

水稻 (*Oryza sativa* L.) 核基因组存在叶绿体 *psbA* 基因的同源片段

俞 皓 韩爱东 王春新 李 焱 刘良式

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘要 序列比较说明, 重复 DNA 顺序 pRRD9* 与水稻叶绿体基因组中编码 QB 蛋白的 *psbA* 基因存在高度的同源。用 pRRD9 亚克隆片段 pRRD9R 和片段 pRRD9L 对水稻的叶绿体和核 DNA 进行 Southern 杂交分析, 揭示了 *psbA* 基因同源片段在某个进化时期由叶绿体基因组转移到水稻核基因组, 而且两者在水稻进化过程中的变异程度存在明显的差异。利用它们对野生稻和栽培稻总 DNA 的 Southern 杂交分析, 显示亚洲栽培稻与 AA 基因组型的野生稻有较近的亲缘关系, 以及在部分野生稻产生特异的杂交带谱, 说明它可以作为一种分子探针来研究水稻的进化问题。

关键词 水稻; 重复 DNA 顺序; 叶绿体 *psbA* 基因

中图分类号 Q813.6

NUCLEAR GENOMIC HOMOLOGOUS SEQUENCE OF CHLOROPLAST *psbA* GENE IN RICE (*ORYZA SATIVA* L.)

Yu Hao Han Aidong Wang Chunxin Li Yan Liu Liangshi

(School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Abstract Sequence comparison showed the high homology between rice repetitive DNA sequence pRRD9 and chloroplast gene *psbA* encoding QB protein. Southern hybridizations of rice chloroplast and nuclear DNA with the two subcloned segments from pRRD9, pRRD9R and pRRD9L, revealed that *psbA* gene sequence was transferred from chloroplast to the nuclear genome in rice at a certain evolution stage. Significant differences occurred between the two segments in the evolution of rice variation. Southern analysis of wild and cultivated rices with the segments showed that the cultivated Asian rice had closer relative of the wild rice with AA genome type. In addition, specific hybridization patterns were also detected in some wild rices. These findings suggest that pRRD9 may be a good molecular probe for the study of the evolution of rice.

Key words Rice; Repetitive DNA sequence; Chloroplast *psbA* gene

* 此序列作为一个新序列已被 EBI 数据库接收, 登录号码为 #92389。

国家 863 计划和美国洛氏基金会水稻生物技术国际合作项目支持。

1998-09-07 收稿; 1999-05-04 修回

植物叶绿体基因组的遗传物质转移到核基因组是一种普遍的现象^[1]。叶绿体的一些基因在核基因组中存在它的同源片段^[2]。高等植物的叶绿体基因组在进化过程中已经缩小到它们始祖基因组的几十分之一^[3]，这从一个侧面说明发生过遗传物质的流动。本文报道叶绿体基因 *psbA* 的同源片段存在于核基因组中这一事实。

中度重复顺序 pRRD9 是利用复性动力学方法 ($Cot_{50} = 10^{-2}$) 从水稻 DNA 中克隆到的，核苷酸序列长度为 560 bp^[4]，用狭缝印渍杂交测定 pRRD9 同源序列在水稻基因组中的拷贝数，发现野生稻基因组的拷贝数大约在 300–900 之间，而栽培稻则有 3 000–6 000 份拷贝^[5]。用这个片段作探针，与植物总 DNA 的内切酶 *Hae* III 消化物作 Southern 杂交分析，显示稻属和多种禾本科植物 DNA 中均存在其同源片段，并且在水稻中显示出 3.2 kb 的主带和以 180 bp 为单体直至 30 聚体的强烈的阶梯状杂交带谱^[6,7]。基于以上结果使我们有兴趣进一步探讨它的存在范围、来源和作为分子探针的实用价值。

1 材料和方法

水稻总 DNA 的提取 称取 5–10 g 叶片，用液氮研磨成细粉，转入 60 °C 预保温的 25 ml 提取液 (0.315 g ml⁻¹ 尿素，0.375 mol/L Tris-HCl, 0.015 mol/L EDTA, 2% Sarcosine, 5% 饱和酚) 中；加 1.5 ml 的 10% SDS；保温 10 min 后加 15 ml 的氯仿/异戊醇 (24:1)，轻摇 5 min，于 10 000 r min⁻¹ 离心 10 min，上清液通过 4 层无菌纱布过滤到新管中，用 2/3 体积的异丙醇沉淀 DNA；挑出 DNA 沉淀，用 70% 乙醇洗涤几次；加 4 ml 10×TE (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA) 于 60 °C 溶解 2 h，并在最后 10 min 加入 10 μl RNase (10 μg μl⁻¹)，于 12 000 r min⁻¹ 离心 10 min 去掉不溶物，上清液重新用乙醇沉淀一次，溶于 TE，-20 °C 保存^[8]。

