

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2010.00067

白氏文昌鱼单个体基因组 BAC 文库的构建

张巨永¹, 黄盛丰², 王蔚³, 徐安龙², 王义权¹

1. 厦门大学生命科学学院, 厦门 361005;
2. 中山大学生命科学学院, 广州 510275;
3. 国家海洋局海洋研究所, 厦门 361003

摘要: 隶属于头索动物亚门的文昌鱼是现存生物中最近似于脊椎动物亚门直接祖先的一个类群, 具有重要的进化地位, 是研究脊椎动物原始祖先的重要材料和模式动物。随着文昌鱼实验室连续繁殖的成功, 全基因组测序成为中国文昌鱼模式化急需完成的工作之一。文章从单条雄性白氏文昌鱼精巢组织中提取高质量的基因组 DNA, 经 *EcoR* I 限制性内切酶和 *EcoR* I 甲基化酶酶切, 脉冲场电泳选择合适酶切 DNA 片段, 连接线性磷酸化的载体 pCC1BAC, 转化大肠杆菌 EPI300 *E. coli*, 构建了含有 44 706 个克隆的全基因组 BAC (Bacterial artificial chromosome) 文库, 该文库平均插入片段 80 kb, 具有 9 倍的基因组覆盖率, 基本能够满足功能基因等研究需要, 为中国文昌鱼全基因组测序打下基础。

关键词: 头索动物; 白氏文昌鱼; 基因组文库; BAC 文库

Construction of genome BAC library for single *Branchiostoma belcheri* individual

ZHANG Ju-Yong¹, HUANG Sheng-Feng², WANG Wei³, XU An-Long², WANG Yi-Quan¹

1. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China;
2. College of Life Sciences, Sun Yat-Sen (Zhongshan) University, Guangzhou 510275, China;
3. The Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361003, China

Abstract: As one of the closest living invertebrate relatives of vertebrates, amphioxus (subphylum Cephalochordata) occupies a key position in animal evolution and is becoming the best available proxy and model animal for studying the last common ancestor of all chordates, especially vertebrates. As long-term continuous culturing of amphioxus in laboratory became reliable, for pushing this animal to be a more successful model system, whole-genome sequencing of one or more species derived from this branch will be another urgent issue needed to address. In the present study, we described the construction and characterization of a bacterial artificial chromosome (BAC) library, using a single individual of Chinese amphioxus (*Branchiostoma belcheri*). High quality genomic DNA extracted from the spermary was partially digested with *EcoR* and *EcoR* methylase. Desirable DNA fragments were isolated by pulsed field gel electrophoresis (PFGE), ligated to linearized and phosphorylated carrier pCC1BAC, and then transformed to *Escherichia coli* EPI300. The constructed library consists of 44 706 clones with the average insert fragment size around 80 kb as estimated by PFGE. The representation of the library is about 9 equivalents to the amphioxus genome. These results indicate that the BAC library will be useful

收稿日期: 2009-08-27; 修回日期: 2009-10-10

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(编号: 2008AA092602)资助

作者简介: 张巨永(1983-), 男, 硕士研究生, 专业方向: 动物学。E-mail: jyzhang0306@yahoo.com.cn

通讯作者: 王义权(1957-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动物分子遗传与进化。E-mail: wangyq@xmu.edu.cn

for functional genomic studies and facilitate the whole-genome sequencing of Chinese amphioxus.

Keywords: Cephalochordata; *Branchiostoma belcheri*; genomic library; bacterial artificial chromosome library

隶属于头索动物亚门(Cephalochordata)的文昌鱼是现存生物中最近似于脊椎动物亚门(Vertebrata)直接祖先的一个类群,在动物进化史上占据重要的地位,是研究脊椎动物基因组起源、进化、基因倍增和基因家族演化、新基因产生和基因退化等问题的重要材料^[1-3]。高质量的基因组文库是文昌鱼基因组研究,特别是大范围的基因、基因簇比较研究和全基因组测序工作的基础。目前分布于大西洋西岸的佛罗里达文昌鱼(*Branchiostoma floridae*)两个大片段基因组文库已经建成(<http://www.benaroyaresearch.org>; <http://bacpac.chori.org/>),基因组序列草图已于 2006 年 3 月释放(<http://www.jgi.doe.gov/>)。分布于中国沿海的白氏文昌鱼(*Branchiostoma belcheri*)也是研究较多的一种文昌鱼^[4]。随着国内对文昌鱼研究速度的加快,特别是文昌鱼实验室连续繁殖成功^[5, 6],中国文昌鱼全基因组测序工作显得尤为重要,这将有力地促进文昌鱼作为新的实验室模式动物的应用。此外,分布于西太平洋沿岸的白氏文昌鱼与分布于西大西洋墨西哥湾的佛罗里达文昌鱼分离发生在 1.12 亿年以前^[7],二者独立进化的历史大大超过灵长类与啮齿类(8 千万年)^[8],基因组产生较大的遗传分化,因此,完成白氏文昌鱼全基因组测序,也有助于在全基因组水平上与佛罗里达文昌鱼进行比较,为脊椎动物直接祖先状态提供更准确的信息。

