

# 大豆球蛋白 A<sub>1b</sub>B<sub>2</sub> 基因表达的分子基础探讨\*

张德玉 管丽丽

(江苏省农业科学院遗传生理研究所 南京 210014)

伊藤义文 深泽亲房

(日本食品综合研究所, 日本筑波)

## 提 要

通过对大豆品种松浦和 A<sub>1b</sub>B<sub>2</sub> 基因突变体凡实的染色体 DNA 进行限制性片段长度多态性(RFLP)分析,克隆了一个只存在于大豆品种松浦中,而不存在于大豆突变体凡实中的大小为 2.2Kb 的 DNA 片段,并利用 pUC19 为载体,对该片段进行了亚克隆,利用多种限制性内切酶进行了酶切分析,得到了该片段的酶切图谱。根据两个大豆品种在多种限制性内切酶酶切时都表现出显著差异,推断大豆球蛋白 A<sub>1b</sub>B<sub>2</sub> 基因之所以不能在大豆品种凡实中表达,是由于该品种染色体 DNA 发生了倒位或缺失所致,而不仅仅是个别碱基对的突变。

**关键词** 大豆球蛋白基因;突变体;RFLP 分析;酶切图谱

大豆分布的地域广阔,既是重要的蛋白作物也是廉价的蛋白质资源<sup>[1]</sup>。由于大豆蛋白质与谷类作物的蛋白质相比富含赖氨酸,因而日益受到人们的重视。大豆球蛋白是大豆种子贮藏蛋白质的主要组成部分,在有些大豆品种中可占种子干重的 20%<sup>[9]</sup>。随着分子遗传学的发展,人们逐渐了解了大豆球蛋白亚基的组成和结构特征<sup>[5,7,10]</sup>。编码大豆球蛋白的 cDNA 先后被分离和克隆<sup>[4,8]</sup>,并利用大豆球蛋白 cDNA 做探针研究了大豆球蛋白基因的结构特征<sup>[2,3,9]</sup>。用 DNA 限制性片段长度多态性(RFLP)作为遗传标记,借此对一种植物的基因进行全面分析,从而比较不同品种基因之间的差异是近年来发展的一项新技术。我们选择了虽然都含有大豆球蛋白 A<sub>1b</sub>B<sub>2</sub> 基因,但该基因只在大豆品种松浦中表达,而在大

\* 本研究得到联合国大学的资助,在日本食品综合研究所完成。

本文于 1992 年 5 月 15 日收到。This paper was received on May 15, 1992.

大豆突变体凡实中检测不到该基因表达产物的两个大豆品种为材料,进行 RFLP 分析,以  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP 标记大豆球蛋白 A<sub>10</sub>B<sub>2</sub> 的 cDNA 为探针进行分子杂交,比较两个大豆品种产生杂交条带的差异,克隆了一个只出现在大豆品种松浦中,而不出现在大豆突变体凡实中,大小为 2.2Kb 的 DNA 片段,进行了限制性内切酶酶切分析,试图进一步阐明大豆球蛋白 A<sub>10</sub>B<sub>2</sub> 基因表达的分子基础。

## 材料与amp;方法

### 1、植物材料

本研究用两个大豆(*Glycine max* . L. Mer.)品种,松浦和凡实做材料。虽然在两个大豆品种的基因组中,都有编码大豆球蛋白 A<sub>10</sub>B<sub>2</sub> 的 DNA 序列,但 A<sub>10</sub>B<sub>2</sub> 基因只在大豆品种松浦中表达,而在突变体凡实中则检测不到该基因的表达产物(深泽亲房,未发表结果)。两个大豆品种的干种子经灭菌处理后,用无菌水冲洗干净,22 C,在湿润的塑料盒中避光培养一周左右即可去根收获。黄化苗在-20 C真空冷冻干燥后,密封贮存在-70 C冻箱中保存备用。

### 2、大豆 DNA 的抽提

真空冷冻干燥的大豆黄化苗加入铝酸盐在研钵内磨细,用氯仿:辛醇(24:1)抽提两次,加十分之一体积 10%的十六烷三甲基溴化铵(CTAB)进行 DNA 沉淀,用玻璃钩绕出 DNA 沉淀,吹干后溶于 TE。经氯化铯密度梯度离心分离、纯化后,在紫外灯下用注射器取出 DNA 条带,用 NaCl 饱和的辛醇反复抽提去除溴化乙锭后,无水乙醇沉淀。DNA 沉淀溶于 TE 中,测其在波长 260nm 下的光吸收值,进行定量。在波长 300—220nm 的范围内进行扫描,测其纯度。

