

利用細菌人工染色體建構褐色菜鴨基因庫⁽¹⁾

廖仁寶⁽²⁾ 黃文瑛⁽²⁾ 陳美如⁽²⁾ 劉秀洲⁽³⁾ 吳明哲⁽²⁾
程梅萍⁽⁴⁾⁽⁵⁾

收件日期：99 年 8 月 12 日；接受日期：99 年 12 月 16 日

摘要

本研究目的在以大片段 DNA 方式建構褐色菜鴨之基因庫，除可保存珍貴基因外，並可提供後續基因體學研究之用。本研究已確立大分子量 DNA 分離與大片段部分分切 DNA 分離和純化技術平台，並建立以細菌人工染色體建構基因庫的核心技術。以載體 CopyControl pCC1BAC 建構三個褐色菜鴨細菌人工染色體基因庫，經限制酶作用與脈衝式電泳分析後發現，其平均插入片段大小分別為 34.0、48.9 及 144.0 kb。三個基因庫的株系達 134,000 個，總基因體覆蓋率則為 6.69 倍。

關鍵詞：褐色菜鴨、細菌人工染色體基因庫、大分子量 DNA 片段。

緒言

臺灣本地品種褐色菜鴨為世界上具高產蛋性能的水禽之一，褐色菜鴨生產之蛋殼顏色有白、淡藍及青等色。王等（1997）的研究發現，青殼蛋具有以下特性：角皮層質細堅實、海綿層細緻結實、乳頭層有規則、蛋殼膜粘液化纖維緻密交織成網狀、內外膜清澈分明而富韌性，因此，有許多的鴨蛋加工業者較喜以青殼蛋製作成加工蛋，且製成率較高。行政院農業委員會畜產試驗所宜蘭分所將選育完成且經命名登記之褐色菜鴨青殼蛋品系，積極推廣予鴨農飼養，所生產之青殼蛋可做為產品區隔標記，亦可增加鴨蛋產品市場競爭力（劉，2008）。

利用酵母菌人工染色體（yeast artificial chromosome, YAC）選殖載體進行大片段 DNA 的選殖工作始於 1987 年（Burke *et al.*, 1987），YAC 是理想的載體，因為 YAC 攜帶外源 DNA 的最大長度可達 1,000 kb 以上，因此，在此技術發展之後，很多的研究就建構了許多物種的 YAC 基因庫，如

（1）行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1627 號。

（2）行政院農業委員會畜產試驗所遺傳育種組。

（3）行政院農業委員會畜產試驗所宜蘭分所。

（4）行政院農業委員會畜產試驗所經營組。

（5）通訊作者，E-mail:mpcheng@mail.tlri.gov.tw。

豬 (Alexander *et al.*, 1997; Leeb *et al.*, 1995; Rogel-Gaillard *et al.*, 1997)、牛 (Libert *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1996; Takeda *et al.*, 1998)、雞 (Toye *et al.*, 1997) 及作物 (Santra *et al.*, 2003)。但 YAC 也有其缺點，最大的問題是嵌合性 (chimerism)，且酵母菌的操作比大腸桿菌困難且轉形效率低，及至 1990 年初期，另一項建構基因庫的技術細菌人工染色體 (bacterial artificial chromosome, BAC) 被發展出來，BAC 載體所能攜帶外源基因的大小可達 300 kb，且本系統卻無 YAC 系統的缺點，因而 BAC 基因庫逐漸成為主流，便建立了很多的物種之基因庫如雞 (Lee *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003; Zimmer and Verrinder Gibbins, 1997)、豬 (Anderson *et al.*, 2000; Fahrenkrug *et al.*, 2001; Jeon *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2010)、牛 (Buitkamp *et al.*, 2000; Cai *et al.*, 1995; Eggen *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 1999)、山羊 (Schibler *et al.*, 1998) 及植物 (Chalhoub *et al.*, 2004)。

