

# 水稻 (*Oryza sativa* L.) 重复 DNA 顺序的克隆及序列分析

## ——重复顺序存在意义的探讨

何木兰 唐东江 许莉萍 侯永敏 张素敏 刘良式

(中山大学生物工程研究中心, 广州 510275)

### 摘 要

以大肠杆菌启动子选择质粒 pKK175-6、pKK232-8 为载体, 将通过复性动力学方法获得的水稻重复 DNA 顺序片段进行克隆。阳性克隆菌株表现出对四环素或氯霉素不同程度的抗性。DNA 序列分析表明, 克隆到的某些水稻重复 DNA 顺序具有丰富的基因表达调节元件的同源序列。

**关键词:** 水稻; 重复 DNA 顺序; 启动子同源序列

DNA 复性动力学研究发现重复 DNA 顺序广泛存在于真核生物基因组中<sup>[4]</sup>, 在植物核基因组中占有相当大的比例, 通常达 50% 以上<sup>[13]</sup>, 而且是造成一些植物高 C 值及植物种间 DNA 组成的高度变异性的一个重要原因<sup>[7,8,12]</sup>。

人们认为重复 DNA 由于形成多余的拷贝而遍布于整个基因组, 但对基因组的表型没有特殊的作用, 实际上是真核生物基因组的寄生物, 一种“利己 DNA”<sup>[10,11,18,20]</sup>。然而另一些研究者则认为, 重复 DNA 顺序在基因组活动中具有一定的功能。例如 Northern 和 Southern 杂交分析显示出一些功能未知的重复 DNA 顺序的转录产物, 它们有的与 5SRNA、tRNA 同源<sup>[2,25]</sup>, 有的甚至还可以翻译成多肽并且这个过程受到发育调节<sup>[24]</sup>; 异染色质区的高度重复序列<sup>[21]</sup>, 与染色体的稳定, 重组和配对密切相关<sup>[3,19,15]</sup>; 构成端粒的串连重复序列的长短直接影响到染色体的稳定<sup>[3]</sup>; 存在一种特异结合卫星 DNA (一种高度重复顺序) 的蛋白质使 DNA 卷曲形成核小体<sup>[22]</sup>。一些研究者还认为, 部分重复顺序可能会参与基因表达的调控<sup>[9]</sup>, 因为某些重复 DNA 顺序与结构基因共转录到 mRNA 中, 它们通过 RNA-RNA 二联体对

mRNA 加工起到某种调节作用, 但这些推测至今尚无明确的支持证据。因此, 我们对于在重复 DNA 顺序中是否存在基因表达的调节元件甚感兴趣, 尝试建立一个实验系统, 克隆一些不同的重复顺序片段, 并从结构分析上来开展这方面的研究。

本文叙述在水稻上利用复性动力学与 S1 酶消化组结合的方法分离不同 Cot 值的水稻重复顺序片段, 并且启动子选择载体进行克隆, 得到一些有启动子活性的重复顺序片

段, 并对它们的启动子活性强度、序列结构特点以及在基因组中分布的状况作了一些研究。

## 材料与方法

### 材 料

1. 植物材料: 水稻 (*Oryza sativa* L.) 广亲和品种 (Cps10 17 由湖南杂交水稻中心提供)。
2. 载体与宿主菌: 质粒 pKK175-6、pKK232-8<sup>[8]</sup>均购自 Pharmacia 公司, 具有氨苄青霉素抗性的筛选标记, 还分别带有启动子缺失的四环素抗性基因 (Tet) 和氯霉素抗性基因 (Cat), 抗菌素抗性基因上游有多克隆位点, 大肠杆菌株 *E. coli* HB101 为本实验室保藏菌种。
3. 试剂: T<sub>4</sub>DNA 连接酶、各种限制性内切酶、S1 核酸酶、DNA 聚合酶 I (Klenow Large Fragment)、dNTPs、缺口转移探针标记盒分别是 Boehringer、Bio-labs、Sigma、Promega 及华美生物工程公司产品, 氨苄青霉素 (Ap)、四环素 (Tc) 和氯霉素 (Cm) 均为国产,  $\alpha$ -<sup>35</sup>S-dATP 购自 NEN 公司,  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP 购自北京福瑞生物工程公司, 其余试剂均为国产分析纯试剂; LB 培养基及各种酶反应缓冲液按照文献配制<sup>[15]</sup>。

