

小麦叶绿体 *psbA* 基因 PCR 扩增及其克隆^①

于 玲^② 俞新大 张自立

(南开大学生物系, 天津 300071)

摘要 利用聚合酶链反应(Polymerase chain reaction)对小麦叶绿体的 *psbA* 基因进行特异性扩增, 并以 pBS⁺质粒为载体将完整的 *psbA* 基因克隆到 *E.coli* 中。通过分子杂交, PCR 反应和酶切分析证明, 重组质粒 pTD₁ II 中含有完整的小麦叶绿体 *psbA* 基因。

关键词 小麦 *psbA* 基因, PCR 扩增, 克隆

PCR Amplification and Cloning of the Wheat Chloroplast *psbA* Gene

Yu Ling^③ Yu Xinda Zhang Zili

(Department of Biology, Nankai University, Tianjin 300071)

叶绿体类囊体膜上, 有一种 32kD 的膜结合蛋白。它是光合系统 II 复合体的结构成份, 参与电子传递过程。该蛋白由叶绿体基因组中的 *psbA* 基因编码^[1]。研究发现均三氮苯类除草剂能与 32kD 蛋白特异结合, 阻断光合作用过程中电子传递。同时, 抗除草剂的 *psbA* 基因和对除草剂敏感的 *psbA* 基因分别编码的两种 32kD 蛋白仅有一个氨基酸之差^[1, 7, 8, 11], 由于 32kD 蛋白既与光合作用密切相关, 又决定着是否对除草剂产生抗性, 因此, 编码 32kD 蛋白的 *psbA* 基因的研究是非常必要的。目前, 一些植物的 *psbA* 基因已经克隆成功^[2, 13]。其中, 有些已经完成了 DNA 序列分析^[1, 13]。1981 年, Bowman 等^[5] 对小麦叶绿体基因组进行了限制性酶切图谱分析。1988 年, Linda Hanley-Bowdoin 等^[14] 对小麦 *psbA* 基因进行了定位, 并获得含有小麦 *psbA* 基因 5'-端的亚克隆, 对其 5'-端进行了核苷酸序列分析, 确定了转录起始位点。但小麦完整 *psbA* 基因的克隆及其表达的研究至今未见报道。本研究利用近年来发展的基因体外扩增技术(PCR), 对小麦叶绿体 *psbA* 基因进行特异性扩增, 并将扩增的完整 *psbA* 基因克隆进 *E.coli* 中, 为进一步研究 *psbA* 基因在原核生物中的表达及 *psbA* 基因的序列分析提供了必要的条件。

1 材 料 和 方 法

1.1 材 料

小麦种子 SC581 由本系周之杭教授提供。转化受体菌为大肠杆菌 JM105。克隆载体是 pBS⁺质粒。小麦 *psbA* 基因的 PCR 扩增反应试剂盒、限制性内切酶及其它工具酶均是华美公司产品。

1.2 小麦叶绿体 DNA 的制备

制备小麦叶绿体 DNA 主要参考龚小松等人的方法^[4]。但作如下修改: 小麦种子经温室培养, 在三叶期采

①本工作为天津市自然科学基金资助的项目。

②现工作单位: 西北师范大学生物系, 兰州 730070。

③Present Address: Department of Biology, Northwest Normal University, Lanzhou 730070。

其叶片 100 克, 立即放入冰箱 12—24 小时, 剪成 1 厘米左右, 放入预冷的匀浆器瓶中, 加入 400 毫升预冷的缓冲液 A, 均浆后用 12 层纱布过滤。滤液经 3 000rpm、4℃ 离心 8 分钟, 沉淀用 200 毫升缓冲液 B 悬浮, 并且以 3 000rpm 离心, 沉淀用 30 毫升溶液 C 悬浮, 再以 3 000rpm 离心, 沉淀先用 16 毫升溶液 D 悬浮, 再加由溶液 D 配制的 10% SDS 溶液 4 毫升, 蛋白酶 K (5ml/ml) 200 μ l, 于 37℃ 水浴中保温 5 小时, 叶绿体裂解后的溶液用 0.2mol/L Tris-饱和酚抽提 2 次, 再用酚-氯仿-异戊醇(PCIA)抽提 1 次(8 000rpm 15 分), 上清液加 1/2 体积的 7.5mol/L 乙酸铵, 并加 2 倍体积无水乙醇, -20℃ 过夜。次日, 以 10 000rpm 离心 15 分钟。收集 ctDNA 粗制品, 用 70% 乙醇洗一下, 真空抽干。溶于 TE 溶液, 加 RNA 酶(5mg/ml)5 μ l, 37℃ 水浴 1 小时, 再用饱和酚抽提 2 次, PCIA 抽提 1 次, 经无水乙醇沉淀后, 将 ctDNA 溶于 TE 溶液中, 4℃ 保存。

