园艺学报，2015，42 (2)：361 – 366.
Acta Horticulturae Sinica
doi：10.16420/j.issn.0513-353x.2014-0885；http：//www. ahs. ac. cn

马铃薯栽培品种‘合作 88’细菌人工染色体文库的构建与评价

杨 煜[1]，杨晓慧[1,*]，李灿辉[2]，郭 晓[1]，单伟伟[1]，马伟清[1,**]，黄三文[3]，李广存[1,3,**]

（[1]山东省农业科学院蔬菜花卉研究所，山东省设施蔬菜分子生物学重点实验室，济南 250100；[2]云南师范大学生命科学学院，昆明 650500；[3]中国农业科学院蔬菜花卉研究所，北京 100081）

摘 要：以四倍体马铃薯栽培品种‘合作 88’培养 12 ~ 15 d 苗龄的幼嫩叶片为试材，提取高分子量基因组 DNA，利用限制性内切酶 *Hin*dⅢ部分酶切后回收 100 ~ 300 kb 片段，连接到载体 CopyControl^{TM} pCC1BAC^{TM}的 *Hin*dⅢ位点上，构建了细菌人工染色体（BAC）文库。该文库约由 850 000 个克隆组成，空载率约 2.08%，保存在 1 700 个混合池中，克隆插入片段平均大小约为 90 kb，覆盖单倍型马铃薯基因组约 85 倍。随机挑取 6 个 BAC 克隆连续培养 5 d，提取 DNA 进行 *Hin*dⅢ完全酶切检测，确认不同培养时间的 BAC 克隆的指纹图谱完全一致，表明文库较好的稳定性。BAC 文库的构建为马铃薯重要农艺性状基因克隆、基因组测序以及比较基因组研究等奠定了基础。

关键词：马铃薯；细菌人工染色体文库；抗病性

中图分类号：S 532　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：0513-353X（2015）02-0361-06

Construction and Characterization of a Bacterial Artificial Chromosome Library of Potato Cultivar C88

YANG Yu[1]，YANG Xiao-hui[1,*]，LI Can-hui[2]，GUO Xiao[1]，SHAN Wei-wei[1]，MA Wei-qing[1,**]，HUANG San-wen[3]，and LI Guang-cun[1,3,**]

（[1]*Institute of Vegetables and Flowers*，*Shandong Academy of Agricultural Sciences*，*Molecular Biology Key Laboratory of Shandong Facility Vegetable*，*Ji'nan* 250100，*China*；[2]*College of Life-Sciences*，*Yunnan Normal University*，*Kunming* 650500，*China*；[3]*Institute of Vegetables and Flowers*，*Chinese Academy of Agricultural Sciences*，*Beijing* 100081，*China*）

Abstract: A bacterial artificial chromosome library of potato（*Solanum tuberosum* L.）was constructed for‘C88’，a tetraploid potato cultivar conferring resistance to late blight，PVX and PVY，using BAC vector CopyControl^{TM} pCC1. Fresh leaf tissues from 12 – 15 day-old seedlings were used to isolate high molecular weight genomic DNA，and 100 – 300 kb partially *Hin*dⅢ digested DNA fragments were selected and ligated into the *Hin*dⅢ site of pCC1. The library consists of 850 000 clones and stored in 1 700 pools. The average insert size of BAC clones is about 90 kb and the empty clones consist of about

收稿日期：2014 – 10 – 24；**修回日期**：2015 – 01 – 07

基金项目：国家‘863’计划项目（2013AA102603-4）；国家科技支撑计划项目（2012BAD02B05-10）；山东省良种工程农业生物资源创新利用项目（PTBR2013）；公益性行业（农业）科研专项（201303018-03）；山东省农业科学院青年科研基金项目（2014QNZ03）

* 共同第一作者

** 通信作者 Author for correspondence（E-mail：liguangcun001@163.com；maweiqing008@163.com）

2.08%. The library is equivalent to 85 haploid potato genomes. Six randomly picked clones showed stable *Hin*dⅢ fingerprints after 5 days' successive culture，indicating that the clones in the library are stable. The library will facilitate gene cloning，sequencing and comparative genomics research of potato.

