

水稻染色体 DNA 的交变脉冲电泳分析*

钟 翎 李文哲 刘良式

(中山大学生物工程研究中心, 广州 510275)

提 要

从水稻完整的细胞核中释放出来的染色体 DNA 在交变脉冲电泳中表现为一种“240kb 单位”的形式。这种单位,经限制性内切酶消化,可产生连续分布的大至 1500kb 的染色体 DNA 片段。文章讨论了“240kb 单位”作为水稻染色体 DNA 基本结构单位的可能性。

关键词 交变脉冲电泳, 水稻, 染色体 DNA

真核生物的完整染色体 DNA 分子量大约在 10^3 — 10^5 kb 之间,因此,常规凝胶电泳对于真核生物的完整染色体 DNA 分离是无能为力的。80 年代开始建立的交变脉冲电泳(PFGE)技术可以分离 50—9000kb 的 DNA 片段,为真核生物染色体 DNA 或大片段 DNA 的研究提供了新的工具。

目前,PFGE 已广泛用于酵母染色体 DNA 分离^[1,2]、电泳核型分析^[3]、酵母人工染色体系统构建,另外也用于哺乳动物染色体 DNA 物理图谱分析^[4,5]、染色体步行、染色体跳步文库构建^[6]等研究。植物方面, Raymond^[7] 用脉冲电泳技术成功地分离到蕃茄核 DNA 的限制性内切酶大片段。我们在水稻广亲和基因的染色体步行克隆系统研究中,建立了水稻染色体 DNA 的 PFGE 技术,无需通过原生质体而直接以种子干胚为材料,在一定释放条件下获得大量高分子量 DNA 制品,从而为分离纯化植物材料大片段 DNA,构建 YAC 文库等奠定技术基础。我们还发现一个值得深入研究的现象:用本实验的条件从细胞核制备的这些大分子 DNA 在 PFGE 中是以“240 kb 单位”出现的,该单位经限制性内切酶酶切后,分子量增大至 1500kb。

1 材料和方法

1.1 水稻细胞核的制备^[8,9,10]

取水稻种子干胚,用冷的 0.45mol/L (约 15% W/V) 蔗糖, 2 mmol/L CaCl_2 溶液在 4℃ 下匀浆,经一层尼龙布过滤,滤液在 4℃, $750 \times g$ 离心 10min,沉淀重悬于适量上述溶

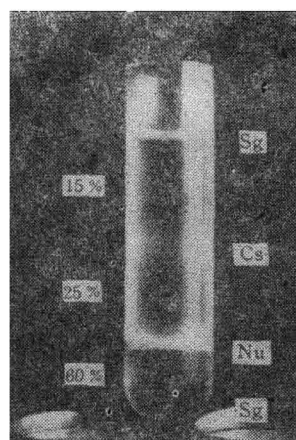


图 1 蔗糖密度梯度分离水稻细胞核

Fig. 1 Isolation of rice nuclei by sucrose gradient

Sg: 淀粉粒; Cs: 细胞碎片; Nu: 细胞核

Sg: Starch grain; Cs: Cell segment; Nu: Nuclei

* 国家高科技“863 计划”资助项目部分内容

收稿日期: 1991-06-25 修回日期: 1992-02-09

液中,铺于 25%—60% 蔗糖分部梯度 (2mmol/L CaCl_2) 上, 4℃, 10000×g 离心 30min. 完整的细胞核位于 25% 和 60% 蔗糖分部之间 (图 1), 收集细胞核部分, 再用 0.45mol/L 蔗糖溶液洗一次, 镜检备用。

1.2 包埋

纯化的细胞核沉淀悬浮于适量 0.05 mol/L 乙二胺四乙酸 (EDTA) pH 7.5 中, 在 37℃ 下与等体积融化的 1.0% 低融点琼脂糖混合, 迅速倒入模具, 置冰箱中凝固为胶块。

1.3 水稻染色体 DNA 在琼脂糖凝胶中的释放

完整的细胞核包埋于琼脂糖凝胶中之后, 各种反应便在凝胶块中进行, 免除了机械损伤 DNA 分子。首先进行细胞核裂解, 使 DNA 在 EDTA 等保护剂存在下释放出来, 一般的释放剂包括蛋白酶 K^[2,7,11,12], 十二烷基肌氨酸 (lauroyl sarcosine)^[2,7] 等。我们试验了各种释放缓冲液成分及释放时间对 DNA 释放的影响, 释放处理结束之后, 凝胶块在 0.05 mol/L EDTA (pH 7.5) 中洗 3h, 每小时更换一次溶液^[12]。凝胶块可在 4℃ 长期贮存。

