



## 海带雌配子体细菌人工染色体 (BAC) 文库构建及 特异分子标记邻近基因的图位克隆与序列

刘鹏飞<sup>1</sup>, 谷俊刚<sup>1</sup>, 毕燕会<sup>1,2</sup>, 周志刚<sup>2\*</sup>

(1. 上海海洋大学, 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

2. 上海海洋大学, 国家海洋生物科学国际联合研究中心, 上海 201306)

**摘要:** UV 性别决定系统在一些低等生物生活史的单倍体阶段展现出特定的进化和遗传特性。实验构建了一个海带雌配子体基因组的细菌人工染色体 (BAC) 文库, 结果显示, 该文库包含 31 872 个克隆, 插入片段平均长为 115 kb, 覆盖 6.57 倍的海带基因组。利用海带雌配子体特异性的标记 FRML-1488 的序列为探针筛选 BAC 文库, 获得 4 个阳性 BAC 克隆。随机挑选一个克隆 (638-C12), 通过 Roche454 第二代测序平台进行测序, 并经过间隔序列的扩增、克隆和测序, 了解到该 BAC 克隆的插入片段长为 86 996 bp。该序列位于海带基因组的 Scaffold285 上, 占后者序列总长的 22.4%。序列分析结果显示, 在雌配子体特异性标记 FRML-1488 的上游存在大量的微卫星以及 *Copia* 逆转录转座子等重复序列。推测 BAC 克隆 638-C12 的插入片段可能与海带 U 染色体的性别决定区相关。本研究是 BAC 文库在海带性别相关序列图位克隆的首次应用报道, 将有助于海带性别染色体结构的揭示及性别决定机制的解析。

**关键词:** 海带; 雌配子体; 细菌人工染色体 (BAC) 文库; 分子标记; 图位克隆

中图分类号: S 917.3

文献标志码: A

一些藻类和苔藓植物在其生活史的单倍体阶段表现出雌、雄性特征<sup>[1]</sup>, 这种现象显然不同于高等植物或动物在二倍体个体中所呈现的 XY 或 ZW 性别决定系统。Bachtrog 等<sup>[2]</sup>认为单倍体的雌雄性别分别由 U 和 V 染色体决定, 因而称其为 UV 性别决定系统。近期, 在水云 (*Ectocarpus* sp.) 的 UV 性别决定系统及演化等研究中取得较大的突破。Ahmed 等<sup>[3]</sup>利用比较基因组学, 初步界定了水云的性别决定区 (sex-determining region, SDR) 及性别相关基因, 它的雌、雄性决定区大小相似 (约为 1 Mbp), 且只

占性染色体长度的五分之一, 其余五分之四对应于可发生重组的拟常染色体区 (pseudoautosomal region, PAR), 致使从形态上难以分辨 U 和 V 染色体, 这可能也是其雌、雄配子体之间表现出低水平性二型性 (sexual dimorphism) 的主要原因<sup>[4]</sup>。

海带 (*Saccharina japonica*) 是褐藻门 (Phaeophyta) 海带目 (Laminariales) 最重要的经济物种, 它具有典型的异形世代交替的生活史<sup>[5]</sup>及与水云一样的 UV 性别决定系统<sup>[6]</sup>。海带的雄配子体通常由十几至几十个细胞构成, 细胞直径较小 (5~

收稿日期: 2020-01-27 修回日期: 2020-05-21

资助项目: 国家自然科学基金 (41376136); 国家“双一流”水产学科

第一作者: 刘鹏飞 (照片), 从事藻类生物技术研究, E-mail: pengfei.liu@tuebingen.mpg.de

通信作者: 周志刚, E-mail: zgzhou@shou.edu.cn



8  $\mu\text{m}$ ), 呈分支丝状体发育; 而雌配子体多为1个或多个细胞的藻体, 大多为球形或梨形, 无或少分支, 细胞直径较大(11~22  $\mu\text{m}$ )<sup>[7]</sup>; 从而表现出典型的性二型性。对海带UV性别决定区域和性别决定基因的研究, 显然有助于了解性二型性形成的遗传基础。目前为止, 在海带的基因组<sup>[8]</sup>、转录组<sup>[9-10]</sup>等数据基础上, 筛选到一些与海带配子体性别相关的分子标记<sup>[6,11-14]</sup>, 但对海带性别决定机制以及性别染色体进化等问题的解决仍显不足。Gu等<sup>[13]</sup>利用简单重复序列间(inter-simple sequence repeat, ISSR)的扩增技术自海带雌配子体中筛选到一个分子标记FRML-1488, 并利用荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)技术, 将其定位于海带雌配子体的染色体上, 而雄配子体的染色体上无此杂交信号, 说明FRML-1488是海带雌配子体染色体的特异分子标记。由此推测, 该标记及其周围的基因可能与海带雌性性别的分化与形成有关。

但在利用该标记序列搜索海带的基因组数据库<sup>[8]</sup>时, 未获得相应的结果。于是, 本研究构建了海带雌配子体的细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome, BAC)基因组文库, 以FRML-1488为探针, 筛选到携带有FRML-1488标记序列的BAC克隆, 并对其进行序列分析。结果表明所构建的海带雌配子体BAC文库可用于物理图谱的构建及目的基因的图位克隆, 为后续的海带性别决定机制以及性别染色体分化等研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本实验所用的海带雌配子体无性繁殖系, 按已报道的方法<sup>[15]</sup>分离和保藏。在温度(17 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ 、光周期12L:12D(光/暗)、光照强度30  $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 条件下, 于PES培养基<sup>[16]</sup>中培养, 每2周换1次培养基。

### 1.2 BAC文库构建和质量检测

收集在黑暗条件下进行黄化培养1周的海带雌配子体25 g, 送至BIO S & T Inc. (Montreal, Canada)构建基因组BAC文库。首先使用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取海带雌配子体基

