

水稻线粒体基因组水平上的蛋白质 编码基因克隆方法研究

杨晓坡^{1,2}, 刘冰¹, 唐云轩¹, 金雨熙¹, 石珍¹, 杜晓丽¹, 宋丽¹

(1. 赤峰学院 生命科学学院, 内蒙古 赤峰 024000; 2. 山西大学 科学技术哲学研究中心, 山西 太原 003006)

摘要:为探索适用于水稻线粒体基因的克隆方法,以水稻线粒体基因 *ccmB*、*nad9* 为例,分别选用 3 种不同的方法进行克隆。在对水稻线粒体基因组蛋白质编码基因进行比对分析的基础上,探讨了各种克隆方法的优劣及适用范围。结果表明:常规方法适用于Ⅰ类水稻线粒体基因的克隆,RT-PCR 法适用于Ⅱ类水稻线粒体基因的克隆,简易方法只适用于Ⅲ类水稻线粒体基因的克隆。

关键词:水稻;线粒体 DNA;蛋白质编码基因;基因克隆

中图分类号:S511

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2014)12-0009-06

高等植物的线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 有很多独特的性质,诸如生物进化过程中的保守性、较大的基因组 (200 ~ 2 400 kb)、外源 DNA 的插入以及特殊的基因表达模式等。2002 年, Notsu 等测序结果表明,水稻线粒体基因组大小为 490 520 bp, 大部分由非编码的 DNA 序列组成, 同时还包括 3 个 rRNA 基因、17 个 tRNA 基因、5 个 tRNA 假基因、35 个蛋白质编码基因和 19 个 ORF (open reading frame)^[1]。关于水稻 mtDNA 功能的研究主要集中在雄性不育方面, *orfB*、*orf79*、*orfH79* 及 WA352 等基因相继得到克隆及功能鉴定^[2-5]。除此之外,不同水稻品种线粒体基因组的比较研究在进化生物学领域也取得了一定的进展^[6]。但作为一种古老而保守的细胞器,从独特性和复杂性角度考虑,mtDNA 仍有许多问题值得研究。

mtDNA 的提取方法早在 20 世纪中后期便有所涉及, Levings 等提取了玉米的 mtDNA 并用于雄性不育方面的研究^[7]。目前,烟草、棉花、胡萝卜、马铃薯、洋葱、小麦和油菜等植物 mtDNA 提取方法相继发展出来。水稻 mtDNA 的提取大体可以分为 3 种策略:第一种策略应用较为普遍,首先以黄化苗或新鲜叶片等为材料分离得到水稻线粒体,再提取 mtDNA。分离线粒体的过程通常采用差速离心或密度梯度离心方法,提取 mtD-

NA 的过程则运用 CTAB 和 SDS 等方法,提取到的 mtDNA 可用于 RFLP (restriction fragment length polymorphism) 分析、RAPD (random amplified polymorphic DNA) 分析和 Southern 杂交等研究,甚至可以满足线粒体全基因组的测序要求^[8-9]。但是,这种方法实际上回避了水稻线粒体基因组中的内含子序列。如果 mtDNA 的提取是以基因克隆为目的,那么内含子序列的问题就不应该被忽视。第二种策略是通过 RT-PCR 方法,先由 mRNA 反转录得到 cDNA,再扩增得到 mtDNA。这种方法在水稻 mtDNA 的提取上鲜有报道。2002 年, Kuhn 等用 RT-PCR 方法对豌豆线粒体基因 *cox2* 进行了研究^[10]。第三种策略是借鉴近年来比较流行的针对水稻总 DNA 提取的简易方法,直接以水稻叶片、干种子和根为材料,经过简易操作得到水稻总 DNA,以此为模板进行 mtDNA 扩增。这种方法十分经济便捷,但局限性也显而易见^[11]。该文以水稻线粒体基因 *ccmB* 和 *nad9* 为例,分别运用几种不同的方法进行基因克隆。在线粒体基因组水平上,并没有一种方法适用于所有线粒体蛋白质编码基因的克隆。该文研究还将水稻线粒体基因组蛋白质编码基因进行分类,并就不同类别基因的克隆方法进行了讨论。

