

水稻腊质基因的分子克隆

王志亮 王宗阳 郑霏琴 郭小丽 洪孟民

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

利用 λ EMBL3为载体构建了水稻寒丰6366的基因文库, 重组噬菌体数日达 4×10^5 , 超过了要求的理论值。用缺口平移法标记玉米Wx基因DNA片段作探针, 从基因文库中筛选出阳性杂交克隆。对其中一个阳性克隆, λ Wx2的Southern分析表明, 它和玉米Wx基因编码区杂交。根据绘出的物理图, 将杂交区内一个0.4kb的BS片段克隆到M13上, 测定了DNA顺序。结果表明, 该区域内水稻和玉米Wx基因外显子DNA同源性在80%以上。这说明我们确实得到了水稻Wx基因克隆, 而且水稻和玉米的Wx基因是高度同源的。

关键词 基因文库; 水稻; 腊质基因; λ EMBL3载体

直链淀粉是稻米蒸煮、吃口与加工质量的重要因素之一, 因此也是水稻育种中必须考虑的问题^[1]。不同品种水稻的米粒中直链淀粉的含量有很大的差别。Khush等^[2]报道了水稻第3号染色体上的腊质基因(简称Wx基因)控制着胚乳中直链淀粉的合成。与水稻Wx基因相比, 玉米中的Wx基因被研究得比较详细^[3]。近年来, Sano等^[4]从水稻中也鉴定出了结合在淀粉粒上的Wx蛋白, 分子量为60kd, 它的含量与水稻三倍体胚乳中Wx⁺基因的剂量有一定的比例关系, 在Wx⁻的胚乳中, 没有Wx蛋白, 也没有直链淀粉。因此, 水稻与玉米Wx基因的特性在很多方面十分相似, 为了研究水稻Wx基因的结构与该基因表达的调控机理, 我们构建了一个粳稻品种的基因文库, 以玉米Wx基因的DNA作探针, 从文库中筛选出了水稻的Wx基因。

材料和方法

(一)材料

1. 植物材料: 粳稻 (*Oryza sativa*

subsp. *japonica*) 寒丰 6366(Wx⁺), 含直链淀粉21%(按Williams方法测出^[5]) 上海农科院作物所提供。

2. 细菌和 λ 噬菌体株系: *E. coli* K802, *E. coli* Q359(P₂)和VCS257菌株是 λ EMBL3^[6]噬菌体的宿主菌或指示菌。

3. 试剂: 限制酶、T4DNA连接酶和缺口平移反应盒等试剂购自BRL公司 λ 噬菌体DNA体外包装盒是Gigpack公司产品; 核苷酸顺序分析试剂盒买自Biolabs公司; 5'- α -³²P-dATP是Amersham公司产品; 硝酸纤维膜是上海医工院产品。

4. 含有玉米Wx基因的pWx质粒系Dr. N. Fedoroff惠赠^[7]。

(二)方法

1. 供体DNA片段的制备: 水稻寒丰6366的种子萌发后, 在25℃, 人工光照条件下生长三星期, 收取叶组织用液氮速冻, 在液氮中研磨成细粉, 然后按Schwarz-Sommer的方法^[8]抽提水稻总DNA, 再按照Maniatis的方法^[9]用Mbo I部分酶解总DNA, 通过10—40%蔗糖

本文于1989年2月27日收到。

密度梯度超离心回收15—20kb DNA片段用作供体。

2. 载体DNA的制备: 按T. Maniatis的方法^[9] 抽提出噬菌体λ EMBL3的DNA, 参照 Frishauf 的方法^[9] 双酶解(EcoR I 和BamHI)载体DNA, 异丙醇沉淀去掉EcoRI和BamHI之间的DNA小片段以消除载体自连的可能性。

3. DNA的连接和体外包装: 供体和载体DNA按1:1比例混合, DNA浓度不小于200μg/ml。加MgCl₂至10mmol/L 42℃保温60min再慢慢冷却至12℃。加入连接缓冲液和连接酶^[9], 12℃连接过夜。连接好的DNA用苯酚:氯仿(1:1)抽提一次, 氯仿抽提一次, 乙醚抽提一次。乙醇沉淀DNA, 最后溶于少量TE缓冲液(10mmol/L Tris, 1mmol/L EDTA)待用。取3μl按Gigapack公司体外包装盒说明进行体外包装, 用P₂溶源菌作受体菌测定包装反应物的效价。

