中国科学
1989 年 8 月　　B 辑　　第 8 期

蚕豆 16S rRNA 基因前导顺序的一级结构分析

高家国　汪训明　王　琪　谈家桢
（复旦大学遗传学研究所，上海）

摘　要

通过测定蚕豆 16S rRNA 基因前导顺序的一级结构并和其它物种相应顺序的比较发现：(1) 在蚕豆 16S rRNA 基因上游不存在 F1 和 X 蛋白基因；(2) 蚕豆的 F3 的保守区域更接近于保守顺序；(3) 蚕豆的 F3 的—10 区 3′ 端后更富含 A-T 核苷酸对；(4) 油菜、烟草、玉米和菠菜的 16S rRNA 基因 5′ 端上游能形成一个稳定的基环结构，而蚕豆则不能．我们由此认为蚕豆的 rDNA 启动子比油菜的要强，增加转录是一个担负起两个 rDNA 拷贝功能的原因之一．

关键词：蚕豆，叶绿体 DNA，反向重复顺序

迄今为止，已报道的高等植物叶绿体 16S rRNA 基因的前导顺序(Leader Sequence)的有玉米[1]、烟草[2]和菠菜[3]，油菜的最近也已测定完毕1)．在上述 4 种植物叶绿体 16S rRNA 基因的前导顺序中，有着以下的共同点：16S rRNA 基因 5′ 端附近有一个 $tRNA^{Val}$ 基因；存在着 3 个具有启动子结构的 F1，F2 和 F3 区域，其中 F3 位于 $tRNA^{Val}$ 和 16S rRNA 基因之间，F1 和 F2 位于 $tRNA^{Val}$ 5′ 端上游；位于 F1 上游还存在一个和 16S rRNA 基因、$tRNA^{Val}$ 基因不同编码链的 X 蛋白基因及 S. D. 顺序． Strittmatter 等[4]和 Gabriele 等[5]证明，无论是在体内还是克隆到大肠杆菌中，F3 就是 rDNA 的启动子． Sun 等[6]用分离了的叶绿体 RNA 聚合酶研究了豌豆 rDNA 的体外转录，并测定了 $tRNA^{Val}$ 基因到 16S rRNA 基因 5′ 端 280 位核苷酸的一级结构．实验表明，在豌豆中，F3 是 rDNA 的启动子，转录的起点位于—10 区后的第 5 位核苷酸．

1987 年，我们以 pBR322 为载体构建了蚕豆叶绿体 DNA BamH I 片段的克隆库[7]，并分离到了含完整 16S rRNA 基因的重组质粒 pVFB16，此质粒带有蚕豆叶绿体 4.7kb 的 BamH I 片段．本文报道这 4.7kb DNA 片段中的 BglII-PvuII 片段的 DNA 顺序，并和玉米、烟草、菠菜、油菜及豌豆的相应顺序进行了比较，结果表明，蚕豆 16S rRNA 基因的上游发生了顺序重排．

本文 1988 年 7 月 19 日收到，1989 年 1 月 25 日收到修改稿．

1) 高家国等，遗传学报，16(1989)，2：89－96．

蚕豆和豌豆等[8] 6 种豆类植物由于丢失了 1 个反向重复顺序而每一个叶绿体 DNA 分子仅含 1 个 rDNA 拷贝；油菜、玉米、烟草、菠菜等的高等植物叶绿体 DNA 分子有两个反向重复顺序，因此每一个 DNA 分子有两个 rDNA 拷贝，我们的研究结果表明，增加转录是 1 个担负起 2 个 rDNA 拷贝功能的原因之一。

