

# 蚕豆核酮糖1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶 大亚基基因5'区域核苷酸顺序的分析

孙 崇 荣

(复旦大学生物化学教研组, 上海)

篠崎一雄 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/加氧酶大亚基基因存在于叶绿体DNA中, 它的转录作用能受光诱导。我们从蚕豆重组DNA中制备得到该基因片段后, 应用Maxam和Gilbert的化学法分析了该基因5'端区的核苷酸顺序。结果表明叶绿体中光诱导基因的启动区具有一些共同特征。同时该大亚基肽链N端在进化过程中具有相当的守恒性。

**关键词** 重组 DNA; 核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶大亚基; 启动子结构; 多肽N端顺序

叶绿体是植物进行光合作用的重要细胞器, 在光照下, 各种植物叶绿体在离体状态时所合成的蛋白质主要是可溶性的核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶大亚基 (LS) 和不溶性的 P 32 蛋白两种<sup>[1]</sup>, 同时叶绿体中以这两种成分的 mRNA 含量最多。这表明光线对这两种多肽的基因有专一的活化作用, 在转录过程中, 这些受光诱导而活化的基因很可能有着特别的强启动部分。Sugita 和 Sugiura<sup>[2]</sup> 比较烟草和菠菜中这些基因结构的分析结果后, 观察到其启动子区域具有共同的特征, 并认为这和转录的高活性有关。烟草和菠菜叶绿体 DNA 的环状分子中, 都具有两组逆向排列的 rRNA 基因组, 其 LS 基因以及 P 32 基因在 DNA 中的相对位置在两种植物中都相同。蚕豆叶绿体 DNA 属于另一种类型, 它只具有一组 rRNA 基因组, LS 基因的位置和 P 32 基因靠得很近, 定位和烟草及菠菜完全不同<sup>[3]</sup>。蚕豆 LS 这种光诱导基因是否也存在有类似的强启动区, 值

得研究。本文应用蚕豆叶绿体 DNA 为材料, 继对 LS 基因进行克隆后<sup>[4]</sup>, 制备出该基因片段, 并应用 Maxam 和 Gilbert 的化学法分析了该基因 5' 区域核苷酸顺序。经过与烟草等其它高等植物中这些基因的相应部分进行比较后, 证实蚕豆叶绿体 DNA 这种类型的基因组中, 与光诱导相关的 LS 基因其转录调控区也存在特有结构。同时该基因的转录和翻译机制仍属原核类型, 其编码 LS 多肽的 N 端氨基酸顺序十分保守。

## 材料与方 法

(一) 蚕豆叶绿体 LS 基因的分子克隆  
应用孙崇荣等<sup>[4]</sup> 分子克隆得到的重组质粒 pBCB 2 作研究材料。其物理图谱经校定后, 如图 1 所示。

### (二) 重组质粒的制备

pBCB2 质粒菌在 Takanami 培养基中

本文于1986年7月24日收到。

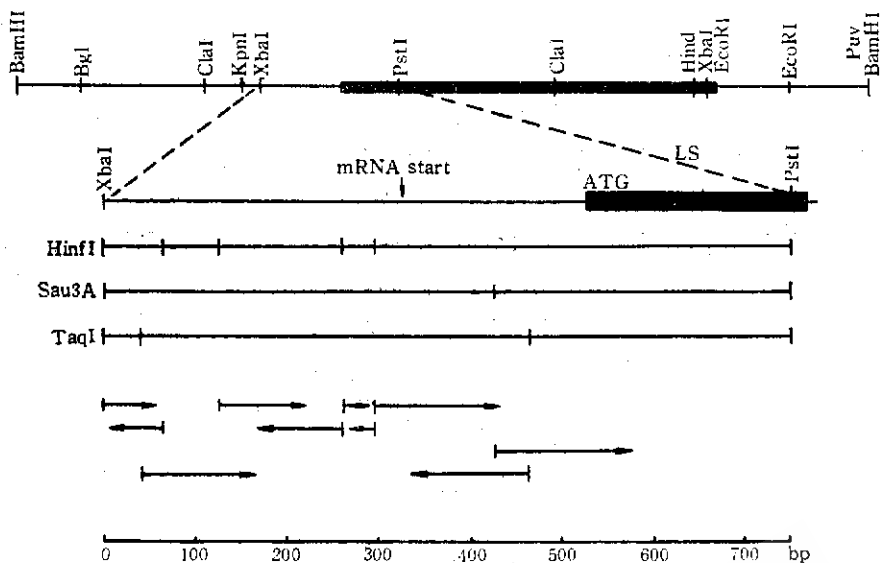


图1 蚕豆叶绿体LS基因5'端区的物理图谱及顺序分析战略  
 Fig.1 Physical map and strategy of sequencing for the flanking region of LS gene from broad bean

