

六倍体普通小麦中国春 PBF 编码基因的克隆及序列分析

郭丽娜, 高翔* (西北农林科技大学农学院, 陕西杨凌 712100)

摘要 [目的] 探讨作为模式小麦中国春 PBF 转录因子编码基因的多样性。[方法] 以中国春小麦品种为材料, 利用基因特异引物进行 PCR 扩增, 经过胶回收, 将目标片段连接至克隆载体上, 随机选择阳性质粒测序。序列拼接与比对、信号肽预测、二级结构预测、亚细胞定位及系统演化进行分析分别经由 DNAMAN、Signalp、PSIPRED、Nuc_PLoc 及 MEGA 软件进行分析比对。[结果] 从六倍体普通小麦中国春基因组中克隆得到 25 条编码序列, 根据序列相似性, 将其聚成 3 种等位类型, 亚基 2 个位点存在 SNP, 且都导致编码氨基酸残基的改变, 并影响到最终编码产物的二级结构。[结论] PBF 亚基编码序列在中国春小麦中极端保守, 但仍然存在变异。该结果为评价小麦籽粒储藏蛋白亚基的表达效率提供了理论参考。

关键词 普通小麦; PBF 转录因子; 克隆; 序列分析

中图分类号 S512.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)11-04740-05

Cloning and Sequence Analysis of PBF Encoding Genes from Hexaploid Common Wheat Chinese Spring (*Triticum aestivum* L.)

GUO Li-na et al (College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract [Objective] This study aimed to investigate the polymorphism of PBF encoding genes from common wheat Chinese Spring (*Triticum aestivum* L.). [Method] Using common wheat Chinese Spring as the experimental material, gene-specific primers were designed and applied to amplify the genomic DNA of Chinese Spring. PCR products were isolated, purified and ligated into the cloning vector. Positive clones were randomly selected for sequencing. A series of softwares including DNAMAN, Signalp, PSIPRED, Nuc_PLoc and MEGA were employed for sequence assembly and alignment, signal peptide prediction, primary and secondary structure prediction, as well as analyses of subcellular location and phylogenetic relationships between the PBF family members in Gramineae. [Result] Twenty-five target sequences were obtained from the genome of hexaploid common wheat Chinese Spring, which were classified into three clusters based on the sequence similarity. SNPs exist at two loci of the subunit, resulting in the change of encoded amino acid residues and affecting the secondary structure of final product encoded. [Conclusion] PBF encoding sequences are extremely conservative in Chinese Spring with certain variations. This study provides theoretical reference to evaluate the expression efficiency of wheat storage proteins.

Key words Common wheat; PBF transcription factor; Cloning; Sequence analysis

普通小麦中国春 (Chinese Spring, CS) (*Triticum aestivum* L.) 属于四川白麦类群 (white wheat complex)^[1-2], 被广泛应用于小麦各类重要性状 (如抗病、抗虫、抗逆等) 的定位及农艺性状的遗传分析^[3-5], 其含有的高分子量谷蛋白亚基 (High-molecular-weight glutenin subunit, HMW-GS) 被用于蛋白亚基命名的标准及亚基的加工品质分析^[6-7], 而有关栽培小麦基因组的测序工作也是以中国春为模式进行^[8]。中国春也常作为外源基因鉴定与转移的工具材料, 使得大量的远缘杂交过程中, 多以中国春作为受体遗传背景或对照材料^[4,9]。迄今为止, 已培育出中国春整套染色体缺失体、代换系、附加系等遗传材料, 这更是极大地推动了小麦遗传学研究领域的发展 (<http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/nomenclature.html>)^[10]。

麦类作物的籽粒蛋白在灌浆期间形成并运输到特定组织, 各蛋白组分的合成受到了转录水平及转录后水平的严格调控。其中, 转录因子 (Transcription Factors, TFs) 在该过程扮演重要角色, 该类调控因子又称反式作用因子, 本质上是一类调控蛋白, 能特异结合到真核生物基因启动子区域中的 DNA 序列上 (即顺式作用元件 cis-motifs), 从而激活或抑制下游基因以特定程度进行转录^[11]。禾谷类作物, 如大麦、玉