水稻核 DNA 的制备和电泳 定量称取水稻黄化苗，加液氮研磨 10 min，每克材料加入 10 ml 预冷抽提液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6, 50 mmol/L EDTA, pH 8.0, 20 mmol/L 巯基乙醇, 40% 甘油, 0.1% BSA, 0.5% Triton X-100) 中，轻轻混匀，冰上放置 30 min，用一层尼龙布过滤至灭菌离心管中。滤液经过 4 000 r min⁻¹ 离心 10 min，去沉淀。上清液转入新离心管中，4 °C 5 000 r min⁻¹ 离心 10 min。沉淀用 0.25 mol/L 蔗糖悬浮，然后铺在 25% (W/W), 45% (W/W), 60% (W/W) 不连续蔗糖梯度上，使用水平转子 4 000 r min⁻¹ 离心 20 min。收集分布在 45% 与 60% 蔗糖梯度界面上细胞核层，用抽提液洗涤三次，最后用等体积抽提液悬浮，45 °C 保温 30 min，然后加入 3/4 体积预先在 45 °C 保温的 2% 低熔点琼脂糖 (用 0.125 mol/L EDTA 配制)，加到可预制成胶块的模具中；胶块转入 ESP 溶液 (0.5 mol/L EDTA pH 8.0, 1% Sarcosine, 2 mg ml⁻¹ 蛋白酶 K)，50 °C 保温 48 h，最后用 TE₅₀ (10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L EDTA, pH 8.0) 洗两次，每次 24 h，最后保存于 4 °C 的 0.5 mol/L EDTA 中^[9]。

水稻核 DNA 的内切酶消化和电泳 将胶块在 50 °C 下用 40 倍体积的 TE₁₀P (1 mmol/L PMSF, 10 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA, pH 8.0) 洗涤两次，每次 1 h；再用 40 倍体积 TE 洗两次，每次 1 h；然后在 4 °C 下用 40 倍体积无菌双蒸水洗涤 1 h；用 20 倍体积预消化液洗两次，每次 1 h；然后每 1/4–1/6 胶块加 100 μl 消化液，再加入 30–40 U 的 *Hae* III，冰上放置 1 h；然后在 37 °C 下消化 10 h。把相当于 3–5 μg DNA 的胶块插入点样孔。由于核

DNA 与其它 DNA 的上样方式不同, 会引起类似图 2A 第一电泳道的带谱。

水稻叶绿体 DNA 的制备 取 3—4 片叶龄的叶片 30 g, 用蒸馏水洗净, 晾干后置于 4 °C 黑暗饥饿过夜; 剪碎叶片, 加入 300 ml 4 °C 预冷的缓冲液 A(25 mmol/L 柠檬酸, 1.25 mol/L NaCl, 0.25 mol/L 抗坏血酸, pH3.6), 高速匀浆三次, 每次约 5 s, 6 层纱布过滤; 滤液 4 °C 800×g 离心 6 min; 用 60 ml 预冷的缓冲液 B(50 mmol/L Tris-HCl, 25 mmol/L EDTA, 1.25 mol/L NaCl, 10 mmol/L 巯基乙醇, pH8.0) 悬浮沉淀, 800×g 离心 6 min; 用 30 ml 缓冲液 C(150 mmol/L NaCl, 100 mmol/L EDTA, pH8.0) 重悬沉淀, 800×g 离心 6 min; 沉淀加 8 ml 缓冲液 D(50 mmol/L Tris-HCl, 25 mmol/L EDTA, pH8.0), 2 ml 10% Sarcosine, 蛋白酶 E 10 μl(100 mg ml⁻¹), 于 37 °C 保温 4 h; 依次用等体积酚, 酚: 氯仿各抽提一次; 用 0.5 体积 7.5 mol/L NH₄AC, 2 倍体积无水乙醇沉淀 DNA; 4 °C 10 000 r min⁻¹ 离心 15 min; 沉淀溶于 400 μl TE 后, 加 5 μl REase(10 mg ml⁻¹), 37 °C 保温 1 h; 等体积酚: 氯仿抽提一次; 水相加 1/10 体积 3 mol/L NaAc (pH5.2), 2 倍体积冷无水乙醇, 混合均匀后将沉淀勾出; 70% 乙醇洗涤一次; 溶于适量 TE 中^[10]。