一、材料与方法

1. 材料

(1) 质粒 pVFB16　由本实验室构建[7]，含有蚕豆叶绿体 DNA BamH I 4.7kb 的片段(图 1)。

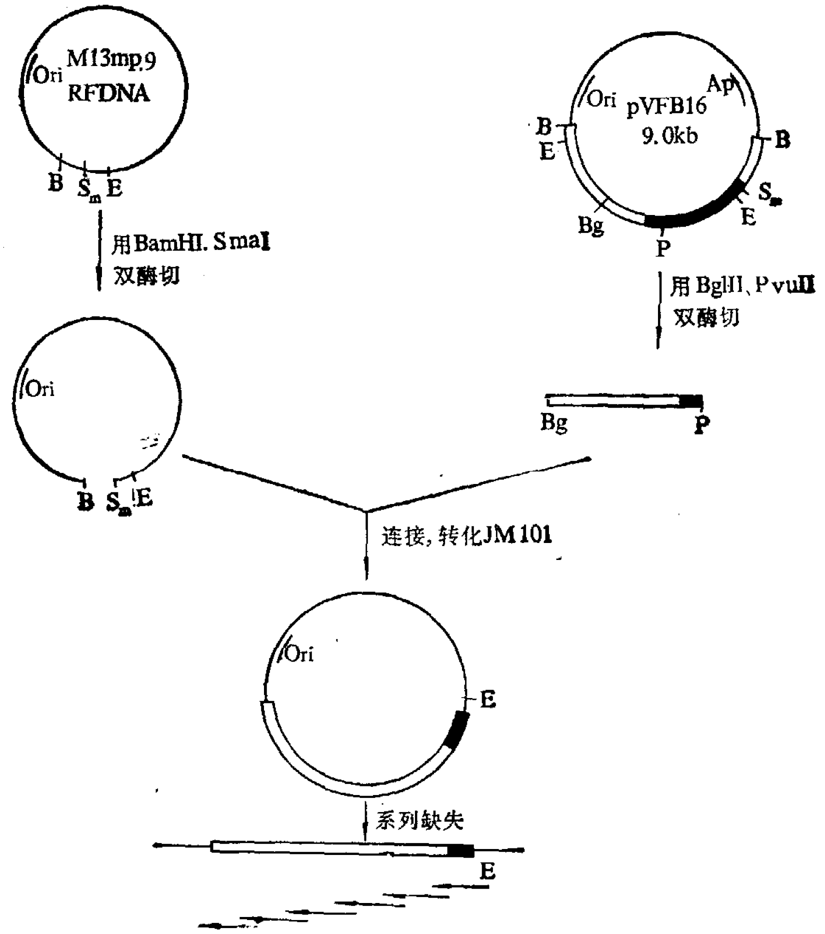

图 1　BglII-PvuII 片段在 M13mp9 上克隆
(B——BamHI, Sm——SmaI, E——EcoRI, Bg——BglII, P——PvuII;
箭头表示克隆顺序分析的方向和测序范围)

(2) 药品试剂　DNase I 为 Boehringer 产品；其它的酶试剂及顺序分析用的一套药品为 New England Biolabs 产品；α-^{32}P-dATP 为 Amersham 产品，X 光底片为上海感光胶片厂产品。

(3) 菌种　*E. coli* HB101 和 *E. coli* JM101。

(4) 噬菌体　M13mp9。

2. 方法

(1) 质粒 pVFB16 DNA 的提取　参照 Maniatis 等[9]的方法. 先用碱变性法提取质粒 DNA，然后 CsCl 超离心分离出超螺旋 DNA 分子.

(2) M13mp9 RFDNA 的提取　参照 Wu Ray 等[10]的方法.

(3) 质粒 pVFB16 BglII-PvuII 片段在 M13mp9 上的克隆　用 BglII 和 PvuII 双酶切质粒 pVFB16 DNA，然后和经 SmaI 和 BamHI 双酶切的 M13mp9 RFDNA 混匀后，用 T_4-DNA 连接酶连接后转化 JM101. 在 X-gal 平板上选出无色噬菌斑(图 1)，电泳鉴定插入的大小(见方法(5)).

(4) 重组克隆的定向缺失　主要参考 Hong[11] 的方法，重组的 RF DNA 经 DNase I 部分酶切后，经低熔点胶电泳回收线性的 DNA 分子，EcoRI 酶切后补平自连，转化 JM101.