1.4 限制性内切酶消化和电泳

上述凝胶块切成小块, 在限制性酶消化前用苯甲基磺酰氟 (PMSF) 溶液 (0.1 mol/L PMSF, 1mmol/L EDTA, 10mmol/L Tris-HCl pH 7.5) 洗 2h, 每小时更换一次溶液, 这个步骤主要是抑制蛋白酶 K 的活性。胶块再用 TE 缓冲液洗 3h, 每小时更换一次。进行两方面的限制性酶消化比较:

1.4.1 不同种类限制酶消化比较

DNA 样品放入相应的限制酶反应缓冲液中, 分别用 10—20 单位的限制性内切酶 BamHI, PstI, HindIII, NotI, SfiI 消化, 37℃ 保温 6h。

1.4.2 不同浓度限制酶消化比较

DNA 样品分别在 1, 2, 4, 8U/ μg DNA 的 BamHI 中消化, 37℃ 保温 6h。

水稻染色体 DNA 的交变脉冲电泳条件基本与酵母染色体 DNA 的 PFGE 条件^[1,2] 相同。电泳缓冲液为 0.5×TBE (TBE: 0.089mol/L

Tris-硼酸, 0.089 mol/L 硼酸, 0.4 mmol/L EDTA, pH 8.0), 条件为 10—14℃, 200V 稳压, 脉冲时间为 70—100s, 电泳 15—20h. 脉冲电泳系统为 CHEFII 系统 (美国 Bio-Rad 公司产)。

2 结果和讨论

2.1 水稻染色体 DNA 在不同释放条件下的 PFGE 行为

我们参照 Ahmed^[9] 和 Szabados^[10] 的方法制备水稻细胞核, 镜检为完整的细胞核, 但含有少量淀粉粒, 可通过重复用蔗糖密度梯度离心的方法除去。细胞核包埋于低融点琼脂糖中, 一般 1ml 纯化核 (1×10^4) 沉淀加 0.6ml 0.05mol/L EDTA (pH 7.5) 与 1.5 ml 1.0% 低

表 1 水稻染色体 DNA 在不同释放条件下的交变电泳行为
Table 1 PFGE behaviour of chromosome DNA released in gel in different conditions

组号 group	释放缓冲液 releasing buffer	释放时间 Releasing time (h)					
		0.5	1	4	8	16	24
A	0.5mol/L EDTA (pH9.0)	0	0	0	0	0	0
B	0.5mol/L EDTA (pH9.0) 1% 十二烷基肌氨酸 1% lauroyl sarcosine 2mg/ml 蛋白酶 K 2mg/ml proteinase K	0	Sc	Sc	Sc	Sc	Sm
C	0.5mol/L EDTA (pH9.0) 1% lauroyl sarcosine	0	0	Sc	Sc	Sm	Sm
D	0.5mol/L EGTA (pH9.0) 1% lauroyl sarcosine 2mg/ml proteinase K	0	Sc	Sc	Sc	Sm	Sm
E	0.5mol/L EDTA (pH9.0) 10% 钒氧核苷酸复合物 10% vanadyl-ribonucleotide complex 1% lauroyl sarcosine 2mg/ml proteinase K	0	0	Sc	Sc	Sm	Sm

Sc: “240kb 单位”的超螺旋 DNA; Sc: The supercoiled DNA of “240kb-like units”; Sm: 50—1500kb 的长拖尾 DNA; Sm: The long smear DNA of 50—1500 kb; O: 未见有 DNA. O: No DNA.

