

中国野生葡萄葛藟叶绿体 DNA 质粒文库的构建*

吴俊辉¹ 舒煦¹ 查晓¹ 李朝銮² 余平²

(¹四川省肿瘤研究所, 成都 610041)

(²中国科学院成都生物研究所, 成都 610041)

摘要 限制性内切酶 BamHI 水解中国野生葡萄葛藟 (*Vitis flexuosa* Thunb) 的叶绿体 DNA (cpDNA), 电泳分离为 34 条带, 最大为 11.7kb, 最小为 0.23kb, 分别用 pUC 和 pBR322 质粒克隆所得片段, 转化大肠杆菌, 并从转化菌中提取质粒 DNA, 经酶切电泳分析证明含有葛藟 cpDNA 经 BamHI 水解的不同片段, 从而构建了葛藟 cpDNA 的 BamHI 质粒文库。

关键词 质粒文库, 葛藟, 叶绿体 DNA

CONSTRUCTURE OF THE PLASMID LIBRARY OF cpDNA FROM VITIS FLEXUOSA IN CHINA

WU Jun-Hui¹, SHU Xu¹, ZHA Xiao¹, LI Chao-Luan², YU Ping²

(¹Sichuan Institute of Tumour, Chengdu 610041)

(²Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041)

Abstract Chloroplast DNA from *Vitis flexuosa* Thunb was digested with BamHI. The resulting fragments were cloned into plasmids pUC7, pUC9 and pBR322. The plasmid library of the BamHI fragments of cpDNA from *Vitis flexuosa* Thunb was obtained.

Key words Plasmid library, *Vitis flexuosa*, cpDNA

叶绿体 DNA 是植物染色体外遗传物质研究的主要对象之一, cpDNA 质粒文库的建立将为研究 cpDNA 的结构、功能、基因分布, 植物系统发育及进行植物改造等分子生物学工作奠定基础。目前国内已先后报道构建了一些植物的叶绿体 DNA 基因库, 如烟草^[1, 2] 绿豆和豌豆^[3], 菠菜^[3, 4], 油菜^[6], 蚕豆^[6], 窝苣^[7], 紫菀^[7] 等, 揭示出高等植物 cpDNA 的一些结构特点, 如分子大小, 基因的排列, rRNA 基因的反向重复顺序等。葡萄属植物的 cpDNA 文库国内外尚未见报道。我们在进行葡萄叶绿体 DNA 限制性酶谱的比较研究 (另文发表) 的同时, 选择葛藟 cpDNA 完成了 BamHI 文库。如果进一步利用这一文库详细研究葡萄叶绿体 DNA 及某些基因的结构特点, 并与不同亲缘关系的植物叶绿体 DNA 的结构进行比较, 可以得出叶绿体在葡萄科植物分子水平上某些重要的系统发育进化的信息, 在系统学研究上有重要意义。

·国家自然科学基金和中科院生物分类区系资助项目

1993-02-15 收稿, 1993-06-08 修回

材料和方法

1. cpDNA 的提取

cpDNA 按本研究小组设计的热处理法提取^[8], 叶片在匀浆液(8%蔗糖, 50mmol/L Tris. Cl pH8.0, 5mmol/L EDTA, 1mol/L NaCl, 0.2mol/L KCl, 10mmol/L Vitamin C, 5mmol/L Na₂S₂O₅, 2mmol/L β-巯基乙醇)中组织搅切机搅切后, 过滤去粗渣, 收集滤液中的叶绿体粗品经35%—75%蔗糖梯度离心纯化, 用蛋白酶 K 水解叶绿体并加热至85℃灭活杂酶, 沉淀 cpDNA 并经 Sepharose 4B 柱层析纯化。

2. 重组片的准备

将纯化的葛藟 cpDNA 用限制酶 BamHI 作完全水解。因较大分子的 DNA 片段在鸟枪法重组中机遇较低, 所以另取水解后的 cpDNA 以低熔点琼脂糖分离 6kb 以上片段, 纯化后备用。操作按文献[9]进行。