在文獻資料庫 (PubMed) 以 duck 和 bacterial artificial chromosome 或 library 為關鍵字搜尋相關文獻，所得之結果僅兩篇報告與基因庫建構比較相關 (Moon and Magor, 2004; Yuan *et al.*, 2006)，但其所建構的鴨種為北京鴨，以茶鴨為對象而建構基因庫的研究文獻，截至目前為止尚未見得。在臺灣，茶鴨具有產業發展性，而畜產試驗所亦投入了大量的研究人力在茶鴨的相關研究，包括受精持續性、蛋殼強度、青殼蛋性狀選育及微衛星體標記研究，若能結合分子遺傳學和數量遺傳學研究工具，將可有效且快速提昇選育效果。因此，本研究的目的在以大片段 DNA 方式建構茶鴨基因庫，除可保存珍貴基因外，並可提供後續基因體學研究之用包括遺傳圖譜的建立、QTL mapping、定位選殖、結構基因研究、基因保存及基因轉殖 (Heaney *et al.*, 2006) 或治療 (Grimes *et al.*, 2005)。

材料與方法

I. 血液樣品

本研究所使用之褐色茶鴨青殼蛋品系血樣，由畜產試驗所宜蘭分所提供。血樣之採集步驟如下：首先在鴨隻翅靜脈處以酒精消毒，其後以含抗凝血劑 (EDTA) 之採血針筒，進行收集血液樣品約 3 mL，上下混勻以避免凝血，採集完成後，將血樣置於低溫保存盒，並寄送至畜產試驗所總所，進行後續之試驗。

II. 大分子量 DNA 分離技術之建立

依 Ausubel *et al.* (2004) 之操作步驟，將血液樣品稀釋 2 倍後，與等體積之 1% 低熔點瓊脂均勻混合，並分注於膠塊模中，而成為瓊脂膠塊。將 25 個膠塊加入內含 25 mL 紅血球分解溶液 (178 mM NH₄Cl, 3 mM NH₄HCO₃) 之離心管中，在 4℃ 下，以 belly dancer 緩慢搖動作用過夜，去除紅血球分解溶液後，再加入細胞分解溶液 (0.4 M EDTA, pH 8.0, 2 % N-lauroylsarcosine, 2 mg/mL proteinase K) 進行作用，置於 50℃ 水浴中，以 75 rpm 振盪反應 24 小時，再換新的細胞分解溶液並反應 24 小時。將細胞分解溶液小心倒出，以 25 mL 無菌水洗 3 次，再加入 50 mL TE₅₀ 緩衝液 (10 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 8.0)，在 4℃ 下，以 belly dancer 緩慢搖動作用過夜，期間至少更換一次新的緩衝液。為抑制蛋白酶 K，則以含 0.1 mM PMSF 的 TE₅₀ 緩衝液在 4℃ 下緩慢振盪 2 h，共進行 2 次。再以 TE₅₀ 緩衝液在 4℃ 下緩慢振盪過夜，期間至少更換一次新的緩衝液，最後則可將膠塊保存於 0.5 M EDTA 溶液中。為評估以此種方式所萃取的 DNA 大小，則可將欲評估之膠塊置入 0.5 X TBE 緩衝液 (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA, pH 8.0) 進行透析，並將瓊脂膠塊埋入於瓊脂膠片中，以脈衝式電泳 (pulsed field gel electrophoresis, PFGE) 方式 (6.0 V/cm, pulse time: 1s to 25s, 24 h, 8℃) 將大分子 DNA 分離出來，再將瓊脂膠片置於溴化乙錠溶液染色 20 min 後，置於

紫外燈箱下呈相，觀察主要 DNA 片段的長度應該至少要在 600 kb 以上，而分子量小的 DNA 片段應該越少越好。

III. 大片段部分分切 DNA 分離、純化技術之建立

將已完成 DNA 萃取之膠塊，利用 *in gel digestion* 的方式，使用 *HindIII* 限制酶進行分切，並找到最佳之作用條件。本研究加入的 *HindIII* 限制酶活性單位分別為 0, 2, 5, 10, 20, 50，而作用時間則設定為 20 min，最後以脈衝式電泳分析分離，電泳成像後以求得最佳之作用條件。其後以限制酶最佳作用條件製作大量部分分切的膠塊樣品，將樣品經脈衝式電泳分離後（6.0 V/cm, pulse time: 0.1 s to 40 s, 16 h, 14°C），先將大小標記染色成像，並以此推估瓊脂膠片之相對應位置，將分子量大於 100 kb 的樣品每隔 0.5 cm 切成一條膠條，並分別放入個別內含 TE₅₀ 緩衝液之離心管中以做為長期保存用，或放入內含 0.5X TBE 緩衝液之透析袋中，以電溶離（*electroelution*）方式回收大片段分切之 DNA（6.0 V/cm, pulse time: 0.1s to 40 s, 20 h, 14°C），再以 TE（10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0）緩衝液進行透析，以去除硼離子避免干擾接合反應。

