

文章编号:1000-0615(2009)03-0396-07

条斑紫菜基因组 Fosmid 文库构建

茅云翔, 崔菁菁, 孔凡娜

(中国海洋大学海洋生物遗传学与基因资源利用教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要:高分子量基因组文库是开展条斑紫菜基因组学研究的必备工具。构建了由 23 040 个 Fosmid 克隆组成的条斑紫菜孢子体无偏倚基因组文库。检测分析表明:文库克隆重组率为 100%;插入 DNA 片段长度为 28~40 kb,平均长度为 35 kb,文库覆盖率约为条斑紫菜基因组的 2.78 倍;从超级池中筛查条斑紫菜 18S rRNA、*atpA*、*h2A*、*rbcL* 基因,至少能得到一个阳性克隆,印证了计算所推测的文库覆盖率;随机选取 6 个 Fosmid 克隆经 100 代传代后插入 DNA 片段未发生丢失或长度变化,表明克隆传代的稳定性。该文库的构建为开展条斑紫菜基因组特性分析和基因克隆奠定了基础。

关键词:条斑紫菜;Fosmid 文库;基因克隆;基因组学

中图分类号:Q 785; S 917

文献标识码:A

条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis* Ueda) 是世界上最重要的人工栽培海藻之一,营养丰富、质优味美,具有极高的经济价值。我国是世界最大的条斑紫菜栽培生产国,栽培面积超过 $1.5 \times 10^4 \text{ hm}^2$,标准制成品年产量超过 30 亿张,产值超过 20 亿元。由于条斑紫菜重要的经济价值,多年来在其生活史、养殖生态、生理学和生物化学等方面开展了大量的研究^[1]。

条斑紫菜不仅具有很高的经济价值,而且具有特别的科学研究价值^[2]。条斑紫菜是潮间带海藻的典型代表,能够适应渗透压、光强、温度等环境理化因子的急剧变化,具有很强的抗逆能力。其主要特性表现在:1)耐干性强,干燥至含水 20%,复水后仍能恢复活力;2)光饱和点高、光补偿点低;3)适应低温能力强,在一定含水量下,冻存数月仍能恢复活力;4)盐度适应范围广。条斑紫菜染色体数目少,配子体仅 3 条染色体;基因组小,碱基数目约为 $(2.8 \sim 2.9) \times 10^8 \text{ bp}$,与模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和水稻 (*Oryza sativa*) 属于同一数量级。条斑紫菜易于培养,能

在实验室条件下完成生活史,世代周期短。

近年来,条斑紫菜分子生物学研究进展迅速。锰超氧化物歧化酶 (Mn superoxidase dismutase, SOD)、海藻糖合成酶 (trehalose-6-phosphate synthase, TPS) 等数百个重要基因被克隆^[5-6];由 191 952 bp 组成的质体基因组全序列已被测定;开展了大规模表达序列标签分析^[7-10];基因芯片被开发并应用于基因表达谱分析^[11-12];遗传转化系统研究亦取得了初步的进展^[13-15]。因此,条斑紫菜已成为海藻抗逆分子生理和基因组学研究的理想模式物种。

高分子量基因组文库是开展基因组学研究的必备工具。Fosmid 载体是含有大肠杆菌 F-因子的粘粒 (cosmid)^[16],既具有粘粒载体增殖与包装效率高的优点,又具有大肠杆菌 F-因子单拷贝、稳定性高的特性。与细菌人工染色体 (bacterial artificial chromosome, BAC) 相比,Fosmid 载体可诱导增殖,更便于操作。本文以条斑紫菜孢子体为材料,成功构建了首个覆盖率比较高、序列无偏倚的基因组 Fosmid 文库,为开展条斑紫菜基因克

收稿日期:2008-04-27 修回日期:2009-01-10

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA10A402, 2006AA10A413);国家自然科学基金项目(30700621);教育部新世纪人才支持计划(NCET-06-0596);教育部科学研究重点项目(107070);国家自然科技资源共享平台项目(2006DKA30470-016);山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(2008BS06002)