米、水稻、小麦等, 都具有 3 种重要的顺式作用元件, 分别是: GCN4-like motif (GLM)、prolamin box (PB) 及 AACAMotif^[12]。前者在营养响应中起主要作用; 后者则为储藏蛋白的组织特异性表达所必需^[13]。目前已有较多的 TFs 因子被报道, 小麦醇溶蛋白盒结合因子 PBF (prolamin box-binding factor) 即是其中之一, 它是小麦胚乳组织特异的基因表达调控因子, 主要调控小麦、大麦及玉米等作物籽粒中贮藏蛋白基因的活性^[13]。该因子属于 DOF (DNA binding with one finger) 类转录因子, 能与 PB 序列元件直接作用, 从而调控储藏蛋白基因的表达^[14]。序列分析表明, 这种互作实际为 PBF 转录因子与位于储藏蛋白编码基因启动子上的一段 AAAG 核心序列, 通过结合达到反式调控储藏蛋白基因的表达。研究表明, PB 序列本身存在多种变异类型, 已鉴定的有 P-box1 ~ P-box7, 这类序列与同一 PBF 因子结合的效率存在差异^[15]。类似的情况, PBF 本身也存在不同的等位形式, 理论上, 也可能存在结合能力与效率的差异, 并最终反映到蛋白质的积累上^[14]。此外, 在大麦中还发现 PBF 参与了种子萌发过程中对水解酶的调控^[13]。

尽管已有研究表明, 普通小麦的 PBF 编码基因定位于第 5 号同源群^[16], 但迄今为止, 针对六倍体普通小麦 PBF 的研究仍较少, 而有关中国春 *pbf* 基因的研究则仅有 1 条记录^[14]。同时就序列特征上看, PBF 亚基的染色体定位、亚细胞定位、高级结构、模体类型、糖基化与磷酸化位点等遗传及理化特性尚缺乏深入分析。鉴于此, 笔者在文中拟通过特异引物, 结合生物信息学分析软件, 系统发掘中国春基因组中 *pbf* 基因的等位类型以及编码产物的结构特征, 为后续的标

基金项目 国家自然科学基金 (30900896); 现代农业产业技术体系建设专项 (NYCYTX-001); 唐仲英育种基金 (A212020912)。

作者简介 郭丽娜 (1981-), 女, 山西运城人, 硕士, 从事植物遗传育种, E-mail: jessica810702@qq.com。* 通讯作者, 教授, 博士生导师, 博士, 从事小麦品质育种及理论研究, E-mail: gx@nwsuaf.edu.cn。

收稿日期 2013-03-17

记开发、功能研究等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 小麦及克隆菌株。小麦品种中国春 CS 由西北农林科技大学农学院品质实验室提供;克隆所用菌株大肠杆菌 DH5 α 感受态菌株购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.1.2 主要试剂。PCR 用 Trans PCR SuperMix、PCR 产物凝胶回收所需的 EasyPure Quick Gel Extraction Kit、分子量标准等均购于北京全式金生物技术有限公司,pGEM-T Easy Vector 购自北京天根生化科技,用于蓝白斑筛选的 IPTG、XGal 购自上海生物工程公司,试验所用其他试剂均为分析纯。

1.1.3 主要仪器。PCR 仪(MJ Mini,Bio-Rad);恒温摇床(上海比朗);Gel Doc 凝胶成像系统(Bio-Rad)。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取。以室温黑暗培养 1 周左右的中国春幼嫩叶片为材料,采用改良 CTAB 法提取基因组总 DNA^[17]。

1.2.2 引物设计。根据 NCBI 已登录的小麦 PBF 编码序列(GenBank 登录号为 AJ012284、AY496057、EF012226),利用软件 DNAMAN(ver. 7.0)设计一对覆盖 *pbf* 基因完整编码区的特异引物组合,即 *pbf* F1:5'-ATGGAGGAAGTGTATCCGTCA-3';*pbf* R1:5'-TTACATCAGGGAGGTGCTG-3'。引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

1.2.3 基因扩增。PCR 扩增体系为 25 μ l,包含 12.5 μ l 2 \times EasyTaq PCR SuperMix,1 μ l *pbf* F1/R1(10 μ mol/L),1 μ l 基因组 DNA,9.5 μ l ddH₂O。扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 40 s,56 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。

