

RFLP 缩减杂交技术的改良与水稻雄性不育细胞质基因组差异片段的克隆

张群宇, 刘耀光

(华南农业大学 生命科学院, 广东 广州 510642)

摘要:对基因组 RFLP 缩减杂交技术进行了改良,即用连接成大分子的 Driver DNA 与 Tester DNA 杂交,再利用 PCR 纯化试剂盒对大片段 DNA 回收率低的原理去除大部分 Driver DNA 以及与之杂交的非特异性 Tester DNA 片段。经过 PCR 扩增和克隆,获得多态性片段,可快速获得在亲本间有差异的分子标记。用该技术对水稻野败型雄性不育细胞质和正常细胞质 DNA 进行 RFLP 缩减杂交,获得了 2 个在不育系细胞质 DNA 与保持系细胞质 DNA 间的差异片段。

关键词:基因组 RFLP 缩减杂交; 水稻; 细胞质雄性不育

中图分类号:Q781

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2004)01-0066-04

Isolation of polymorphic DNA fragments between normal and cytoplasmic male sterility lines of rice using a modified RFLP subtractive hybridization method

ZHANG Qun-yu, LIU Yao-guang

(College of Life Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract:To obtain polymorphic markers between parents, a modified RFLP-subtractive hybridization method was developed. The method uses restriction fragments of a parent as a driver, which were ligated to form large fragment DNA, for hybridization with tester DNA, and the driver/tester hybrid fragments are removed by using a PCR purification kit. The method was used to isolate polymorphic sequences between Zhenshan97B and a Rf-gene near-isogenic line ZSR11 with normal and CMS-WA cytoplasm, respectively. As a result, two polymorphic sequences, *Bgl* II-1 and *Pst* I-4, were obtained. Southern blot analysis indicated that the polymorphisms were associated with the normal and CMS-WA types of cytoplasm.

Key words:RFLP-subtractive hybridization; rice; cytoplasmic male sterility

缩减杂交是一种利用核酸动力学原理分离目的基因的技术。20 世纪 90 年代以来,缩减杂交技术在基因克隆应用上得到迅速发展^[1,2]。目前缩减杂交技术多数应用于 cDNA 缩减杂交或细菌等基因组复杂度较小的遗传材料。对于高等植物,由于基因组的复杂性以及大量存在的重复序列可能会降低缩减杂交的效率,应用基因组缩减杂交的例子不多。目的基因克隆研究工作中,常规方法是利用已有的分子标

记进行全基因组扫描,直至获得亲本间有遗传差异的分子标记,如 RFLP 分子标记或 SSR 分子标记扫描、RAPD 筛选,但都较费时。为了快速获得在亲本间有差异的分子标记,在现有 RFLP 缩减杂交方法的基础上^[1,2],本研究发展了一种改良的基因组 RFLP 缩减杂交技术,并用该技术对水稻野败型雄性不育细胞质和正常细胞质 DNA 进行 RFLP 缩减杂交,获得了 2 个在不育系细胞质 DNA 与保持系细胞质 DNA

间的差异片段。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试水稻材料 水稻野败型细胞质雄性不育系珍汕 97A、保持系珍汕 97B,以 IR24 为恢复基因供体与野败型细胞质雄性不育系珍汕 97A 回交获得的恢复基因近等基因系 ZSR11^[3],以及另外 2 种水稻野败型细胞质雄性不育系和保持系:优 1A/优 1B、博 A/博 B。

1.1.2 主要试剂 缩减杂交液为 0.02 mol/L Hepes-HCl pH 8.3, 0.5 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA pH 8.0;凝胶回收纯化试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒购自 QIAGEN 公司;T4 DNA 连接酶购自大连宝生公司。引物由上海生工公司合成。

1.1.3 接头和 PCR 引物 根据限制性内切酶 *Pst* I 和 *Bgl* II 的识别位点序列设计了相应的接头和 PCR 引物:

*Pst*I 接头:TAGTGC GGCCGCTAATTGCA

ATCACG CCGGCGATTA,

引物 P:TAGTGC GGCCGCTAATTGCA-3'.

*Bam*HI 接头:TAGTGC GGCCGCT

ATCACG CCGGCGACTAG,

引物 B:TAGTGC GGCCGCTGATC-3'.