3. 载体的准备

考虑到葛藟 cpDNA 的 BamHI 水解产物含有与载体 pUC 或 pBR322 片段大小相似的片段, 这种片段即使被克隆也难以通过电泳判断, 给筛选造成困难, 所以采用 pUC 和 pBR322 两种载体共同克隆, 使与 pUC 相似大小的片段由 pBR322 筛选, 反之, 则由 pUC 筛选。操作按文献[9]进行, 所提取的 pUC7, pUC9 和 pBR322 DNA 用 BamHI 水解后, 用牛胰碱性磷酸酶去除末端磷酸, 再经 Sepharose 4B 柱层析纯化后备用。

4. cpDNA 的克隆

克隆按文献[9]进行。将葛藟 cpDNA—BamHI 酶切样品(包括未分离样品及分离的 6kb 以上片段)分别与载体 pUC 和 pBR322 的 BamHI 酶切片段进行连接反应后, 载体为 pUC 的连接液对宿主菌 JM101 转化, 载体为 pBR322 的连接液对宿主菌 HB101 和 DH5 转化。JM101 转化菌液涂布于含异丙基-β-硫代半乳糖苷(IPTG)和 5-溴-4-氯-3-吡啶半乳糖苷(X-Gal)的 LB 平板上筛选白色菌落并编号; HB101 和 DH5 转化菌液采用氨苄青霉素十四环素(Ap+Tc)的双抗平板筛选 Ap^rTc^s重组子, 编号。再对所选重组菌落进行快速质粒抽提, BamHI 水解, 以 λDNA 的 PstI 水解产物为分子量标准, 以葛藟 cpDNA 的 BamHI 水解产物为对照, 电泳分离, 筛选出含有不同插入片段的重组质粒, 定名, 编号。

结果和讨论

葛藟 cpDNA 经 BamHI 水解后, 电泳分离为 34 条条带, 经薄层扫描定量结果, 第 3, 6, 7, 25, 27, 33 为双倍量 DNA 带; 第 13 为三倍量 DNA 带, 最大条带为 11.7kb, 最小条带为 0.23kb, cpDNA 分子量共 129.4kb (另文待发表)。本文共筛选由 pUC7、pUC9、pBR322 为载体的克隆 817 株, 进一步经重组质粒酶切电泳筛选, 得克隆株 34 个, 按载体不同分别命名为有不同下标号的 pUV 或 pBV。这 34 株克隆所含外源片段与葛藟—BamHI 酶谱中电泳带对应, 见图 1, 2, 3 和表 1。筛选所得的含不同插入片段的克隆株数目比例也相对地与葛藟—BamHI 图谱中各条带的荧光亮度及扫描定量的结果相吻合, 即选出的二倍量和三倍量 DNA 带的克隆多于邻近的单倍量 DNA 带的克隆株数。在筛选中, 扫描定量为一倍 DNA 量条带的克隆以单株保存, 或确实相同的克隆株采用合并保存; 扫描定量为二倍或三倍 DNA 量条带的克隆株均由电泳条带相同或相似大小的克隆株合并保存(表 1), 因这些多倍量 DNA 带可能反向重复顺序或迁移率相同或相近的不同片段, 电泳分离区别不开, 故混合保存以便以后杂交选择进一步确