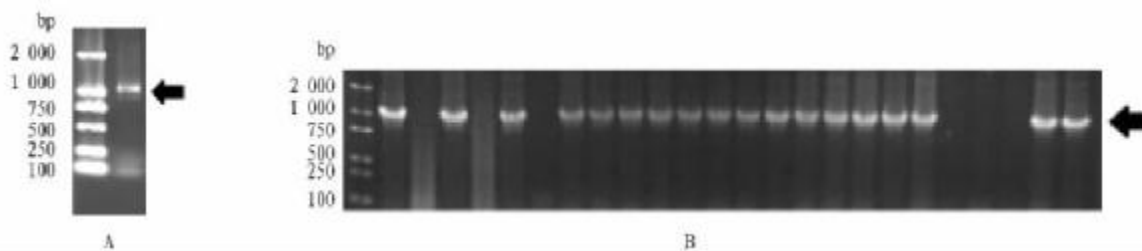
1.2.4 基因克隆与重组子筛选。PCR 扩增产物经 1.0% 琼

脂糖凝胶检测后,回收目的条带,与 pGEM-T Easy 载体连接,16 $^{\circ}$ C 水浴过夜。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态,在含有氨苄青霉素的 LB 平板上通过 X-gal/IPTG 挑选白色单斑,利用克隆引物 *pbf* F1/R1 进行菌落 PCR,随机选取 25 个独立的阳性克隆,送至北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

1.2.5 序列分析。利用 NCBI 网站的 BLASTn 软件(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)在线比对测定序列,判断其序列属性;利用 DNAMAN(ver. 7.0)拼接所筛选出的阳性克隆序列,以获得完整编码序列,同时利用该软件进行多序列比对及蛋白质翻译等序列处理;蛋白质理化性质由 ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)在线预测;使用 SherLoc(plant)(<http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/SherLoc>)确定 PBF 蛋白的亚细胞定位;信号肽由 SignalP 4.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)在线预测、核定定位信号由 PredictNLS(<https://roslab.org/owiki/index.php/PredictNLS>)在线预测、核输出信号由 NetNES(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/>)完成;蛋白质模体(motif)及二级结构整合了 Pfam motif(<http://pfam.janelia.org/search>)、MyHits(<http://myhits.isb-sib.ch/>)及 PCI-SS(<http://bioinf.sce.carleton.ca/PCISS/start.php>)的分析结果;系统演化树所需序列从 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上下载,经 DNAMAN(ver. 7.0)比对,由 MEGA5 构建系统演化树。

2 结果与分析

2.1 基因扩增、克隆与重组子筛选 基因扩增获得大小近 1 000 bp 的单一一条带(图 1A),经条带回收、纯化后连接到克隆载体上,通过蓝白斑筛选,并进行菌落 PCR(部分筛选结果如图 1B 所示),筛选到 30 个独立的阳性克隆,以 CSPBF01 ~ CSPBF30 逐一编码。



注:A 为 PCR 回收图谱,箭头所指为中国春条带;B 为部分阳性克隆筛选鉴定结果。

图 1 基因纯化及阳性克隆筛选

2.2 核酸序列分析 30 条序列中被 BLASTn 确认为 *pbf*(相似性 >80%)的阳性克隆有 25 条,利用 DNAMAN 进行序列比对,将其划分为 3 类,并从中挑选出 CSPBF01、CSPBF09、CSPBF21 为代表,核酸序列及蛋白质序列间的相似性分别为 99.93%、99.80%。将上述 3 条代表性的序列提交至 GenBank 数据库,通过与数据库中唯一 1 条具有中国春来源的 *pbf* 完整编码序列(数据库登录号:AJ012284)进行比较,得到核酸序列及蛋白质序列间的相似性分别为 99.87%、99.70%(编码氨基酸由 DNAMAN 推断,如图 2 所示)。来源于中国春的 *pbf* 基因序列间存在 5 个 SNPs,分别是:14 号碱基发生

