

活化石植物——苏铁树 叶绿体DNA分子中的核糖核苷酸*

娄艳春 刘望夷

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

COVALENTLY LINKED RIBONUCLEOTIDES IN CHLOROPLAST DNA MOLECULES OF THE LEAVES OF A LIVING FOSSIL PLANT, *CYCAS REVOLUTA* THUNB

Lou Yanchun, Liu Wangyi

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031)

关键词 叶绿体DNA; λ 噬菌体DNA; 核糖核苷酸; 核糖核酸酶

Key words Chloroplast DNA; Bacteriophage DNA; Ribonucleotide; Ribonuclease

随着分子生物学的深入发展,科学工作者对脱氧核糖核酸(DNA)的研究也更加深入。近年来发现一些植物叶绿体DNA(cpDNA)^[3]、动物线粒体DNA(mtDNA)^[4,5]分子中含有少数核糖核苷酸。其中对豌豆,菠菜和莴苣叶绿体DNA分子中的核糖核苷酸研究较多,而且比较详细^[3]。

研究这个问题,使用的方法是碱(KOH)或核糖核酸酶(RNase)处理cpDNA。如果DNA分子中含有核糖核苷酸,则表现出碱不稳定性和对RNase的敏感性。例如:在碱性氯化铯溶液中进行超离心分析时,菠菜cpDNA全部降解为小片段。而在相同条件下,不含有核糖核苷酸的大肠杆菌噬菌体G₄复制型DNA则仍然是完整的分子。在中性氯化铯溶液中超离心菠菜cpDNA时则无降解。

我们发现古老的树种苏铁树叶绿体DNA中也含有核糖核苷酸。本文报告初步实验结果。

1. 材料与方法

苏铁树叶(*Cycas revoluta* Thunb)由中国科学院上海分院花房赠送。氯化铯为上海试剂一厂产品。牛胰核糖核酸酶(RNase A)为中国科学院上海生物化学研究所东风试剂厂产品。RNase A使用前在100℃条件下加热15分钟,以失活其中可能存在的DNase。

本文于1989年11月19日收到。

*上海生化所沈菊英,彭海同志,中科院上海分院花房郑学彬同志对本工作给予很大的支持与帮助,在此表示诚恳感谢。

2. 结果与讨论

(1) 苏铁树 cpDNA 的制备与纯化

苏铁树叶体及其 DNA 的制备按 Bovenberg 等和 Green^[1,2]的方法。cpDNA 分子中的核糖核苷酸检测按 Kolodner 等^[3]的方法。

将用肌氨酸钠(Sarkosyl)保温处理的苏铁树叶体 DNA 在0.7%的琼脂糖凝胶上电泳(50V, 25mA) 5 小时。电泳后切下含有 DNA 带的凝胶, 装在透析袋中, 再继续电泳1小时(100V, 50mA, 透析袋中的缓冲液与电泳缓冲液相同), 待样品完全走出凝胶后, 交换电源的正负极, 再电泳30秒钟, 停止电泳, 取出透析袋中的溶液, 用冷的95%乙醇沉淀, -20℃放过夜, 这样便可得到较纯的 cpDNA。此法比超离心法简便、快速(图1)。

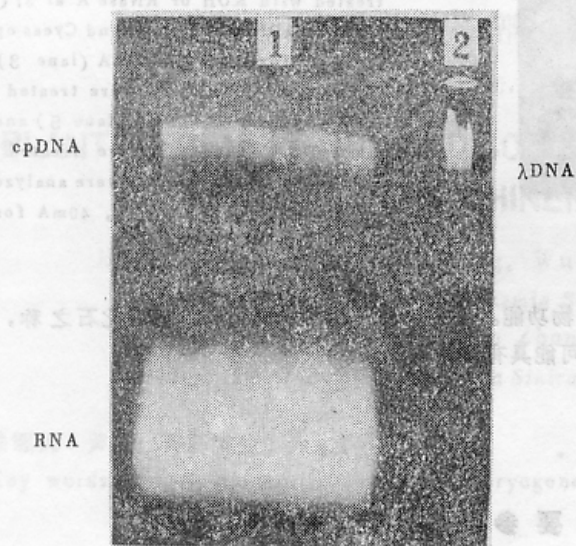


图1 用琼脂糖凝胶电泳制备苏铁 cpDNA

苏铁树叶体用2%肌氨酸钠在20℃保温处理1小时, 然后样品在0.7%琼脂糖凝胶上电泳纯化, 50V, 25mA, 5小时。1.为苏铁 cpDNA; 2.为λDNA 对照。

Fig. 1 Preparation of *Cycas revoluta* Thunb cpDNA by gel electrophoresis. *Cycas revoluta* Thunb Chloroplasts were incubated with 2% of sarkosyl at 20℃ for one hour. Then the samples were purified on the 0.7% agarose gel at 50V, 25mA for five hours (lane 1) and λ phage DNA for control (lane 2).