4. 噬斑原位杂交: 按T. Maniatis的方法^[9]将噬斑转移到硝酸纤维素膜上, 然后进行分子杂交和放射自显影。

5. 缺口平移法标记探针: 按照BRL公司的缺口反应盒说明书进行, 但略作修改。每一反应体积30μl, 内含探针DNA 0.1—0.2μg, 同位素α-³²P-dATP 30 μCi, 3μl反应盒试剂(含dCTP、dGTP、dTTP各0.2mmol/L), 2.5μl酶(Pol I和DNase), 15℃保温60min。加入3μl 0.5mol/L EDTA以终止反应, 通过Sephadex G-50柱, 收集第一个放射性洗脱峰。

6. Southern杂交: 按Maniatis方法^[9]进行。

7. DNA顺序分析: 用两种方法同时进行。一是按照Biolab公司试剂盒说明书(双脱氧末端终止法)进行; 二是用ABI

公司的DNA顺序分析仪进行分析。

结 果

(一)基因文库的构建

为了从水稻中克隆出Wx基因, 我们首先构建了水稻总DNA基因文库。按照材料与方法所述, 得到了分子长度大于50kb的水稻总DNA。用限制酶Mbo I部分酶解水稻总DNA, 得到不同长度的DNA片段, 然后按适当条件大量酶解水稻总DNA, 酶解产物经10—40%蔗糖密度梯度超离心, 分离得到15—20kb的DNA片段, 将这些片段与双酶解的λ EMBL3载体DNA混合, 经T4DNA连接酶连接后进行体外包装。用P₂噬菌体的溶源菌Q359(P₂)测定, 体外包装混合物中含有4×10⁵个重组噬菌体。

二倍体水稻基因组的分子量约为3×10⁸kb^[10], 根据Clarke^[11]基因文库覆盖率的计算公式: $N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-F)}$, P

值选99%, F值为 $\frac{15}{3 \times 10^5}$, 即克隆片段平均长度为15kb时, 只要有1×10⁵个重组噬菌体即能覆盖整个水稻基因组。这样我们构建的水稻基因文库已达到了理论需要的数目。

(二)从基因文库中筛选阳性杂交克隆

我们将含有玉米Wx基因的pWx质粒DNA用EcoRI酶解, 从低熔点琼脂糖凝胶中回收带有Wx基因的10.6kb DNA片段。通过缺口平移方法标记成为有放射性的探针, 用原位杂交的方法找出阳性克隆。每一个阳性克隆都经过了三次单噬斑纯化, 图版I-A显示了单噬斑纯化后的原位杂交结果, 平皿上所有的噬斑均为阳性结果。

(三)水稻 Wx 基因克隆的鉴定

由于我们筛选时所用的探针是玉米 Wx 基因的 EcoRI 片段, 它还包含有玉米 Wx 基因编码区以外的若干顺序。根据 N. Fedoroff^[7] 的报道, 用 Sal I 酶解 pWx 质粒 DNA 可以得到 5.9, 4.5, 3.2, 2.0, 和 0.9kb 五个片段。其中大部分 Wx 基因编码顺序都在 2.0 和 0.9kb 两个片段上, 并且不含有编码区以外的顺序。如果我们得到的阳性克隆的确是来自于玉米的 Wx 基因顺序杂交所选出, 那么以这些阳性克隆作探针, 就只应与 2.0 和 0.9kb 两个片段杂交, 而不能与其它片段杂交。为此, 我们用阳性克隆 λWx2 的 DNA 做成探针, 与经 Sal I 酶解的 pWx DNA 片段进行 Southern 杂交试验(图版 I -B,C), 结果表明 λWx2 阳性克隆只与玉米 Wx 基因杂交。

接着我们又构建了阳性克隆 λ Wx2 的物理图以确证能与玉米 Wx 基因杂交的顺序所在部位。方法是用限制酶 Sal I、EcoRI、BamHI、和 Hind III 对 λ Wx2 DNA 进行单酶解和双酶解, 并在琼脂糖

凝胶上电泳(图版 I -D), 测定各个酶解片段的大小, 并排出了这四种酶的切点位置(图 1)。然后用玉米 Wx 基因的 EcoRI 片段作为探针, 经 Southern 分析(图版 I -E)测定出 λWx2 中能与探针杂交的区域(图 1), 结果表明这一杂交区是连续的, 其长度与玉米 Wx 基因相近, 物理图的类型也相似。

