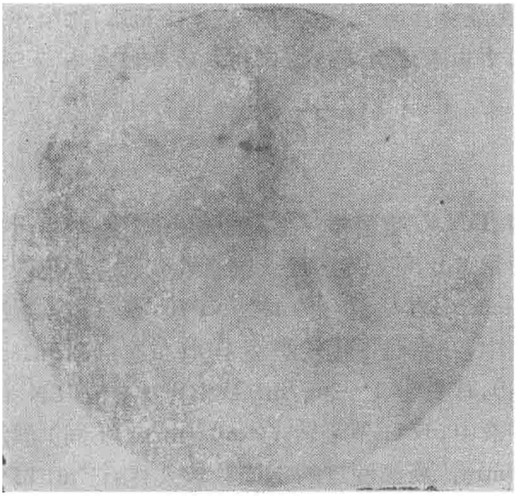


图 1　用抗体探针从原始文库平板上筛选出的融合蛋白质-抗体蛋白质原位杂交信号(箭头所示)

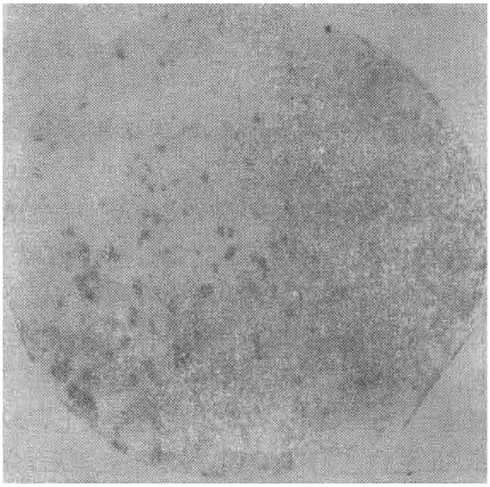


图 2　阳性噬菌斑经两次纯化、扩增后，用抗体探针筛选出的融合蛋白质-抗体蛋白质原位杂交信号

参 考 文 献

1 Young R A *et al. Proc Natl Acad Sci*. USA, 1983; 80: 1194

2 Young R A *et al. Science*, 1983; 222:778

3 Mierendorf R C *et al. Methods in Enzymology*, 1987; 152:458

4 沈正达，甘肃农大学报，1987; 1: 1

5 沈正达，陈书琨，胡永浩，王　蒲，中国兽医科技，1991; 21(11): 43

油菜叶绿体 4.5S rRNA 与高粱 ctDNA 杂交及作为探针的应用

周　强　韩晓光　许卫东　蒋五玲　程振起*

(清华大学生物科学与技术系，北京 100084)

李御宇　赵微平

(北京师范学院生物系，北京 100037)

提　要

提取纯化了油菜叶绿体核糖体 4.5S RNA (4.5S rRNA) 并在其 5′ 端标记 ^{32}P，作为探针与高粱叶绿体 DNA (ctDNA) 进行分子杂交。结果证明油菜 4.5Sr RNA 可作为公用探针，对一般植物，特别是高等植物进行分子杂交研究。杂交的结果得到两条带。

关键词　分子杂交，4.5S rRNA，ctDNA

4.5 S rRNA 是高等植物叶绿体核糖体上的独有成分，一般组成为 80—106 个核苷酸之间，5′ 端为游离羟基，且其中不含稀有碱基，它在叶绿体蛋白质合成过程中起重要作用[1]。

* 联系人：程振起

收稿日期：1991-06-12　修回日期：1991-08-11

近年来,通过对一些植物 4.5S rRNA 的序列分析,发现它们存在很大的同源部分,根据目前所测定的植物 4.5S rRNA 序列数据得知除禾本科植物 4.5 S rRNA 序列中有 7 个核苷酸缺失造成序列同源性下降至 85% 外,序列同源性均在 95% 以上[2-4].这对于研究叶绿体的起源、进化以及在分子水平上讨论演化和分类均有重要意义.

