

野生大豆核基因组 Mb 级 DNA 的制备与酶切

李晓玲^{1,2}, 李克秀², 赵洪锬¹, 董英山¹

(1. 吉林省农业科学院 生物技术研究中心, 吉林 长春 130033; 2. 长春工业大学 化学与生命科学学院, 吉林 长春 130012)

摘 要:以野生大豆黄化幼苗为材料提取其细胞核 DNA, 经 LMP 包埋并用蛋白酶 K 裂解其中的核蛋白后, 采用脉冲电泳回收 2 Mb 左右细胞核 DNA。用 *Hind* III 对回收细胞核 DNA 进行部分酶切并用脉冲电泳回收酶切后的 DNA 片段, 经电洗脱、浓缩和透析后 DNA 溶液浓度可达 $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。连接转化检测结果表明: 该 DNA 可用于后续野生大豆基因组可转化人工染色体 (TAC) 文库的构建和基因组分析。

关键词:野生大豆; Mb 级 DNA; 脉冲电泳; 基因组可转化人工染色体 (TAC) 文库

中图分类号: Q781

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2011)01-0033-04

Preparing and Digesting Megabase-size Nuclear DNA of *Glycine soja* Genome

LI Xiao-ling^{1,2}, LI Ke-xiu², ZHAO Hong-kun¹, DONG Ying-shan¹

(1. Biotechnology Research Centre, Jinlin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033; 2. School of Chemistry and Life Science Changchun University of Technology, Changchun 130012, Jilin, China)

Abstract: Nuclear DNA was extracted from etiolated seedlings of *Glycine soja*. Generally, the nuclei were embedded in low-melting-point agarose pulps, digested with proteinase K and depurated with pulsed field gel electrophoresis to yield about two-Megabase-size DNA. The concentration of DNA solution could be up to $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ after partial digestion by *Hind* III, elution by pulsed field gel electrophoresis, concentration and dialysis. The result of examination by ligation and electroporation showed that the DNA obtained by the method was suitable for consequent construction of genomic library of *Glycine soja*.

Key words: *Glycine soja*; Megabase-size DNA; Pulsed field gel electrophoresis; TAC Genomic library

基因组大片段 DNA 克隆文库是植物基因组分析和基因图位克隆的基础。利用 TAC 载体构建大片段 DNA 插入文库, 一旦筛选到目标阳性克隆, 可直接利用农杆菌转化系统将其转到植物体中进行基因功能互补实验, 不必进行亚克隆, 从而加速了工作进程^[1]。因此, 构建高质量的植物基因组可转化人工染色体 (TAC) 文库, 不仅有助于基因克隆, 还有助于基因表达、数量性状基因等的研究, 应用范围也将越来越广泛。目前, 应用 TAC 载体系统已成功构建了拟南芥^[2]、小麦一簇毛麦易位系 6VS/6AL^[3]、高抗黄矮病基因的小麦-中间偃麦草易位系^[4]、籼稻品种 H359^[5]、稻瘟菌^[6]、水稻^[7]、桃^[8]、六倍体小麦、番茄、蕪菁^[9]、大豆、棉花和百脉根^[10]等多种植物的基因组文库, 并已被成功地用于多个拟南芥新基因的分离, 在水稻和小麦^[11-12]基因的分离研究工作中也取得了重要进展。

一年生野生大豆 (*Glycine soja*) 是栽培大豆的近缘祖先种, 是我国作物资源中的瑰宝。因其携带有

高产、抗病、抗虫、抗旱、耐冷、耐盐、耐瘠薄等基因^[13], 因而可为选育大豆等作物新品种、开展生物技术研究提供多种优异基因资源。构建高质量的野生大豆核基因组可转化人工染色体 (TAC) 文库将为野生大豆功能基因组研究工作奠定基础, 对有关野生大豆优异基因挖掘和资源创新研究都具有重要意义。而细胞核 Mb 级 DNA 的提取和酶切, 是构建 TAC 文库的前提和关键步骤。因此, 该研究对野生大豆细胞核基因组 Mb 级 DNA 的制备与酶切条件进行摸索, 以期为进一步构建野生大豆核基因组可转化人工染色体 (TAC) 文库和优异基因挖掘研究工作提供一定的理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 植物材料 具有高度耐盐特性野生大豆种子由吉林省农业科学院生物技术中心植物资源与分子生物学课题组提供, 播种后置于温室遮光培

