

# 银杏叶绿体 DNA 的分离提纯

李冠一 林栖凤 黎荣松

(武汉大学)

叶绿体是植物进行光合作用的极为重要的细胞器。本世纪初, Correns 等根据植物叶子的花斑现象具有母性遗传的特征, 推测叶绿体中可能存在着某些特殊的遗传因子, 但是在其后的近半个世纪里, 叶绿体基因存在与否始终未能得到肯定, 直到六十年代初, 随着核酸检测技术和电镜技术的发展, 叶绿体基因的存在才最后得到证实。1962年 Ris<sup>[6]</sup> 用电镜观察到衣藻叶绿体中存在着纤维状 DNA。1963年 Sager 和石田政弘<sup>[2]</sup> 应用超离心技术, 从衣藻叶绿体中首次成功地分离提取了 DNA。由于在高等植物中叶绿体基因组比较简单, 而且它的非孟德尔遗传方式对叶绿体基因组的结构及其遗传分析带来极大方便。此外叶绿体作为真核细胞的细胞器, 其 DNA 及基因表达系统却又与原核细胞的极为类似, 因此叶绿体也是研究真核基因和原核基因之间相互关系的好材料。叶绿体基因组的研究无论在理论上还是在实际上均有着重要意义。

本文用银杏为材料, 参考 Kolodner<sup>[3]</sup> 和杉浦昌弘<sup>[3]</sup> 的方法, 并加以改进, 分离制得叶绿体 DNA (Chloroplast DNA · 简称 ctDNA)。

## 试剂

STM/BSA 溶液 0.35M 蔗糖, 50mM Tris-HCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM 巯基乙醇, 0.1% BSA (牛血清白蛋白), pH7.5。

A 溶液 0.3M 甘露醇, 50mM Tris-HCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM 巯基乙醇, 0.1% BSA, pH8.0。

B 溶液 0.3M 甘露醇, 50mM Tris-

HCl, 20mM EDTA, pH8.0。

TE 溶液 50mM Tris-HCl, 20mM EDTA, pH8.0。

电极缓冲液 TAE 40mM Tris, 20mM NaAc, 1mM EDTA, pH8.0。

## 方 法

### (一) 叶绿体的分离纯化

1. 蔗糖梯度离心法 参考文献 [3] 并略加改进。取新鲜银杏叶 200 克, 去叶脉, 洗净, 剪碎。加入 600ml 冷的 STM/BSA 溶液于组织捣碎器中间歇捣碎, 捣碎液经多层纱布过滤, 滤液经 400rpm 离心 5 分钟, 除去细胞碎片及未破碎细胞等, 将上层悬液于 2,000rpm 离心 10 分钟, 收集沉淀并用 100ml STM 溶液洗涤 1—2 次, 得粗制叶绿体沉淀。将此沉淀悬浮于 20ml STM 冷溶液, 在蔗糖梯度上铺层、离心。梯度溶液的制备方法是, 在 40ml 的离心管中依次加入 55%、40%、20% 的蔗糖溶液 15ml、10ml、15ml, 放置 2 小时后, 在液面小心铺加粗制叶绿体悬液 2—4ml, 4,000 rpm 离心 20 分钟, 收集叶绿体区带, 用适量 STM 溶液洗涤 2 次, 3,500rpm 离心 10 分钟, 所得沉淀即为纯净叶绿体, 将其悬浮于 10ml TE 溶液中, 低温保存备用。以上操作均在 4℃ 下进行。

2. 差速离心法 参考文献 [5] 进行。取新鲜银杏叶 200 克, 去叶脉, 洗净, 剪碎。加入 800ml 冷的 A 液, 用组织捣碎器中间歇捣碎, 经多

*Li Guanyi et al.: Isolation and Purification of Chloroplast DNA from the Ginkgo*

本文于 1985 年 7 月 19 日收到。

层纱布过滤,滤液于 400rpm 离心 5 分钟,取上层悬液再反复离心 1—2 次,去核。所得悬液于 2,000rpm 离心 10 分钟,将沉淀悬浮于 20ml A 液中,加入固体 DNaseI,使终浓度为 50 $\mu$ g/ml,于 4 $^{\circ}$ C 放置 1 小时,再加入 60ml B 液,2,000rpm 离心 10 分钟,沉淀用 B 液洗涤 2 次,悬浮于 10ml TE 溶液中,低温保存备用。