我们选择油菜 4.5 S rRNA 作为探针,对亲缘关系较远的高粱 ctDNA 谱带进行了分子杂交,确定了高粱叶绿体 ctDNA 中 4.5SrRNA (的)基因的位置.

1 材料与方法

1.1 材料

油菜购于农贸市场,高粱为产自内蒙古的秋冀五号.

尼龙膜 (Bio-Rad),琼脂糖 (生物物理所中生公司),[γ-^{32}P]ATP (10 μCi/μl) (北京福瑞生物工程公司),T_4 多核苷酸激酶、限制性内切酶 BamHI、PstI (华美生物工程公司),蛋白酶 K,PolyA,Sepharose 4B (Boehringer Mannheim),丙烯酰胺 (Serva),甲叉双丙烯酰胺(红星生化厂).

1.2 方法

1.2.1 4.5S rRNA 提取纯化 采用一步匀浆热酚法,直接从植物全叶中提取混合小分子 RNA,经 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离纯化,切下 4.5S 带浸泡回收,乙醇沉淀,可得到 4.5S rRNA[5].

1.2.2 4.5S rRNA5′ 端标记 基本按 Alessio 的方法进行[6],标记后的 4.5 S rRNA 经 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离纯化,并回收备用.

1.2.3 高粱 ctDNA 的提取 参照 Bookjans 的方法进行[7].

1.2.4 高粱 ctDNA 的内切酶降解与电泳分离 分别用 PstI、BamHI 降解 ctDNA,降解产物用 0.8% 琼脂糖电泳分离[8].

1.2.5 分子杂交 参照 Southern 的方法进行[9].

2 结果和讨论

2.1 4.5S rRNA 纯化及 ^{32}P 标记探针的制备

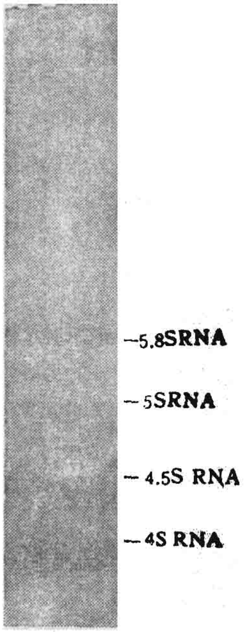


图 1 油菜叶小分子 RNA 的 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳图
制胶缓冲液为 90mmol/L Tris-硼酸,1mmol/L EDTA (pH8.3),7mol/L 脲. 电泳缓冲液除无脲外,与制胶缓冲液相同. 电压 500V,电流 20mA,时间 5h

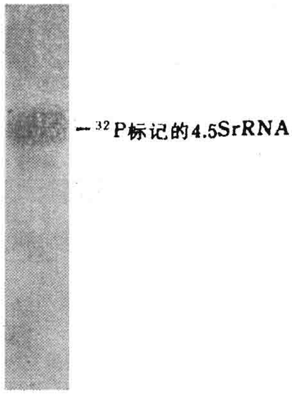


图 2 5′ 端 ^{32}P 标记的 4.5 S rRNA 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离图
电泳条件同图 1,放射自显影 5min

由于细胞中与 4.5S 大小相似的 RNA 分子仅 4.5S rRNA 一种,所以,我们采用一步匀浆热酚法,提取全部小分子 RNA,然后用聚丙

烯酰胺凝胶电泳分离，纯化 4.5S rRNA，而不会发生 4.5S rRNA 与别的小分子 RNA 相混杂的情况．图 1 是分离纯化的油菜小分子 rRNA 的结果．4.5S rRNA 处出现二条带是由于相同序列而不同构象造成(具体数据省略)．

