

# 水稻线粒体 26S rRNA 基因在大肠杆菌 JM101 中的克隆及分子鉴定

徐琼芳 王京兆 王斌

(中国科学院遗传研究所, 北京 100101)

**摘要** 用 BT 型水稻喜峰 A 黄化苗为材料, 按本实验过去报道经修改后的方法提取线粒体 DNA, 经 EcoRI 完全酶切后, 随机克隆到 pUC19 载体上, 转化大肠杆菌, 在含氨苄青霉素 (50 $\mu$ g/ml) 和 X-gal 的 LB 固体平板上筛选白色转化子。随机提取重组子 DNA, 以玉米 26S rRNA 基因为探针, 经 Southern 分子杂交鉴定, 一个插入 1.3kb 水稻线粒体 DNA 片段的重组质粒杂交结果为阳性, 并将这

个含有 26S rRNA 基因片段的重组质粒命名为 pXMT1。

**关键词** 水稻;线粒体; 26S rRNA; 基因

线粒体不仅具有提供能量的重要功能,同时又是一种含有 DNA、RNA、核糖体和酶,并能进行转录和翻译,合成一些蛋白质的细胞器。由于它独立于细胞核,属母本遗传,具有某些独特的功能,因此,对它的研究,长期受到人们的重视。线粒体中存在着各种 RNA,均为线粒体中所特有。对于 rRNA 的研究,一直到

1967年人们才从线粒体中分离和鉴定了线粒体核糖体和线粒体 RNA<sup>[1]</sup>。在线粒体核糖体中存在三种 rRNA: 5S rRNA、18S rRNA 和 26S rRNA<sup>[2-4]</sup>。除 18S rRNA 在核糖体小亚基上外,5S rRNA 和 26S rRNA 存在于大亚基中。这些 rRNA 的基因由线粒体中的 DNA 所编码,它们在线粒体蛋白质合成中,起着极其

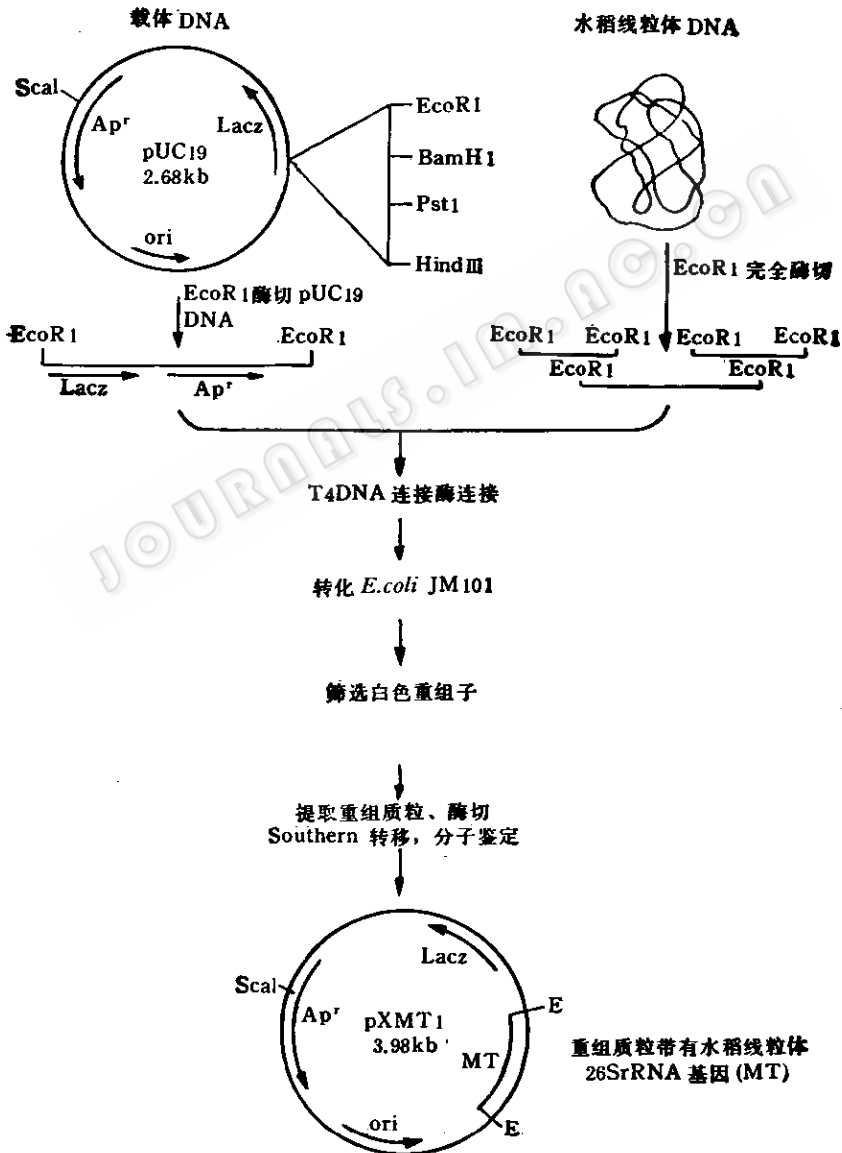


图1 水稻线粒体 DNA 分子克隆图

Ap<sup>r</sup>: 氨苄青霉素抗性基因 MT: 水稻线粒体 26S rRNA 基因片段

重要的作用。目前在研究植物线粒体 rRNA 中,除小麦线粒体 5S rRNA 的一级结构已测定,并比较了其进化关系外,对 26S rRNA 的研究,除小麦、玉米有报道外,对水稻 26S rRNA 的了解不多。