### 方 法

1. 水稻 DNA 的提取 水稻种籽用 15% 漂白粉消毒洗净, 于 30℃ 暗生长一周, 所得的黄化苗用液氮速冻并保存备用。水稻高分子量 DNA 的提取采用 CTAB 法<sup>[17]</sup>, 必要时作进一步纯化。
2. 载体 DNA 的消化 pKK175-6、pKK232-8 均用 SmaI 消化获得平末端的载体 DNA 片段。
3. 复性动力学方法分离重复 DNA 顺序片段 水稻 DNA 经 Sepharose 4B 柱层析纯化后, 用 TaqI 酶消化得到大部分产物大小为 1-2kb 的片段, 乙醇沉淀, 溶于适量 TE 缓冲液中, 采用复性动力学方法<sup>[1,5,14]</sup>分离 Cot 值分别为 10<sup>-2</sup>和 50 的复性 DNA 片段, 经 S1 酶修剪除去未复性的单链部分后, 用 DNA 聚合酶 I (Klenow Large Fragment) 补平其末端。
4. 连接和转化 将上述方法获得的水稻 DNAT 片段与消化好的载体 DNA 混合连接, 并按照氯化钙方法<sup>[18]</sup>转化 *E. coli* HB10 菌株。
5. 重组体的鉴别 将能在含适量的 Ap 和 Tc 或 Ap 和 Cm 的转化平板上生长的转化子作单菌落纯化, 用质粒 DNA 的快速分离法<sup>[18]</sup>分析重组体, 以 1-2kb 水稻 DNA 片段作探针针对重组质粒作点杂交 (Dot-blot) 以进一步确证。
6. 抗菌素抗性测定和生长曲线的绘制 受检菌株经 37℃ 液体培养过夜, 按一定比例接种在新鲜的含有不同浓度抗菌素的 LB 液体培养基中, 37℃ 振荡培养, 在不同时间间隔取样测 OD<sub>550</sub> 光密度值。
7. DNA 序列测定与分析 用低熔点琼脂糖 (1.8%) 纯化插入片段, 并把插入片段克隆到载体 M<sub>13</sub>mp18 和 M<sub>13</sub>mp19 中, 用双脱氧法 (Pharmacia 公司 T7 DNA Sequencing Kit) 测定全序列, 结果用 SEQMA1 软件在 EMBL Nucleic Acid Data (1989.9) 进行计算机分析。

8. Southern 分析 用不同的限制性内切酶消化水稻 DNA, 转移到硝酸纤维素滤膜或尼龙膜上, 分别用不同的克隆或其插入片段作探针进行杂交<sup>[18]</sup>。

## 结果与讨论

### 一、具有启动子活性的不同 Cot 值的 DNA 片段的克隆与鉴定

为获得范围广泛的重复顺序, 本研究采用了复性动力学与 S1 酶消化相结合的方法来分离水稻重复顺序片段, 选择在 Cot50 和 Cot $10^{-2}$  复性的 DNA 片段来代表水稻基因组中的中度重复顺序<sup>[1]</sup>。

带有 pKK175-6 或 pKK232-8 的菌株在含四环素培养基 (20 $\mu$ g/ml) 或含氯霉素培养基 (30 $\mu$ g/ml) 上是不能生长的。只有当质粒的多克隆位点上插入了外源启动子片段才能使其下游的 Tet 或 Cat 基因表达, 从而使重组体获得对四环素或氯霉素的抗性。将这两种载体 DNA 用 SmaI 消化, 与已补平末端的重复顺序片段连接并转化到大肠杆菌 HB101 中, 在含有 Ap (50 $\mu$ g/ml) 和 Tc (20 $\mu$ g/ml) 或含 Ap (50 $\mu$ g/ml) 和 Cm (30 $\mu$ g/ml) 的 LB 培养基平板上筛选 (见图 1), 获得了一批抗性菌落 (见表 1, 2)。将这批纯化的抗性菌落分别转接到含不同浓度的 Tc (20, 50, 100 $\mu$ g/ml) 或 Cm (30, 60, 120, 180, 240, 360 $\mu$ g/ml) 的培养基平板上, 发现随着抗菌素浓度的不断提高, 表现抗性而存活的克隆数目逐渐减少, 显示不同的克隆抗性水平有差异。因受体菌及带有 pKK175-6 或 pKK232-8 质粒转化子在 Tc (20 $\mu$ g/ml) 或 Cm (30 $\mu$ g/ml) 上不能存活, 由此结果可以推测这些重组体菌落的抗性是由于外源片段插入所致。为了进一步证实, 用快速检测法提取重组质粒 DNA 进行凝胶电泳 (见图 2), 可看到它们的迁移率比对照质粒 DNA 慢; 以 1-2kb 的水稻基因组 DNA 片段作探针与这些重组质粒作杂交时, 亦可看到克隆的 DAN 片段与水稻 DNA 杂交。此外, 我们曾经将重组质粒从宿主 HB101 中提取出来再转至 DHI 中, 同样也使转化子获得相同的抗性。这表明重组体插入的水稻重复顺序片段具有启动子活性。不同的抗性强度反映了抗性基因不同程度的表达并相应地表明启动子活性的不同强度。