1.3 PCR 扩增小麦 *psbA* 基因

以提取的小麦 ctDNA 作为模板, 参考龙葵⁽¹⁾、豌豆⁽⁶⁾、蚕豆⁽¹²⁾等 *psbA* 基因序列, 人工设计、合成一段寡聚核苷酸片段作为扩增小麦 *psbA* 基因的上、下游引物序列。扩增反应体系由以下成份组成: 10 \times 缓冲液 10 μ l, dNTP (每种 200 μ M) 8 μ l, 引物(各 200 μ mol/L)各 4 μ l, 小麦 ctDNA 1—2 μ l(0.5—1 μ g)。总体积 100 μ l。首先, 将反应管放到 94℃ 水浴中 10 分钟, 然后, 再加 1 μ l Tag DNA 聚合酶(2.5U/每个反应), 混匀后在液面加 50—80 μ l 石蜡油, 72℃ 反应 5 分钟后立即开始按下面循环参数进行扩增反应。循环参数为: 94℃ 1.5 分钟, 50℃ 2 分钟, 72℃ 2 分钟。经过 35 个循环后, 最后在 72℃ 中反应 5 分钟, 以确保链延长完全。反应结束后, 加等体积的氯仿-异戊醇(24:1)抽提, 取上清液; 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.4 *psbA* 基因的克隆、筛选和鉴定

制备的 pBS⁺ 质粒用限制性内切酶 *Bam*HI 切成线状, 并经小牛肠碱性磷酸酶(CIP)脱磷酸作用后, 提纯制成载体。由于经提纯后扩增的 *psbA* 基因两端均具 *Bam*HI 识别位点, 所以经 *Bam*HI 酶切后与经相同酶切的 pBS⁺ 质粒连接转化 *E.coli* JM105。方法同文献(9)。用 Amp 平板(加有 X-gal 和 IPTG)筛选重组子。从阳性克隆中快速提取检测重组子 DNA, 并用 *Bam*HI 酶切检查重组质粒中插入片段的大小, 方法同文献(9)。

2 结果与讨论

2.1 小麦叶绿体 *psbA* 基因的 PCR 扩增及鉴定

将制备的小麦 ctDNA 酶切后用琼脂糖凝胶电泳检测(见图 1), 证明完全可以作 PCR 扩增目的基因的模板。已有的 *psbA* 基因序列分析资料说明, *psbA* 基因在植物进化中是高度保守的^(7,8,11)。根据已发表的一些植物的 *psbA* 基因核苷酸序列^(1,6,12), 以及小麦 *psbA* 基因 5'-端的起始序列⁽¹⁴⁾, 设计并人工合成了一段寡聚核苷酸片段作为扩增小麦 *psbA* 基因的上、下游引物, 其序列为:

上游引物: 5'GTGGATCCTGGTATTGGTTGACAC-OH

下游引物: 5'CGGGATCCTATCCACTTATAGATGG-OH

上游引物从启动子区域开始, 下游引物是包含 *psbA* 基因终止密码的一段 DNA。同时, 为了便于基因克隆、表达及序列分析等方面的研究, 在上下游引物 5'端分别加上了限制性内切酶 *Bam*HI 的识别序列。经 PCR 扩增反应后, 扩增产物经电泳检测发现只有一条分子量为 1.2kb 的特异性带, 与预期的 *psbA* 基因大小是一致的(见图 2)。利用该扩增系统, 我们还从蚕豆、玉米等作物中扩增到了相同大小的 *psbA* 基因, 说明该引物是扩增植物的 *psbA* 基因较通用的引物。这为研究其它植物的 *psbA* 基因提供了方便。