1.2 方法

1.2.1 基因组超大分子 DNA 的提取 为避免抽提过程中造成过多的机械断裂,取适量近等基因系 ZSR11 和保持系珍 97B 的种子,避光育成黄化苗。各取 10~15 g 叶片,放入预冷的研钵中,加入液氮迅速研磨成粉末状,按照提取超大分子 DNA 的方法^[4]制备 DNA。其他水稻材料 DNA 的提取用 CTAB 方法提取。

1.2.2 基因组 DNA 的限制性酶切及回收 取 ZSR11 和珍汕 97B 的 DNA 各 200 μ g,用限制性内切酶 *Pst* I 充分酶切。将酶切产物在 0.01 g/mL 琼脂糖凝胶电泳分离,回收 0.5~1.8 kb 的酶切片段,用回收纯化试剂盒纯化,分别获得约 20 μ g DNA 片段。用同样方法也回收了 *Bgl* II 酶切的 DNA。

1.2.3 基因组 RFLP 缩减杂交 本研究对已报道的 RFLP 缩减杂交方法^[1]进行了一些改良(见图 1),将近等基因系 ZSR11 的酶切回收 DNA 片段 1 μ g 与 50 pmol 的接头用 50 U 的 T4 连接酶连接,作为 Tester

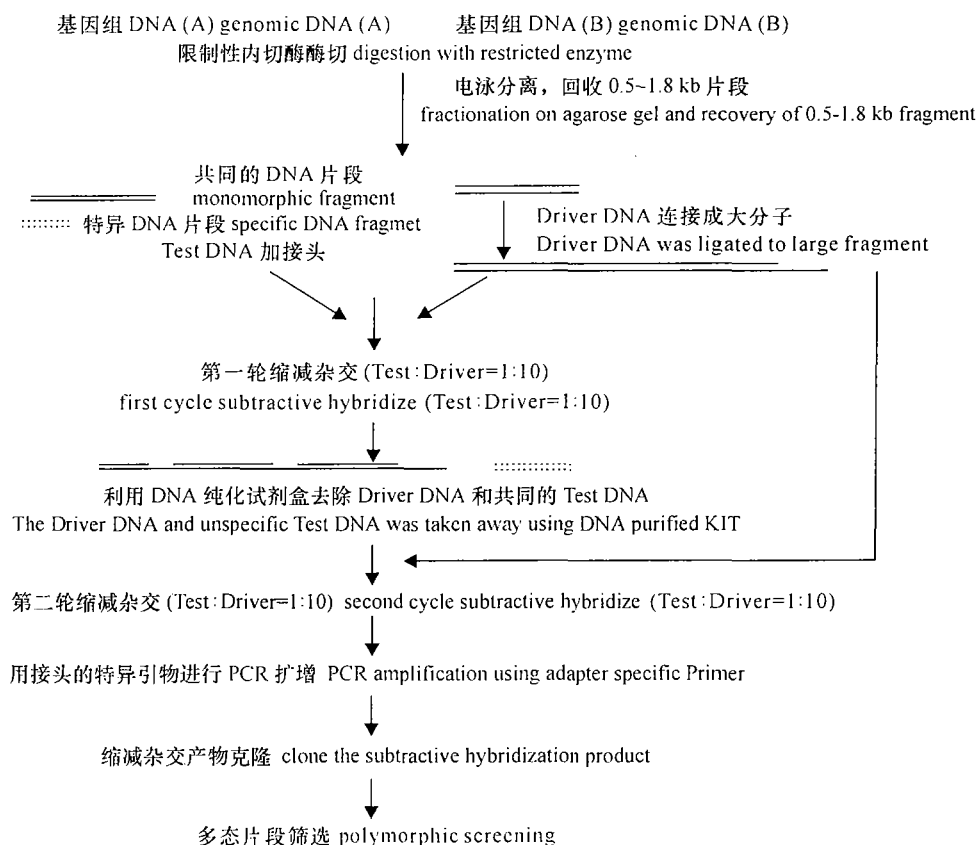


图 1 基因组 RFLP 缩减杂交技术路线示意图

Fig.1 Procedures of the modified genomic RFLP subtractive hybridization

DNA. 将珍汕 97B 的酶切回收 DNA 片段在高质量浓度(0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)条件下用 500 U 的 T4 连接酶连接成超大分子片段,作为 Driver DNA. 将 1 μg Tester 和 15 μg Driver 混合,乙醇沉淀,溶于 5 μL 杂交液,加入 0.5 μL 5 mol/L NaCl,覆盖 2 滴矿物油,离心至管底. 96 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min,迅速转到 68 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中进行第一次缩减杂交. 15~20 h 后,加入 100 μL TE 于缩减杂交样品,70 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30 min. 按 PCR 产物纯化试剂盒操作程序处理杂交样品.

