

棉花细菌人工染色体的荧光原位杂交 (BAC-FISH) 技术*

王 凯 张燕洁 关 兵 郭旺珍 张天真**

(南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095)

摘要 细菌人工染色体荧光原位杂交 (BAC-FISH) 技术是植物染色体识别、物理作图等分子细胞遗传学研究的重要工具, 但对于某些物种尤其是多倍体植物, 由于大量重复序列的存在等问题, 使得该技术应用受到很大的限制. 通过选择棉花分子遗传图中高重组区的微卫星位点 (simple sequence repeats, SSR) 标记的策略, 筛选到不含或含有少量重复序列的细菌人工染色体 (BAC) 克隆, 同时, 在通用 FISH 技术程序基础上, 通过改进发根、变性、洗脱条件等步骤, 构建出适合于棉花的 BAC-FISH 技术, 简化了操作流程的同时, 获得稳定的杂交结果及较高的检出率; 并通过将一随机获得的 BAC 进行染色体的物理定位, 进一步引入双探针、双色及重复杂交技术, 显示了该技术的成熟与良好的应用前景和价值.

关键词 棉花, 细菌人工染色体, 荧光原位杂交

学科分类号 Q37, Q23

DNA 荧光原位杂交 (FISH) 是 20 世纪 80 年代末开始发展起来的一种重要的非放射性标记原位杂交技术. 随着技术的不断改进, 探针类型从最初的 DNA 重复序列和多拷贝基因家族^[1]发展到单或低拷贝序列^[2], 现今它已被广泛地应用于动植物基因组结构和 DNA 分子物理图谱的构建研究中^[3~5].

细菌人工染色体荧光原位杂交 (BAC-FISH) 是以细菌人工染色体 (BAC) 克隆作为探针进行的染色体原位杂交, 由于克隆的外源片段一般为 100 kb 以上, 其探针与靶 DNA 序列相遇的机会大, 杂交信号检出率大大提高. 因此, 它较单拷贝或低拷贝小片段 DNA 序列杂交更为容易, 而且准确可靠, 从根本上克服了过去单拷贝 DNA 杂交的困难, 大大促进植物尤其是二倍体物种基因组的研究, 现已成为植物核型分析^[6~9]、基因定位及物理图谱构建^[10~14]等分子细胞遗传学研究的有力工具. 但是, 由于 BAC 克隆片段的长度增加, 其往往含有大量重复序列, 特别是对于基因组中重复序列含量高的物种如六倍体小麦, 四倍体棉花、油菜、马铃薯等, 导致杂交后较强的背景干扰, 使得该技术的应用受到很大的限制, 至今, 在多倍体植物中 BAC-FISH 技术应用报道极少^[11,15].

棉花是重要的经济作物, 棉纤维是世界上主要的纺织原材料^[16]. 1995 年, Hanson 等^[17]利用 Cot-1 DNA 为探针与 11 个棉花大插入片段 BAC 克隆 DNA 杂交, 并从中筛选出不含重复序列的单拷贝克隆, 进行 FISH 杂交. 这是 BAC-FISH 技术在棉花上应用的首次正式报道. 但它与现今的 BAC-FISH 不同, 他们是利用 Cot-1 DNA 为探针与克隆进行 DNA 杂交, 从中选出单拷贝序列的 BAC 克隆用于原位杂交, 而非将 Cot-1 DNA 用于探针封阻, 其技术流程较为复杂. 同年, Jiang 等^[18]即报道了改进的 BAC-FISH 技术, 利用 Cot-1 DNA 与探针预杂交进行探针封阻, 将该技术成功应用到水稻中. 简化了操作步骤的同时大大提高了可用探针的数量, 而且避免了使用 DNA 杂交造成的繁琐, BAC-FISH 从此在植物中开始得到广泛的应用. 但遗憾的是, 作为重要经济作物之一的棉花, 至此却再无应用报道. 现今, 随着棉花基因组学研究的深入, 高密度的遗传图谱以及 BAC 文库的成功构建, 迫切要求对于核

* 长江学者和创新团队发展计划资助项目 (IRT0432).

