

配制蔗糖梯度溶液,按由高到低的顺序将蔗糖溶液 60% (330 μL), 52% (830 μL), 36% (1 mL), 20% (830 μL), 依次铺入 6 个 5 mL 透明管中,室温放置 1 h,然后将 2 mL 粗制线粒体悬浮液平均铺于斜面上。100 000 g, 4℃ 水平离心 50 min (Beckman SW55)。收集分层于 36% ~ 52% 界面的线粒体,置于冰上,小心滴加 4 倍体积的匀浆缓冲液 (未加巯基乙醇和 BSA),混匀,16 000 g 4℃ 离心 10 min,沉淀即为纯化的线粒体。

1.3 线粒体裂解及 DNA 纯化

线粒体沉淀加入 1 mL 裂解缓冲液 (Tris-HCl 0.05 mol/L, EDTA·Na₂ 0.001 mol/L, pH 8.0) 悬浮沉淀。加蛋白酶 K 至终浓度 0.5 mg/mL, 10% SDS 至终浓度 1%, 摇匀, 37℃ 反应 90 min 裂解线粒体。加入等体积的苯酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1), 缓慢混匀 10 min, 10 000 g 离心 10 min, 使两相分开, 取上层水相, 加入 10 μL 10 mg/mL RNase A, 37℃ 保温 1 h。重复这一步骤。取上层水相, 加水饱和和乙醚至满管, 除去残留的苯酚、氯仿。水相中加入 1/10 体积的 5 mol/L (NH₄)₂ Ac 及 2.5 倍体积的无水乙醇沉淀线粒体 DNA。70% 乙醇浸泡 2 次。自然干燥, 溶于 30 μL TE 溶液中, -20℃ 保存备用。

1.4 荧光素染色

取 2 μL 纯化后的线粒体稀释一定倍数后取少量于 40 倍物镜下观察。其余稀释液加入荧光素 (FDA) 染色, 吸少许滴到载玻片上, 轻覆盖玻片, 置于万能显微镜下进行荧光激发, 观察照相。

1.5 mtDNA 纯度检测

1.5 μg mtDNA, *Eco*RI (MBI 公司生产) 酶切 12 h, 0.8% 琼脂糖凝胶, 1.5 V/cm 电泳 18 h。Southern 印迹参照分子克隆实验手册^[8]。用玉米线粒体探针 *atp6*, 长 2.7 kb; 柑橘叶绿体探针 *rubisco* L, 长 1.3 kb; 柑橘 45 s rRNA, 长 0.7 kb。

1.6 AFLP 分析

*Eco*RI 接头: Ead5 5-CTCGTAGACTGCGTACC, Ead3 5-AATTGGTACGCAGTCTAC;

*Mse*I 接头: Mad5 5-GACGATGAGTCCTGAG, Mad3 5-TACTCAGGACTCAT;

前扩增引物: EA00 5'-GTA GAC TGC GTA CCA ATTC A-3'; MC00 5'-GAC GAT GAG TCC TGA GTAA C-3';

选择性扩增引物: CMC02 5'-GAT GAG TCC TGA GTAA CTA-3'; EA03 5'-GAC TGC GTA CCA ATTC ACG-3'; E01 5'-GAC TGC GTA CCA ATTC AGC-3'; E02 5'-GAC TGC GTA CCA ATTC ACC-3'; E05 5'-GAC TGC GTA CCA ATTC AGG-3';

*Eco*RI 和 *Mse*I 酶切目的基因组 DNA; 常温下连接接头; 将连接产物稀释 10 倍。预扩增反应程序: 94℃ 30 s, 56℃ 1 min, 72℃ 1 min, 20 个循环。然后将预扩增产物稀释 50 倍用于下一轮的扩增模板。选择性扩增 PCR 反应程序: 第一轮循环, 94℃ 30 s, 65℃ 30 s, 72℃ 1 min; 第 2 ~ 13 轮循环, DNA 退火温度每次递减 0.7℃, 其余步骤同第一轮; 第 14 ~ 36 循环, 退火温度 56℃, 其余步骤同第一轮循环。6% 聚丙烯酰胺变性凝胶电泳分离选择性扩增产物后银染显示^[9]。

2 结果与分析

2.1 线粒体活性

40 倍光学显微镜下可观察到椭圆形的线粒体。线粒体荧光素染色后荧光激发呈绿色 (图 1), 说明提纯后的线粒体是完整的, 具有一定的活性。

2.2 柑橘 mtDNA 纯度

琼脂糖凝胶电泳 EB 染色后紫外灯下观察到 20 kb 左右的 mtDNA 带, 所含杂质少, 没有出现降解现象, 说明通过上述提纯方法, 能得到大片段线粒体 DNA 片段。