Key words：potato；bacterial artificial chromosome library；pathogen resistance

马铃薯单倍型DM基因组测序计划的完成（The Potato Genome Sequencing Consortium，2011）为马铃薯重要农艺性状的研究奠定了坚实基础，但由于已测序马铃薯材料为双单倍体，而马铃薯栽培种为四倍体，利用已测序单倍型基因组序列信息进行马铃薯重要农艺性状的研究仍有很大的局限性。因此，以四倍体马铃薯为材料，深入研究马铃薯重要农艺性状及抗病性具有重要意义。构建基因组文库是从 DNA 水平上对各种生物进行研究的技术平台，基因组文库是永久保存基因资源的最好方法之一，也是进行基因组结构和功能研究的基础。细菌人工染色体文库（Bacterial artificial chromosome library，BAC 文库）具有插入片段大、稳定性好、操作简单、易于保存等优点，在基因的染色体定位、物理图谱构建、图位克隆、基因组测序及比较基因组研究等方面发挥着重要作用。目前已在多种植物中成功构建了 BAC 文库，如拟南芥（Choi et al.，1995）、玉米（穆春华 等，2013）、大白菜（冯大领 等，2011）、小麦（李孟军 等，2014）、水稻（Qiu et al.，1999）、棉花（Hu et al.，2011）、甘蓝（Gao et al.，2004）、大豆（许靖曼 等，2010）、烟草（高晓明 等，2012）等。

马铃薯栽培品种‘合作 88’是由云南师范大学通过杂交选育而成的一个蒸食品质优良，又适宜淀粉加工的马铃薯高产新品种，其母本来自印度一个抗晚疫病的马铃薯克隆 I-1085，父本来自具有 *Solanum andigena* 遗传背景的高抗晚疫病群体。‘合作 88’同时抗晚疫病菌 IPO428.2（A2 交配型）和 X-4（A1 交配型），且高抗马铃薯 X 病毒（PVX）和马铃薯 Y 病毒（PVY^{o}）、中抗马铃薯卷叶病 PLRV（Li et al.，2011a）。因此，本研究中以‘合作 88’为材料构建其 BAC 文库，为马铃薯抗病基因筛选、重要农艺性状功能基因的定位克隆、基因组测序及比较基因组研究等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料马铃薯（*Solanum tuberosum* L.）四倍体品种‘合作 88’由云南师范大学李灿辉研究员提供。克隆载体采用 Epicentre 公司的 CopyControl^{TM} pCC1BAC^{TM} Vector。

1.2 BAC 文库构建

1.2.1 高分子量基因组 DNA 的提取

马铃薯高分子量基因组 DNA 的提取参照 Zhang 等（1995）和 Ma 等（2000）的方法并做改进。取培养 12～15 d 的马铃薯幼嫩叶片 30 g，液氮研磨，转入 300 mL 预冷的核离析液（内含 0.1% β–巯基乙醇，10% Triton X-100）中，轻摇洗脱 15 min。过滤除杂并收集滤液至 50 mL 离心管中，进一步离心弃上清液，沉淀用不含 β–巯基乙醇和 Triton X-100 的核离析液洗涤 2 次。洗涤后的沉淀重悬于适量体积的不含 β–巯基乙醇和 Triton X-100 的核离析液中，42 ℃水浴 3 min，再加入等体积 1.5%低熔点琼脂糖凝胶混匀，制备大小为（0.5 × 0.25 × 0.1）cm^3 的凝胶块。将制备好的凝胶块放入 15 倍体积含有 1 mg · mL^{-1} 蛋白酶 K 的裂解液中，50 ℃水浴中缓和振荡 22 h，换一次蛋白酶 K 裂解液，重复水浴 22 h。之后将胶块置于 30 mL 含 40 μg · mL^{-1} 苯甲基磺酰氟（PMSF）的 TE 中冰浴 2 h，重复 1 次，再于不含 PMSF 的 TE 中清洗胶块 1 h，重复 1 次。最后将处理好的胶块置于 0.5