为了确证所得到的阳性克隆确实是水稻的 Wx 基因, 我们对杂交区中的一个片段进行了核苷酸顺序分析。为此, 将 λWx2 中带有玉米 Wx 基因同源顺序的 0.4kb 的 BS 片段克隆到噬菌体 M13mp18 和 M13mp19 上, 按 Sanger^[13] 的双脱氧末端终止方法, 用同位素标记和 ABI 公司的 DNA 顺序分析仪测定了它的顺序, 并将它和玉米基因的相应区域进行比较^[14](图 2)。结果表明二者具有高度的同源性, 特别是在外显子区域, 二者的同源性可达 85%, 而在内含子区域, 同源程度仅有 30%。从上述几方面分析结果表明, 重组噬菌体 λWx2 中含有水稻的 Wx 基因编码顺序。

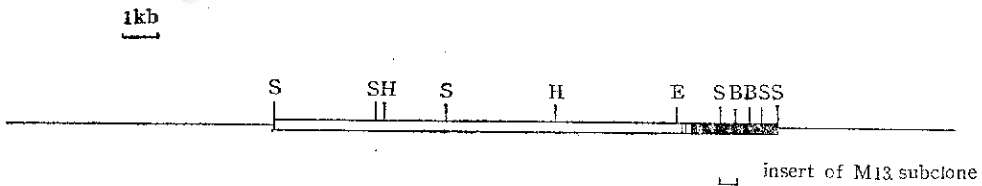


图 1 λWx2 的限制酶图

Fig.1 Restriction map of insert in recombinant λWx2

λ sequences are represented by a thin line. Rice DNA sequences are represented by a box. The cross-hybridization region are shown as solid bar. The symbols for restriction endonuclease sites are as follows: B: BamHI, E: EcoRI, H: Hind III, S: Sal I

讨 论

许多报道指出, 有些生物的同类基因, 其核苷酸顺序有很高的同源性。因此利用这些同源顺序作探针, 来筛选近缘生

物中的同类基因是一种方便而有效的方法。玉米与水稻都是禾本科单子叶植物, 它们的 Wx 基因都是负责胚乳中直链淀粉的合成, 作为基因产物的蛋白也都结合在淀粉粒上, 分子量也相似^[8], 两种蛋白之间还有免疫血清交叉反应^[12]。因此,

Rice	GTCGACCGTGTGTTTCATCGACCATCCGTCATTCCTGGAGAAGGTGGAGTC	
Maize	GTGGACCGCGTGTTCGTTGACCACCCACTGTTCCCTGGAGAGGGTGAGACG	1066
Rice	ATCATTAGTTTACCTTTTTTGTTTTACTGAATTATTAACAGTGCATTTA	
Maize	AGATCTGATCACTCGATACGCAATTACCACCCCATGTGAAGCAGTTACAG	1116
Rice	GCAGTTGGACTGAGCTTAGCTTCCACTGGTGATTTCAGGTTTGGGGAAAG	
Maize	TGAGCTTTTTTFCGCCCGGCCTGGTCGGTTTCAGGTTTGGGGAAAG	1166
Rice	ACCGGTGAGAAGATCTACGGACCTGACACTGGAGGTGATTACAAAGACAA	
Maize	ACCGAGGAGAAGATCTACGGGCCTGTGCGCTGGAACGGACTACAGGGACAA	1216
Rice	CCAGATGCGTTTCAGCCTTCTTTGCCAGGTCAGTGATTACTTCTATCTGA	
Maize	CCAGCTGCGTTTCAGCCTGCTATGCCAGGTCAGGATGGCTTGGTACTACA	1266
Rice	TGATGGTGGGAAGCATCAGAGTTTACCATAGTATGTATGGATTGATAAC	
Maize	ACTICATATCATCTGTATACAGCAGTATACACTGATGAGAAATGCATGCT	1316
Rice	TAATTCGTGATTGATGCTACCTGCAGGCAGCACTCGAGGCTCCTAGGAT	
Maize	GTT*****CTGCAGGCAGCACTGAAGCTCCAAGGAT	1348
Rice	CC	
Maize	CC	

图 2 λ Wx2 部分 DNA 顺序与玉米 Waxy 基因的比较

Fig. 2 Comparison of partial DNA sequences between the rice and maize Wx gene
划底线部分为玉米的内含子区域

