

研究报告

# 蚕豆核酮糖1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶 大亚基基因的分子克隆

孙 崇 荣

(复旦大学生物化学教研组, 上海)

筱崎一雄 杉浦昌弘

(名古屋大学基因研究中心)

核酮糖1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶由大亚基(LS)和小亚基组成。LS由叶绿体DNA编码。蚕豆LS的基因已被克隆到 pBR 322中。应用几种限制性内切酶酶解以及 Southern 印迹法构建了该重组质粒的物理图谱。

**关键词** 重组DNA; 基因克隆; 核酮糖1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶; 蚕豆叶绿体

核酮糖1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶是植物叶蛋白的主要成分,在C<sub>3</sub>植物中其含量占可溶蛋白的50%,是地球上最丰富的蛋白质<sup>[1]</sup>。它是光合作用中十分重要的酶,催化CO<sub>2</sub>和核酮糖1,5二磷酸形成3-磷酸甘油酸,起着固定CO<sub>2</sub>的作用。同时,该酶又催化核酮糖1,5二磷酸的氧合反应,产生一分子3-磷酸甘油酸和一分子磷酸乙醇酸,后者是光呼吸作用的底物。因此,核酮糖1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶既是光合作用,也是光呼吸作用中的一个关键酶<sup>[2]</sup>。植物生物工程学家想构建一种低光呼吸高光效的酶分子,以期能最大限度提高作物对光能的利用。因而近年来对这种酶的生物工程学的基础研究日益引人注目。

在高等植物中,这种酶一般由8个大亚基和8个小亚基组成(L<sub>8</sub>S<sub>8</sub>),分子量各为5.3kd和1.4kd<sup>[3]</sup>。大亚基由叶绿体DNA所编码,并在叶绿体和核糖体上合成<sup>[4]</sup>。小亚基由核DNA所编码,并在细

胞浆中先合成一个20kd的前体,然后再进入叶绿体经加工后和大亚基组装<sup>[5]</sup>。对这种酶的生物工程学研究,涉及不同的方面,包括研究这种双基因组协同表达的机制;研究进化过程中基因结构的变异;研究C<sub>3</sub>和C<sub>4</sub>作物中这种酶的基因结构上的区别,以及研究8个大亚基是否可能由多基因编码等等。而对这些问题的阐明,首先有必要对大小亚基的基因结构有所了解,至今,玉米<sup>[6]</sup>、菠菜<sup>[7]</sup>、烟草<sup>[8]</sup>以及某些藻类<sup>[9]</sup>中这种酶的大亚基基因已分别被克隆,有些已作了序列分析。本文应用蚕豆叶绿体DNA为材料,继r-RNA基因组克隆后<sup>[10]</sup>,对核酮糖1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶大亚基基因进行了克隆,并绘制了重组质粒的物理图谱。

## 材料和方法

### (一) 叶绿体DNA

本文于1985年4月15日收到。

按 Sugiura 方法, 蚕豆 (*Vicia fava* var *sanaki*) 在温室中生长约一个月, 经不连续密度梯度离心分离出叶绿体, 将叶绿体悬浮于含 50mM Tris-HCl (pH8.0) 和 10mM EDTA 的溶液中, 添加 1/5 体积 10% Sarkosyl, 经酚处理两次后, 用乙醇沉淀出 DNA。然后将 DNA 溶于缓冲液 (10 mM Tris-HCl pH7.5, 10mM KCl, 0.2 mM EDTA) 中, 如 CsCl 至吸光度为 1.58, 并添加 200 $\mu$ g/ml 溴乙锭, 经 32000rpm 离心 40h (15 $^{\circ}$ C), DNA 带用叔丁醇抽提去除溴化锭, 再对上述缓冲液彻底透析后备用。