收稿日期: 2010-10-09

项目基金: 农业部野生植物资源保护资助项目 (2010); 农业部 CWRC 资助项目 (CWRC-20080205); 国家重点基础研究发展计划“973 计划”资助项目 (2007CB116205); 国家转基因专项资助项目 (2008ZX08004-004)。

第一作者简介: 李晓玲 (1971-), 女, 博士, 副教授, 主要从事植物生物技术与植物分子生物学研究。E-mail: lxl5275278@163.com。

养,待萌发并生长 10 d 后剪取黄化幼苗备用。

1.1.2 载体和菌株 TAC 载体 pYLTAC747NH/sacB (18.9kb) 由华南农业大学刘耀光教授馈赠,大肠杆菌电转化感受态细胞 (ElectroMAX DH10B Cells) 购自 Invitrogen。

1.2 试验方法

1.2.1 分离细胞核 参照 Liu 等^[14]的方法稍加改进。取 20 g 野生大豆幼苗在液氮中研磨成粉,加入 250 mL 冰冷的含 0.15% β -巯基乙醇的 $1 \times \text{HB}$ 溶液,冰浴搅拌 15 min。依次用 35、70、180 和 300 目钢丝细胞筛过滤,回收滤液备用。并用同样溶液清洗所得滤渣,重新过滤。合并所有滤液,将其分装于 50 mL 离心管中离心 (4°C 、RCF 2000 g) 15 min。回收沉淀,加 40 mL 相同溶液悬浮清洗沉淀后离心 10 min;再将沉淀用 $1 \times \text{HB}$ 悬浮清洗离心 (4°C 、RCF 2 000 g、10 min) 2 次,最后所得沉淀即为野生大豆细胞核沉淀,用 1 mL 的 $1 \times \text{HB}$ 悬浮置于冰上暂存。

1.2.2 细胞核的包埋和裂解 将 $1 \times \text{HB}$ 细胞核悬浮液置 45°C 水浴 1 ~ 3 min,加入等体积的 1.4% LMP,轻柔混匀后迅速加到自制模具 plug mold 中 ($10 \times 0.2 \times 1 \text{ cm} = 2.0 \text{ mL}$) 制成胶条,用蛋白酶 K 裂解。

1.2.3 Mb 级 DNA 的回收和保存 配制 1% LMP 胶,将 PFG Marker 点于胶的两侧,将包埋裂解后的胶条点在两道 Marker 之间。按 Yeast Chromosome PFG Marker (NEB) 条件进行脉冲电泳。电泳结束后,将两侧的 Marker 切下,用 EB 染色后,使用手持紫外仪对照回收 2 Mb 左右 DNA 并保存于 T10E10 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-Cl, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, pH8.0) 中。

1.2.4 野生大豆细胞核 2 Mb 左右 DNA 的部分酶切 预处理:将回收胶用 TEP (含有 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PMSF 的 T10 E10) 4°C 清洗 2 次 (第 1 次 3 h,第 2 次 4 h) 后,换 T10 E10 浸洗 4 h,然后再换 1 次 T10 E10 保存过夜,酶切前换 TE (pH8.0) 洗 2 次 (第 1 次 10 h,第 2 次 13 h)。

酶切:以胶体积为基本标准决定反应体系,按整胶重量 0.05 g 为基本标准换算加酶单位量,切取小部分胶块进行预酶切。按胶块体积的 3 倍为反应体系加酶切缓冲液混匀,冰浴 1 h。更换含有不同酶量的 *Hind* III (NEB) 相同酶切缓冲液混匀,再冰浴 8 h 以上。加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{MgCl}_2$ 使其终浓度为 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 后,冰浴 1 h。然后 37°C 开始酶切反

应 (温育) 40 min,加入 0.1 倍胶体积的 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA (pH8.0),冰上 45 min 终止酶切反应。换 TE 浸洗 1 h 后,再更换新的 TE 于 4°C 保存。按 Low Range PFG Marker (NEB) 条件进行脉冲电泳。电泳结束后,根据预酶切结果确定最佳部分酶切酶用量和酶切条件,对剩下的大部分胶块进行部分酶切。