(2) 苏铁树 cpDNA 分子中的核糖核苷酸

在用肌氨酸钠提取苏铁树 cpDNA 的同时加入 RNase A 在20℃保温, 用 RNase A 除去部分 RNA。反应结束后用琼脂糖凝胶电泳分析鉴定 cpDNA 时发现大分子的 cpDNA 都降解成小分子。这个结果提示我们, 苏铁树 cpDNA 分子中也可能含有核糖核苷酸。

我们用 RNase A (加热失活其中可能存在的 DNase)和 KOH 分别处理苏铁树 cpDNA 及 λDNA 的结果如下: 用相同量的 RNase A 和 KOH 对大肠杆菌 λ噬菌体 DNA 和苏铁树 cpDNA 分别保温, 然后样品在0.7%琼脂糖凝胶上电泳, 发现苏铁树 cpDNA 用 RNase A 和 KOH 分别作用后基本降解为小分子, 而 λ噬菌体 DNA 不被降解(图2)。

上述结果说明, 苏铁树 cpDNA 分子中含有的核糖核苷酸分散在 cpDNA 分子中。从电泳结果看, 经碱和 RNase A 水解后, cpDNA 降解为较小的片段, 说明 cpDNA 分子中含有不只一个核糖核苷酸。至于苏铁树 cpDNA 分子中含有多少个核糖核苷酸, 有待进一步研究。

DNA 分子中存在核糖核苷酸的生物学意义现在还不十分清楚。一种可能是在 DNA 复制过程中, DNA 聚合酶识别底物不甚严格而造成的。另一种解释是 cpDNA 分子中的核糖核苷酸可能是在 DNA 复制中引物 RNA 切除不完全而剩下的。应该指出, 目前几乎所有研究过 DNA 复制方式的生物体, 凡 RNA 作引物的, 在正常情况下, RNA 引物的切除都是完全的。从上述情况看, cpDNA

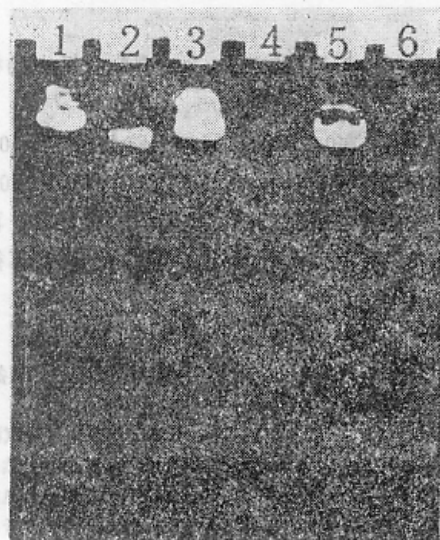


图2 苏铁树 cpDNA 分子中有核糖核苷酸的证据
λ噬菌体 DNA 和苏铁树 cpDNA 分别用 RNase A 和 KOH 在 37℃ 保温 30 分钟。1, 2 分别为 λDNA 和 cpDNA 对照; 3, 4 为 λDNA 和 cpDNA 分别用 10μg 的 RNase A 处理; 5, 6 为 λDNA 和 cpDNA 分别用 0.2mol KOH 处理。反应结束后, 样品在 0.7% 的琼脂糖凝胶上电泳分析(100V, 40mA, 1 小时)。

Fig. 2 Evidence of presence of ribonucleotides in cpDNA molecules of *Cycas revoluta* Thunb.

λphage DNA and *Cycas* cpDNA were treated with KOH or RNase A at 37°C for 30 min. λDNA (lane 1) and *Cycas* cpDNA (lane 2) for control; λDNA (lane 3) and *Cycas* cpDNA (lane 4) were treated with 10μg of RNase A; λDNA (lane 5) and *Cycas* cpDNA (lane 6) were treated with 0.2mol KOH. All samples were analyzed by 0.7% agarose gel at 100V, 40mA for one hour.

分子中核糖核苷酸可能有某些独特的生物功能。苏铁树是一种古老的树种, 有活化石之称, 在它的 cpDNA 分子中含有一些核糖核苷酸可能具有特殊的意义。

主要参考文献

- 1 Bovenberg W A et al. *Nucleic Acids Res*, 1981; 9: 503
- 2 Green B R. *Biochem Biophys Acta*, 1976; 447: 256
- 3 Kelodner R et al. *J Biol Chem*, 1975; 250: 7020
- 4 Miyaki M et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 1973; 50: 252
- 5 Wong-steal F et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 1973; 53: 140