水稻是重要的粮食作物,研究其线粒体基因的结构与功能,了解核质间基因协调表达机制,具有非常重要的意义。本实验室已经克隆了水稻  $atp^A$ 、 $atp^6$  和  $atp^9$  等重要线粒体基因。但目前尚未见到国内有关 26S rRNA 的研究报道。本文报道水稻线粒体 26S rRNA 基因片段克隆情况,这对深入研究水稻 26S rRNA 基因的结构和功能,分析线粒体基因组 DNA 的多态性,以及研究水稻的遗传进化都具有重要的意义。

## 材料与方 法

### (一) 实验材料

实验所用的水稻种子为 BT 型喜峰 A,由北京农科院洪立方先生提供。尼龙膜购自 Biorad 公司, X-光片为富士产品,玉米 26S rRNA 基因探针由 Hauswith, W. W. 先生惠赠。

### (二) 试剂

T4 DNA 连接酶, EcoR1 内切酶购自 Boehringer mannheim 公司, 32p-dCTP 购自杜邦公司。

### (三) 菌种和质粒

所用受体菌株为 *E. coli* JM101, 克隆载体为 pUC19 质粒。pXMT1 重组质粒的构建见图 1。

### (四) 方法

1. 线粒体的制备:分离和纯化参照 Cheese 等人<sup>[1]</sup>的方法进行。

2. 线粒体 DNA 的制备参考 Kemple<sup>[6]</sup>, Cheese<sup>[5]</sup> 和本实验室以前发表的<sup>[7]</sup>经改进后的方法进行。

3. *E. coli* JM101 感受态细胞的制备按文献<sup>[8]</sup>方法进行。

4. 质粒 DNA pXMT1 的制备、分离、纯化参照文献<sup>[8]</sup>方法进行。

5. 重组质粒 pXMT1 的分子鉴定: 重组质粒 pXMT1 DNA 经 EcoR1 酶切,琼脂糖电泳后,转移到尼龙膜上,用玉米 26S rRNA 基因探针进行杂交, Southern 分子鉴定结果有阳性带出现。方法按 Biorad 公司的 Zeta-probe blotting Membranes 说明书进行。

## 结果与讨论

1. 重组质粒的构建: 线粒体 DNA 和载体 pUC19 质粒 DNA 的酶切、连接、转化、重组子的筛选,重组质粒的凝胶电泳鉴定等按文献<sup>[9]</sup>进行。构建过程见图 1。

2. 水稻线粒体 DNA 的制备: 水稻含大量的纤维素,是线粒体 DNA 提取最难的材料之一。按照以前报道提取水稻线粒体 DNA 的方法,不仅程序繁杂,得率低,而且容易污染核 DNA,特别是容易污染叶绿体 DNA。为了解决以上问题,我们采用很嫩的黄化苗提取 DNA。通过避光培养得到的材料可以除去大量叶绿体,在提取时可以减少大量叶绿体 DNA 的污染。线粒体的大小和密度与细菌接近,因而所用的器皿要先灭菌,再通过差速离心可以除去大量叶绿体和核 DNA。为了提高线粒体 DNA 产量和纯度,我们将原来的液氮保护研磨改为匀浆,每次匀浆 30 秒,稍等片刻再继续匀浆,反复 4 次。此外,在线粒体裂解时,提高蛋白酶 K

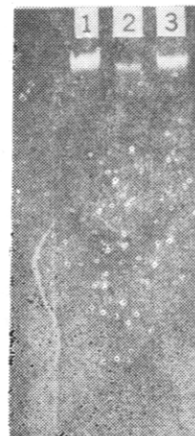


图 2 水稻线粒体 DNA 的 0.8% 琼脂糖电泳  
1 和 3 为水稻线粒体 DNA  
2 为  $\lambda$ DNA (约 43kb)

的浓度,延长裂解时间,即由原来的 37℃ 裂解一小时改为至少三小时。这样才能使线粒体得到充分裂解,从而提高了线粒体的得率,用此法提取的线粒体 DNA 纯而完整(图 2)。

3. 水稻线粒体 DNA 的克隆: 为了得到线粒体 26S rRNA 基因片段,首先将纯化后的线粒体 DNA 用 EcoR1 进行完全酶切。在电泳中,显示出均匀拖尾的不同分子量的 DNA 带(图 3),此结果证明 EcoR1 酶切水稻线粒体 DNA 比较完全。然后与 EcoR1 酶切后的载