酶切片段回收:酶切片段胶回收和电洗脱电泳条件均同预酶切。首先用 1% LMP 脉冲电泳按照 DNA 片段长度范围分 3 组 (23.1 ~ 48.5 kb, 48.5 ~ 97 kb, 97 ~ 145.5 kb) 回收 DNA 酶切片段胶块,再分别用装有 1 mL TE 的 3.4 cm 宽透析袋电泳洗脱回收胶中 DNA,电泳结束后把透析袋旋转 180° ,同条件电泳 5 min 后停止电泳,吸取 DNA 洗脱液。将 DNA 溶液在超净工作台上蒸发浓缩至原体积的 $1/5 \sim 1/6$ 后,用漂浮在 $0.8 \times \text{TEN}$ 缓冲液上的 Minipore ($0.025 \mu\text{m}$) 膜 4°C 透析 30 min,小心吸取各组 DNA 溶液于 4°C 保存。

1.2.5 连接与转化 将 TAC 载体 pYLTAC747NH/sacB (18.9 kb) 经 *Hind* III 酶切、HK 脱磷酸酶脱磷^[15]后,与上述 23.1 ~ 48.5 kb 范围的 DNA 片段在 16°C 条件下连接 28 h。连接产物用 Minipore ($0.025 \mu\text{m}$) 膜在 $1/4 \text{TE}$ 溶液中 4°C 透析 4 h 后,电转化入大肠杆菌电转化感受态细胞 (ElectroMAX DH10B Cells) 中,然后在 LB + 卡纳霉素 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 5% 蔗糖培养基平板上 37°C 培养过夜。待克隆长至适宜大小时,挑取阳性克隆用碱裂解法提取质粒,经 *Hind* III 酶切、1% 琼脂糖电泳检测连接效果。

2 结果与分析

2.1 野生大豆细胞核的分离及 2Mb 左右核 DNA 回收

在相差显微镜下,用血球计数板对细胞核提取物进行检测,结果获得的野生大豆细胞核很完整,核提取液中所含杂质颗粒较少 (图 1)。经计算细胞核浓度可达 $1.0 \times 10^9 \cdot \text{mL}^{-1}$,据此调整使其终浓度为 $5.0 \times 10^8 \cdot \text{mL}^{-1}$,用等体积的 1.4% LMP 进行包埋用于核 DNA 的制备;经蛋白酶 K 裂解后,野生大豆细胞核 DNA 胶块脉冲电泳结果见图 2,细胞核裂解后释放的野生大豆 DNA 多集中 1.9 Mb 以上,在加样孔附近形成较亮的条带,比较容易分离、回收和纯化,有利于后续酶切、连接反应的顺利进行。

2.2 野生大豆 2 Mb 左右核 DNA 部分酶切

在 LMP 胶块中的 2 Mb 左右核 DNA 酶切效果主要和 DNA 的浓度、所加的酶量、胶块的重量和体

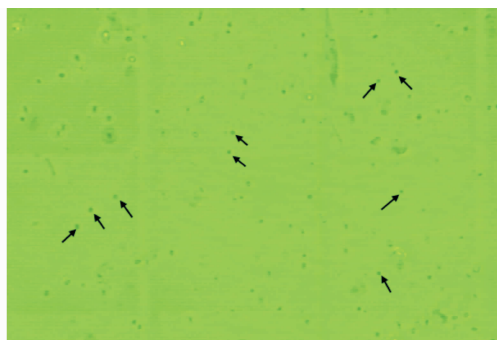
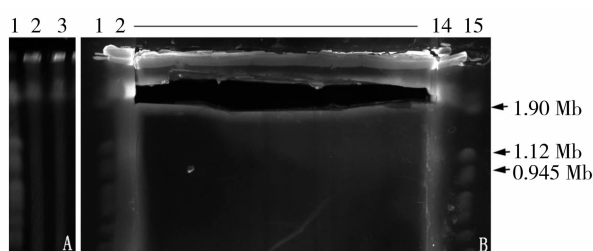


图 1 相差显微镜下(40×)的野生大豆细胞核

Fig. 1 The nuclei of *Glycine soja* by the phase contrast microscope(40×)



A:野生大豆 2 Mb 左右核 DNA 检测(1 为 Yeast Chromosome PFG Marker;2、3 为野生大豆核 DNA);B:野生大豆 2 Mb 以上核 DNA 回收(1、15 为 Yeast Chromosome PFG Marker;2-14 为野生大豆核 DNA)。

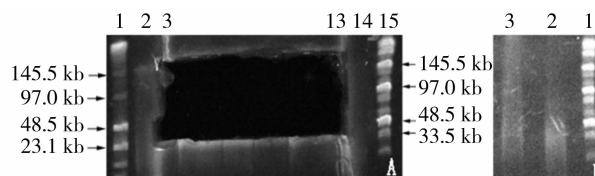
A: About two-Megabase-size DNA from the nuclei of *Glycine soja* was evaluated(1: Yeast Chromosome PFG Marker;2 & 3: Nuclear DNA of *Glycine soja*); B: About two-Megabase-size DNA from the nuclei of *Glycine soja* was recovered(1 & 15: Yeast Chromosome PFG Marker;From 2 to 14: Nuclear DNA of *Glycine soja*).