BAC 基因庫之建構與保存

- (i) 接合反應：將大片段分切之 DNA 接合 BAC 載體（pCC1BAC *HindIII* cloning-ready, Epicentre），接合反應溶液總體積為 100 μ L 包括 25 ng 載體、500 ng insert DNA（大片段 DNA）、10 μ L 10 X ligase buffer、1 μ L ATP、2 μ L T4 DNA ligase（2 U）及水。小心混合後放在 16°C 下作用過夜，作用完成後，於 65°C 下加熱 20 分鐘，以去除 ligase 活性。將接合反應溶液去鹽及濃縮，取一部分進行電轉形，剩餘部分放在 4°C 冷藏櫃中，可存放 10 天。
- (ii) 電轉形：以寬口滴管尖取 1.5 μ L 接合反應溶液加入 25 μ L 勝任細胞（TransforMax™ EPI300™ Electrocompetent *E. coli*, Epicentre）中，小心混勻，並置放於冰上，5 min 後將此溶液移入已預冷之 0.1 cm electroporation cuvette 中，並將 cuvette 放在電轉形儀器（EQU BIO, EasyjecT PLUS）操作室中，電轉形條件為 1.25 kV, 25 F, 99 Ohms, time constant 為 2.47 msec。電轉形後馬上加入 1 mL 的 SOC 培養基，放在 37°C 培養箱中，以 150 rpm 振盪培養 1 h，取出菌液塗在方形平板（22.5 X 22.5 cm, Genetix）上，放在 37°C 培養箱培養過夜。
- (iii) 選殖株挑選：將過夜培養後之培養盤，以菌落挑選機（QpixII, Genetix）將白色菌落挑選於 384 孔盤中，經過夜培養後添加含甘油（最終濃度為 10%）之培養液，混勻後即可存放於 -80°C 冷凍庫中。
- (iv) BAC 株系的分析：隨機挑選 18 株白色菌落接到 3 mL 含有 12.5 mg/mL chloramphenicol 的 LB broth 之試管中，在 37°C 培養箱中，以 150 rpm 振盪培養過夜，再將已培養之菌液 300 μ L 接種至新的含抗生素與誘導液培養基之試管中，再培養 5 h，其後將個別菌液裝入於微量離心管中，以 13,000 rpm 離心 2 min，加入 200 μ L 的 solution I（50 mM glucose; 25 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA, pH 8.0）將菌體打散，再加入 200 μ L 的 solution II（0.2 N NaOH; 1% SDS），小心上下混合 5 次，放在室溫靜置 5 min，其後再加入 200 μ L 的 solution III（60 mL 5 M potassium acetate, 11.5 mL glacial acetic acid, 28.5 mL water），小心上下混合 5 次，放在冰浴靜置 5 min。以 13,000 rpm、4°C 離心 15 min，取出上清液到新的微量離心管中。加入 0.6 倍體積的異丙醇，在 4°C 下以 13,000 rpm 離心 15 min 以沉澱 DNA，倒去上清液，加入 0.5 mL 冰的 70% 乙醇，離心 5min。倒去上清液後，微量離心管倒放以令樣品風乾，之後加入 100 μ L 的 TE 緩衝液以溶解 DNA，並測定其濃度。取 2 μ L 的 DNA 溶液以 *NorI* 限制酶進行分切反應，並以脈衝式電泳分離（6.0 V/cm, pulse time: 5 s to 15 s, 14 h,

8°C)，以分析株系中插入片段之大小。

結果與討論

I. 大分子量 DNA 片段的製備

利用瓊脂膠塊包埋茶鴨血液樣品以萃取大分子量 DNA 的方式，所得到的 DNA 確屬大分子量，經過脈衝式電泳分析得知膠塊中的主要 DNA 片段長度在 1 Mb 以上（圖 1），可以繼續進行限制酶部分分切的步驟，以進行基因庫的建構。