粗线表示LS基因的编码区，水平箭头表示顺序分析的方向和范围  
 Thickened lines represent the region coding for the LS gene, horizontal arrows indicate the direction and extent of DNA regions sequenced

用旋转摇瓶 (500ml) 培养至菌浓度为100 Klett 后，加入氯霉素至 200 $\mu$ g/ml，继续在37 $^{\circ}$ C培养 17h，放入冰水中冷却后，于7000rpm离心 10min，收集菌体。将菌体悬于100ml TE缓冲液，再次于7000rpm离心。洗净后的菌体悬于含有 25% 蔗糖的 0.05M Tris和1mM EDTA 溶液中，加入溶菌酶溶液 (总量15mg)，于0 $^{\circ}$ C共作用 15min，再加入20% SDS 1.2ml，于0 $^{\circ}$ C过夜。菌体脱壁按常规方法用酚处理两次，水层在 NaAc 存在下用二倍体积乙醇使核酸沉淀。然后将沉淀溶于TES缓冲液中，应用 CsCl/EtBr 密度梯度离心法 (3700rpm, 36h)，收集质粒 DNA 区带。经异丙醇抽尽溴乙锭后，对 DNA 缓冲液彻底透析，最后加入 1/10体积NaAc 及 2 体积乙醇使重组质粒DNA沉淀。

**(三) DNA片段制备**

由于不同植物叶绿体中 LS 基因同源性强，应用烟草中该基因5'端编码区的

小片段 ( $^{32}$ P标记) 作探针，与 pBCB2质粒DNA的PstI-XbaI 复合水解物的电泳区带接Southern印迹法进行杂交，探明 pBCB2中LS基因的 5' 端位于 PstI 切点的前方。

为分析 LS 基因启动子区域的结构，因此制备XbaI到PstI位点片段 (0.4Md) 用作顺序分析。pBCB2经 PstI-XbaI 复合水解后，应用 5 %聚丙烯酰胺平板凝胶电泳 (12 $\times$ 15 $\times$ 0.5cm)进行制备性分离(TA 缓冲液, 70V, 4-6h)，4 条区带中移动最快的为XbaI到PstI位点片段，切下该区带，用电渗析方法回收该片段 (TA 缓冲液, 100V 5h)，再通过 DEAE-Sephacel 柱净化并浓缩后，用 NaAc 及乙醇沉淀出XbaI到PstI位点片段。

**(四) 顺序分析战略**

XbaI 到 PstI 位点片段进一步应用 Hinf I, Sau3A及Taq I酶水解、构建该片段的物理图谱，并按图1所示战略路线进行

结构分析。

### (五) 5'端标记

Xba I到 Pst I 位点片段用细菌碱性磷酸酶除去末端磷酸,经酚处理后,在NaAc存在下用乙醇沉淀出去末端磷酸的片段。然后在多聚核苷酸激酶作用下,应用 [ $^{32}\text{P}$ ]ATP使5'端标记(PNK缓冲液,37°C作用2h)。反应物通过Sephadex 50柱(床体积6—7ml,用含pH8的10mM Tris-HCl, 0.3M NaAc, 1mM EDTA, 1mM KCl的溶液平衡),收集标记物,乙醇沉淀备用。

### (六) 链分离

标记物溶于含有30% DMSO及1mM EDTA的溶液中,于90°C加热3min,迅速用冰水冷却,立即进行5%聚丙烯酰胺凝胶电泳(28×52×0.05cm)分离。胶板对X射线感光片曝光15min,切割下胶板上相应位置的单链区带,用DNA缓冲液浸泡出单链DNA,在助沉淀载体tRNA存在下,加入NaAc及乙醇于-80°C使单链DNA沉淀。

### (七) DNA顺序分析

按Maxam和Gilbert方法<sup>[5]</sup>,应用硫酸二甲酯,强碱和胍等在不同条件下对碱基进行专一性分解(G,A>C,T+C,C),部分分解物应用8%及12%聚丙烯酰胺凝胶(52×28×0.05cm,含7M尿素变性胶,2×TBE缓冲液,以BPB及XC作指示位置)进行电泳分析,以X射线感光片于-80°C增感曝光后,阅读核苷酸排列顺序。