因组总DNA<sup>[17]</sup>; 之后使用HindIII部分酶切基因组DNA并完全酶切载体pIndioBAC-5 (Epicentre, USA), 用T<sub>4</sub>连接酶(Invitrogen, USA)将酶切后的目的产物与载体连接; 取1  $\mu\text{L}$ 连接产物, 加入20  $\mu\text{L}$ 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH10B感受态细胞(Invitrogen, USA), 冰上预冷30 min, 用Bio-Rad电击仪进行电击转化。

在转化后的感受态细胞中, 立即加入1 mL LB培养基, 于37  $^{\circ}\text{C}$ 复苏培养2 h。将复苏培养后的菌液涂于含12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的5-溴-4-氯-3-吡啶半乳糖苷(X-Gal)和25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)的LB固体培养基上, 37  $^{\circ}\text{C}$ 培养16~18 h。对LB平板上的菌落进行蓝白斑统计, 计算空载率。随机挑选10个BAC阳性克隆, 分别接种于LB液体培养基(含12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素)中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 提取BAC质粒后使用Not I限制酶完全酶切, 利用脉冲场电泳(PFGE)检测插入片段长度, 据此计算BAC文库的容量及基因组覆盖度。

挑取白色单克隆菌落于含有60  $\mu\text{L}$ 冰冻LB培养基的384微孔培养板中, 编号、盖上盖子, 置于37  $^{\circ}\text{C}$ 培养16~18 h, 于-80  $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中保存构建完成的海带雌配子体BAC文库。

### 1.3 含目的基因的BAC克隆筛选与测序

根据已报道的海带雌配子体特异性标记FRML-1488的序列(GenBank登录号: JX556866)<sup>[13]</sup>设计PCR引物1488-F1和1488-R1(表1), 筛选BAC文库。将384微孔板的一半(即192个微孔)克隆等量混合构建BAC一级池库, 培养12 h后进行菌液PCR以筛选文库。25  $\mu\text{L}$ 反应体系包含12.5  $\mu\text{L}$ 天根2 $\times$ Taq PCR MasterMix [0.1 U/ $\mu\text{L}$  Taq Polymerase、500  $\mu\text{mol}/\text{L}$  dNTP、20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3)、100 mmol/L KCl、3 mmol/L MgCl<sub>2</sub>], 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的上、下游引物各0.5  $\mu\text{L}$ , 1  $\mu\text{L}$ 菌液作为模板DNA以及10.5  $\mu\text{L}$ 超纯H<sub>2</sub>O。扩增程序包括94  $^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min, 紧接着按照94  $^{\circ}\text{C}$ 变性45 s, 57或61  $^{\circ}\text{C}$ 退火45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$ 延伸1.5 min的程序进行30个循环, 72  $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。扩增结果在1.0%的琼脂糖凝胶上进行电泳, 凝胶成像进行观察与拍照。

若PCR产物的电泳检测有目的产物条带, 将该一级池库所在克隆按行、列分别构建二级池库, 培养后使用同样的引物再进行菌液PCR。

表 1 本研究所使用的引物及其序列

Tab. 1 Nucleotide sequence of primers employed in the present study

引物 primer	序列(从5'到3') nucleotide sequence from 5' to 3'	退火温度/°C annealing temperature	产物大小/bp size of amplified product
<b>BAC克隆筛选 screening of BAC clones</b>			
1488-F1	TATGGTATCAGACTTGTCGCTTCA	60.8	974
1488-R1	AGGGGGGAGGGTGTGAA		
<b>BAC克隆的鉴定 PCR amplification for BAC identification</b>			
1488-F	AGAGAGAGAGAGAGAGGATGCCTTGCTTGTGT	61.0	1 488
1488-R	AGAGAGAGAGAGAGAGGGCGCCATTTCCT		
<b>Contig间隔序列的克隆 cloning of gaps between Contigs</b>			
Contig4-10F	AGCCCAACGGACTACGATGT	55.1	177
Contig4-10R	TGGAGGTACTGGATAGAGAGAC		
Contig8-1F	TGGGACTTGCCTCATTCT	61.5	361
Contig8-1R	GTGGTAGGGTTGCTGGAT		
Contig10-6F	GCCAATAGCCTTCGTGAGA	63.0	2 246
Contig10-6R	CTGAGACGCCCTGAACCA		
Contig6-8F	AGTAGGTGCTCCTTGCGCT	58.9	273
Contig6-8R	TCAACGAACATGGCGACCTCA		
Contig1-2F	ACGAAAGTTGACCCTTTACTGGCTGT	55	195
Contig1-2R	TCGGAGAAGGAGATCGTAGATAGTTC		
Contig2-5F	CGAGGGACGGTGGTAAGA	55	214
Contig2-5R	AAACGTGCGAAATTGCTG		
Contig5-7F	ACTTTCCTCCTTACTTCTTGC	54.9	315
Contig5-7R	GATTCGGTGGTGGGTGAT		
Contig7-3F	AAGCGTGGATGAAAGGAC	55	875
Contig7-3R	GTGACTTGACCACCTTGC		
Contig3-9F	ACGCAGCATACTGTTATACTCGAC	55	114
Contig3-9R	TCGTTGCATGCGTCACCTACACTAC		
<b>Contig6序列的验证 PCR amplification for Contig6 calibration</b>			
12F	AATAGACAGCCACGCCAGAG	59	555
12R	TCGCAGCCACCAAGGAAA		
23F	GCACGGGTCTACCAAGCA	58	887
23R	CGATTCATCAACGGTCAGC		
34F	CCCTCCGAATCTCATCAC	59	706
34R	GCCGCCGACTAAATCCCT		

二级文库的 PCR 产物中同时具有目的条带所对应的微孔即为筛选到的克隆。

将筛选到含有海带 FRML-1488 序列的 BAC 阳性克隆送上海南方基因科技有限公司, 使用通用引物 (T7 Promoter Primer: 5'-TAATACGACT CACTATAGGG-3' 和 pIndigoBAC-5 RP-2 Primers: 5'-TACGCCAAGCTATTTAGGTGAGA-3') 通过 ABI 的 3730XL 测序仪进行末端测序以验证, 然后利用第二代测序仪 Roche 454 Genome Sequencer FLX 进行测序。