定其结构。

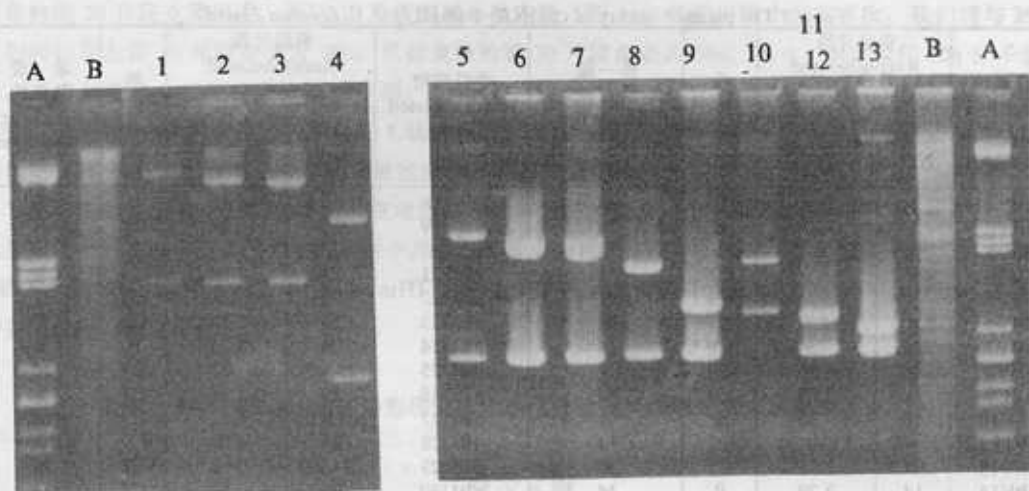


图 1 葛藟 cpDNA BamHI 1—2 片段克隆株质粒经 BamHI 酶解后的电泳图, 第 1, 2, 3, 10 载体为 pBR322, 其余为 pUC。A 为 λ -PstI, B 为 cpDNA-BamHI marker。

Fig. 1 BamHI restriction patterns of *V. flexuosa* Thunb cpDNA plasmid library. The vectors of 1, 2, 3 and 10 are pBR322; and others are pUC. A (λ -PstI) and B (*V. flexuosa* Thunb cpDNA-BamHI) are markers.

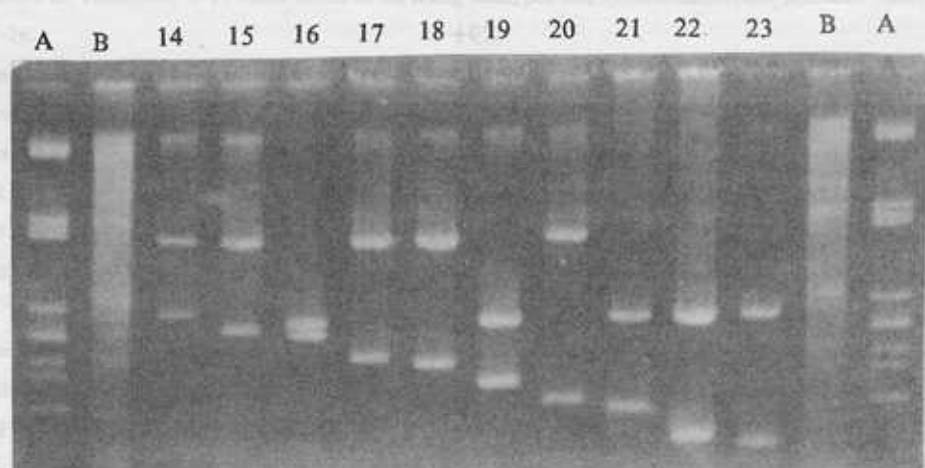


图 2 同图 1, 第 14—23 片段。其中 14, 15, 17, 18, 20 片段的载体为 pBR322 其余为 pUC。

Fig. 2 Continuation of Fig. 1. The vectors of 14, 15, 16, 17, 18, 20 are pBR322 and others are pUC.