将上述两种方法制得的纯净叶绿体用荧光显微镜观察其形态完整性和纯度。

## (二) 叶绿体 DNA 的提取

参照 Kolodner<sup>[2]</sup> 和杉浦昌弘<sup>[3]</sup> 方法。在纯净叶绿体悬液中加入 10% SDS,使终浓度为 1.5%,加入 Pronase E,使终浓度为 150 $\mu$ g/ml,于 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 1 小时。然后加入等体积饱和重蒸酚(用 0.1M Tris, pH12 溶液饱和),轻摇 15 分钟,3,500rpm 离心 5 分钟,将上相液用酚重复抽提两次,再用氯仿-异戊醇(24:1, V/V)抽提 1—2 次,直至中层界面无变性蛋白为止。取上相液加入两倍体积冷乙醇,置 -20 $^{\circ}$ C 过夜,4,000rpm 离心 15 分钟,将沉淀溶于 2ml TE 溶液。为了除去其中的 RNA,加入固体 NaCl,使终浓度为 2M, -10 $^{\circ}$ C 放置 1 小时后,12,000rpm 离心 5 分钟,收集上清液,加入 RNase 溶液(用 10mM Tris-HCl, pH7.5, 0.015M NaCl 溶液配制,并于 85 $^{\circ}$ C 保温 10 分钟,灭活可能混入的 DNase),使 RNase 最终浓度为 50 $\mu$ g/ml,37 $^{\circ}$ C 保温 1 小时,用饱和苯酚抽提两次,取上相液对 TE 溶液透析 1 夜,最后用聚乙二醇(PEG)浓缩,即为纯净叶绿体 DNA。

## (三) 琼脂糖凝胶电泳

用 0.7% 琼脂糖制胶(内含溴化乙锭约 0.5 $\mu$ g/ml),水平凝胶板为 12 $\times$ 10 $\times$ 0.4cm。样品内含溴酚蓝 0.02%,甘油 10%。电极缓冲液为 TAE,电压 100 伏,在室温下泳动 2—3 小时,紫外灯下观察并拍照。

## (四) 电镜观察

用 Kleinschmidt<sup>[4]</sup> 的碱性蛋白膜技术制片。展层样品液按如下方法配制:取 5M 醋酸铵-10mM Na<sub>2</sub>EDTA 10ml, ctDNA + 重蒸水 80 $\mu$ l(使 ctDNA 最终浓度约为 0.5 $\mu$ g/ml), 0.1%

细胞色素 C 10 $\mu$ l,混匀。下相液为重蒸水。展开后静置 30—60 秒,用覆盖了火棉胶(Parlodion)膜的铜网捞膜,并用 0.1% 磷钨酸溶液染色,90% 乙醇脱色,自然干燥后,用铂-铀合金旋转投影以增加反差。在 JEM-100CXII 型电子显微镜上进行观察。

## 结果与讨论

植物 DNA 存在于细胞核、叶绿体和线粒体中,由于实际上不可能从总 DNA 中分离细胞器 DNA,故欲制取 ctDNA,必须首先分离纯化叶绿体。本文采用简便易行的差速离心和蔗糖梯度离心两种方法制得的叶绿体经荧光显微镜观察,均具有完整形态,但用差速离心法制得的样品中混杂有少量不发荧光的细胞核,为此须经 DNase 处理,除去混入叶绿体中的核 DNA 后,方可用于提取 ctDNA,然该法操作简便,适用于叶绿体的大量制备。用蔗糖梯度离心法纯化叶绿体时,他们改进了文献[3]的梯度制备方法 and 离心条件,将 25,000rpm 离心 30 分钟改为 4,000rpm 离心 15 分钟,得到两条清晰的叶绿体带(图 1)。该法制得的叶绿体通过荧光显微镜观察,在视野范围内基本上都是发荧光的叶绿体,表明纯度合乎要求。该法制得的叶绿体无须经 DNase 处理,即可用于制备 ctDNA。利用蔗糖梯度离心法纯化叶绿体时,应根据植物种类和叶龄的不同适当选择蔗糖浓度和用量。

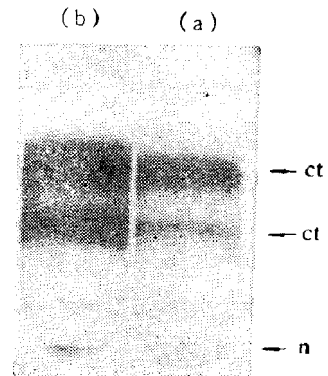


图 1 蔗糖密度梯度分离叶绿体  
(a) 上样量 2ml; (b) 上样量 8ml。ct 代表叶绿体;  
n 代表残余的细胞核等。



图2 银杏 ctDNA 的琼脂糖凝胶电泳  
(a)  $\lambda$ DNA; (b) 差速离心法制得的 ctDNA;  
(c) 梯度离心法制得的 ctDNA。