(5) 缺失子大小的鉴定　用牙签挑取从方法 (4) 得到的转化噬菌斑于 2ml LB 培养液中，加入 20μl 培养过夜的 JM101，37℃ 振荡培养过夜. 培养液用台式高速离心机 15000r/min 离心 15min，上清液置于 4℃ 保存. 离下的菌体用 50μl 细胞裂解液 (cracking gel buffer) (1%SDS，0.05 mol/L Tris-Cl，pH6.8，0.002mol/L EDTA，0.4mol/L 蔗糖，0.01% 溴酚蓝)，37℃ 裂解 15min，台式高速离心机 15000r/min 离心 15min，吸取上清液于 17cm 长，0.7% 的琼脂糖凝胶上以 2V/cm 电泳 12h. 根据电泳结果，选出 6 个缺失了不同大小片段的克隆进行顺序分析.

(6) DNA 顺序测定　按 Sanger[12] 的双脱氧法进行. 聚丙烯酰胺胶浓度为 8%，含尿素 8.3mol/L. 胶为楔形，厚 0.2—0.7mm，长 55cm. 电泳系统为 LKB 2010 Macrophor 系统，电压 2500V，电泳时间为 3h.

二、结果与讨论

我们一共做了 6 个克隆的 DNA 顺序测定，每个克隆大小约相差 200bp，每一个克隆在一块胶上至少能清晰地读出 250bp，共测得 BglII-PvuII 片段 1199bp (图 2).

我们将测得的顺序输入到电子计算机中和文献[1—3]中的烟草、玉米和菠菜的 16S rRNA 基因前导顺序进行比较，在我们测得的顺序中，有 16S rRNA 基因 5′ 端的 139bp，间隔 255bp 是一个 72bp 的 $tRNA^{Val}$ 基因，间隔之间有相应的 F3；$tRNA^{Val}$ 基因上游能找到相应的 F2，但寻找不到 F1，X 蛋白基因及 S. D. 顺序(图 2).

人们较早地发现，蚕豆和豌豆叶绿体 DNA 基因组内，基因的顺序重排现象比较严重[13]，Ko 等[14]用 DNA 片段作为探针，研究了蚕豆基因组基因的重排现象，发现 rDNA 发生了重排. 我们认为这种重排发生在 F1 到 F2 之间，以致在我们所测定的顺序中，不能找到 F1 及 X 蛋白基因和 S. D. 顺序.

蚕豆 $tRNA^{Val}$ 基因和别的物种的核苷酸数一样，为 72bp，从它的 DNA 一级结构可以推测出典型的三叶草结构. 玉米、烟草和油菜的 $tRNA^{Val}$ 基因完全一致. 与之相比，菠菜有一个核苷酸对的变化；而蚕豆有 4 个核苷酸对的变化. 蚕豆和豌豆之间也有两个核苷酸对之差(图 3).

我们将在蚕豆中找到的 F3 和烟草、玉米、油菜和豌豆的 F3 进行比较. 以烟草为 100% 同源，发现蚕豆和豌豆的 F3 变异较大，它们和烟草的 F3 同源性分别为 43% 和 52%，而其