#### 1.4 Contig 间隔 (gap) 序列的克隆及 BAC 克隆序列分析

使用 Newbler 软件对测序读数进行拼接后, 获得 BAC 克隆 638-C12 的 10 条 Contig 序列。根据其在基因组中的位置设计引物进行 PCR 扩增反应 (反应体系及程序如 BAC 克隆的筛选, 引物见表 1), 将 PCR 产物送至上海生工生物工程有限公司测序以获得间隔序列, 并手工拼接。利用 NCBI 的 Vec Screen (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/>) 去除载体序列。根据海带基因组的框架结构, 利用 IBS 1.0<sup>[18]</sup> 和 MapChart 2.32<sup>[19]</sup> 软件对 BAC 克隆 638-C12 的插入片段序列进行物理图谱的绘制。使用 RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org/>) 在线软件对 BAC 克隆的插入片段序列进行重复序列分析。使用 Blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 在线软件进行序列相似性比对分析。

## 2 结果

### 2.1 海带雌配子体 BAC 文库的构建和质量检测

从黄化培养的海带雌配子体中提取高质量核基因组 DNA, 经 *Hind* III 部分酶切并连接至载体 pIndioBAC-5 (大小约 7 kb) 上, 电击转换至大肠杆菌后获得 43 450 个克隆, 铺平板后发现蓝斑率小于 5%。

从构建的海带雌配子体的 BAC 文库中, 共获得阳性 BAC 克隆 31 872 个 (384×83 块板, 编号为 601~683)。为了检测 BAC 文库插入片段的大小和重组克隆的百分比, 随机挑取 10 个 BAC 克隆, 提取质粒 DNA 并经 *Not* I 酶切后, 利用 PFGE 检测, 结果显示, 该 BAC 文库插入片段的平均长度为 115 kb, 空载率不大于 10% (图 1)。鉴于

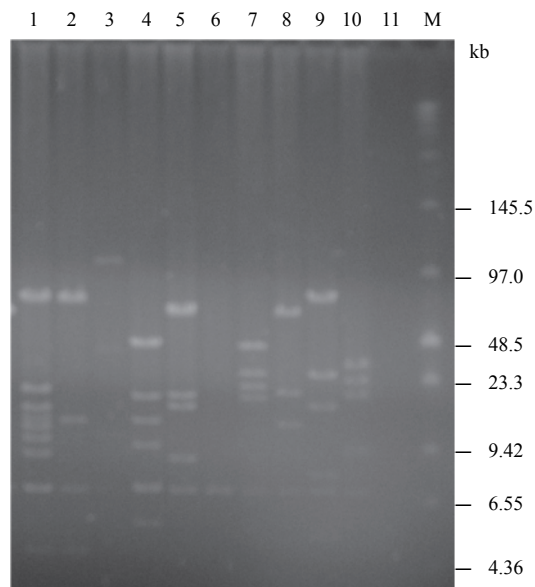


图 1 海带雌配子体 BAC 克隆插入片段大小的脉冲场电泳检测

泳道 1~10. 随机挑选的 10 个 BAC 克隆的 DNA 经 *Not* I 酶切后的脉冲场凝胶电泳; 泳道 11. 空白对照; 泳道 M.  $\lambda$  Ladder PFG 分子量标准 (New England Biolabs)

#### Fig. 1 Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of selected BAC clones from the constructed BAC library of the *S. japonica* female gametophytes

Lanes 1-10. *Not* I-digested DNA of BAC clones randomly selected from the BAC library of *S. japonica* female gametophytes; lanes 11. control with H<sub>2</sub>O instead of BAC clone DNA; lane M.  $\lambda$  Ladder PFG marker (New England Biolabs)

海带配子体的基因组大小约为 545 Mb (Ye 等<sup>[8]</sup>), 由此计算出该 BAC 文库的容量可以覆盖 6.57 倍的海带基因组。依据经验公式:  $N = \ln(1-p) / \ln(1-f)^{20-21}$ , 计算可知, 自该文库中筛选到任一个基因的概率为 99.86%; 该公式中,  $N$  为基因组文库所含克隆数,  $p$  为任一基因被克隆的概率,  $f$  为克隆片的平均大小/生物基因组的大小。

### 2.2 以海带 FRML-1488 序列为探针筛选 BAC 文库

Gu 等<sup>[13]</sup> 利用 ISSR-PCR 的方法获得了海带雌配子体特异标记 FRML-1488, 并利用 FISH 技术将其定位于海带雌配子体的 1 条染色体上。为了更好地了解染色体上该标记及其附近的基因信息, 实验基于图位克隆的原理, 根据 FRML-1488 的序列设计引物 1488-F1 和 1488-R1 (表 1), 筛选 BAC 文库 (图 2)。经重新设计引物 1488-F 和 1488-R (表 1), 对筛选到的克隆进行扩增反应以鉴定, 结果显示, 从 4 个 BAC 克隆中均能扩增