提取高纯度的 mtDNA 是利用分子手段研究线粒体的前提。利用差速离心去掉核、质体及碎片, 过量的 DNase 处理可以酶切掉破裂的核 DNA、mtDNA、质体 DNA。不连续蔗糖梯度离心对线粒体进一

步纯化, 理论上能完全排除其它基因组 DNA 的污染。利用叶绿体 *rubisco* L、核探针 45 s rRNA 杂交结果 (图 2) 可以看出没有得到相应的杂交带, 而用线粒体探针 *atp6* 杂交得到一条亮带, 说明所提取的 DNA 即为 mtDNA, 且无质体和核 DNA 的污染。

2.3 mtDNA AFLP 扩增

采用 4 对引物组合检测了柑橘品种国庆 1 号和冰糖橙线粒体 DNA 之间的差异, 如图 3 所示, 上述方法所提纯的线粒体 DNA 经 *Eco*RI、*Mse*I 双酶切, 预扩增和选择性扩增, 聚丙烯酰胺凝胶电泳可以得到几十条清晰的亮带。由于植物线粒体基因组小, 大小在 200 ~ 2 000 kb, 扩增得到带的总数远远小于总 DNA 的数目, 在柑橘基因组中可以得到平均 100 条以上的带^[10]。4 对引物共产生 98 个 AFLP 标记, 其中 15 个标记有多态性。引物对 CMC02/EA03、CMC02/E01 以及 CMC02/E05 可以检测出冰糖橙和国庆 1 号线粒体基因组之间比较丰富的差异。国庆 1 号、冰糖橙分属于宽皮柑橘、甜橙两个不同的柑橘种, 尽管柑橘线粒体属母性遗传, 但这也说明柑橘线粒体基因组在进化过程中可能发生了基因重排或突变等现象。



图 1 ‘国庆 1 号’线粒体荧光素 (FDA) 染色
箭头所示为线粒体

Fig. 1 Fluorescent dyeing of ‘Guoqing 1’ mitochondria
The arrow head indicated the mitochondria

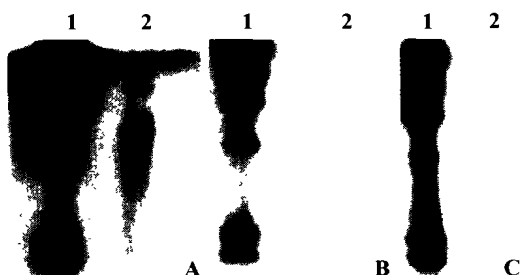


图 2 ‘国庆 1 号’线粒体 DNA 中叶绿体 DNA
和核 DNA 的 Southern 检测

A. 线粒体探针 *atp6*; B. 叶绿体探针 *rubisco* L;
C. 核探针 45 s rRNA;

1. 标准分子量 λ /Hind III; 2. *Eco*RI 酶切的 mtDNA。

Fig. 2 cpDNA and nuclear DNA Southern detection in purified
mitochondrial DNA of ‘Guoqing 1’ satsuma

A. Mitochondrial probe *atp6*; B. Chloroplast probe *rubisco* L;

C. Nuclear probe 45 s rRNA;

1. Standard molecular weight λ /Hind III;

2. *Eco*RI-digested mtDNA.

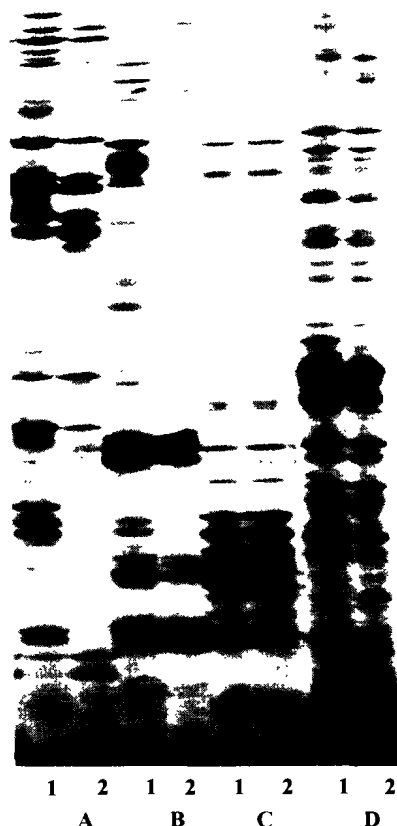


图 3 mtDNA AFLP 分析结果

A, B, C, D 分别为引物对 CMC02/EA03, CMC02/E01,
CMC02/E02, CMC02/E05;

1. 国庆 1 号, 2. 冰糖橙。

Fig. 3 AFLP analysis of mtDNA

Lanes marked A – D are CMC02/EA03, CMC02/E01,
CMC02/E02, CMC02/E05; respectively;

1. ‘Guoqing 1’ satsuma, 2. ‘Bingtang Cheng’
sweet orange respectively.

