

## 萝卜叶绿体DNA花粉育性特异片段的定位

王虹\* 李继耕 孔繁瑞

(中国科学院遗传研究所, 北京)

本实验采用萝卜细胞质雄性不育系401A及其同核保持系401B为材料, 利用 BamH I、EcoR I、Bgl I 和Hind III 四种内切酶酶解其叶绿体DNA。除Hind III外, 其余三种内切酶电泳图谱中均显示两系之间的明显差异。将BamH I 的 5 个差异片段分别与载体pBR322进行体外连接, 获得 4 种重组体克隆。利用 3 种膜蛋白质基因探针, 分别与两系的叶绿体 DNA 杂交, 杂交均未出现在差异片段所在部位, 这说明, 两系之间的差别可能与这 3 种基因无关。将重组体质粒分别与P700叶绿素a脱辅基蛋白质基因探针及反向重复区内rRNA基因区探针杂交, 结果表明, 有 3 种重组体质粒所携带的差异片段与rRNA基因探针在杂交中显示出明显的阳性反应。也就是说, 这 3 个差异片段均位于rRNA基因所在的叶绿体基因组的反向重复区中。

**关键词** 叶绿体DNA; 花粉育性; 定位

细胞质雄性不育性, 由于它在杂种优势利用与细胞质遗传理论研究两方面的重要意义而受到广泛的重视。有关雄性不育机理的研究, 比较多地集中于线粒体方面<sup>[1-5]</sup>。有关叶绿体与雄性不育关系的研究, 也正在引起人们的重视。Frankel<sup>[6]</sup>比较了烟草中 6 种同核不育系与其亲本叶绿体DNA, 发现不育系DNA的核苷酸顺序有所改变。同样, Vedel<sup>[7]</sup>在油菜、Mikami<sup>[8]</sup>在甜菜中也观察到不育系与可育系叶绿体DNA内切酶图式之间的差异。Remy<sup>[9]</sup>利用双向电泳证明: 油菜两系之间类囊体膜蛋白质的组成也发生改变。

我们实验室连续几年对玉米、小麦、油菜、甜菜及高粱等作物进行研究, 肯定了叶绿体与花粉育性之间存在着某种联系。前不久, 又获得了油菜叶绿体DNA若干与花粉育性有关的特异片段的克隆<sup>[10]</sup>。为了进一步确定叶绿体DNA与花粉育性有关的特异片段的位置, 我们利用萝卜为材料, 开展了本项研究。

## 材料与方法

### (一) 材料

1. 本实验所用材料为萝卜细胞质雄性不育系401A及同核保持系 401B。此材料是山西省农科院蔬菜所郭素英等在1977年从晋丰萝卜采种田中发现的天然雄性不育株选育而成的。

2. 实验所用的基因探针的结构及来源: rRNA基因区探针为玉米叶绿体基因组DNA片段, 约12kb, 位于叶绿体基因组的反向重复区。它包括前导顺序, 16S rRNA基因, 间隔区, 23S rRNA基因, 4.5S rRNA基因及5S rRNA基因。这段DNA连接于载体pMB9上。

光系统 I P700 叶绿素 a 脱辅基蛋白

本文于1987年9月15日收到。

H. Kossel和R. G. Herrman教授赠予基因探针, 北京农业大学园艺系周长久教授及山西省农科院蔬菜所提供试验用种子, 特此致谢。

\* 现在工作地址: 北京市植物细胞工程实验室。

质-1基因探针,为菠菜叶绿体DNA经BamH I及Kpn I酶解后的一个1098bp DNA片段。它对应于此蛋白质的第17—382氨基酸残基并重组于质粒pUC18上。

光系统II P680叶绿素a脱辅基蛋白基因探针为菠菜叶绿体DNA经BamH I及Xba I酶解后的一个1160bp DNA片段。它对应于此蛋白质的第84—471氨基酸残基并重组于载体pSP64上。

32kd蛋白基因探针为菠菜叶绿体DNA经限制性内切酶Pst I及Xba I酶解后的一个769bp的DNA片段,它对应于此蛋白的第87—341氨基酸残基,重组于质粒pUC18上。