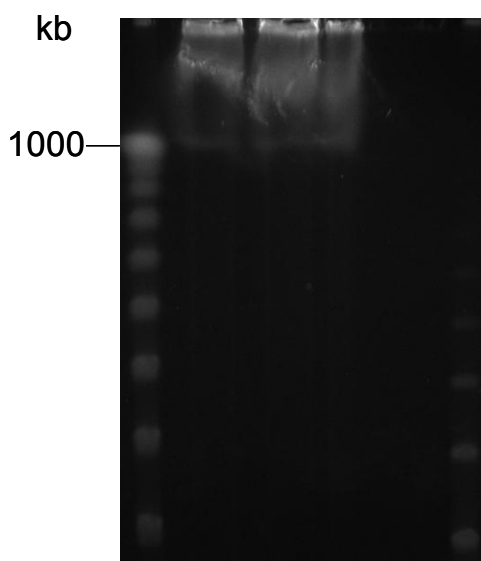


圖 1. 褐色茶鴨血液經瓊脂膠塊埋法所萃取之基因組 DNA。

Fig. 1. The genomic DNA extracted from Brown Tsaiya duck blood by agarose plug embedding method.

II. 大片段部分分切 DNA 分離與純化

先將整片膠塊以不同活性的限制酶 *Hind*III 進行分切反應，經過脈衝電泳分析，找出限制酶分切片段長度主要在 150-600 kb 部分之最佳條件（圖 2），最後挑選 5 units 為大量分切的限制酶活性濃度。將 12 片膠塊各分成一半，以進行大量的限制酶分切作用，將部分分切的膠塊進行脈衝式電泳分離後，回收 150-600 kb 的膠片，每隔 0.5 cm 切成一條，進行電溶離以回收部分分切之 DNA。部分分切之 DNA 經過去鹽及濃縮後，以超微量核酸光譜儀測定其濃度。再將所有經過濃縮與純化的部分分切 DNA 進行脈衝式電泳分析，結果以位於最大片段區所回收的部分，相對的其屬大片段的 DNA 較多，但亦有小於 100 kb 之小片段 DNA，因此，就利用此部分分切 DNA 建構基因庫。第二次建構基因庫時，亦直接利用從最大片段區回收之部分分切 DNA。在第三次建構茶鴨 BAC 基因庫時，則將切割下來的膠體進行第二次的 PFGE，用以將夾雜於大片段 DNA 的小片段 DNA 移除，電泳分離後回收上段膠體，並進行電溶離以取得部分分切之 DNA。

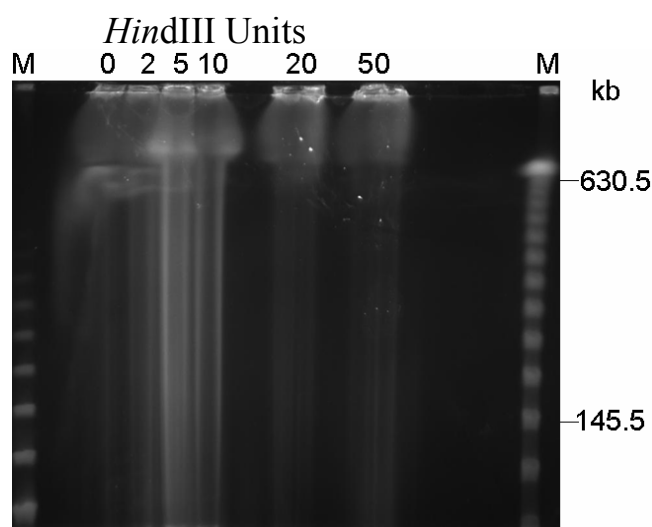


圖 2. 褐色菜鴨基因組 DNA 以 *HindIII* 限制酶部分分切試驗。*HindIII* 限制酶與整片膠塊之 DNA 在 37°C 水浴中作用 20 min。

Fig. 2. Partial digestion of Brown Tsaiya duck genomic DNA by endonuclease *HindIII*. The whole plug embedding DNA was digested with *HindIII* at 37°C in the water bath for 20 min.