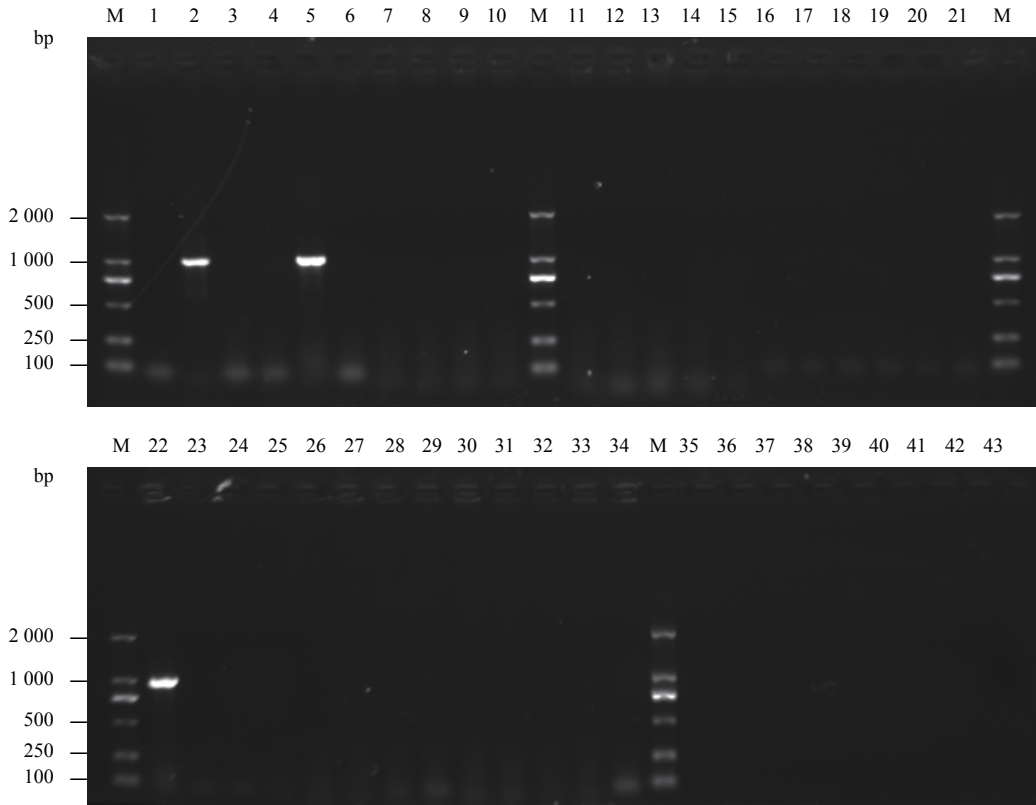


图 2 含有海带雌配子体特异标记 FRML-1488 序列 BAC 克隆的筛选

泳道 M. D2000 的 DNA 分子标准; 泳道 1. 空白对照; 泳道 2. 引物 1488-F1 和 1488-R1 在海带雌配子体基因组扩增的阳性对照; 泳道 3~10. 引物 1488-F1 和 1488-R1 在 384 微孔板横向二级池库筛选; 泳道 23~43. 引物 1488-F1 和 1488-R1 在 384 微孔板纵向二级池库筛选

Fig. 2 Screening of BAC clones containing the female-related marker FRML-1488 from the constructed BAC library of *S. japonica*

Lane M. D2000 Ladder marker; lane 1: control with H<sub>2</sub>O; lane 2. positive control with genome of *S. japonica* gametophytes; lanes 3-10. landscape screening of secondary pools with primer set 1488-F1/1488-R1; lanes 23-43. portrait screening of secondary pools with primer set 1488-F1/1488-R1

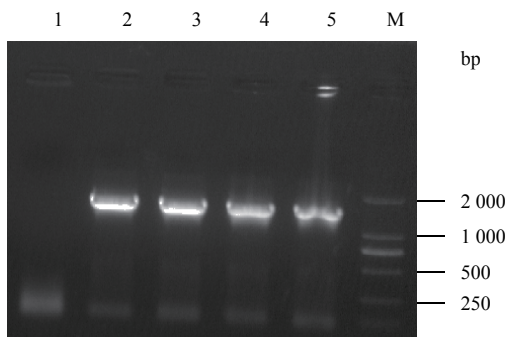


图 3 含有目的序列 BAC 克隆的 PCR 产物电泳图

泳道 M. D2000 标准分子量; 泳道 1. 空白对照; 泳道 2~5. 基于 FRML-1488 基因序列筛选到的 BAC 克隆

Fig. 3 Electrophoresis of amplified products of the screened BAC clones containing the target sequence from the constructed BAC library of *S. japonica*

Lane M. D2000 DNA marker; lane 1. control with H<sub>2</sub>O as templet; lanes 2-5. screened BAC clones based on FRML-1488 sequence

到目的序列大小的条带 (图 3), 这些 BAC 克隆分别为 638-C12、641-K8、653-B1 和 653-1-B3。随机挑选 BAC 克隆 638-C12, 培养后经 PCR 验证确认存在目的基因, 送国家基因组南方中心测序。

### 2.3 含有海带特异性标记 FRML-1488 的 BAC 克隆序列分析

利用 Roche 454 第二代测序平台对 BAC 克隆 638-C12 进行序列分析, 获得 13 889 个读数 (read), 每个读数平均长 477 bp。使用 Newbler 软件对这些读数进行拼接, 去除载体后得到 10 条 Contig 序列, 它们的平均长度为 8.6 kb; 最长的 Contig 是 Contig1, 为 20.4 kb (图 4)。经 Blastn 比对, 发现海带雌配子体特异性标记 FRML-1488 的序列部分位于 Contig7 的 3'端, 部分位于 Contig3 的 5'端, 预示着 Contig3 应处于 Contig7 的下游; 并通过末端测序了解 Contig4 和 Contig9 应位于插

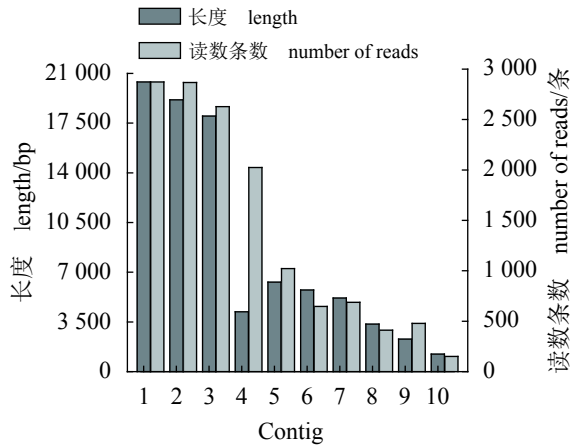


图 4 BAC 克隆 638-C12 测序数据经拼接后 Contig 的长度与读数统计图

Fig. 4 Distribution of the length and reads of the assembled Contigs from the sequenced BAC clone 638-C12