表 1 水稻重复顺序克隆

Table 1 Clones of rice repetitive DNA

Clone NO.	Vector	Cot value of the inserted fragments
pRRD1-15		
pRRD21-33	pKK175-6	Cot $10^{-2}$
pRRD101-113	pKK232-8	Cot 50
pRRD114-120		
pRRD130-146	pKK232-8	Cot $10^{-2}$

表 2 含水稻重复 DNA 顺序的不同克隆菌株的抗菌素抗性水平

Table 2 Antiotic resistance of the clones containing rice repetitive DNA

CloneNo.	Tc-resistance (ug/ml)	Clone No.	Cm-resistance (ug/ml)
pRRD2	20	pRRD106	160
pRRD3	80	pRRD107	160
pRRD10	40	pRRD 124	260
pRRD23	40	pRRD 146	160

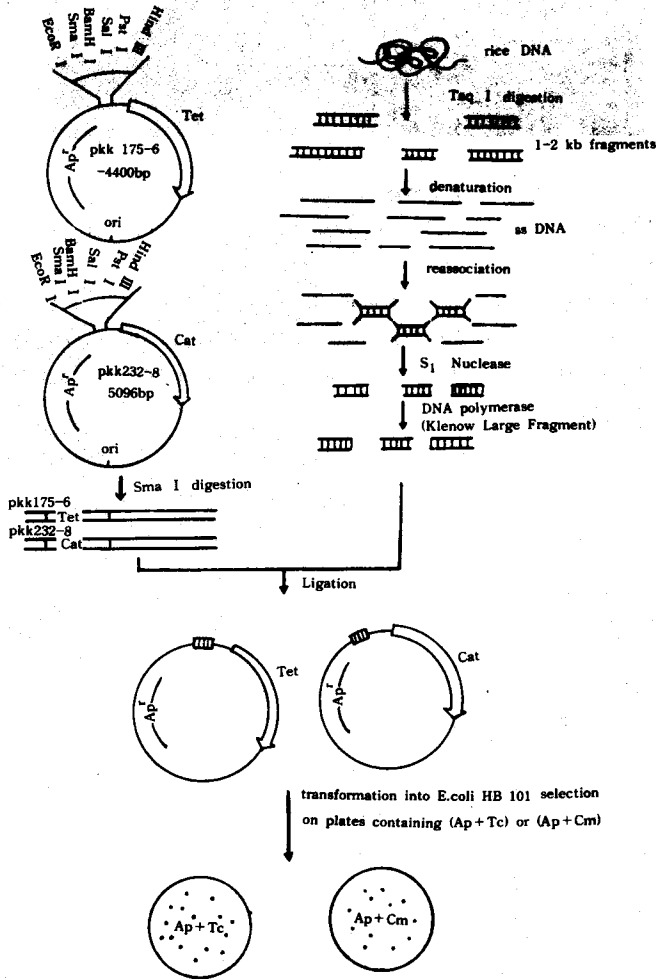


图 1 水稻重复 DNA 顺序的克隆  
Fig. 1 Cloning of rice repetitive DNA

另外，我们还测定了一些克隆在一定抗菌素浓度下的生长曲线。在液体 LB 培养基中添加抗菌素后，克隆菌株生长情况普遍表现出较长一段时间的延滞期 (Lag)，但延滞期的

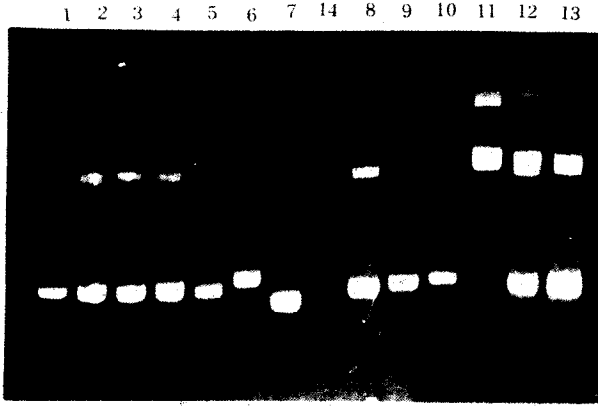


图2 水稻重复顺序克隆的快速检测

1-6 和 8-13 分别为 pRRD 107, 106, 115, 117, 120, 124, 125, 127, 130, 131, 146, 142, DNA, 7 为 pKK232-8 载体 DNA, 14 为  $\lambda$ /Hind III DNA.