细胞色素b6基因探针为菠菜叶绿体DNA经Xho I酶解后的一个309bp的DNA片段,对应于此蛋白的第8—110氨基酸残基,重组于质粒pUC9上。

## (二) 方法

1. 叶绿体DNA的提取及纯化:取经暗室中过夜的新鲜叶片,剪碎后于缓冲液A (50mmol/L Tris-HCl pH8.0, 25mmol/L EDTA, 10mmol/L 巯基乙醇, 0.1%牛血清白蛋白, 1.25mol/L NaCl,  $I = 1.40$ ) 中匀浆, 20 $\mu$ m尼龙网过滤, 1500g离心10min, 去上清, 再用A液洗一次。将沉淀的叶绿体用B液 (25mmol/L Tris-HCl pH8.0, 10mmol/L EDTA) 悬浮, 加入Sarkosyl及SDS使其浓度分别达到2%及0.5%。室温下放置3—4h后, 分别用等体积饱和酚及氯仿各抽提两次。回收上层水相, 用2.5倍体积的95%冷乙醇沉淀, 过夜, 离心即得DNA沉淀。再经Sepharose 4B柱层析, 即得纯化的DNA样品。

2. 限制性内切酶酶解: 叶绿体DNA样品, 分别用BamH I、Bgl II、EcoR I及Hind III酶解, 酶解条件参照各种酶的

使用说明书。酶解后经1%琼脂糖胶电泳, EB染色, 紫外光下观察并拍照。

3. 差异DNA片段的回收、连接及转化: 不育系及保持系叶绿体DNA经BamH I酶解后, 经1%低熔点琼脂糖胶电泳并染色后, 在紫外光下分别切下5条差异片段所在的琼脂糖胶, 按一般方法回收差异片段DNA, 电泳检查回收的DNA量。

质粒pBR322经BamH I酶解后, 70℃处理10min, 再用95%冷乙醇沉淀, 离心、干燥。DNA溶于适量TE缓冲液中, 并分别与回收的差异片段DNA按1:1比例混合、连接, 电泳检查连接结果。

感受态*E. coli*菌株HB101的制备: 参照Mandel及Higa的方法<sup>[11]</sup>。取感受态HB101菌液0.2ml, 加入上述连接混合物, 分别进行转化处理, 最终将转化液涂于含35 $\mu$ g/ml氨苄青霉素的固体培养基上, 37℃培养24h, 可获大量转化菌落。

4. 重组克隆的筛选: 抗菌素筛选: 准备两套固体培养基, 一套只含有35 $\mu$ g/ml氨苄青霉素, 另一套除含氨苄青霉素外, 还含有12.5 $\mu$ g/ml四环素。将获得的转化菌落分别接种在这两套培养基的相应位置上, 37℃培养, 即可选出在含氨苄青霉素的培养基上生长, 而在含双抗菌素的培养基上不能生长的菌落。

利用同位素标记进行筛选: 用电泳提纯的5条差异片段DNA, 分别用大肠杆菌DNA多聚酶I及放射性 $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP进行缺口转移标记。标记物作为探针同经抗菌素法筛选出的菌落进行原位杂交, 方法参照Rigby<sup>[12]</sup>。杂交后进行放射自显影, 选出阳性斑点所对应的菌落。

5. 重组克隆的鉴定: 将克隆菌落分别接种于5ml含35 $\mu$ g/ml氨苄青霉素的液体培养基中, 37℃振荡培养过夜, 取1.5ml

培养物,离心收集菌体,将之悬浮于0.35ml 8%蔗糖,0.5% Triton-X-100,50mmol/L EDTA,10mmol/L Tris-HCl pH8.0溶液中,再加入25 $\mu$ l新配制的溶菌酶溶液(10mg/ml溶于10mmol/L Tris-HCl pH8.0),充分混合后,放置短时间,在开水浴中煮沸40秒,立即离心10min,上清液用异丙醇沉淀,即得重组质粒,将之同pBR322对照一起电泳,观察比较其分子量的变化。

同时,将提取的质粒及保持系DNA分别用BamH I酶解,酶解物与用作分子量标准的 $\lambda$ -DNA一起电泳,观察比较所得结果。

6. 分子杂交:杂交分两次进行。第一次将不育系与保持系DNA经BamH I酶解后,用Southern blot方法转移至硝酸纤维素膜上,与用 $\alpha$ - $^{32}$ P-dCTP标记的叶绿体P680叶绿素a脱辅基蛋白、32kd膜蛋白、细胞色素b6三种蛋白的基因探针杂交。