将 5 μg 大分子 Driver DNA 与第一次缩减杂交的回收 DNA 片段混合,乙醇沉淀后溶于 5 μL 杂交液进行第二次缩减杂交,并用 PCR 产物纯化试剂盒回收,试验步骤同上.

1.2.4 PCR 扩增与克隆 以缩减杂交后回收片段为模板,用相应的接头特异引物进行 PCR 扩增,扩增条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 35 次循环. 扩增产物克隆到质粒载体 pGEM-T.

2 结果与分析

2.1 RFLP 缩减杂交方法的改良

本研究对报道的 RFLP 缩减杂交方法^[1]进行了一些改良. 即将 Driver DNA 连接成大片段分子,缩减杂交后用 PCR 纯化试剂盒处理杂交产物. 由于纯化试剂盒对 9 kb 以上的片段回收率很低,处理过程实际上除去大部分大分子 Driver,同时带走与之杂交的同源 Tester 片段,使回收的 DNA 中特异的 Tester 片段获得富集,并可以进行第 2 轮缩减杂交,进一步富集特异的 Tester 片段.

2.2 RFLP 缩减杂交差异片断的筛选

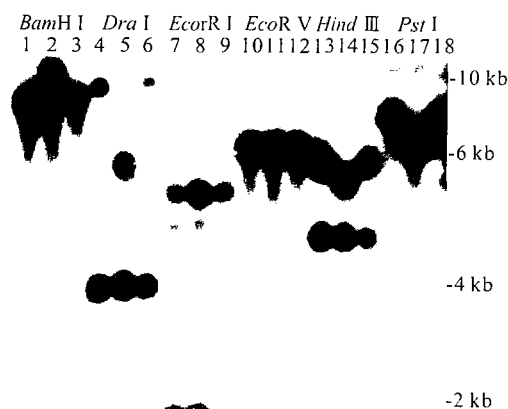
从 *Pst* I 和 *Bgl* II 2 种酶切片段的 RFLP 缩减文库中各随机挑选 100 个克隆进行初步筛选. 利用接头特异引物进行 PCR 扩增插入子,电泳后转移到尼龙膜. 用 Driver DNA 和 Tester DNA 作为探针进行 Southern 杂交,从来源于近等基因系 ZSR11 的 *Pst* I 酶切片段 RFLP 缩减杂交文库和 *Bgl* II 酶切片段缩减杂交文库分别筛选到 8 个和 6 个杂交信号强度有差异的片段.

2.3 RFLP 分析

对 14 个候选差异片段逐一进行了 RFLP 分析,各获得 1 个在亲本珍汕 97B 和 ZSR11 间检出多态的片段,分别命名为 *Bgl* II - 1 和 *Pst* I - 4.

为了确认这 2 个多态片段的来源,利用珍汕

97A、珍汕 97B 和 ZSR11 之间细胞质和细胞核基因组两两相同的特点,把 3 种亲本用 6 种限制性内切酶酶切,用这 2 个多态片段标记作 RFLP 分析. 结果显示该片段在珍汕 97A 和 ZSR11 之间相同、而与珍汕 97B 不同(图 2),说明该片段属于细胞质 DNA 片段. 进一步用 *Pst* I - 4 片段对 3 对水稻野败性不育系/保持系材料即珍汕 97A/珍汕 97B、优 IA/优 IB、博 A/博 B 进行的 RFLP 分析,结果显示在所有材料的 A/B 细胞质之间存在相似的差异(图 3). 对该片段进行测序发现它是一段线粒体序列(结果另文发表).



1,4,7,10,13,16 为珍汕 97A;2,5,8,11,14,17 为珍汕 97B;3,6,9,12,15,18 为 ZSR11.

1,4,7,10,13,16 is Zhenshan97A, 2,5,8,11,14,17 is Zhenshan97B, 3,6,9,12,15,18 is ZSR11

图2 *Bgl* II - 1 片段探针对珍汕 97A、珍汕 97B 和 ZSR11 的 RFLP 分析

Fig. 2 RFLP analysis of Zhenshan97A, Zhenshan97B, and ZSR11 with *Bgl* II - 1 fragment as a probe