图 2 脉冲电泳回收未经 EB 染色的野生大豆 2Mb 左右核 DNA

Fig. 2 About two-Megabase-size DNA from the nuclei of *Glycine soja* was recovered without staining in EB by pulsed field gel electrophoresis

积、时间及温度有关。将温度固定在 37℃,酶切时间设定为 40 min,通过不同梯度小量酶切来确定所回收同一长胶块的最佳酶切量。结果见图 3B,当采用 2U *Hind* III/0.05 g 胶酶量进行部分酶切反应时,酶切后的 DNA 片段大部分集中在 48 kb 以下范围,表明该酶切反应过头。当酶量降至 1U *Hind* III/0.05 g 胶时,酶切后的 DNA 片段在琼脂糖凝胶上分布比较均匀,因此将 1U *Hind* III/0.05 g 胶确定为最佳部分酶切反应酶用量。由于同一胶块中所含的 DNA 浓度大致相同,因而按照此最佳酶用量进行大量酶切得到了比较理想的酶切结果(图 3A)。采用脉冲电泳回收 3 组不同长度 DNA 片段胶块,经电洗脱、浓缩和透析后,用普通琼脂糖凝胶电泳测定其浓度均达到 $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 以上,可满足后续连接转

化反应的需要。



A:野生大豆 2Mb 左右核 DNA 部分酶切片段回收(1 为 Low Range PFG Marker(NEB),2-14 为核 DNA 部分酶切产物,15 为 Midrange PFG Marker(NEB));B:野生大豆 2Mb 以上核 DNA 预酶切结果(1 为 Midrange PFG Marker(NEB),2 为 2U *Hind* III/0.05 g 胶酶切产物,3 为 1U *Hind* III/0.05 g 胶酶切产物)。

A:The DNA fragments yielded after partial digestion were recovered(1: Low Range PFG Marker(NEB); From 2 to 14: DNA fragments yielded after partial digestion;15: Midrange PFG Marker(NEB)).

B: About two-Megabase-size DNA from the nuclei of *Glycine soja* was digested partially and evaluated preliminarily.

图 3 野生大豆 2Mb 左右核 DNA 部分酶切及回收

Fig. 3 About two-Megabase-size DNA from the nuclei of *Glycine soja* was digested partially and the DNA fragments yielded were recovered

2.3 连接与转化检测

取 1.5 μL 连接产物与 10 μL 大肠杆菌 DH10B 电转化感受态细胞于冰上轻柔混匀,电转后用 1 mL SOC 培养基复苏培养后涂平板(平均每板涂约 100 μL 菌液),最后将平板置于 37℃ 培养箱倒置培养过夜。获得的阳性克隆见图 4,平均每板长菌落约 80~100 个,每次电转共可获得 800~1 000 个实心、比较饱满的克隆。根据菌落形态选择挑取阳性克隆进行摇菌培养,再利用菌液提取质粒,并用 *Hind* III 单酶切对阳性质粒进行鉴定。从图 5 可以看出:经检测,所挑取的克隆中 95% 以上均为阳性克隆,且大的连接片段合计接近 20 kb 左右,表明所提取的野生大豆 2 Mb 以上核 DNA 完全可满足其核基因组 TAC 文库构建的要求。

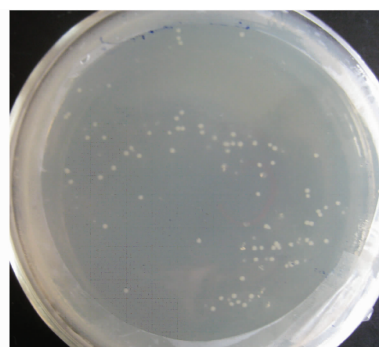
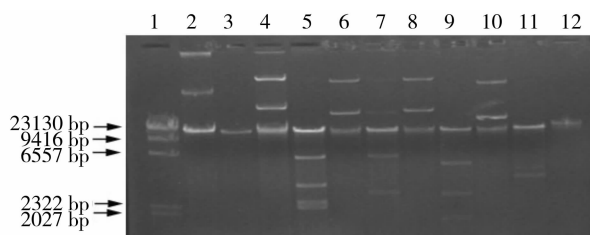