mol · L^{-1} EDTA 中 4 ℃保存备用。

1.2.2 基因组 DNA 部分酶切最佳酶量的确定及大片段 DNA 的获得

用 *Hin*dIII 做部分酶切，确定产生目的片段（100 ~ 300 kb）的最佳内切酶用量。首先对胶块进行预电泳：电压 4 V · cm^{-1}，起始脉冲 60 s，终止脉冲 60 s，脉冲时间 4 h。然后采用 3 个不同用量（10、20、30 U）的 *Hin*dIII 酶浓度梯度，分别酶切半个胶块 1 h，并进行电泳检测（电压 6 V · cm^{-1}，起始脉冲 50 s，终止脉冲 50 s，脉冲时间 16 h），将酶切后 DNA 片段大小主要分布于 100 ~ 300 kb 的酶用量选定为最佳酶用量，然后再选用 3 个完整胶块进行大量酶切。

酶切后采用 1 次脉冲电泳选择法获得 100 ~ 300 kb 目的片段，通过电洗脱方法回收大片段 DNA，TE 溶液中透析 2 h 去除离子。以不同浓度的 λDNA 为对照，电泳估测大片段 DNA 的浓度。

1.2.3 大片段 DNA 的连接转化

连接体系 100 μL，内含 pCC1BAC 载体 10 ng，部分酶切后回收的大片段 DNA 100 ng，10× buffer 10 μL，400 U T_4 连接酶（New England Biolabs），16 ℃连接过夜。连接产物经脱盐浓缩处理 3 h 后，电击转化大肠杆菌感受态细胞 EPI300（Epicentre）；转化液加入 1 mL SOC 培养基，37 ℃ 220 r · min^{-1} 复苏培养 1 h，然后取 200 μL 涂布在含有氯霉素（12.5 μg · mL^{-1}）的 LB 平板上培养过夜。挑选白斑克隆检测插入片段大小，确认大小合适后根据试验要求进行大量转化，转化液暂存于 – 80 ℃备用。

1.3 BAC 文库的质量检测

为确定文库中 BAC 克隆插入片段大小及分布情况，随机挑取 96 个克隆，经摇菌培养，碱裂解法提取质粒后，*Not* I 酶切检测插入片段的大小及空载率。同时，为了鉴定 BAC 克隆在宿主菌 EPI300 中的稳定性，随机挑取 6 个克隆，连续培养 5 d，分别取培养 1、3、5 d 的菌液提取质粒，*Hin*dIII完全酶切后电泳检测酶切带型。

2 结果与分析

2.1 高分子量基因组 DNA 质量检测与最佳酶切条件选择

脉冲场电泳检测显示，提取的马铃薯基因组 DNA 片段大小主要集中在 1 000 kb 以上，几乎未见明显降解，因此提取 DNA 的分子量大小和质量能够满足试验要求（图 1）。

采用固定酶切时间（1 h），对限制性内切酶 *Hin*dIII的最佳用量进行选择。部分酶切结果表明，*Hin*dIII用量为 10 U 时，酶切后 DNA 片段主要分布在 150 ~ 400 kb 之间，*Hin*dIII用量为 20 U 时，酶切后 DNA 片段主要分布在 100 ~ 300 kb 之间；而用量为 30 U 时，酶切后 DNA 片段则主要分布在 50 ~ 250 kb 之间（图 1）。因此，DNA 大量酶切的最佳条件确定为酶量 20 U，温度 37 ℃，酶切时间 1 h。