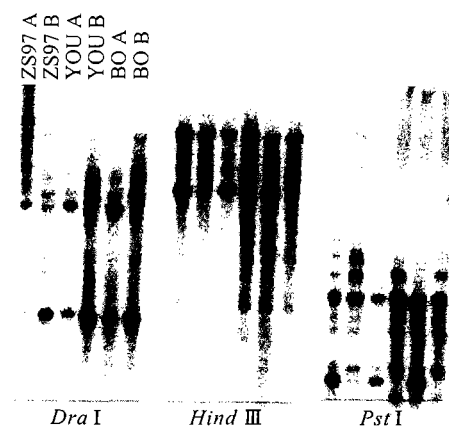


图3 *Pst* I - 4 片段探针对 3 对 A/B 型细胞质的 RFLP 分析

Fig. 3 RFLP analysis of 3 pairs of A/B cytoplasm with *Pst* I - 4 fragment as a probe

3 讨论

笔者对基因组 RFLP 缩减杂交技术进行了改良,并用于水稻野败型雄性不育细胞质差异片段的克隆. RFLP 缩减杂交技术的基本原理是,基因组 DNA 由于缺失、碱基突变等可能导致酶切片段长度多态性. 2 个遗传材料用同一种限制性内切酶酶切时,如果出现限制性酶切片段长度有较大的差异,则该片段在电泳后回收的一定范围长度的 DNA 片段样品中是一方存在而另一方不存在,因此可以通过缩减杂交富集特异片段. 笔者对 RFLP 缩减杂交技术的改良点在于将回收的酶切片段连接为大分子作为 Driver DNA. 它既利于杂合分子的形成,又便于和特异性 Tester DNA 片段的分离,即利用 PCR 纯化试剂盒对 9 kb 以上片段回收率低的特点,除去大分子 Driver DNA 及其与之杂交的同源 Tester 片段. 这种操作简便有效. 本研究获得了 2 个来源于不育细胞质线粒体基因组并与正常细胞质线粒体基因组之间有差异的 DNA 片段,而在亲本间没有 RFLP 差异的其他 DNA 片段都被 Driver DNA 去除,说明在植物基因组中能够应用 RFLP 缩减杂交技术进行有酶切片段长度多态性片段的克隆. 但对于没有酶切片段长度多态性的差异如点突变则需要其他技术方法进行研究.

在玉米、水稻、高粱、油菜等多种作物的杂种优势育种中已经应用了细胞质雄性不育(CMS),人们认为细胞质雄性不育有可能是由线粒体或叶绿体的遗传物质决定的,但 CMS 的表达机制还不完全清楚. 近十多年来,飞速发展的分子生物学和植物细胞质遗传研究提供了许多新方法,研究初步证明控制许多作物 CMS 的基因在线粒体 DNA 上,而来自 CMS 系

线粒体中特异内质粒与核基因组的同源关系以及它们的存在与否同 CMS 表达的关系,更为线粒体可能参与 CMS 的表达提供了有力的证据^[5,6]. 本试验获得的 2 个遗传差异片段在不育系和保持系表现了明显的差异,在不同的不育系和保持系组合间也显示了差异,说明该片段为不育细胞质线粒体基因组与正常细胞质线粒体基因组之间有差异的 DNA 片段.

致谢:华南农业大学农学院张桂权教授提供恢复基因近等基因系 ZSR11 等实验材料,特此致谢!

参考文献:

- [1] ROSENBERG M, PRZYBYLSKA M, STRAUS D. "RFLP subtraction": A method for making libraries of polymorphic markers [J]. Proc Natl Acad Sci, 1994, 91:6 113 - 6 117.
- [2] RTINSLEY C, NASSIF X. Analysis of the genetic difference between *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*: Two closely related bacterial expressing two difference pathogenicities[J]. Proc Natl Acad Sci, 1996, 93:11 109 - 11 114.
- [3] ZHANG G, LU Y, HUANG N. Molecular analysis of introgressed chromosomal segments in a set of near-isogenic lines of rice for fertility-restoring genes[J]. Rice Genet News, 1994, 11:147 - 149.
- [4] LIU Y G, WHITTE R F. Rapid preparation of megabase plant DNA from nuclei in agrose plugs and microbeads[J]. Nucleic Acid Research, 1994.22:2 168 - 2 169.
- [5] 涂 军, 朱英国. 水稻线粒体基因组与细胞质雄性不育研究进展[J]. 遗传, 1997, 19(5): 45 - 48.
- [6] AKAGI H, SAKAMOTO M, SHINJO C, 等. A unique sequence located downstream from the rice mitochondrial atp6 may cause male sterility[J]. Curr Genet, 1994, 25(1):52 - 58.

【责任编辑 柴 焰】