入片段的两端。通过本地 Blast 比对, 发现该 BAC 克隆的 10 条 Contig 序列集中分布于海带基因组 Scaffold285 的第 75 245~161 125 bp 的碱基之间 (图 5-a), 这些 Contig 的顺序为 4、10、6、8、1、2、5、7、3 和 9。

比照海带基因组 Scaffold285 的序列, 发现这 10 条 Contig 间存在 9 个间隔 (gap); 同时, 在 Scaffold285 中未搜索到 Contig6 中 237~490 bp、847~1 321 bp 及 1 707~2 023 bp 所对应的序列。为了进一步完善该 BAC 克隆的插入片段序列, 根据 Contig 所在海带基因组框架中的位置 (图 5-a) 以及它们的序列设计相应的引物 (表 1) 进行 PCR 扩增反应 (图 5-b)。扩增产物经测序后, 获得了 114~2 246 bp 的目的产物序列, 说明了此 Contig 排序的正确性及海带基因组 Scaffold285 组装的准

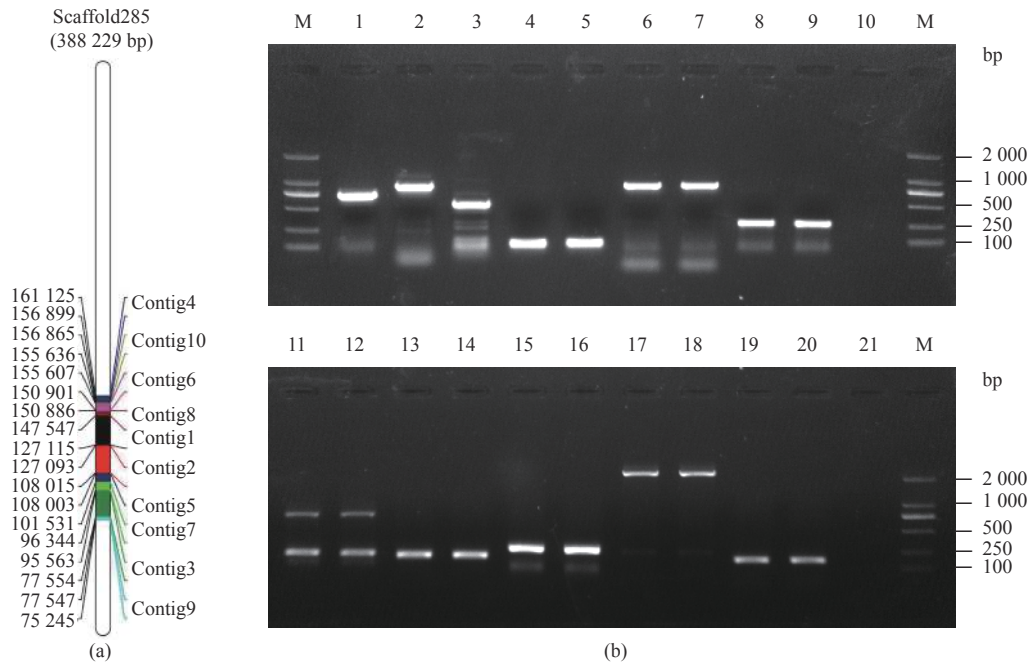


图 5 BAC 克隆 638-C12 各 Contig 在海带基因组框架 285 中的位置示意图 (a) 和 Contig6 部分序列及 Contig 间隔序列的 PCR 扩增产物电泳图 (b)

泳道 M. D2000 的 DNA 分子标准; 泳道 1 和 2. 引物 Contig4-10F/R 的 PCR 结果; 泳道 3 和 4. 引物 Contig10-6F/R 的 PCR 结果; 泳道 5 和 6. 引物 Contig6-8F/R 的 PCR 结果; 泳道 7 和 8. 引物 Contig8-1F/R 的 PCR 结果; 泳道 10 和 11. 引物 Contig1-2F/R 的 PCR 结果; 泳道 12 和 13. 引物 Contig2-5F/R 的 PCR 结果; 泳道 14 和 15. 引物 Contig5-7F/R 的 PCR 结果; 泳道 16 和 17. 引物 Contig7-3F/R 的 PCR 结果; 泳道 18 和 19. 引物 Contig3-9F/R 的 PCR 结果; 泳道 21~23. 分别为引物 Contig12F/R、Contig23F/R 和 Contig34F/R 的 PCR 结果; 泳道 9 和 20. 空白对照

Fig. 5 Schematic location of Contigs assembled from the sequenced BAC clone 638-C12 in the Scaffold 285 of *S. japonica* (a), and electrophoresis of amplified products to complete the sequences of Contig6 and the gaps between Contigs (b)

Lane M. D2000 Ladder marker; lanes 1 and 2. PCR detection of primer set Contig4-10F/R; lanes 3 and 4. PCR detection of primer set Contig10-6F/R; lanes 5 and 6. PCR detection of primer set Contig6-8F/R; lanes 7 and 8. PCR detection of primer set Contig8-1F/R; lanes 10 and 11. PCR detection of primer set Contig1-2F/R; lanes 12 and 13. PCR detection of primer set Contig2-5F/R; lanes 14 and 15. PCR detection of primer set Contig5-7F/R; lanes 16 and 17. PCR detection of primer set Contig7-3F/R; lanes 18 and 19. PCR detection of primer set Contig3-9F/R; lanes 21-23. PCR products with the primer sets, Contig12F/R, Contig23F/R and Contig34F/R, respectively; lanes 9 and 20. control with H<sub>2</sub>O

确性。序列分析结果明确了海带基因组的 Scaffold-285 中缺少 Contig6 中 237~490 bp、847~1 321 bp 及 1 707~2 023 bp 所对应的序列；将 10 个 Contig

与所获得的间隔序列进行组装，得到 BAC 克隆 638-C12 长为 86 998 bp 的完整 DNA 序列 (图 6)，它占 Scaffold285 序列总长度的 22.4%。