III. BAC 基因庫之品質分析

自第一次所製作的菜鴨 BAC 基因庫中，逢機挑選 18 個株系培養後萃取其重組質體，經限制酶 *NotI* 作用與脈衝式電泳分析後，可得知其平均插入片段 DNA 長度，約為 34.0 kb，最長的片段約為 100 kb，最短者則低為約 8 kb，因而造成整體基因庫的平均插入片段較小，所挑選而保存的總株系數目為 60,926 個，由此估算基因庫的覆蓋率則為 1.73 倍。在第二次所製作的菜鴨 BAC 基因庫中，再逢機挑選 18 個株系，經限制酶 *NotI* 作用與脈衝式電泳分析後，可得知其平均插入片段 DNA 長度約為 48.9 kb，且插入片段大小比較平均，保存總株系數目為 48,175 個，估算基因庫的覆蓋率則為 1.96 倍，累計兩次所建構之基因庫其總覆蓋率則為 3.69 倍。在第三次所製作的菜鴨 BAC 基因庫中，逢機挑選 16 個株系，將所分離出來的重組質體經限制酶 *NotI* 作用與脈衝式電泳分析後，可得知其平均插入片段 DNA 長度約為 144.0 kb（圖 3），最長的片段約為 180 kb，最短者則約為 81.5 kb，保存總株系數目為 25,000 個，估算基因庫的覆蓋率則為 3.00 倍。此結果比前二次所建構的菜鴨 BAC 基因庫的平均插入片段 34.0 kb 與 48.9 kb 更佳，一般而言，以 BAC 載體所建構之基因庫，其能攜帶之插入片段最大可達 300 kb，而第三次所建構的菜鴨 BAC 基因庫平均插入片段（144.0 kb）大於前二次所建構的菜鴨 BAC 基因庫平均插入片段（34.0 kb 與 48.9 kb），其最大的原因為將糾結在一起的短小片段與較大大片段，在進行第二次的電泳分離時，能夠較有效的將兩者分開。因此，在菜鴨 BAC 基因庫的建構中，累計三次之基因庫其總覆蓋率則為 6.69 倍。Moon and Magor (2004) 以 fosmid 載體系統建構北京鴨基因庫，所得之平均長度為 38 kb，基因庫覆蓋率為 4.7 倍，而 Yuan *et al.* (2006) 以 BAC 載體系統建構北京鴨基因庫，其平均長度為 117.94 kb，基因庫覆蓋率為 9.84 倍。本研究結果與前兩研究相較顯示，第三次所建構之基因庫其平均插入片段 DNA 長度已經可達到 100 kb 以上，一般而言，插入片段 DNA 長度愈長，則所需保存的株系數目將可減少，利用性亦較佳。

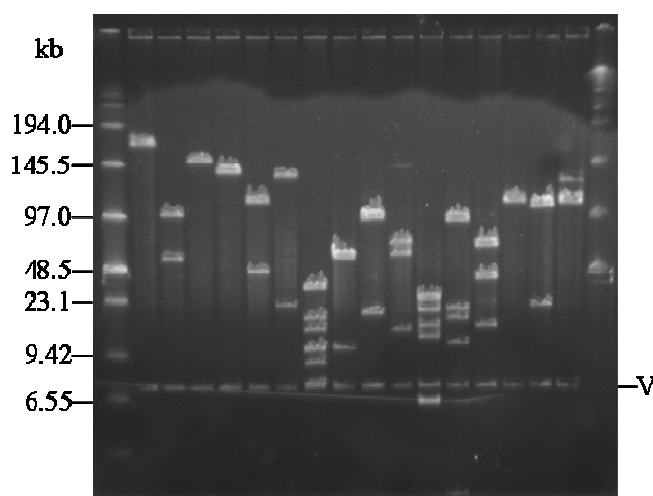


圖 3. 第三次建構之褐色茶鴨 BAC 基因庫株系抽出重組質體 DNA 的 *NotI* 分切圖。V 代表 BAC 載體。

Fig. 3. The insert size analysis of Brown Tsaiya duck BAC library constructed for the third time. Each of the recombinant plasmids of clones was digested with an endonuclease *NotI*. The “V” indicates BAC vector.

結論

本研究已確立茶鴨血液大分子量 DNA 分離與大片段部分分切 DNA 分離和純化技術平台，並建立以 BAC 建構基因庫的核心技術，往後將可據此技術建立品質優良的畜禽基因庫，以供未來相關研究之用如基因保存、基因圖譜建立、QTL mapping、基因定位選殖等。

