

# 大白菜开花相关基因 *FLC1* 的 BAC 克隆筛选及分析

石学萍, 冯大领, 王彦华, 轩淑欣, 申书兴\*

(河北农业大学园艺学院, 河北保定 071001)

**摘要:** 采用改良的混合池构建方法构建大白菜 BAC 文库一级混合池和二级混合池, 利用开花相关基因 *FLC1* 特异引物对其进行 PCR 筛选。通过三步 PCR 扩增、114 个 PCR 反应, 筛选了 19 200 个克隆, 获得了 2 个 *FLC1* 单克隆。克隆测序结果表明, 其扩增产物的序列与大白菜 *FLC1* 的相似性达到 99%, 证实此克隆为含 *FLC1* 基因的 BAC 克隆。

**关键词:** 大白菜; BAC 克隆; 开花相关基因; 混合池; PCR 筛选

**中图分类号:** S 634.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2010) 09-1513-04

## Screening and Analysis of BAC Clones Containing Flowering Time Gene *FLC1* in *Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* Olsson

SHI Xue-ping, FENG Da-ling, WANG Yan-hua, XUAN Shu-xin, and SHEN Shu-xing\*

(College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China)

**Abstract:** The primary and secondary pools of a bacterial artificial chromosome (BAC) library in Chinese cabbage were constructed using improved BAC pooling strategy. The specific primers of flowering time gene *FLC1* were to screen those BAC clones by PCR amplification. In total two positive *FLC1* clones were obtained from 19 200 BACs through three steps of PCR screening with 114 reactions. Sequence analysis of *FLC1* clones showed that these fragments has 99% of homology with the *FLC1* in Chinese cabbage, indicating that the flowering time gene *FLC1* is contained in the BAC clones.

**Key words:** Chinese cabbage; BAC clone; *FLC1* gene; pool; PCR screening

大白菜 [*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* (Lour.) Olsson] 是典型的春化敏感植物, 春季抽薹是白菜类作物春季生产的主要障碍。*FLOWERING LOCUS C (FLC)* 基因是最早在拟南芥中发现的与春化作用有关的基因 (Lee et al., 1994; Sheldon et al., 2000), 对花分生组织特性基因 *LFY* 起抑制作用, 并编码一种新的 MADS-box 蛋白, *FLC* 的表达水平越高, 开花时间越晚 (Michaels & Amasino, 1999; Yuan et al., 2009)。Schrantz 等 (2002) 研究发现, 在白菜中有 4 个 *BrFLCs* 基因 (*BrFLC1*, *BrFLC2*, *BrFLC3*, *BrFLC5*), *FLC* 的重复是造成开花时间变异的原因, 开花时间的表型变异是由于 *BrFLC1* 和 *BrFLC2* 的加性效应造成的。Kim 等 (2006) 研究了这 4 个开花相关基因与各个连锁

收稿日期: 2010-04-23; 修回日期: 2010-06-17

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (30871713); 国家科技支撑计划项目 (2009BADB8B03); 河北省应用基础研究计划重点基础研究项目 (08965514D)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: shensx@hebau.edu.cn)

群的关系, Yang 等 (2006) 将它们分别定位在连锁群 A10、A02 和 A03 上。本研究中以中国大白菜 '85-1' 自交系构建的 BAC 文库为材料, 筛选开花相关基因 *FLC1* 的 BAC 克隆, 为研究其在大白菜染色体上的定位以及染色体结构 (如易位) 或数量变异 (如三体) 对开花特性的影响奠定基础, 也为筛选抗抽薹反季节大白菜新品种提供技术基础, 同时对 BAC 库筛选方法进行了优化。

## 1 材料与方法

试验于2008年3月—2009年10月在河北农业大学园艺学院进行。试验材料为大白菜 '85-1' 自交系构建的BAC文库, 由河北农业大学细胞生物学实验室提供。

根据GenBank中大白菜开花相关基因 $FLC1$  (登录号AY115678) 设计合成1对PCR引物: P1为5'-AGGTACGTTACTTCCGTGAT-3', P2为5'-GGAGATTGTCCTGGTGAGA-3'。PCR反应体系: 100 ng模板DNA, 1 U *Taq* DNA 聚合酶, 0.5  $\mu$ L dNTPs ( $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 各1  $\mu$ L正向和反向引物 ( $5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。PCR程序为94  $^{\circ}\text{C}$  预变性3 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 54  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 35个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸10 min。