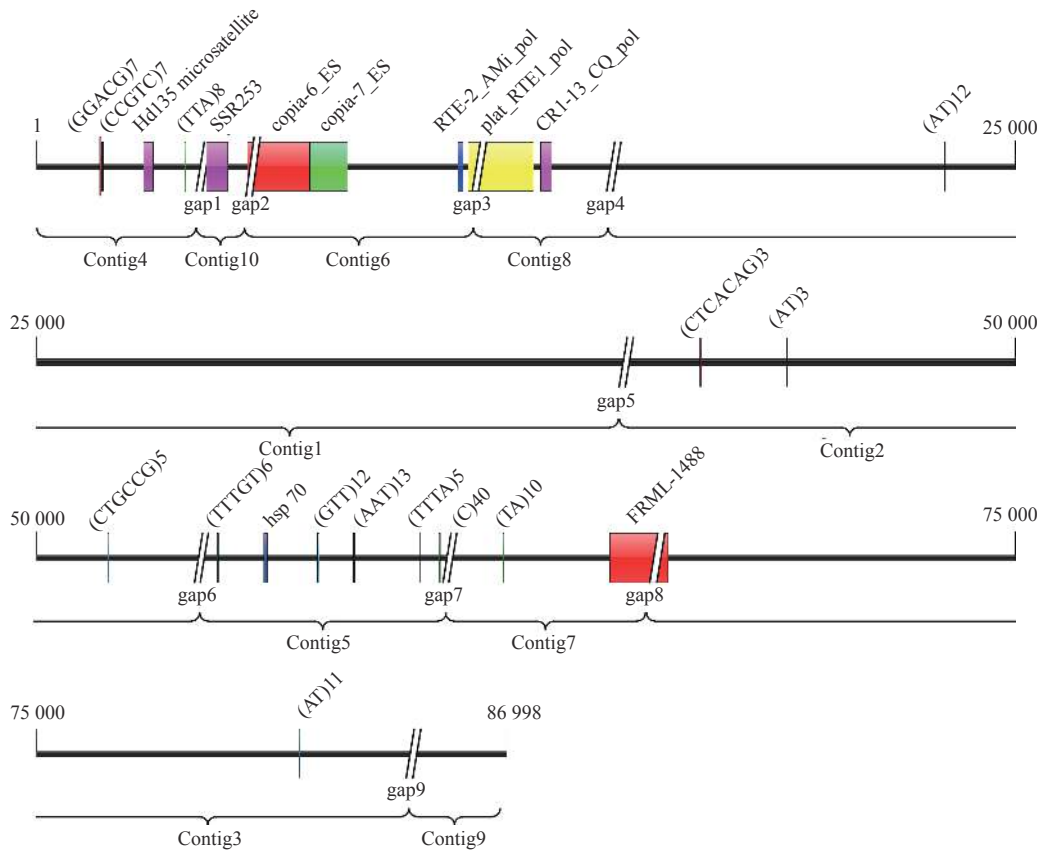


图 6 BAC 克隆 638-C12 插入片段序列的物理图谱

Fig. 6 Physical map of the sequence of inserted fragment in BAC clone 638-C12

使用 RepeatMasker 对 BAC 克隆 638-C12 的 DNA 序列进行在线分析，结果显示，Contig6 中存在 *Copia* 逆转录转座子 (retrotransposon)，如 *Copia-6\_ES*、*Copia-7\_ES* 等 (图 6)；除此之外，该 BAC 克隆的 DNA 序列还分布着很多单碱基、二碱基、三碱基、四碱基等简单重复序列 (图 6)。利用 Blastn 对该 BAC 克隆的 DNA 序列进行相似性分析，结果显示该 BAC 克隆的 DNA 序列还分布着海带微卫星基因序列 SSR253 (GenBank 登录号：JN703785.1)、卫星基因序列 Hdl135 (GenBank 登录号：JF957359.1) 以及一个海带 *hsp70* 蛋白基因 (EMBL 登录号：Y17349) 序列，这些基因序列分别位于 Contig4、5 和 10 中 (图 6)。

### 3 讨论

BAC 基因组文库具有 DNA 插入片段大、遗

传稳定性高、操作简便等优点，已广泛应用于动植物<sup>[22-24]</sup>以及藻类的全基因组测序<sup>[25]</sup>、物理图谱构建<sup>[26]</sup>和图位克隆<sup>[27-28]</sup>等研究中，也是基因资源永久保存的最优材料和方法之一<sup>[29]</sup>。迄今已在 *Ostreococcus tauri*<sup>[25]</sup>、*Cyanidioschyzon merolae*<sup>[26]</sup>、莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*)<sup>[27]</sup>、绿色杜氏藻 (*Dunaliella viridis*)<sup>[28]</sup>、盘藻 (*Gonium pectorale*)<sup>[29]</sup> 和 *Alexandrium ostenfeldii*<sup>[30]</sup> 等微藻以及条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis*)<sup>[31]</sup> 等少数海藻中得到应用。本研究的结果表明，从海带雌配子体基因组中所构建的 BAC 文库可用于性别相关标记的图位克隆。这也是 BAC 文库在海带等大型经济褐藻中的首次应用报道。

在 BAC 文库构建中，基因组的覆盖度是评价 BAC 文库质量的重要指标，Ammiraju 等<sup>[32]</sup>认为，一个 BAC 文库至少覆盖基因组 5~10 倍，才

更有利于后续的各项研究, 例如大麦 (*Hordeum vulgare*)、小麦 (*Triticum aestivum*) 和玉米 (*Zea mays*) 等物种 BAC 文库的基因组覆盖度分别为 6.6 倍<sup>[33]</sup>、9.05 倍<sup>[34]</sup> 和 6.0 倍<sup>[35]</sup>, 有利于图位克隆以及末端测序。本研究所构建的海带雌配子体 BAC 文库包含 31 872 个克隆, 平均插入片段长度为 115 kb, 覆盖海带基因组的 6.57 倍, 达到了玉米和大麦的覆盖度。