The sequences are aligned to show the homology. The underlined is the maize intron sequence. Homology of exons is bigger than 80%

用已克隆的玉米 Wx 基因 DNA 作探针来筛选水稻的 Wx 基因应该是可行的。我们的实验结果也证明, 用含有玉米 Wx 基因的 10.6kb DNA 作探针, 不仅从水稻的基因文库中筛选出了有杂交强阳性的重组噬菌体, 而且所构建的杂交区的物理图也与玉米 Wx 基因很相似。特别是对所筛选出的水稻 Wx 基因中的一个 DNA 片段进行顺序分析所得到的数据说明, 外显子同源程度达到 80% 以上, 这更说明我们所得到的

重组噬菌体 λ Wx2 中含有水稻的 Wx 基因。

与玉米 Wx 基因一样, 水稻 Wx 基因也只在一定的发育阶段, 在特定的组织中表达。因此, 我们得到水稻 Wx 基因后, 不但可以对它进行表达调控机理的研究, 还可以从水稻与玉米 Wx 基因 5' 上游区调控顺序的异同来分析顺式调控因子的结构与功能, 以帮助对 Wx 基因表达调控机理的进一步了解。

参 考 文 献

[1] 闵绍楷, 熊振民: 水稻遗传和品种改良, 浙江科学技术出版社, 1983.

- [2] Khush, G. S. et al.: *Genetics*, 107:141—163, 1984.
 [3] Preiss, J.: *The Biochemistry of Plant*, 14:181—248, 1988.
 [4] Sano, Y.: *TAG*, 68:467—473 1984.
 [5] Williams, P. C. and Kuzina, F. D.: *Cereal Chemistry*, 47(4):410—415, 1983.
 [6] Frischauf, A. M. et al.: *J. Mol. Biol.*, 170:827—842, 1983.
 [7] Shure, M. et al.: *Cell*, 35:225—239, 1983.
 [8] Schwarz-Sommer, Zs. et al.: *The EMBO J.*, 3(5):1021—1028, 1984.
 [9] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
 [10] Sorenson, J. C.: *Advances in Genetics*, 22:109—156, 1984.
 [11] Clarke, J. and Carbon, J.: *Cell*, 9:91—98, 1976.
 [12] Okagaki, R. et al.: *Genetics*, 120, 1137—1143, 1988.
 [13] Sanger, F.: *Proc. Acad. Sci. U. S. A.*, 74: 5463—5468, 1977.
 [14] Klösgen, R. B. et al.: *M. G. G.*, 203:237—244.

MOLECULAR CLONING OF RICE WAXY GENE

Wu Zhiliang Wang Zongyang Zheng Feiqin

Guo Xiaoli Hong Mengmin

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai)

The genomic library of rice Hanfen 6366 was constructed by using the bacteriophage λ EMBL3 as a cloning vector. The obtained recombinant phages were 4×10^5 . It exceeded the necessary number of recombinants that represented an entire genome of rice. The positive clones were identified by in situ hybridization using the nick-translated maize waxy gene DNA fragment as probe. One of them, λ Wx2, was further studied through Southern blot hybridization and DNA sequencing. The results strongly suggest that λ Wx2 is the waxy gene clone of rice, and it is high homologous with the maize waxy gene.

Key words

Genomic library; rice; waxy gene; λ EMBL3 vector

图版说明 Explanation of plate I

A. Screening the genomic library of rice by in situ hybridization.

The nick-translated maize waxy gene DNA was used as probe. Made hybridization in 50% formamide, $5 \times$ Denhardt's, $5 \times$ SSPE, 0.1%SDS solution for 12h at 42°C. Washed the filters twice for 2h in $1 \times$ SSC, 0.1% SDS at 68°C, and made autoradiography.

B. The maize Wx gene clone pWx DNA was digested with Sal I. Five bands were seen, and two of them, 2.0 and 0.9 kb fragments, contain major structure region of Wx gene.

C. Hybridization was done using the nick-translated recombinant λ Wx2 DNA as probe. The autoradiography result suggests that 2.0 & 0.9 kb fragments are strongly hybridized.

D. Recombinant λ Wx2 DNA was digested with Sal I (1), Hind III (3), Sal I + BamHI (2), SalI + EcoRI (4) and made agarose gel electrophoresis.

E. Southern blot hybridization was done using the nick-translated maize Wx gene DNA as probe.