** 通讯联系人.

Tel: 025-84395311, E-mail: cotton@njau.edu.cn

收稿日期: 2007-03-30, 接受日期: 2007-05-08

型分析等分子细胞遗传学研究以及物理图谱构建等领域有着重要作用的BAC-FISH技术的引入. 我们在前人工作的基础上, 重新构建了棉花的BAC-FISH技术体系, 并成功运用该技术将遗传图谱的未定位连锁群与染色体建立联系^[7], 同时, 开发出完整的一套四倍体棉染色体特异BAC克隆, 成功地应用于棉花染色体的识别^[8]. 本研究则是在此基础上对该技术的进一步改进, 并通过建立双探针、双色及重复杂交等衍生技术, 显示了该技术在物理定位及物理图谱构建中的重要作用.

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用BAC文库是由雄性不育恢复系材料0-613-2R构建^[9]; 用于荧光原位杂交(FISH)的制片材料为陆地棉遗传标准系TM-1, 二倍体中棉(*G. arboreum*)及雷蒙德氏棉(*G. raimondii*); 南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室开发的一套染色体特异BAC克隆用于染色体的物理定位^[8].

1.2 方法

1.2.1 标记选择及文库筛选. 本研究所用微卫星位点(SSR)标记来自一个棉花高密度遗传图谱, 引物的设计、序列及合成参见其详细报道^[9]. 为了得到不含有或含很少重复序列的BAC克隆以获得清晰的杂交信号, 每一个标记都须符合以下2个条件: a. 所选的标记必须在图谱中只有唯一的位点; b. 所选的标记位于连锁群上标记的密集区. 将这些SSR标记用于文库的PCR法筛选, 筛选具体步骤按王凯等^[20]的方法进行.

1.2.2 染色体制片.

减数分裂中期 I 染色体制片: 摘取TM-1适当大小的花蕾, 除去花萼和花冠, 取少量花药于载片上, 加一滴乙酸洋红, 盖上盖玻片, 用镊子轻压, 在低倍物镜下预检, 将处于减数分裂中期 I 的花蕾用卡诺固定液固定过夜. 用镊子摘取数个处于减数分裂中期 I 的花药于载片上, 滴加45%乙酸并轻轻捣碎, 剔除可见的杂质, 然后压片, -70℃保存.

有丝分裂中期染色体制片: TM-1种子经浓硫酸脱绒后, 以流水冲洗、晾干后于室温浸过夜, 置于固体MS培养基中, 置25~30℃条件下培养; 待根长3 cm以上时, 切取根尖, 用0.025% (v/v)放线菌酮于室温下处理2小时; 处理结束后, 用蒸馏水洗约10 min, 用卡诺固定液固定2~24 h; 固定完成后, 再用蒸馏水洗约10 min, 用2%纤维素酶

(Cellulase R-10)和0.5%果胶酶(Pectinase)混合液于37℃酶解40 min, 卡诺固定液固定; 最后用45%乙酸压片, 制片于-70℃保存.

1.2.3 探针的制备及杂交液的配置. 将筛选得的阳性单克隆于含12.5 g/L氯霉素的LB培养基中培养过夜, 碱裂解法提取BAC-DNA. 探针采用德国Roche公司的DIG-Nick Translation Mix和BIO-Nick Translation Mix标记系统对其进行标记, 按产品说明进行操作, 所标记探针的大小为200~500 bp. 杂交液中含有1 mg/L (双探针杂交时, 为提高2个信号同时检测到的概率, 采用1.5 mg/L) 的纯化探针, 50%去离子甲酰胺, 10%硫酸葡聚糖, 2×SSC和10 μg鲑鱼精DNA, 适量 Cot-1 DNA^[22], 97℃变性10 min, 置冰上5 min以上.

1.2.4 杂交. BAC-FISH 杂交程序根据 Hanson等^[11]的方法并经修改进行: 染色体制片经冰冻揭掉盖片, 无水乙醇干燥; 干燥制片用150 mg/L的RNA酶A (2×SSC配制)于37℃处理1 h, 2×SSC冲洗2次, 每次5 min; 再将制片转入70%去离子甲酰胺 (2×SSC配制) 变性, 有丝分裂制片70℃3 min, 减数分裂中期 I 制片78℃1 min; 变性后的制片迅速转入-20℃的70%、90%和无水乙醇中梯度脱水, 每次3 min; 制片于室温干燥后, 加15 μl上述杂交混合液, 加一20 mm×20 mm盖片, 置于一密封湿盒中, 37℃杂交过夜(6 h以上).

