

水稻叶绿体基因文库的构建和 rps14 基因的分离

曹凯鸣 李碧羽 詹树萱 孙崇荣

(复旦大学生物化学系,复旦大学分析测试中心,上海)

提 要

水稻(珍汕97B)叶绿体 DNA 经 Sau3A 部分水解并从低熔点琼脂糖凝胶中回收出 12—23kb 大小的片段。得到的片段与 λ 噬菌体置换型载体 EMBL3 DNA 重组,采用体外包装系统构建了水稻叶绿体的基因文库。通过与探针的分子杂交,从文库中分离出含编码叶绿体核糖体小亚基蛋白质 S14 的基因(rps14)的克隆。

水稻是我国及亚洲地区的主要粮食作物,叶绿体是营光合作用的重要细胞器。为了期望将来能在分子水平上培育高光合效率、高品质的水稻品种,必须了解水稻叶绿体基因组的结构和功能特性。日本平井等人^[1]已着手于水稻叶绿体 DNA(ctDNA)的基础研究,初步完成了 ctDNA 物理图谱的构建,并估计其大小约为 130kb,另外,在基因克隆方面,近年来 Frischanf 等人^[2]应用 λ 噬菌体构建了 EMBL 系列载体。由于 λ 载体系统比质粒系统克隆效率高,允许插入的片段长,所以本文应用 EMBL3 作载体,建立了水稻(珍汕97B)叶绿体基因文库,为进一步筛选叶绿体基因及其结构分析创造了条件。我们已从中分离出为叶绿体核糖体小亚基蛋白质 S14 编码的基因(rps14)的克隆。

材 料 和 方 法

1. 载体 DNA 制备

参照 Silhavy 等人^[3]的方法,将 37℃ 振荡培养的 5 毫升 K802 菌液($A_{600} = 0.5-0.6$)与 0.15 毫升 EMBL3 噬菌体溶液(滴度为 10^{12})混合,37℃ 保温 5 分钟后转入 250 毫升 LB 液体培养基内,37℃ 振荡培养 5—6 小时后寄主菌裂解。加入 DNaseI 和 RNaseA (终浓度 3

微克/毫升),37℃ 处理 15 分钟,7000rpm 离心除去菌体碎片。上清内加 NaCl 和 PEG6000,使终浓度分别为 0.5mol/L 和 10%,冰浴放置 1 小时后,7000rpm 离心 15 分钟,取噬菌体-PEG 沉淀悬于 2 毫升 TM (10mmol/L $MgSO_4$, 50mmol/L Tris-HCl, pH7.8) 中,并以等体积氯仿抽提两次,上层水相即为高效价的 EMBL3 噬菌体粗制品。将其铺于预先制备的 3 毫升 40% 甘油/TM 和 4 毫升 5% 甘油/TM 梯度上,40000rpm 离心 1 小时,沉淀为纯化的噬菌体。该噬菌体再悬于 100 微升 TM,经与 DNaseI (终浓度为 5 微克/毫升)和 RNaseA (终浓度为 4 微克/毫升) 37℃ 保温 30 分钟后再加 EDTA, pH8.0 (终浓度 20mmol/L), 20% SDS (终浓度 0.5%) 和蛋白酶 K (终浓度 50 微克/毫升) 65℃ 保温 1 小时,使噬菌体裂解。接着以等体积 TE 饱和酚、酚/氯仿 (1:1 V/V) 和氯仿各处理一次,上清液 4℃ 下对 TE 透析过夜。酒精沉淀得到的 EMBL3 DNA 溶于适量 TE 缓冲液中,经 BamHI* 和 EcoRI 完全酶解即获供重组用的左右两臂 (19.3kb 和 9.2kb) 和可被取代的中间片段 (13.7kb)。

* 本工作中所用限制性内切酶 BamHI、SalI、Sau3A、PstI 和 T4DNA 连接酶, DNA poll 均为日本宝酒产品。

2. ctDNA 部分酶解和 12—23kb 片段的回收

水稻 (*Oryza Sativa* subsp *Indica* Zhen Shan 97B) 叶绿体 DNA 基本参照 Salts 和 Beckman 方法^[4]制备。每微克 ctDNA 加 0.5 单位 *Sau3A*, 于 37℃ 水解 15 分钟, 经 0.6% 低熔点琼脂糖 (BRL 产品) 凝胶电泳分离, 回收 12—23kb 的片段。

