司,酚、氯仿、无水乙醇等为国产试剂。

1.3 方法

尼罗罗非鱼基因组 DNA 的提取 采用酚/氯仿法^[8]提取基因组 DNA,取 30 μg DNA 于 Eppendorf 管中用 200 μL 的吸头轻轻吹打随机剪切 DNA,1.0% 低熔点琼脂糖凝胶电泳, -20℃ 保存备用。

DNA 片段的末端修复 利用 Fosmid 文库构建试剂盒提供的 T₄ DNA 聚合酶将外源 DNA 片段进行末端补齐和 5'端磷酸化处理,进行末端修复,并检测修复后的浓度。末端修复按照试剂盒提供的说明书进行,反应体系总量为 40 μL,含 10 × End-Repair Buffer 4 μL,2.5 mmol/L dNTP Mix 4 μL,10

mmol/L ATP 4 μL,End-Repair Enzyme Mix 2 μL 和提取的 DNA 10 μg,室温下温育 45 min,70℃ 10 min 终止末端修复酶活性,并检测修复后的浓度。

连接与包装 取 0.25 μg 末端修复后的 DNA,加入 pCC2FOS Vector 0.5 μg,并加入 2 μL T₄ DNA 连接酶,总体系 10 μL,16℃ 连接 20 h。冰上融化包装蛋白,取 25 μL 包装蛋白 30℃ 包装 90 min,然后再加 25 μL 包装蛋白,30℃ 包装 90 min。最后加入 1 mL PDB(phage dilution buffer)和 25 μL 氯仿。

滴度计算 将包装产物按照 10²、10⁴、10⁵、10⁶ 梯度稀释,分别取 10 μL 稀释产物感染宿主菌 EPI300™-T1^R,37℃ 温育 20 min,涂板,37℃ 倒置培养 20 h,根据公式:滴度(CFU/mL) = (菌落数 × 稀释倍数 × 10³ μL/mL) / 所用稀释未扩增文库的量(μL),计算滴度。

插入片段大小分析 随机挑取 10 个克隆分别接种于 10 管盛有 1 mL 含氯霉素的 LB 液体培养基的离心管中,并加入 1 μL 诱导液过夜培养,采用碱裂解法提取质粒 DNA^[6],*Not* I 酶切,方法按照 Takara 说明书进行,电泳检测并计算平均插入片段大小。

文库的稳定性分析 随机挑取 9 个克隆分别接种于 LB 液体培养基中継代培养 6 d,提取培养第 1 天(约 20 代)和第 6 天(约 100 代)菌液的质粒 DNA,经 *Eco*R I 和 *Hind* III 37℃ 酶切 5 h,电泳检测质粒酶切情况。

克隆的挑取、池的构建及备份保存 (1) A 板的构建:将 115 200 个单菌落从培养板上——挑至 300 块 384 孔深孔板,每孔中加入 300 μL 培养基,37℃ 培养过夜,并对培养板进行系统编号(即 A1 - A300)。

(2) 列池、行池的构建:将 A1 板第一列每孔吸取 100 μL 全部加入 B1 板(96 孔板)第一列的第一个孔即为一个列池,依次类推,A1 板共 24 列,占 B1 板前 3 列 24 个孔;同理,A1 板第一行每孔吸取 100 μL 到 B1 板第 4 列的第一个孔即为一个行池,依次类推,A1 板共 16 行,占 B1 板 4 列和 5 列的 16 个孔;B1 板的另一半放 A2 板的列池和行池。这样,每块 B 板放两块 A 板的行池和列池,300 块 A 板共使用 150 块 B 板建行池和列池。

(3) 板池的构建:向 B 板中每孔加入 1 mL 培养基,37℃ 培养过夜,从 B 板行池和列池每孔

吸取 200 μL 加入 10 mL EP 管构建板池;每个 B 板构建两个板池,例如,从 B1 板构建 A1 和 A2 板的板池。并与 A 板对应,共构建 300 个板池。

(4) 超级池的构建:从每个板池中吸取 500 μL 加入 10 mL EP 管构建超级池。每 12 块板池构建一个超级池如 A1 ~ A12 块板池构建超级池 C1,依次类推,具体构建流程如图 4。

(5) 保存:对 300 块原板(A 板)和所构建的行池、列池、板池和超级池进行复制备份,一份存放于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 作永久保存,另一份置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 供筛选使用,并对 300 个板池和 25 个超级池分别提取质粒保存。