1.2.5 信号检测. 杂交后的制片轻轻剥离盖片后于40℃按如下程序洗脱: 2×SSC 2次, 每次5 min; 50%甲酰胺(2×SSC配制)10 min; 2×SSC中5 min; 1×PBS中5 min. 甩掉多余的PBS, 加入20 μl Anti-DIG-Rhodamine (2 mg/L); 多色杂交时, 同时加入20 μl Anti-DIG-Rhodamine (2 mg/L)和avidin-fluorescein(2 mg/L); 加盖片, 于37℃温育1 h; 然后用1×PBS洗3次, 每次5 min, 晾干后加DAPI (2 mg/L于McIlvaine's缓冲液中)染色3 min; 用1×PBS冲洗载片, 加抗衰减剂(Vector)封片, 制片于Olympus BX51荧光显微镜下观察信号, 图像拍摄使用VF CCD相机(Media Cybernetics)拍照, 使用Image-Pro Express软件进行图象合成处理.

1.2.6 重复荧光原位杂交. 重复荧光原位杂交(repeated-FISH)的杂交程序基本与前者相同, 只是在前一次杂交结束后, 将制片放入1×PBS洗脱掉盖片后, 再于45℃浸泡2次, 每次10 min, 然后于2×SSC中45℃温浴5 min. 之后, 将制片室温脱水干燥一天以上备用即可.

2 结 果

2.1 低重复序列BAC克隆的筛选

结合以往研究^[17,18], 共筛选位于遗传图谱^[20]具较高标记密度区的SSR标记80个, 共有57个标记筛选到阳性克隆. 每个标记分别选用一个阳性克隆进行初步的原位杂交分析, 其中39个克隆在有丝中期与减数分裂中期 I 的染色体制片中均获得了清晰的杂交信号(图1a, b). 其余的18个标记虽然筛选到阳性克隆, 但多数在杂交时无法获得清晰的杂交信号, 当加入大量的Cot-1 DNA后(100~200倍探针), 有5个克隆在有丝中期染色体制片杂交中获得了较弱的信号, 说明这些克隆DNA片段上含有较多的重复序列. 在39个可获得清晰信号的BAC克隆中, 有27个(69.2%)无需加入Cot-1 DNA进行封阻, 就可获得清晰的杂交信号, 而另外12个克隆探针只需加入20倍探针量的Cot-1 DNA即可获得清晰的杂交信号. 说明这些克隆含有较少量的重复序列. 上述结果说明, 在棉花中根据遗传图谱高密度标记区进行标记选择筛选文库, 可以提高获得具有较少或无重复序列的BAC克隆的概率, 从而提高BAC-FISH技术中BAC的应用效率.

2.2 原位杂交程序的改进

2.2.1 制片变性. 植物原位杂交中, 制片变性条件一般有70℃ 2.5~3 min和78℃ 1.1~1.5 min两种^[23], 为了获得最佳的结果, 我们设计了几组条件(表1)进行了对比试验. 对于有丝分裂制片, 在70℃和78℃两种温度条件下, 变性处理3 min和1.1 min均可获得较好的杂交结果; 对于减数分裂制片, 只有在78℃ 1 min下获得了较良好的杂交结果. 实验中发现, 有丝分裂制片在78℃时, 延长时间(1.5 min)会导致染色体的膨胀变形, 严重影响杂交结果, 而减数分裂染色体虽然会随变性时间的不同而获得不同

Table 1 Identification of the influence under variety chromosome denature conditions

Groups	Denature conditions (°C/min)	The results of hybridization	
		Mitotic cell	Meiotic cell
I	70/2	+	-
II	70/2.5	+	+
III	70/3	++	+
IV	78/1	+	++
V	78/1.1	++	+
VI	78/1.5	-	+

+ : good chromosome configuration after FISH. - : chromosome distortion or dilating after FISH.

的杂交效果, 但在一定范围内不会出现染色体膨胀变形现象. 因此, 我们选用了有丝分裂制片70℃ 3 min, 减数分裂78℃ 1 min的变性条件.

