

大豆 rDNA ITS1 片段的分离与 克隆研究简报*

庄炳昌 徐豹

(吉林省农业科学院大豆研究所)

顾京 肖岗 张耕耘 陈受宜

(中国科学院遗传研究所)

高等真核生物的 rRNA 基因(rDNA)具有多次重复,并以串联形式排列的特点,每一个重复区都由一个非转录区和转录区组成。rDNA的转录区首先合成分子量为6.8~8.5Kb的rRNA前体,然后rRNA前体降解为18S、5.8S和28S的rRNA(图1)。与非转录区相比,rDNA的转录区保守性较强,比较稳定,生物间的差异较小。近年来,有关rDNA的研究较多。但是,有关大豆rDNA的研究尚未见报道。研究大豆rDNA的结构及其序列,对于了解大豆的起源、进化及其调节机制具有重要意义。

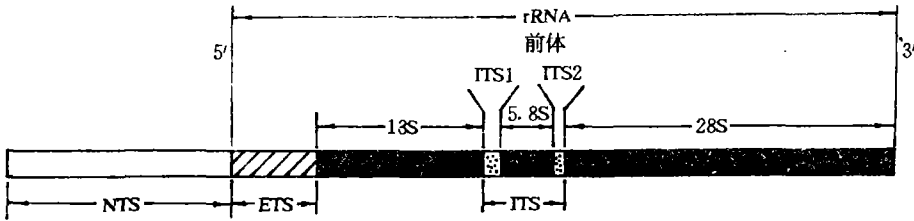


图1 真核生物 rDNA 示意图

NTS:非转录区 ETS:拷贝区的外间区 ITS:拷贝区的内间区

聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction—PCR)是近年才发展起来的一种体外酶促合成特异DNA的一门新兴技术,由高温变性、低温退火和适温延伸三步反应组成一个周期,循环进行,进而使目的基因得以迅速扩增。由于具有能够快速特异地扩增任何所需要的DNA片段或目的基因,使极微量的DNA得以迅速扩增等优点,因而此技术近年来得到了广泛的重视。目前,已被广泛应用于基因的分、基因多态性分析、基因调控、疾病诊断等研究领域。

材料与方 法

总 DNA 的提取:取新鲜叶片,在液 N 中研磨成粉,加入预热至 65℃的 DNA 提取液在 65℃下提取30分钟,然后加入氯仿:异戊醇反复抽提3次,以95%的乙醇沉淀DNA。沉淀的DNA用RNase酶解15分钟,95%乙醇沉淀,70%乙醇清洗,最终溶于TE缓冲液中备用。

ITS1 片段的分离:ITS1 片段的分离是以大豆总 DNA 为模板,采用 PCR 扩增的方法得到的。PCR仪为中科院遗传所生产,DNA扩增系统为华美公司产品。循环参数为:90℃变性反应60秒,50℃退火反应60秒,72℃延伸反应100秒,循环35个周期,反应结束后,用1%琼脂糖

* 本研究得到中国科学院植物生物技术开放实验室、国家自然科学基金的资助。

凝胶电泳检测扩增效果。

ITS1 片段的克隆:在进行连接反应之前,首先用低熔点琼脂糖凝胶电泳回收提纯扩增片段。回收片段用T₄连接酶连接到质粒pUC19中,重组质粒转化到JM83中,并从中筛选单克隆。重组质粒的筛选采用X-gal标记。

试验结果

(一)图2看到,采用本方法提取的总DNA分子量大于20kb,经XbaI酶切,酶切完全。因此可以用于PCR扩增及克隆。

(二)根据水稻rDNA序列,分别在ITS1区域的两端人工合成2个引物,引物1和引物2分别由28和24个核苷酸组成。以总DNA为模板,人工合成的DNA片段为引物,采用PCR的方法分离到ITS1片段。电泳检测结果(图3)表明,扩增到的大豆ITS1片段的长度约300bp。并说明大豆与水稻的rDNA具有一定的同源性。

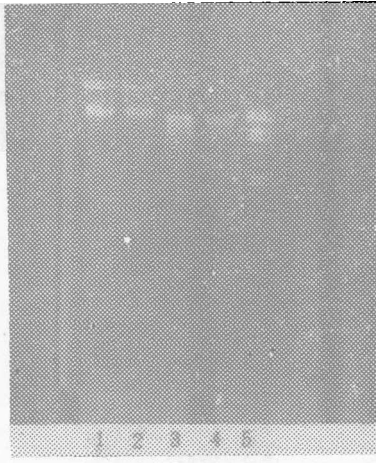


图2 大豆总DNA(1,2),酶切后(3,4)(XbaI)和标样人DNA/Hind III(5)的电泳图谱



图3 从大豆总DNA中扩增到的ITS1片段

(三)将扩增到的大豆ITS1片段用低熔点琼脂糖凝胶电泳回收提纯,然后进行连接反应。采用的受体为pUC19,首先用Hinc II在pUC19的多聚接头处进行酶切,产生平头末端,然后用T₄连接酶连接。