Southern 转移和杂交 Southern 转移按 Sambrook 的方法进行^[11]。0.5 μg 探针 DNA 用缺口翻译法(Nick Translation Kit, Promega) 标记。膜于预杂交液(1% BSA, 7% SDS, 0.5 mol/L NaPO₄, pH6.8, 1 mmol/L EDTA, pH8.0) 中 65 °C 预杂交 6 h, 杂交 16 h。洗膜程序依次为洗膜液 I(0.5% BSA, 5% SDS, 40 mmol/L NaPO₄, pH6.8, 1 mmol/L EDTA, pH8.0) 室温和 65 °C 各 30 min, 洗膜液 II (1% SDS, 40 mmol/L NaPO₄, pH6.8, 1 mmol/L EDTA, pH8.0) 65 °C 30 min 两次; -70 °C 放射自显影。

DNA 数据的检索与分析 在 Genebank 数据库中进行序列同源性检索, 并使用 DNASIS 软件包进行 DNA 数据分析。

2 结果和讨论

2.1 pRRD9 序列与 *psbA* 基因序列的同源

根据我们以前的研究, pRRD9 的同源序列在稻属和多种禾本科植物基因组广泛存在^[7], 这一点引起我们的兴趣。因此对 pRRD9 在 DNA 数据库中进行同源性检索, 发现它和水稻叶绿体编码 QB 蛋白的 *psbA* 基因有 89.3% 的同源性(图 1), 其对应的同源序列是 *psbA* 基因的 5' 上游非编码区和 5' 编码区的一段序列^[12]。pRRD9 的 117—560 bp 区(简称 pRRD9R) 与 *psbA* 基因序列只有一个核苷酸的差异, 达 99.7%, 但它的 1—116 bp 区(简称 pRRD9L) 与对应区仅有 45.7% 的同源。据此可以推测这个重复序列可能来源于叶绿体基因组中的 *psbA* 基因, 而且转移之后可能在核基因组中发生变异和扩增。这就是产生一个有趣的问题, 在水稻核基因组中 pRRD9 作为重复 DNA 顺序的一个成员, 为何该序列一部分是保守的, 而另一部分却高度变异? 根据现在的资料还不能作出回答。

2.2 pRRD9 在水稻核基因组和叶绿体基因组中的分布

为了证实 pRRD9 重复序列来源于叶绿体基因组中的 *psbA* 基因, 同时也进一步了解它们在水稻的核基因组和叶绿体基因组中的分布, 根据 pRRD9 的两个部分与 *psbA* 基因片段的同源性