## 结果和讨论

从阅读结果, Xba I到 Pst I 位点中约700个分析得到的核苷酸顺序列于图2。

将该顺序有关部分与C<sub>3</sub>植物的烟草<sup>[6]</sup>、菠菜<sup>[7]</sup>以及C<sub>4</sub>植物的玉米<sup>[8]</sup>LS

基因启动子部分的顺序比较,可以推断蚕豆叶绿体LS基因在翻译起始点-202 bp处有类似大肠杆菌基因结构中的“Pribnow box”(TAtAaT)的TAGAAT区域,在-175bp处有类似于大肠杆菌基因结构中-35区(TTGaca)的TTGCGC区域(见图3)。虽然几种植物中这些区域的定位点并不相同,但结构特征都相似。因此可以说,蚕豆叶绿体LS基因的转录特征和其他植物一样,属于原核类型。

另外,在翻译起始点上游10—6碱基处,蚕豆叶绿体LS基因有GGGGG顺序,烟草、菠菜和玉米相应顺序为GGAGG,与大肠杆菌中Shine-Dalgarno顺序、即与16S rRNA相结合的顺序相近或相同。所以从翻译机制来看,推测蚕豆叶绿体LS基因也和其他植物一样,属于原核类型。

很有意思的是,将叶绿体LS基因以及P32基因和其他叶绿体基因进行比较时,可以发现,前两者在转录的启动子部分,除“Pribnow box”和“-35区”外,在“-35区”前的确都存在有TTGG的特有共同结构;而在转录起始点前有共同的ATT特有结构;特别是在-25区有着P,AP,ATA的特有结构。这些特征在其他叶绿体基因组中皆未发现。由于叶绿体LS基因和P32基因都是光诱导光活的基因,而且基因转录活性强,所以可以推测这些特有的顺序有可能是构成强力启动子的重要成分。这对阐明叶绿体基因的表达有一定意义。

另外,以烟草、菠菜以及玉米LS多肽氨基酸排列顺序知道,其一级结构相当恒定,特别是N端附近高度保守。根据图1推断,蚕豆叶绿体LS多肽N端附近顺序也符合这一情况(图4)。这反映了叶绿体基因组在进化过程中具有相当的守恒性。

TCTAGATTATAGACAA TACTATCTATATTA TCTATGTAAT TCGAACCTGA  
 XbaI TaqI  
 ACTTTGTTTGTTTATG ATTCCGTTTTTCTATCTCATTGGTCCTTCTTTTT  
 HinfI  
 TCTTTCCTCAGCATAGGATTTATACTATG CAGATTCTTTTACCAATTTT  
 HinfI  
 TCTTTTTATTGGGCAAATTCTGCCGATTTTGACATCTAGGATTTACATAT  
 ACAACATATATCACTGTCAAGGTCAAGAGTATATTTTTATTATTTAGATT  
 AGAAAA TGAGATTCACCCCAAAATTC AAAAAAAAAAAAAATAAGAGACTCA  
 HinfI HinfI  
 AAAAAAAAA CGGTTGGGTTGCGCCATA CATATGAAACAGTAT TAGAATAATG  
 -35 PB  
 ATGTATTTGCCAAATCAAAATCATCGTAAAATTGAA CAATGACCCATTC  
 ↳  
 GGATTAATTGATAAATATTAGTTGATGATCATTTGTAAAAAGGTTTTCTTA  
 Sau3A  
 ACTCCTAAGTTATG TCGATAGACCTTGTCTTG CATAACTTAATCATGCG  
 TaqI  
 TGTGTTAGGGGGGGGATTTATGTCACCA CAAACAGAAACTAAACCAAAGG  
 S.D. ↳  
 TTGGGTTCCAAGCTGGTGTTAAAGATTATAAAATTGACTTATTATACTCCT  
 GAATATCAAACCAAATGATACTGATACTTTGGCAGCATTCGGAGTCCGAG  
 TAACTCCTAAACAGAGTTCCGCGAAG