基因筛选 根据构建的超级池、板池、行池和列池,选取 18 个与罗非鱼性别分化与生长相关基因(表 1)进行尝试性筛选,筛选时首先以超级池的菌液或提取的质粒为模板通过 25 个 PCR 反应找到目的基因所在的超级池,然后对超级池所对应的 12 个板池菌液或提取的质粒为模板进行 PCR 反应找到相应的板池,最后对定位的板池的行池和列池的筛选,通过行池和列池的交集找到目的基因所在的单菌落,以本实验室最新克隆的 *Igf-3* 为例进行筛选,所用罗非鱼 *Igf-3* 基因特异性引物为 Forward Primer: 5'-ACA GTC CAG AGT TTG AAG-3'; Reverse Primer: 5'-GTG CAT TTA TGA GTA GAT C-3'。

2 结果

2.1 DNA 抽提

本研究提取的肌肉、鳍条和精巢组织 DNA 片段大小基本一致,约 40 kb 左右。通过对比发现,肌肉中蛋白含量较高,鳍条中 DNA 浓度较低,而从精巢中抽提的 DNA 质量最好,且得率高、紫外分光光度计检测 $\text{OD}_{\text{A}260/\text{A}280} = 1.81$,纯度高,大小适合文库的构建(图 1)。

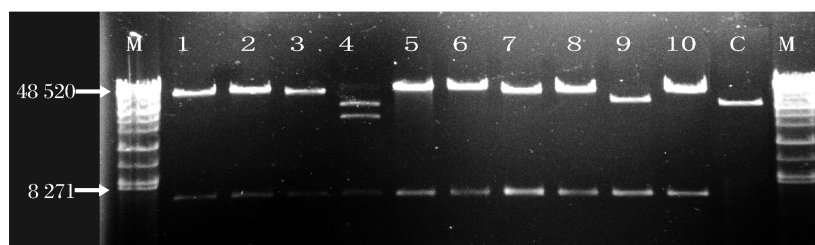


图 2 Fosmid 克隆 *Not I* 酶切图谱

M. 48 kb 分子量标记; 1~10. Fosmid 克隆的质粒; C. 对照 DNA。

Fig. 2 Gel electrophoresis of Fosmid clones digested by *Not I*

M. 48 kb marker; 1-10. Fosmid DNA; C. control DNA.

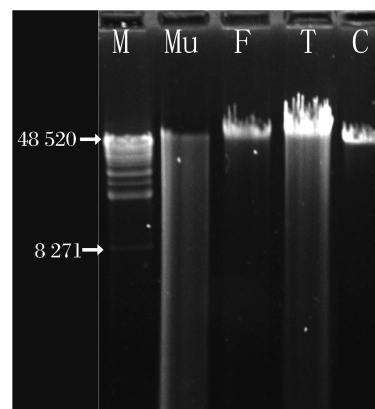


图 1 抽提获得的尼罗罗非鱼基因组 DNA 电泳图

M. 48 kb 分子量标记; Mu. 肌肉; F. 鳍条; T. 精巢; C. Control DNA。

Fig. 1 Gel electrophoresis analysis of the Nile tilapia genomic DNA

M. 48 kb marker; Mu. muscle; F. fin; T. testis; C. Control DNA.

2.2 DNA 片段回收与载体的连接

本研究参照 FUJIMOR 等^[16]的方法对试剂盒中的操作步骤进行改进,在末端修复前对 DNA 的大小进行选择,获得 40 kb 左右的片段后不需进行电泳回收直接进行末端修复,随后对末端修复的 DNA 进行几次酚氯仿抽提以去除其中的蛋白质等杂质。连接时采用 TaKaRa 公司的 T_4 DNA 连接酶进行连接,延长连接时间(约 20 h),获得良好的连接效果。

2.3 滴度计算

包装后进行滴度检测发现,经过 10^2 稀释的包装产物 10 μL 转化后可形成约 150 个单菌落,经计算,滴度为 1.5×10^6 CFU/mL,适合文库的构建。

2.4 插入片段大小分析

随机挑选了 10 个克隆,过夜培养、提取质粒,经 *Not I* 酶切电泳后发现插入片段大多集中在 (40 ± 2) kb(图 2),未发现空载,由此估算该文库的平均插入片段大小约为 40 kb。