通讯作者:茅云翔, E-mail: yxmao@ouc.edu.cn

隆,内含子与基因上下游调控序列分析,基因组物理图谱构建,基因组特征分析,乃至全基因组序列测定奠定了基础。

1 材料与amp;方法

1.1 藻株与试剂

条斑紫菜孢子体由江苏省海洋水产研究所国家紫菜种质库提供,实验室长期保种。培养条件:光照强度 30 ~ 35 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光照周期(L:D) 14 h: 10 h,培养温度 $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$,培养基为 Provasoli 加富海水培养基(PES)。

文库构建使用 Epicentre 公司的 CopyControl™ Fosmid Library Production Kit。宿主菌为 EPI300™-T1^R Phage T1-resistant *E. coli* Plating Strain;载体为 CopyControl pCC1FOS™;包装蛋白为 MaxPlax™ Lambda Packaging Extracts。限制性内切酶 Not I 购自日本 TOYOBO 公司。其它试剂均为进口试剂或国产分析纯。

1.2 文库构建

材料收集 用 200 目筛绢收集条斑紫菜孢子体,无菌蒸馏水冲洗 3 次以去除藻丝表面附着的杂质,吸水纸尽量吸干水分,称取 1.2 g 藻丝,液氮冻存。

高分子量 DNA 制备 DNA 制备参照节旋藻的 DNA 制备方法^[17]。冻存藻丝加入 0.12 g 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)及少量石英砂,液氮中迅速研磨破碎,分装于 1.5 mL 离心管;管中加入 0.5 mL 溶液 I (30 mmol/L Tris-Cl pH 8.0, 10 mmol/L EDTA pH 8.0, 100 mmol/L NaCl, 2% β -巯基乙醇),涡旋振荡 1 min;13 000 \times g 离心 1 min,弃上清;重复一次。用 0.54 mL 溶液 II (100 mmol/L NaCl, 200 mmol/L 蔗糖, 10 mmol/L EDTA pH 8.0)悬浮沉淀,加入 0.18 mL 裂解缓冲液(500 mmol/L Tris-Cl, 25 mmol/L EDTA, 2.5% SDS pH 8.0),振荡 1 min;加入 RNase A 至终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,55 $^\circ\text{C}$ 水浴 1 h。冷却至室温后,用等体积 Tris 饱和酚和等体积氯仿/异戊醇抽提 2 次,离心(13 000 \times g, 10 min)收集上清;加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc(pH 5.2)和 0.8 倍体积的异丙醇轻柔混匀,-20 $^\circ\text{C}$ 过夜后 13 000 \times g 离心 15 min;沉淀用 70% 乙醇洗涤两次除盐,100 μL TE 溶解沉淀并定量。-20 $^\circ\text{C}$ 保存备用。

随机片段制备与末端修饰 25 μg 高分子量 DNA 在 60 μL 体系中用 21 号注射器随机剪切制备适合于文库构建的 DNA 片段。倒转电场凝胶电泳(field-inversed gel electrophoresis, FIGE)检测分子量,正向电压 180 V,反向电压 120 V,脉冲转换时间 0.1 ~ 2.0 s,0.8% 琼脂糖凝胶电泳 12 h,电泳结束后 EB 染色。

末端修饰按照试剂盒流程操作 随机剪切的 DNA 片段用 0.8% 低熔点胶(low melting point, LMP)电泳,切取含有 40 ~ 50 kb DNA 片段的凝胶,42 $^\circ\text{C}$ 琼脂糖酶消化 10 h,70 $^\circ\text{C}$ 灭活后冰置 5 min;13 000 \times g 离心 20 min,上清加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc(pH 7.0)和 2 倍体积的无水乙醇轻柔混匀,室温静置 30 min,13 000 \times g 离心 20 min;沉淀用 70% 乙醇洗涤 2 次,室温放置使乙醇挥发,溶于 30 μL TE 溶液,-20 $^\circ\text{C}$ 保存备用。电泳检测回收片段大小并定量。

连接转染 按试剂盒流程操作:载体与外源片段按摩尔比 10:1 连接 4 h,用 MaxPlax™ Lambda Packaging Extracts 体外包装后转染 EPI300™-T1^R 菌株。涂布在含有 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素的 LB 平板上,37 $^\circ\text{C}$ 培养 20 h。