第二次将筛选出的克隆质粒及保持系DNA分别经BamH I酶解并一起电泳,然后转移至硝酸纤维素膜上,与 $\alpha$ - $^{32}$ P-dCTP标记的叶绿体DNA的rRNA基因区探针(带有质粒pMB9片段)和P700叶绿素a脱辅基蛋白基因探针(带有质粒pUC18片段)分别杂交。

杂交后均经放射自显影,观察杂交结果。

## 实 验 结 果

### (一) 限制性内切酶酶解结果

不育系及保持系叶绿体DNA,经限制性内切酶BamH I, EcoR I, Bgl II及Hind III酶解后的电泳图式中,除去Hind III不育系与保持系DNA之间未见

差异外,其余3种内切酶酶解图谱在两系之间均显示出明显差异。

在BamH I的酶解图谱中(图版I-A),不育系和保持系在2.0kb左右处显示5条片段的差别,其中不育系两条,保持系3条,互不相同。

EcoR I酶解图谱中(图版I-B),不育系与保持系之间,在分子量区至少显示两条带的差别(箭头所示)。

Bgl II的酶解图谱中(图版I-C),在1.3kb左右,不育系与保持系各有一条带彼此不同。

内切酶Hind III,可将DNA酶解成20多条DNA片段,但不育系与保持系之间在片段数目及其相对迁移率方面均观察不到明显差别。

### (二) 不育系与保持系之间差异DNA片段的克隆

采用低熔点琼脂糖胶,进行长胶板垂直板电泳,分离差异DNA片段效果较好。不育系的两条差异片段分别命名为A<sub>20</sub>, A<sub>21</sub>;保持系的三条差异片段命名为B<sub>20</sub>, B<sub>21</sub>, B<sub>22</sub>(图版I-D)。

回收的差异片段DNA与pBR322DNA连接后,转化*E. coli*菌株HB101,转化体经多次筛选及鉴定,获得了A<sub>20</sub>、A<sub>21</sub>、B<sub>21</sub>、B<sub>22</sub>4个片段的重组体克隆。

### (三) 差异DNA片段的定位

叶绿体DNA经BamH I酶解后,分别与光系统II P680叶绿素a脱辅基蛋白、32kd膜蛋白和细胞色素b6 3个基因探针杂交。杂交结果表明, P680叶绿素a脱辅基蛋白基因探针同不育系及保持系的第5片段杂交; 32kd膜蛋白基因探针同不育系与保持系的第8及11两个片段杂交; 细胞色素b6基因探针同第2片段杂交。3个基因的杂交结果,不育系同保持系相同,杂交带均未出现在差异片段所在的2.0kb左

右。这就说明,不育系与保持系叶绿体DNA在此区域的差别,与上述3个基因无关。

在另一次杂交试验中,携带有 $A_{20}$ 、 $A_{21}$ 、 $B_{21}$ 、 $B_{22}$ 差异片段的重组体质粒,经BamH I 酶解后,与保持系DNA经BamH I 酶解的样品一起电泳,并分别同玉米叶绿体DNA的rRNA基因区探针(带有pMB9质粒片段)及菠菜光系统I P700叶绿素a脱辅基蛋白基因探针(带有pUC18质粒片段)杂交。杂交结果如图版I-E、F。

图版I-E中,差异片段 $A_{20}$ 、 $A_{21}$ 、 $B_{21}$ 及 $B_{22}$ 与P700叶绿素a脱辅基蛋白基因没有显示同源性。在保持系401B的杂交结果中,有两条带与此基因探针有很高的同源性,但与2.0kb左右的差别区没有同源性。同样,差别片段B20也与此基因探针无关。此外,由于质粒pBR322与质粒pUC18之间具有同源区域,故质粒pBR322区显示出强烈的杂交反应,此反应与叶绿体DNA无关。