### (二) 限制性内切酶水解和凝胶电泳

限制性内切酶均购自 Takara Shuzo 公司, 按常规方法每微克 DNA 用 1 单位酶作用 1h, 使其彻底水解。用 BamHI 作部分水解时, 每微克 DNA 加 0.5 单位酶在 30 $^{\circ}$ C 水解 25—45min, DNA 酶解片段用 0.6% 琼脂糖平板胶或管状胶电泳进行分离, 用 pH7.8TA 缓冲液 (含 0.5 $\mu$ g 溴乙锭/ml) 作介质, 以  $\phi$ x174-Hae III 和  $\lambda$ -Hind III 混合物作分子量标准, 溴酚蓝作前沿指示, 4V/cm 电流 5—6 h。

### (三) 缺刻标记和 Southern 印迹法

用含有大亚基基因, 分子大小为 1.2 kbp 的烟草叶绿体 DNA BamHI 酶解片段作探针<sup>[8]</sup>, 该片段在下列反应混合液中进行缺刻复制: 50 $\mu$ l 中含有 50mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM  $\beta$ -巯基乙醇, dTTP, dGTP 和 dATP 各 8 $\mu$ M, 10 $\mu$ Ci ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)dCTP, 0.5 $\mu$ g DNA 片段, 5ng 活化的 DNA 酶 I 以及 10 个单位的 *E. coli* DNA 聚合酶 (Boehringer 5u/ $\mu$ l) 保温 2min 后, 再 14 $^{\circ}$ C 保温 2h, 然后通过 Sephadex G50 柱层析, 取高比活部分应用。

经琼脂糖凝胶电泳后的蚕豆叶绿体

DNA 片段的条带, 用 Southern 的方法检测大亚基基因所在的位置。凝胶先经过碱变性 20min, 中和后转移到硝酸纤维素滤纸上 (Schleicher and Schull, BA85), 80 $^{\circ}$ C 真空干燥 2h, DNA-DNA 杂交先在 1 $\times$ Denhart 溶液中 (0.02% 聚蔗糖, 0.02% 聚乙烯吡咯烷酮和 0.02% 牛血清白蛋白, 6 $\times$ SSC) 60 $^{\circ}$ C 预保温 4h, 吸去多余水分后, 在含有 10 $\mu$ g/ $\mu$ l 变性牛胸腺 DNA 和变性 <sup>32</sup>P 标记的 DNA 探针的 1 $\times$ Denhart 中于 60 $^{\circ}$ C 杂交 16h, 用 2 $\times$ SSC 溶液洗几次去背景后, 进行同位素自显影。

### (四) 分子克隆

pBR 322 经 BamHI 消化后, 取 10 $\mu$ g 放在 200 $\mu$ l 50mM Tris-HCl (pH8.4) 中, 经 1 个单位细菌碱性磷酸酶 (Worthington, BAPF) 60 $^{\circ}$ C 作用 30min 后, 追加 1 单位酶作用 30min, 该去磷酸化的 DNA 经酚处理二次, 用乙醇沉淀, 并溶解于 DNA 缓冲液中用作载体。

蚕豆叶绿体 DNA 经 BamHI 部分水解后的碎片与处理后的 pBR322 在 20 $\mu$ l 的反应液中进行连接反应。该液中包含 20mM Tris-HCl (pH 7.5), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM 二巯基苏糖醇, 0.1mM ATP, 0.2 $\mu$ g 上述 BamHI 部分水解的叶绿体 DNA 片段, 以及 2 $\mu$ l T<sub>4</sub> DNA 连接酶 (10  $\mu$ g/ml) 连接反应在 15 $^{\circ}$ C 进行 3h, 然后用 50mM CaCl<sub>2</sub> 稀释到 0.1ml。

转化反应的受体菌为 *E. coli* HB101 (hsdR, hsd M, recA)。在 40ml L-培养液中使其生长达到  $2.5 \times 10^8$  细胞/ml, 离心后用 10mM MgCl<sub>2</sub> 20ml 洗涤菌体后, 再悬于冰冷的 20ml 50mM CaCl<sub>2</sub> 中 20min, 再离心并悬于 1ml 50mM CaCl<sub>2</sub> 中, 将以上所得到的连接反应物稀释液加入 0.2ml 经 CaCl<sub>2</sub> 处理的菌体细胞中, 在 0 $^{\circ}$ C 保持 20min, 42 $^{\circ}$ C 热刺激 2min, 加