2.5 稳定性检测

经 *EcoR* I 和 *Hind* III 对随机挑选的 9 个克隆摇菌、提取质粒并酶切后表明,第 1 天和第 6 天的

质粒酶切产物无任何明显差异(图 3),表明没有发现插入片段的丢失和重排。

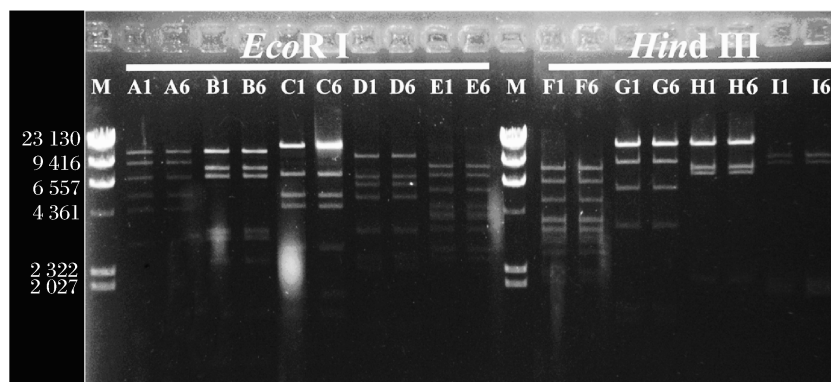


图 3 Fosmid 克隆的稳定性检测

A~I 代表 9 个不同的克隆; 1 和 6 代表第 1 天和第 6 天; M: 为 λ DNA/*Hind* III 分子量标记。

Fig. 3 Stability assay of Fosmid clones

DNA isolated from the initial culture (day 1) and the final culture (day 6) of nine individual clones (A~I) was digested with *EcoR* I or *Hind* III and separated on 1.0% agarose gel. M, represents the DNA/*Hind* III size marker

2.6 克隆的保存和池的构建及备份

本研究共挑选 115 200 个单菌落(克隆), 尼罗罗非鱼基因组大小(1.32×10^9 bp)^[17], 以每个克隆平均插入 40 kb 计算, 该文库覆盖约罗非鱼基因组的 3 倍, 得到任意单拷贝 DNA 序列的概率为 95.0%~99.0%。所有克隆保存在 300 块 384 孔深孔板中, 每块 384 孔板构建 16 个行池和

24 个列池, 因此总共构建 4 800 个行池和 7 200 个列池, 对每块板分别构建板池, 共构建 300 块板池, 然后每 12 块板池构建一个超级池, 共构建 25 个超级池, 由此形成罗非鱼微阵列 Fosmid 基因组文库(图 4), 并对其进行复制备份、保存, 保证文库的安全性。

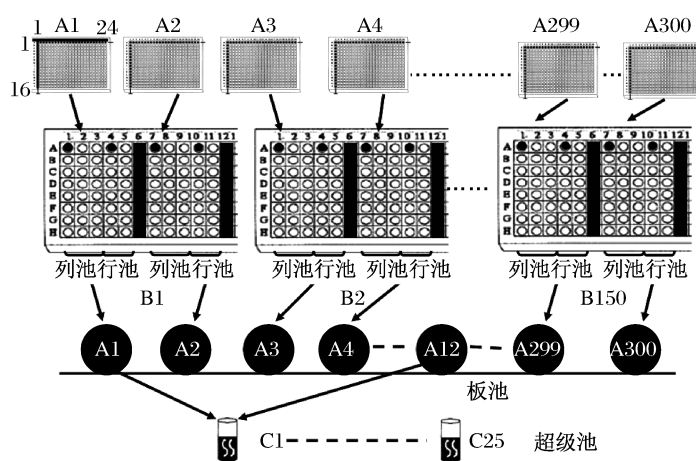


图 4 克隆的保存和池的构建

Fig. 4 A schematic illustration of colony storage and pool construction

2.7 筛选结果

通过该文库尝试性筛选 *Foxl2*、*Cyp19a1a*、*Igf-3*、*Dmrt1* 和 *Cyp26b1* 等 18 个基因, 平均每个

基因筛选到的阳性克隆数为 2~5(表 1)。筛选结果以 *Igf-3* 为例, 通过 25 个 PCR 反应发现 *Igf-3* 在 4、5 和 8 号超级池中存在, 对 4 号超级池对应的