3. 包装蛋白制备及效价测定

按 Scalenghe 的方法^[5], 从 λ 溶源菌 BHB 2688 和 BHB2690 菌种制备体外包装蛋白, 测得包装效价为 1.08×10^7 pfu/ μ g DNA。

4. 水稻叶绿体基因文库的构建

ctDNA 12—23kb 片段 (约 0.5 微克) 与 EMBL3 DNA 的 *Bam*HI、*Eco*RI 双酶解产物 (约 3.0 微克) 在 15 微升体积中由 10 单位 T4DNA 连接酶, 13℃ 反应过夜。连接产物中加入 $MgCl_2$ 使终浓度为 10mmol/L, 68℃ 保温 10 分钟, 冰浴速冷, 分成两份, 分别进行体外包装 (操作同包装蛋白效价测定)。以 Q359 溶源菌为寄主菌测得包装后共得 3.3×10^5 个重组噬菌体, 即为水稻叶绿体基因文库。

5. 重组噬菌体的鉴定

从得到的基因文库制备的平板中随机取出若干重组噬菌斑, 按前文的方法^[6]快速抽提噬菌体 DNA, 以 *Sall* 酶解后于 0.6% 琼脂糖凝胶上电泳, 鉴定插入片段。

6. 探针 DNA 的制备

烟草 *rps14* 基因克隆由名古屋大学杉浦昌弘教授赠送, 按碱法快速抽提质粒 DNA, 经 *Pst*I 和 *Eco*RI 酶解后, 用 DEAE-纤维素膜回收 0.21kb 的 *rps14* 基因片段。用 [α -³²P] dATP (>3000 Ci/mmol, 中国原子能科学研究院同位素所), 经切口平移法^[7]标记。

7. 噬菌斑原位杂交

基本按 Benton 方法^[8]进行。

8. Southern 杂交

按 Southern 方法^[9]进行。

结果和讨论

水稻叶绿体基因组约 130kb, 用 *Bam*HI、*Eco*RI 和 *Hind*III 等限制性内切酶处理后分别可得二、三十条区带。片段大小分布在几百 bp 和 30kb 范围内, 用质粒作为载体难以获得所有片段的克隆, 特别是大片段的克隆; 得到的克隆中包含的基因也可能不完整。以 EMBL3 作载体建库克服了以质粒为载体的不足之处。EMBL3 允许插入 9.3—22.4kb 的外源 DNA, 它有两个方向相反的 *Sall*、*Bam*HI 和 *Eco*RI 三种限制性内切酶位点的多聚接头, 增加了克隆片段的选择性, 而且由于载体中间片段有 *Spi*, 不能在 P2 噬菌体溶源化的菌株 (Q359) 中生长, 而重组子以外源 DNA 取代了中间片段, 呈 *Spi*⁻, 则可以在 Q359 中生长, 形成噬菌斑, 这给重组子的选择带来极大方便。

利用 EMBL3 多聚接头上 *Bam*HI 位点与限制性内切酶 *Sau3A* 有同源顺序的性质, 采用 *Sau3A* 部分酶解水稻 ctDNA 可以得到切点近于随机分布的限制性片段, 控制酶解条件, 使片段大多集中于 9—23kb 范围内 (图 1, 见图版 II), 这就保证了各片段所包含的基因的完整性。为了防止 ctDNA *Sau3A* 酶解片段中小于 11.2kb 的片段在连接酶作用下自连造成假连锁现象而干扰实验结果, 我们采用低熔点琼脂糖胶电泳回收 12—23kb 的酶解片段作为目的 DNA 片段 (图 2, 见图版 II), 除去了较小片段, 保证了文库的真实性。