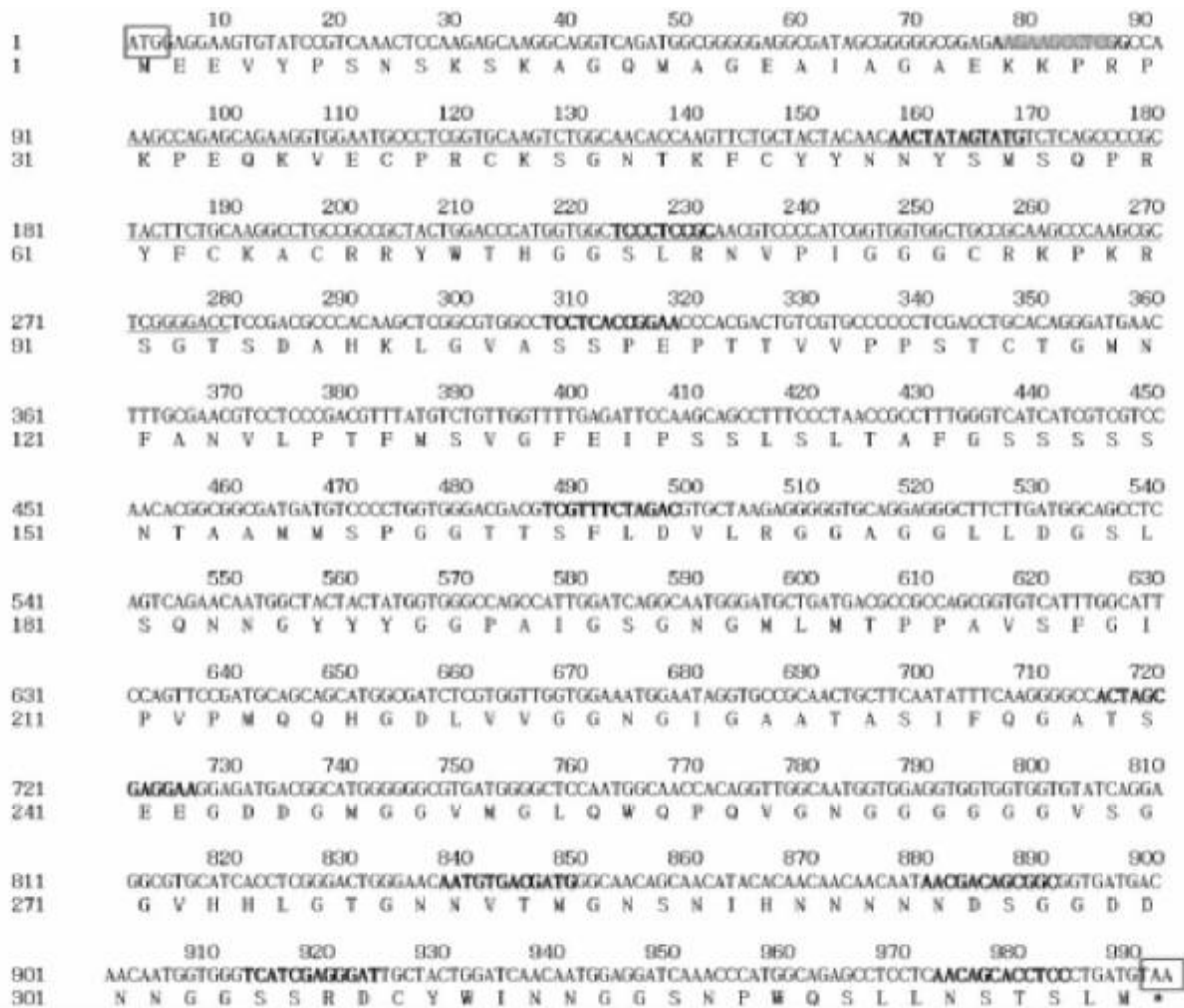
A \leftrightarrow T 颠换,16 号碱基发生 T \leftrightarrow C 转换,215 号碱基发生 A \leftrightarrow G 转换,339 号碱基发生 T \leftrightarrow C 转换,445 号碱基发生 T \leftrightarrow C 转换。其中,试验克隆到的 3 组编码亚基 CSPBF01、CSPBF09、CSPBF21 内部存在 2 处 SNPs,都导致了错义突变;而与之相比,AJ012284 共有 3 个 SNPs,其中位于 339 号碱基的转换属于沉默突变,14 号及 16 号碱基变异导致了错义突变。

