

一种简单高效的克隆水稻端粒相关序列的方法

房迈菀¹ 李美茹² 李洪清^{1,*}

¹华南师范大学生命科学学院, 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广州 510631; ²中国科学院华南植物研究所, 广州 510650

A Simple and Highly Efficient Method for Cloning Telomere Associated Sequences from *Oryza sativa*

FANG Mai-Chun¹, LI Mei-Ru², LI Hong-Qing^{1,*}

¹College of Life Science, South China Normal University, Guangdong Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, Guangzhou 510631; ²South China Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650

摘要 采用盒式PCR扩增水稻端粒相关序列, 将扩增产物与T载体连接, 转化大肠杆菌, 再通过PCR对获得的转化子进行鉴定。应用此方法成功地从水稻中克隆到多个端粒相关序列。

关键词 端粒相关序列; 盒式PCR; 水稻

端粒(telomere)位于真核细胞线性染色体的末端, 典型的端粒是由富含GT的串连重复序列组成, 其保守序列可表示为[(T/A)₁₋₄G₁₋₈]_n。一个基因组内的所有端粒都是由相同的重复序列组成, 但不同物种的端粒重复序列是不同的。与端粒相邻的区域主要由几种不同的重复序列组成, 称之为亚端粒序列(subtelomeric sequence), 也称为端粒的相关序列(telomere associated sequence, TAS)。端粒相关序列的克隆可采用盒式PCR, 以端粒序列和人工接头序列设计引物进行扩增, 但扩增的产物电泳时呈弥散形分布, 难以得到单一的条带。本文通过回收相应区域的片段, 克隆进T载体, 结合PCR鉴定, 从水稻中克隆到多个端粒相关序列。

材料与与方法

1 材料

水稻(*Oryza sativa* ssp. *japonica*)品种“紫稻”由中国科学院华南植物研究所提供。

2 方法

2.1 总DNA的提取 采用CTAB方法。取约300 mg新鲜幼嫩的紫稻叶片, 于液氮中迅速研磨成粉末后, 再迅速转入离心管中, 加入1 mL 1.5×CTAB (1.5% CTAB、75 mmol·L⁻¹的pH 8.0 Tris-HCl、1 mol·L⁻¹ NaCl、15 mmol·L⁻¹ EDTA), 于65℃中放置30 min; 再加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1),

室温下放置15 min后以9 300×g离心3 min, 取上清液, 加入600 μL的异丙醇, 室温下放置15 min后以9 300×g离心5 min; 收集沉淀, 用70%乙醇充分洗涤, 最后加入50 μL H₂O溶解沉淀, 置于-20℃下储存备用。

2.2 获取端粒相关序列模板 取约100 μg总DNA, 用Mbo I进行酶切, 酶切产物经过0.8%琼脂糖凝胶电泳检测后, 用TAKARA试剂盒回收3~8 kb的DNA片段, 定容为20 μL。

2.3 端粒相关序列的盒式PCR扩增 制作人工接头(linker), 序列为: 5'CTGACTGATCTAGAGGTA-CCGGATCC 3'和5'GATCGGATCCGGTACC-TCTAGA 3'。将3 μL人工接头和10 μL 3~8 kb的紫稻DNA片段放在4℃中进行连接反应, 过夜。以连接后的3~8 kb DNA片段为模板, 以人工接头序列(5'CTGACTGATCTAGAGGTACCGGATCC 3')和端粒重复序列(5'AACCCTAAACCCTAAACCCTAAACCC 3')为引物进行热启动PCR。反应条件为: 94℃ 10 min; 94℃ 30 s, 67℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30个循环; 72℃ 10 min。

2.4 PCR产物的克隆 PCR产物经过0.8%琼脂糖

收稿 2004-03-01 修订 2004-05-31

资助 教育部优秀青年教师资助计划。

* 通讯作者(E-mail: hqli@scnu.edu.cn, Tel: 020-85211375-8514)。

凝胶电泳检测后, 用 TAKARA 试剂盒回收 100~400 bp 的片段。将回收片段和 TA 克隆载体 pUCmT 进行连接反应, 转化大肠杆菌。挑选部分克隆进行 PCR 检测, 引物同上。PCR 反应条件为: 94°C 10 min; 94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 10 min。

2.5 序列分析 重组克隆子利用 M13 正向引物进行测序。

结果与讨论

用 *Mbo* I 酶切后, 取 2 μ L 点样检测(图 1)。端粒和端粒相关序列包含的酶切位点很少, 而以 *Mbo* I 酶切后, 端粒和端粒相关序列主要位于大分子量的酶切片段中, 切取 3~8 kb 片段回收, 将 3~8 kb 的 DNA 片段和人工接头进行连接, 连接好的片段作为模板进行盒式 PCR 扩增。如图 2 所示, PCR 的产物不成带。用 *Mbo* I 酶解基因组 DNA 可能产生的片段大小约为 300 bp, 我们预测 PCR 扩增的端粒片段约在 100~400 bp 之间。切下 100~400 bp 之间的 PCR 产物回收, 连接 pUCmT 载体, 转化大肠杆菌; 挑取 30 个重组子进行 PCR 检测, 得到 7 个含有端粒相关序列插入片段的重组子(图 3); 再将含有端粒相关序列插入片段的重组子进行序列分析, 最后得到 5 个水稻的端粒相关序列(AY572962、AY572963、AY572964、AY573970, 另一个与 AY367133 的同源性为 100%)。在基因库中比较的结果显示, 所得水稻



图 1 *Mbo* I 酶切结果

1. 梯度分子量标准(8、7、6、5、4、3、2、1.6、1 kb);
2. 水稻基因组酶切结果。

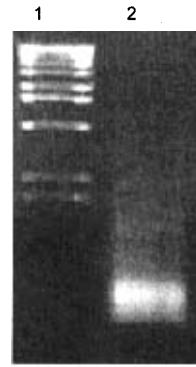


图 2 端粒相关序列的盒式 PCR 扩增结果

1. 梯度分子量标准(8、7、6、5、4、3、2、1.6、1、0.5、0.4、0.2 kb); 2. 以 3~8 kb DNA 片段为模板进行 PCR 扩增的结果。

的端粒相关序列与拟南芥、小麦、玉米、烟草等物种的端粒相关序列具有很高的同源性。这些序列使我们进一步了解了水稻染色体端粒区域的结构, 它们还可以为水稻染色体末端的遗传图谱提供标记探针。本文中的方法是在 Ashikawa 等^[1]方法的基础上发展来的, 具有操作过程简单且高效的特点, 可以用于不同物种中端粒相关序列的克隆。

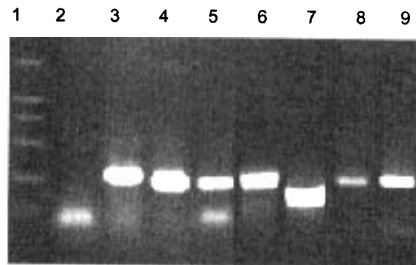


图 3 克隆产物的 PCR 检测结果

1. 梯度分子量标准(2、1、0.75、0.5、0.25、0.1 kb);
2. 无端粒相关序列插入片段的重组子; 3~9. 有端粒相关序列插入片段的重组子。

参考文献

1. Ashikawa I, Kurata N, Nagamura Y et al. Cloning and mapping of telomere-associated sequences from rice. *DNA Res*, 1994, 1(2): 67~76