

大豆叶绿体中存在小分子环状 DNA*

黄永芬 汪清胤 王海廷
慕福艳 傅桂荣 邢怡 殷华

(哈尔滨师范大学生物系)

程振起

(清华大学生物科学与技术系)

提 要

以东北栽培大豆“合丰28”温室培养至二片真叶时取为材料,提取叶绿体 DNA,在电镜下观察,发现有长度约为 $2\mu\text{m}$ 的小分子环状 DNA,其性质和功能正在探讨中。

关键词 大豆;叶绿体;小分子环状 DNA

近几年来,随着分子生物学的发展,在高等动植物中陆续发现了存在于染色体外的小分子环状 DNA。

这种小分子环状 DNA 最早在线粒体中发现。1971年 Wong 和 Wildman^[16]报道了烟草线粒体 DNA(mt-DNA)中有 $2\mu\text{m}$ 的环状分子。后来也有人报道,高等植物 mt-DNA 具明显异质性,不同种植物 mt-DNA 大小显著不同,同一种植物 mt-DNA 分子大小也不一致,其范围在 $2\mu\text{m}$ — $30\mu\text{m}$ ^[11,15]。在大豆、甜菜、月见草、柑桔、小麦、高粱等多种植物的线粒体中均发现有小分子环状 DNA^[5,6,7,14]。

1982年以来,日本京都大学 Yamagishi 等^[10]报道了在一些高等动植物材料的细胞核内也存在染色体外小分子环状 DNA,并对它们的大小,出现频率及生物学性质、功能进行了研究。它们报道的核内染色体外小分子环状 DNA 大小为 $0.1\mu\text{m}$ — $5\mu\text{m}$ 。

关于叶绿体中小分子环状 DNA 的研究,1972年 Nass^[13]在眼虫藻(*Euglena*)中,1976年 B. R. Green^[8]在伞藻(*Acetabularia*)中分别报道了叶绿体内有 $3\mu\text{m}$ 和 $4.2\mu\text{m}$ 的小分子环状 DNA。1984年何国顺等^[1]、1985年程振起等^[3]也报道了在油菜、番茄叶绿体中存在小分子环状 DNA。大豆叶绿体中是否存在小分子环状 DNA 尚未见报道。

* 国家自然科学基金资助项目

本文于1989年10月13日收到。 This paper was received on Oct. 13, 1989.

材料和方法

1. 材料 东北大豆栽培品种“合丰28”，温室种植，一片真叶时取叶为材料。

2. 大豆叶绿体 DNA(ct-DNA)的提取 采用 G. Book jans 等^[4]改进的在高离子强度溶液中制备 ct-DNA 的方法。取大豆叶 200 克，冰箱中饥饿 24 小时后置 -70°C 冰冻保存。制备时，取出迅速压碎，加 3 倍体积缓冲液 A(50mM Tris, 25mM EDTA-Na₂, 10mM 巯基乙醇, 0.1% BSA, 1.25M NaCl, pH8.0)。间歇匀浆后，10 层纱布过滤，离心取叶绿体沉淀，去除混杂的淀粉，所得叶绿体在光学显微镜下检查，再加 50ml 缓冲液 B(25mM Tris, 10mM EDTA-Na₂, pH8.0)并加蛋白酶 K(50μg/ml)、SDS(0.5%)以及 Sarkosyl(2%)室温下保温 3 小时后，经饱和酚、氯仿抽提去除蛋白，离心取水相用 95%冷乙醇沉淀 ct-DNA(置-70°C 冰箱中 15 分钟)，离心取 ct-DNA 沉淀于 -30°C 冰箱中空干，溶于 pH7.5 TE 缓冲液中。

3. ct-DNA 的纯化 将上述所得的粗 ct-DNA 经 RNase A 处理，去除混杂的 RNA，得到较纯净的 ct-DNA。纯度检查用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳，EB 染色，在紫外灯下观察照相；在岛津 UV-265 紫外可见分光光度计上绘制 200-300nm 紫外全波扫描曲线，并测 A₂₆₀/A₂₈₀比值。

4. ct-DNA 的电镜观察 主要参照 Kleinschmidt^[11]的方法。展层上相液含 0.5mg/ml 细胞色素 C, 0.5M 醋酸铵, 1mM EDTA-Na₂, 1-4μg/ml ct-DNA, 下相液为 0.2M 醋酸铵。经展层后，单分子层形成，用带有 Formran 膜铜网，膜面向下捞起单分子层，经醋酸双氧铀染色及乙醇脱水后，在高真空喷涂仪中进行钨-铂喷镀，倾角约 7°。制片后，在日立 H300 电子显微镜下以 20000 倍观察 ct-DNA。