文库保存及 PCR 超级池构建 挑取单克隆分别培养于含 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素的 500 μL LB 液体培养基中,37 $^\circ\text{C}$ 培养 30 h 后,加入 25% 无菌甘油混匀。按两步 PCR 筛选系统设超级池,每个一级超级池由 12 个 96 孔板构成,共含有 1 152 个克隆;每个二级池分别由 12 个板池、8 个行池和 12 个列池构成。文库与超级池均用 96 孔细菌培养板各保存两份,并用密封膜封板,-80 $^\circ\text{C}$ 保存。

1.3 文库质量鉴定

克隆片段长度和文库覆盖率鉴定 随机挑取 20 个克隆,碱裂解法提取质粒 DNA,经 Not I 酶切后进行脉冲场凝胶电泳,检测克隆片段大小并计算重组率。电泳条件:1% 琼脂糖凝胶,0.5 \times TBE,温度 14 $^\circ\text{C}$,起始脉冲时间 5 s,终止脉冲时间 15 s,电泳 11 h,电场强度 6 V/cm,电场夹角 120 $^\circ$,泵速 90 r/s。

为检测文库覆盖率,以条斑紫菜 18S rRNA, *atpA*, *h2A*, *rbcL* 基因为模板设计 PCR 引物进行文库基因筛查(表 1),并对 PCR 产物进行 DNA 序列测定。

表 1 从文库中筛查基因所用 PCR 引物
Tab.1 PCR primers for gene screening from the fosmid library

GenBank 登录号	基因	引物(5'→3')
GI: 75755632	18S rRNA	TGGAGGGCAAGTCTGGTGAACG 22 bp TCCCACTGGCAACAAGGCAAAA 22 bp
GI: 90994377	<i>atpA</i>	CTGTCATACTACCTCCACCTA 21 bp CAAGTAATGGAACAAGGCTAA 21 bp
GI: 156186230	<i>h2A</i>	GCGTACCCATCACTGTCTCCTCG 23 bp CCCTTCTTTCCCTTGACCTTCG 22 bp
GI: 90994377	<i>rbcL</i>	ACTGGGATGCTGACTATGTGA 21 bp CCTAAGAAAGGTCTACCGAAC 21 bp

Fosmid 克隆稳定性鉴定 随机挑选 6 个 Fosmid 克隆,分别接种于 300 mL 含有 12.5 μg/mL 氯霉素的 LB 培养基,37 °C 过夜培养,培养物稀释 10⁶ 倍接种后按同样条件继续培养,连续继代培养 5 d。培养结束后,分别提取第 1 天(第 0 代)和第 5 天(约第 100 代) Fosmid DNA,Not I 酶切后,脉冲场凝胶电泳检测 Fosmid 克隆在继代培养中是否发生变化。

2 结果

2.1 大分子量 DNA 的制备

足量的高质量基因组 DNA 是构建 Fosmid 文库的关键。检测结果显示,本研究方法制备 DNA 得率高、纯度好、分子量较大。制备 DNA 片段的起始材料为 50 mg 条斑紫菜孢子体(每个 EP 管中的藻体量),最后得到的 DNA 为 70 μg,得率高;紫外分光光度计检测 DNA 质量 $A_{260}/A_{280} = 1.9$ 、 $A_{260}/A_{280} = 1.85$,纯度好;电泳结果显示 DNA 片段的分子量大于 100 kb(图 1),能够满足构建 Fosmid 文库对大分子量 DNA 的要求。

注射器随机剪切能有效破碎大分子量 DNA。随机剪切 30 次左右,DNA 片段的长度从 100 kb 以上下降到 50 kb 左右;再经过末端修饰等步骤,最终得到的 DNA 片段的长度大约集中在 35 ~ 40 kb,适合与 Fosmid 载体进行重组连接。

2.2 文库覆盖率

条斑紫菜 Fosmid 文库来自于同一 DNA 样本的两次连接,克隆总数为 23 040 个。随机选取 20 个文库克隆提取质粒,用限制性内切酶 Not I 酶切后电泳检测(图 2),可看出每个泳道大约在 8 kb 处均有一载体 DNA 片段的电泳带,除此之外每个泳道还有其它的电泳条带,表明文库克隆的重组效率约为 100%。