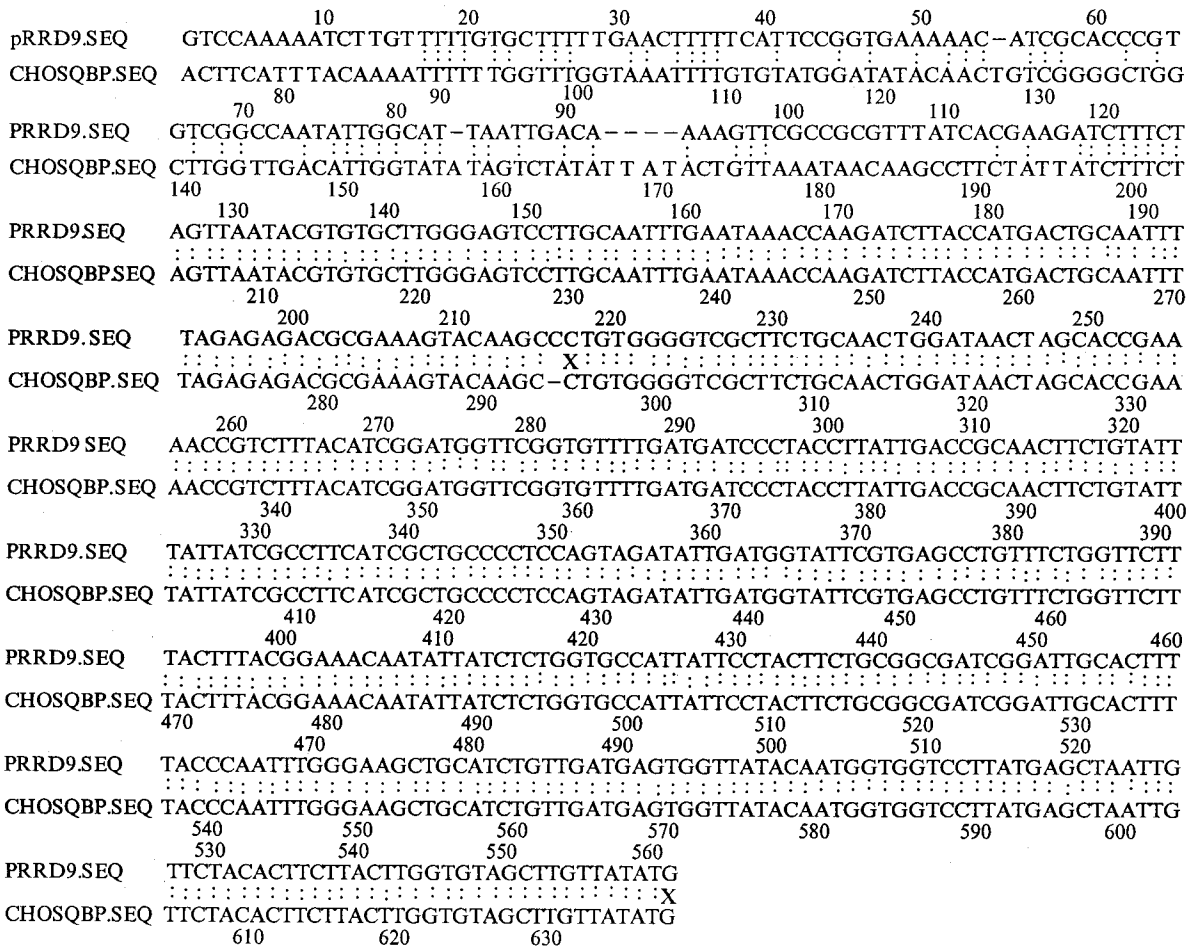


图1 pRRD9序列与水稻叶绿体QB基因的同源性比较

Fig. 1 Homogeneity comparison between pRRD9 and rice chloroplast *psbA* gene

初始值是 1384, 最高值是 1804. “X”表示最高同源片段 Initial score is 1384, and optimized score is 1804.

“X” stands for the fragment of optimized homology.

存在的差异, 我们亚克隆获得 pRRD9R(117-560 bp) 和 pRRD9L(1-116 bp) 片段。利用这两个片段作探针, 对水稻纯化的核和叶绿体 DNA 的 *Hae* III 消化产物分别进行 Southern 杂交分析(图 2)。结果显示, 在核 DNA 中, pRRD9R 产生的 3.2 kb 强杂交带, 明显表现为单拷贝或少拷贝, 而 pRRD9L 则明显的表现为串联的重复顺序带谱。在叶绿体 DNA 中, pRRD9R 产生除与核 DNA 相同的强信号带外, 还有一个弱带, 可能是叶绿体 DNA 变异带来的多态性。而 pRRD9L 在叶绿体 DNA 杂交带谱在相对低分子量处存在与核 DNA 相同的阶梯状带谱, 而高分子量区则无核 DNA 显示的明显阶梯状带谱, 说明 pRRD9L 在叶绿体基因组中可能已经存在串联程度较低的重复。当然这种重复也可能是叶绿体 DNA 中污染有少量的核 DNA 造成的, 因为所采用的叶绿体 DNA 纯化方法不可避免地存在微量的核 DNA 污染^[13]。

由此我们可以得出这样的结论, pRRD9 重复顺序确实存在于水稻核基因组中, 它起源于叶绿体的 *psbA* 基因, 在进化的过程中从叶绿体基因组转移到核基因组中, 并且发生了变异和扩

增, 其中与 *psbA* 基因序列高度同源的右侧序列(我们还不知道它在核基因组 DNA 向右还延伸多长)仍然保持单拷贝或少拷贝的性质, 而左侧(5'上游区)却高度放大, 如前所述, 在 Southern 杂交图谱上可以观察的 180 bp 的 30 聚体的带谱, 这种复杂的结构被我们克隆到纯粹是一种巧合, 它似乎是重复 DNA 顺序中的一种 SINE 重复元件^[14]。