1 材料与方法

1.1 材料

供试水稻品种为日本晴 (*Oryza sativa* L. Japonic Nippanbare.)。

试验所用试剂包括:RNAiso Plus 试剂盒、Agarose Gel DNA Fragment Recovery 试剂盒、LA Taq DNA Polymerase 和 pMD18-T Vector

收稿日期:2014-05-26

基金项目:内蒙古自治区教育厅高等学校科学研究资助项目(NJSY11219);国家自然科学基金资助项目(31360572)

第一作者简介:杨晓坡(1979-),男,内蒙古自治区赤峰市人,博士,讲师,从事植物基因工程与科技哲学研究。E-mail: yangxp@hotmail.com。

等购自 TaKaRa 生物公司。Quantscript RT 试剂盒和 RNAsafe (RNase Inhibitor) 购自 TIAN-GEN 生物公司。大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购

自博迈德生物公司。引物由 Invitrogen 公司合成。水稻 mtDNA 提取过程中所需的溶液见表 1。

表 1 水稻 mtDNA 提取过程中所需的溶液

Table 1 The buffer solutions required in the process of extracting rice mtDNA

缓冲液 Buffer	成分 Composition
A	50 mmol \cdot L ⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0; 2.5 mmol \cdot L ⁻¹ EDTA; 0.44 mmol \cdot L ⁻¹ Sucrose; 0.15% BSA; 2% β -巯基乙醇; 使用前加入少许 PVP
B	50 mmol \cdot L ⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0; 20 mmol \cdot L ⁻¹ EDTA; 2% β -巯基乙醇
C	10 mmol \cdot L ⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0; 20 mmol \cdot L ⁻¹ EDTA; 0.6 mol \cdot L ⁻¹ Sucrose
D	50 mmol \cdot L ⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0; 10 mmol \cdot L ⁻¹ EDTA
E	50 mmol \cdot L ⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0; 20 mmol \cdot L ⁻¹ EDTA; 1.5% SDS
F	0.1 mol \cdot L ⁻¹ NaOH; 2% Tween20
G	0.1 mol \cdot L ⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0; 2 mmol \cdot L ⁻¹ EDTA

1.2 方法

1.2.1 常规方法克隆水稻线粒体基因 ①水稻线粒体的提取:将水稻种子暗培养 14 d, 取水稻黄化苗 10 g, 加入 100 mL 预冷的缓冲液 A, 研磨并过滤, 滤液在 4℃ 下 14 000 r \cdot min⁻¹ 离心 15 min, 收集沉淀。用 5 mL 预冷的 A 液悬浮沉淀后, 在 4℃ 下 4 200 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min。取上清, 加入 8 mL 预冷的缓冲液 B, 在 4℃ 下 12 000 r \cdot min⁻¹ 离心 15 min, 弃上清。将沉淀悬浮于 8 mL 预冷的缓冲液 A 中, 并加于 5 mL 缓冲液 C 中, 在 4℃ 下 12 000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min。所得沉淀为纯化的水稻线粒体^[12]。②水稻 mtDNA 的提取:将 2.4 mL 缓冲液 D 加入线粒体中, 充分悬浮后加入 1.2 mL 缓冲液 E。在 37℃ 下反应 1 h。加入 3.6 mL 饱和酚摇匀, 缓慢振荡 10 min。在 4℃ 下 10 000 r \cdot min⁻¹ 离心 15 min。吸取上层水相于另一个 10 mL 离心管内, 加入 3.6 mL 酚-氯仿(1:1)溶液中, 轻轻摇匀后, 在 4℃ 下 10 000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min。取上层液体加入 350 μ L 3 mol \cdot L⁻¹ 醋酸钠和 6 mL 75% 乙醇, 在 -20℃ 下放置 1.5 h。在 4℃ 下 12 000 r \cdot min⁻¹ 离心 15 min 后收集沉淀, 用 70% 乙醇洗涤 2 次, 空气干燥 2 h, 此沉淀即为 mtDNA。③目的基因的合成与鉴定:根据 Genebank 公布的水稻线粒体 *ccmB* 和 *nad9* 基因序列设计引物为:

ccmB-F: 5'-GGCGGATCCATGAGACGACTCTTTCTTGAAC 3';
ccmB-R: 5'-GCGTCTAGAAATCTTGTGA ACTAATCGAGACC 3';
nad9-F: 5'-GGCGGATCCAGGATAACCA ATCCATTTTCC 3';
nad9-R: 5'-GCGTCTAGATTATCCGTCGTACGCTGT 3';