2.2.2 洗脱及信号分析. 杂交后洗脱的严谨度是结果可靠性的保证. 严谨度主要由甲酰胺的浓度和洗脱时间及温度决定的, 浓度、温度越高, 时间越长严谨度就越高. 为了减少探针非特异结合信号影响, 得到可靠的结果, 我们采用了50%甲酰胺、40℃和10 min的洗脱时间, 严谨度大于80%. 从图1a、b可以看出, 杂交基本无背景干扰, 并且信号清晰易辨.

为了进一步分析杂交的效率, 随机筛选8个BAC克隆(平均长度为133.5 kb), 从中分别选取最长(169 kb)、最短(105 kb)和中间长度(129 kb)3个, 统计其信号检出率(表2). 其中, 有丝分裂中期的检出率均大于90%, 减数分裂中期 I 的检出率达到65.4%. 按四倍体棉花基因组中含有40%的重复序列推算^[24], 探针最小杂交长度为60 kb左右. 但不论在体细胞还是花粉母细胞, 其杂交的效率都表现出一致性, 并不会因探针的长短表现不同.

Table 2 The ratio of detected signals using different probes in length

BAC clone	Length/kb	Ratio of detected signals / Total number of detected cells	
		Mitotic cell	Meiotic cell
14G14	169	93.8% / 65	63.4% / 63
59B08	129	91.6% / 60	60.9% / 41
50D03	105	92.1% / 51	72.0% / 81
Average	133.5	92.5% / 176	65.4% / 185

2.3 利用 BAC-FISH进行BAC克隆的物理定位

我们从文库中随机选择了一个单克隆, 通过利用BAC-FISH及其衍生的双探针、双色及重复杂交技术将其定位来介绍和说明该技术的应用. 初步选择克隆29B22, 其与有丝分裂中期染色体杂交时, 可见清晰的杂交信号(图1g). 为了能快速将该克隆进行染色体定位, 首先, 将该克隆探针与二倍体的中棉(*G.arboreum*)及雷蒙德氏棉(*G.raimondii*)杂交, 以确定其所在的基因亚组. 如图1c、d所示, 该克隆探针在中棉某染色体上有杂交信号, 而在雷蒙德氏棉染色体上未见信号, 说明该克隆片段应来自四倍体棉的A基因亚组. 接着, 利用该克隆探针分别与一套四倍体棉的染色体特异BAC探针的A亚组染色体探针进行双探针杂交, 如图1e所示, 该克隆探针与染色体4的特异BAC探针 84C03杂交, 结果显