虽然 DNA 测序技术已有很大的发展,如 454 测序系统^[9, 10]能高通量低成本快速完成基因组测序环节,但测序片段一般在几百个碱基,给后续基因组拼接带来很大困难,对于高重复片段基因组的拼接仍离不开大片段文库的辅助,已公布的佛罗里达文昌鱼(*B. floridae*)基因组序列草图也是基于高质量基因组 BAC 文库,因此构建一个高质量基因组 BAC 文库是完成白氏文昌鱼全基因组测序必不可少的辅助工作。之前我们实验室已经成功构建了一个高质量多条鱼混合的白氏文昌鱼 BAC 文库^[11],考虑到文昌鱼不仅种之间有很大差异,同种个体间也存在较大的差异^[12],因此本研究构建了单一个体的白氏文昌

鱼(*B. belcheri*)基因组 BAC 文库,这一文库的成功构建,为全基因组测序的顺利完成打下了基础,也为比较基因组研究提供了重要资源。

1 材料和方法

1.1 材料

成熟雄性白氏文昌鱼(*B. belcheri*)采自厦门海域,动物的种名经过准确的形态学鉴定^[6, 13];大肠杆菌 EPI300 *E. coli* 和线性磷酸化质粒 pCC1BAC 购于 EPICENTRE 公司;Incert Agarose 购于 FMC 公司;Not 购于 TaKaRa 公司;SAM, *EcoR*, *EcoR* Methylase, Low Range PFG Markers 购于 Biolabs 公司;Agarose Low EFO (Electrophoresis Grade)购于 Fisher 公司;其他常用试剂均为国产分析纯。CHEF-DRIII system 脉冲场电泳仪、电转仪和电击杯(0.2 cm)购于 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 高分子量(HMW)基因组 DNA 的提取

取单条性腺饱满、体型较大的雄性文昌鱼,置 4 预冷的过滤海水中 5~10 min 后于体视镜下小心剥离出精巢组织,因解剖出的精巢组织稀软与海水混合,可直接用移液器吸到 1.5 mL 的离心管中,4 下 1 500 r/min 离心 10 min,小心弃上清。所得沉淀物为精子和精巢组织,用 1 mL 预冷的洗涤缓冲液(137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na₂HPO₄, 2 mmol/L KH₂PO₄, 40 mmol/L EDTA, 2.0% v/v 甘油, pH 7.4)轻轻悬起,然后以 2 000 r/min, 4 离心 15 min,小心弃上清,再用 300 μ L 预冷的洗涤缓冲液充分悬起沉淀,悬起的精巢组织细胞的包埋步骤同本实验室此前多个体文昌鱼文库构建^[14]。包埋精巢组织细胞的栓塞经蛋白酶 K 充分消化后得到质地均匀、完全透明的栓塞,其中有琼脂糖包裹着的 HMW 基因组 DNA,上述一条性腺饱满的文昌鱼可制得约 10 个栓塞。栓塞 DNA 质量检测和栓塞的保存方法同文献^[14]。

1.2.2 部分酶切和大片段 DNA 回收

用适当比例的 *EcoR* 和 *EcoR* 甲基化酶部分酶切栓塞 DNA, 酶切后的栓塞转入 20% NDS (2 mmol/L Tris, 6.8 mmol/L *N*-l-tyrosylsarcosine, 127 mmol/L EDTA, pH 9.0) 终止反应。经过两次脉冲场电泳割取 97~145 kb DNA 片段的胶块。用截留分子量 12 000~14 000 透析带电洗脱回收胶块中 DNA, 将回收的 DNA 溶液用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳以确定 DNA 浓度。部分酶切和大片段 DNA 回收的具体步骤参考文献[14]。