20 μ L 反应体系含有模板 mtDNA 3 μ L, 2.5 mmol \cdot L⁻¹ dNTP 0.6 μ L, 10 \times LA *Taq* PCR Buffer(Mg²⁺ Plus) 2 μ L, DMSO 1 μ L, 5 U \cdot μ L⁻¹ TaKaRa LA *Taq* Polymerase 0.3 μ L, 上下游引物各 0.3 μ L, ddH₂O 12.5 μ L。扩增 *ccmB* 基因的 PCR 反应条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 40 s, 58℃ 40 s, 72℃ 45 s, 30 个循环; 72℃ 5 min。扩增 *nad9* 基因的 PCR 反应条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 40 s, 56℃ 40 s, 72℃ 40 s, 30 个循环; 72℃ 5 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测并回收 PCR 产物, 将其与 pMD18-T 载体在 16℃ 下进行连接。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑取阳性克隆 PCR 鉴定, 并送英潍捷基(上海)贸易有限公司测序。

1.2.2 RT-PCR 克隆水稻线粒体基因 ①水稻总 RNA 提取:将水稻种子暗培养 14 d, 取适量叶片置液氮中研磨, 将粉末加到盛有 1 mL RNAiso Plus 的离心管中混匀, 4℃ 静置 15 min, 在 4℃ 下 12 000 r \cdot min⁻¹ 离心 5 min。取上清加入约 200 μ L 氯仿并振荡, 4℃ 静置 5 min, 12 000 r \cdot min⁻¹ 离心 15 min。取上清加入约 500 μ L 异丙醇, 4℃ 静置 10 min, 12 000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min, 弃上清。加入 1 mL 75% 乙醇(RNase Free H₂O 配制)洗涤沉淀, 12 000 r \cdot min⁻¹ 离心 5 min, 沉淀即为水稻黄化苗根部总 RNA。室温干燥沉淀 2~5 min, 加入 2 μ L RNAsafe, 再加入 30 μ L RNase Free H₂O 充分溶解, -80℃ 保存备用。②水稻 cDNA 的合成:合成水稻 cDNA 的 20 μ L 反应体系含有 10 \times RT 2 μ L, 超纯 dNTP(2.5 mmol \cdot L⁻¹) 2 μ L, Random 引物(10 μ mol \cdot L⁻¹) 2 μ L, Quant Reverse Transcriptase 1 μ L, RNase Free H₂O 8 μ L, 模板 RNA 5 μ L。37℃ 孵育 60 min, 所获得产物即为水

稻的 cDNA。③目的基因的合成与鉴定:以水稻 cDNA 为模板合成 *ccmB* 和 *nad9* 基因,PCR 反应程序及鉴定方法同 1.2.1③。

1.2.3 简易方法克隆水稻线粒体基因 取新鲜水稻叶片 10、20 及 40 mg 放入预冷的 PCR 管中,分别加入 100 μ L 缓冲液 F。PCR 仪中 95 $^{\circ}$ C 孵育 15 min,迅速加入等体积的缓冲液 G 并混匀^[11]。取 2 μ L 反应产物直接作为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应程序及鉴定方法同 1.2.1③。

1.2.4 水稻线粒体基因组蛋白质编码基因分析 水稻线粒体基因组中编码序列所占比例为 11.1%,内含子序列占 7.2%,核基因组同源序列占 13.4%,叶绿体基因组同源序列占 6.2%^[1]。以水稻线粒体基因组 35 个蛋白质编码基因和 19 个 ORF 的表达产物序列为基础,运用 TBLASTN 和 Bl2Seq 程序进行内含子分析。以水稻线粒体基因组 35 个蛋白质编码基因和 19 个 ORF 的序列为基础,运用 Bl2Seq 程序,分别将提