图 4 电转后获得的阳性克隆

Fig. 4 Positive clones obtained by electrotransformation



1 为 λ DNA/*Hind* III Marker (Takara) ; 2 为未酶切 pYLTAC747NH/sacB 载体, 3 为 pYLTAC747NH/sacB 线性载体; 4、6、8、10 分别为未酶切阳性克隆质粒; 5、7、9、11 分别为对应的阳性克隆质粒 *Hind* III 单酶切产物, 12 为 λ DNA Marker (Takara)。

1: λ DNA/*Hind* III Marker (Takara) ; 2: Intact pYLTAC747NH/sacB vector; 3: Linear pYLTAC747NH/sacB vector prepared by *Hind* III ; 4, 6, 8 & 10: Plasmids extracted from positive clones ; 5, 7, 9 & 11: Corresponding positive plasmids digested by *Hind* III.

图 5 阳性克隆质粒酶切检测结果

Fig. 5 The plasmids extracted and digested from positive clones

3 讨论

根据水稻^[7,14,16]、小麦^[17]等的成功报道,以植物幼苗为材料更容易得到高质量的细胞核 Mb 级 DNA。因此,选用野生大豆黄化幼苗为材料,进行细胞核大片段 DNA 的提取,既减少了叶绿体污染几率,也保证了细胞核的得率。多次核分离结果表明,植物材料研磨程度及其与核抽提缓冲液冰上充分混匀对细胞核的得率起到关键的作用。植物材料粉末越细腻、与核抽提缓冲液充分混匀,细胞核的得率较高。在细胞核分离的过程中,借鉴徐粤宇等^[18]的方法采用不锈钢质细胞筛进行分级过滤,比采用纱布过滤减少了对溶液的吸附作用,从而减少了细胞核的损失,同时使分离操作更为简便易行。在离心过程中,增加离心的次数可在一定程度上减少细胞核的损失,但是次数过多浪费能量和时间,因此一般离心 2~3 次即可。同时增加不含 β -巯基乙醇的核抽提缓冲液洗涤有利于纯化细胞核匀浆,试验共洗涤 3 次。

由于制备 DNA 浓度一致的长胶块对于后续部分酶切反应条件的摸索至关重要,因此在 LMP 包埋过程中借鉴徐粤宇等^[18]的方法使用自制的模具制成连续的长胶块,便于脉冲电泳加样和回收,且使回收的 2 Mb 级 DNA 在胶块中均匀分布、浓度相同,从而可使用小量梯度酶切来确定大量酶切的最佳酶切量准确度增高,部分酶切实验结果也验证了这一改进的重要性和有效性。同时,由于多次纯化胶回收和部分酶切回收造成 DNA 的大量损失,致使最后能用于连接转化反应的 DNA 量较少,因此需