AGATCTGACC CATTTTCTTA TTCATCAAAA GGTAAGGAAG GTACGTAATA AAGAAGATTT CTTTATTGTA TCATACTATA 80

TGAAATCTTC GGTTTTTTCT CTTTCTATAT GCCTTTCTTG TAAGTATACT GTTTAATCAA TATCAATAGA AAACCTTTTC 160

TTCTGTATGA ATCAATATTA TTACATTCCA ATTCCTTTCC AATATTTCCC AAAGAAAATA CCGAATTGGA TCTTAAATTG 240

ACGGGTTAGT GTGAGCTTAT CCAGTCGGTT ATGCACTCTT TGAATAGGAA TCTATTTTGT GAAAAATACC GGCTTTCGTG 320

CTTTGGTGGG TCGTTGAGAT CCTTCGATGA CCTATGTTGA AAAGATATCT ATCTATTATG ATACGATTAA TTGTGTAAAG 400

GCGTGTAGTA GCAACGGAAC CAGAGAGAAT ATATGGAGAT GGAAAAGACA GTTTCCTATT GTATACGATT AGATTATTAT 480

CTATTAGTTT AGTTAATGAT CTCGGTTCAG CGAGTCCTTT CTTTCGTGAT GAACTACCTA CATTTTGTCG CAGAGGGCCG 560

AGGAGAAAAG CAACAAGAGG ATTGTATCAT CATATAAAGA AGTAGATCAA CCTCTTTCCA ATATACAACT ATGTAAGAGT 640

F2

GTGAAAAGAA GGCCTTGTTT AAGTTTCAAA AATAGTCGCG TTGATTTTTT TGACGTAGGA TTAGGCAGTC TTTTTTTCTC 720

$tRNA^{Val}$

GATAGGGGCA AGGAGGGGTA TAACTCAGCG GTAGAGTGTC ACCTTGACGT GGTGGAAGTC ATCGGTTCGA ATCTGATTAT 800

CCCTAAACCC AATATCAATT GTTCGATTCA ATATAAATTG TTCGATTTTG ATGACAAGAT TCAATCCAAA TGGATAAGAG 880

F3

GCCTGGGGGT TGACAAAAGC GGACAGAGGG CTGTATTATA TTTTTGGGAA GCAACTCCGG GCGAATAGTA AGCCCATGGA 960

TACAAGTTAT GTCTTCTCAG CATCAGCATC AGCAAAGAAA ATAAAATTCC GAATCAGTTT TGTCTAGAAA CAAGGAAGTT 1040

ATAAGGAATG CAACTAGGAA TCTCATGGAG AGTTTGATCC TGGCTCAGGA TGAACGCTCG CGGCATGCTT TACACATGCA 1120

16S rRNA

AGTCGGACGG GAAGTGGTGT TTCCAGTGGC GGACGGGTGA GTAACGCGTA AGAACCTGCC CTTGGGAGGG GGACAACAG 1199

图 2 蚕豆叶绿体 16S rRNA 基因前导顺序

它物种的 F3 比较保守，如玉米和烟草的同源程度可达 83%（图 4）.

通过 F3 的比较，我们认为蚕豆、豌豆丢失了 1 个 rDNA 拷贝后，转录的增强是 1 个担负起 2 个 rDNA 拷贝功能的原因之一，主要是因为：(1) Diane 等[15]比较了168 个大肠杆菌的启动子，发现 −35 区和 −10 区的保守顺序分别为 TTGACA 和 TATAAT，他们做了 98 个启动子的突变研究，发现几乎所有的突变都遵循以下原则：发生在 −35 区和 −10 区背离保守顺序的突变会使启动子减弱，反之则会使启动子增强. 叶绿体 DNA 的转录是原核性的，启动子的 −35 和 −10 区的保守顺序同大肠杆菌一致[16]，所以也应遵循这条原则. 烟草、菠菜、油菜和玉米的 −35 区均为 TTGACG，而蚕豆和豌豆则为 TTGACA，和保守顺序完全一致. 在豌豆中，−10 区为 TATAAT，也和保守顺序完全一致. 因此，蚕豆和豌豆的 rDNA 启动子应较强；(2) 物理学研究表明，RNA 聚合酶和启动子结合后，会使 −10 区和转录起点之间的双链 DNA 解链[17]，因此，−10 区到转录起点 DNA 的解链易难，会影响转录效率. 在豌豆中，rDNA 的转录起点位于 −10 区后的第五位核苷酸 A 上，−10 区后的 4 个核苷酸顺序为 ATTT. 在蚕豆中，相应的顺序是 TTTT，但在烟草、油菜和菠菜中相应的顺序是 TCTG，玉米是 GCTG. 显然，A-T 配对更利于双链的解开.