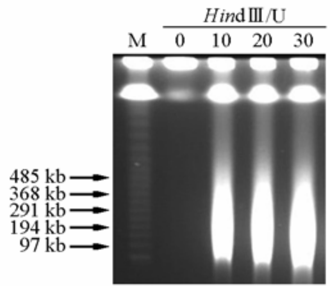

图 1 高分子量 DNA 的质量检测与最佳酶切条件选择

Fig. 1 Quality determination of high molecular weight DNA and its optimal partial digestion analysis

2.2 大片段 DNA 的回收及与载体的连接转化

选用 20 个酶切单位的 *Hin*dIII内切酶对琼脂糖凝胶块中的高分子量 DNA 进行大量酶切。酶切后

经脉冲电泳分离后，回收 100 ~ 300 kb 的 DNA 片段，然后与 pCC1BAC 载体按照 10∶1（质量比）的比例于 16 ℃连接过夜，将连接产物透析脱盐后进行电转化。结果表明，1 次转化 2 μL 连接产物可以得到约 20 000 个 BAC 克隆。由于所用的马铃薯材料为四倍体栽培种，含有 4 套染色体，为了提高该文库的覆盖倍数，共进行了 45 次转化，最终获得约 850 000 个克隆，覆盖单倍型基因组约 85 倍。

2.3 BAC 文库质量的检测

2.3.1 插入片段大小及空载率的检测

随机挑取 96 个克隆，用碱裂解法提取质粒 DNA，*Not* Ⅰ酶切后检测插入片段的大小及空载率，并统计各片段长度的分布情况。结果表明，在 96 个 BAC 克隆中有两个无插入片段，空载率为 2.08%。在 94 个有插入片段的 BAC 克隆中，插入片段的长度多分布在 80 ~ 100 kb 之间，主要集中在 90 kb 左右，图 2 为其部分结果，说明 BAC 克隆插入片段大小的均一性较好。通过估测每个 BAC 克隆插入片段大小，计算平均插入片段大小约为 90 kb。进一步的统计发现，在 94 个含有插入片段的克隆中，插入片段小于 80 kb 的 BAC 克隆共 5 个，80 ~ 90 kb 的克隆共 32 个，90 ~ 100 kb 的克隆 53 个，100 kb 以上的 4 个，其中 80 ~ 100 kb 的克隆占 90%。

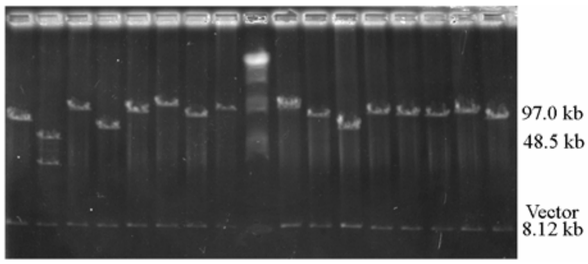

图 2 BAC 克隆插入片段大小检测

Fig. 2 Evaluation of insert sizes of BAC clones

2.3.2 BAC 克隆的稳定性检测

随机挑取 6 个 BAC 克隆进行培养，然后将培养 1 d（约 25 代）、3 d（约 75 代）、5 d（约 125 代）的菌液分别提取质粒进行 *Hin*dⅢ完全酶切和电泳检测。结果表明，各个克隆经过约 125 代的繁殖，DNA 指纹图谱没有变化（图 3），说明 BAC 克隆在大肠杆菌 EPI300 中能够稳定遗传。