參考文獻

- 王政騰、萬添春、潘金木、鄭永祥。1997。褐色茶鴨青白殼蛋之理化性狀及鹼化過程比較。中國農業化學會誌 35：263-272。
- 劉秀洲。2008。褐色茶鴨之選育、應用與展望。pp. 17-1~17-12。行政院農業委員會畜產試驗所五十週年所慶學術研討會專輯《遺傳育種》。
- Alexander, L. J., T. P. Smith, C. W. Beattie and M. F. Broom. 1997. Construction and characterization of a large insert porcine YAC library. *Mamm. Genome* 8: 50-51.
- Anderson, S. I., N. L. Lopez-Corrales, B. Gorick and A. L. Archibald. 2000. A large-fragment porcine genomic library resource in a BAC vector. *Mamm. Genome* 11: 811-814.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith and K. Struhl. 2004. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley and Sons, New York, NY.
- Buitkamp, J., S. Kollers, G. Durstewitz, K. Welzel, K. Schäfer, A. Kellermann, H. Lehrach and R. Fries. 2000. Construction and characterization of a gridded cattle BAC library. *Anim. Genet.* 31:

- 347–351.
- Burke, D. T., G. F. Carle and M. V. Olson. 1987. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* 236: 806–812.
- Cai, L., J. F. Taylor, R. A. Wing, D. S. Gallagher, S. S. Woo and S. K. Davis. 1995. Construction and characterization of a bovine bacterial artificial chromosome library. *Genomics* 29: 413–425.
- Chalhoub, B., H. Belcram and M. Caboche. 2004. Efficient cloning of plant genomes into bacterial artificial chromosome (BAC) libraries with larger and more uniform insert size. *Plant Biotechnol. J.* 2: 181–188.
- Eggen, A., M. Gautier, A. Billaut, E. Petit, H. Hayes, P. Laurent, C. Urban, M. Pfister-Genskow, K. Eilertsen and M. D. Bishop. 2001. Construction and characterization of a bovine BAC library with four genome-equivalent coverage. *Genet. Sel. Evol.* 33: 543–548.
- Fahrenkrug, S. C., G. A. Rohrer, B. A. Freking, T. P. Smith, K. Osoegawa, C. L. Shu, J. J. Catanese and P. J. de Jong. 2001. A porcine BAC library with tenfold genome coverage: a resource for physical and genetic map integration. *Mamm. Genome* 12: 472–474.
- Grimes, B. R. and Z. L. Monaco. 2005. Artificial and engineered chromosomes: developments and prospects for gene therapy. *Chromosoma* 114: 230–241.
- Heaney, J. D. and S. K. Bronson. 2006. Artificial chromosome-based transgenes in the study of genome function. *Mamm. Genome* 17: 791–807.
- Jeon, J. T., E. W. Park, H. J. Jeon, T. H. Kim, K. T. Lee and I. C. Cheong. 2003. A large-insert porcine library with sevenfold genome coverage: a tool for positional cloning of candidate genes for major quantitative traits. *Mol. Cells* 16: 113–116.
- Lee, M. K., C. W. Ren, B. Yan, B. Cox, H. B. Zhang, M. N. Romanov, F. G. Sizemore, S. P. Suchyta, E. Peters and J. B. Dodgson. 2003. Construction and characterization of three BAC libraries for analysis of the chicken genome. *Anim. Genet.* 34: 151–152.
- Leeb, T., G. Rettenberger, H. Hameister, G. Brem and B. Brenig. 1995. Construction of a porcine YAC library and mapping of the cardiac muscle ryanodine receptor gene to chromosome 14q22-q23. *Mamm. Genome* 6: 37–41.
- Libert, F., A. Lefort, R. Okimoto, J. Womack and M. Georges. 1993. Construction of a bovine genomic library of large yeast artificial chromosome clones. *Genomics* 18: 270–276.
- Liu, L., J. Yin, W. Li, K. Liu, Y. Peng, P. Tan and R. Z. Ma. 2010. Construction of a bacterial artificial chromosome library for the Rongchang pig breed and its use for the identification of genes involved in intramuscular fat deposition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391: 1280–1284.
- Liu, W., Z. Liu, X. Hu, Y. Zhang, J. Yuan, R. Zhao, Z. Li, W. Xu, Y. Gao, X. Deng and N. Li. 2003. Construction and characterization of a novel 13.34-fold chicken bacterial artificial chromosome library. *Anim. Biotechnol.* 14: 145–153.
- Moon, D. A. and K. E. Magor. 2004. Construction and characterization of a fosmid library for comparative analysis of the duck genome. *Anim. Genet.* 35: 408–423.
- Rogel-Gaillard, C., N. Bourgeaux, J. C. Save, C. Renard, P. Coullin, P. Pinton, M. Yerle, M. Vaiman and P. Chardon. 1997. Construction of a swine YAC library allowing an efficient recovery of unique and centromeric repeated sequences. *Mamm. Genome* 8: 186–192.
- Santra, D. K., D. Sandhu, T. Tai and M. K. Bhattacharyya. 2003. Construction and characterization of a