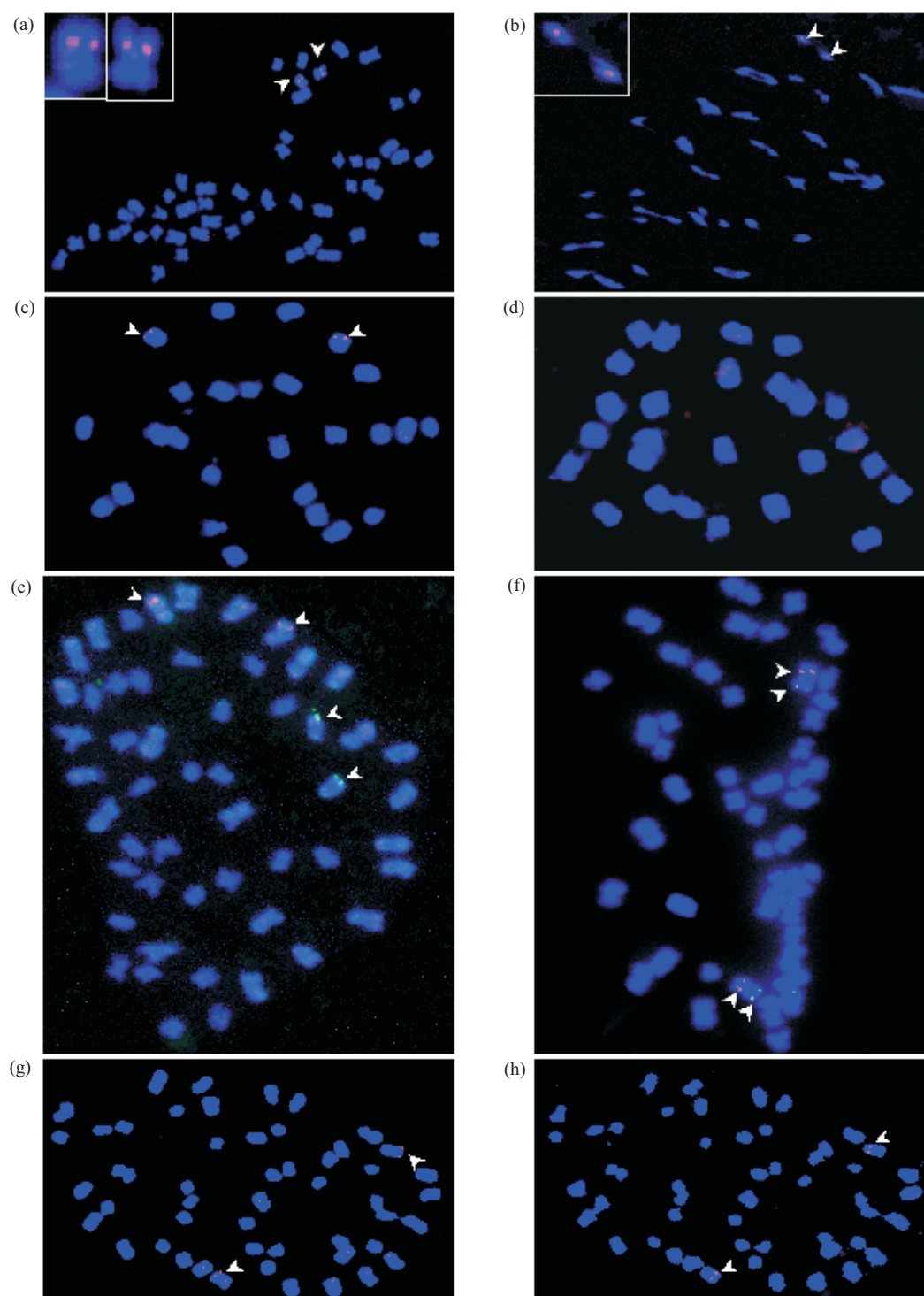


Fig. 1 BAC-FISH photomicrographs of cotton

(a) Mitotic chromosomes, hybridized with the BAC probe screened by SSR marker BNL2655 derived from the relatively high recombination region of linkage group D03. (b) Meiotic chromosomes, hybridized with the same BAC probe with (a). (c),(d) Showed the results of random BAC clone 29B22 hybridized with *G. arboreum* (c) and *G. raimondii* (d) metaphase chromosome. (e) Showed the random BAC clone 29B22 (red signals) located on the different chromosomes with chromosome-4-specific BAC 84C03 (green signals). (f) Showed the chromosome location of random BAC clone 29B22 by dual-color, and dual-probe-FISH. It showed the random BAC clone 29B22 (green signals, arrow) located on the same chromosomes with chromosome-5-specific BAC 87P01 (red signals, arrowhead). (g),(h) Showed the chromosome location of random BAC clone 29B22 by re-FISH. (g) One pair of signals could be found on one pair of metaphase chromosomes when used BAC clone 29B22 as probe in FISH. (h) When chromosome-5-specific BAC 87P01 as probe hybridized with the same slide as (g). The signals could be found on the same chromosome with BAC clone 29B22 probe. Arrows indicating the signal sites; the figures in white frames were enhancement of the chromosomes bearing signals.

示两探针位于不同的染色体上. 当该探针与染色体5的特异BAC探针87P01杂交时, 发现它们位于同一染色体的不同臂上(图1f). 为了避免多个探针的干扰, 进一步验证这一结果, 我们采用了重复原位杂交的方法加以证明. 如图1g、h所示, 图1g为随机BAC探针29B22在有丝分裂中期染色体的杂交结果, 图1h为染色体5特异BAC探针87P01与图1g中相同细胞染色体杂交结果, 从图1结果可知, 2个探针位于同一染色体上, 从而验证了该随机克隆位于染色体5上, 并与染色体特异克隆87P01相对应, 位于其相对的染色体臂的近末端.