2.3 pRRD9 序列的进化

存在于核基因组中的 pRRD9 序列是否仅限于水稻的核基因组中? 为了研究 pRRD9 的进化关系, 我们对水稻和与水稻亲缘关系较近的李氏禾进行分析。当以 pRRD9、pRRD9R、pRRD9L 作探针, 对它们的核 DNA 进行 Southern 杂交分析(图 3), 可以看出, 一方面对水稻来说, pRRD9R 和 pRRD9L 两者的杂交带谱叠加能很好地吻合 pRRD9 的杂交带谱(参看图 4 及文献[6,7]); 另一方面 pRRD9R 在水稻和李氏禾的核 DNA 中均显示杂交带谱, pRRD9L 则只在水稻的核 DNA 中显示, 而在李氏禾核 DNA 并不显示杂交带谱。由于水稻和李氏禾分别属于禾本科的稻亚族中的两个属, 亲缘关系较近, 这说明 pRRD9L 的迅速变异使之在水稻和李氏禾之间产生杂交的不同。因为存在水稻中的序列和当初叶绿体 DNA 的序列已经有很大的差别(45.7%同源), 不难想象, 它与李氏禾序列的差别更大了, 因而不产生杂交。

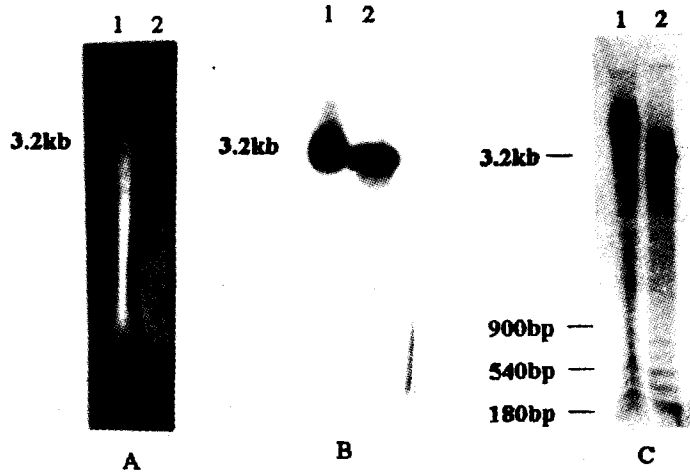


图 2 水稻的核和叶绿体 DNA 的 Southern 杂交分析

Fig. 2 Southern hybridization analysis of nuclear and chloroplast DNAs of rice

(A) *Hae* III 酶切的电泳图 Electrophoresis pattern (*Hae* III digestion); (B) pRRD9R 作探针的杂交图 Probed with pRRD9R; (C) pRRD9L 作探针的杂交图 Probed with pRRD9L; 1 核 DNA, nuclear DNA; 2 叶绿体 DNA, chloroplast DNA

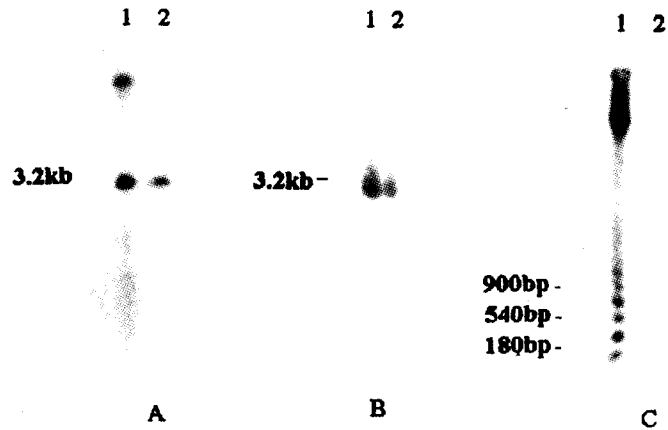


图 3 水稻和李氏禾核 DNA(*Hae* III 酶消化) 的 Southern 杂交分析

Fig. 3 Southern hybridization analysis of nuclear DNAs from *Oryza sativa* L. and *Leersia hexandra* Swartz (*Hae* III digestion)

探针分别为 (A) pRRD9, (B) pRRD9R, (C) pRRD9L. Probed with pRRD9 (A), pRRD9R (B), pRRD9L (C); 1 水稻 *Oryza sativa*; 2 李氏禾 *Leersia hexandra*.

