

类质粒S-1与玉米和高粱基因组同源性的研究

谢友菊 刘明强 米景九 戴景瑞 彭学贤*

(北京农业大学, 北京)

在S型和N型玉米线粒体基因组中, 存在S-1、S-2类质粒的同源序列^[1,2]。研究表明, 在正常细胞质的线粒体DNA(mtDNA)主环(570 kb)上, 与S-1同源的这段序列位于6.9kb的BamH I片段之中^[3]。此外, 在N型玉米核基因组中, 也存在与类质粒S-1的同源序列^[4]。

本文研究内容有三方面: (1)利用不同于前述作者的材料, 进一步探讨与S-1同源的序列在正常细胞质自交系中存在的普遍性及其差异(2)利用克隆的S-1(比天然的S-1缺少两端的128bp)进行类似的研究, 以便探明用克隆的S-1代替天然S-1进行研究和利用的可能性(3)对高粱mtDNA与S-1的同源性问题进行研究。本文目的在于通过有关同源性的研究, 为今后利用S-1构建载体或作为载体, 促进外源基因转化单子叶植物进行初步探讨。

材料和方法

(一) 玉米和高粱 mtDNA 及玉米核 DNA (nDNA) 的制备

所用的玉米为Chao23、D69、C3、K64和荻白等五个自交系, 高粱为忻7杂交种。这两种作物mtDNA提取方法均按前报^[5]进行。玉米nDNA的提取方法参照Zuily-Fodil^[6]的方法并作了适当修改。

(二) DNA的酶切与电泳

线粒体和核DNA样品10—30 μ g, 按1—2酶活单位/ μ gDNA加入BamH I和中盐缓冲液以及BSA等, 37 $^{\circ}$ C水浴中温育2h, 用0.5mol/L Na₂EDTA(pH8.0)终止酶切反应, 室温下电泳。琼脂糖凝胶浓度为0.7—0.8%, 电压40V, 电泳液为TBE, 电泳18h。

(三) 类质粒S-1探针的制备

所用的类质粒S-1有两类, 一类是天然的S-1, 另一类是克隆的S-1。

1. 用天然的S-1制备探针: 先从S型齐31 \times 综3的F1黄化苗中提取线粒体总DNA, 然后在0.7%琼脂糖凝胶中电泳24h, 电压40V, 溴化乙锭染色后, 利用DE81硝酸纤维膜, 按Dretzen法^[7]进行回收。将0.5—1 μ g的S-1DNA溶于30 μ l 10mmol/L Tris(pH8.0)溶液里, 投入大约含100 μ Ci α -³²P-dATP和 α -³²P-dCTP的双标记物的缺口平移试剂盒(北京福瑞诊断公司)中, 使终反应体积为100 μ l, 在12—18 $^{\circ}$ C水浴中反应2—5h, 通过Sephadex G-50层析柱, TE缓冲液洗脱, 收集第一计数高峰的洗脱液, 得到³²P标记的S-1探针。

2. 用克隆的S-1制备探针: S-1的Pst I限制片段(比天然的S-1缺少位于两端的128个碱基对)已从pBR322的Pst I切点处插入, 形成pBS1重组体^[8]。克隆的S-1即来自于这一重组体的S-1大片段。按缺口平移法^[9], 用2 μ g S-1的Pst I限制性片段和10 μ Ci α -³²P-dCTP(美国New England公司)制备探针, 其比放射强度约为1 \times 10⁶cpm/ μ g DNA。

(四) Southern转移、杂交和放射性自显影

均按常规方法^[9]进行。

结果和讨论

Chao23、D69、C3和K64玉米自交系的mtDNA与天然S-1制备的探针杂交结果表明, 在6.9和4.7kb处都有很强的杂交带(图版I-B中2、4、6、8)。有趣的是, 在Chao23和C3两系的4.7kb

本文于1988年12月26日收到。

* 中国科学院微生物研究所。

位置上,下方还各有一带(图版 I-B2、6)。在 2.5kb 位置上,四个系也都有明显的杂交带。此外,在高分子区域和其他区域还有一些较弱的杂交带。

用克隆的 S-1 作探针,与玉米自交系获白的 mtDNA 杂交,在 6.9 和 5.0kb 处各有一条杂交带前者与探针的杂交程度显然强于后者(图版 I-D 中的 2)。上述结果表明,供试的五个玉米自交系的 mtDNA 与类质粒 S-1 都有同源性,尽管程度有所不同。