12 个板池(A37 ~ A48 板池)通过 PCR 进行检测发现 43 号板池中存在阳性克隆,之后对 43 号板池的 24 个列池和 16 个行池进行 PCR 反应发现, *Igf-3* 在 43 号板池对应的 43 号板(A 板)的第 8 列、第 12 行的交集孔中存在,因此总共通过 77 个 PCR 反应就能找到一个 *Igf-3* 的单克隆(图 5),如需找到多个克隆,则需对 5 号和 8 号超级池对应的板池、行池和列池继续筛选。

表 1 尝试在 Fosmid 文库中筛选的基因及得到的阳性克隆数

Tab. 1 Tested genes and positive clones obtained from the Nile tilapia Fosmid library screening

基因 gene	阳性克隆数 no. of positive clone	基因 gene	阳性克隆数 no. of positive clone
<i>Cyp19a1a</i>	3	<i>P450C17- I</i>	3
<i>Dmrt1</i>	4	<i>P450C17- II</i>	2
<i>Wtlb</i>	2	<i>Cyp26b1</i>	3
<i>3β-HSD- I</i>	4	<i>Lrh-1</i>	3
<i>3β-HSD- II</i>	3	<i>Igf-1</i>	2
<i>Foxl2</i>	3	<i>Igf-2</i>	3
<i>Nanos2</i>	4	<i>Igf-3</i>	3
<i>Nanos3</i>	3	<i>Dmrt4</i>	5
<i>11β-hydroxylase</i>	3	<i>20β-HSD</i>	2

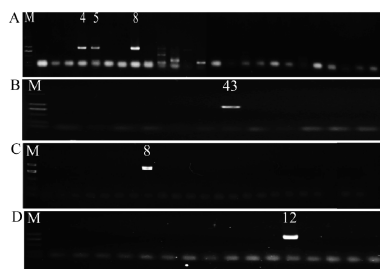


图 5 *Igf-3* 在超级池(A)、板池(B)、列池(C)和行池(D)中的筛选结果

M. 2 000 bp 分子量标记; 4, 5, 8 (A) 表示阳性克隆所在的超级池编号, 43 (B) 表示阳性克隆所在板池编号, 8 (C) 和 12 (D) 分别表示阳性克隆所在列池和行池编号。

Fig. 5 PCR screening of *Igf-3* from super-pools (A), plate pools (B), column-pools (C) and row-pools (D)

M. 2 000 bp marker; 4, 5, 8 (panel A) represent the number of super pool, 43 (panel B) represents the number of plate pool, 8 (panel C) and 12 (panel D) represent the number of column pool and row pool in which the positive clones located, respectively.

3 讨论

文库插入片段大小、对基因组的覆盖率和克

隆的稳定性是评价一个文库是否适用于基因组分析的三个重要方面。通过分析发现,随机挑取的 10 个 Fosmid 克隆均含有插入片段,且插入片段大小相差甚小,集中分布在 38 ~ 42 kb,符合 Fosmid 的包装限制原则。如果插入片段不稳定,产生缺失或重排,将给后续物理图谱的制作、大片段分析、基因定位等带来错误的结论, Fosmid 文库优于 Cosmid 文库的一个重要原因就是其克隆稳定性高,本研究对随机挑取的 6 个 Fosmid 克隆培养 100 代后即 6 d 后也不会发生插入片段的突变或丢失,说明罗非鱼的 DNA 片段可以在宿主大肠杆菌中稳定存在。

其次,大分子量、高纯度基因组 DNA 的制备是构建 Fosmid 文库的前提。不同的载体对基因组 DNA 长度的要求不同, DNA 过长或过短都会影响连接效率,对于 Fosmid 载体,基因组 DNA 合适的片段长度为 40 kb 左右,因此选取 35 ~ 45 kb 左右的 DNA 片段能保证连接的高效率。此外包装蛋白的保存(-70 °C)、受体菌的制备(本研究发现, OD₆₀₀ = 0.85 左右时转化效果最佳)和保存(4 °C 时不超过 3 d)也是影响转化效率的重要因素。