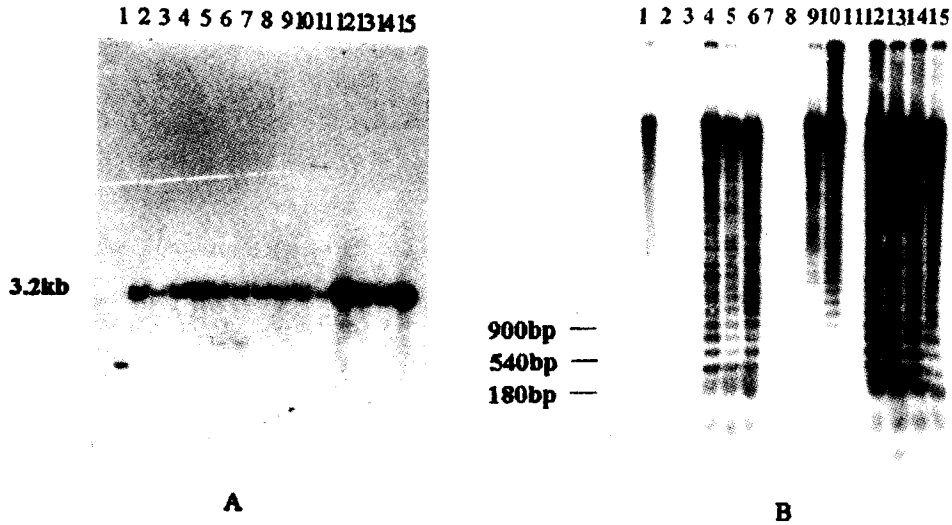


图4 以 pRRD9R(A) 和 pRRD9L(B) 为探针对野生稻和栽培稻总 DNA(*Hae* III 酶消化) 的 Southern 分析
 Fig. 4 Southern hybridization analysis of total DNAs from wild and cultivated rices (*Hae* III digestion) probed with pRRD9R (A) and pRRD9L (B)

1 小粒野生稻 *Oryza minuta*; 2. 斑点野生稻 *O. punctata*; 3. 药用野生稻 *O. officinalis*; 4. 普通野生稻 *O. rufipogon*; 5. 多年生野生稻 *O. glumaepatula*; 6. 长药野生稻 *O. longistaminata*; 7. 非洲野生稻 *O. barthii*; 8. 疣粒野生稻 *O. meyeriana*; 9. 澳洲野生稻 *O. australiansis*; 10. 高秆野生稻 *O. alta*; 11. 短药野生稻 *O. brachyantha*; 12. 日本晴 Ribenqing; 13. 马尾齐 Maweiqi; 14. 巴利拉 Balila; 15. IR30.

2.4 用 pRRD9L 和 pRRD9R 序列研究野生稻和栽培稻的进化关系

从上面的结果可知, pRRD9 既具有极其保守性又具有十分变异性的特征, 这一点使它可能成为一种新型的在核苷酸水平上研究水稻进化的分子探针, 这种类型的探针在研究物种变异和亲缘关系时是十分有用的^[15]。因此我们分别以 pRRD9R 和 pRRD9L 作为探针, 对 11 个野生稻、两个籼稻和两个粳稻(表 1) 总 DNA 进行了 Southern 杂交分析(图 4)。结果表明, pRRD9R 在野生稻和亚洲栽培稻中均以单拷贝或低拷贝存在, 并表现有限度的变异。其中 pRRD9R 在 BBCC 基因组型的小粒野生稻存在明显的变异, pRRD9R 在 BBCC 基因组型野生稻产生的杂交带显示其是 BBCC 基因组型的特征带。pRRD9L 在不同野生稻之间存在巨大差异, 例如在 DNA 浓度相同以及本文采用的杂交条件下, 有的野生稻 DNA 甚至无法检测到明显的杂交带谱, 而有的野生稻的阶梯状带谱酷似栽培稻。再者, 观察到籼稻品种之间或粳稻品种之间的阶梯状带谱基本相同, 而籼粳之间只是存在不显著的差别, 似无法以此来区分品种间差异。然而