1.2.3 电击感受态细胞制备

电击感受态细胞按照 Shigekawa 等^[15]方法制备, 菌种为 EPI300 *E. coli*, 用无离子水配制的 10% 甘油重悬沉淀物, 使菌体最终浓度 OD_{600} 的吸光值达到 10.0, 分装成 100 μ L 小份-80 冻存备用。

1.2.4 连接与转化

连接反应按照 Copy Control™ BAC Cloning Kit 说明进行。将微孔过滤膜(0.025 μ m, Millipore)漂浮于平静的预冷纯水表面, 用移液器轻轻地把连接产物点在滤膜的中央, 4 透析 1.5 h, 充分脱盐。大肠杆菌转化参考文献[14], 具体操作如下: 取 2 μ L 透析过的连接产物与 40 μ L 感受态细胞混匀加入预冷的电击杯, 用 Cell-Porator *E. coli* Electroporation system (Gibco BRL) 电转化, 参数设为电阻 100 Ω ; 电压梯度 18 kV/cm; 电容 25 μ F。电击后迅速将 1 mL SOC 培养基加入电击杯, 于 37 中 200 r/min 培养 1 h 后, 涂布在含有氯霉素(12.5 μ g/mL)及 X-gal (20 μ g/mL)和 IPTG (0.1 mmol/L)的 LB 固体培养基上, 37 培养过夜。

1.2.5 单克隆分离和培养

向无菌 384 孔板每个孔中加 80 μ L (12.5 μ g/mL 氯霉素和 10% 甘油) LB 液体培养基, 手工用牙签将单克隆挑入孔中, 37 培养至菌液浑浊。将 384 孔板标号后放入-80 冰箱中长期保存。

1.2.6 重组克隆插入片段大小的鉴定

随机抽取几块 384 孔板, 每个板随机挑取 20 到 40 个不等的克隆检查插入片段大小与空载(无插入

片段)比例。质粒提取采用碱裂解法, 提取的质粒 DNA 用限制性内切酶 *Not* 消化, 脉冲场电泳检测插入片段大小。根据 $R=N \times I / GS$, (公式中 R 代表覆盖度, N 代表重组克隆的数目, I 代表平均插入片段大小, GS 为物种基因组大小, 文昌鱼约 400 MB, <http://bacpac.chori.org>) 计算文库的库容。

2 结果与分析

2.1 洗涤缓冲液的选择

在洗涤组织细胞时洗涤缓冲液的选择对提取高分子量基因组 DNA 至关重要。由于文昌鱼是海洋生物, 细胞渗透压较高, 之前我们实验室在构建多个体混合白氏文昌鱼文库时通过在普通 PBS 缓冲液中增加 EDTA, 显著地提高了大片段 DNA 的质量^[11, 14]。本研究中针对文昌鱼的特点, 调节缓冲液的成分, 比较采用加入 60 mmol/L EDTA 的 PBS 作洗涤缓冲液与加入 40 mmol/L EDTA 和 2% v/v 甘油的 PBS 作洗涤缓冲液, 用同样的方法处理精巢组织、制作栓塞和消化细胞, 然后进行脉冲场电泳检测, 结果发现采用加入 60 mmol/L EDTA 的 PBS 作洗涤缓冲液, 提取的基因组 DNA 仍然有较多大片段降解, 而加入 2% v/v 甘油和 40 mmol/L EDTA 的 PBS 作洗涤缓冲液提取的基因组 DNA 降解的更少, 高分子量 DNA 得率更高(图 1: A, B), 说明加入 2% v/v 甘油有利于提高大片段质量。

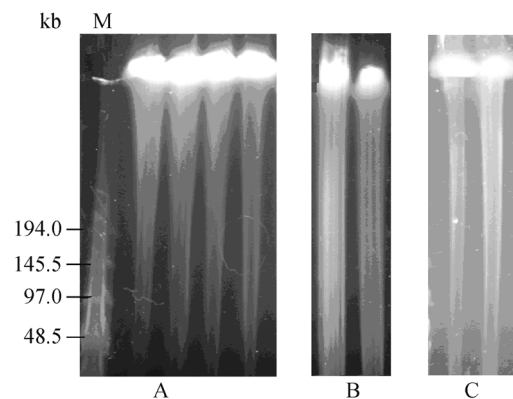


图 1 栓塞中包埋的基因组 DNA 电泳检测

A: 缓冲液中加入 40 mmol/L EDTA 和 2% v/v 甘油的 PBS 制备的精巢组织 DNA 栓塞脉冲场电泳结果(M: Low Range PFG DNA 分子量标记); B: 缓冲液中加入 40 mmol/L EDTA 和 2% v/v 甘油的 PBS 制备的整条文昌鱼 DNA 栓塞脉冲场电泳结果; C: 缓冲液中加入 60 mmol/L EDTA 的 PBS 制备的精巢组织 DNA 栓塞脉冲场电泳结果。