一般实验室用 *Cscl* 梯度离心纯化 EMBL3 噬菌体, 我们用甘油梯度超离心方法代替 *Cscl* 纯化, 效果好, 操作简便, 耗时短而且较经济。EMBL3 载体 DNA 在与水稻 ctDNA *Sau3A* 片段连接前用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 两种限制性内切酶处理, 使载体两臂的 *Bam*HI 切点可以与水稻 ctDNA 片段的 *Sau3A* 切点相连接, 而中间片段两端是 *Eco*RI 末端, 因此不会参与片段重连, 这样就省略了纯化 EMBL3 两臂 DNA 的工作。为了使水稻 ctDNA *Sau3A* 片段能充分插入载体中, 连接反应时使载体 EMBL3 DNA

^{35}S - α -dATP 用于缺口转移标记探针 DNA 及蓖麻蚕核型多角体病毒 (ArNPV) 多角体蛋白基因的初步定位

陈蔚梅 林栖凤 马延高 卢文钧

(武汉大学病毒研究所)

提 要

本文用苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒的多角体蛋白基因 mRNA 的 cDNA 为探针,用 ^{35}S - α -dATP 为标记化合物,经缺口转移体外标记探针 DNA,用旋转柱层析法分离出标记探针,由膜上 DNA-DNA 杂交,将 ArNPV 的多角体蛋白基因定位,确定是在其 EcoRI-II 片段上。

前文报告了 ArNPV DNA 的物理图谱^[1]。定位其多角体蛋白基因是进一步研究 ArNPV

过量。

根据包装后测定结果说明我们获得了 3.3×10^5 个重组子。按 Clarke 和 Carbone^[10] 的公式 $N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-F)}$, 我们按克隆片段平均大小为 17kb 计算,水稻 ctDNA 基因组大小是 130kb, 33 个重组子就可以使水稻 ctDNA 基因文库的完整性达到 99%。而我们获得的重组子数大大超过此数值,所以基因文库的完整性是不容怀疑的。

从已构建的文库中任意挑取 10 个噬菌斑,并以简易方法提取噬菌体的重组 DNA,利用限制性内切酶 SalI 切除两臂,释放出插入片段。经鉴定此 10 个均为重组子,插入片段大小在 14—21kb 之间,所以大小完全在克隆片段范围之内(图 3,见图版 II)。

为了进一步证实文库的有效性,我们用比放射性为 $10^7\text{cpm}/\mu\text{g}$ 的烟草叶绿体核糖体 S14 蛋白基因片段作探针,经原位杂交挑选出 3 个阳性斑点,分别命名为 $\lambda\text{Rps14-1}$, $\lambda\text{Rps14-2}$ 和 $\lambda\text{Rps14-3}$ 。以快速抽提法制取重组 DNA 后,用 SalI 酶解,经 Southern 杂交,结果表明重组子 $\lambda\text{Rps14-3}$ 的插入 DNA 中有 rps14 基

因(图 4,见图版 II)。

基因文库的构建成功将为今后进一步研究水稻叶绿体基因组的结构,探测与光合作用、抗病和抗逆境功能有关基因并研究它们的结构与功能准备了条件。

本工作承我系沈志伟同志提供 ctDNA 样品,复旦大学遗传所有关同志提供某些菌种及 λ 噬菌体,生化专业八二届毕业生黄跃和蒋进参加了部分工作,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Hirai, A. et al.: *Theor. Appl. Genet.*, 1985, **70**, 117.
- [2] Frischang, A. M. et al.: *J. Mol. Biol.*, 1983, **170**, 824.
- [3] Silhavy, T. J. et al.: *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1984, 93—96.
- [4] Salts, Y. and Beckman, J.: *PMB Newsletter*, 1981, **11**, 73.
- [5] Scalenghe, F. et al.: *Chromosoma*, 1981, **82**, 205.
- [6] 曹凯鸣等:《复旦学报》, 1988.
- [7] Rigby, P. W. J. et al.: *J. Mol. Biol.*, 1977, **113**, 237.
- [8] Benton, W. D. et al.: *Science*, 1977, **196**, 180.
- [9] Southern, E. M.: *J. Mol. Biol.*, 1975, **98**, 503.
- [10] Clarke, L. and Carbon, J.: *Cell*, 1976, **9**, 91.