### 3、探针

大豆球蛋白 A<sub>10</sub>B<sub>2</sub> cDNA 由日本食品综合研究所深泽博士提供,克隆载体为 pBR322,以限制性内切酶 PstI 可以完整的切下插入片段,插入片段的大小为 1.8Kb。宿主菌为 JM109(recA、F<sup>-</sup>、traD36、ProAB、tac)。人工合成的 A<sub>10</sub>特异性寡核苷酸探针为 17bp,可以特异性的和编码 A<sub>10</sub>的核苷酸顺序互补。

### 4、载体和宿主菌

Charomid 9-42 购自日本和光纯药株式会社,该质粒全长 42.2Kb,具有氨苄青霉素抗性基因,含有 Cos 位点和 9 个单一限制性内切酶酶切位点可用于克隆,宿主菌为大肠杆菌 C600(F<sup>-</sup>、thi<sup>-1</sup>、leuB6、lacY、tonA2、SupE44)。

pUC19 和 pUC18 由日本食品综合研究所深泽博士提供,质粒全长 2.686Kb,含有 13 个单一限制性内切酶酶切位点可用于克隆。经双酶切重组后,插入片段在 pUC19 和 pUC18 中的插入方向相反,宿主菌为大肠杆菌 JM109。

### 5、质粒 DNA 的抽提和酶制剂

按 Maniatis<sup>[5]</sup>的碱裂解法抽提含有 A<sub>10</sub>B<sub>2</sub> cDNA 插入片段的 pBR322 质粒 DNA,经氯化铯密度梯度超离心纯化后,以限制性内切酶 PstI 完全酶解后,用电泳洗脱法从琼脂糖凝胶中分离 A<sub>10</sub>B<sub>2</sub> cDNA 插入片段。1.8Kb 的插入片段经放射性同位素  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP 标记后,

用做探针。

限制性内切酶,碱性磷酸脂酶,T<sub>4</sub>DNA 连接酶购自日本基因公司和宝酒造试剂公司。连接反应在 14℃ 恒温下进行。

### 6、分子杂交

电泳吸印转移法(Electro Blot),4℃,50 伏恒压,0.5xTAE 缓冲液中转移 16 小时将 DNA 条带从 1%琼脂糖凝胶中转移到尼龙膜上,60℃—80℃,76mm 汞柱真空干燥 2 小时。42℃,预杂交 20 小时,同样温度下杂交 24 小时,杂交结束后,逐渐升温洗膜,直到本底降至 100cpm。膜用塑料膜包好,在两张增感屏下,-70℃放射自显影 16 小时。

## 结果与分析

### 1、Southern 杂交分析

两个大豆品种的 DNA 经限制性内切酶 Bgl II 完全酶切后,以  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP 标记大豆球蛋白 A<sub>1b</sub>B<sub>2</sub> 的 cDNA 做探针,进行 Southern 杂交。该探针与大豆品种松浦 DNA Bgl II 片段杂交得到了 4 条不同分子量,清晰的杂交条带,与大豆突变体凡实的 DNA Bgl II 片段杂交得到了 3 条清晰的杂交条带。其中,三条高分子量杂交条带的电泳位置基本相同,只有 2.2Kb 的杂交条带出现在大豆品种松浦中,而在大豆突变体凡实中,则缺失了这一杂交条带。

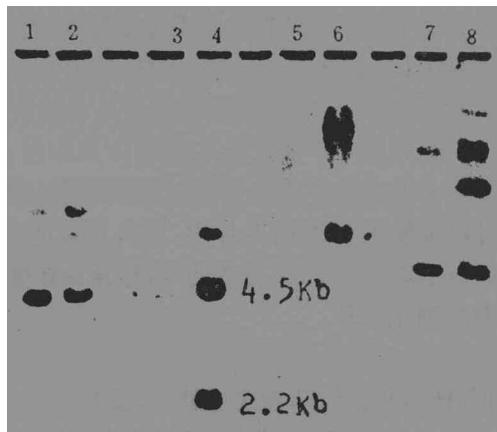


图 1 大豆 DNA 经限制性内切酶酶切后用克隆的 cDNA 片段作探针的分子杂交放射自显影图(B:凡实 M:松浦)