由于葛藟 cpDNA-BamHI 酶谱中有几处相邻大小的 DNA 片段分子量较接近, 电泳时很难确切分开, 在克隆筛选时, 也很难通过电泳鉴定, 见图 1 中 pUV11, 12 及图 3 中 pUV26, 27, 28 克隆株, 其中 pUV11, 12 为两株混合, 分别克隆了第 11 和第 12 片段。而 pUV26, 27, 28 中, 第 26, 28 均为单株, 第 27 为混合株 (表 1), 其中可能混有第 26 或第 28 克隆株。

表1 葛藟 cpDNA-BamHI 质粒文库一览表

Table 1 The plasmid library of cpDNA-BamHI from *V. flexuosa* Thund

重组质粒 Recombelated plasmid	重组片段 Recombelated fragment		载体 Vector	单一或 混合株 Single or mixed strain	重组质粒 Recombelated plasmid	重组片段 Recombelated fragment		载体 Cector	单一或 混合株 Single or mixed strain
	编号 NO.	分子量(kb) Molecular Size				编号 NO.	分子量(kb) Molecular Size		
pBV1	1	11.7	B	M	pBV18	18	2.15	B	S
pBV2	2	10.5	B	M	pBU19	19	2.02	C7	S
pBV3	3	9.7	B	M	pBV20	20	1.73	B	S
pBV4	4×2	6.7	C7	M	pBU21	21	1.68	C9	S
pBV5	5	5.3	C9	S	pBU22	22	1.38	C9	S
pBV6	6×2	5.1	C7	M	pBU23	23	1.30	C7	S
pBV7	7×2	4.9	C9	M	pBU24	24	1.25	B	S
pBV8	8	4.35	C9	S	pBU25	25×2	1.21	C7	M
pBC9	9	3.55	C9	M	pBU26	26	1.16	C7	S
pBV10	10	3.30	B	S	pBU27	27×2	1.11	C7	M
pBV11,12	11+12	3.2+3.14	C7	M	pBU28	28	1.07	C9	S
pBV13	13×3	2.95	C7	M	pBU29	29+30b	0.83+0.57	C7	M
pBV14	14	2.79	B	M	pBU30	30a	0.58	C7	M
pBV15	15	2.74	B	S	pBU31	31	0.53	C7	S
pBV16	16	2.49	C9	M	pBU32	32	0.39	C7	M
pBV17	17	2.25	B	S	pBU33	33×2	0.31	C7	M
					pBU34	34	0.23	C7	M

表注 B: pBR322, C7: pUC7, C9: pUC9,

×2, ×3: 酶谱中电泳扫描为二倍量或三倍量的 DNA 片段 the quantity of DNA fragments are double or triple in restriction patterns and scanning maps.