2.3 蛋白序列分析

2.3.1 蛋白质理化性质分析。ProtParam 预测显示,试验克隆序列的编码产物分子量约 33.9 kD,分子式为 C₁₄₄₅H₂₂₄₃N₄₂₇

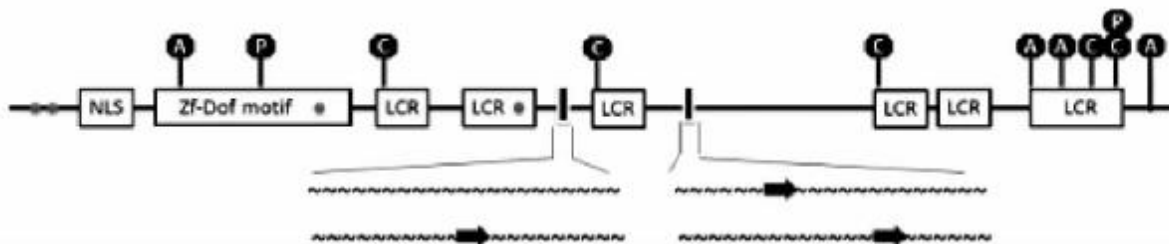
$O_{476}S_{22}$, 等电点 8.09, 属弱碱性蛋白, 所带正负电荷数相近; 体外红细胞中的半衰期(half-life)为 30 h, 不稳定系数(instability index)为 46.60, 属不稳定蛋白; 脂肪系数(Aliphatic in-

dex)为 52.30, 总平均亲水性(Grand average of hydropathicity)为 -0.435, 因此该 PBF 属亲水蛋白。



注:方框表示起始/终止密码,阴影部分为核定位信号 NLS 序列,下划线部分为 zf-Dof 结构域,加黑部分表示磷酸化或糖基化所在位点。

图 2 cspbf 全长编码序列及推导的氨基酸序列



注:圆点表示 CSPBF01、CSPBF09、CSPBF21 与 AJ012284 序列间的突变氨基酸位置, A、C、P 分别表示 N 端糖基化位点(ASN_Glycosylation_Site)、酪氨酸激酶 II 磷酸化位点(CK2_Phospho_Site)、蛋白激酶 C 磷酸化位点(PKC_Phospho_Site), zf-Dof 表示锌指所在的结构域, LCR 表示低复杂度区段, 箭头表示片层结构(β -strand)所在位置。

图 3 PBF 结构模式

2.3.2 蛋白质亚细胞定位分析。 SignalP 4.1 分析表明, 该蛋白无跨膜区段(noTM, no transmembrane regions), 最大切割位点可能性(Max cleavage site probability)为 0.1, 因此 PBF 蛋白不具备信号肽, 是非分泌型蛋白。SherLoc (plant) 预测表明, 该蛋白定位于细胞核的分值为 0.891 748(总分为 1), 因此 PBF 在合成后被转运至细胞核中执行调控任务。PBF

PredictNLS 预测表明, PBF 从 26 ~ 29 aa 区具有 KKPR 短肽, 符合单组份核定位信号(NLS-monopartite motif)的特征序列 K-K/R-X-K/R(图 3), 能帮助 PBF 快速通过核孔进入细胞核, 因此在合成后被运往细胞核。NetNES 未发现保守亮氨酸区段, 因此 PBF 不具备在细胞质与细胞核间往返穿梭的特性。

2.3.3 蛋白质结构分析。Pfam motif 预测表明,CSPBF01、CSPBF09、CSPBF21 都在 31~93 aa 区间形成锌指结构(zinc finger,DNA-binding with one finger domain,zf-Dof),这是一类小的模式蛋白,呈手指状突出,能直接接触及调控转录^[18];同时发现 6 个低复杂度区(low-complexity region,LCR)(图 3)。

MyHits 的分析表明,PBF 序列存在 3 种类型的翻译后修饰位点,其中,N 端糖基化位点(ASN_Glycosylation_Site)有 4 个,集中分布于 PBF 的 C 端低复杂度区;酪氨酸激酶 II 磷酸化位点(CK2_Phospho_Site)有 5 个,分散在整条蛋白质上;蛋白激酶 C 磷酸化位点(PKC_Phospho_Site)有 2 个,分别位于 N 端与 C 端;PBF 核心区域 Dof 分别有 1 个 N 端糖基化位点和 1 个蛋白激酶 C 磷酸化位点(图 3)。

PCI-SS 预测表明,尽管在 CSPBF01、CSPBF09、CSPBF21、AJ012284 之间存在 4 个氨基酸的替换,但各个位点对二级结构的影响大小不同,其中处于锌指结构域内部的第 72 号氨基酸由于发生 H→R 的变化,对结构影响效果极为明显,导致 CSPBF21 二级结构相对于其他 3 条记录产生了明显变化,而且还波及到临近区域,总共形成 5 处结构的改变,如图 3 所示,在 102~161 aa 区域插入长度为 5 aa 的片层结构(Extended strand),而 190~210 aa 区间片层后移 7 aa 位置。二级结构分析表明,zf-Dof 区域氨基酸的变化对整个蛋白质的二级结构影响较大,而且表现为片层结构的增加或移位,未发现其他类型的结构性变化。