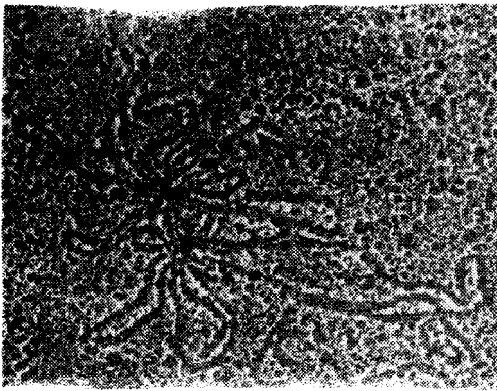


图3 银杏 ctDNA 分子(电镜放大倍数为 29,000)

银杏 ctDNA 的电泳分析结果如图 2 所示。本文提取的 ctDNA 为 1 条带, 表明其纯度合乎要求。银杏 ctDNA 的电镜观察如图 3 所示, 该 ctDNA 为花盘状卷曲环状分子, 与何国顺等<sup>[1]</sup>在电镜下观察到的油菜、烟草 ctDNA 的花盘状形态十分相似, 中间有明显的“花心”, 周围有 7—9 个花瓣状环, 其大小有的比较相近, 有的却相差甚远, 如图 3 所示, 最小的环为  $0.23\mu\text{m}$ , 最大的达  $3.02\mu\text{m}$ 。这些分子构型的规律性有待进一步研究。

### 参 考 文 献

[1] 何国顺等: 1984. 植物学报, 26(3): 258—265。  
[2] 石田政弘: 1980. 遗传, 34(12): 71—87。  
[3] 杉浦昌弘等: 1982. 植物细胞育种入门, 学会出版センター, 92—95。  
[4] Kleinschmidt, A. K.: 1968. *Methods in Enzymology*, 12 part B, 125。  
[5] Kolodner, R. and K. K. Tewari: 1975. *Biochim. Biophys. Acta*, 40:2:371。  
[6] Ris, H. and W. Plaut: 1962. *J. Cell Biol.*, 13: 383—391。

(上接第 9 页)

株发育的一定阶段进行接种, 就可以将分离群体中纯合抗病的单株和杂合抗病的单株鉴别出来, 便于尽早选择或选择纯合抗病株作进一步杂交之用, 提高选择的效率, 减少工作量, 缩短育种程序。根据本试验结果, 当利用 B. P. 等爪哇稻品种的成株抗性时, 要想鉴别纯合抗病株和杂合抗病株, 可在 10—11 叶龄期(播种后 51—57 天) 对分离群体进行接种。而南粳 15、早生爱国 3 号和辛尼斯的分离群体宜在 9—10 叶龄期进行接种, 在迟播条件下, 则应提前。

### 参 考 文 献

[1] 赵新平、张端品、谢岳峰: 1985. 华中农学院学报, 4(3): 11—12。  
[2] 张端品、谢岳峰、T. W. Mew: 1984. 中国农业科学, (1): 40—50。  
[3] Stern, C. 著(吴曼译): 1973. 人类遗传学原理, 科学出版社, 1979, p. 245。  
[4] Athal, D. S. and I. A. Watson: 1957. *Proc. Linn.*

*Soc. N. S. W.*, 82: 245—252。  
[5] Ayres, P. G. and B. Woolcott: 1980. *Ann. Appl. Biol.*, 94: 255—263。  
[6] Dyck, P. L. and E. R. Kerber: 1970. *Can. J. Genet. Cytol.*, 12: 175—180。  
[7] Hart, H. and Zaleski: 1935. *Phytopathology*, 25: 1041—1066。  
[8] Jones, I. T.: 1975. *Ann. Appl. Biol.*, 80: 301—309。  
[9] Kumar, H. and R. B. Singh: 1981. *Euphytica*, 30: 147—151。  
[10] Lebedeva, T. V.: 1979. *USSR*, 34—35。  
[11] Mains, E. B., C. E. Leighty and C. O. Johnston: 1926. *Jour. Agr. Res.*, 32: 931—972。  
[12] Marlens, J. W. et al.: 1981. *Can. J. Genet. Cytol.*, 23: 591—595。  
[13] Parlevliet, J. E.: 1975. *Euphytica*, 24: 21—27。  
[14] Russell, G. E.: 1976. *Proceedings of the Fourth European and Mediterranean Cereal Rusts Conference*, Interlakan/Switzerland, pp. 21—23。  
[15] Sidhu, G. S. and G. S. Khush: 1978. *Phytopathology*, 68: 461—463。  
[16] Sinons, M. D.: 1954. *Phytopathology*, 44: 221—223。  
[17] Upadhyay, M. K. and R. Kumar: 1981. *P. B. A.*, 51(3): 171。