Fig. 2 The rapid identification of rice repetitive sequence clones

Lane 1-6 and 8-13 contain pRRD 107, 106, 115, 117, 120, 124, 125, 127, 130, 131, 146, 142 separately; Lane 7 contains the cloning vector pKK 232-8 as size control; Lane 14 contains  $\lambda$ /Hind III DNA.

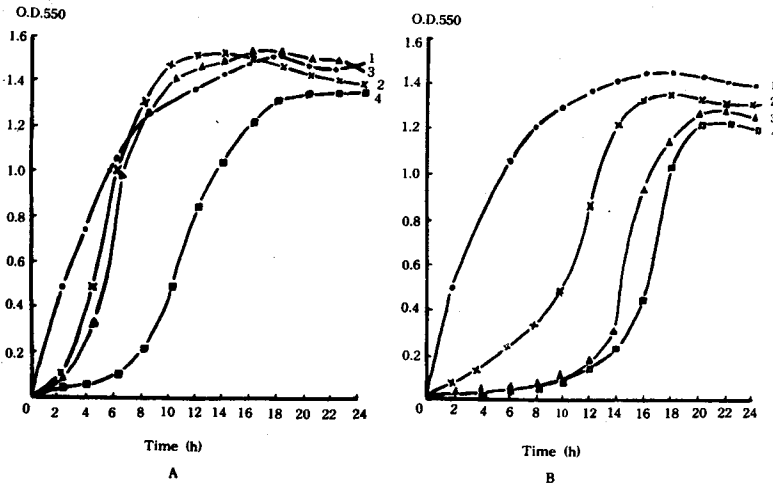


图3 重组质粒 pRRD 在一定抗菌素浓度下的生长曲线

Fig. 3 The growth curves of pRRD clones in the presence of antibiotics.

(A) 1. pKK175-6, Tc 0 $\mu$ g/ml 2. pRRD9, Tc 30 $\mu$ g/ml 3. pRRD 8, Tc 30 $\mu$ g/ml 4. pRRD 21, Tc 30 $\mu$ g/ml (B) 1. pKK232-8, Cm 0 $\mu$ g/ml 2. pRRD 124, Cm 160 $\mu$ g/ml 3. pRRD 146, Cm 160 $\mu$ g/ml 4. pRRD 107, Cm 160 $\mu$ g/ml

长短不同 (如图 3), 对照菌株是标准 S 型曲线, 对数生长期为 5h, 在含 Tc 40 $\mu$ g/ml 条件下, 克隆体 pRRD9, 23, 33 经 10-12h 的延滞期后才呈 S 型曲线, 其对数生长期为 6h; 而 pRRD3 则只有很短的 Lag (1-2h), 对数生长期为 8h, 但生长量降低 10-15%。由此推想, 克隆的水稻重复 DNA 顺序的长短及其内部结构的差异, 将会影响到其作为启动子的活性强度和含有该重组质粒的菌株在一定抗菌素浓度下的生长情况, 因抗性表达的克隆与序列分析的克隆不是同样的。

## 二、一些重组体的插入片段的序列测定与分析

用内切酶 EcoRI 和 Hind 消化重组体 pRRD8, 9, 21 DNA, 分离到插入的水稻重复 DNA 片段 (约 400-600bp 大小), 分别亚克隆到噬菌体 M13mp18 和 M13mp19 中进行测序。上述三个克隆的序列如图 4。

通过计算机分析发现, 这些序列存在一些共同的有趣的特征。它们的碱基组成显示 A、T 含量丰富, pRRD8, 9, 21 分别为 63%, 58%, 53%, 特别是在远离载体抗性基因的 5' 上游区, 即序列的 5' 区域内 (A+T)% 含量更高, 如 pRRD8 (1-100nt) 84%, pRRD9 (1-50nt) 72.5%; 在这些序列中均有多处自身内部重复、反折对称、发夹结构等, 这表明在这些重复顺序片段中还存在若干种更小的重复单位; 具有原核启动子的同源序列, 所测的这几个序列中均有一个以上的原核启动子 (-10 区, -35 区) 的同源序列 (见表 3), 如 pRRD8 有 4 处有 -10 区 (TATAAT) 同源, 4 处与 -35 区 (TTGACA) 同源。这些同源序列可能在抗性基因表达中起作用。尽管目前尚不能确定究竟是那一处或几处同源区在体内起调控作用, 但随着研究的深入如进行缺失分析等, 我们将有可能知道更多有关其结构与功能的关系。