BAC 文库混合池的构建参考 Liu 等 (2006) 提出的方法并进行了改进。用灭菌的 384 复制器在装有 BAC 克隆的 384 板上沾取菌落于 LB 固体培养基上, 37  $^{\circ}\text{C}$  过夜培养。各菌落混合置于 10 mL 离心管中, 即构成 1 个一级混合池。共构建一级混合池 50 个。利用碱裂解法 (Sambrook & Russell, 2001) 制备质粒 DNA, 并以其为模板, 进行 PCR 筛选。取含阳性克隆一级混合池对应的 384 冻存板, 用牙签分别挑取 A~P 每行 24 个克隆置于含 3 mL LB 液体培养基的离心管中, 37  $^{\circ}\text{C}$  225  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  过夜培养, 此菌液做为二级混合池。每个一级混合池对应的 384 冻存板能构成 16 个二级混合池, 每个二级混合池中有 24 个 BAC 单克隆。用牙签挑取含有阳性克隆的二级混合池对应的单克隆, 过夜培养并提取质粒, 以此为模板进行 PCR 筛选, 经电泳检测找到含 *FLC1* 的阳性单克隆。

PCR 产物回收按照 Takara Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 试剂盒进行, 回收的 PCR 产物与 T-载体连接、转化, PCR 验证转化菌落, 挑取 10 个克隆进行验证。将验证正确的克隆送上海生工测序, 用 NCBI 站点的 BLAST 进行核苷酸比对, 分析 PCR 扩增产物的序列与已知 *FLC1* 基因的相似性。

## 2 结果与分析

### 2.1 *FLC1* 克隆的筛选

以 50 个一级混合池为模板, 利用特异引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增, 结果表明: 第 146 号池中能够扩增出目的条带, 其大小为 900 bp 左右, 与预期的扩增片段一致 (图 1), 说明其含有 *FLC1* 克隆。

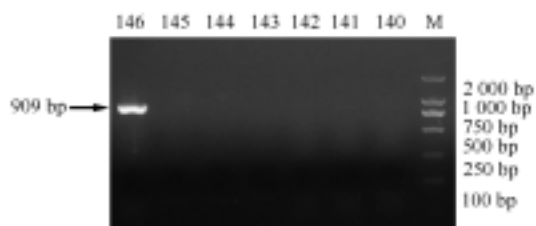


图 1 *FLC1* 克隆的一级混合池 (140~146) 筛选

Fig. 1 Screening of primary pools (140–146) for *FLC1* clones



图 2 *FLC1* 克隆的二级混合池 (C~J) 筛选

Fig. 2 Screening of secondary pools (C–J) for *FLC1* clones

将 146 号冻存板每 1 行作为 1 个二级混合池进行 PCR 扩增，结果显示：在 I 行和 L 行含有 *FLC1* 克隆（图 2）。对 L 行的各个单克隆进行 PCR 扩增结果表明，L 行的 11 号单克隆扩增到了目的条带（图 3）。用同样方法在 I 行的 20 号单克隆扩增到了目的条带。通过以上 3 步 PCR 扩增共 114 个 PCR 反应，筛选了 19 200 个克隆，获得了 2 个 *FLC1* 单克隆。

2.2 *FLC1* 单克隆的鉴定及分析

将单克隆的 PCR 产物与载体 pMD-19 连接、转化，PCR 验证结果表明：扩增条带均在 900 bp 左右，与筛选单克隆的扩增条带一致，证明转化后的克隆为阳性克隆（图 4）。取该阳性克隆的菌株送上海生工测序，测序结果表明，该片段长度为 909 bp，与预期片段完全一致。