要多次制备 DNA 以满足核基因组文库构建的需要,也可通过优化连接转化反应等措施降低核 DNA 的用量^[19]。

参考文献

- [1] 宋琳琳,赵茂林. 可转化人工染色体文库的构建与鉴定[J]. 生物技术通报, 2006 (增刊): 83-84. (Song L L, Zhao M L. Construction and identification of transformation competent artificial chromosome library[J]. Biotechnology Bulletin, 2006 (Suppl): 83-84.)
- [2] Liu Y G, Shirano Y, Ukaki H F, et al. Complementation of plant mutants with large genomic DNA fragments by a transformation-competent artificial chromosome vector accelerates positional cloning[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96: 6535-6540.
- [3] 方玉达,刘耀光,吴豪,等. 小麦-簇毛麦 6VS/6AL 易位系可转化人工染色体 (TAC) 文库的构建[J]. 生物工程学报, 2000, 16 (4): 433-436. (Fang Y D, Liu Y G, Wu H, et al. Construction of a transformation-competent artificial chromosome (TAC) library of a wheat-haynaldia villosa translocation line[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2000, 16 (4): 433-436.)
- [4] 王晓萍,张增艳,张群宇,等. 抗黄矮病小麦-中间偃麦草易位系基因组可转化人工染色体文库的构建及初步筛[J]. 遗传学报, 2002, 29 (8): 712-718. (Wang X P, Zhang Z Y, Zhang Q Y, et al. Construction, characterization and screening of a transformation-competent artificial chromosome (TAC) library of wheat-thinopyrum intermedium translocation line with resistance to barley Yellow Dwarf Virus[J]. Acta Genetica Sinica, 2002, 29 (8): 712-718.)
- [5] 刘华清,周君丽,段远霖,等. 籼稻品种 H359 基因组可转化人工染色体 (TAC) 文库的构建[J]. 分子植物育种, 2003, 1 (1): 27-32. (Liu H Q, Zhou J L, Duan Y L, et al. Construction of a genomic dna library of an Indica rice variety H359 Based on Transformation-Competent Artificial Chromosomes[J]. Molecular Plant Breeding, 2003, 1 (1): 27-32.)
- [6] Wei S P, Wang Y, Liu Y G, et al. Construction and evaluation of a TAC library of *Magnaporthe grisea* [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2003, 33 (1): 57-62.
- [7] Liu Y G, Liu H M, Chen L T, et al. Development of new transformation-competent artificial chromosome vectors and rice genomic libraries for efficient gene cloning[J]. Gene, 2002, 282: 247-255.
- [8] Liang F S, Zhang K C, Yu Z W, et al. Construction, characterization, and screening of a transformation-competent artificial chromosome library of peach [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2004, 22: 37-48.
- [9] Kong F N, Jiang S M, Shi L X, et al. Construction and characterization of a transformation-competent artificial chromosome (TAC) library of *Zizania latifolia* (Griseb) [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2006, 24: 219-227.

0.4604,每个位点的有效等位基因数为 1.5139;25 个品种间的遗传相似性系数变幅范围为 0.4462 ~ 0.8923,说明黑龙江省大豆种质资源间的遗传基础相对较宽,存在较大的遗传变异性。

UPGMA 聚类分析可将 25 份大豆材料分成 5 大类,从分子水平上揭示了黑龙江省大豆种质资源间的亲缘关系,为大豆育种材料的筛选和后续深入研究提供了物质基础和理论依据。