取的基因序列与水稻核基因组序列和水稻叶绿体基因组序列进行比对。

2 结果与分析

2.1 水稻目的基因的 PCR 扩增

分别以常规方法、RT-PCR 法和简易方法对目的基因 *ccmB* 进行 PCR 扩增,均获得约为 619 bp 的 DNA 片段(见图 1),符合目的基因的大小。同样以 3 种方法对目的基因 *nad9* 进行 PCR 扩增,均获得约为 573 bp 的 DNA 片段(见图 2),符合目的基因的大小。对 pMD18-T-*ccmB* 和 pMD18-T-*nad9* 载体的测序结果表明,克隆得到的 DNA 序列即为目的片段。简易方法扩增过程中,选用 10、20 和 40 mg 水稻叶片为材料均可得到目的片段。扩增 *ccmB* 基因的结果随水稻叶片用量的增加而呈现出一定的上升趋势,但是水稻叶片的用量对 *nad9* 基因的扩增并没有明显的相关性。考虑到具体操作与结果,简易方法选材以 20 mg 水稻叶片为宜。

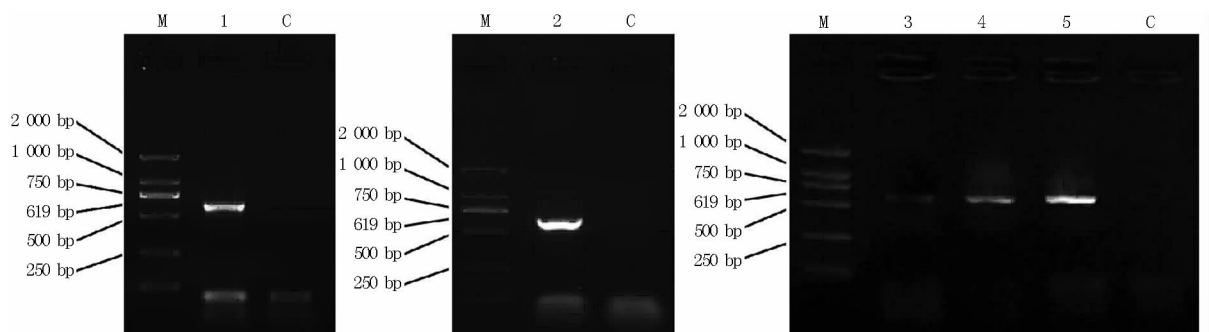


图 1 水稻线粒体 *ccmB* 基因的 PCR 扩增产物

Fig. 1 The PCR products of mitochondrial *ccmB* in rice

M:DL2 000 DNA Marker;1:mtDNA 模板扩增 *ccmB*;2:RT-PCR 扩增 *ccmB*;3~5:10、20、40 mg 叶片模板扩增 *ccmB*;C:PCR 对照。
M:DL2 000 DNA Marker;1:PCR products of *ccmB* by mtDNA;2:PCR products of *ccmB* by RT-PCR;3~5:PCR products of *ccmB* by leaves with 10、20、40 mg;C:CK.

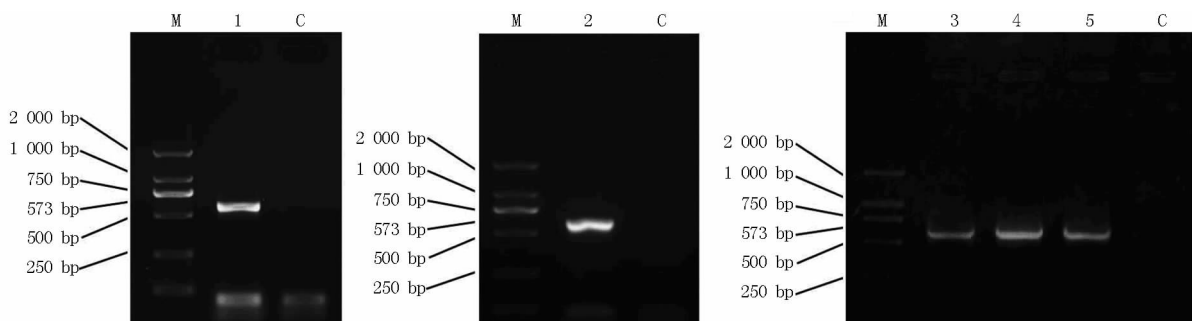


图 2 水稻线粒体 *nad9* 基因的 PCR 扩增产物

Fig. 2 The PCR products of mitochondrial *nad9* in rice

M:DL2 000 DNAMarker;1:mtDNA 模板扩增 *nad9*;2:RT-PCR 扩增 *nad9*;3~5:10、20、40 mg 叶片模板扩增 *nad9*;C:PCR 对照。
M:DL2 000 DNA Marker;1:PCR products of *nad9* by mtDNA;2:PCR products of *nad9* by RT-PCR;3~5:PCR products of *nad9* by leaves with 10、20、40 mg;C:CK.