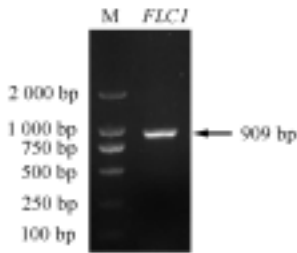


图 3 *FLC1* 阳性单克隆的筛选  
Fig. 3 The single *FLC1* positive clone screening

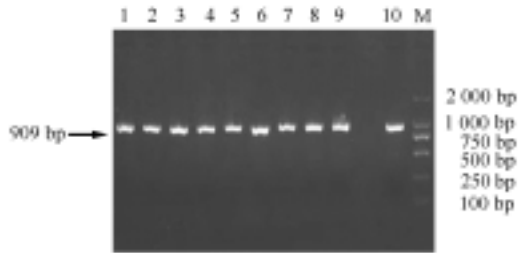


图 4 *FLC1* 菌液的 PCR 验证  
1 ~ 10：含 *FLC1* 的菌液；M：2 kb DNA 分子量标准。  
Fig. 4 PCR confirming of bacteria *FLC1*  
1 ~ 10：The bacteria *FLC1*；M：2 kb DNA marker.

在 NCBI 站点进行了 BLAST 比对，从表 1 可以看出，PCR 扩增产物的序列与大白菜 KBrH080A08BAC 克隆、大白菜 *FLC1* 外显子和部分蛋白质编码序列（Coding sequences，cds）相似性达到 99%，与甘蓝 *FLC1* 基因相似性达到 63%，证明此克隆为含 *FLC1* 基因的 BAC 克隆。

表 1 *FLC1* 克隆的相似性比对  
Table 1 Sequence similarities of compared with the *FLC1* clones

登录号	序列名称	最大相似分值	总分值	相似性/ %
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage
AC155344.1	大白菜 KBrH080A08 克隆的完整序列 <i>Brassica campestris</i> ssp. <i>pekinensis</i> clone KBrH080A08, complete sequence	1 668	1 668	99
AY115678.1	白菜类 <i>FLC1</i> 基因 2-7 号外元的部分序列 <i>Brassica campestris FLC1</i> gene, exons 2 through 7 and partial cds	1 646	1 646	99
AM231517.1	芥蓝 <i>FLC1</i> 基因 1-7 号外元序列 <i>Brassica oleracea</i> var. <i>alboglabra FLC1</i> gene for flowering protein, exons 1-7	815	1 004	63
AY115674.1	甘蓝 <i>FLC1</i> 基因 2-7 号外元部分序列 <i>Brassica oleracea FLC1</i> gene, exons 2 through 7 and partial cds	813	1 002	63
AM231521.1	青花菜 <i>FLC1</i> 基因 2-7 号外元部分序列 <i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> partial <i>FLC1</i> gene for flowering protein exons 2-7	811	1 000	63

3 讨论

用于筛选 BAC 文库的方法主要有高密度影印杂交筛选法（王文生 等，2006；张洋 等，2008）和 PCR 法，PCR 法由于具有简便、快速、精确度高而被大多数人采用。吴新东等（2008）在研究美利奴细毛羊 BAC 文库筛选时，一级混合池基于盘、行、列三维混合池组成，二级混合池基于整个 BAC 文库而构建，先筛选二级混合池，再根据结果筛选相应的一级混合池。筛选 7.4 万个克隆，共构建一

级盘混合池168个,一级行混合池672个,一级列混合池1 008个。此方法需要做的PCR反应较少,且筛选多个不同功能基因的阳性克隆时可多次使用,但构建混合池较复杂。本试验中利用384冻存板的384个克隆作为一级混合池,冻存板的各行做二级混合池,1个冻存板只需做16个二级混合池,然后对阳性克隆行24个单克隆进行PCR验证。本试验从19 200个克隆中筛选到阳性克隆只需做50个一级混合池,16个二级混合池,共114个PCR反应就能够获得2个阳性克隆。这样使构建混合池的程序简化、贮存混合池占用空间减小,也减少了做单列池的工序,更重要的是减少了对384孔板的污染几率。该文库筛选方法的优化,为快速筛选包含功能基因的阳性克隆提供了有效的技术手段。

本试验通过PCR方法筛选到2个*BrFLC1*基因的BAC克隆。但这2个克隆是否包含*BrFLC1*基因的全部遗传信息还有待于进一步利用分子生物学技术对BAC克隆进行分析。由于在白菜类作物中存在着多个*FLC*相关基因,因此,还需要筛选*BrFLC2*,*BrFLC3*,*BrFLC5*的BAC克隆,以期通过BAC-FISH技术对大白菜开花相关基因进行染色体定位;并利用本课题组创建的大白菜初级三体(申书兴等,2006)研究不同*BrFLCs*基因的协同作用对开花特性的影响,为筛选抗抽薹反季节大白菜新品种提供理论依据。