3 讨 论

BAC-FISH中BAC克隆因其片段长, 易于杂交及信号检出, 但这也使BAC克隆中的重复序列存在的概率大大增加. Kim等^[9]在高粱的BAC-FISH研究中发现: 即使BAC中有很少比例的重复序列存在, 也会产生很强的背景干扰. 虽然可以加入Cot-1等进行封阻, 但这不仅会大大降低信号的强度, 而且有时无法完全消除背景干扰. 因此, 筛选不含或含有很少重复序列的BAC克隆便成为BAC-FISH成功的前提, 尤其对于具有高重复序列含量的物种, 实现这一点更加困难也更加迫切. Childs等^[25]在高粱中的研究证明, 遗传图谱中高的重组率区域往往是基因的富含区. 而高的基因含量又预示着低的重复序列含量^[26,27], 因此, 他们通过选择位于连锁群末端、高重组率区域的标记成功筛选到不含或含有较少重复序列的BAC克隆用于原位杂交. 本研究中, 我们通过探索选择四倍体棉的遗传图谱中具有单一位点并且位于较高的重组区域的标记, 以检验该策略对于棉花的适用性. 在筛选到的57个克隆中, 有39个(68%)克隆可获得清晰的杂交信号, 其中27个(47%)无需加入封阻DNA, 即克隆片段基本不含有重复DNA. 由此可以推断, 在连锁图上选择高重组区的标记进行BAC-FISH探针筛选的策略是适用于四倍体棉花的, 这为在棉花中有目的筛选BAC克隆开展BAC-FISH工作提供了依据.

由于棉花染色体较小而多, 细胞质浓厚且容易覆盖在染色体上, 因而获得易于进行原位杂交的染色体制片较困难. Hanson等^[11]及王春英等^[28]曾采用砂培法发根制片, 在棉花中获得成功. 本研究中, 有丝分裂原位杂交制片采用了培养基发根和放线菌酮预处理的方法, 与砂培发根法相比, 其种子发芽率高, 生长整齐, 2天时间即可剪根, 大大节省了

间, 且根尖分裂旺盛, 细胞内含物少, 分裂相好, 易于制片, 并且杂交信号清晰(图1), 能获得稳定的杂交结果(表2). 这一方法在节约时间的同时, 提高了种子的利用效率, 这对于利用各种变异或难以获得大量种子的材料进行FISH分析时更为有利, 因为较高的发芽率保证了在较少量的种子条件下, 能够获得良好的染色体制片, 从而保证遗传分析的成功.

染色体制片变性条件及制片的洗脱强度对杂交的效果及结果的准确性都有着很大的影响. 尤其是洗脱强度, 由于棉花基因组重复序列的含量高及BAC克隆插入片段大的特点, 导致克隆含有重复序列可能性增加, 杂交结果常具有较强背景干扰. Hanson等^[11]的洗脱方法虽获得了良好的杂交效果, 但步骤较为繁琐, 本研究通过摸索, 针对有丝分裂及减数分裂不同的染色体材料确定相应的变性条件, 同时, 利用较高的洗脱强度保证实验结果的准确性和可靠性, 获得较高的检出率及优良的杂交效果, 并且简化了洗脱步骤, 更加有利于BAC-FISH在棉花中的推广与应用. 但是, 图1e与其他图片比较可以看出, 其他图中的染色体背景清晰, 而图1e中则出现了相对明显的染色体涂染状信号. 分析原因主要是: 图1e为双探针杂交, 对于具有较高重复序列含量的四倍体棉花基因组来说, 其大基因组克隆片段中的重复序列含量亦会很高, 当采用多个不同探针时, 其不同克隆上不同的重复序列会产生“干扰叠加”, 获得更多的杂交位点, 较单个探针杂交(图1a, g, h)时背景干扰明显增强, 而同样是双探针杂交的图1f, 其背景干扰则并不明显, 说明这一现象是由不同克隆含有的重复序列多少所导致, 并非杂交及洗脱等操作过程所导致. 而这一点再一次说明, 获得不含或含由较少重复序列克隆对于BAC-FISH成功应用的重要性.