2.3.4 系统演化树分析。通过 BLSATn 从数据库获得 30 条相似序列,其中,小麦(*Triticum aestivum* L.)来源的序列 6 条,水稻(*Oryza sativa*)来源的序列 7 条,高粱(*Sorghum bicolor*)及大麦(*Hordeum vulgare*)来源的各 4 条,玉米(*Zea mays*)及短柄草(*Brachypodium distachyon*)来源的各 2 条,小果野蕉(*Musa acu minata*)、黍(*Panicum miliaceum*)、稷(*Eleusine coracana*)、大豆(*Glycine max*)以及森林草莓(*Fragaria vesca*)来源的各 1 条。利用 MyHits 进一步鉴定上述序列的编码产物,并去掉不具有典型 zf-Dof 结构域的记录,最终获得包括 11 个物种的 28 条记录。

系统演化树如图 4 所示,zf-Dof 编码序列被聚类成 4 个相对独立的组,试验克隆的 3 条序列与数据库来源的另外 9 条序列被聚到第 1 组(Group I),且 CSPBF01 与 CSPBF21 距离比 CSPBF09 更近;从序列种群来源上看,该簇主要包括小麦和大麦 2 物种,同时还有极少量的玉米、稷、黍,且都属于禾本科。第 2 组(Group II)也有 9 条序列,该簇主要包括水稻与高粱 2 物种,也包括玉米、短柄草,都同属于禾本科植物。第 3 组(Group III)由 7 条记录构成,主要包括水稻、大麦 2 物种,也有小果野蕉及 1 条小麦序列^[19]。第 4 组(Group IV)有 2 条序列,分别是水稻及大豆来源的 PBF 锌指序列。

3 讨论

小麦来源的 zf-Dof 结构本身具有多样性,变异位点主要集中于 N-端区域(图 3、4),AY955493 与 AJ012284、CSPBF01、CSPBF 09、CSPBF21 之间的差异很大,被聚到 2 个完全不同

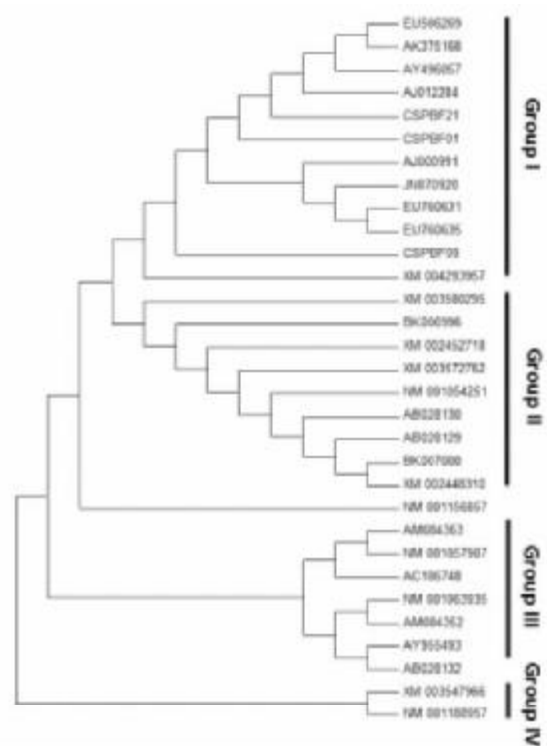


图 4 物种间 PBF 蛋白质的系统演化树分析

的簇。同时,AJ012284 与 CSPBF01、CSPBF09、CSPBF21 均来自于中国春小麦品种,从同一份材料中克隆得到 4 条不同的 *pbf* 编码基因,这与特定位点编码相悖^[16],可能预示着 *pbf* 并非由单一位点编码,此推论尚有待于进一步证实。而水稻有关研究应证了这种可能,从图 4 的聚类结果可知,水稻来源的序列广泛分布于 Group II~IV,而 Group I 其实与 Group II 关系很近,这说明作为二倍体的水稻,该家族成员已足够复杂,这可能与该基因编码产物广泛参与转录水平上的植物生长发育及对生物和非生物胁迫的反应有关^[20]。因此,作为倍性更为复杂的小麦,其 PBF 多样性研究也亟待深入。另外,研究随机挑选的阳性克隆中,近 2/3 的序列与 CSPBF01 完全一致,这种扩增上的显著偏倚性(bias)同样值得关注。