但是,与rRNA基因区探针杂交结果却与此不同。如图版I-F所示,差异片段 $A_{21}$ 、 $B_{21}$ 、 $B_{22}$ 都与此探针有明显的阳性反应,而 $A_{20}$ 没有阳性反应。由此可见,除 $A_{20}$ 外, $A_{21}$ 、 $B_{21}$ 、 $B_{22}$ ,3个差异片段均位于叶绿体DNA分子的反向重复区的rRNA操纵子区。同样,图中pBR322质粒带,同基因探针上的pMB9质粒有同源片段而显示出杂交反应。

在保持系DNA的BamH I 图谱中, $B_{21}$ 与 $B_{22}$ 由于所用的电泳胶板较小,未能将两者分开,因此,与rRNA基因探针杂交时只显示出一条带。此外, $B_{20}$ 片段没有显示出与rRNA基因探针的同源性。

综上所述,萝卜细胞质雄性不育系401A及保持系401B的叶绿体DNA,在BamH I 图谱中显示的5条差异片段DNA

带 $A_{20}$ 、 $A_{21}$ 、 $B_{20}$ 、 $B_{21}$ 及 $B_{22}$ ,其中3条带 $A_{21}$ 、 $B_{21}$ 及 $B_{22}$ 均位于rRNA操纵子所在的反向重复区内。而另外两条带 $A_{20}$ 、 $B_{20}$ 的位置不在这一区域。其次,通过与P700叶绿素a脱辅基蛋白、P680叶绿素a脱辅基蛋白、32kd膜蛋白、细胞色素b6 4个基因探针杂交,可以初步断定,这五条片段与上述4个基因无关。但由于上述基因探针本身均未包括完整的基因序列,因此,尚不能完全排除这几个差异片段与这4个基因有关的可能性。

## 讨 论

### (一) 限制性内切酶图谱的差异与CMS问题

叶绿体基因组是否带有雄性不育现象的遗传控制因子,一直是个有争议的问题。早期对这个问题所下结论的主要实验依据,就是对限制性内切酶图谱差异的分析。

有些实验者对雄性不育系与可育系叶绿体DNA进行限制性内切酶分析比较,结果观察不到差异或仅有少数差异,因此,对叶绿体基因组在雄性不育性中的作用持否定意见。

但是Frankel<sup>[6]</sup>对烟草、Vedel<sup>[7]</sup>对油菜、Mikami<sup>[8]</sup>对甜菜等作物的雄性不育系及可育系叶绿体DNA进行分析时发现,两者之间有差异。我们实验室曾经对玉米、小麦、油菜、甜菜及高粱多种作物的雄性不育性从叶绿体DNA、膜蛋白质及叶绿体超微结构三方面进行分析,肯定了它们之间的某种联系,特别是有些作物,如玉米、小麦,尽管在DNA内切酶酶解后的一向琼脂糖胶电泳时没有差异,但在含变性剂浓度梯度的双向电泳中仍显示出差异来<sup>[13-17]</sup>。

本实验结果再一次证实,萝卜不育系与其保持系叶绿体 DNA 之间确实存在着明显差异。此外,将本实验中萝卜不育系 DNA 的 BamH I 图谱与具有萝卜细胞质的油菜不育系 DNA 的 BamH I 图谱相比较时,就会发现两者之间惊人地相似<sup>[10]</sup>。但是,从育种过程看,两种不育系的突变过程彼此独立,因此,这种相似性似乎说明了某种内在关系。

## (二) 差异 DNA 片段的定位问题

1982年, Stern<sup>[18]</sup>在对玉米线粒体 DNA 进行研究时发现,玉米线粒体基因组中有一个 12kb 的顺序,同叶绿体基因组中反向重复区的一段 DNA 顺序有 90% 以上的同源性。在玉米的 T, C, S 三型细胞质

雄性不育系中,线粒体 DNA 的这一区域均发生变异。Stern 的这一工作首次提出了反向重复区和细胞质雄性不育性之间联系的可能性。以后 Vedel<sup>[17]</sup>在比较油菜雄性不育系及可育系叶绿体 DNA 物理图谱时,也发现两系之间在 rRNA 基因区,即反向重复区,有一明显的点突变。

我们的上述试验中,一共做了 5 种叶绿体基因探针同不育系及保持系叶绿体 DNA 的 BamH I 酶解片段的杂交,结果发现,在 BamH I 图谱中的 5 条差异片段中有 3 条被定位于反向重复区的 rRNA 操纵子区。这一发现再一次证实,叶绿体 DNA 分子的反向重复区与细胞质雄性不育性之间存在着不容忽视的联系。