[本文于 1987 年 8 月 17 日收到]

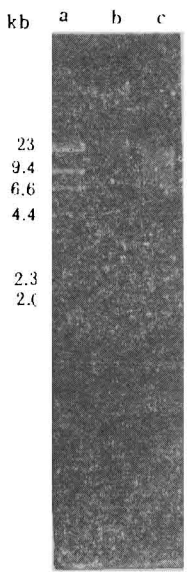


图1 水稻 ctDNA 的 *Sau* 3A 部分酶解产物电泳图谱
a. λ -DNA *Hind* III 酶解片段作为分子量标准
b. 水稻 ct DNA
c. ct DNA 的 *Sau*3A 部分酶解物

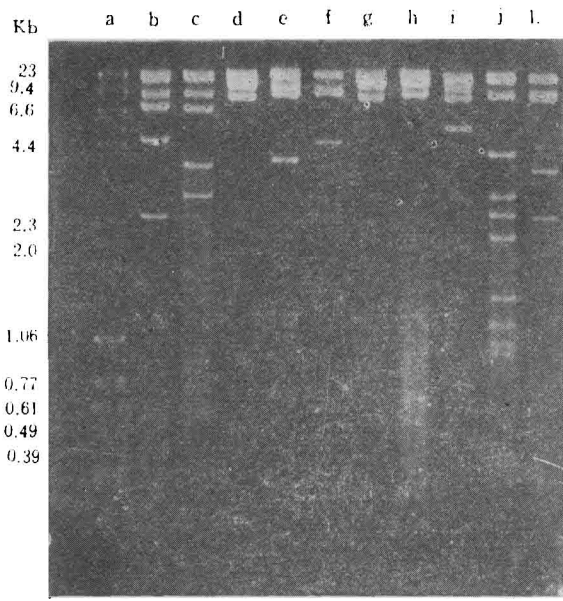


图3 重组子DNA 的 *Sal*I 酶解片段电泳图谱
a. λ -DNA *Hind* III + ϕ X174-DNA *Hinc* II 片段
b—k. 重组子 DNA 的 *Sal*I 片段

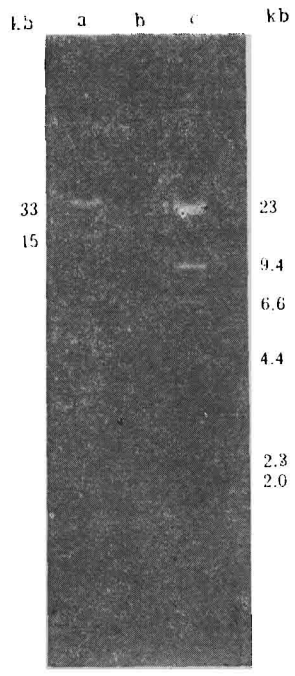


图2 “LIP”琼脂糖凝胶电泳回收得到12—23kb片段的鉴定
a. λ -DNA 的 *Xho*I 酶解片段
b. 回收片段
c. λ -DNA 的 *Hind* III 酶解片段

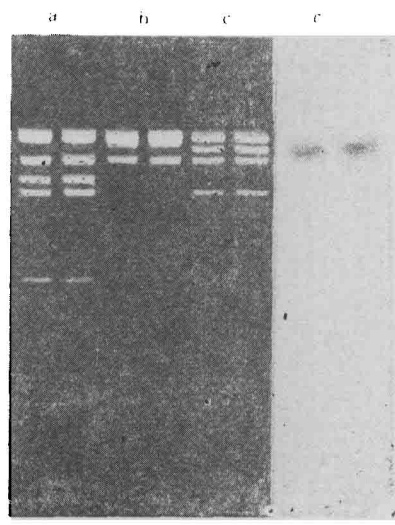


图4 重组 DNA 的 Southern 杂交图谱
a. b 和 c 分别为 λ Rps14-1、 λ Rps14-2 和 λ Rps14-3 (每种重组子经平板扩增后挑取两个噬菌斑, 分别提取重组 DNA) 的 *Sal*I 酶解片段 c' 为 *rps14* 探针与 c 杂交的结果