- soybean yeast artificial chromosome library and identification of clones for the Rps6 region. *Funct. Integr. Genomics*. 3: 153–159.
- Schibler, L., D. Vaiman, A. Oustry, N. Guinec, A. L. Dangy-Caye, A. Billault and E. P. Cribiu. 1998. Construction and extensive characterization of a goat bacterial artificial chromosome library with threefold genome coverage. *Mamm. Genome* 9: 119–124.
- Smith, T. P., L. J. Alexander, T. S. Sonstegard, J. Yoo, C. W. Beattie and M. F. Broom. 1996. Construction and characterization of a large insert bovine YAC library with five-fold genomic coverage. *Mamm. Genome* 7: 155–156.
- Suzuki, K., S. Asakawa, M. Iida, S. Shimanuki, N. Fujishima, H. Hiraiwa, Y. Murakami, N. Shimizu and H. Yasue. 2000. Construction and evaluation of a porcine bacterial artificial chromosome library. *Anim. Genet.* 31: 8–12.
- Takeda, H., H. Yamakuchi, N. Ihara, K. Hara, T. Watanabe, Y. Sugimoto, T. Oshiro, H. Kishine, Y. Kano and K. Kohno. 1998. Construction of a bovine yeast artificial chromosome (YAC) library. *Anim. Genet.* 29: 216–219.
- Toye, A. A., L. Schalkwyk, H. Lehrach and N. Bumstead. 1997. A yeast artificial chromosome (YAC) library containing 10 haploid chicken genome equivalents. *Mamm. Genome* 8: 274–276.
- Yuan, X., M. Zhang, W. Ruan, C. Song, L. Ren, Y. Guo, X. Hu and N. Li. 2006. Construction and characterization of a duck bacterial artificial chromosome library. *Anim. Genet.* 37: 599–600.
- Zhu, B., J. A. Smith, S. M. Tracey, B. A. Konfortov, K. Welzel, L. C. Schalkwyk, H. Lehrach, S. Kollers, J. Masabanda, J. Buitkamp, R. Fries, J. L. Williams and J. R. Miller. 1999. A 5x genome coverage bovine BAC library: production, characterization, and distribution. *Mamm. Genome* 10: 706–709.
- Zimmer, R. and A. M. Verrinder Gibbins. 1997. Construction and characterization of a large-fragment chicken bacterial artificial chromosome library. *Genomics* 42: 217–226.

Construction of bacterial artificial chromosome libraries of Brown Tsaiya ducks ⁽¹⁾

Ren-Bao Liaw⁽²⁾ Wen-Ying Huang⁽²⁾ Mei-Ru Chen⁽²⁾
Hsiu-Chou Liu⁽³⁾ Ming-Che Wu⁽²⁾ and Mei-Ping Cheng⁽⁴⁾⁽⁵⁾

Received: Aug. 12, 2010; Accepted: Dec. 16, 2010

Abstract

The purpose of this study was to construct large-insert libraries of Brown Tsaiya ducks to preserve their valuable genes and to be applied for the future genomic studies. In this study, the platform of high-molecular-weight DNA fragments separation and separation and purification of large partially digested DNA from a Brown Tsaiya duck were established. In addition, the core technology of bacterial artificial chromosome (BAC) library construction was set up. Three BAC libraries were constructed in the vector CopyControl pCC1BAC. Based on the analyses of restriction reaction and PFGE, the average insert size of the three BAC libraries was 34.0, 48.9 and 144.0 kb, respectively. A total of 134,000 clones preserved accounted for 6.69-fold genome coverage of Brown Tsaiya duck.

Keywords: Brown Tsaiya duck, Bacterial artificial chromosome library, High-molecular-weight DNA fragments

(1) Contribution No. 1627 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Animal Breeding Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan, 71246, Taiwan, R.O.C

(3) Ilan Branch, COA-LRI, Ilan, 26846, Taiwan, R.O.C

(4) Animal Management Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan, 71246, Taiwan, R.O.C.

(5) Corresponding author, E-mail: mpcheng@mail.tlri.gov.tw