有研究表明, 重复序列的积累是性染色体的一个最常见特征<sup>[36-40]</sup>。伴随着重复序列在基因组上的积累, 染色体发生重排及非重组区域内的基因退化, 使基因重组难以发生, 进而导致性染色体的起源<sup>[41]</sup>。本研究筛选到的 BAC 克隆 638-C12, 其插入片段的序列中含有海带雌配子体特异性标记 FRML-1488(图 6), 该标记经 Southern 杂交分析是单拷贝, 并经 FISH 作图证实只位于雌配子体的染色体上<sup>[13]</sup>; 结合 BAC 克隆 638-C12 的插入片段序列分布着逆转录转座子 *Copia-6\_ES*、*Copia-7\_ES* 以及卫星序列(图 6) 等性别决定区域的特征重复序列<sup>[42]</sup> 的特征, 推测 BAC 克隆 638-C12 的插入片段可能是海带雌配子体性别染色体上性别决定区的部分序列, 具体还需要通过性别连锁标记等实验来证明。

#### 参考文献 (References):

- [ 1 ] Coelho S M, Gueno J, Lipinska A P, et al. UV chromosomes and haploid sexual systems[J]. *Trends in Plant Science*, 2018, 23(9): 794-807.
- [ 2 ] Bachtrog D, Kirkpatrick M, Mank J E, et al. Are all sex chromosomes created equal?[J]. *Trends in Genetics*, 2011, 27(9): 350-357.
- [ 3 ] Ahmed S, Cock J M, Pessia E, et al. A haploid system of sex determination in the brown alga *Ectocarpus* sp.[J]. *Current Biology*, 2014, 24(17): 1945-1957.
- [ 4 ] Lipinska A, Cormier A, Luthringer R, et al. Sexual dimorphism and the evolution of sex-biased gene expression in the brown alga *Ectocarpus*[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2015, 32(6): 1581-1597.
- [ 5 ] Scoggan J, Zhuang Z M, Wang F J. *Laminaria* seaweed farming in China: training manual 89/5 (RAS/86/024)[M]. Qingdao, China, 1989.
- [ 6 ] Lipinska A P, Toda N R T, Heesch S, et al. Multiple gene movements into and out of haploid sex chromosomes[J]. *Genome Biology*, 2017, 18: 104.
- [ 7 ] 曾呈奎, 吴超元. 海带养殖学 [M]. 北京: 科学出版社, 1962.
- [ 8 ] Zeng C K, Wu C Y. Manual of Haidai (*Laminaria japonica* Aresch.)[M]. Beijing: Science Press, 1962 (in Chinese).
- [ 9 ] Ye N H, Zhang X W, Miao M, et al. *Saccharina* genomes provide novel insight into kelp biology[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 6986.
- [ 10 ] Deng Y Y, Yao J T, Wang X L, et al. Transcriptome sequencing and comparative analysis of *Saccharina japonica* (Laminariales, Phaeophyceae) under blue light induction[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e39704.
- [ 11 ] Wang W J, Wang F J, Sun X T, et al. Comparison of transcriptome under red and blue light culture of *Saccharina japonica* (Phaeophyceae)[J]. *Planta*, 2013, 237(4): 1123-1133.
- [ 12 ] Lipinska A P, Ahmed S, Peters A F, et al. Development of PCR-based markers to determine the sex of kelps[J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0140535.
- [ 13 ] Liu Y, Bi Y H, Gu J G, et al. Localization of a female-specific marker on the chromosomes of the brown seaweed *Saccharina japonica* using fluorescence *in situ* hybridization[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e48784.
- [ 14 ] Gu J G, Sun Y P, Liu Y, et al. Sex identification and genetic variation of *Saccharina* (Phaeophyta) gametophytes as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2014, 26(1): 635-646.
- [ 15 ] Zhang L N, Cui C J, Li Y, et al. A genome screen for the development of sex-specific DNA markers in *Saccharina japonica*[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2018, 30(2): 1239-1246.
- [ 16 ] 周志刚, 吴超元. 海带无性繁殖系的形成及孢子体诱导[J]. *生物工程学报*, 1998, 14(1): 109-111.
- [ 17 ] Zhou Z G, Wu C Y. Clone culture of *Laminaria japonica* and induction of its sporophytes[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 1998, 14(1): 109-111(in Chinese).
- [ 18 ] Starr R C, Zeikus J A. UTEX—the culture collection of algae at the University of Texas at Austin 1993 list of cultures[J]. *Journal of Phycology*, 1993, 29(S2): 1-106.
- [ 19 ] Hu Y J, Zhou Z G. Extraction of RAPD-friendly DNA from *Laminaria japonica* (Phaeophyta) after enzymatic dissociation of the frozen sporophyte tissues[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2001, 13(5): 415-422.
- [ 20 ] Liu W Z, Xie Y B, Ma J Y, et al. IBS: an illustrator for