物理定位是BAC-FISH技术的重要应用之一. 而进行物理定位时往往应用到多个探针、多种颜色及重复杂交的FISH杂交衍生技术, 利用一个或多个标有不同颜色的探针同时杂交的技术, 可以在同一制片上同时观察到一个或多个探针的物理定位结果, 因此, 它已成为基本的BAC-FISH衍生技术, 并得到广泛应用^[6~10]. 但本研究发现, 在四倍体棉花中, 当2个或2个以上在单探针杂交均可检出清晰信号的BAC探针进行同时杂交时, 其背景往往较强, 这可能是由于不同BAC中的重复序列干扰叠加所导致. 对于一些探针, 高强度的洗脱及大量封阻

亦无法解决这一问题。但重复FISH技术的应用使得这一问题得到了解决, 并且由于每次采用单个探针杂交, 消除了不同探针的相互干扰, 增加结果的可靠性。本研究则通过将一随机获得的BAC克隆的物理定位, 将这两种技术引入四倍体棉花, 利用双探针将其进行初步定位后, 利用重复FISH技术将其物理定位加以确认。同时, 这一技术体系的建立也为棉花中标记或小片段序列的物理定位提供了新的方法和途径。由于标记或小片段的序列作为探针, 在FISH中难以观测到其信号位点, 因此, 其物理定位工作往往无法实现, 这里, 我们可以利用标记或根据小片段的序列开发的特异标记, 筛选文库获得相应的BAC克隆, 利用BAC-FISH技术即可实现这些标记或小片段的间接物理定位了。由此可见, 棉花BAC-FISH技术体系的建立为其核型分析、基因定位及物理图谱构建等分子细胞遗传学研究发展提供新的契机和手段, 也必将推动其获得更加深入的进展。

参 考 文 献

- Pardue M L, Gall J G. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1969, **64** (2): 600~604
- Harper M E, Ullrich A, Saunders G F. Localization of the human insulin gene to the distal end of the short arm of chromosome 11. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78** (7): 4458~4460
- Joos S, Fink T M, Ratsch A, *et al.* Mapping and chromosome analysis: the potential of fluorescence *in situ* hybridization. *Biotechnology*, 1994, **35** (1): 135~153
- Gill B S. Nonisotopic *in situ* hybridization and plant genome mapping: the first 10 years. *Genome*, 1994, **37** (4): 717~725
- Jiang J, Heiskanen M, Peltonen L, *et al.* Visual mapping by high resolution FISH. *Trend in Genetics*, 1996, **12** (10): 379~382
- Dong F, Song J, Naess S K, *et al.* Development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato. *Theor Appl Genet*, 2000, **101** (7): 1001~1007
- Kim J S, Childs K L, Islam-Faridi M N, *et al.* Integrated karyotyping of sorghum by *in situ* hybridization of landed BACs. *Genome*, 2002, **45** (2): 402~412
- Cheng Z, Buell C R, Wing R A, *et al.* Toward a cytological characterization of the rice genome. *Genome Res*, 2001, **11** (12): 2133~2141
- Kim J S, Klein P E, Klein R R, *et al.* Chromosome identification and nomenclature of *Sorghum bicolor*. *Genetics*, 2005, **169** (2): 1169~1173
- Jiang J, Gill B S, Wang G L, *et al.* Metaphase and interphase fluorescence *in situ* hybridization mapping of the rice genome with bacterial artificial chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (10): 4487~4491
- Hanson R E, Zwick M S, Choi S, *et al.* Fluorescent *in situ* hybridization of a bacterial artificial chromosome. *Genome*, 1995, **38** (4): 646~651
- Gomez M I, Isiam-Faridi M N, Woo S S, *et al.* FISH of a maize sh2-selected sorghum BAC to chromosomes of *Sorghum bicolor*. *Genome*, 1997, **40** (4): 475~478
- Yan H M, Song Y C, Li L J, *et al.* Physical location of the rice *Pi-5(t)*, *Gdh* and *RTSV* gene by ISH of BAC clones. *Wuhan Univ J Natur Sci*, 1998, **3** (2): 226~230
- 覃瑞, 魏文辉, 金危危, 等. 水稻 $\chi a-5$ 基因在水稻和玉米中的比较物理定位. *作物学报*, 2001, **27** (3): 367~370
- Qin R, Wei W H, Jin W W, *et al.* *Acta Agronomica Sinica*, 2001, **27** (3): 367~370
- Zhang P, Li W L, Fellers J, *et al.* BAC-FISH in wheat identifies chromosome landmarks consisting of different types of transposable elements. *Chromosoma*, 2004, **112** (6): 288~299
- Lee J A. Cotton as a world crop. In: Kohel R J, Lewis C L, eds. *Cotton. Agronomy Monograph*. Madison: Crop Science Society of America, 1984, **24**: 1~25
- Wang K, Song X L, Han Z G, *et al.* Complete assignment of the chromosomes of *Gossypium hirsutum* L. by translocation and fluorescence *in situ* hybridization mapping. *Theor Appl Genet*, 2006, **113** (1): 73~80
- Wang K, Guo W Z, Zhang T Z. Development of one set of chromosome-specific microsatellite-containing BACs and their physical mapping in *Gossypium hirsutum* L. *Theor Appl Genet*, 2007, **115** (5): 675~682
- Yin J M, Guo W Z, Zhang T Z. Construction of BAC library for 0-613-2R in upland cotton. *J Integr Plant Biol*, 2006, **48** (2): 219~222
- Han Z G, Wang C B, Song X L, *et al.* Characteristics, development and mapping of *G. hirsutum* derived-EST-SSRs in allotetraploid cotton. *Theor Appl Genet*, 2006, **112** (3): 430~439
- 王凯, 张燕洁, 张天真. 一种高通量提取棉花BAC-DNA的方法. *棉花学报*, 2005, **17** (2): 125~126
- Wang K, Zhang Y J, Zhang T Z. *Cotton Science*, 2005, **17** (2): 125~126
- Zwick M S, Hanson R E. A rapid procedure for the isolation of Cot-1 DNA from plants. *Genome*, 1997, **40** (2): 138~142
- 杨国华, 英加, 李滨, 等. 荧光原位杂交技术在植物细胞遗传学和绘制基因图谱中的应用现状与展望. *西北植物学报*, 2002, **22** (2): 421~429
- Yang G H, Ying J, Li B, *et al.* *Acta Botan Boreali-Occiden Sin*, 2002, **22** (2): 421~429
- Baker R J, Longmire J L, Van den Bussche R A. Organization of repetitive elements in the upland cotton genome (*Gossypium hirsutum*). *J Hered*, 1995, **86** (3): 178~185
- Childs K L, Klein R R, Klein P E, *et al.* Mapping genes on an integrated sorghum genetic and physical map using cDNA selection technology. *Plant J*, 2001, **27** (3): 243~255
- Gill K S, Gill B S, Endo T R, *et al.* Identification and high-density mapping of gene-rich regions in chromosome group 1 of wheat.

