

# ② 水稻线粒体基因组中发现线性 DNA 分子的报道\*

843-846

Q949.714.2

郑佐华 汪训明<sup>✓</sup> 谈家桢

(复旦大学遗传学研究所, 上海 200433)

关键词 水稻、线粒体、基因组、脉冲电泳、组织结构

DNA

高等植物的线粒体基因组比较大, 一般从 200—2500 kb, 加上其组织结构相当复杂, 研究起来比较困难. 目前的研究途径主要是两条, 一是借助于脉冲电泳技术进行的, 如完整线粒体 DNA 的脉冲电泳分析、结合某些稀有酶切位点的限制性酶的酶切, 某些线粒体大分子 DNA 的大尺度物理图谱的构建; 二是构建线粒体基因组的物理图谱. 但因为线粒体结构比较复杂, 含有较多的重复序列, 构建图谱的难度较大, 而且构建的结果有待进一步的检验. 现今对高等植物线粒体基因组的总的认识是: 线粒体内存在大重复序列和许多小重复序列, 通过这些重复序列间的重组可能导致线粒体基因组的多分子化, 这些分子可能是环状的, 也可能是其它结构的.

水稻线粒体基因组的研究现状基本上与其它植物线粒体的研究水平接近. 日本的两个实验室报道了水稻线粒体基因组的物理图谱<sup>[1,2]</sup>. 他们提出了水稻线粒体基因组的三体模型<sup>[1]</sup>和基本环结构<sup>[2]</sup>. 但实验数据与他们的模型间有很大的差异, 表明水稻线粒体的结构远比这些模型复杂. 线粒体 DNA 脉冲电泳的结果也被提出, 但各实验室的结果有很大的差异.

本文的工作是通过脉冲电泳技术, 研究水稻完整线粒体基因组的组织结构. 首次在水稻协青早 A(矮败不育系) 线粒体 DNA 脉冲电泳的 Smear 区发现了一些能与线粒体基因组探针特异性杂交的条带, 推测这些条带对应线性的线粒体 DNA 分子. 实验还表明, 高分子量区的 DNA 的两条带存在结构上的差异. 其中一条带对核酸酶 S1 敏感, 另一条带则相对地不敏感. 这为进一步的研究打下了良好的基础.

## 1 材料和 方法

### 1.1 水稻协青早 A 线粒体的提取和插块的制备

按鹿炳伟等<sup>[3]</sup>制备水稻协青早 A 黄化苗的线粒体插块, 略作改动. 线粒体上超离心前, 先 DNaseI 处理; 之后线粒体悬浮液置于 Cushion Buffer (0.6 mol/L Sucrose, 25 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris-HCl) 上, 10000 r/min 离心 20 min (转头为 RPR20-2, 日立 20PR-52D), 沉淀用匀浆液悬浮. 其余相同. 4°C 保存待用.

1993-07-01 收稿, 1993-11-10 收修改稿.

\* 国家攀登计划基金和复旦大学遗传工程国家重点实验室开放基金资助项目.

匀浆液 3000 r/min 离心 10 min, 沉淀用匀浆液悬浮, 双层尼龙布过滤. 滤液 3000 r/min 离心 10 min, 沉淀用 DNase I Buffer (0.3 mol/L Sucrose, 10 mmol/L Tris-HCl) 悬浮, 加 1/100 体积 1 mol/L MgCl<sub>2</sub> 和 20 μg/g 苗 DNase I, 0°C 60 min. 3000 r/min 离心 10 min, 沉淀用匀浆液悬浮后再离心一次, 得细胞核样品. 插块制备同上.

### 1.2 脉冲电泳分析

水稻线粒体样品插块和核插块走脉冲电泳. 电泳条件为: 0.5×TBE, 30s 脉冲, 165V 电压, 电泳 4h; 60s, 150V, 12h; 120s, 100V, 4h. 脉冲电泳仪为 Pharmacia 公司的产品(六角形电极).

### 1.3 印迹杂交分析

电泳后的凝胶用 20×SSC Southern 转移 24h 以上. 杂交探针为 *rrn26* (26S rRNA 的基因), *cox I* (细胞色素氧化酶亚基 I), *cox II* (细胞色素氧化酶亚基 II) 基因片段(由本所杨金水先生提供). 杂交仪为 Hybaid 公司的杂交炉, 具体方法和试剂见 Amersham 公司的 Blotting and hybridization protocols for Hybond™ membranes.