图 2 蚕豆叶绿体LS基因5'端区的核苷酸顺序  
 Fig.2 Nucleotide sequence of the 5' flanking region of the LS gene from broad bean chloroplast  
 类似于大肠杆菌“Pribnow box”和“-35区”的部分以及Shine-Dalgarno顺序下方划有直线  
 Sequences which resemble *E. coli* “pribnow box” and “-35 region”  
 and the Shine-Dalgarno sequence are underlined

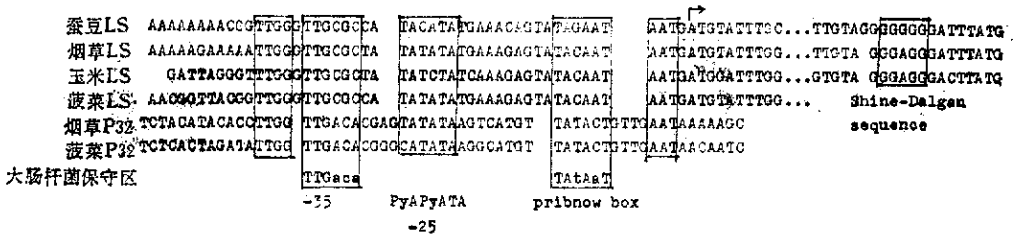


图 3 某些高等植物LS基因和P32基因启动子顺序和编码起始区顺序的比较  
 Fig.3 Comparison of the promoter sequences and start sequences of coding regions of LS gene and P32 gene from some high plants

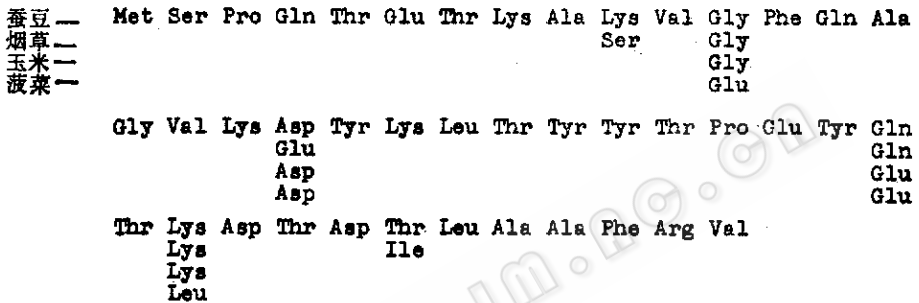


图 4 蚕豆、烟草、玉米和菠菜叶绿体LS多肽N端氨基酸顺序的比较  
 Fig.4 Comparison of the N-terminal amino acid sequences of the LS proteins of broad bean, tobacco, maize and spinach

参 考 文 献

[ 1 ] Ellis, R.J., *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 32:111—137, 1981.  
 [ 2 ] Sugita, M. and Sugiura, M., *Mol. Gen. Genet.*, 195:308—313, 1984.  
 [ 3 ] Shinozaki, K. et al., *Mol. Gen. Genet.*, 197:363—367, 1984.  
 [ 4 ] 孙崇荣等, *生物工程学报*, 2(1):19—24, 1986.  
 [ 5 ] Maxam, A.M. and Gilbert, W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 74:560—564, 1977.  
 [ 6 ] Shinozaki, K. and Sugiura, M., *Gene*, 20: 91—102, 1982.  
 [ 7 ] Zurawski, G. et al., *Nucl. Acids Res.*, 9:3251—3270, 1981.  
 [ 8 ] Crossland et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81:4060—4064, 1984.

# THE SEQUENCE ANALYSIS OF 5' REGION OF THE GENE FOR THE LARGE SUBUNIT OF RIBULOSE-1,5- BISPHOSPHATE CARBOXYLASE/OXYGENASE FROM BROAD BEAN CHLOROPLAST

Sun Chongrong

*(Biochemistry Division, Fudan University, Shanghai)*

Shinozaki Kazuo Sugiura Masahiro

*(Center for Gene Research, Nagoya University)*

It is well known that the gene for large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase exists in chloroplast DNA and its transcription can be induced by light. After having been prepared the gene fragment from broad bean rDNA, about 700bp sequence flanking its N-end has been analysed with Maxam and Gilbert's Chemical method. The results show that the Rubisco-LS gene promotor of broad bean has some conservative regions, the common feature shared by the light-induced gene in chloroplast if compare it with the equivalent genes of tobacco and spinach.

## Key words

Recombinant DNA; RuBPCase/Oase large subunit; promotor structure; N-terminal sequence