结 果

1. 大豆 ct-DNA 经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳后，EB 染色，在紫外灯下可见 ct-DNA 带，RNA 带及小分子环状 DNA 带。(图 1)



图 1 ct-DNA 经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳后的电泳图谱

Fig. 1 ct-DNA pattern by electrophoresis on 0.7% agarose gel

图 2 是经 RNaseA 处理后的 ct-DNA 琼脂糖凝胶电泳图。

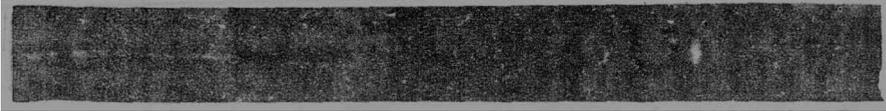


图 2 经 RNase A 处理后的 ct-DNA 0.7% 琼脂糖凝胶电泳后的电泳图谱
 Fig. 2 ct-DNA digested with RNase pattern by electrophoresis on 0.7% agarose gel

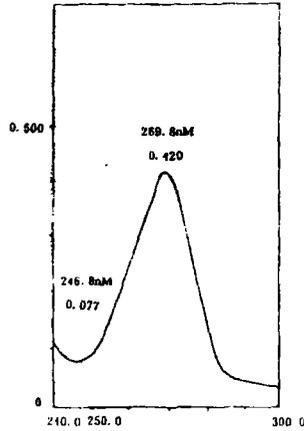


图 3 大豆 ct-DNA 全波长扫描曲线
 Fig. 3. The scanning record of ct-DNA soybean chloroplast

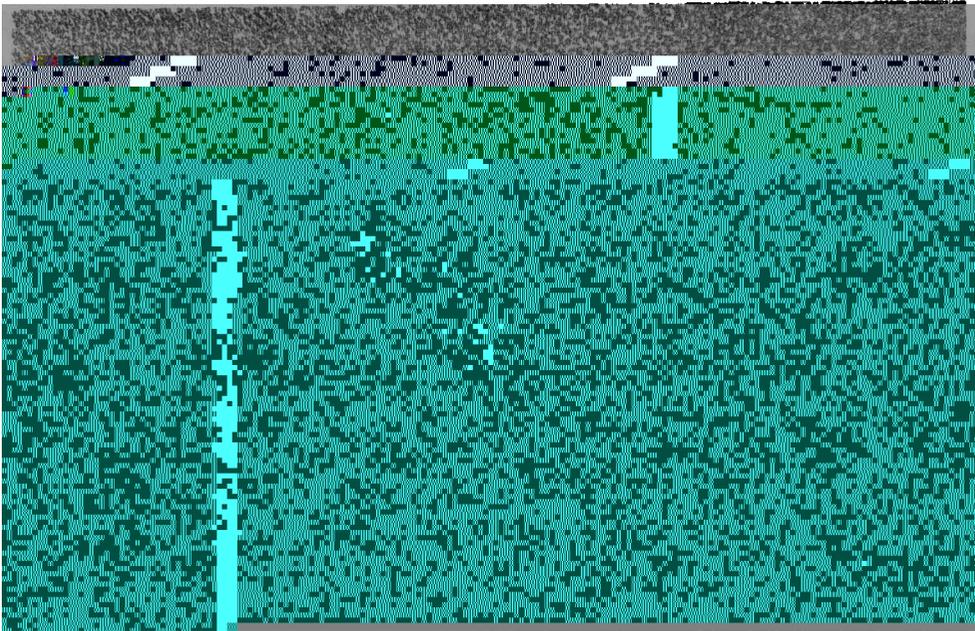


图 4 大豆 ct-DNA 分子的电镜照片 (×20000×5)
 Fig. 4 Electron micrographs of ct-DNA from soybean chloroplast (×20000×5)

2. 经岛津 UV-265 紫外可见分光光度计检测, $\lambda_{\text{最大}}$ 为 269.8nm, $\lambda_{\text{最小}}$ 为 246.8nm, $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ 为 1.96, 说明 ct-DNA 比较纯净(图 3)。

3. 通过电镜观察, 除看到有正常的 ct-DNA 分子外(图 4), 也看到了小分子环状 DNA, 其长度约为 2 μm (图 5), 比 1985 年我们报道的在番茄中看到的小分子环状 DNA (3 μm) 小一些。

