

简报

苜蓿豆血红蛋白cDNA的分子克隆

荆玉祥

(中国科学院植物研究所, 北京)

Moo Je Cho

(Gyeongsang 大学农学院农化系)

鲍绍琦* 温杰 布里尔

(美国威斯康辛大学细菌学系)

豆血红蛋白是一种与动物肌红蛋白相似的蛋白,是共生固氮根瘤的蛋白。豆血红蛋白结合氧,并对固氮类菌体进行氧分压的调节。我们对苜蓿根瘤豆血红蛋白的组分、性质及其mRNA和合成的转译水平调节等进行了研究^[1-5]。本文在合成苜蓿豆血红蛋白cDNA的基础上报道其分子克隆的初步结果。

材料和方法

1. 植物培养参考文献[2]方法。
2. 苜蓿豆血红蛋白mRNA分离和血红蛋白组分的体外合成参考文献[3]和[6]方法。
3. cDNA合成和重组DNA质粒构建参考文献[4]和[7]方法。将pBR322质粒DNA和豆血红蛋白mRNA的cDNA重组成嵌合质粒,转化到*E. coli* HB101进行克隆。
4. 重组质粒的菌落筛选按文献[8]。
5. Southern^[9]吸收杂交:用大豆豆血红蛋白cDNA^[7]与重组质粒中的cDNA进行分子杂交

6. 杂交选择和俘获转译

按参考文献[10]方法进行杂交选择和俘获转译。对杂交选择转译,可将30 μ g含pBR322和cDNA插入片段的线形DNA点到硝酸纤维素纸上,然后将其放在用0.5mol/L NaOH和1.5mol/L NaCl浸泡过的Whatman 1号纸上,使DNA

碱变性。用2.0mol/L Tris-HCl (pH7.4)和2 \times SSC溶液中和洗涤,然后将硝酸纤维素纸空气干燥,于80 $^{\circ}$ C下真空干燥2h。用剪刀将结合DNA的硝酸纤维素纸剪成小片,再用含50%甲酰胺,40mmol/L pipes(pH6.4),0.75mol/L NaCl,2mmol/L EDTA,0.4% SDS和100 μ g/ml poly(A) RNA的杂交缓冲液在45 $^{\circ}$ C进行预杂交4h,然后去除预杂交缓冲液,接着用具有10 μ g的poly(A⁺)-mRNA杂交缓冲液在45 $^{\circ}$ C杂交12h。杂交后保留没有杂交的Poly(A⁺)-mRNA溶液进行杂交俘获转译,将有杂交选择的mRNA的硝酸纤维素纸片洗涤,去除没有杂交的mRNA,的然后将被选择的mRNA从硝酸纤维素纸上洗脱下来,酒精沉淀。用所述方法^[1-3]对被选择的mRNA进行体外转译,同时将上述杂交后所保留在溶液中没有被杂交的mRNA溶液进行体外杂交俘获转译,免疫沉淀^[7],双向凝胶电泳分析,荧光增效和自显影观察^[11]。

结果和讨论

从根瘤分离Poly(A⁺)-mRNA,然后合成双股cDNA,并用人工合成的Sal I多聚核苷酸接头接到双股cDNA,插到pBR322的Sal I位点,

本文于1987年4月18日收到。

* 现在地址:美国西特斯农业遗传公司

这样使四环素抗性基因失活(Tet^r)，保留氨基青霉素基因抗性(Amp^r)。用抗生素抗性筛选 HB101 转化子，并用³²P标记的mRNA 和大豆血红蛋白的cDNA 探针^[7]进行菌落原位杂交，进一步筛选500Amp^r和Tet^r菌落，结果得到两个克隆。杂交选择和杂交俘获转译进一步证实了其中一个苜蓿豆血红蛋白cDNA克隆(图1)。