在测定的三个序列中, 还可看到一些与植物类型启动子 (TCTATAAAACA 或 TG-TATAAAATA) 同源的序列, 以及与早期发表的真核启动子的 Hogness Box (TATAAAAG) 同源的序列, 暗示这些重复片段不仅有原核启动子活性, 还可能具有真核启动子活性。

此外, pRRD9 在 160nt 有与 polyA 信号 (AATAAA) 完全同源的序列, pRRD8 有 4 处与 AGGA 同源, 而 pRRD 21 也有 4 处与 GGTGG 完全同源。上述这些序列是迄今在基因调控区的一些保守序列。由此可见, 在所测的三个序列中含有丰富的基因表达调控元件的同源序列。

图 4 三个克隆片段的全序列

Fig 4 The complete sequences of three clones

The complete sequence of pRRD-21 fragment (479nt),

10	20	30	40	50	60	70
CGATTGGTGTG	GTGGTGCTTG	AGAAAGTGGG	TGGCTTGACA	CGAAGAAATT	CTAACCGTTT	GGACTGAGGA
80	90	100	110	120	130	140
GGTGGAGGAC	CAAACCTGCAG	GTTCTGCTGC	TGCTGCTGTG	CTTGCTGCTG	CACCTGCTGC	AACACCTGAT
150	160	170	180	190	200	210
GGTACTGTG	CTGCATATGT	TGCATCATCA	TTGTCATCAT	CTGAGTGACC	GTTGGGTTCT	CGGGCGGTGG
220	230	240	250	260	270	280
AGATGGACTG	CTGCTAGATG	CACCACTGGT	ATGAGCTCCC	TTGATCTGCA	CTTCGCTGCC	ACTGGCGTCG

290	300	310	320	330	340	350
CTGGAGTCAC	GGGGATCATT	CCTTGTCTTC	ACCATCTGGA	GGAGGATAGG	TAGAAATAAG	AGAAATGAAG
360	370	380	390	400	410	420
AAAACAGATG	GCTCGGAAAC	TAATCTTTCT	TATAAAITTA	TGTACAATTA	TCTTAATCTT	GATTAAACA
430	440	450	460	470		
CTTAAAAGGA	AGTAAACAAC	TCCTAATTA	GGTAGCCATA	CCACTGACAC	ATGATATCG	

The complete sequence of pRRD9 fragment (560nt);

5'	10	20	30	40	50	60	70
GTCCAAAAAT	CTTGTTTTTG	TGCTTTTTGA	ACTTTTTTCAT	TCCGGTGAAA	AACATCGCAC	CCGTGTCGGC	
80	90	100	110	120	130	140	
CAATATTGGC	ATTAATTGAC	AAAAGTTCGC	CGCGTTTATC	ACGAAGATCT	TTCTAGTTAA	TACGTGTCT	
150	160	170	180	190	200	210	
TGGGAGTCCT	TGCAATTTGA	ATAAACCAAG	ATCTTACCAT	GACTGCAATT	TTAGAGAGAC	GCGAAAGTAC	
220	230	240	250	260	270	280	
AAGCCCTGTG	GGGTCGCTTC	TGCAACTGGA	TAAGTAGCAC	CGAAAACCGT	CTTACATCG	GATGGTTCCG	
290	300	310	320	330	340	350	
TGTTTTGATG	ATCCCTACCT	TATTGACCGC	AACTTCTGTA	TTTATTATCG	CCTTCATCGC	TGCCCTCCA	
360	370	380	390	400	410	420	
GTAGATATTG	ATGGTATTCG	TGAGCCTGTT	TCTGGTCTT	TACTTTACGG	AAACAATATT	ATCTCTGGTG	
430	440	450	460	470	480	490	
CCATTATTCC	TACTTCTGCG	GCGATCGGAT	TGCACITTA	CCCAATTGG	GAAGCTGCAT	CTGTGATGA	
500	510	520	530	540	550	560	
GTGGTTATAC	AATGGTGGTC	CTTATGAGCT	AATTGTTCTA	CACITTCITAC	TTGGTGTAGC	TTGTTATATG	

The complete sequence of pRRD8 fragment (515nt);