3 讨论

植物线粒体基因组的结构比较复杂, 存在大量的内含子、重复序列及非编码序列, 不同于动物中只含有调控区和编码序列的线粒体基因组。近年来在玉米、黄瓜等作物线粒体的研究中还发现类质粒的存在^[11]。大多数被子植物线粒体属于母性遗传, 从分子水平上对线粒体进行研究不仅能寻找出不同物种之间的亲源关系, 还可以克隆与自然界某种特异现象有关的线粒体基因, 如玉米胞质雄性不育基因 *orf138*, 柑橘抗黑星病基因 *ACRS*^[12] 等。柑橘等木本植物线粒体基因组的研究较其它农作物起步晚, 进展缓慢, 主要是由于木本植物有性杂交后代繁殖选育以及分离高纯度、足够量的线粒体细胞器等不易, 阻碍了线粒体基因组的研究。无性繁殖的少核、无核木本植物无法通过获得种子培养黄化苗。采用成熟叶片获得的线粒体 DNA 量少, 杂质多, 又极易降解, 用传统的纯化线粒体的方法 CsCl_2 超速离心, 仍然很难避免叶绿体 DNA 的污染^[13]。柑橘果实在发育过程中可以产生未发育的胚珠, 利用诱导未发育胚珠获得的胚性愈伤组织作为提取线粒体的材料, 优点在于可大量获得丰富的幼嫩组织, 不受田间生长的限制, 且能排除叶绿体 DNA 的污染。

线粒体基因是比较保守的, 通常只在基因的 5' 或 3' 侧翼序列表现出异质性^[14], 且由于自身高度重组等特性, 内含子区域变异很大。Xu 等^[15] 认为由于分离线粒体非常困难, 建议用胞质基因特异性探针与总 DNA 进行 RFLP 分析。RFLP 结果虽然可靠, 但能检测的酶切位点有限。Sane 等^[16] 用 16 个线粒体探针没有发现两个包含相同胞质的水稻品系的多态性, 而 40 条 RAPD 引物中的 25 条均检测到了这两个品系的线粒体 DNA 的差异。Jaiswal 等^[17] 对 7 个高粱恢复系的线粒体 DNA RAPD 分析结果表明能够按照恢复系能力的不同区分它们。RAPD 检测效率虽高, 但重复性差, 对后续工作的开展, 如克隆测序等十分不利。本试验采用的 AFLP 技术具有以上两种分子标记的优点。凌杏元等^[18] 将 AFLP 技术应用到水稻线粒体的研究, 从 M/P_A 引物对中筛选到了不育系与保持系差异带 ZA1, ZA2, ZA3, Northern 分析表明 ZA2、ZA3 两片段在不育系、保持系和 F₁ 杂种中的转录有差异^[19]。国庆 1 号与冰糖橙线粒体 DNA 的 AFLP 分析表现出差异, 与电镜观察和限制性内切酶图谱结果是一致的^[20]。

国庆 1 号为雄性不育类型, 多年的杂交、回交试验已证明为细胞质雄性不育^[6]。摸清不同柑橘品种胞质的分子基础, 无疑为利用原生质体融合的方法^[19, 20] 转移胞质创造新的雄性不育种质及寻找新的柑橘胞质类型, 避免单一胞质类型的遗传脆弱性带来曙光, 也为研究柑橘不同属种间 mtDNA 之间的变异和柑橘品种的分子演化研究提供依据。

参考文献:

- 1 Unseld M, Marienfeld J R, Brandt P, et al. The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 336, 924 nucleotides. *Nat. Genet.*, 1997, 15: 57~61
- 2 Sinclair W T, Morman J D, Ennos R A. The postglacial history of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in Western Europe: evidence from mitochondrial DNA variation. *Mol. Ecol.*, 1999, 8: 83~88
- 3 Gugerli F, Sperisen C, Buchler U, et al. Haplotype variation in a mitochondrial tandem repeat of Norway spruce (*Picea abies*) populations suggests a serious founder effect during postglacial re-colonization of the western Alps. *Mol. Ecol.*, 2001, 10: 1255~1263
- 4 Besnard G, Khadari B, Baradat P, et al. Combination of chloroplast and mitochondrial DNA polymorphisms to study cytoplasm genetic differentiation in the olive complex (*Olea europaea* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 2002, 105: 139~144
- 5 Patrick S S, Roger P W. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *Trends in Plant Science*, 1998, 3(5): 175~180
- 6 Yamamoto M, Matsumoto R, Okudai N, et al. Aborted anthers of *Citrus* result from gene-cytoplasmic male sterility. *Scientia Horticulture*, 1997, 70 (1): 9~14
- 7 Mignouna H, Virmani S S, Briguët M. Mitochondrial DNA modifications associated with cytoplasm male-sterility in rice. *Theor. Appl. Genet.*, 1987, 74: 666~669
- 8 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, et al. *Molecular cloning; a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 474~491