## 参 考 文 献

- [1] Levings, C. S. et al., *Science*, 193: 158—160, 1976.
- [2] Levings, C. S. et al., *Science*, 209: 1021—1023, 1980.
- [3] Powling, A. et al., *Heredity*, 49: 117—120, 1982.
- [4] Pring, D. R. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 2904—2908, 1977.
- [5] Thompson, R. D. et al., *Nucleic Acids Res.*, 8: 1999—2008, 1980.
- [6] Frankel, R. et al., *MGG*, 169: 129—135, 1979.
- [7] Vedel, F. et al., *Current Genet.*, 7: 13—20, 1983.
- [8] Mikami, T. et al., *TAG*, 71: 166—171, 1985.
- [9] Remy, R. et al., *TAG*, 64: 249—250, 1983.
- [10] 高洁等: 遗传学报, 第五期, 1987.
- [11] Mandel, M. and Higa, A., *J. Mol. Biol.*, 53: 154, 1970.
- [12] Rigby, P. W. J. et al., *J. Mol. Biol.*, 113: 237, 1977.
- [13] 刘一农, 李继耕: 科学通报, 第一期, 1983.
- [14] 李继耕, 高文琴: 遗传学报, 10 (4): 280, 1983.
- [15] 李家洋, 李继耕: 遗传学报, 13 (6): 430—436, 1983.
- [16] Li Jigeng et al., *TAG*, 64: 231—238, 1983.
- [17] Li Jiayang and Li Jigeng et al., *Current Genet.*, 10: 947—949, 1986.
- [18] Stern, D. B. et al., *Nature*, 299: 698—702, 1982.

# LOCATION OF DNA FRAGMENTS RELATED TO MALE-FERTILITY IN RADISH CHLOROPLAST GENOME

Wang Hong Li Jigeng Kong Fanrui

(*Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing*)

Chloroplast DNAs from radish CMS line 401A, and its isonucleus maintaining line 401B were digested by endonuclease BamH I, EcoR I, Bgl II and Hind III. Except Hind III restriction pattern, the other three enzyme restriction patterns all show the differences in ctDNA between the two lines. Using plasmid pBR322 as the vector, we have cloned four fragments which are the different bands in BamH I restriction pattern of ctDNA from the two lines. Three gene probes of 32kd protein, cytochrome b6 and photosystem II p680 chlorophyll a apoprotein were hybridized to the DNA fragments of ctDNA digested by BamH I. No homology was found in the different regions of the two lines. The four recombinant plasmids were digested by BamH I and hybridized to photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein gene probe and rRNA gene probe (12kb DNA fragment from maize ctDNA inverted repeat region). The result shows that three of the four special fragments are homologous to the rRNA gene probe. This indicates that these three fragments related to male-fertility are located at the chloroplast genome's inverted repeat region.

## Key words

Location; male-fertility; chloroplast genome

## Explanation of plate

- A and B. Agarose gel(1%) electrophoresis of ctDNAs digested with BamH I and EcoR I  
1. ctDNA from CMS 2. ctDNA from maintainer
- C. Agarose gel(1%) electrophoresis of ctDNAs digested with Bgl II  
1. DNA MW marker 2. ctDNA from maintainer 3. ctDNA from CMS line
- D. Low-melting-temperature agarose gel(1%) electrophoresis of ctDNAs digested with BamH I  
1. ctDNA from maintainer 2. ctDNA from CMS line
- E. ctDNAs from maintaining line and recombinant plasmids which have special fragments inserted into pBR322 BamH I recognition sites were digested with BamH I, then hybridized with P700 chlorophyll a apoprotein gene probe  
Arrow shows the location of the special DNA fragments
- F. ctDNAs from maintaining line and recombinant plasmids were digested with BamH I, then hybridized with 12kb DNA fragment from maize ctDNA inverted repeat region. Arrow shows the location of the special DNA fragments

王 虹等: 萝卜叶绿体DNA花粉育性特异片段的定位  
 Wang Hong et al., Location of DNA fragment related to  
 male-fertility in radish chloroplast genome

图版 I  
 Plate I