29+

A B 24 25 26 27 28 30b 30a 31 32 33 34 B A

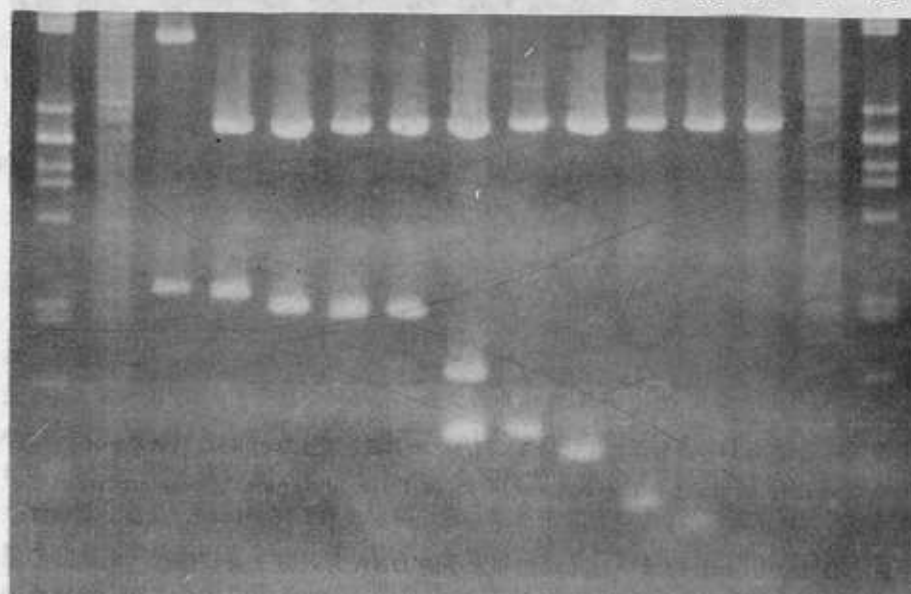


图3 同图2. 第24—34片段, 第24片段载体为pBR322, 其余为pUC, 参见表1。

Fig. 3 Continuation of Fig. 2 The vectors of 24 is pBR322 and others are pUC.

在进行克隆的 BamHI 酶切筛选中发现, 第 29 片段总是与第 30 片段同时被克隆在 1 个载体上, 没有单独的 29 片段克隆出现, 而第 30 片段则被单独克隆 (图 3), 并在实验中出现多次。我们将与 29 片段同时出现在第 30 片段命名为 30b, 单独克隆的第 30 片段命名为 30a, 其中, 30b 似较 30a 分子量稍大, 二者可能是分子量相近的不同序列。在葛晶 cpDNA 的 BamHI 酶谱中还可见 1 条较正常一倍量 DNA 条带荧光更浅的条带, 分子量约 1.4kb, 与第 29 和 30 片段的分子量之和相当。但这些现象不能解释第 29 片段为什么能在酶谱中以正常量出现却不能被单独克隆。

葛晶 cpDNA-BamHI 第 15 片段在电泳酶谱中荧光亮度正常, 为一倍量 DNA 带, 但挑选克隆时只挑选到 1 个, 精确定量分子大小时, 这个片段较酶谱中的相应片段小, 因此不能肯定是否确为第 15 片段 (图 2: 15)。有可能葛晶 cpDNA 的 BamHI 酶谱中的第 15 片段类似于克隆豌豆叶绿体基因组中遇到的干涉克隆过程的恒定序列^[3]。

致谢 电泳结果的扫描由四川省肿瘤研究所中心仪器室董昱和李文惠协助完成。

参考文献

- [1] Sugiura M, Shinozaki K, Zaita N *et al.* Cloning bank of the tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplast genome as a set of overlapping restriction endonuclease fragments: mapping of eleven ribosomal protein genes. *Plant Science*, 1986, **44**: 211—216.
- [2] Sugiura M. Structure and function of the tobacco chloroplast genome. *Bot Mag Tokyo*, 1987, **100**: 407—436.
- [3] Palmer J D, Thompson W F. Clone banks of the mung bean, pea and spinach chloroplast genomes. *Gene*, 1981, **15**: 21—26.
- [4] Erion J L, Tarnowski J, Weissbach H *et al.* Cloning, mapping, and *in vitro* transcription-translation of the gene for the large subunit of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase from spinach chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78**(6): 3459—3463.
- [5] 高家国, 何国顺, 汪训明等. 油菜叶绿体基因组文库的构建和 16s rRNA 基因及 16s-23s rDNA 间隔顺序的分离. *遗传学报*, 1987, **14** (1): 12—18.
- [6] 李加, 汪训明, 唐慷等. 蚕豆叶绿体 DNA BamHI 克隆库的构建及含 16s-23s rRNA 基因克隆的分析. *生物工程学报*, 1987, **3** (4): 247—253.
- [7] Jansen R K, Palmer J D. Chloroplast DNA from *Lettuce* and *Barnadesia* (Asteraceae): structure, gene localization, and characterization of a large inversion. *Curr Genet* 1987, **11**: 553—564.
- [8] 吴俊辉, 舒煦, 李朝鑫. 中国葡萄属植物叶绿体 DNA 的提取, 纯化及分子量测定, 云南植物研究, 1994, **16** (2): 178—186.
- [9] Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *Molecular Cloning. a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 150—152.