Fig. 1 Autoradiograph of soybean genomic DNA digested with restriction enzymes and probed with cloned soybean glycinin A<sub>1b</sub>B<sub>2</sub> cDNA fragments(M: Matsuura genomic DNA, B: Bonminorí genomic DNA)  
1. B/BamH I 2. M/BamH I 3. B/Bgl II 4. M/Bgl II 5. B/Sal I 6. M/Sal I 7. B/Xba I 8. M/Xba I

## 2. 特异性杂交条带的分离和克隆

大豆品种松浦的基因组 DNA 经限制性内切酶 Bgl I 完全酶切后,用 10%—40% 的蔗糖密度梯度离心分离、收集后,经 1% 琼脂糖凝胶电泳确定不同收集组分的分子量,2.2Kb 的 DNA 片段存在于 No. 14 和 No. 15 管的组分中。

以含有粘性末端(Cos 位点)的质粒 Charomid9-42 为克隆载体,利用限制性内切酶 BamHI 识别位点,进行 2.2Kb Bgl I 片段的连接重组,然后转化到感受态的大肠杆菌 C600 中,用含有氨苄青霉素(50μg/ml)的 LB 固体培养基筛选含有重组质粒的菌株,共得到大约 80,000 个 Ap<sup>r</sup> 菌落。

以 α-<sup>32</sup>P-dCTP 标记大豆球蛋白 A<sub>1b</sub>B<sub>2</sub> 的 cDNA 做探针,经菌落原位杂交筛选,从 80,000 个菌落中筛选到 4 个阳性菌落,将阳性菌落转移到新鲜培养基上,进行第二次菌落原位杂交筛选,确认了 3 个阳性克隆。为了进一步确定,用 γ-<sup>32</sup>P-dATP 标记对 A<sub>1b</sub> 特异的人工合成寡核苷酸做探针,再一次进行菌落原位杂交筛选,结果如图所示,从中挑取一个,称之为 pLG156。据此,可以初步认定得到了阳性克隆。

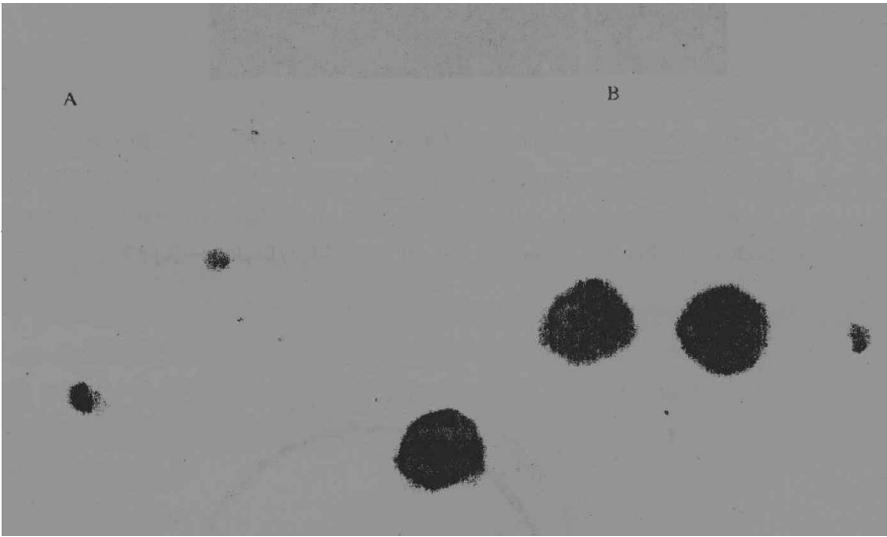


图 2. 菌落原位杂交的放射自显影结果(A: A<sub>1b</sub>B<sub>2</sub> cDNA 做探针, B: 对 A<sub>1b</sub> 专一性寡核苷酸做探针)

Fig. 2 Autoradiographs of colony hybridization (A: soybean glycinin A<sub>1b</sub>B<sub>2</sub> cDNA as the probe, B: oligonucleotide specific to A<sub>1b</sub> as the probe)

## 3. 特异性片段的亚克隆和酶谱分析

用限制性内切酶 SmaI+XbaI 从 pLG156 上切下完整的 2.2Kb 插入片段,以 pUC19 为克隆载体,重组后转化到大肠杆菌 JM109 中,以含有氨苄青霉素的 LB 培养基筛选含有重组质粒的菌株。采用质粒快速抽提法提取质粒,酶切后用琼脂糖凝胶电泳检测插入片段的大小。再以同样方法将该片段亚克隆到 pUC18 上,获得插入方向相反的亚克隆,以便于今后的核酸序列测定工作。