图1 小麦叶绿体 DNA *Bam*HI 消化片段的琼脂糖凝胶电泳
A. λ DNA *Hin*dIII 消化片段作分子量标准; B. 小麦叶绿体的 DNA 的 *Bam*HI 消化片段。

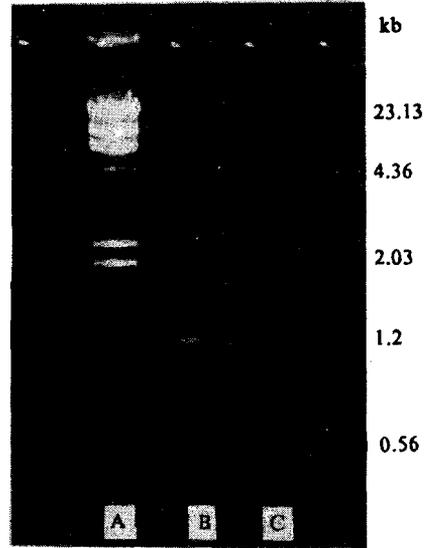


图2 PCR 扩增小麦叶绿体 *psbA* 基因及鉴定 pTD₁II 质粒 DNA 中插入片段的凝胶电泳分析
A. λ DNA *Hin*dIII 消化片段作分子量标准; B. 叶绿体 DNA 为模板的扩增产物(*psbA* 基因); C. pTD₁II 质粒 DNA 为模板的扩增产物。

2.2 小麦叶绿体 *psbA* 基因的克隆

经 PCR 扩增反应获得小麦叶绿体 *psbA* 基因后, 利用 pBS⁺质粒 DNA 作为载体进行体外重组和转化。用含 Amp、X-gal 和 IPTG 的 LB 平板筛选, 并对每个筛选的阳性克隆进行快速 DNA 鉴定。测定结果表明, 重组质粒 DNA 的分子量均大于非重组质粒 DNA。并发现由于插入片段大小不等使重组质粒彼此间的分子量差异很大。经鉴定有些插入片段为缺失一段序列的不完整 *psbA* 基因。实验表明, 经 PCR 扩增后获得完整 *psbA* 基因的克隆存在一定难度。

Junko Tsudzuki 等在对 Black pine 叶绿体 *psbA* 及其它基因的研究中⁽¹⁰⁾, 也发现 *psbA* 基因克隆难度很大, 仅获得缺失 103bp 的不完整 *psbA* 基因的克隆。李育庆等⁽³⁾ 提出 PCR 扩增产物末端呈平头, 且 5'端是 OH, 而载体 DNA 的 5'端含磷, 也是导致克隆效率降低的原因。我们通过实验发现, 尽管 PCR 扩增产物双链 *psbA* 基因的克隆存在一定难度, 但如果对引物设计合理, 分别在上下游引物的 5'端加上 *Bam*HI 的识别位点, 那么, 经扩增获得 *psbA* 基因后, 先用 *Bam*HI 酶切, 使 *psbA* 基因末端呈粘性, 同时对载体 DNA 进行 CIP 处理使其末端脱磷酸化, 再进行体外重组, 是能够获得完整 *psbA* 基因克隆的。

2.3 含有 *psbA* 基因的重组质粒的鉴定

为证明重组质粒中含有的插入片段是完整 *psbA* 基因, 首先, 分别提取重组质粒 DNA, 并用 *Bam*HI 酶切, 通过琼脂糖电泳分析, 发现重组质粒 pTD₁II 中含有的插入片段分子量为 1.2kb, 与 *psbA* 基因扩增带的大小一致(图 3)。初步说明该重组质粒内的 1.2kb 插入片段确实是小麦叶绿体 *psbA* 基因, 利用³²P 标记的蚕豆 *psbA* 基因为探针, 与该重组质粒进行点杂交, 并以 pBS⁺质粒 DNA 为对照, 放射自显影, 结果显示阳性, 表明重组质粒 pTD₁II 中确实含有 *psbA* 基因。我们进一步用 pTD₁II 质粒 DNA 作模板, 采用上述用于扩增小麦叶绿体 *psbA* 基因时的上下游引物, 进行特异性扩增反应, 扩增产物与小麦 ctDNA 为模板扩增得到的 *psbA* 基因带比较大小相同(图 2)。从另一角度证实 pTD₁II 质粒中含有完整 *psbA* 基因。实验还进一步对 pTD₁II 质粒进行酶切电泳分析(图 4)。由于已知 pBS⁺质粒 DNA 本身具有上述所用酶的单一识别位点, 故根据电泳图谱可确定小麦 *psbA* 基因内部不存在