3ml L-培养液稀释, 在37℃保温 1h。再将0.8ml这种“DNA-细胞”混悬液添加到2.5ml含有25μg/ml氨基青霉素(AP)的低熔点L-培养基洋菜中, 并铺在含有25μg/ml AP的L-洋菜板上, 在37℃培养使其长出菌落。最后应用AP板和添加四环素的AP板, 筛选出重组子。

### (五) 菌落杂交

含有重组质粒的菌落, 同时对AP和四环素发生敏感, 从这些敏感的菌落中再用菌落杂交法挑选出重组有大亚基基因片段的菌落。将各转化体移植到47mm直径的Millipore纸上(HAWG 047 SO), 叠放在含有AP的L-洋菜板上, 37℃培养出菌落后, 微孔纸用0.5N NaOH碱变性10 min 1M Tris-HCl (pH 7) 中和2min, 再用0.5M Tris-HCl (pH7) -1.5M NaCl处理5min后, 真空吸干, 经氯仿处理, 0.3M NaCl洗涤后于80℃真空干燥2h。然后用前述方法和大亚基探针杂交鉴别。

### (六) 大量质粒DNA的制备

重组菌先在含有AP (25μg/ml) 的L-培养液中预培养过夜后, 加入Takana-mi 培养液中旋转摇瓶培养至菌浓度达到100klett, 加氯霉素到200μg/ml, 继续在37℃培养17h, 培养液放入冰水中冷却并于7000rpm离心10min, 所得菌体在含25%蔗糖的TE缓冲液中用溶菌酶和SDS处理, 再用酚抽提, 最后用酒精沉出DNA。

## 结果和讨论

蚕豆叶绿体DNA经几种限制性内切酶完全水解后, 可分辨出7—30条电泳带。Sal I、Xho I、Sma I以及Pst I所切的片段较大, 而EcoR I、Hind III以及BamH I所切片段较小, 分子量较多地集中在 $0.8-4 \times 10^6$  dal 范围内, 反映它们

的切点较多(图版I-1)。经各种限制性内切酶酶切后, 为了寻找包含有大亚基基因的片段, 应用已标记的大亚基探针杂交检测。其中, Pst I酶解的片段中, 大亚基基因分布在分离的两个片段上, 而Sma I、Xho I以及Sal I酶切时, 包含大亚基基因的片段过大, 主要在 $(12-17) \times 10^6$  dal 范围, 不宜也不必要用于克隆, EcoR I、Hind III以及BamH I酶解时, 包含大亚基基因的片段都比较小, 特别是BamH I酶解的 $2.6 \times 10^6$  dal 片段, 相当小而又能专一地与大亚基探针杂交(图版I-2), 因此选取BamH I对蚕豆叶绿体DNA部分酶解的产物用以分子克隆。

以pBR 322 DNA(经BamH I及碱性磷酸酶处理)为载体, 以HB101为受体菌, 经克隆后, 每微克叶绿体DNA断片可转化得到一千个左右的转化体, 其中可与探针杂交的菌落约占5%, 说明分子量范围比较相近的片段(近二十种)克隆机率都相当。选取若干含大亚基基因的转化体, 用简易方法提取出质粒后, 应用BamH I酶解后电泳, 发现插入的片段有四种类型, 其片段大小分别为 $2.55 \times 10^6$  dal,  $(2.55+2.0) \times 10^6$  dal,  $(2.55+2.0+1.0) \times 10^6$  dal 以及 $(2.55+2.0+1.0+0.7) \times 10^6$  dal。第一种类型最多, 约占1/3。插入片段长短的不同说明叶绿体DNA部分水解后, 可以得到包含有大亚基基因的不同长度的断片。我们将仅含有 $2.55 \times 10^6$  dal 片段的重组质粒定名为pBCB2, 重组质粒的大小为 $5.4 \times 10^6$  dal。