以多种限制性内切酶,对阳性克隆进行鉴定和分析,并根据 1% 琼脂糖凝胶电泳的结

果,绘制了 pLG156 的酶切图谱。该片段的大小为 2.2Kb,没有限制性内切酶 AatI、PstI、SmaI、XhoI 识别位点,含有两个 EcoRI 和两个 Pvu II 识别位点,以及单个 AccI、EcoRV 识别位点。

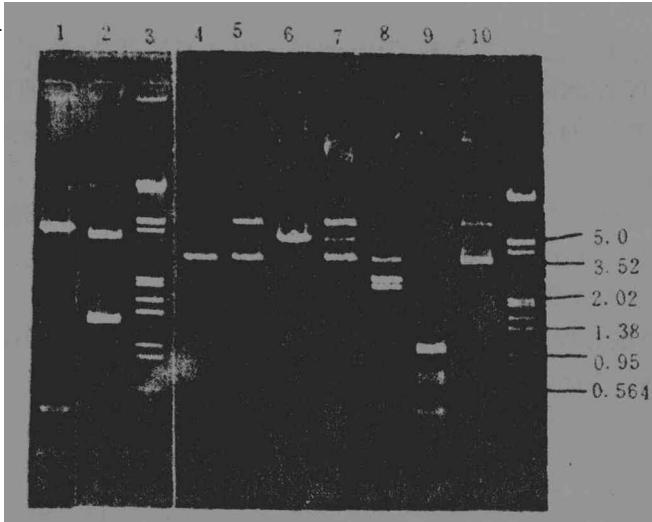


图 3 大豆球蛋白 A<sub>11</sub>B<sub>2</sub> 2.2Kb/Bgl I 片段的限制性内切酶切分析

Fig. 3 Restriction enzyme digestion analysis of soybean glycinin A<sub>11</sub>B<sub>2</sub> subunit 2.2Kb/Bg I fragment

- 1. EcoR I    2. Sph I    3. λ/EcoR I +Hind III    4. Undigest    5. Aat I    6. Acc I
- 7. EcoR V    8. Pvu II    9. Sau3A    10. Xho I    11. λ/EcoR I +Hind III

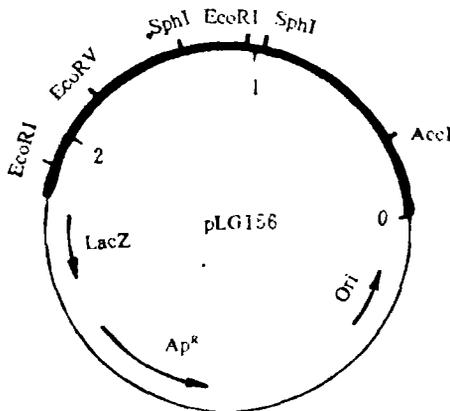


图 4 大豆球蛋白 A<sub>11</sub>B<sub>2</sub> 基因 2.2kb/Bgl I 片段的限制性内切酶图谱

Fig. 4 Restriction map of soybean glycinin A<sub>11</sub>B<sub>2</sub> gene 2.2Kb/Bgl I fragment in plasmid pUC19

## 讨 论

两个大豆品种的 DNA 经 4 种不同的限制性内切酶分别酶解后,与  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP 标记的大豆球蛋白 A<sub>10</sub>B<sub>2</sub> cDNA 探针进行分子杂交后,都分别出现了杂交条带数目的差异,这表明两个大豆品种之间的 DNA 序列有较大范围的变异,可能出现了 DNA 片段的易位、倒位、插入或缺失等,因而影响了大豆球蛋白 A<sub>10</sub>B<sub>2</sub> 基因在大豆突变体凡实中的表达。如果仅仅是个别碱基对的突变,只有当突变位点正好在某一限制性内切酶的识别顺序范围内时,才有可能检测出杂交条带的差异。Tae-Ju Cho 等人<sup>[2]</sup>在以大豆球蛋白基因突变体 (Forrest) 做材料,研究 Gy<sub>3</sub>(A<sub>10</sub>B<sub>2</sub>) 基因表达时认为,不能检测到该基因的表达产物,是由于染色体的重排导致了该基因的 5' 端部分和 3' 端部分分离,发生倒位使得 Gy<sub>3</sub> 在种子中不能积累的结果。