亚细胞定位、信号肽、核定位信号及输出信号分析表明,PBF 合成后被运输至细胞核;同时,motif 分析发现,该蛋白 N-端区具有 zf-Dof 结构域,能与核酸结合。上述信息符合作为转录因子的空间及功能特性。

二级结构预测表明,CSPBF21 与 CSPBF 01、CSPBF 09 的关系较远,由于核心区域的氨基酸变化,波及附近区段,最终表现为二级结构局部区段的显著改变(图 3);对 Dof 域序列的比对分析表明,CSPBF 21 与 CSPBF 01 被聚成一支,而 CSPBF 09 被疏离(图 4)。同时,PBF 具有种属特异性,如图 4 所示,水稻来源的 PBF 极少与小麦来源的 PBF 聚到一支。显然,Dof 难以体现物种之间的进化关系。

由于 PBF 通过反式激活的方式广泛参与胚乳储藏蛋白的合成调控^[21],同时还参与小麦植株其他组织的表达调控^[22],因此,上述结果将对于系统研究 PBF 多样性、进化关系、异源多倍体物种中分布特点等具有重要的参考价值。

参考文献

- [1] YEN C, LUO M C, YANG J L. The origin of the Tibetan weederace of hexaploid wheat, Chinese Spring, Chengdu-guang-tou and other landraces of the white wheat complex from China [C]. Proceedings of the 7th International Wheat Genetics Symposium. Cambridge, England, 1988:175-179.
- [2] WARD R W, YANG Z L, KIM H S, et al. Comparative analyses of RFLP diversity in landraces of *Triticum aestivum* and collections of *T. tauschii* from China and Southwest Asia [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1998, 96:312-318.
- [3] XU Z Q, ZHANG S Y, WANG R, et al. Genetic analysis and molecular mapping of stripe rust resistance gene in wheat line M8003-5 [J]. Acta Agronomica Sinica, 2010, 36:2116-2123.
- [4] ANDERSON J M, BUCHOLTZ D L, SARDESAI N. Potential new genes for resistance to *Mycosphaerella graminicola* identified in *Triticum aestivum* × *Lophopyrum elongatum* disomic substitution lines [J]. Euphytica, 2010, 172:251-262.
- [5] LUO MC, DVO RÁK J. Molecular mapping of an alu minium tolerance locus on chromosome 4D of Chinese Spring wheat [J]. Euphytica, 1996, 91:31-35.
- [6] MANSUR L M, QUALSET C O, KASARDA D D, et al. Effects of 'Cheyenne' chromosomes on milling and baking quality in 'Chinese Spring' wheat in relation to glutenin and gliadin storage proteins [J]. Crop Science, 1990, 30:593-602.
- [7] PAYNE P I, LAWRENCE G J. Catalogue of alleles for the complex gene loci, *Glu-A1*, *Glu-B1* and *Glu-D1* which coded for high-molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat [J]. Cereal Research Communications, 1983, 11:29-35.
- [8] BRECHLEY R, SPANNAGL M, PFEIFFER M, et al. Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing [J]. Nature, 2012, 491:705-710.
- [9] SCHOENENBERGER N, GUADAGNUOLO R, SAVOVA-BIANCHI D, et al. Molecular analysis, cytogenetics and fertility of introgression lines from transgenic wheat to *Aegilops cylindrica* Host [J]. Genetics, 2006, 174:2061-2070.
- [10] ENDO T R, GILL B S. The deletion stocks of common wheat [J]. Journal of Heredity, 1996, 87:295-307.
- [11] VERDIER J, THOMPSON R D. Transcriptional regulation of storage protein synthesis during dicotyledon seed filling [J]. Plant Cell Physiology, 2008, 49:1263-1271.
- [12] ZHENG Z, KAWAGOE Y, XIAO S H, et al. 5'distal and proximal cis-acting regulation elements are required for developmental control of a rice seed storage protein *glutelin gene* [J]. Plant Journal, 1993, 4:357-366.
- [13] MULLER M, MUTH J R, GALLUSCI P, et al. Regulation of storage protein synthesis in cereal seeds: developmental and nutritional aspects [J]. Plant Physiology, 1995, 145:606-613.