统计显示,除载体片段外的电泳带共计有 57 条;将每个泳道片段合并后分析,重组克隆的插入片段分子量在 28 ~ 40 kb 之间,平均约为 35 kb。以条斑紫菜基因组大小为 290 Mb 计,所构建基因组文库覆盖率约为 2.78 倍。

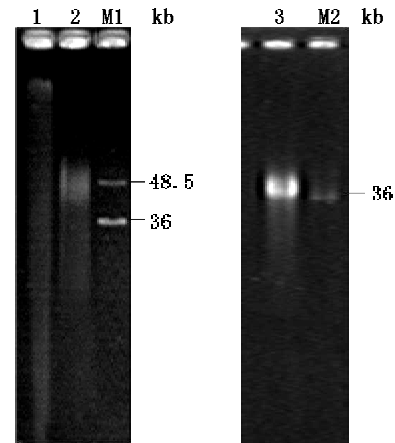


图 1 大分子量基因组 DNA 制备

1. 制备的总 DNA;2. 随机剪切 30 次后的 DNA;3. 经末端修饰并回收的 DNA, M1. λDNA + copycontrol DNA, M2. copycontrol DNA

Fig.1 Preparation of high molecular genomic DNA

1. Total DNA prepared; 2. randomly sheared DNA for thirty times; 3. recovery DNA of end modified; M1. λDNA + Copycontrol DNA, M2. Copycontrol DNA

以包含全部克隆的 20 个一级池的 DNA 为模板,从文库中筛查条斑紫菜 18S rRNA, *atpA*, *h2A*, *rbcL* 基因。PCR 筛查结果显示,18S rRNA 基因在所有一级池中均能筛查到,其它 3 个基因至少能筛查到一个克隆(表 2),经测序均为目标基因。实验印证了由计算所推测的文库覆盖率。

2.3 文库稳定性检验

为了评估 Fosmid 克隆的插入片段在大肠杆菌中的稳定性,我们随机挑选了 6 个克隆连续培养 100 代,比较 0 代和第 100 代 Fosmid 克隆插入片段的酶切图谱,结果显示没有发生重组或插入/

缺失等变化,表明 Fosmid 克隆至少能稳定传代 100 代(图 3),说明低拷贝的 Fosmid 克隆在不加诱导剂下传代稳定。

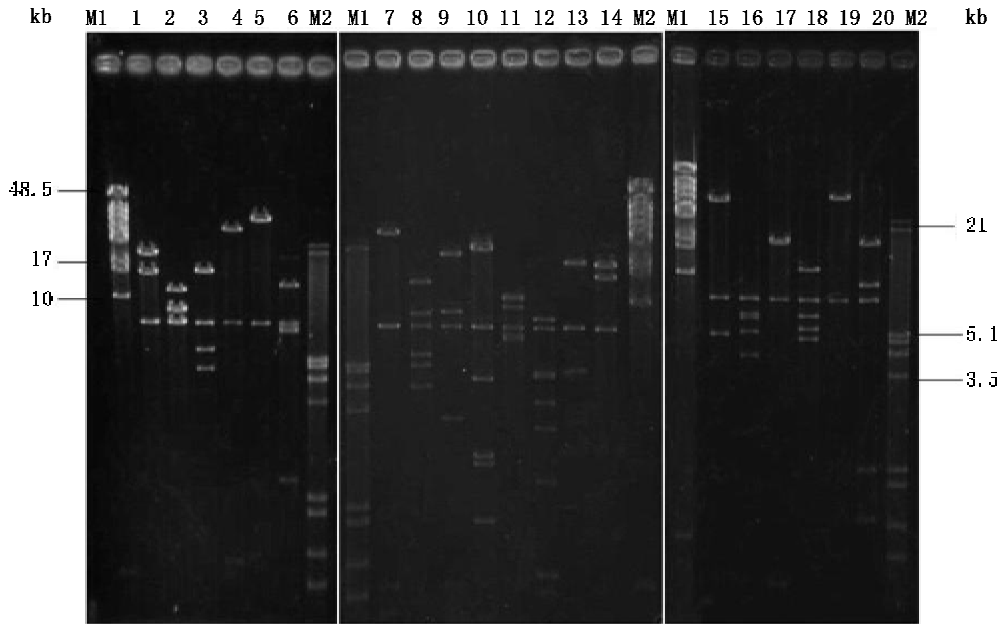


图 2 文库克隆酶切片段电泳图

1~20. 为随机检测的克隆;M1. lambda mono cut mix;M2. λ DNA /Hind III + EcoR I

Fig. 2 Electrophoresis of restricted fragments of recombinant Fosmid clones

1-20. Randomly selected clones; M1. lambda mono cut mix; M2. λDNA/Hind III + EcoR I