参考文献

- [1] 邱丽娟,曹永生,常汝镇,等. 中国大豆 (*Glycine max*) 核心种质构建 I. 取样方法研究[J]. 中国农业科学,2003,36(12): 1442-1449. (Qiu L J, Cao Y S, Chang R Z, et al. Establishment of Chinese soybean (*G. max*) core collection I. Sampling strategy [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2003, 36(12): 1442-1449.)
- [2] 卢翠华,何志鸿,宋英淑,等. 黑龙江省主要大豆品种同工酶酶谱分析[J]. 大豆科学,1990,9(2):145-148. (Lu C H, He Z H, Song S Y, et al. Isozyme type analysis of soybean planted in Heilongjiang province [J]. Soybean Science, 1990, 9(2): 145-148.)
- [3] 马淑梅,丁俊杰,郑天琪,等. 黑龙江省大豆疫霉根腐病生理小种鉴定结果[J]. 大豆科学,2005,24(4):260-262. (Ma S M, Ding J J, Zheng T Q, et al. The identification of physiological races of *Phytophthora Megasperma* [J]. Soybean Science, 2005, 24(4): 260-262.)
- [4] 秦君,李英慧,刘章雄,等. 黑龙江省大豆种质遗传结构及遗传多样性分析[J]. 作物学报,2009,35(2):228-238. (Qin J, Li Y H, Liu Z X, et al. Genetic structure and diversity of soybean germplasm in Heilongjiang, China [J]. Acta Agronomica Sinica, 2009, 35(2): 228-238.)
- [5] Godwin I D, Aitken A B, Smith W. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics[J]. Electrophoresis, 1997, 18: 1524-1528.
- [6] 谢启鑫,缪南生,宋小民,等. 蝴蝶兰种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 西北植物学报,2010,30(7):1331-1336. (Xie Q X, Miu N S, Song X M, et al. Genetic Diversity Analysis of *Phalaenopsis* by ISSR markers [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2010, 30(7): 1331-1336.)
- [7] Blair M W, Panaud O, McCouch S R. Inter simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1999, 98: 780-792.
- [8] Cekic C, Battey N H, Wilkinson M J. The potential of ISSR-PCR primer-pair combinations for genetic linkage analysis using the seasonal flowering locus in *Fragaria* as a model [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103: 540-546.
- [9] 周延清,李敏,贾敬芬,等. 河南大豆遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 西北植物学报,2006,26(9):1883-1887. (Zhou Y Q, Li M, Jia J F, et al. ISSR analysis of genetic diversity of soybean in Henan [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2006, 26(9): 1883-1887.)
- [10] 谢甫锦, Yoshihito Takahata. 利用分子标记进行不同来源大豆品种的分类[J]. 大豆科学,2005,24(3):161-165. (Xie F D, Yoshihito Takahata. Phylogenetic analysis of soybean cultivars from different regions through ISSR markers [J]. Soybean Science, 2005, 24(3): 161-165.)
- [11] 王晓丹,吕慧颖,张敬,等. 以 PCR 为目的的大豆叶片 DNA 提取方法的比较研究[J]. 分子植物育种,2004,2(6):891-894. (Wang X D, Lu H Y, Zhang J, et al. Comparative study on methods of extracting DNA from soybean leaf for PCR [J]. Molecular Plant Breeding, 2004, 2(6): 891-894.)
- [10] 郭熙志,刘耀光,罗达. 以可转化人工染色体(TAC)载体为基础的百脉根基因文库的构建及筛选[J]. 植物生理与分子生物学报,2004,30(2):234-238. (Guo X Z, Liu Y G, Luo D. Construction and screening of a genomic dna library of *Lotus corniculatus* based on transformation competent artificial chromosomes [J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2004, 30(2): 234-238.)
- [11] Xu Y H, Zhu Y Y, Zhou H C, et al. Identification of a 98-kb DNA segment containing the rice *Eui* gene controlling uppermost internode elongation, and construction of a TAC transgene sublibrary[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2004, 272: 149-155.
- [12] 姜大刚,付晓,柳忠玉,等. TAC 载体介导温敏不育水稻的遗传转化[J]. 华南农业大学学报, 2005, 26(3):52-55. (Jiang D G, Fu X, Liu Z Y, et al. The genetic transformation of thermo-sensitive male sterile rice mediated by TAC vector [J]. Journal of South China Agricultural University, 2005, 26(3): 52-55.)
- [13] 杨光宇,纪锋. 中国野生大豆资源的研究与利用综述[J]. 吉林农业科学,1999,24(1):12-17. (Yang G Y, Ji F. Summary about study and exploitation of *Glycine soja* in China [J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences, 1999, 24(1): 12-17.)
- [14] Liu Y G, Whittier R F. Rapid preparation of megabase plant DNA from nuclei in agarose plugs and microbeads[J]. Nucleic Acids Research, 1994, 22(11): 2168-2169.
- [15] 曹筑荣,王正华,曹孟良. 可转化人工染色体文库研究进展[J]. 长江大学学报(自科版)农学卷, 2006, 3(4):201-203. (Cao Z R, Wang Z H, Cao M L. Research about a transformation-competent artificial chromosome (TAC) library [J]. Journal of Yangtze University (Natural Science Edition), 2006, 3(4): 201-203.)
- [16] Zhang H B, Choi S D, Woo S S, et al. Construction and characterization of two rice bacterial artificial chromosome libraries from the parents of a permanent recombinant inbred mapping population [J]. Molecular Breeding, 1996, 2: 11-24.
- [17] 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]. Plant J, 2000, 23(5):687-695.
- [18] 徐粤宇,周玉雷,赵茂林,等. 多枝赖草基因组 Mb 级 DNA 制备和酶切方法的优化[J]. 华北农学报,2007,22(6):24-29. (Xu Y Y, Zhou Y L, Zhao M L, et al. Optimized method of preparing and digesting Megabase-size DNA of *Leymus multicaulis* genomes [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2007, 22(6): 24-29.)
- [19] 徐粤宇,周玉雷,宋琳琳,等. 多枝赖草基因组可转化人工染色体(TAC)文库的构建和鉴定[J]. 中国科学 C 辑:生命科学, 2008, 38(4):328-336. (Xu Y Y, Zhou Y L, Song L L, et al. Construction and identification of transformation-competent artificial chromosome library of *Leymus multicaulis* genomes [J]. Science in China Series C: Life Sciences, 2008, 38(4): 328-336.)

(上接第 36 页)