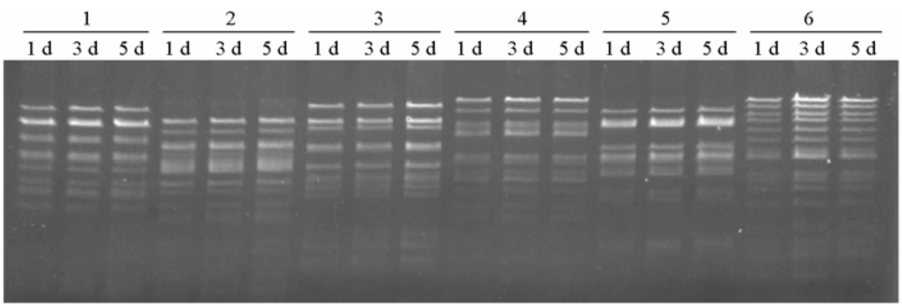

图 3 6 个 BAC 克隆的稳定性检测

Fig. 3 Stability analysis of six BAC clones

3 讨论

DNA 提取的质量是进行 BAC 文库构建的关键（Biradar et al.，2014）。在进行 DNA 提取时，尽量选用幼嫩的真叶，这样提取的 DNA 质量和纯度会较高，并且片段大小可达到 1 000 kb 以上。DNA 部分酶切主要受酶浓度和酶切时间的影响。本研究在相同的酶切体系中采用同样的酶切时间，酶用量在 20 U 时酶切效果最好。已有的研究表明，部分酶切后的 DNA 经过多次电泳选择去除小片段的效果比 1 次选择好，而且电泳选择次数越多，获得目标大片段的长度一致性越好，但是电泳次数越多，对外源大片段 DNA 的损伤会越大，获得的目标大片段 DNA 的量也越少（为前一次电泳选择后

含量的 1/3 ~ 1/6），后续的 DNA 连接效率也就越低。因此，为了同时满足建库所需目标大片段长度和量的要求，人们多采用两次电泳选择法获得目的大片段。而在本试验中尝试选用一次电泳选择法，适当调整脉冲条件和延长电泳时间获得了理想的大片段 DNA。

BAC 文库构建除了要求获得高质量的 DNA 外，还需要高的连接转化效率。连接效率与插入片段的大小密切相关，插入片段越大，连接效率越低。另外连接酶的存在会影响转化效率，连接反应结束后，65 ℃灭活连接酶，也可适当提高转化效率（Nováková et al.，2014）。本试验中采用适当降低插入片段大小，并在连接反应结束后，65 ℃灭活 10 min，获得了很高的转化效率。

借助 BAC 文库进行基因组学研究具有诸多优点。基因的调控元件通常位于基因 50 kb 以外距离，但通常的转基因载体容纳的外源片段小于 20 kb，不能携带原有调控序列进入受体，致使基因在表达复制过程中不能完全遵循原有机制，可能导致基因低水平表达及位置效应的产生；而双元细菌人工染色体（BIBAC）载体可以将含有基因调控元件的外源大片段 DNA、多基因或基因家族利用农杆菌的 T-DNA 转化到植物基因组中（Shi et al.，2011），使目的基因在植物中完整表达。马铃薯的很多优良基因资源存在于野生种质中，但杂交不亲和、杂交不育等生殖障碍和重组频率低、不易存活等问题，使得通过传统的有性杂交方式有时难以将野生种质的优良基因转移到栽培种中，而如果将野生种质 BAC 文库中筛选到的含有目的基因的克隆转移到 BIBAC 载体上，就可以实现优良基因的转移，这为马铃薯野生种质中优良基因的挖掘和利用提供了新的技术手段。目前，BAC 文库已经在马铃薯重要功能基因克隆上得到良好应用，特别是在马铃薯抗晚疫病基因的克隆上，结合图位克隆技术已经克隆了一系列马铃薯的重要抗晚疫病基因，如 *Rpi-bIb1/RB*、*Rpi-bIb2*、*Rpi-bIb3*、*R3a* 和 *R3b* 等（van der Voseen et al.，2003，2005；Huang et al.，2004；Lokossou et al.，2009；Li et al.，2011b），部分基因已经应用于马铃薯的抗晚疫病育种中。