- the presentation and visualization of biological sequences[J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(20): 3359-3361.
- [19] Voorrips R E. MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs[J]. *Journal of Heredity*, 2002, 93(1): 77-78.
- [20] Clarke L, Carbon J. A colony bank containing synthetic Col El hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome[J]. *Cell*, 1976, 9(1): 91-99.
- [21] Farrar K, Donnison I S. Construction and screening of BAC libraries made from *Brachypodium* genomic DNA[J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(7): 1661-1674.
- [22] Zhang H B, Wu C C. BAC as tools for genome sequencing[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2001, 39(3-4): 195-209.
- [23] 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.  
Li H Q, Diao X M. Construction and application of genomics bacterial artificial chromosome (BAC) library[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2005(1): 6-11(in Chinese).
- [24] Zhang H B, Scheuring C F, Zhang M P, *et al.* Construction of BIBAC and BAC libraries from a variety of organisms for advanced genomics research[J]. *Nature Protocols*, 2012, 7(3): 479-499.
- [25] Derelle E, Ferraz C, Lagoda P, *et al.* DNA libraries for sequencing the genome of *Ostreococcus tauri* (Chlorophyta, Prasinophyceae): the smallest free-living eukaryotic cell[J]. *Journal of Phycology*, 2002, 38(6): 1150-1156.
- [26] Maruyama S, Misumi O, Ishii Y, *et al.* The minimal eukaryotic ribosomal DNA units in the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*[J]. *DNA Research*, 2004, 11(2): 83-91.
- [27] Nguyen R L, Tam L W, Lefebvre P A. The *LF1* gene of *Chlamydomonas reinhardtii* encodes a novel protein required for flagellar length control[J]. *Genetics*, 2005, 169(3): 1415-1424.
- [28] 孟祥宗, 杨晓武, 管祯玮, 等. 盐藻(*Dunaliella viridis*)细菌人工染色体文库的构建和鉴定[J]. *上海大学学报(自然科学版)*, 2007, 13(1): 88-93.  
Meng X Z, Yang X W, Guan Z W, *et al.* Construction and characterization of a *Dunaliella viridis* bacterial artificial chromosome library[J]. *Journal of Shanghai University (Natural Science Edition)*, 2007, 13(1): 88-93(in Chinese).
- [29] Hamaji T, Ferris P J, Nishii I, *et al.* Identification of the minus mating-type specific gene *MTD1* from *Gonium pectorale* (Volvocales, Chlorophyta)[J]. *Journal of Phycology*, 2009, 45(6): 1310-1314.
- [30] Jaeckisch N, Yang I, Wohlrab S, *et al.* Comparative genomic and transcriptomic characterization of the toxic marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*[J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e28012.
- [31] Deng D Y, Zhao G, Xuan J S, *et al.* Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of marine macroalga *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta)[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2004, 22(4): 375-386.
- [32] Ammiraju J S S, Luo M Z, Goicoechea J L, *et al.* The *Oryza* bacterial artificial chromosome library resource: Construction and analysis of 12 deep-coverage large-insert BAC libraries that represent the 10 genome types of the genus *Oryza*[J]. *Genome Research*, 2005, 16(1): 140-147.
- [33] Schulte D, Ariyadasa R, Shi B J, *et al.* BAC library resources for map-based cloning and physical map construction in barley (*Hordeum vulgare* L.)[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 247.
- [34] Cao W J, Fu B S, Wu K, *et al.* Construction and characterization of three wheat bacterial artificial chromosome libraries[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(12): 21896-21912.
- [35] Tomkins J P, Davis G, Main D, *et al.* Construction and characterization of a deep-coverage bacterial artificial chromosome library for maize[J]. *Crop Science*, 2002, 42(3): 928-933.
- [36] Contreras B, Vives C, Castells R, *et al.* The impact of transposable elements in the evolution of plant genomes: from selfish elements to key players[M]//Pontarotti P. *Evolutionary biology: biodiversification from genotype to phenotype*. Cham: Springer, 2015: 93-105.
- [37] Ellison C E, Bachtrog D. Dosage compensation via transposable element mediated rewiring of a regulatory network[J]. *Science*, 2013, 342(6160): 846-850.
- [38] Jamsari A, Nitz I, Reamon-Büttner S M, *et al.* BAC-derived diagnostic markers for sex determination in *Asparagus*[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108(6): 1140-1146.
- [39] Erlandsson R, Wilson J F, Pääbo S. Sex chromosomal transposable element accumulation and male-driven substitutional evolution in humans[J]. *Molecular Biology*

- and Evolution, 2000, 17(5): 804-812.
- [40] Steinemann M, Steinemann S. Degenerating Y chromosome of *Drosophila miranda*: a trap for retrotransposons[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(16): 7591-7595.
- [41] Bergero R, Forrest A, Charlesworth D. Active miniature transposons from a plant genome and its nonrecombining Y chromosome[J]. *Genetics*, 2008, 178(2): 1085-1092.
- [42] Na J K, Wang J P, Ming R. Accumulation of interspersed and sex-specific repeats in the non-recombining region of papaya sex chromosomes[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 335.

## Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library of the female gametophytes of *Saccharina japonica* and map cloning and sequencing of genes neighboring with a female-specific marker FRML-1488

LIU Pengfei<sup>1</sup>, GU Jungang<sup>1</sup>, BI Yanhui<sup>1,2</sup>, ZHOU Zhigang<sup>2\*</sup>

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. International Research Center for Marine Biosciences, Ministry of Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** UV sex-chromosome system exhibits unique evolution and genetic features during the haploid stage of the life cycle in some algae and bryophytes. In this study, a bacterial artificial chromosome (BAC) library was constructed from the female gametophytes of *Saccharina japonica*. The library, contained a total of 31 872 BAC clones with an average insert size of 115 kb as revealed by pulsed-field gel electrophoresis. It covered 6.57-fold of the estimated haploid genome equivalents. To evaluate the quality of this library, one pair of primers was designed on the basis a female-specific marker FRML-1488 to screen positive BAC clones harboring this specific marker by PCR amplification. Four positive clones were obtained, demonstrating that the possibility of selecting any gene from the library was 99.86%. A randomly selected BAC clone (638-C12) was sequenced by Roche454 pyrosequencing method. Total 10 contigs were assembled and the gaps were further filled by PCR amplification. Finally, a full-length fragment was assembled with the length of 86 996 bp. It was located in Scaffold285 of the kelp genome by blast, and it accounted for 22.4% of this scaffold in length. This well-matching result pointed out that the insert in BAC clone 638-C12 was from the kelp genome. Sequence analysis showed that a large number of repetitive sequences including microsatellites, satellites and retrotransposons (*Copia*) were found upstream of the female-specific marker FRML-1488. Since sex-determining region (SDR) is characterized by high proportion of repetitive sequences associated with non-combination, the insert of BAC clone 638-C12 might be involved in the SDR of *S. japonica* U chromosome. This study is the first report on the application of BAC library in map-based cloning of sex-related sequences in *S. japonica*, which contributes to comprehensive understanding of sex chromosome structure and the sex determination mechanism of this kelp.

**Key words:** *Saccharina japonica*; female gametophyte; bacterial artificial chromosome (BAC) library; molecular marker; map-based cloning

**Corresponding author:** ZHOU Zhigang. E-mail: zgzhou@shou.edu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (41376136); State Double First-Class Discipline Project of Aquaculture