- [14] MENA M, VICENTE-CARBAJOSA J, SCHMIDT R J, et al. An endosperm-specific DOF protein from barley, highly conserved in wheat, binds to and activates transcription from the prolamins-box of a native B-hordein promoter in barley endosperm [J]. Plant Journal, 1998, 16(1):53-62.
- [15] JUHÁSZ A, MAKAI S, SEBESTYÉN E, et al. Role of conserved non-coding regulatory elements in LMW glutenin gene expression [J]. PLoS ONE, 2011, 6(12):29501.
- [16] RAVEL C, NAGY I J, MARTRE P, et al. Single nucleotide polymorphism, genetic mapping, and expression of genes coding for the DOF wheat prolamins-box binding factor [J]. Functional and Integrative Genomics, 2006, 6:310-321.
- [17] MURRAY M G, THOMPSON W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. Nucleic Acids Research, 1980, 8:4321-4325.
- [18] LIJAVETZKY D, CARBONERO P, VICENTE-CARBAJOSA J. Genome-wide comparative phylogenetic analysis of the rice and Arabidopsis Dof gene families [J]. BMC Evolutionary Biology, 2003, 3:17.
- [19] CHEN R, NI Z, QIN Y, et al. Isolation and characterization of *TaDof1* transcription factor in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Mitochondrial DNA, 2005, 16(5):358-363.
- [20] 周淑芬, 刘华清, 徐桂磊, 等. 水稻种子发育期间特异锌指蛋白基因的筛选与分析 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2012, 28(11):1033-1039.
- [21] DONG G, NI Z, YAO Y, et al. Wheat Dof transcription factor WPBF interacts with *TaQM* and activates transcription of an *alpha-gliadin* gene during wheat seed development [J]. Plant Molecular Biology, 2007, 63:73-84.
- [22] WANG Z, NI Z, WU H, et al. Heterosis in root development and differential gene expression between hybrids and their parental inbreds in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2006, 113:1283-1294.
- [23] 聂利红, 王延召, 孙其信, 等. 人工异源六倍体小麦中甲基化差异的 MSAP 分析 [J]. 华北农学报, 2012(2):77-80.
- [24] 杨松杰, 刘世贵, 李俊, 等. 人工合成六倍体小麦与普通小麦杂交后代衍生群体的 PPO 基因分析 [J]. 分子植物育种, 2006(6):772-778.
- [5] 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.
- [6] 王江波, 潘东明, 潘腾飞, 等. 中国水仙 BAC 文库构建的研究 [J]. 中国农学通报, 2012(10):194-197.
- [7] 赵茜, 徐丽珍. 快速提取籽用南瓜基因组 DNA 方法的研究 [J]. 黑龙江农业科学, 2011(10):14-15.
- [8] OSOEGAWA K, WOON P Y, ZHAO B, et al. An improved approach for construction of bacterial artificial chromosome libraries [J]. Genomics, 1998, 52:1-8.
- [9] HAO R, ZHAO F K, SUN Q P, et al. Cloning and Sequence Analysis of CmNAC Gene from *Cucurbita moschata* [J]. Agricultural Science & Technology, 2012, 13(2):295-298.
- [10] 王卓, 袁玉辉, 胡学芳, 等. 芥菜型油菜 A9 染色体黄籽基因区域 BAC 重叠群的构建 [J]. 湖南农业科学, 2012(11):1-3, 7.
- [11] 马爱茹, 冯大领, 刘立平, 等. 大白菜开花相关基因 CO 的 BAC 克隆筛选及分析 [J]. 华北农学报, 2012(6):20-23.

(上接第 4739 页)

3 结论

该研究首次成功构建了南瓜基因组 DNA 的细菌人工染色体 (BAC) 文库, 研究表明, 该方法可用于南瓜基因组 DNA 的 BAC 文库构建, 这将为南瓜基因组测序以及相关基因的克隆、结构功能研究奠定基础。

参考文献

- [1] SHIZUYA H, BIEEREN B, KIM U J, et al. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase pair fragments of human DNA Escherichiacoli using an F-factor based vector [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992, 89:8794-8797.
- [2] 许靖曼. 大豆多粒荚特异材料 BAC 文库的构建 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2010.
- [3] 赵雪雅. 栽培花生基因组 BAC 文库的构建 [D]. 郑州: 郑州大学, 2011.
- [4] 冯大领. 大白菜 BAC 文库的构建及 CO 相关基因 BAC 克隆的筛选与