表 1 野生稻和栽培稻的基因组型
 Table 1 Genome types of wild and cultivated rices

稻名 Rice	基因组型 Genome type	稻名 Rice	基因组型 Genome type	稻名 Rice	基因组型 Genome type
小粒野生稻 <i>Oryza minuta</i>	BBCC	长药野生稻 <i>O. longistaminata</i>	A ¹ A ¹	短药野生稻 <i>O. brachyantha</i>	FF
斑点野生稻 <i>O. punctata</i>	BB/BBCC	非洲野生稻 <i>O. barthii</i>	A ⁸ A ⁸	日本晴(粳) Ribenqing (<i>Japonica</i>)	AA
药用野生稻 <i>O. officinalis</i>	CC	疣粒野生稻 <i>O. meyeriana</i>	?	马尾齐(籼) Maweiqi (<i>Indica</i>)	AA
普通野生稻 <i>O. rufipogon</i>	AA	澳洲野生稻 <i>O. australiansis</i>	EE	巴利拉(粳) Balila (<i>Japonica</i>)	AA
多年生野生稻 <i>O. glumaepatula</i>	A ^{CU} A ^{CU}	高秆野生稻 <i>O. alta</i>	CCDD	IR30(籼) IR30 (<i>Indica</i>)	AA

此结果也说明在进化过程中 pRRD9L 的确发生了比 pRRD9R 更迅速的变异, 使其在野生稻间的拷贝数差别十分大, 一旦进化到栽培稻之后, 变异程度相对较小。此外, pRRD9L 在具有 AA 组型的野生稻(非洲野生稻例外)产生的杂交带谱与 AA 组型的亚洲栽培稻的带谱类似, 意味它们之间的亲缘关系比较近。同时也说明 AA 基因组型的非洲野生稻比其它 AA 基因组型的野生稻在进化过程中分化更早。

有关 pRRD9 的起源和功能意义仍然存在一些问题。既然 pRRD9 在核基因组内存在, 那么这种与 QB 蛋白相对应的序列是否表达? 它是一个假基因还是一个有活性的基因? 为何同一序列两部分的变异程度差别如此之大? 但无论如何, 根据上述结果, 我们认为 pRRD9R 和 pRRD9L 是研究栽培稻和野生稻进化关系中一种很有用的分子工具。如果能对不同水稻的 pRRD9 同源片段的核苷酸水平进行比较分析, 就有可能对野生稻和栽培稻的进化关系得到更深入的了解。

参考文献

- 1 Timmis J N, Scott N S. Movement of genetic information between the chloroplast and nucleus. In: Hohn B, Dennis E S eds. Genetic Flux in Plants. New York: Springer-Verlag Wien, 1985
- 2 Timmis J N, Scott N S. Sequence homology between spinach nuclear and chloroplast genomes. Nature, 1983, 305:65-67
- 3 Wolfe K H. Evolution of the plastid ribosomal RNA operon in a nongreen parasitic plant. Plant Mol Biol, 1992, 18:1037-1048
- 4 何木兰, 唐东江, 刘良式等. 重复 DNA 顺序的克隆及序列分析. 华南植物学报, 1993, 试刊 II: 62-72
- 5 肖真, 蔡业统, 刘良式. 重复 DNA 顺序 pRRD9 在稻属中的拷贝数测定. 热带亚热带植物学报, 1993, 1(1):90-98
- 6 刘钿连, 王春新, 刘良式等. 一种能表现水稻基因组 DNA 分化特征的重复 DNA 顺序. 植物学报, 1994, 36(6): 452-458
- 7 韩爱东, 林建东, 缪汝槐等. 一些水稻的重复 DNA 顺序在稻属和其它禾本科植物中的多态性. 植物学报, 1997, 39(6):577-581
- 8 Murray M G, Thompson W G. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res, 1980, 8:4321-4325
- 9 王春新, 王金发, 刘文华等. 水稻核基因组 DNA 的 YAC 克隆和鉴定. 生物工程学报, 1996, 12(1):11-16
- 10 龚小松, 阎隆飞. 高等植物叶绿体 DNA 提纯方法的改进. 科学通报, 1991, 36(6):467-469
- 11 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, a Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 12 Wu N Y, Wu R. The chloroplast gene *psbA* coding QB protein in rice. Dev Genet, 1987, 8:339-350
- 13 赵衍, 翁醒华, 邹勤等. 水稻叶绿体基因文库的构建和精细限制图谱的制作. 遗传学报, 1991, 18(2):149-160
- 14 Jelink W R. Repetitive sequence in eukaryotic DNA and their expression. Ann Rev Biochem, 1982, 51:813-844
- 15 Gupta V. Characterization of species-specific repeated DNA sequences from *B. nigra*. Theor Appl Genet, 1992, 84: 397-402