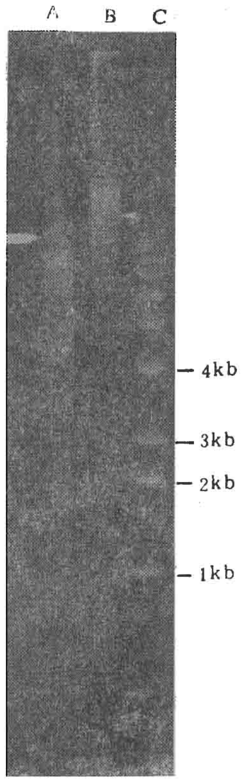


图 3　高粱 ctDNA 酶切后，0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离图

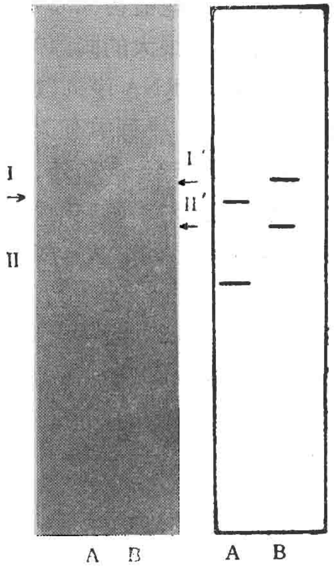
酶切：A. Bam HI, B. PstI, C. DNA 分子量标准 (1kb 阶梯)

箭头所指为 ^{32}P 标记的4.5S rRNA 探针杂交的相应谱带

天然植物叶绿体 4.5 S rRNA 的 5′端未经磷酸化，而具有游离羟基的特点，使 5′端 ^{32}P 标记可以直接进行．标记的结果在图 2 中显示，其中主带为 4.5 S rRNA，其下的几条小带是由于 T_4 多核苷酸激酶中所含少量 RNA 酶降解所至．回收主带，比强为 3×10^5cpm/μg．

2.2　分子杂交

图 3 A 和 B 分别是高粱 ctDNA 的



(b)

图 4　^{32}P 标记的油菜叶绿体 4.5S rRNA 与高粱 ctDNA 谱带杂交图

预杂交在 42℃，12h；杂交在 42℃，24h；洗涤于 55℃，15min 2 次．放射自显影 36h

A 为 BamHI 酶切，B 为 PstI 酶切

I(9.5kb) 和 II(4.8kb)；I′(14kb) 和 II′(6.5kb) 分别表示杂交谱带

BamHI 及 PotI 酶切图谱． C是标准分子量指示，显出相应的酶切片段的大小．

以油菜 4.5S rRNA 为探针与高粱 ctDNA 杂交后的放射自显影图谱如图 4 所示． A 为 BamHI 酶切片段杂交结果，两条带分别为 9.5kb (上)和 4.8kb (下)；B 为 PstI 的结果，两条带分别为 14kb (上)和 6.5kb (下)．

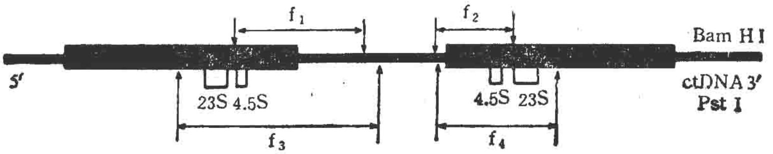


图 5　高粱 ctDNA 部分酶切图谱

二条粗黑线是 ctDNA 的二个反向重复序列．f_1 和 f_2 代表 4.5S rRNA 探针杂交的 BamHI 酶切片段(见图 4)．f_3 和 f_4 代表 4.5S rRNA 探针杂交的 PstI 酶切片段(见图 4)

23S 和 4.5S 代表 23S rRNA 和 4.5S rRNA 基因的位置

在我们以前的工作中也曾得到两条带的杂交结果． 当时认为是由于内切酶的作用，得到两条分别含有 4.5S 和 23S 基因的带，而 23S 5′端与 4.5S 3′端又有互补的区段所致． 由分析水稻的 BamHI 及 PstI 的酶切图谱，可知这两个酶在两段重复序列中均有一个或一个以上的切点，彼此是对称的；我们给出了高粱 ctDNA BamHI 及 PstI 部分酶切图谱示意图（图 5），