2.2 提取基因组 DNA 所用组织的选择

我们建库最终用的是精巢组织,但也试用过以整条文昌鱼为材料。整条文昌鱼提取 DNA 时,首先将样品置液氮中研成精细粉末,再加预冷的洗涤缓冲液,于冰浴中用匀浆器研磨,然后用二层纱布过滤除去较大组织块,取离散的细胞或者小的细胞团,之后的步骤和精巢组织基因组 DNA 的提取步骤相同。选用精巢饱满的全鱼和只用精巢组织提取的基因组 DNA 进行脉冲场电泳检测,结果见图 1 所示,全鱼提取的 DNA 降解较多,总量反而没有只用精巢组织提取的 DNA 量多,同时考虑到全鱼提取的基因组 DNA 还有可能会被消化道食物中的基因组 DNA 污染,因此本研究只用精巢组织提取的基因组 DNA 来建文库。

2.3 部分酶切条件的选择

本研究用 pCC1BAC 载体,该载体有一个 *EcoR* 酶切位点,用于插入外源 DNA 片段。为了得到长度各异、带有粘性末端的基因组 DNA 片段,我们用 *EcoR* 和 *EcoR* 甲基化酶的竞争性酶切获得用于连接反应的大片段 DNA,两种酶的用量和比例是影响酶切效果的决定性因素,为了确定最适宜的浓度组合,我们对这两种酶分别设计梯度浓度的酶切实验。首先将 *EcoR* 甲基化酶固定为 80 U/mL,以 *EcoR* 浓度 0、2、6、10、14、20、30、40 (U/mL) 作梯度实验,结果如图 2A 所示。当 *EcoR* 浓度达到 10 U/mL 时 100~200 kb 之间的 DNA 片段的量较

多,故选取 10 U/mL *EcoR* 浓度进一步对甲基化酶设计浓度 0、60、80、100、120 (U/mL) 进行考察,发现 *EcoR* 甲基化酶浓度在 60~120 U/mL 范围对酶切效果没有显著变化(图 2B),故选择 80 U/mL *EcoR* 甲基化酶。最终选择酶切条件为半个栓塞在 500 μ L 体系中以 10 U/mL 的 *EcoR* 和 80 U/mL *EcoR* 的甲基化酶浓度于 37 $^{\circ}$ C 下酶切 2.5 h。

2.4 部分酶切 DNA 片段的回收

用确定的最适酶切条件(10 U/mL 的 *EcoR* 和 80 U/mL *EcoR* 的甲基化酶浓度)将基因组 DNA 酶切后,以两次脉冲场电泳分离目的片段,回收含 97~194 kb 范围片段大小的凝胶,经过两次选择的 DNA 片段用电泳从琼脂糖凝胶中洗脱,为检测所得 DNA 片段的大小和浓度,分别以 Low Range PFG 为分子标记进行脉冲场电泳和以已知浓度的 λ DNA *Hind* 为分子标记进行 0.8% 的普通琼脂糖凝胶电泳,结果表明得到的 DNA 片段长度在 97~145 kb 之间(图 3A),DNA 样品的浓度大约为 5 ng/ μ L(图 3B)。

2.5 文库的建立及质量鉴定

经过条件优化,我们构建了一个 *EcoR* 单酶切的单条白氏文昌鱼基因组 BAC 文库,该文库由 44 706 个克隆组成。为了估计文库的插入片段大小的分布,我们随机挑取培养 3 个 384 孔板中的 76 个克隆,脉冲场电泳检测结果表明,平均插入片段大小为 80 kb,图 4 显示随机检测的 19 个克隆。根据公式计算这个文库的库容大约相当文昌鱼基因组的