5'	10	20	30	40	50	60	70
GTGTTTTTTTT	ATAAAAAAAAA	GTTGCITTA	AAATCATATC	AAATTACTIT	AAAGTATTTT	TTTAACTAAT	
80	90	100	110	120	130	140	
ATACTTAATT	AATCATGCAT	TAAAATATCG	CTCCGTTATA	AGTGCAAGTG	ATGGATGGAG	CCATGGAGGT	
150	160	170	180	190	200	210	
TGCTAACCCA	TGCAAACGCA	AACGAAAGCA	GCCTTAGGCA	GGAGCTTGA	TGGAGAGGAG	AGAGATATAT	
220	230	240	250	260	270	280	
CAACGGAAAT	ATGCTATTGG	AAAATAATTG	GATTGACCTA	TGACATGGAT	GAAATGAAA	AAAGAACTAG	
290	300	310	320	330	340	350	
TGAGGACACT	AATATTTTGG	ACACTAATAC	GGTAAGTTTG	GTGGGCCGTT	TGTTCTTAC	GAATATCTA	
360	370	380	390	400	410	420	
AAACTGGGAG	AGAAGAAAAA	TCTCCCTACA	TTCTGGAAT	GGTTTGAGGG	CTGCTACAAA	ACGGGATCCC	
430	440	450	460	470	480	490	
TTGCAACGGG	ATAGACATAT	TAACATTTTT	CTTGACACAG	TATCGTGTAC	CATGTAGCTG	GTATCACAAT	
500	510						
AGGTATCAAG	TACTGTCTCA	TAGAA					

表 3 不同克隆片段中存在的与调节元件同源的序列  
Table 3 The regulator-like sequences existed in the different cloning fragments

Position and sequence		Prokaryotic promoter		Plant-type or eukaryotic promoter	Some consense sequences in the regulator region	
		-10 region TATAAT	-35 region TGACA	T <del>T</del> TATAA <del>A</del> <sub>1</sub> -s <del>f</del> A TATAAAAG	AGCA	GGTGG
Cloning fragment (Clone No.)	pRRD 8	10* TATAAA	243 TTGACC	10 TATAAAAA	180 AGGA	320GGTGG
		70 TATACT	250 ATGACA		196 AGGA	
		107 TATAAG	298 TGGACA		259 AGGA	
		205 TATATC	432 TAGACA		283 AGGA	
	pRRD 9	323 TATTAT	186 TTGACA	496 TATACAAT	None	None
		407 TATTAT	303 TTGACC			
		496 TATACA				
	pRRD 21	381 TATAAA	19 TTGAGA	379 CTTATAAAT	67 AGGA	10 GGTGG 29 GGTGG 71 GGTGG 206 GGTGG
			36 TTGACA		76 AGGA	
			171 TTGTCA		323 AGGA	
			282 TTGATC	387 TTTATGTACA	427 AGGA	
			304 TTGTCT			
		410 TTGATT				

\* The number shows the position of 5' end nucleotide of the sequence.

### 三、具有启动子活性的重复序列在水稻基因组中的分布状况及其含义

分别用质粒 pRRD 8, 9, 107 质粒 DNA 或其插入片段作探针, 对不同内切酶消化的水稻 DNA 作 Southern 杂交 (见图 5)。

从杂交结果看, 它们都呈现出若干强弱不同的杂交带, 显示典型的重复 DNA 顺序杂交图谱。例如 pRRD8, 9 克隆的杂交图谱, 在某一位置的杂交强度明显地高于其它带, 并且在这条强杂交带之下还有多条较弱的阶梯 (ladder) 状分布的杂交带, 表明它的一部份成员可能在基因组内呈一定程度的串连重复, 而另一部份则可能散布分布。

以上研究是利用启动子选择载体来克隆植物基因组中的重复顺序, 结果表明这一研究途径是可行的。相似地, 我们还可以设计一些选择载体来分离具有与其它调节元件同源的重复顺序。本研究结果也说明重复 DNA 顺序含有丰富的调节元件同源序列, 所用的克隆系统虽然是一个启动子区缺失质粒, 但结果使人们感到惊奇的是, 在这些短短 (500—600bp) 的序列中竟然包含了众多的与原核启动子、真核启动子、polyA 信号以及一些调控区的保守序列同源的序列, 这令人联想到是否重复顺序可作为潜在的调节元件的贮存库。在进化理论上存在着重复顺序的近代起源说<sup>[20]</sup>和先起源的<sup>[28]</sup>。近代起源说认为重复序列是通过不等交换、转座子插入或 Retroposon 式扩散产生的, 但这种理论较难解释我们所得到的重复序列片段所具有的特点即将那么多调控元件收集成一个单元后再扩散到基因组中。相反, 重复顺序起源于生产之始的假说则能较好地解释这点: 寡聚核苷酸的重复序列是地球上的一种原始序列, 由此进化产生各种调控元件和新的基因。因此, 我们认为, 有关重复 DNA 顺序功能的研究不在于确定某一类型重复 DNA 顺序或某一个家族成员的序列在基因组中的特殊功能, 而且这种努可能是徒劳的, 重复顺序也许类似一