苜蓿豆血红蛋白 Poly(A⁺)-mRNA可以合成包括豆血红蛋白在内的很多蛋白，像大豆根瘤

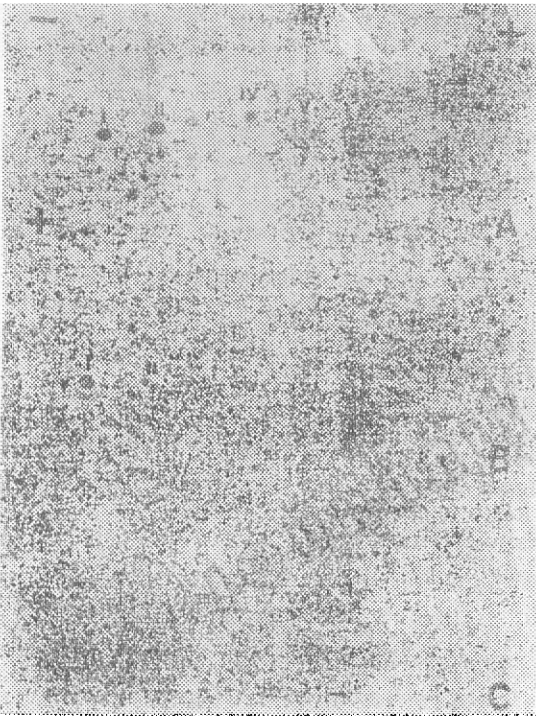


图 1 苜蓿根瘤的 Poly(A⁺)-mRNA 与 cDNA 杂交后转译产物双相凝胶电泳图

Fig. 1. Fluorographs of ³⁵S-methionine labelled polypeptides synthesized by poly(A⁺)-mRNA from alfalfa nodules in a wheat germ-cell free system separated by 2D-polyacrylamide gel electrophoresis

A. 用苜蓿豆血红蛋白抗体进行免疫沉淀的体外转译产物 B. 杂交俘获转译免疫沉淀的产物 C. 杂交选择转译的免疫沉淀产物。在A中的 I、II、IV 和 V 分别为苜蓿豆血红蛋白组分 I、II、IV、V。

A. *In vitro* translation products immunoprecipitated by an anti-alfalfa leghemoglobin antiserum B. hybrid-arrested and immunoprecipitated polypeptides C. hybrid-release translated polypeptides The polypeptide I, II, IV and V were Lb I, Lb II, Lb IV, and Lb V, respectively

一样，可以合成大约有 18—20 种根瘤特有的蛋白，称结瘤素。我们从苜蓿豆血红蛋白的不同 poly(A⁺)-mRNA 群体^[1-3]体外合成了 4 个豆血红蛋白组分和两个推测为未经剪接的 mRNA 产物(图 1A)。组分 I 和 II 为杂交俘获转译产物(图 1B)，组分 V 和两个未剪接加工的 mRNA 产物为杂交选择转译产物(图 1C)。这一结果似乎说明所选择到的克隆所含的 cDNA 可能是组分 V 的 mRNA，或是正如所讨论的未经剪接加工的 mRNA 前体合成的^[1-3]。

对被杂交的 cDNA 大小进行了测定，大约是 2.5kb。成熟的豆血红蛋白分子量约为 15000—20000 道尔顿，也就是说有 148—154 个氨基酸残基。从该蛋白分子量考虑，一个由成熟 mRNA 合成的完全长度的 cDNA 碱基应该不大于 500bp。在我们以前的文章^[1-3]中已经指出对一些较高分子量的体外转译产物的检测，而且它们可以被纯化的苜蓿豆血红蛋白抗体免疫沉淀。由于我们所分离的 RNA 方法没有将核的 RNA 和细胞质 RNA 分开，所以我们认为所得到的 cDNA 克隆可能是未经剪接的，或部分剪接的 mRNA 前体合成的，而且其 2.5kb 与所报道的含有三个大的插入顺序的大豆豆血红蛋白基因的大小是相一致

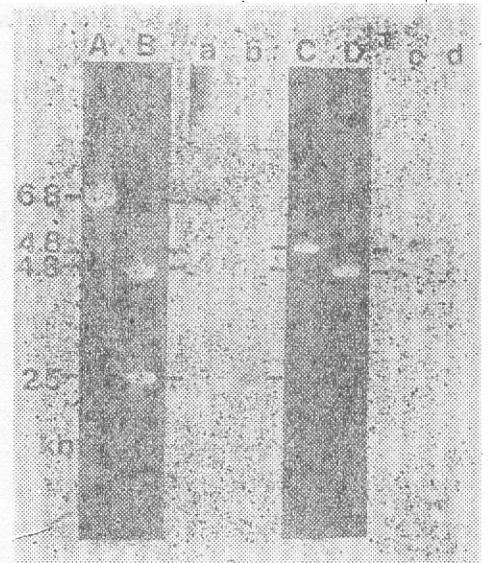


图 2 苜蓿豆血红蛋白cDNA 与大豆豆血红蛋白 P²⁴³¹cDNA^[7] 的 Southern 分子杂交
Fig. 2 Southern blot hybridization of alfalfa leghemoglobin cDNA to soybean leghemoglobin cDNA prepared from p2341