为了构建pBCB2的物理图谱, 应用单酶水解或双酶复合水解后琼脂糖凝胶电泳, 并转移到硝基纤维纸上与探针杂交, 典型的结果列于表1并示于图版I-3。

参照pBR322 DNA已知切点, 从上述结果可推出pBCB2的物理图谱(图1)。

在插入的含大亚基基因片段中, Sal I 和 Ava I 无切点, Hind III, Pst I, Pvu II, Kpn I 有一个切点, 而 EcoR I, Xba I, Bgl II, Cla I 则皆有两个切点。根据杂交结果以及探针的极性, 插入的  $2.55 \times 10^6$  dal 片段中, 大亚基基因的 5' 端起始于 Pvu II 处。高等植物如烟草大亚基肽链由 477 个氨基酸残基组成, 相应的结构基因大小约为  $1 \times 10^6$  dal, 考虑到启动和结尾部分, 大亚基基因组的全部大小不会大于  $2 \times 10^6$  dal, 现在重组质粒 pBCB2 中所插入的叶绿体 DNA 片段大小为  $2.55 \times 10^6$  dal, 因此足以包含大亚基基因组的全部内容。

表 1 重组质粒 pBCB 2 的限制性酶切片段 ( $\times 10^6$  dal)

Table 1 Restriction fragments of the recombinated plasmid pBCB.2 ( $\times 10^6$  dal)

					$\Sigma$
BamHI	2.85	2.55*			5.4
EcoRI	4.4*	0.6	0.4		5.4
ClaI	3.1	1.3*	1.0*		5.4
Kpn I	5.4*				5.4
Xba I	4.1	1.3*			5.4
Pst I	3.1*	2.3*			5.4
Hind III	4.4*	1.0*			5.4
Hind III $\times$ BamHI	2.6	1.8*	0.75*	0.25	5.4
Hind III $\times$ KpnI	3.2	1.2*	1.0*		5.4
BamHI $\times$ Xba I	2.85	1.25*	0.7	0.6	5.4
Xba I $\times$ Pst I	2.7	1.4	0.9*	0.4*	5.4

\* 为可与探针杂交的片段。

已有报道表明<sup>[8]</sup>, 高等植物如烟草、菠菜和玉米大亚基肽链相当保守, 同源性在 90% 左右, 它们分属  $C_3$  和  $C_4$  植物, 从生理上说,  $C_4$  植物固定  $CO_2$  的能力较强,

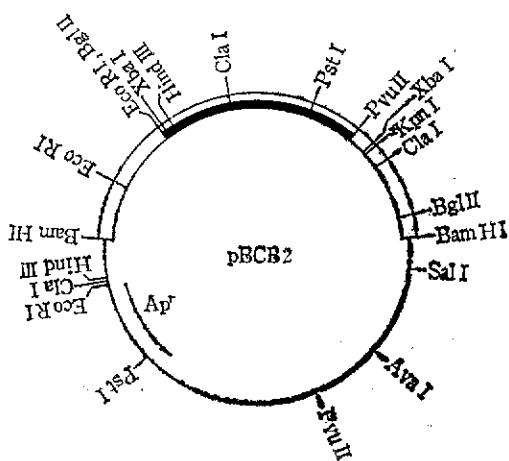


图 1 pBCB2 DNA 的物理图谱

Fig. 1 Physical map of pBCB2 DNA

双线为叶绿体 DNA 部分; 实体部分编码区的大致范围, 单线为 pBR322

Double lines, chloroplast DNA sequence; solid area, approximate coding region; single line, pBR322 sequence