它能很好地解释实验结果。

2.3 叶绿体 4.5 S rRNA 作为公用探针的优点及意义

叶绿体 4.5 S rRNA 由于其自身特点而非常适合于用做探针。a. 它一般由 100 个左右核苷酸组成，分子量约为 33kD。这样大小的核苷酸片段正好适合于作为探针。片段过大难于分离纯化，片段过小者则由于能与模板 DNA 互补配对的部分太短而使结合不稳定。b. 4.5S rRNA 的分离纯化步骤简便易行，不会被植物细胞中其它 RNA 成分污染，所得 RNA 纯度较高。c. 天然植物 4.5S rRNA 与植物中其它 RNA 分子相比，显著特点是其 5′ 端未经磷酸化，即无需脱磷反应，易于直接进行 4.5S rRNA 5′ 端 ^{32}P 标记。植物核酸序列在进行过程中保守性很大。目前所测定的 4.5S rRNA 序列同源性一般说来均在 95% 以上，也就是说植物叶绿体 4.5S rRNA 的基因序列相似性在 95% 以上，一般认为核酸序列有 50% 同源性即可做为杂交探针，所以任何一种植物的 4.5S rRNA 均可做为其它植物 4.5 S rRNA 基因的探针与之进行分子杂交。

选用的油菜属于双子叶纲，而高粱属于单子叶纲，两者亲缘关系很远。杂交的成功，更进一步证明 4.5S rRNA 可以作为公用探针使用，同时也说明其序列同源性很大，在进化过程中保守性很强。

以上结果表明，从某种植物来源的 4.5 S rRNA 可以用作多种植物叶绿体基因组研究的公用探针。这具备两方面的意义：a. 在研究某些比较珍贵或稀有的植物叶绿体基因组时，可以用其它容易获得的植物来制备 4.5 S rRNA 作为探针；b. 用某种植物的 4.5S rRNA 为探针，可以解决某些植物，特别是介于低等和高等植物边缘的植物叶绿体 DNA 上是否有 4.5 S rRNA 基因存在的问题。而且根据不同植物中 4.5S rRNA 序列同源性的大小比较可以对植物进行分类学上的研究。

参 考 文 献

1 Takaiwa F, Sugiura M. *Nucleic Acids Res*, 1980; 8 (18): 4125
2 Cheng Zhenqi, Xiao Xiao, Wang E-sheng. *Biochim Biophys Acta*, 1986; 866(1): 89
3 Cheng Zhenqi, Zhang Hong, Li Guoya. *FEBS Lett*, 1986; 200(1): 193
4 张 虹，程振起，李 沥. 遗传学报，1986;13(6): 411
5 谷丽雅等，生物化学杂志，1985;1(5,6): 97
6 Alessio D J M. In: Ricrwood D. eds, *RNA sequencing. Gel Electrophoresis of Nucleic Acid*, Oxford: IRL Press, 1982: 176—182
7 Bookjans G *et al*. *Anal Biochem*, 1984; 141(1): 244
8 Maniatis *et al*. *Molecular cloning*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982: 150—161
9 Southern E M *J Mol Biol*. 1975; 98: 508

水稻叶片蛋白质快速双向电泳分析的新方法

刘立军　薛光行

（中国农业科学院作物育种栽培研究所，北京 100081）

提　要

介绍了利用 PhastSystem 全自动快速电泳仪进行水稻叶片蛋白质双向电泳的方法。此方法具有快速（电泳全过程仅需 3.5 h），操作简单和成本低廉的特点，同时具有良好的重复性和高分辨率。

关键词 叶片蛋白，PhastSystem 电泳仪，双向电泳

目前国内外已有不少分析植物叶片蛋白的双向电泳方法[1-5]，但它们普遍存在耗时长、操作复杂、成本较高等问题。利用瑞典 Pharmacia 公司全自动快速电泳仪 PhastSystem 可将蛋白质电泳的效率和重复性大大提高[6,7]。已有用它从事微生物蛋白质双向电泳分析的报道[8,9]，但

收稿日期：1991-06-17　修回日期：1991-10-31