在基因组学蓬勃发展的今天，大片段 DNA 文库发挥着重要作用。研究发现，即使第 2 代测序技术高度完善，第 3 代测序技术已经暂露头角，仍需要利用 BAC 文库来辅助完成和完善全基因组测序和拼装工作。Vu 等（2010）报道了一个 BAC-HAPPY mapping 的方法来构建物理图谱，综合了 BAC 准确搭桥和高通量测序的优点，利用三维（3D）的 BAC 池，结合传统的 HAPPY 作图法，简单、快速、低成本的创建了拟南芥第 4 条染色体 1.8 M 区域的连锁图。该方法对于复杂基因组的测序、作图和拼装等方面有广阔的应用前景。应该说，随着测序技术和 BAC 文库构建技术的日新月异，二者的有机结合将会更好、更高效地推动生物基因组学研究的发展。

References

Biradar S S，Nie X，Feng K. 2014. Preparation of high molecular weight gDNA and bacterial artificial chromosome（BAC）libraries in plants. Methods in Molecular Biology，1099：41 – 63.

Choi S，Creelman R A，Mullet J E，Wing R A. 1995. Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology Reporter，13 (2)：124 – 128.

Feng Da-ling，Shi Xue-ping，Yang Yu，Wang Yan-hua，Xuan Shu-xin，Zhao Jian-jun，Shen Shu-xing. 2011. Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library from Chinese cabbage. Acta Horticulturae Sinica，38 (1)：151 – 158. (in Chinese)

冯大领，石学萍，杨　煜，王彦华，轩淑欣，赵建军，申书兴. 2011. 大白菜细菌人工染色体文库的构建及鉴定. 园艺学报，38 (1)：151 – 158.

Gao M，Li G，Yang B，McCombie W R，Quiros C F. 2004. Comparative analysis of a *Brassica* BAC clone containing several major aliphatic glucosinolate genes with its corresponding *Arabidopsis* sequence. Genome，47：666 – 679.

Gao Xiao-ming，Chen Yan-ling，Liu Guan-shan，Li Feng-xia，Wang Wei-feng，Ren Yuan-yuan，Sun Yu-he. 2012. BAC library construction of villi tobacco（*Nicotiana tomentosiformis*）. Chinese Tobacco Science，33 (3)：68 – 71. (in Chinese)

高晓明，陈艳玲，刘贯山，李凤霞，王卫峰，任媛媛，孙玉合. 2012. 绒毛状烟草BAC文库的构建. 中国烟草科学，33 (3)：68–71.

Hu Y，Lu Y M，Ma D，Guo W Z，Zhang T Z. 2011. Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library for the A-genome of cotton（*G. arboreum* L.）. Journal of Biomedicine and Biotechnology，2011：1–5.

Huang S W，Vleeshouwers V G A A，Werij J S，Hutten R C B，van Eck Herman J，Visser R G F，Jacobsen E. 2004. The *R3* resistance to *Phytophthora infestans* in potato is conferred by two closely linked *R* genes with distinct specificities. MPMI，17 (4)：428–435.

Li C H，Wang J，Chien D H，Chujoy E，Song B，VanderZaag P. 2011a. Cooperation-88：A high yielding，multi-purpose，late blight resistant cultivar growing in Southwest China. American Journal Potato Research，88 (2)：190–194.

Li G C，Huang S W，Guo X，Li Y，Yang Y，Guo Z，Kuang H H，Rietman H，Bergervoet M，Vleeshouwers V，van der Vossen E，Qu D Y，Visser R，Jacobsen E，Vossen J. 2011b. Cloning and characterization of *R3b*；Members of the *R3* super family of late blight resistance genes show sequence and functional divergence. Molecular Plant-Mmicrobe Interactions，24 (10)：1132–1142.

Li Meng-jun，Yang Yu，Gao Xin-na，Guo Xiao，He Ming-qi，Shi Zhan-liang，Guo Jin-kao. 2014. Construction and characterization of BAC library from common wheat Shimai 15. Journal of Triticeae Crops，34 (2)：164–168. (in Chinese)

李孟军，杨　煜，高新娜，郭　晓，何明琦，史占良，郭进考. 2014. 石麦 15 细菌人工染色体文库的构建与鉴定. 麦类作物学报，34 (2)：164–168.