融点琼脂糖混合后倒入模子中。

Schwartz 等(1984)^[2]和 Raymond(1989)^[7]在酵母原生质体及 λ 噬菌体裂解物实验中用十二烷基肌氨酸和蛋白酶 K (50°C 过夜保温) 作释放剂。我们选用了 EDTA, 乙二醇双乙胺醚-N,N'-四乙酸 (EGTA) 和钒氧核苷酸复合物等防止 DNA 降解的核酸保护剂观察其对释放的影响。时间为 0.5—24h, 结果见表 1。其中 A 组为对照组, 不含释放剂, 结果未见有 DNA 释放; 其他条件下, 从核中释放的 DNA 在电泳中表现为比较集中的带和长拖尾的两种图谱, 分别位于 240kb 或 50—1500kb 处(图 2), 其中 B 组 16h 以后, C, D, E 组 8h 以后表现为双向长拖尾, DNA 连续分布于 50—1500kb 范围, 而 B 组在 1—16h, C, E 组在 4—8h, D 组在 1—8h 以内释放的 DNA 集中在 240kb 左右处, 我们暂称之为“240 kb 单位”DNA。比较 D 组和 B 组显示 EDTA 比 EGTA 的保护作用好, D 组 DNA 在 16h 后“散开”, 而 B 组 DNA 在 24 h 后才散开, E 组显示钒氧核苷酸复合物的存在可能影响蛋白酶 K 的作用。

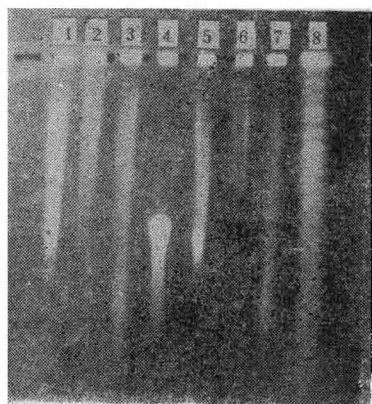


图2 水稻核 DNA 在不同释放条件下(见表1)的 PFGE 图谱

Fig. 2 Rice chromosome DNA released in gel in different conditions showed in PFGE (refer to Table 1)

1. D组, 24h; 2. C组, 24h; 3和7. E组, 24h;
4. B组, 16h, “240kb 单位”DNA; 5. D组, 16h;
6. B组, 24h; 8. 酵母染色体 DNA 分子量标准
1. Group D, 24h; 2. Group C, 24h; 3 and 7. Group E, 24h;
4. Group B, 16h, “240 kb-like units”; 5. Group D, 16h; 6. Group B, 24h;
8. Yeast chromosome DNA standard

从“240kb 单位”出现的时间上看, 最适时间是 4—8h 的释放反应, 短于 4h, 染色体 DNA 大多尚未释放出来; 长于 8h, 其电泳行为则多表现为大于 240 kb 的长拖尾带, 推测这是因为

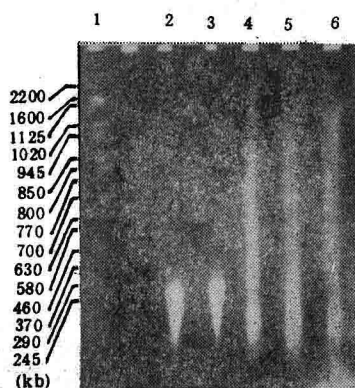


图3 限制性内切酶消化水稻核 DNA 的 PFGE 图谱
Fig. 3 PFGE pattern of restriction enzyme digestion of rice chromosome DNA released from nuclei in gel

1. 酵母染色体 DNA 分子量标准; 2和3. 水稻核 DNA (未消化)位于 240kb; 4. BamHI 酶切; 5. HindIII 酶切; 6. PstI 酶切; 4—6. >240kb 大分子 DNA
1. Yeast chromosome DNA standard; 2 and 3. Rice DNA undigested released from nuclei in gel, shows “240kb-like units”; 4. Rice DNA digested with BamHI; 5. Rice DNA digested with HindIII; 6. Rice DNA digested with PstI; 4—6. >240kb large molecular DNA

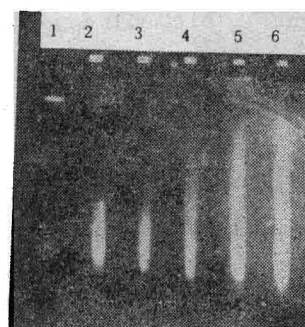


图4 BamHI 消化后的水稻核 DNA 的 PFGE 图谱
Fig. 4 PFGE pattern of restriction enzyme digestion of rice chromosome DNA released in gel

1. 酵母染色体 DNA 分子量标准 Yeast chromosome DNA standard; 2. 未消化的水稻核 DNA (位于 240 kb 处) Rice DNA undigested; 3. BamHI 1U/μg DNA; 4. BamHI 2U/μg DNA; 5. BamHI 4U/μg DNA; 6. BamHI 8U/μg DNA