## References

- Kim J, Chung T, King G, Jin M, Yang T, Jin Y, Kim H, Park B. 2006. A sequence-tagged linkage map of *Brassica rapa*. *Genetics*, 174: 29–39.
- Lee I, Michaels S D, Masshardt A S, Amasino R M. 1994. The late-flowering phenotype of *FRIGIDA* and mutations in *LUMINIDEPENDENS* is suppressed in the Landsberg erecta strain of *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 6: 903–909.
- Liu H B, Liu K, Wang J F, Ma R Z. 2006. A BAC clone-based physical map of ovine major histocompatibility complex. *Genomics*, 88 (1): 88–95.
- Michaels S D, Amasino R M. 1999. *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell*, 11 (5): 949–956.
- Sambrook J, Russell D. 2001. *Molecular Cloning: A laboratory manual* (3rd edition). Cold Spring Harbor: CSHL Press.
- Schranz M E, Quijada P, Sung S, Lukens L, Amasino R, Osborn T. 2002. Characterization and effects of the replicated flowering time gene *FLC* in *Brassica rapa*. *Genetics*, 162: 1457–1468.
- Sheldon C C, Rouse D T, Finnegan E J, Peacock W J, Dennis E S. 2000. The molecular basis of vernalization: The central role of *FLOWERING LOCUS C (FLC)*. *Proc Natl Sci*, 97: 3753–3758.
- Shen Shu-xing, Hou Xi-lin, Zhang Cheng-he. 2006. A study on obtaining primary trisomics by the isolated microspore culture of autotetraploid chinese cabbage. *Acta Horticulturae Sinica*, 33 (6): 1209–1214. (in Chinese)
- 申书兴, 侯喜林, 张成合. 2006. 利用小孢子培养创建大白菜初级三体的研究. *园艺学报*, 33 (6): 1209–1214.
- Wang Wen-sheng, Wang Xing-fen, Ma Zhi-ying, Zhang Gui-yin. 2006. Identification of BAC clones related with verticillium wilt resistance gene and construction of sub-clone library. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 21 (Supplement): 147–150. (in Chinese)
- 王文生, 王省芬, 马峙英, 张桂寅. 2006. 棉花抗黄萎病相关基因筛选与亚克隆文库构建. *华北农学报*, 21 (增刊): 147–150.
- Wu Xin-dong, Chen Fang, Li Xin, Zou Yi-hui, Qiu Wei, Gao Jian-feng. 2008. Three-dimensional PCR-based screening of Chinese fine wool merino sheep BAC library. *Chinese Journal of Biotechnology*, 24 (10): 1828–1831. (in Chinese)
- 吴新东, 陈芳, 李鑫, 邹毅辉, 邱巍, 高剑峰. 2008. 中国美利奴细毛羊BAC文库的三维PCR筛选. *生物工程学报*, 24 (10): 1828–1831.
- Yang T, Kim J, Kwon S, Lim K, Choi B, Kim J, Jin M, Park J, Lim Y, Kang J, Hong J, Kim C, Bhak J, Bancroft L, Park B. 2006. Sequence-level analysis of the diploidization process in the triplicated *FLOWERING LOCUS C* region of *Brassica rapa*. *The Plant Cell*, 18: 1339–1347.
- Yuan Y, Wu J, Sun Ri, Zhang Xiao-wei, Xu D, Bonnema G, Wang X. 2009. A naturally occurring splicing site mutation in the *Brassica rapa FLC1* gene is associated with variation in flowering time. *Journal of Experimental Botany*, 60 (2): 1299–1308.
- Zhang Yang, Zhang Xiao-jun, Liu Bin, Li Fu-hua, Xiang Jian-hai. 2008. Key of genome research: Large-insert genomic DNA libraries. *Marine Sciences*, 32 (4): 74–81. (in Chinese)
- 张洋, 张晓军, 刘斌, 李富花, 相建海. 2008. 基因组研究的关键平台——大片段文库. *海洋科学*, 32 (4): 74–81.