为高产型植物。从基因结构上来比较, 它们的启动部分似乎存在着差异, 作为  $C_3$  植物的烟草, 其大亚基基因启动子部分的构造, 包括 Pribnow box 及 -35 区与原核细胞中的很相似, 而作为  $C_4$  植物的玉米其大亚基基因启动部分的构造则与原核的相距甚远。另外, 烟草中启动子构造中缺乏回文结构, 而玉米则有明显的回文结构。要探明  $C_3$  及  $C_4$  植物中大亚基基因本质上的差异, 还必须累积数据。蚕豆为  $C_3$  型植物, 本文应用烟草叶绿体中的大亚基基因片段作为探针, 可直接用于研究蚕豆叶绿体中的大亚基基因, 说明它们在结构上十分相似。进一步对蚕豆叶绿体中大亚基基因组的结构进行分析, 对阐明  $C_3$  和  $C_4$  植物的差异, 研究植物光合类型进化都将会有一定的意义。

## 参 考 文 献

- { 1 } Kawashima, N. and Wildman, S.G.: *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 21:325—358, 1971.
- { 2 } Lorimer, G.H.: *Ibid.*, 32:349—383, 1981.
- { 3 } Kung, S.D.: *Science*, 191:429—434, 1976.
- { 4 } Blair, G.E. and Ellis, R.J.: *Biochim. Biophys. Acta*, 319:223—234, 1973.
- { 5 } Highfield, P.E. and Ellis, R.J.: *Nature*, 271:420—424, 1978.
- { 6 } McIntosh, L. et al.: *Nature*, 288:556—560, 1980.
- { 7 } Zurawski, G. et al.: *Nucl. Acids Res.*, 9:3251—3270, 1981.
- { 8 } Shinozaki, K. and Sugiura, M.: *Gene*, 20:91—102, 1982.
- { 9 } Shinozaki, K. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:4050—4054, 1983.
- { 10 } Sun, C.R. et al.: *Jpn. J. Genet.*, 57:397—402, 1982.
- { 11 } Sugiura, M.: *Current Genetics*, 2:95—96, 1980.
- { 12 } Southern, E.M.: *J. Mol. Biol.*, 98:503—517, 1975.

## MOLECULAR CLONING OF THE GENES FOR THE LARGE SUBUNIT OF RIBULOSE-1,5-DIPHOSPHATE CARBO- XYLASE/OXYGENASE FROM BROAD BEAN CHLOROPLAST DNA

Sun Chongrong Shinozaki Kazuo Sugiura Masahiro  
(*Biochemistry Division, Fudan University, Shanghai, Center for Gene  
Research, Nagoya University*)

Ribulose-1,5-disphosphate carboxylase/oxygenase (RUBPase/oase) consists of large subunits (LS) and small subunits. LS is encoded in chloroplast DNA. The gene for the large subunit (LS) from broad bean has been cloned in pBR322. A physical map of the recombinant plasmid was constructed by cleavage with several restriction endonucleases and Southern hybridization with  $^{32}\text{P}$ -labeled probe.

### Key words

Recombinant DNA, ribulose-1,5-disphosphate carboxylase/oxygenase, broad bean chloroplast DNA

## 图 版 说 明

1. 蚕豆叶绿体DNA限制性酶切片段的琼脂糖凝胶电泳图
  2. 含有大亚基基因的蚕豆DNA片段的定位。蚕豆叶绿体DNA用BamH I消化, DNA片段用大亚基探针杂交
  3. pBCB2 DNA 限制性片段的琼脂糖电泳 (A) 以及大亚基探针对这些片段进行的 Southern 印迹法杂交图 (B)
1. Agarose gel electrophoresis of restriction fragments of chloroplast DNA from broad bean
  2. Location of the DNA fragments containing LS genes. Broad bean chloroplast DNA was digested with BamH I, the DNA fragments were hybridized with the LS probe
  3. Agarose gel electrophoresis of the restriction fragments of pBCB2 DNA (A) and Southern blot hybridization of LS probe to the fragments (B)

JOURNALS.IM.AC.CN

孙崇荣等：蚕豆核酮糖1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶大亚基基因分子克隆  
SunChongrong et al.:Molecular cloning of the genes for the large subunit of ribulose-1,5-disphosphate carboxylase/oxygenase from broad bean chloroplast DNA

图版 I  
Plate I