表 2 超级池筛选结果

Tab.2 Specific gene screening from the super pool of Fosmid clones

基因	1,2,3,4.....18,19,20
18S	+++++++++
atpA	-----+-----
h2A	-----+-----
rbcL	-----+-----

3 讨论

3.1 高分子量基因组 DNA 制备

Fosmid 文库构建的关键步骤之一就是制备高纯度的高分子量基因组 DNA。藻类的多糖和多酚含量普遍较高,是 DNA 纯度的主要干扰物质。紫菜配子体含有大量硫酸基多糖和羧基多糖等酸性胞外多糖,这些多糖比陆生植物的中性多糖更易溶于水,会与 DNA 产生共沉淀,从而影响限制性内切酶的消化和 PCR 扩增等后续实验。另外,有研究表明紫菜配子体细胞 DNA 含量较少,DNA 酶含量却很高,会导致紫菜 DNA 提取得

率不足^[18]。紫菜的孢子体世代具有和配子体相同的遗传背景,更易于在常温条件下长期保存和培养,使其成为对紫菜进行分子生物学和基因组研究的理想材料。因此,本研究选用条斑紫菜孢子体为实验材料。

紫菜 DNA 的制备方法已有报道^[18-20]。1992 年,Hong 等^[20]采用 LiCl 法提取紫菜 DNA,LiCl 使紫菜组织软化,DNA 从松散的细胞壁和细胞膜之间释放出来,避免了液氮研磨造成的酸性多糖释放,但此法提取的 DNA 纯度不高,效果也不稳定。细胞法是用海螺酶除去紫菜配子体的细胞壁(含大量多糖),以减少多糖对 DNA 质量的干扰,但由于孢子体与配子体细胞壁组分差别很大,用海螺酶不能有效降解孢子体细胞壁,因此不适合于孢子体 DNA 制备^[19]。CTAB 法是提取植物 DNA 的常用方法,可有效去除多糖、多酚等杂质,制备的 DNA 纯度较高,但该方法步骤多,不利于获得高分子量 DNA 片段。琼脂糖包埋组织材料,原位消化后脉冲场凝胶电泳是构建 BAC 文库常用的高分子量 DNA 制备方法,但操作繁琐,对仪器和试剂要求高。

本实验针对条斑紫菜的生化特性采取了去除多糖的措施,实验材料研磨后加入溶液 I,大量多糖溶于溶液 I 而被除去,质量检测证明制备的 DNA 多糖含量较少,质量较高。同时,针对 Fosmid 文库对 DNA 分子量的要求,采取了简化步骤、轻柔操作的措施,虽然采用的是最常规的酚抽提法,但由于步骤少,所制备的 DNA 片段分子量集中在 100 kb 左右,且 DNA 得率较高,能够满足构建 Fosmid 文库的要求。

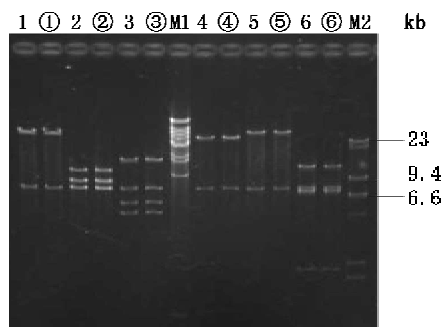


图3 克隆稳定性鉴定

1~6. 0 代克隆酶切, ①~⑥. 100 代克隆酶切, M1. lambda mono cut mix, M2. λ DNA/*Hind* III

Fig. 3 Stabilization of clones

1-6. digestions of 0 generation clone; ①-⑥. digestions of 100 generation clone; M1. lambda mono cut mix; M2. λ DNA/*Hind* III