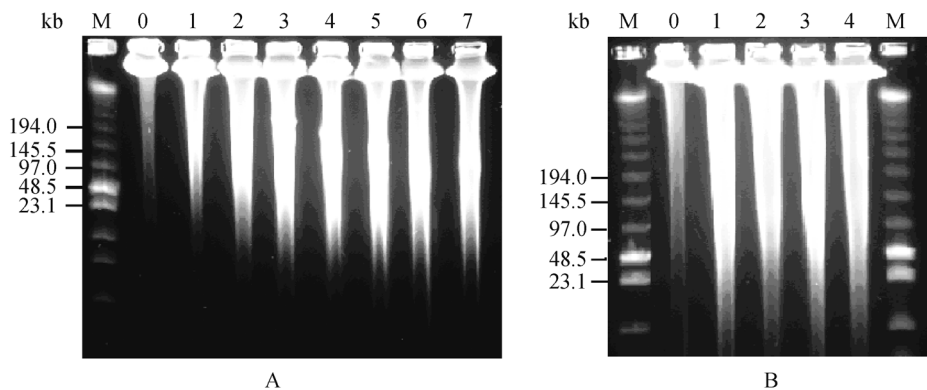


图 2 *EcoR* I 和 *EcoR* I Methylase 酶切条件比较

A: *EcoR* 浓度梯度。泳道 0: (对照不加酶); 泳道 1~7: *EcoR* 甲基化酶浓度固定 80 U/mL, *EcoR* 浓度分别为 2、6、10、14、20、30、40 (U/mL); M: Low Range PFG DNA 分子量标记。B: *EcoR* 甲基化酶浓度梯度。泳道 0: 对照(不加酶); 泳道 1~4: *EcoR* 浓度固定 10 U/mL, *EcoR* 甲基化酶浓度分别为 60、80、100、120 U/mL; M: Low Range PFG DNA 分子量标记。

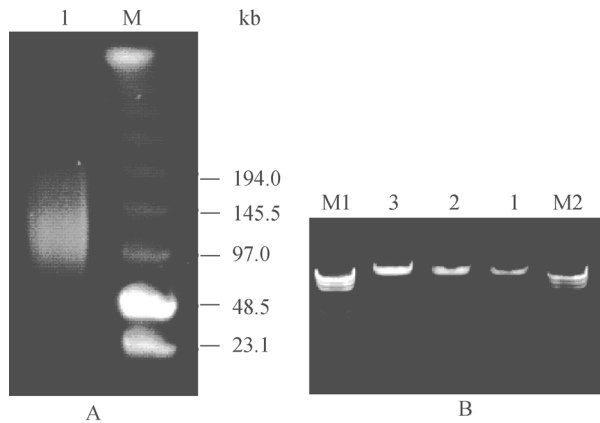


图 3 回收片段的大小和浓度确定

A: 两次电泳片段选择后回收的片段进行脉冲场电泳(M: Low Range PFG DNA 分子量标记); B: 通过普通电泳对回收 DNA 浓度的确定。根据 λ DNA *Hind* DNA 分子量标记判断回收 DNA 的浓度, M1 点样量为 50 ng DNA, M2 点样量为 25 ng DNA。泳道 1~3 分别点样 5、10、20 μ L。

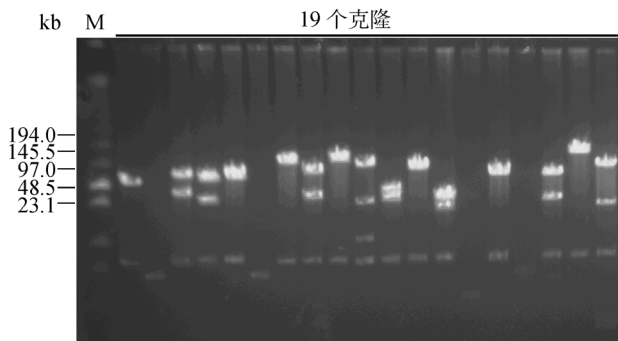


图 4 BAC 克隆中插入片段大小的脉冲场电泳检测
M: Low Range PFG DNA 分子量标记。

9 倍。检测的克隆中 9 个不含插入片段, 占总数的 11.8%。片段大小分布情况: > 100 kb: 22/76 (28.9%); 80~100 kb: 23/76 (30.3%); 60~80 kb: 18/76 (23.7%); < 60 kb: 13/76 (17.1%)。