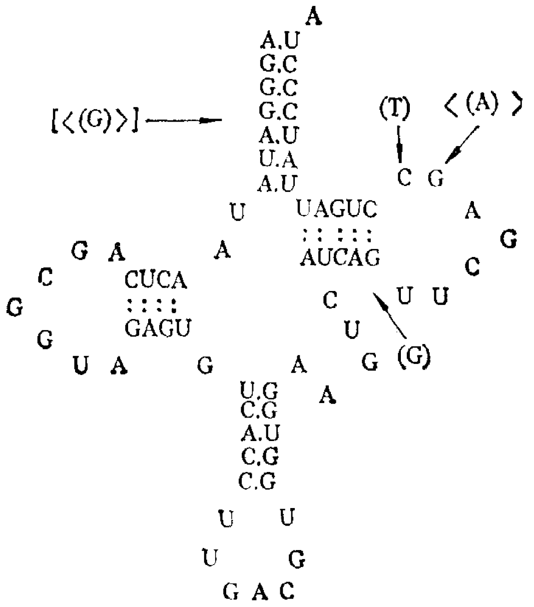

图 3　tRNA^{Val} 基因核苷酸顺序的比较
（只画出油菜 tRNA^{Val} 基因顺序，烟草、玉米和它的顺序一致；()表示蚕豆的变异位点，<>表示豌豆的变异位点，[]表示菠菜的变异位点）

		"−35"	18bp	"−10"		%
烟草	CTCGTGGGA	TTGACG	TGAGGGGGCAGGGATGGC	TATATT	TCTGGGAGCGAACTC	100
菠菜	CTCGTGGGA	TTGACG	TGAGGGGGtAGGGATGGC	TATATT	TCTGGGAGCaAACTC	96
油菜	CTCGTGGGA	TTGACG	TGAGGGGGtAGGGgTaGC	TATATT	TCTGGGAGCGAACTC	94
玉米	CTtGTGGGA	TTGACG	TGAtaGGGtAGGGtTGGC	TATAcT	gCTGGtgGCCAACTC	83
蚕豆	gcCtgGGGg	TTGACa	aaAGGGGaCAGaGggctg	TATtaT	TtTtGGgaaGcAact	52
豌豆	ggataGGGA	TTGACa	caAGGGGGggtaaggcca	TATAaT	atTtatgGgaggCaa	43

图 4　F3 的同源性比较
（以烟草为 100% 同源，小写字母表示变异的核苷酸）

另外，我们将上述的 DNA 顺序全部输入到电子计算机中，寻找稳定的茎环结构. 结果，在烟草、菠菜、玉米和油菜的 F3 和 16S rRNA 基因之间，均能找到一个稳定的茎环结构（表 1），然而不能在蚕豆和豌豆的相应位置找到稳定的茎环结构. 我们推测这些茎环结构对 rDNA 的转录有着负调控作用.

我们试图测定油菜和蚕豆叶绿体 DNA 的拷贝数及其 rRNA 的含量，但由于这两种植物的生长季节不完全相同，且同一植物不同的发育时期，叶绿体 DNA 及 rRNA 含量也不完全相同，因此，未能得到满意的结果. 因此，我们不知道有反向重复顺序和无反向重复顺序这

表 1 位于油菜、菠菜、玉米和烟草 16S rRNA 基因 5 端前的茎环结构

物种	茎环结构大小	自由能
油菜	17 bp	$-14.8\ m^3 \cdot kcal$
菠菜	13 bp	$-3.4\ m^3 \cdot kcal$
玉米	10 bp	$-3.8\ m^3 \cdot kcal$
烟草	12 bp	$-5.4\ m^3 \cdot kcal$

	"—35"		18bp	"—10"		%
烟草	TTGGG	TTGCGC	TATATATATGAAAGAGTA	TACAAT	AATGATGTATTTGG	100
菠菜	TTGGG	TTGCGC	cATATATATGAAAGAGTA	TACAAT	AATGATGTATTTGG	98
蚕豆	TTGGG	TTGCGC	cATAcATATGAAAcAGTA	TAGAAT	AATGATGTATTTGc	93
豌豆	TTGGG	TTGCGC	cATAcATATGAAAGAGTA	TAGAAT	AATGATGTATTTCc	94