个贮存众多不同类型调节元件的信息库, 在这里一种元件有多份拷贝, 这些元件有可能在个体发育和系统发育过程中被利用, 因而从进化意义上看这些 DNA 组份并不是一种可有可无的寄生物。然而, 要说明这点, 仍需解决许多问题, 例如, 要进行缺失分析确定所克隆的片段哪一区域的序列在克隆菌株的抗性表达中担负功能, 以及这些区域在基因组内存在的位置和拷贝数目, 以及它们是否和某些反式因子相互作用等等, 我们也正在进行这方面的探索。

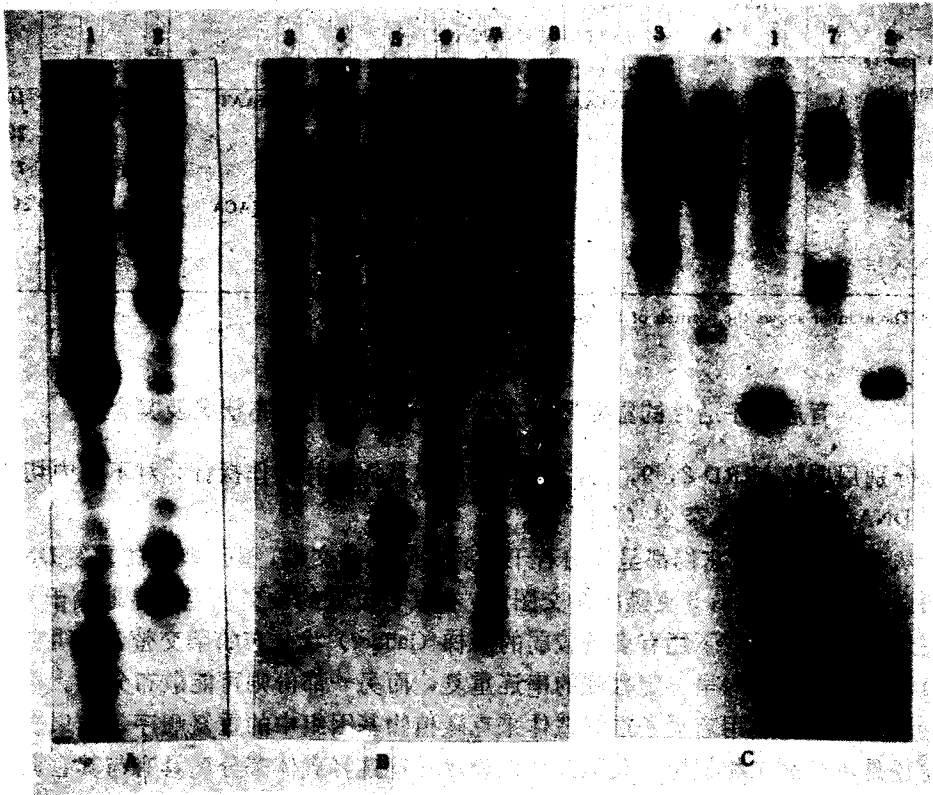


图 5 水稻重复顺序克隆的杂交图谱

水稻 DNA 用 (1) Hind II, (2) EcoRI, (3) BamHI, (4) Bgl I, (5) DraI, (6) EcoRV, (7) Hae II, (8) HhaI 酶切后用 (A) pRRD 107, (B) pRRD 9, (C) pRRD 8 做探针进行 Southern 杂交。

Fig 5 Southern hybridization patterns of several rice repetitive sequences

Rice DNA was digested with (1) Hind II, (2) EcoRI, (3) BamHI, (4) Bgl I, (5) DraI, (6) EcoRV, (7) Hae II (8) HhaI and then probed with (A) pRRD 107, (B) pRRD 9, (C) pRRD 8.