随着释放时间的延长,释放剂消除某些维持 DNA 超螺旋状态的蛋白质,从而破坏了“240 kb 单位”显示出大分子 DNA 的线性长度。

综合结果看, B 组的释放条件优点最多:
a. DNA 释放快; b. DNA 保护好。

2.2 “240kb 单位” DNA 在限制性内切酶消化后的 PFGE 行为

将经过释放处理后产生“240 kb 单位”的 DNA 用限制性内切酶 BamHI, PstI, HindIII, NotI 和 SfiI 消化,经 PFGE 后发现了非常有趣的现象,即 DNA 消化后,分子量不是变小了而是增大了(图 3)。而在限制酶浓度梯度实验中发现随着 BamHI 浓度的增高,不断出现更大分子量 DNA (图 4)。例如当 BamHI 的浓度从 1 单位、2 单位/ μg DNA, 增至 4 单位、8 单位/ μg DNA 时,新出现的 DNA 分子量也随着酶浓度增加而变大。假如 BamHI 的浓度增至 15 单位/ μg DNA 以上, DNA 的分子量便开始降低,即出现大量分子量小的 DNA,并且“240 kb 单位”DNA 也不再出现。

我们还以菠菜、西洋菜等植物细胞核为材料进行了相同的实验,发现了类似的“240 kb 单位”DNA 现象(资料未发表)

2.3 “240kb 单位”成因的分析

众所周知,真核生物染色体 DNA 的结构是线性 DNA 分子在几种水平上盘绕折叠而成。在本实验的释放条件下,经 PFGE 发现的这种“240 kb 单位”可能是某一水平上构成染色体高级结构单位,“240kb 单位”DNA 之间的连接部位可能是易受释放剂作用的“脆弱”部位,从而染色体 DNA 易于在该处断裂。在我们所用的包埋和释放条件下,胶块中的 DNA 以这种单位首先释放出来,经电泳在 240kb 位置处聚集,随着释放时间的延长,释放剂或其他物质进一步作用于“脆弱”部位之外的其他染色体蛋白,从而使部分“240kb 单位”电泳显示出双向长拖尾现象。另一方面,当 DNA 限制性内切酶作用时,切断了 DNA 上的一些切点,从而也造成了“240kb 单位”的破坏,显示出线性 DNA 分子。从以上两个方面推断,我们认为

“240 kb 单位”是一种高级结构状态,其真实 DNA 分子大小远大于 240 kb,当此种高级结构受到破坏时,线性 DNA 分子释放,才在电泳上显示其实际的分子量。

我们在其他植物(如菠菜、白菜、西洋菜等)细胞中同样发现了这一现象,因此,“240kb 单位”DNA 有可能作为高等植物染色体 DNA 的基本结构单位,这一问题值得进一步研究。

Stoilov^[13]曾对玉米细胞核用非离子去污剂和高盐处理后,经过蔗糖密度梯度离心,得到 DNA 带,经电镜检验为 DNA 的超螺旋结构。我们在凝胶块中裂解细胞核释放出来的“240kb 单位”DNA 是否与 Stoilov 得到的 DNA 有联系,尚待进一步确定。

我们同时还与常规程序提取的 DNA 进行了酶切电泳比较, PFGE 图谱显示,当限制酶浓度增加时, DNA 分子量不断变小(图 5),而不会象如上所述出现 DNA 分子量“变大”的现象。这也从另一个侧面说明“240 kb 单位”

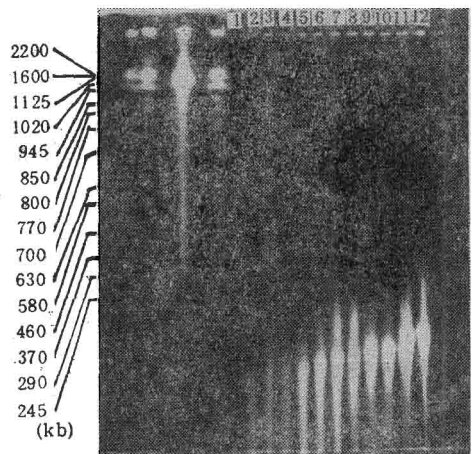


图5 用常规程序提取的水稻 DNA 限制性内切酶 HindIII 消化后的 PFGE 图谱

Fig. 5 PFGE pattern of restriction enzyme digestion of rice DNA extracted in solution