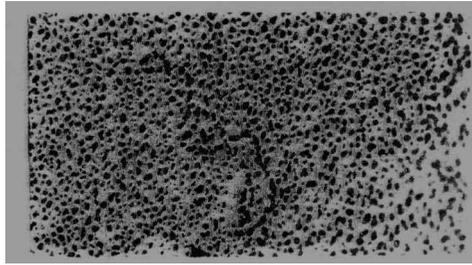


图 5 大豆 ct-DNA 分子中的小分子环状 DNA. ($\times 20000 \times 2$)

Fig. 5 Small molecular circular DNA chloroplast preparation from soybean ($\times 20000 \times 2$)

4. 从我们的工作和其它报道表明, 高等植物叶绿体中可能普遍存在着大小不等的小分子环状 DNA。

讨 论

1. 有报道^[2]小分子环状 DNA 约占所观察的 DNA 分子的 4% 左右, 即在电镜下和电泳中呈现频率较低, 所以经 RNase A 处理提纯的 ct-DNA 样品, 经琼脂糖凝胶电泳后, 其亮度不如未处理样品, 而小环 DNA 分子带也很难显示了(图 1、图 2)。

2. Nal-hu Wu 等^[12]在提取 ct-DNA 时把叶子放到液氮冷冻, 提取效果较好。我们把叶子改放到 -70°C 冰箱中, 这样既方便, 样品又可保存 3—6 月。提取 ct-DNA 时, 可趁冻迅速压碎叶片, 效果也很好。另外, 提取后的 ct-DNA 样品, 在 -30°C 冰箱中空干比在真空瓶中抽干效果好。

考虑到叶绿体是真核生物的重要细胞器, 其基因组和表达系统都表现了典型的原核生物特点, ct-DNA 中也存在倒转重复顺序^[17]; 并且按内共生理论, 在进化过程中叶绿体基因组的若干基因会迁移至核内^[9]。从这些基本点出发, 叶绿体中的这种小的环状 DNA 分子可能是存在于叶绿体中的质粒, 可能在核与叶绿体之间“漂移”, 其可否成为一种潜在遗传工程载体是许多人关注的问题。目前, 在大豆自身中寻求载体, 对开展大豆遗传工程是十分有意义的工作。

参 考 文 献

- [1] 何国顺等, 1984, 植物学报, 26(3), 258—256
- [2] 程文等, 1989, 遗传, (4) 14—16

- [3] 程振超等, 1985. 生物化学杂志, 1(3), 83-91
- [4] Book, G. et al. ; 1981. *Analytical Biochemistry* 141:244
- [5] Brennicke, A. et al. ; 1982, *Mol Gen. Genet.* 187, 461-466
- [6] Chase, C. D et al. ; 1986, *Plant Mol. Biol*, 6, 53-64
- [7] Fontarnau, A. et al. ; 1982. *Plant physiol*, 70, 1678-1682
- [8] Green, B. R. ; 1976 *Biochim. Biophys. Acta*, 447, 156-166
- [9] Kazuhiko, U. et al. ; 1987. *TIG*, 13(10); 281-287
- [10] Kleinschmidt, A. K. ; 1968, *Methods Enzymol*, 12, 361-377
- [11] Levings, C. S. et al. ; 1978, *Stadler Genet Symp*, 10, 77-93
- [12] Nai-hu Wu, et al. ; 1986, *Gene*, 50, 271-278
- [13] Ness, M. K. et al. ; 1972. *Bichim. Biophys Acta*, 272, 130-136
- [14] Powling, A. ; 1981, *Mol. Gen. Genet*, 183, 82-84
- [15] Quetier, F. et al. . 1977, *Nature*, 268, (28); 365-368
- [16] Wong, F. Y. et al. ; 1971, *Plant Physiol* 47A: 37
- [17] Shinozaki, K. et al. ; 1986, *The EMBO J.* 5(9); 2043-2049
- [18] Yamagishi, H. et al. ; 1982. *Plasmid*. 8, 299-306

SMALL MOLECULAR CIRCULAR DNA IN CHLOROPLAST FROM SOYBEAN

Huang Yongfen Wang Qingyin Wang Haiting Mu Fuyan

Fu Cuirong Xing Yi Yin Hua

(*Department of Biology, Harbin Normal University*)

Cheng Zhenqi

(*Department of Biology, Qinghai University*)

Abstract

A 2 μm size small molecular circular DNA was discovered in electronmicroscope graph of chloroplast-DNA preparation from two leaves plant of Hefeng 28 of North-east soybean. Its properties and function are being studied.

Key Words Soybean; Chloroplast small circular DNA