3 讨论

3.1 大片段 DNA 的提取方法的改进

高分子量基因组 DNA 的提取是构建 BAC 文库的前提, 由于文昌鱼个体小, 从单条文昌鱼中获得足够多的高分子量基因组 DNA 是建库的关键。理想建库材料应具有易于均质化的特性, 以减少提取过程中由于机械剪切造成的 DNA 降解, 因此以往建库大多采用容易获得的分散单细胞材料如血^[16]、脑^[17]、脾^[18]、精子^[19]和细胞系^[20]等。由于文昌鱼稳定的细

胞培养方法尚未成熟^[21], 无法得足够的培养细胞, 因此我们在白氏文昌鱼繁殖季节选择饱满的精巢组织提取高分子基因组 DNA。对构建单条鱼基因组文库而言, DNA 的量是非常宝贵的, 但去除精巢组织的胴体大多是肌肉纤维, DNA 含量少, 加上研磨过程中会有较严重的降解, 不适合后续酶切需要, 同时考虑到提取的基因组 DNA 可能会被消化道中食物的基因组 DNA 污染, 我们只用精巢组织提取的基因组 DNA 来建库。基因组 DNA 的提取过程中会有不同程度的降解, 除了温和操作以外, 主要还在于洗涤缓冲液的优化。此次实验研究在前一个文库优化的洗涤缓冲液基础上进一步改进, 加入了 2% v/v 的甘油, 显著降低了基因组 DNA 的降解。

3.2 文库的质量

基因组文库的质量一般从文库的平均插入片段长度、基因组覆盖率和重组率三方面来衡量。本文库的基因组来自厦门海域的单条白氏文昌鱼, 平均插入片段 80 kb, 重组克隆比例 88.2%, 计算的文库基因组覆盖度为 9 倍。据报道, 2 个佛罗里达文昌鱼基因组文库已经构建, 其中一个为 PAC 文库, 质量较低, 平均插入 80 kb, 覆盖 5 倍基因组。而另一个 BAC 文库质量较高, 平均插入为 142 kb, 约覆盖 17 倍基因组。我们所建立的单条白氏文昌鱼文库, 质量在 2 个佛罗里达文昌鱼基因组文库之间, 基本能够满足功能基因等研究需要, 为中国文昌鱼基因组测序打下基础。

参考文献(References):

- [1] Putnam NH, Butts T, Ferrier DEK, Furlong RF, Hellsten U, Kawashima T, Robinson-Rechavi M, Shoguchi E, Terry A, Yu JK, Benito-Gutiérrez E, Dubchak I, Garcia-Fernández J, Gibson-Brown JJ, Grigoriev IV, Horton AC, Jong PJ, Jurka J, Kapitonov VV, Kohara Y, Kuroki Y, Lindquist E, Lucas S, Osoegawa K, Pennacchio LA, Salamov AA, Satou Y, Sauka-Spengler T, Schmutz J, Shin-IT, Toyoda A, Bronner-Fraser M, Fujiyama A, Holland LZ, Holland PWH, Satoh N, Rokhsar DS. The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. *Nature*, 2008, 453(7198): 1064–1071.
- [2] Huang SF, Yuan SC, Guo L, Yu YH, Li J, Wu T, Liu T, Yang MY, Wu K, Liu HL, Ge J, Yu YC, Huang HQ, Dong ML, Yu CL, Chen SW, Xu AL. Genomic analysis of the