经尝试发现,如果在末端修复后对 DNA 进行电泳回收,其回收率低,而且需要在操作过程中十分小心谨慎,才能获得具有合适浓度的末端修复后的 DNA。如果回收的 DNA 浓度不能达到要求,连接效率将极其低,不能满足文库构建的要求。本研究参考 FUJIMOR 等^[16]的方法对试剂盒中的操作步骤进行改进,首先对提取的 DNA 大小进行检测,若 DNA 片段大于 40 kb,则用枪头轻轻吹打,直到 DNA 片段大小集中在 40 kb 左右,在获得 40 kb 左右的片段后直接进行末端修复,随后对末端修复的 DNA 进行几次酚氯仿抽提以去除其中的蛋白质等杂质,这样既避免末端修复后在电泳过程中 DNA 的大量丢失,也确保修复后 DNA 的浓度,同时无需在低温下进行低熔点琼脂糖凝胶电泳。由于连接的 DNA 片段较大,本研究使用了 TaKaRa 公司的 T₄ DNA 连接酶进行连接,在 16 °C 下连接 20 h,获得良好的连接效果。

目前文库的保存方法主要有单克隆保存法^[18]和混合池保存法^[19]两种,它们各有优点,也存在一定的缺陷。如果采用单克隆保存,筛选目

的基因时对每个单克隆都进行 PCR 或菌落杂交, 这样不仅工作量大, 也耗费大量资金; 混合池保存法在后续筛选上存在一定的难度, LIU 等^[20]首先发展一种称为克隆池 PCR (Pooled PCR) 法用于筛选混合保存的基因组文库, 这种方法在一定程度上减少了筛选的工作量, 但后续得到单克隆的工作量仍然较大。如何在基因组文库构建之后进行简单、快速和有效的筛选成为众多研究者进行基因组文库筛选面临的一大难题。因此本文库参考其他研究者的实验方法^[6,9,20]设计出通过构建行池、列池、板池和超级池三级池系统形成微阵列对 Fosmid 克隆进行保存、备份和筛选, 这样保存和建池有以下优点: 1) 通过构建超级池 - 板池 - 行、列池三级池系统来保存克隆并形成微阵列, 虽然增加建池的工作量, 但大大减少后续筛选的工作量, 筛选时只需通过三轮 PCR 反应 (超级池 25 个、板池 12 个、行池 16 个和列池 24 个, 共计 77 个 PCR 反应) 进行逐级定位, 最后就能通过行池和列池的交集找到含有目的基因的单克隆; 2) 目前通过基因组文库筛选目的基因主要通过 PCR 法^[18]、HDR (高密度影印膜) 杂交筛选法和菌落原位杂交^[21]等方法, PCR 筛选法已成为一种常用的文库筛选方法, 因为其操作简单, 成本较低, 同时不需要同位素和探针标记。本文库只需以所构建的三级池为模板进行 PCR 反应就能筛选到感兴趣的任意基因; 3) 构建超级池和板池不仅减少筛选步骤和工作量, 也可对超级池和板池进行的提取和保存, 直接用质粒 DNA 进行 PCR 筛选, 避免菌液的反复冻融, 也使筛选时灵敏度更高。同时插入片段的稳定性高, 不易发生插入片段的缺失或重排等, 使下游实验数据更加准确、可靠; 4) 对 300 块 384 孔板、超级池、板池和行、列池分别进行复制备份, 这样能保证在一套损毁的情况下还有另一套可供对其进行修复, 使用, 确保文库的安全性; 5) 对每个克隆进行单克隆保存, 这样有利于在行池和列池筛选之后可以快速定位得到目的基因所在的单克隆, 便于下游实验的开展, 节约时间, 不需再涂板进行 PCR 反应或菌落杂交进行单克隆验证。通过文库尝试筛选 18 个与性别分化和生长相关基因, 均获得 2 ~ 5 个阳性克隆, 也印证了文库的覆盖率约为基因组的 3 倍。

综上所述, 本文构建尼罗罗非鱼的大片段高质量基因组文库, 并首次在硬骨鱼类通过构建超

级池 - 板池 - 行、列池三级池系统形成微阵列进行简单、快速、准确的目的基因筛选, 解决文库筛选的难题, 并为本实验室在该物种后续的基因结构与启动子分析、基因组学研究、性别决定的分子机制和遗传改良育种等研究工作的深入开展奠定基础, 同时也可为国内外尼罗罗非鱼研究人员研究作参考。

参考文献:

- [1] TOMASO A W, WEISSMAN I L. Construction and characterization of Large-insert genomic libraries (BAC and fosmid) from the Ascidian *Botryllus schlosseri* and initial physical mapping of a histocompatibility locus [J]. *Marine Biotechnology*, 2003, 5(2): 103 - 115.
- [2] BIRREN B W, TACHIIRI Y, KIM U J, *et al.* A human chromosome 22 fosmid resource; mapping and analysis of 96 clones [J]. *Genomics*, 1996, 34 (1): 97 - 106.
- [3] QI X, LINDUP S, PITTAWAY T S. Development of simple sequence repeat markers from bacterial artificial chromosomes without subcloning [J]. *Biology Techniques*, 2001, 31(2): 355 - 362.
- [4] LICHTENZVEIG J, SCHEURING C, DODGE J, *et al.* Construction of BAC and BIBAC libraries and their applications for generation of SSR markers for genome analysis of chickpea, *Cicer arietinum* L. [J]. *Theoretical and applied genetics*, 2005, 110(3): 492 - 510.
- [5] MOON D A, MAGOR K E. Construction and characterization of a fosmid library for comparative analysis of the duck genome [J]. *Animal Genetics*, 2004, 35(5): 408 - 423.
- [6] 茅云翔, 崔菁菁, 孔凡娜. 条斑紫菜基因组 Fosmid 文库构建 [J]. *水产学报*, 2009, 33(3): 396 - 402
- [7] KIMU J, SHIZUYA H, DEJONG P J, *et al.* Stable propagation of cosmid sized human DNA inserts in an F factor based vector [J]. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20(5): 1083 - 1085.
- [8] 程洁, 张玲玲, 黄晓婷, 等. 栉孔扇贝 Fosmid 文库的构建及基因组结构特征分析 [J]. *中国海洋大学学报*, 2009, 38(1): 78 - 88.
- [9] CHENG L P, YE J P, LIU Y, *et al.* Construction, characterization, and chromosomal mapping of a fosmid library of the white-cheeked gibbon (*Nomascus leucogenys*) [J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2007, 5(3-4): 207 - 227.

- [10] MEYER J D, DELEU W, GARCIA-MAS J, *et al.* Construction of a fosmid library of cucumber (*Cucumis sativus*) and comparative analyses of the eIF4E and eIF(iso) 4E regions from cucumber and melon (*Cucumis melo*) [J]. *Molecular Genetics Genomics*, 2008, 279(5) : 473 - 480.
- [11] WANG X B, ZHNAG Q Q, SUN X H, *et al.* Fosmid library construction and initial analysis of end sequences in female half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. *Marine Biotechnology*, 2009, 11(2) : 236 - 242.
- [12] ZHNAG L L, BAO Z M, CHENG J, *et al.* Fosmid library construction and initial analysis of end sequences in Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) [J]. *Marine Biotechnology*, 2007, 9(5) : 606 - 612
- [13] WANG D S, KOBAYASHI T, ZHOU L Y, *et al.* Foxl2 up-regulates aromatase gene transcription in a female-specific manner by binding to the promoter as well as interacting with ad4 binding protein/steroidogenic factor 1 [J]. *Molecular Endocrinology*, 2007, 21(3) : 712 - 725.
- [14] WANG D S, ZHOU L Y, KOBAYASHI T, *et al.* Doublesex-1 and mab-3-related transcription factor-1 repression of aromatase transcription, a possible mechanism favoring the male pathway in tilapia [J]. *Endocrinology*, 2010, 151(3) : 1331 - 1340.
- [15] 童金苟, 朱嘉濠, 关海山. 鱼类性别决定的遗传基础研究概况 [J]. *水产学报*, 2005, 29(3) : 300 - 306.
- [16] FUJIMORI D G, HRVATIN S, CHRISTOPHER S, *et al.* Cloning and characterization of the biosynthetic gene cluster for kutznerides [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(42) : 16498 - 16503.
- [17] KATAGIRI T, ASAKAWA S, MINAGAWA S, *et al.* Construction and characterization of BAC libraries for three fish species; rainbow trout, carp and tilapia [J]. *Animal Genetics*, 2001, 32(4) : 200 - 204.
- [18] THOMAS J W, TOUCHMAN J W. Vertebrate genome sequencing; building a backbone for comparative genomics [J]. *Trends in Genetics*, 2002, 18(2) : 104 - 108.
- [19] BREITLING R, GERBER J K. Origin of the paired domain [J]. *Development Genes Evolution*, 2000, 210 : 644 - 650.
- [20] LIU Y G, NAGAKI K, FUJITA M, *et al.* Development of an efficient maintenance and screening system for large insert genomic DNA libraries of hexaploid wheat in a transformation competent artificial chromosome (TAC) vector [J]. *The Plant Journal*, 2000, 23(5) : 687 - 695.
- [21] 战爱斌, 胡景杰, 胡晓丽, 等. 富集文库 - 菌落原位杂交法筛选栉孔扇贝的微卫星标记 [J]. *水产学报*, 2008, 32(3) : 353 - 361.