图 5 rbcL 基因启动子的同源性比较

(以烟草为 100%同源,小写字母表示变异的核苷酸)

两类型叶绿体中在相应的发育时期, DNA 的拷贝数是否相等,也不知道这两种类型叶绿体对 rRNA 的需求量是否相同. 可是,如果蚕豆叶绿体的 rRNA 量是仅靠 DNA 分子数的增加使得 rDNA 拷贝数得以补偿的话,那么,为了少量的基因得以补偿而使大量的基因成倍增加,显然是不经济的;如果蚕豆叶绿体的 rRNA 含量减半,对于仅靠光合作用作为唯一能量来源的蚕豆,对其进化是不利的;再则,如果蚕豆是通过 DNA 拷贝数增加或对 rRNA 需要量减半来补偿 1 个 rDNA 拷贝的损失,就不能解释其启动子为何和油菜、烟草、菠菜相比,有较大的变化,而且这些变化往往有利于转录的增强.

rbcL 是叶绿体光合作用中起固定二氧化碳功能的酶的大亚基基因,位于单拷贝区上. 因此,反向重复顺序的丢失与否不影响该基因每一个分子上的拷贝数. 该基因的启动子顺序在烟草[18]、菠菜[19]、蚕豆[20]和豌豆[21]中同源程度很高,蚕豆、豌豆和烟草的同源程度分别达93%和94% (图 5). 与 16S rRNA 基因的启动子不同,在蚕豆和豌豆的 rbcL 启动子中,不存在有利于转录的顺序变化. 这一结果从另一个角度支持了我们增加转录是 1 个担负起 2 个 rDNA 拷贝功能的原因之一的观点.

参 考 文 献

[1] Schwarz, Z. et al., *P. N. A. S. (USA)*, 78(1981), 4748—4752.
[2] Tohdoh, N. et al., *Nucl. Acid Res.*, 9(1981), 5399—5406.
[3] Briat Jean-Francois et al., *ibid.*, 10(1982), 6865—6877.
[4] Strittmatter, G. et al., *EMBO J.*, 4(1985), 599—604.
[5] Gabriele, D. et al., *Curr. Genet.*, 12(1987), 241—246.
[6] Sun, E. et al., *Plant Mol. Biol.*, 6(1986), 429—439.
[7] 李加、汪训明等,生物工程学报,3(1987),4: 247—253.
[8] Palmer, J. D. et al., *Curr. Genet.*, 11(1987), 275—286.
[9] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning, CSH*, 1982, 86—93.
[10] Wu Ray. et al., *Methods in Enzymology*, Vol. 101, Recombinant DNA Part C, 1983, 28—30.
[11] Hong, G. F. et al., *J. Mol. Bio.*, 158(1982), 539—549.
[12] Sanger, F., *P. N. A. S. (USA)*, 74(1977), 5463—5467.
[13] Palmer, J. D. et al., *ibid.*, 78(1981), 5533—5537.
[14] Ko, K. et al., *Theor. Appl. Genet.*, 74(1987), 125—139.

[15] Diane, K. et al., *Nucl. Acids Res.*, **11**(1983), 2237—2255.
[16] Kung, S. D. et al., *ibid.*, **13**(1985), 7543—7549.
[17] Martin Rosenberg et al., *Ann. Rev. Genet.*, **13**(1979), 319—353.
[18] Shinozami, K. et al., *Gene*, **20**(1982), 91—102.
[19] Zurawski, G. et al., *Nucl. Acids Res.*, **9**(1981), 3251—3270.
[20] Kazwo Shinozaki et al., *Mol. Gen. Genet.*, **197**(1984), 363—369.
[21] Mullet, J. E. et al., *Plant Mol. Biol.*, **4**(1985), 39—54.