- 9 Maheswarax M, Suhudhi P K, Nabdi S, et al. Polymorphism, distribution, and segregation of AFLP markers in a doubled haploid rice population. *Theor. Appl. Genet.*, 1997, 94: 39 ~ 45
- 10 庞晓明. 用分子标记研究柑橘属及其近缘属植物的亲缘关系和种的遗传多样性: [博士学位论文]. 武汉: 华中农业大学, 2002. 28 页
- 11 李俊英, 闻颖达, 张秀明, 等. 黄瓜线粒体 DNA 类质粒 pCI 的性质和核酸序列研究. *遗传学报*, 2000, 27 (10): 911 ~ 917
- 12 Ohtani K, Yamamoto H, Akimitsu K. Sensitivity to *Alternaria alternate* toxin in citrus because of altered mitochondrial RNA processing. *Plant Biology*, 2002, 99 (4): 2439 ~ 2444
- 13 Hanson M R, Boeshore M L, McClean P E, et al. The isolation of mitochondria and mitochondrial DNA. *Methods Enzymol.*, 1986, 118: 437 ~ 453
- 14 Gray M W, Hanic-Joyce P J, Covello P S. Transcription, processing and editing in plant mitochondria. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1992, 43: 145 ~ 175
- 15 Xu Y S, Pehu E. 体细胞杂种的分子鉴定. 见: Clark M S 主编. 顾红雅, 瞿礼嘉译. 植物分子生物学——实验手册. 北京: 高等教育出版社, 1998. 338 ~ 352
- 16 Sane A P, Seth P, Ranade S A, et al. RAPD analysis of isolated mitochondrial DNA reveals heterogeneity in elite *Wild abortive* (WA) cytoplasm in rice. *Theor. Appl. Genet.*, 1997, 95: 1098 ~ 1103
- 17 Jaiswal P, Sane A P, Ranade S A, et al. Mitochondrial and total DNA RAPD patterns can distinguish restorers of CMS lines in sorghum. *Theor. Appl. Genet.*, 1998, 96: 791 ~ 796
- 18 凌杏元, 关和新, 周培疆, 等. AFLP 在水稻线粒体 DNA 研究中的应用. *武汉大学学报 (自然科学版)*, 1999, 45 (4): 477 ~ 479
- 19 凌杏元, 周培疆, 关和新, 等. 运用 AFLP 技术筛选分离野败型水稻 mtDNA 中与雄性不育性状相关的片段. *遗传*, 1999, 21 (2): 33 ~ 36
- 20 Agustin Fontamau, Jose Hernandez-YAGO. Characterization of mitochondrial DNA in *Citrus*. *Plant Physiol.*, 1982, 70: 1678 ~ 1682
- 21 Sigareva M A, Earle E D. Direct transfer of a cold-tolerant *Ogura* male-sterile cytoplasm into cabbage (*Brassica oleracea* ssp. *capitata*) via protoplast fusion. *Theor. Appl. Genet.*, 1997, 94: 213 ~ 220
- 22 Yamamoto T, Nakajima Y, Oeda K. Morphological changes in homeotic cytoplasmic male-sterile carrots combined with fertile cytoplasm by *Asymmetrical* cell fusion. *Plant Cell Reports*, 2000, 19: 363 ~ 370

Obtaining mtDNA of Two Types of *Citrus* and the AFLP Analysis

Cao Qingqin, Yi Hualin, and Deng Xiuxin

(National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, and College of Horticulture and Forestry, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: To study the genetic diversity of mitochondrial genome in *Citrus* and molecular mechanism of cytoplasmic male sterility in Satsuma mandarin (*C. unshiu*), we present a method for isolation of mitochondrial DNA from embryogenic callus of *Citrus*. The results showed that discontinuous sucrose density gradient centrifugation method was effective for purifying mitochondria which possessed fluorescent activity. Southern blotting showed no contamination of cpDNA and nuclear DNA using chloroplast probe *rubisco* L, nuclear probe 45 s rRNA respectively where as a 5 kb size fragment was gained after being hybridized by mitochondrial probe *apt6*. Consequently we acquired high pure, not contaminated big segment of mtDNA. The fragments of polymorphic mtDNA extracted from Guoqing 1 Satsuma mandarin and Bingtang Cheng sweet orange were found by AFLP assay.

Key words: *Citrus*; mtDNA; AFLP (amplified fragment length polymorphism); Hybridization; Extraction