EcoRI、*BamHI*、*PstI* 的酶切位点, 有 *HindIII* 单一酶切位点。

体外扩增、克隆 *psbA* 基因是植物抗除草剂基因工程研究的基础性工作。本实验利用 PCR 方法从小麦叶绿体 DNA 中扩增出 *psbA* 基因并克隆。简化了特定基因体外重组的程序, 为其它各种植物叶绿体基因的扩增、克隆及进一步研究提供了实验依据, 也为研究小麦 *psbA* 基因的表达创造了必要的条件。

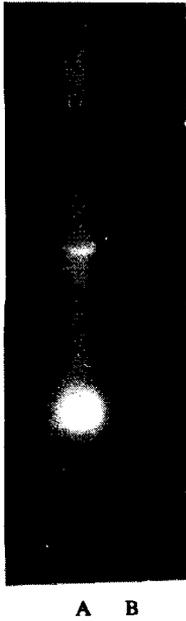


图3 pTD₁II 质粒 DNA *Bam*HI 消化片段的凝胶电泳分析
A. 扩增的小麦叶绿体 *psbA* 基因; B. pTD₁II 质粒的 *Bam*HI 消化片段。

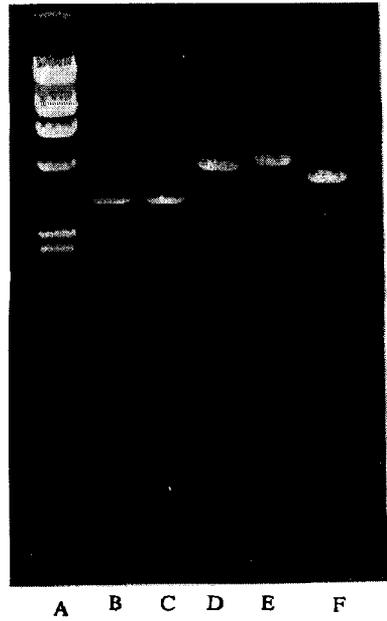


图4 pTD₁II 质粒的酶切电泳分析
A. λ DNA *Hind*III 消化片段作为分子量标准; B. pTD₁II 经 *Bam*HI 消化; C. pBS⁺ 质粒 DNA 经 *Bam*HI 消化; D. pTD₁II 经 *Eco*RI 消化; E. pTD₁II 经 *Pst*I 消化; F. pTD₁II 质粒经 *Hind*III 消化。

参 考 文 献

- (1) 朱立煌等, 1989. 遗传学报, 16(5): 381—388.
- (2) 朱立煌等, 1986. 遗传学报, 13(6): 403—410.
- (3) 李育庆等, 1992. 植物学报, 34(9): 651—657.
- (4) 龚小松等, 1991. 科学通讯, 6: 476—469.
- (5) Bowman C W, *et al*, 1981. Mol. Gen. Genet., 183: 93—101.
- (6) Boyer S K, *et al*, 1986. Plant Mol. Biol., 6: 229—243.
- (7) Gurtis S E, *et al*, 1984. Plant Mol. Biol., 183: 93—101.
- (8) Hirshberg J, *et al*, 1983. Science, 222: 1346—1349.
- (9) Sambrook J, *et al*, 1989. In: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- (10) Junko Tsudzki, *et al*, 1992. Mol. Gen. Genet., 232: 206—214.
- (11) Karabin G D, 1984. Nucl. Acids. Res., 12: 5801—5812.
- (12) Ko K, 1990. Nucl. Acids. Res., 18: 375.
- (13) Link G, *et al*: 1984. Nucl. Acids. Res., 12: 945—958.
- (14) Linda Hanley—Bowdoin, *et al*, 1988. Plant Mol. Biol., 10: 303—310.
- (15) Marder J B, *et al*, 1987. Plant Mol. Biol., 9: 201—210.
- (16) Mattoo A K, *et al*, 1984. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1380—1384.

本文于 1993 年 3 月 4 日收到。