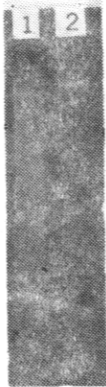


图 3 EcoR1 完全酶切水稻线粒体 DNA 电泳图  
1. EcoR1 完全酶切水稻线粒体 DNA  
2. 未酶切的水稻线粒体 DNA 对照

体 pUC19 质粒 DNA 连接,转化 *E. coli* JM 101 在含有 50 μg/ml 氨苄青霉素和 X-gal 的 LB 固体培养基上筛选转化子,得到 23 个白色重组子菌落。经电泳检测,有 7 个重组质粒比载体 pUC19 分子量大。用 EcoR1 酶切 7 个重组质粒 DNA,结果得到一株经酶切后只含有一条 DNA 片段(约 1.3kb)的重组质粒,命名为 pXMT1,其余的都含两条以上的 DNA 片段。此结果可能是由于原线粒体 DNA 没有完全彻底酶解的片段中还带有 EcoR1 位点所致。或者是在连接时,由两个以上 DNA 片段连接后,再连接到载体 pUC19 质粒上引起的,原因需进一步探索。

4. 含有 BT 型水稻喜峰 A 26S rRNA 基因片段重组质粒的分子鉴定: 为了鉴定重组质粒中带有 26S rRNA 的基因片段,用 <sup>32</sup>P-dCTP 标记玉米 26S rRNA 基因为探针,与 EcoR1 酶切后的重组质粒进行 Southern DNA 分子杂

交,结果只含有一条 1.3kb 的 DNA 片段为阳性杂交带,杂交结果证明此重组质粒中的外源基因片段为水稻 BT 型喜峰 A rRNA 基因片段。

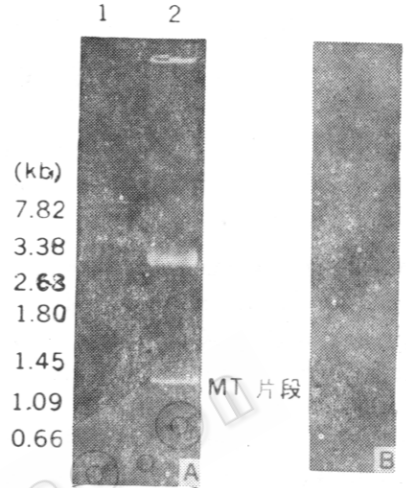


图 4 A: EcoR1 酶切重组质粒 pXMT1 琼脂糖电泳  
A<sub>1</sub>: EcoR1 酶切 SPP1 DNA 的标准分子量  
A<sub>2</sub>: EcoR1 酶切重组质粒 pXMT1 DNA  
B. A<sub>2</sub> 的 Southern 分子杂交阳性带

从图 4 中可以观察到,不仅水稻 26S rRNA 基因片段与玉米 26S rRNA 基因进行分子杂交呈阳性带,而且 pUC19 与玉米 26S rRNA 基因也有同源性。

植物线粒体基因组的研究落后于真菌和动物。在植物中,水稻线粒体基因组 26S rRNA 基因的研究又大大落后于小麦等植物,所以水稻 26S rRNA 基因片段的克隆,对水稻线粒体基因的结构与功能,以及遗传进化的研究有着重要意义。26S rRNA 基因片段的克隆,为分析水稻线粒体基因组 DNA 的多态性提供了极其有用的探针。

#### 参 考 文 献

1. 王德宝,祁国荣主编: 核酸(下册), p. 115 科学出版社,北京,1987。
2. Spencer DF et al.: *Biochemistry*, 20: 4022—4029, 1981.
3. Chao S et al.: *Plant Physiol.*, 71:190—193, 1983.
4. Chao S et al.: *Nucleic Acids Res.*, 12:6624—6629, 1984.
5. Chase CD et al.: *Plant Mol. Biol.*, 6:53—56, 1986.
6. Kemble RJ et al.: *Genetics*, 95:451—458, 1980.

7. 李大东,王 斌: 遗传, 12(4): 1—4, 1990.
8. Sambrook J. et al.: Molecular Cloning 1.21, C. S. H., 1989.
9. Eunpyo Moon et al.: *Nucleic Acids Researach*, 15: 611—630, 1987.

## MOLECULAR CLONING AND DETERMINATION OF RICE MITOCHONDRIA 26S rRNA GENE IN *ES- CHERICIA COLI* JM101

Xu Qiong fang Wang Jing zhao Wang Bin  
(*Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing 100101*)

Mitochondria DNA was isolated from darkgrown shoots of Xi Feng A according to the procedure reported previously. Mitochondria DNA was digested with EcoRI completely, and ligated with pUC19 vector DNA which was digested with EcoRI. The ligated DNA was transformed into *E. coli* JM101. The transformants were selected on LB medium which containing ampicillin 50ug/ml. All of the bacterial clones were hybridized with <sup>32</sup>P-labelled maize 26S rRNA gene, seven positive clones were obtained. The plasmid DNAs were isolated from the clones and digested with EcoRI and southern transferred to NC paper. The membrane was hybridized with maize 26S rRNA probe. One clone which a shortest hybridization band (1.3kb) was named pXMT1.

**Key words** rice; mitochondria; 26S rRNA; gene