从图版 I-D 中 3 看出,用克隆的 S-1 作探针,与高粱 mtDNA 杂交,未发现任何杂交的痕迹。

实验结果还表明,四个玉米自交系(Chao 23、D69、西 3 和 K64)的 nDNA 与天然的 S-1 探针杂交显示出明显的杂交区域(图版 I-B 中 1、3、5、7),表明这四个系的 nDNA 与类质粒 S-1

也有同源性,结果与 KembJe 的结论^[4]相吻合。

正常细胞质的玉米线粒体 DNA 与 S-1 有同源性,主要是由线粒体 DNA 上的一段 6.9kb 的 BamH I 限制性片段所提供^[10]。本实验结果表明,虽然所用的玉米自交系不同,但从图版 I-B 和图版 I-D 上能看到五个系在 6.9kb 处都有明显的杂交带,即使图版 I-D 是用两端各缺失 128bp 的克隆的 S-1 作探针,同源性也未消失。这一结果正是 S-1 中部区域与 6.9kb 的 BamH I 限制性片段有同源性的体现,也说明 S-1 的 Pst I 大片的克隆基本上保留了与线粒体 DNA 的同源性,因此克隆的 S-1 可代替天然的 S-1 进行研究和利用。这对于取克隆的 S-1 构建载体或作为载体,促使外源基因转化单子叶植物的研究工作将是十分有益的。

参 考 文 献

- [1] Houchins, J. P. et al.: *The EMBO Journal*, 5(11): 2781—2788, 1986.
- [2] Schardl, C. L. et al.: *Nature*, 310(26): 292—296, 1984.
- [3] Sederoff, R. R. et al.: *Genetics*, 113: 469—482, 1986.
- [4] Kemble, R. J. et al.: *Nature*, 304(25): 744—747, 1983.
- [5] 谢友菊等: *遗传学报*, 15(5): 335—339, 1988.
- [6] Zuily-Fodil: *Physiol. Plant*, 43: 201—204, 1978.
- [7] Dretzen, G. et al.: *Anal. Biochem.*, 112: 295—298, 1981.
- [8] 孙允明等: *遗传*, 12(1): 15—18, 1990.
- [9] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 1982.
- [10] McNay, J. W. et al.: *Theor. Appl. Genet.*, 67: 433—437, 1984.

STUDY ON THE HOMOLGY BETWEEN PLASMID-LIKE S-1 DNA AND THE GENOMES OF MAIZE AND SORGHUM

Xie Youju Liu Mingqiang Mi Jingjiu Dai Jingrui
(Beijing Agricultural University, Beijing)

Peng Xuexian

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing)

The results of hybridization of plasmid-like S-1 DNA from mtDNA in S-type cytoplasmic maize to Southern blot of BamH I digested mtDNA and nDNA from four normal cytoplasmic maize inbreds (Chao 23, D69, C3, K64) show that there are homology between S-1 and mtDNA and homology between S-1 and nDNA.

When the probe is changed into cloned S-1(Two ends lack 128bp), the results of hybridization to Southern blot of Bam H I digested mtDNA from normal cytoplasmic maize inbred Huo Bai and sorghum hybrid Xin 7 indicate that there is homology between S-1 and mtDNA from maize and no homology between S-1 and mtDNA from sorghum. These data may be helpful in using S-1 as vector or in using S-1 to construct vectors so as to promote foreign genes to be transferred into monocotyledon.

Key words

Plasmid-like S-1 DNA; homology; molecular hybridization

图 版 说 明

- A. 正常细胞质玉米的nDNA和mtDNA经BamH I 消化后, 在0.8%琼脂糖凝胶中的电泳图
 B. 凝胶中的DNA作Southern转移, 与³²P标记的天然的S-1杂交后的放射性自显影
 1. Chao 23 nDNA + BamH I, 2. Chao 23 mtDNA + BamH I, 3. D69 nDNA + BamH I,
 4. D69 mtDNA + BamH I, 5. C3 nDNA + BamH I, 6. C3 mtDNA + BamH I, 7. K64
 nDNA + BamH I, 8. K64 mtDNA + BamH I
 C. 正常细胞质玉米和高粱mtDNA经BamH I 酶切后在0.75%琼脂糖凝胶中电泳图
 D. 凝胶中的DNA作Southern转移, 与³²P标记的克隆的S-1杂交后的放射性自显影
 1. λ /Hind III, 2. 玉米自交系获白mtDNA + BamH I, 3. 高粱杂交种忻7mtDNA + BamH I