### 1.4 核酸酶 S1 分析

协青早 A 线粒体插块先用 PMSF(苯甲磺酰氟)处理, 然后用 10 倍体积 1×S1 Buffer 4°C 浸泡 60 min, S1 处理 60min(50μl 插块+100μl 酶切 Buffer+30US1). 走脉冲电泳, 条件同上, 参考《Molecular Cloning》相关章节.

## 2 结果和讨论

图 1(a), 为水稻协青早 A 线粒体 DNA 的脉冲电泳. 带 3 和带 4 的线粒体样品的电泳结果表明, 脉冲电泳下的水稻线粒体基因组主要由两部分组成, 其中的一部分为 50—150kb 的 Smear 区, 另一部分为高分子量的(1000 kb 以上)DNA 区. 这结果与 Bendich 等<sup>[4]</sup>的研究相近. 带 2 为细胞核样品插块对照, 没有观察到条带出现, 说明水稻染色体 DNA 由于过大以及大量蛋白结合, 在该电泳条件下是不出现的.

高强度 DNaseI 处理对线粒体 DNA 的结构似有影响. 图 1(a) 中, 带 3(10 μg DNaseI/g 苗, 0°C 作用 20 min) 的样品的 Smear 区分布比带 4(20 μg DNaseI/g 苗, 室温作用 60min) 的样品的 Smear 区大一些. 而且在带 3 的 550kb 左右处有一条清晰的条带, 在 Smear 区有一条清晰的条带, 在 Smear 区与该条带间尚有一、二条弱带; 带 4 的样品的 Smear 区仅在 100kb 以下.

用水稻线粒体基因 26S, *cox II* 及线粒体基因组专一的 *cox I* 探针杂交, 带 3 的 Smear 区都有一条清晰的条带, 大小为 150kb(见图 1(b)). 表明这 150kb 的条带含有 *cox I*, *cox II*, 26S 基因或它们的部分顺序.

*cox I* 杂交表明, 除 150kb 的条带被杂交上外, 还有两条杂交信号较强的条带, 分别在 100kb 和 78kb, 其中 78kb 的条带信号弱于 100kb 的条带信号. *cox II* 除杂交上 150kb 条带外, 还在 100kb 左右有强的杂交信号, 无法判断是一条条带还是两条条带. *cox I*, *cox II* 的杂交中, 尚有一、二条弱带. 26S 杂交, 除 150kb 的条带外, 无明显区别于其它部分的带. Smear 区的其它部分和带 4, 只呈现较弱的杂交信号. 带 4 的杂交结果更说明了高强度的 DNaseI 处理对线粒体 DNA 结构的影响. 550kb 左右处也呈强杂交信号, 但似有杂物干扰, 有待证实.