Construction of a microarrayed Fosmid library and its application in gene isolation in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

LI Ming-hui[#], WU Feng-rui[#], XIONG Chuan-qi, ZENG Sheng, YANG Shi-jie, YE Kai, JIANG Wen-tao, SUN Yun-lv, HUANG Bao-feng, WEI Ying-ying, JIAO Jing, GU Yuan, WANG De-shou^{*}

(Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development, Ministry of Education, School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: Genomic DNA prepared from the Nile tilapia testis was used for Fosmid library construction. It was randomly sheared to ~40 kb fragments. End-repair and recovery of the size-fractionated DNA were manipulated according to the manufacturer's protocols. Ligation of the end-repaired fragments into the Fosmid vector pCC2FOS (Epicentre, USA) was performed by using T4 DNA ligase for 16 h at 4 °C. Fosmid clones were packaged using MaxPlaxi Lambda packaging extract provided by the kit. Infected EPI300TM-T1^R cells were grown at 37 °C in solid medium overnight. Well-separated colonies were picked out and transferred into individual wells of 384-well plates, each well with 300 L culture medium. After overnight incubation at 37 °C, 100 L medium was transferred from each of the 24 wells of every row of the 384-well plates into one well of the 96-well plate to construct row-pools. Totally 16 row-pools were constructed for each 384-well plate. Similarly, 100 L medium was transferred from each of the 16 wells of every column of the 384 well plates into one well of the 96-well plate to construct column-pools. Totally 24 column-pools were constructed for each 384-well plate. Plate-pools were constructed by pooling the 16 column-pools and 24 row-pools (200 L from each column- and row-pool) from the same 384-well plate. Totally 4 800 column-pools, 7 200 row-pools and 300 plate-pools were constructed and arrayed. The library was further arranged into 25 super-pools, each including a mixture of culture medium from 12 plate-pools (500 L from each plate-pool). Finally, All 384-well plates and constructed pools were replicated, one copy was kept at -80 °C for long-term storage, another copy was kept at -20 °C for routine use. The constructed tilapia Fosmid library encompasses 115200 clones. Any gene of interest can be screened only by 3 rounds of minimally 77 (25 + 12 + 40) colony PCR due to the array of super -, plate -, row - and column-pools. Fosmid stability assays were performed for the constructed library with 9 randomly picked clones by serial culture for 100 generations over a period of 6 days. The electrophoretic patterns of each clone digested with *Hind*III and *Eco*R I were identical from day 1 to day 6. No loss or rearrangement of the inserted DNA fragment was found during the continuous passage. Ten clones were randomly selected from the library and plasmids of these clones were prepared, digested with *Not* I and visualized by electrophoresis. All the 10 clones contained insert with an average size of around 40 kb, ranging from 38 to 42 kb. Therefore, the coverage rate of this library is about 3 genome equivalents, leading to a 98.7% probability of recovery of any specific sequences of interest. Eighteen genes related to tilapia sex differentiation and growth were screened to test the quality of the library. All of them were successfully isolated from this library, with each having 2 - 5 positive clones, confirming the 3 genome equivalents coverage rate and the availability of the library. In summary, a high-quality Fosmid library of the Nile tilapia with large insert (40 kb) was successfully constructed, microarrayed and characterized using the vector pCC2FOS.

Key words: *Oreochromis niloticus*; genomic library; Fosmid library; microarray; gene screening

Corresponding author: WANG De-shou. Tel: 023 - 68253702, E-mail: wdeshou@swu.edu.cn

[#]LI Ming-hui and WU Feng-rui contributed equally to this work.