## 参考文献

- [1] 唐少军、侯永敏、刘良式, 广亲和水稻品种重复 DNA 顺序的研究。(杂交水稻论文集), 1991年。(印刷中)。
- [2] Benslimane, A. A., M. Dron, C. Hartmann and A. Rode, Small tandemly repeated DNA sequences of higher plants likely originate from a tRNA gene ancestor. *Nucl. Acid Res.*, 1986, 14 (20): 8111—8119.
- [3] Blackburn, E. H., Structure and function of telomers. *Nature*, 1991, 350 (6319): 569—573.
- [4] Britten, R. J. and O. E. Kohne, Repeated sequences in DNA. *Science*, 1963, 161: 529—540.
- [5] Britten, R. J., D. E. Garham and B. R. Neufeld, Method in Emzymology. 1974, 29E: 363—406.
- [6] Brosius, J., Plasmid vectors for the selection of promoters. *Gene*. 1984, 27: 151—160.
- [7] Brutlag, D. L., Molecular arrangement and evolution of heterochromatic DNA. *Ann. Rev. Genet.*, 1980, 14: 121—144.
- [8] Cordesse, F., G. Second and M. Delseny, Ribosomal gene spacer length variability in cultivated and wild rice species. *Theor. Appl. Genet.*, 1990, 78: 81—88.
- [9] Davidson, E. H. and R. J. Britten, Regulation of gene expression; possible role of repetitive sequences. *Science*, 1979, 204: 1052—1059.
- [10] Doolittle, W. F. and C. Sapienza, Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature*, 1980, 284: 601—603.
- [11] Dover, G. A., Ignorant DNA? *Nature*, 1980, 285: 618—620.
- [12] Flavell, R. B. and D. B. Smith, Variation in nucleolar organiser tRNA gene multiplicity in wheat and rye. *Chromosoma*, 1974, 47: 327—334.
- [13] Flavell, R. B., The molecular characterization of plant chromosomal DNA sequences. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 1980, 31: 569—596.
- [14] Houch, C. M., F. P. Rinehart and C. W. Schmid, Aubiquitous family of repeated DNA sequences in human genome. *J. Mol. Bio.*, 1979, 132: 289—306.
- [15] Liu Liangshi and K. G. Lark, The red function of phage mediates alteration of an interspersed repeated DNA sequence from the kangaroo rat *Dipodomys ordii*. *Mol. Gen. Genet.*, 1982, 188: 27—36.
- [16] Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook, Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- [17] Murray, M. G. and W. F. Thompson, Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acid Res.*, 1980, 8 (19): 4321—4325.
- [18] Orgel, L. E. and F. H. C. Crick, Selfish DNA; the ultimate parasite. *Nature*, 1980, 284: 604—607.
- [19] Pardue, M. L., Dynamic instability of chromosomes and genomes. *Cell*, 1991, 86: 427—431.
- [20] Rogers, J., The origin and evolution of retroposons. *Int. Rev. Cytol.*, 1985, 98: 187—279.
- [21] Singer, M. F., Highly repeated sequences in mammalian genomes. *Int. Rev. Cytol.*, 1982, 76: 67—111.
- [22] Strauss, F. and A. Varshavsky, A protein binds to a satellite DNA repeat at three specific sites that would be brought into mutual proximity by DNA folding in the nucleosome. *Cell*, 1984, 37: 889—901.
- [23] Walbot, V., Genome organization in plants. *Molecular Biology of Plants*. 1979, 31—72.
- [24] Wharton, K. A., B. Yedvobnick, V. G. Finnerty and S. A. Tsakonas, opa, A novel family of transcribed repeats shared by the Notch locus and other developmentally regulated loci in *D. melanogaster*. *Cell*, 1985, 40: 55—62.
- [25] Wu, T. and R. Wu, A new rice repetitive DNA shows sequence homology to both 5sRNA and tRNA. *Nucl. Acid Res.*, 1987, 15 (15) 5913—5923.
- [26] Zhang, S. H., Repeated sequence and evolution. *Speculation in Science and Technology*. 1989, 13 (3): 177—180.

CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF  
REPETITIVE DNA FRAGMENT  
FROM RICE (*ORYZA SATIVA* L.)

A Proposed Role of Repeated DNA in Genome

He Mulan, Tang Dongjiang, Xu Liping, Hou Yongmin, Zhang Sumin and Liu Liangshi

(Biotechnology Research Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Abstract

By application of appropriate vectors together with DNA renaturation kinetic method, repetitive DNA sequences of different Cot value were cloned from rice (*Oryza sativa* L.) genome. Two promoter selection plasmids, pKK175-6 and pKK232-8, were used as cloning vectors, which contained promoters Tet or Cat gene, respectively. The recombinant clones acquired resistance to Tc or Cm, and their resistant levels varied from 20 $\mu$ g/ml to 80 $\mu$ g/ml Tc or 30 $\mu$ g/ml to 260 $\mu$ g/ml Cm. The sequence analysis showed that there were several regulator-like sequences such as prokaryotic and plant-type promoter existed in the cloning fragments.

**Key words:** Rice; Repetitive DNA; Promoter-like sequences