- immune gene repertoire of amphioxus reveals extraordinary innate complexity and diversity. *Genome Res*, 2008, 18(7): 1112–1126.
- [3] Holland LZ, Albalat R, Azumi K, Benito-Gutierrez E, Blow MJ, Bronner-Fraser M, Brunet F, Butts T, Candiani S, Dishaw LJ, Ferrier DEK, Garcia-Fernández J, Gibson-Brown JJ, Gissi C, Godzik A, Hallbook F, Hirose D, Hosomichi K, Ikuta T, Inoko H, Kasahara M, Kasamatsu J, Kawashima T, Kimura A, Kobayashi M, Kozmik Z, Kubokawa K, Laudet V, Litman GW, McHardy AC, Meulemans D, Nonaka M, Olinski RP, Pancer Z, Pennacchio LA, Pestarino M, Rast JP, Rigoutsos I, Robinson-Rechavi M, Roch G, Saiga H, Sasakura Y, Satake M, Satou Y, Schubert M, Sherwood N, Shiina T, Takatori N, Tello J, Vopalensky P, Wada S, Xu A, Ye Y, Yoshida K, Yoshizaki F, Yu JK, Zhang Q, Zmasek CM, Jong PJ, Osoegawa K, Putnam NH, Rokhsar DS, Satoh N, Holland PWH. The amphioxus genome illuminates vertebrate origins and cephalochordate biology. *Genome Res*, 2008, 18(8): 1380.
- [4] 张士瑾, 郭斌, 梁玉君. 我国文昌鱼研究 50 年. *生命科学*, 2008, 20(1): 64–68.
- [5] 王义权, 张秋金, 吕小梅, 钟婧, 孙毅. 文昌鱼的实验室繁育及子二代获得. *动物学研究*, 2006, 27(6): 631–634.
- [6] Zhang QJ, Sun Y, Zhong J, Li G, Lü XM, Wang YQ. Continuous culture of two lancelets and production of the second filial generations in laboratory. *J Exp Zool (Mol Dev Evol)*, 2007, 308(4): 464–472.
- [7] Nohara M, Nishida M, Manthacitra V, Nishikawa T. Ancient phylogenetic separation between Pacific and Atlantic cephalochordates as revealed by mitochondrial genome analysis. *Zoolog Sci*, 2004, 21(2): 203–210.
- [8] Kumar S, Hedges SB. A molecular timescale for vertebrate evolution. *Nature*, 1998, 392(6679): 917–920.
- [9] Weiss KM, Smith FH. Out of the veil of death rode the one million! Neandertals and their genes. *Nature*, 2007, 29(2): 105–110.
- [10] Green RE, Krause J, Ptak SE, Briggs AW, Ronan MT, Simons JF, Du L, Egholm M, Rothberg JM, Paunovic M, Paabo S. Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA. *Nature*, 2006, 444(7117): 275–276.
- [11] Wang W, Xu HL, Lin LP, Su B, Wang YQ. Construction of a BAC library for Chinese amphioxus *Branchiostoma belcheri* and identification of clones containing *Amphi-Pax* genes. *Genes Genet Syst*, 2005, 80(3): 233–236.
- [12] Zhong J, Zhang JY, Mukwayaa E, Wang YQ. Reevaluation of deuterostome phylogeny and evolutionary relationships among chordate subphyla using mitogenome data. *J Genet Genomics*, 2009, 36(3): 151–160.
- [13] Xu QS, Ma F, Wang YQ. Morphological and 12S rRNA gene comparison of two *Branchiostoma* species in Xiamen waters. *J Exp Zool (Mol Dev Evol)*, 2005, 304(3): 259–267.
- [14] 王蔚. 白氏文昌鱼 BAC 文库的构建及 *Pax* 基因家族的进化分析[学位论文]. 厦门大学, 2006.
- [15] Shigekawa K, Dower WJ. Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells. *Biotechniques*, 1988, 6(8): 742–751.
- [16] Zimmer R, Verrinder-Gibbins AM. Construction and characterization of a large-fragment chicken bacterial artificial chromosome library. *Genomics*, 1997, 42(2): 217–226.
- [17] Froschauer A, Korting C, Katagiri T, Aoki T, Asakawa S, Shimizu N, Schartl M, Volf JN. Construction and initial analysis of bacterial artificial chromosome (BAC) contigs from the sex-determining region of the platyfish *Xiphophorus maculatus*. *Gene*, 2002, 295(2): 247–254.
- [18] Larin Z, Monaco AP, Lehrach H. Yeast artificial chromosome libraries containing large inserts from mouse and human DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(10): 4123–4127.
- [19] Matsuda M, Kawato N, Asakawa S, Shimizu N, Nagahama Y, Hamaguchi S, Sakaizumi M, Hori H. Construction of a BAC library derived from the inbred Hd-rR strain of the teleost fish, *Oryzias latipes*. *Genes Genet Syst*, 2001, 76(1): 61–63.
- [20] Mozo T, Fischer S, Shizuya H, Altmann T. Construction and characterization of the IGF *Arabidopsis* BAC library. *Mol Gen Genet*, 1998, 258(5): 562–570.
- [21] Wang CL, Zhang SC, Su F, Wang L, Li HY. Initiation of primary cell culture from amphioxus *Branchiostoma belcheri tsingtauense*. *Chin J Oceanol Limnol*, 2009, 27(1): 69–73.