(四)质粒连接后,将其转化到JM83中,转化细菌用含有X-gal、IPTG和Ap的LB培养基37℃培养过夜,从中选择白色阳性克隆(图5)。从筛选出的单克隆中提取质粒DNA,并用内切酶EcoRI和Hind III在多聚接头的两端剪切,并用琼脂糖电泳检测,从中筛选出了部分重组质粒(图6)。

以重组质粒DNA为模板,采用同样的引物,进行PCR扩增,同样扩增到了ITS1片段(图7),进一步证实了

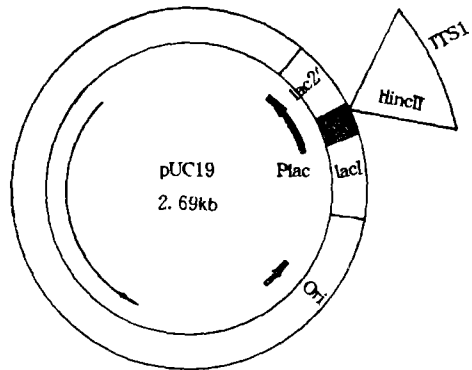


图4 大豆ITS1片段与质粒连接示意图

ITS1片段确实已被克隆。

进一步的工作是拟对 ITS1 片段进行序列与结构分析,可能为大豆的起源、进化等研究提供重要依据。

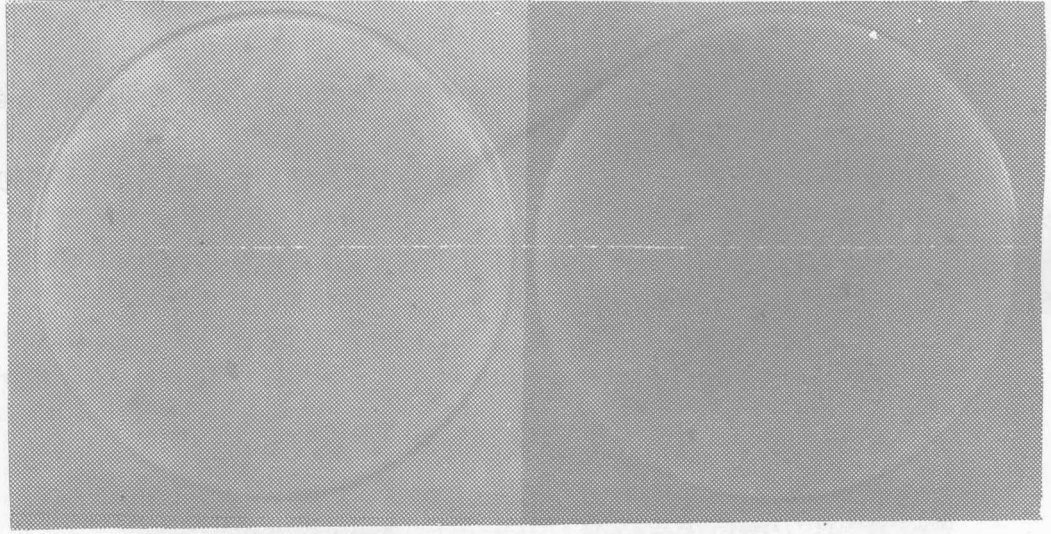


图5 含有重组质粒的转化细菌的筛选(箭头所指阳性白斑)

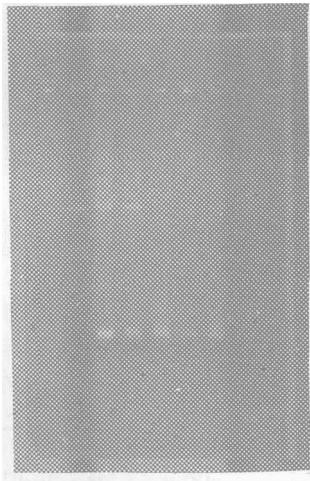


图6 转化细菌的电泳分析

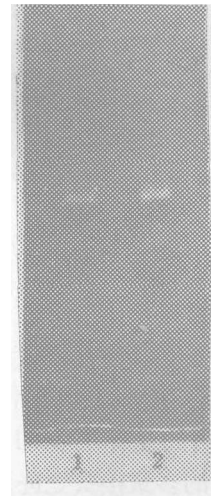


图7 从单克隆重组子(2)和大豆总DNA中(1)扩增的ITS1片段