由于 DNA 杂交片段长度的差异总是通过某种限制性内切酶的酶解揭示出来的,而每个特定 DNA 探针可能揭示的差异与选用酶的种类和酶本身的识别顺序密切相关。限制性内切酶 BamH I、Bgl I、Sal I 和 Xba I 是四种识别 6 个碱基的限制性内切酶,从所得的结果可以看出,使用不同限制性内切酶分别酶切后进行分子杂交的条带,彼此间的差异并不十分显著,在大豆突变体凡实中都只缺失一个条带。

本实验以  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP 标记大豆球蛋白 A<sub>10</sub>B<sub>2</sub> 的 cDNA 为探针,对都含有大豆球蛋白 A<sub>10</sub>B<sub>2</sub> 基因,但在表达水平上有差异的两个大豆品种松浦和凡实进行了 RFLP 分析,克隆和亚克隆了存在于大豆松浦中,而在大豆突变体凡实中缺失的 2.2Kb DNA 片段。并对该片段进行了限制性内切酶分析,绘制了限制性内切酶酶切图谱,为在分子水平上研究大豆球蛋白 A<sub>10</sub>B<sub>2</sub> 基因的表达打下了基础。今后的研究将在以下两个方面进行:第一,对亚克隆的特异性 DNA 片段进行序列测定,分析其结构特征,进一步了解该片段与大豆球蛋白基因表达的相关性。第二,在了解其结构的基础上进行遗传操作,从而进一步探讨大豆球蛋白基因表达的调控机制。

## 参 考 文 献

- [1] 田中幸彦,1986. 国外生物科技,3:1~9
- [2] Cho, T. J. et al. 1989. The Plant Cell, 1, 339-350
- [3] Fischer, R. L. and R. B. Goldberg 1982. Cell, 29, 651-660
- [4] Goldberg, R. B. et al. 1981. Developmental Biology, 82, 218-231
- [5] Kitamura, K. et al. 1976. Agric. Biol. Chem., 40(9), 1837-1844
- [6] Maniatis, T. et al. 1982. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor, New York
- [7] Moreira, M. A. et al. 1979. The J. of Biol. Chem., 254(19), 9921-9926
- [8] Negoro, T. et al. 1985. Nucleic Acids Research, 13(18), 6719-6731
- [9] Nielsen, N. C. et al. 1989. The Plant Cell, 1, 313-328
- [10] Staswick, P. E. et al. 1981. The J. of Biol. Chem., 256(16), 8752-8755

AN INQUIRY INTO THE MOLECULAR BASES ABOUT  
SOYBEAN GLYCININ A<sub>1b</sub>B<sub>2</sub> GENE EXPRESSION

Zhang Deyu      Guan Lili

*(Institute of Agrobiological Genetics & Physiology ,  
Jiangsu Academy of Agriculture Sciences, Nanjing ,210014)*

Yoshifumi Itoh and Chikafusa Fukazawa

*(National Food Research Institute, MAFF, Tsukuba, Japan )*

**Abstract**

DNA restriction fragment length polymorphism(RFLP) analysis was carried out using a labelled soybean glycinin A<sub>1b</sub>B<sub>2</sub> cDNA as probe. The seedlings of soybean cultivar Matsuura and variety mutant Bonminori were used as experiment materials. One 2.2Kb DNA fragment which exists only in cultivar Matsuura but not in variety mutant Bonminori was cloned into Charomid 9-42. Then it was subcloned using pUC19 as vector. The restriction map of that 2.2Kb DNA fragment was made according to the results of several restriction enzyme digestions. It was deduced that the products of soybean glycinin A<sub>1b</sub>B<sub>2</sub> gene expression which can not be detected in variety mutant Bonminori is probably due to the rearrangement (inversion) or deletion. It is not the mutation of a few base pairs.

**Key words** Soybean *glycinin* gene ;Mutant;RFLP analysis;Restriction map

**《作物研究》1994年征订启事**

《作物研究》系湖南省作物学会主办的有关作物科技的国内公开发行的科技期刊。主要刊登作物生理生化、遗传育种、耕作栽培、加工利用等方面的论文,是从事农业科研、教育、管理的科技人员和农村种植业者的参考资料。

《作物研究》为季刊,季末出版。国内统一刊号 CN43-1110/S。全年定价 4 元。欢迎广大读者随时订阅。本刊地址:长沙市东郊湖南农学院内,邮政编码 410128。