- Genetics, 1996, **144** (4): 1883~1891
- 27 Broman K W, Murray J C, Sheffield V C, *et al.* Comprehensive human genetic maps: individual and sex-specific variation in recombination. *Am J Hum Genet*, 1998, **63** (3): 861~869
- 28 王春英, 王坤波, 王文奎, 等. 棉花gDNA体细胞染色体FISH技术. *棉花学报*, 1999, **11** (2): 79~83
- Wang C Y, Wang K B, Wang W K, *et al.* *Cotton Science*, 1999, **11** (2): 79~83

Fluorescence *In situ* Hybridization of Bacterial Artificial Chromosome in Cotton*

WANG Kai, ZHANG Yan-Jie, GUAN Bing, GUO Wang-Zhen, ZHANG Tian-Zhen**

(National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract BAC-FISH (bacterial artificial chromosome and fluorescence *in situ* hybridization) is a powerful tool for molecular cytogenetics such as chromosome identification and physical mapping in plant. Due to the large proportion of repetitive sequence occurring in some plant species, especially the polyploidy species, the application of BAC-FISH was hindered severely. Molecular markers from a high-density genetic map of tetraploid cotton were used to screen BAC libraries. Protocols of BAC-FISH in cotton mitotic and meiotic cells were introduced by some modifications such as root tip preparation, slide denaturation and post-hybridization washing according to previous protocols. The dual-color, dual-probe and repeated FISH were also introduced by applying them to physical mapping a random BAC clone on the corresponding chromosome.

Key words cotton, bacterial artificial chromosome (BAC), fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

* This work was supported by a grant from Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University of MOE (IRT0432), China.

**Corresponding author. Tel: 86-25-84395311, E-mail: cotton@njau.edu.cn

Received: March 30, 2007 Accepted: May 8, 2007