1. 酵母染色体 DNA Yeast chromosome DNA standard; 2. HindIII, 8U/ μg DNA; 3. HindIII, 4U/ μg DNA; 4. HindIII, 2U/ μg DNA; 5. HindIII, 1U/ μg DNA; 6. HindIII, 0.5U/ μg DNA; 7. HindIII, 0.25U/ μg DNA; 8. HindIII, 0.125U/ μg DNA; 9. HindIII, 0.063U/ μg DNA; 10. HindIII, 0.031U/ μg DNA; 11. HindIII, 0.016U/ μg DNA; 12. 水稻 DNA (未消化) Rice DNA undigested

确不同于一般 DNA。

总之,我们建立的水稻染色体 DNA PFGE 方法,为获得大量纯化的大片段植物 DNA,构建 YAC (yeast artificial chromosome) 文库,以及限制酶分析等提供了方便。另外,实验中发现的“240 kb 单位”DNA 现象可能为进一步分析植物染色体 DNA 的结构提供重要的线索。

参 考 文 献

- 1 Carle G F *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1984; 12: 5647
- 2 Schwartz D C *et al.* *Cell*, 1984; 37: 67
- 3 Carle G F *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985; 82: 3756
- 4 Barlow D A, Lehrach H. *Trends Genet*, 1987; 3: 167
- 5 Brown WRA, Bird A P. *Nature*, 1986; 322: 477
- 6 Collins F S *et al.* *Science*, 1987; 235: 1046
- 7 Raymond A J. *Plant Mol Biol*, 1989; 12: 341
- 8 刘良式等. 植物遗传操作技术. 北京: 科学出版社, 1988: 223
- 9 Ahmed El-metainy *et al.* *Mutation Res*, 1971; 13: 337
- 10 Szabados L *et al.* *Planta*, 1981; 151: 141
- 11 朱圣庚,黄仪秀. 生物化学与生物物理进展, 1987;(5): 67
- 12 Kenwrick S *et al.* *Cell*, 1987; 48: 351
- 13 Stoilov L M *et al.* *J Cell Sci*, 1988; 88: 243

ANALYSIS OF CHROMOSOME DNA OF RICE USING PFGE TECHNIQUE

Zhong Ling Li Wenzhe Liu Liangshi

(Zhongshan University, Biotechnology Research Center, Guangzhou 510275)

ABSTRACT

Plant chromosome DNAs released from intact nuclei were analysed in PFGE and it showed that rice chromosome DNAs existed in a form of “240kb-like units” in a releasing condition of this experiments. These units with restriction enzyme digestion were shown to be chromosome-size DNAs up to 1500kb. The possibility of these “240kb-like units” as fundamental organization units of chromosome DNAs was discussed. This technique has been established for a basis of isolating and purifying large DNA fragments, constructing YAC library and restriction enzyme analyzing.

Key words PFGE(pulse field gradient gel electrophoresis), rice, chromosome DNA

(上接 342 页)

- 5 Sussman J L, Harel M, Frolov F *et al.* *Science*, 1991; 253: 872
- 6 Brimijoin S. *Progress I Neurobiol*, 1983; 21: 291
- 7 Attack J R, Perry E K, Bonham J R *et al.* *J Neurochem*, 1986; 47: 263
- 8 Taylor P, Cchumacher M, Macphee-Quigley K *et al.* *Trend I Neurosci*, 1987; 10: 93
- 9 Small D H. *Neurosci Lett*, 1988; 94: 237
- 10 Small D H, Simpson J. *Neurosci Lett*, 1988; 89: 223
- 11 Roberts W L, Santikarn S, Reinhold V N *et al.* *J Biol Chem*, 1988; 263: 18776
- 12 Gibney G, Macphee-Quigley K, Thompson B *et al.* *J Biol Chem*, 1988; 263: 1140
- 13 Sikorav J L, Duval N, Anselmet A *et al.* *EMBO J*, 1988; 7: 2983
- 14 Maulet Y, Camp S, Gibney G *et al.* *Neuron*, 1990; 4: 289
- 15 Quinn D M. *Chem Rev*, 1987; 87: 955
- 16 Peter T W, Waser P G. *Eur J Pharmacol*, 1989; 172: 165
- 17 Rotundo R L, Gomey A M, Fernandez V C *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85: 7805
- 18 Decker M M, Berman H A. *J Biol Chem*, 1990; 265: 11796
- 19 Hammond P, Brimijoin S. *J Neurochem*, 1988; 50: 1111
- 20 Kasmusser A G, Sorensen K, Selmer J *et al.* *Chim Chim Acta*, 1987; 166: 17