Lokossou A A，Park T，van Arkel G，Arens M，Ruyter-Spira C，Morales J，Whisson S C，Birch P R，Visser R G，Jacobsen E，van der Vossen E A. 2009. Exploiting knowledge of *R/Avr* genes to rapidly clone a new LZ-NBS-LRR family of late blight resistance genes from potato linkage group Ⅳ. Molecular Plant-Microbe Interactions，22 (6)：630–641.

Ma Z，Weining S，Sharp P J，Liu C. 2000. Non-gridded library：A new approach for BAC（bacterial artificial chromosome）exploitation in hexaploid wheat（*Triticum aestivum*）. Nucleic Acids Research，28 (24)：e106.

Mu Chun-hua，Zhang Fa-jun，Yang Yu，Li Wen-cai，Lu Shou-ping，Sun Qi，Yu Yan-li，Meng Zhao-dong，Zhang Xiu-qing，Li Guang-cun. 2013. Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of maize（*Zea mays* L.）inbred line Qi 319. Journal of Agricultural Biotechnology，21 (11)：1389–1395. (in Chinese)

穆春华，张发军，杨　煜，李文才，鲁守平，孙　琦，于彦丽，孟昭东，张秀清，李广存. 2013. 玉米自交系齐 319 细菌人工染色体文库的构建及鉴定. 农业生物技术学报，21 (11)：1389–1395.

Nováková J，Izsáková A，Grivalský T，Ottmann C，Farkašovský M. 2014. Improved method for high-efficiency electrotransformation of *Escherichia coli* with the large BAC plasmids. Folia Microbiol（Praha），59 (1)：53–61.

Qiu F，Jin D M，Fu J M，Zhang C L，Xie W W，Yang R C，Zhang H B，Wang B. 1999. Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of thermo-sensitive genie male-sterile rice 5460S. Science in China：Series C：Life Sciences，29 (5)：515–524.

Shi X，Zeng H，Xue Y，Luo M. 2011. A pair of new BAC and BIBAC vectors that facilitate BAC/BIBAC library construction and intact large genomic DNA insert exchange. Plant Methods，7：33.

The Potato Genome Sequencing Consortium. 2011. Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. Nature，475：189–195.

van der Voseen E，Sikkema A，Hekkert Bt，Gros J，Stevens P，Muskens M，Wouters D，Pereira A，Stiekema W，Allefs S. 2003. An ancient *R* gene from the wild potato species *Solanum bulbcastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. Plant Journal，36 (6)：867–882.

van der Voseen E A G，Gros J，Sikkema A，Muskens M，Wouters D，Wolters P，Pereira A，Allefs S. 2005. The *Rpi-bib2* gene from *Solanum bulbcastanum* is an *Mi-1* gene homolog confering broad-spectrum late blight resistance in potato. Plant Journal，44 (2)：208–222.

Vu G T，Dear P H，Caligari P D，Wilkinson M J. 2010. BAC-HAPPY mapping（BAP mapping）：A new and efficient protocol for physical mapping. PLoS One，5 (2)：e9089.

Xu Jing-man，Wei Wen-hui，Sha Ai-hua，Shan Zhi-hui，Zhou Xin-an. 2010. BAC library from a soybean line. Chinese Journal of Oil Crop Sciences，32 (2)：191–195. (in Chinese)

许靖曼，魏文辉，沙爱华，单志慧，周新安. 2010. 大豆多粒荚特异材料 BAC 文库的构建. 中国油料作物学报，32 (2)：191–195.

Zhang M，Zhang Y，Scheuring C F，Wu C C，Dong J J，Zhang H B. 1995. Preparation of megabase-sized DNA from plant nuclei. Plant Journal，7 (1)：175–184.