3.2 文库的偏倚性

无偏基因组文库是任意 DNA 片段出现概率均等的文库,无偏文库有利于基因组特性分析和基因克隆。构建方法的不同以及基因组特性的差异会造成文库的偏倚性。为构建无偏倚的条斑紫菜 Fosmid 基因组文库,我们在制备高分子量 DNA 后,用机械剪切的方法获得断裂位点随机分布的基因组 DNA 片段。

条斑紫菜基因组 GC 含量为 65.2%^[17],用限制性内切酶 *Not* I 分析插入片段分子量,该酶识别位点序列为 GGGGCC,若碱基分布均衡,那么条斑紫菜基因组平均每间隔 8 kb 左右就会有一个 *Not* I 的酶切位点。所构建文库平均插入长度为 35 kb,那么理论上计算平均每个片段应该有 3 个酶切位点。分析 20 个克隆的插入片段,结果显示 *Not* I 酶切片段共 57 条,(不包括载体片段),其中最少 2 段,最多 6 段,平均约为 3 段,比理论值 4 段要略少,这可能是由于甲基化影响了酶切效率,加上个别酶切后小于 1 kb 的片段在脉

冲电泳中被忽略造成的。对重组 Fosmid 克隆的酶切检验证明了本研究所构建的条斑紫菜基因组文库是无偏文库。

Deng 等^[6]构建了条斑紫菜孢子体 BAC 文库,该文库平均插入片段长度 65 kb。用限制性内切酶 *Not* I 进行酶切,从理论上推测除载体外平均应该有 9 个酶切片段,但实际的酶切片段只有 1~2 个,与理论计算差异很大。我们注意到 Deng 等^[6]在构建 BAC 文库时选用了限制性内切酶 *Hind* III 制备重组片段,该酶的识别位点序列为 AAGCTT,在基因组 AT 丰富区域的酶切位点多,而在 GC 丰富区域酶切位点少。因此,用于构建文库的重组 DNA 片段可能有 AT 偏向性,所构建的 BAC 文库 GC 含量比条斑紫菜实际 GC 含量偏低,不易被 *Not* I 酶切。

3.3 文库的覆盖率

按照条斑紫菜基因组大小为 290 Mb 计,本研究构建的覆盖率约为 2.78 倍。根据方程式 $V = \ln(1-P)/\ln(1-f)$ (其中 V 为实际克隆数, P 为筛选到某一克隆的几率, f 为某一单个克隆在整个基因组中所占的相对比例),检测到某一稀有基因的概率约为 93.8%。

以条斑紫菜的 18S rRNA, *atpA*, *h2A*, *rbcL* 基因为模板设计 PCR 引物进行筛库。高拷贝的 18S rRNA 基因在每个超级池都有克隆,其他 3 个基因也得到至少 1~2 个克隆。这证明了本文构建的 Fosmid 文库检测到基因的概率符合理论值,完全达到构建高质量文库要求。

综上所述,本研究成功构建了条斑紫菜覆盖率比较高、序列无偏倚的基因组 Fosmid 文库,从而为开展条斑紫菜基因克隆,内含子与基因上下游调控序列分析,基因组物理图谱构建,基因组特征分析,乃至全基因组序列测定奠定了基础。

参考文献:

- [1] Stiller J, Waaland J. Molecular analysis reveals cryptic diversity in *Porphyra* (Rhodophyta) [J]. *J Phycol*, 1993, 29: 506-517.
- [2] Sahoo D, Tang X R, Yarish C. *Porphyra*-the economic seaweed as a new experimental system [J]. *Current Science*, 2002, 83 (11): 1313-1316.
- [3] Waaland J R, Stiller J W, Cheney D P. Macroalgal candidates for genomics [J]. *J Phycol*, 2004, 40:

- 26-33.
- [4] Grossman A R. Paths toward algal genomics [J]. *Plant Physiol*, 2005, 137: 410-427.
- [5] 王 荣, 刘 涛, 周晓君, 等. 条斑紫菜锰超氧化物歧化酶基因克隆与序列分析[J]. *高技术通讯*, 2006, 16(5): 522-528.
- [6] Deng D Y, Zhao G, Xuan J, *et al.* Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of marine macroalga *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta) [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2004, 22: 375-386.
- [7] Nikaido I, Asamizu R, Nakajima M, *et al.* Generation of 10154 expressed sequence tags from a leafy gametophyte of a marine red alga, *Porphyra yezoensis* [J]. *DNA Research*, 2000, 7(3): 223-227.
- [8] Lee E, Seo S, Kim T, *et al.* Analysis of expressed sequence tags of *Porphyra yezoensis* [J]. *Mol Cells*, 2000, 10: 338-342.
- [9] Asamizu E, Nakajima M, Kitade Y, *et al.* Comparison of RNA expression between the two generations of *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta), based on expressed sequence tag frequency analysis [J]. *J Phycol*, 2003, 39: 923-930.
- [10] Xu M J, Mao Y X, Zhang X C, *et al.* Bioinformatic analysis of expressed sequence tags from sporophyte of *Porphyra yezoensis* (Baciaceae, Rhodophyta) [J]. *Prog Nat Sci*, 2005, 15: 24-34.
- [11] 周晓君, 茅云翔, 王孟强, 等. 条斑紫菜 cDNA 微阵列制备及其在世代差异基因表达检测中的应用 [J]. *高技术通讯*, 2006, 16(12): 1300-1305.
- [12] Kitade Y, Asamizu E, Fukuda S, *et al.* Identification of genes preferentially expressed during asexual sporulation in *Porphyra yezoensis* gametophytes (Bangiales: Rhodophyta) [J]. *J Phycol*, 2008, 44: 113-123.
- [13] Kuang M, Wang S J, Li Y, *et al.* Transient expression of exogenous gus gene in *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta) [J]. *Chinese J Oceanol Limnol*, 1998, 16(s): 56-61.
- [14] Cheney D, Metz B, Stiller J. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in the macroscopic marine red alga *Porphyra yezoensis* [J]. *J Phycol*, 2001, 37 (suppl): 11.
- [15] Liu H, Yu W, Da J, *et al.* Increasing the transient expression of GUS gene in *Porphyra yezoensis* by 18S rDNA targeted homologous recombination [J]. *J Appl Phycol*, 2003, 15: 371-377.
- [16] Kim U J, Shizuya H, Dejong P J, *et al.* Stable propagation of cosmid sized human DNA inserts in an *F* factor based vector [J]. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20: 1083-1085.
- [17] 茅云翔, 凌 娜, 王广策, 等. 极大节旋藻 (*Arthrospira maxima*) 高分子量基因组文库构建及其应用 [J]. *高技术通讯*, 2007, 17(2): 191-196.
- [18] Shivji M S, Rogers S O, Stanhope M J. Rapid isolation of high molecular weight DNA from marine macroalgae [J]. *Mar Ecol Progr Ser*, 1992, 84: 197-203.
- [19] 王 勇, 裴鲁青, 骆其君. 紫菜丝状体 DNA 的提取 [J]. *海洋学报*, 2002, 24(2): 146-148.
- [20] Hong Y, Coury D A, Miriam P F, *et al.* Lithium chloride extraction of DNA from the seaweed *Porphyra perforata* (Rhodophyta) [J]. *Journal of Phycology*, 1992, 28: 717-720.

Construction of genomic Fosmid library of *Porphyra yezoensis*

MAO Yun-xiang, CUI Jing-jing, KONG Fan-na

(Key Laboratory of Marine Genetics and Gene Resources Utilization, Ministry of Education,
Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Genomic library with high-molecular weight inserts is an essential and powerful tool for genomic studies. An unbiased fosmid library of *Porphyra yezoensis* was constructed and characterized. The library comprised 23 040 clones with 100% recombination frequency. The range of insert size of most bulk of clones is from 28 kb to 40 kb and the average size is about 35 kb. Therefore, the library coverage is about 2.78 genome-equivalent. The theoretical coverage was verified by successfully screening out 4 randomly selected genes, 18S rRNA, *atpA*, *h2A* and *rbcL*, once at least from the super pools which covered the whole library clones. No variations were observed by comparing the original clones with those of the hundredth generation cultivated successively, indicating the good fidelity and stability of the fosmid library. This study laid the foundations for gene cloning and genomic research in *P. yezoensis*.

Key words: *Porphyra yezoensis*; genomic Fosmid library; gene cloning; genomics