的 [12, 13]。

用大豆血红蛋白cDNA作探针进行Southern分子杂交 [17]，图2表示所克隆的质粒DNA具有与大豆血红蛋白cDNA杂交的能力。A为有pBR322和cDNA插入体的质粒DNA；B为A的Sal I内切酶的切割DNA；C为载有大豆血红蛋白cDNA克隆的pBR322作正对照；D为线性pBR322作负对照。a、b、c、d为A、B、C、D用缺口转译标记的大豆血红蛋白cDNA分别杂交的结果，说明我们重组的克隆的Sal I片段与大豆血红蛋白cDNA克隆有明显的同源性。图

3是克隆的苜蓿豆血红蛋白cDNA内切酶的物理图谱，可用于今后的顺序分析和作为探针选择核基因库中的豆血红蛋白基因。

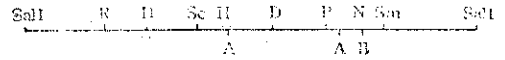


图3 从苜蓿豆血红蛋白mRNA所合成的cDNA的酶切物理图谱

Fig. 3. Physical mapping of the cDNA synthesized from alfalfa leghemoglobin mRNA
R, EcoRI, D, Ddel, Sc, SacI, H, HpaI, A, AvaI, P, PvuII, N, NruI, B, BstEII, Sm, SmaII

参 考 文 献

- [1] Jing, Y. et al.; *Plant Sci. Letter*, 25:119—132, 1982.
- [2] 荆玉祥等; *植物学报*, 25:220—226, 1983.
- [3] 荆玉祥等; *植物学报*, 25:431—436, 1983.
- [4] 荆玉祥; *植物学报*, 27: 263—270, 1985.
- [5] Jing, Y.; *Scientia Sinica*, B, 29:50—56, 1986.
- [6] Leaver, C. J. et al.; *Biochem. J.*, 123:235—243, 1971.
- [7] Truelsen, E. et al.; *Nucleic Acid Res.*, 6:3061—3072, 1979.
- [8] Grunstein, M. et al.; *Proc. Natl. Sci. Sci.*, 72, 3961—3964, 1975.
- [9] Southern E.; *J. Mol Biol.*, 98, 503—517, 1975.
- [10] Paterson, R.M. et al.; *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74, 4370—4374, 1977.
- [11] Roberts, G.P. et al.; *J. Bacteriol.*, 136; 267—279, 1978.
- [12] Brisson, N. et al.; *Can. J. Biochem.*, 60; 272—278, 1982.
- [13] Hylaig-Nielsen, J.J. et al.; *Nucleic Acid Res.*, 10:689—701, 1982.
- [14] Rigby, P.W.J. et al.; *J. Mol. Biol.*, 113:237—251, 1977.

MOLECULAR CLONING OF ALFALFA LEGHEMOGLOBIN cDNA

Jing Yuxiang

(*Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing*)

Moo Je Cho

(*Depart. of Agricul. Chem., College of Agricul., Gyeongsang
National University, South Korea*)

Alan S. Paau* Winston J. Brill*

(*Department of Bacteriology and Center for Studies of Nitrogen
Fixation, University of Wisconsin, Madison, WI 53562, USA*)

cDNAs were synthesized by reverse transcription of poly(A)-RNA containing leghemoglobin mRNA isolated from alfalfa nodules and inserted into pBR322 plasmid for its molecular cloning. Colony hybridization and Southern blot analysis were conducted with a cDNA probe of soybean leghemoglobin. Hybrid-selected and Hybrid-arrested translation were performed after the hybridization of cloned cDNAs of alfalfa leghemoglobin with its mRNA. The results confirm that the cloned cDNA encodes alfalfa leghemoglobin structural genes. Based on the cDNA size of 2.5 kb, it is likely that the cloned cDNA was synthesized from a putative unspliced leghemoglobin mRNA precursor as described in our previous papers. A physical map of the cDNA clone is determined with 9 different restriction enzymes.

Key words

cDNA clone; leghemoglobin; root nodule; alfalfa