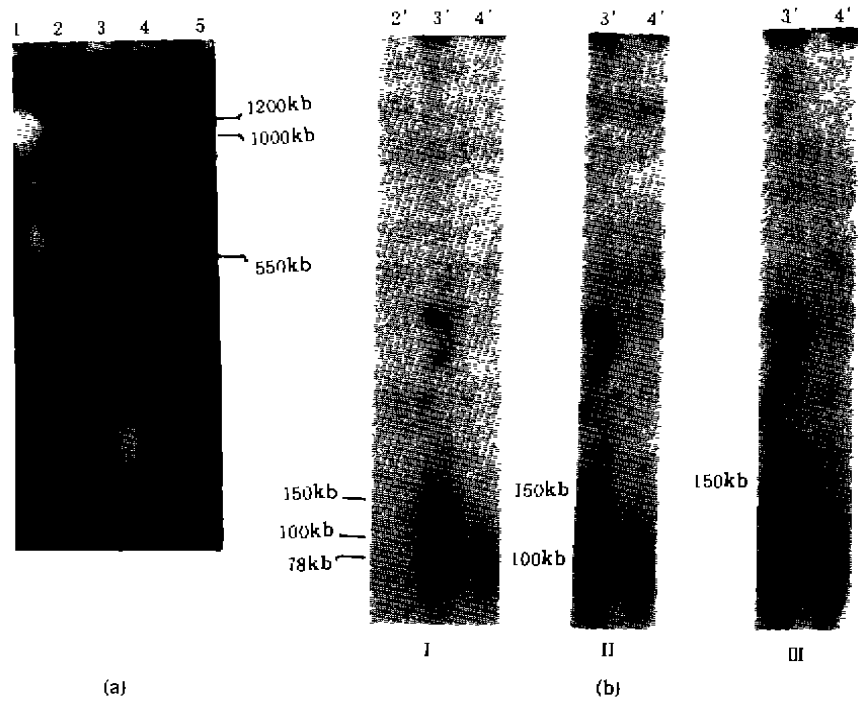


图1 水稻协育早A线粒体DNA的脉冲电泳及杂交分析

(a) 脉冲电泳, (b) 杂交分析. I. *cox I* 为探针, II. *cox II* 为探针, III. *rnl26(26S)* 为探针. 1——酵母染色体 marker, 2, 2'——细胞核插块; 3, 3'——线粒体插块  $10\mu\text{g/g}$  苗 DNaseI,  $0^\circ\text{C}$  作用 10 min; 4, 4'——线粒体插块  $20\mu\text{g/g}$  苗 DNaseI, 室温作用 60 min; 5—— $\lambda$  ladder marker

这些杂交呈阳性的 DNA 条带被推测是线性的. 这些条带有两种可能: 一是线性 DNA 分子; 二是 20—30kb 左右的环状 DNA 分子 (因为在该脉冲电泳条件下, 20—30kb 的 DNA 超螺旋分子的迁移率与 150kb 的 DNA 线性分子的迁移率相当). 如这些条带对应的是 20—30kb 的 DNA 超螺旋分子, 在图 1(b) 的带 4 中, 对应带 3' 的杂交阳性条带消失后, 应在 20—30kb 左右处出现杂交条带或杂交阳性区. 而实验结果表明并没有出现这个现象. 同时, 在目前小分子 DNA 的研究中, 也尚未发现过如此大小的带线粒体 *cox I* 等基因的 DNA 分子. 所以这些条带是 20—30kb 的环状 DNA 分子的可能性很小.

另外, 其它实验也表明这些条带是线性 DNA 分子的可能. 在叶绿体 DNA 的脉冲电泳研究中 (叶绿体的提取过程中也用 DNaseI 处理), 只出现线性的对应于单体和多聚体的 DNA 条带, 而很少有环状的 DNA 分子<sup>[4,5]</sup>. Narayanan 等将 IR36 的水稻线粒体插块用 Sse83871 部分酶切后, 用线粒体探针杂交得到的条带大小与我们的实验结果接近<sup>[9]</sup>, 只是我们实验用的是没有酶切处理的线粒体插块, 可能反映完整状态下的线粒体 DNA 组织方式.

这是至今为止首次在线粒体 DNA 脉冲电泳区 Smear 发现均一的 DNA 分子, 它们在大小上与 Iwahashi 提出的基本环的大小相近, 估计就是 Iwahashi 的那种基本环, 或类基本环. 这个发现, 有力地证实了植物线粒体内存在多分子结构的论断, 可能促进脉冲电泳对高等植物完整线粒体的研究. 结合某些稀有酶切位点的限制性酶酶切, 可以构建这些实在 DNA 分子的大尺度物理图谱.

至于这些线性 DNA 分子是否是线粒体内本来就存在的, 还无法作出判断. 550kb 左右的条带附近有非特异性杂交, 故无法对该条带作出明确判断. 这些都有待进一步的研究.

实验表明, DNase I 对线粒体 DNA 结构可能产生影响. 而在大多对线粒体 DNA 的研究中, 都用了较高强度的 DNase I 处理, 以去除核 DNA. 这些结果提示了目前对线粒体的提取方法上有值得改进之处.

如图 1(a) 协青早 A 高分子量 DNA 区有两条清晰的条带, 一条在 1000kb 左右, 另一条在 1200kb 左右. S1 对线粒体插块的分析表明, 1000kb 左右的 DNA 条带对 S1 敏感, 而 1200kb 左右的条带相对地不敏感, 提示这两条条带对应 DNA 分子的结构有所不同.

**致谢** 复旦大学遗传和遗传工程系 93 届本科毕业生金津同学协助完成部分工作, 在此表示感谢.

### 参 考 文 献

- [1] Yamato, K. et al., *Theor. Appl. Genet.*, 1992, **83**: 279—288.
- [2] Iwahashi, M. et al., *Theor. Appl. Genet.*, 1992, **84**: 275—279.
- [3] 鹿炳伟等, 中山大学学报论丛(自然科学), 1989, **8**(5): 38—43.
- [4] Bendich, A. J., Smith, S. B., *Curr. Genet.*, 1990, **17**: 421—425.
- [5] Deng Xin-wang et al., *PNAS USA (Genetics)*, 1989, **86**: 4156—4160.
- [6] Narayanan, K. K. et al., *Curr. Genet.*, 1993, **23**: 248—254.