2.2 水稻线粒体基因组编码序列分析

在水稻线粒体基因组中发现 9 个蛋白质编码基因含有内含子, 36 个蛋白质编码基因或 ORF 含有核基因组同源序列。另外, 在水稻线粒体蛋白质编码基因中未发现叶绿体基因组同源序列(见表 2)。依据序列分析结果, 将 33 个蛋白质

编码基因和 21 个 ORF 分为 3 类: I 类包括 *orf25*、*nad9* 等, 代表不含有内含子序列, 但含有核基因组同源序列; II 类包括 *nad4*、*rps3* 等, 代表含有内含子序列; III 类包括 *cox3*、*ccmB* 等, 代表不含有内含子序列及核基因组同源序列。

表 2 水稻线粒体基因组蛋白质编码基因的基本特征

Table 2 The basic characteristics of protein-coding genes in the rice mitochondrial genome

基因 Gene	基因序列号 Gene ID	内含子 Intron	核基因组同源基因所在染色体 Chromosome including NDNA homologous gene	表达产物 Gene expression product	类别 Classification
<i>nad1</i>	3950704	+	—	NADH dehydrogenase subunit 1	II
<i>cox3</i>	3950764	—	—	cytochrome coxidase subunit 3	III
<i>orf25</i>	3950741	—	chr12	hypothetical protein OrsaiPp03	I
<i>ND5</i>	3950702	+	chr12	NADH dehydrogenase subunit 5	II
<i>ND5</i>	3950703	+	chr12	NADH dehydrogenase subunit 5	II
<i>rps7</i>	3950721	—	chr6, 9, 12	ribosomal protein S7	I
<i>orf490</i>	3950738	—	chr6, 12	hypothetical protein OrsaiPp07	I
<i>orfB</i>	3950751	—	chr12	hypothetical protein OrsaiPp08	I
<i>orf181</i>	3950747	—	chr9, 12	hypothetical protein OrsaiPp09	I
<i>nad6</i>	3950744	—	chr12	NADH dehydrogenase subunit 6	I
<i>ccmC</i>	3950748	—	chr12	cytochrome c biogenesis C	I
<i>orf183</i>	3950694	—	chr12	hypothetical protein OrsaiPp12	I
<i>orfX</i>	3950687	—	chr12	hypothetical protein OrsaiPp13	I
<i>nad7</i>	3950739	—	chr12	NADH dehydrogenase subunit 7	I
<i>orf152a</i>	3950716	—	chr12	hypothetical protein OrsaiPp15	I
<i>orf288</i>	3950735	—	—	hypothetical protein 1OrsaiPp16	III
<i>orf194</i>	3950720	—	chr12	hypothetical protein OrsaiPp17	I
<i>rps3</i>	3950684	+	chr12	ribosomal protein S3	II
<i>rpl16</i>	3950722	—	chr12	ribosomal protein L16	I
<i>nad3</i>	3950689	—	chr12	NADH dehydrogenase subunit 3	I
<i>rps12</i>	3950682	—	chr12	ribosomal protein S12	I
<i>orf224</i>	3950679	—	chr12	hypothetical protein OrsaiPp22	I
<i>rps2</i>	3950685	—	chr12	ribosomal protein S2	I
<i>nad4</i>	3950734	+	chr6, 12	NADH dehydrogenase subunit 4	II
<i>cox2</i>	3950718	+	—	cytochrome c oxidase subunit 2	II
<i>orf161</i>	3950696	—	chr12	hypothetical protein OrsaiPp26	I
<i>orf187</i>	3950717	—	chr3, 4, 9, 12	hypothetical protein OrsaiPp27	I
<i>atp6</i>	3950762	—	chr1	ATP synthase F0 subunit 6	I
<i>orf153</i>	3950750	—	—	hypothetical protein OrsaiPp29	III
<i>rps13</i>	3950763	—	—	ribosomal protein S13	III
<i>rps4</i>	3950742	—	—	ribosomal protein S4	III

续表 2
Continuing Table 2

基因 Gene	基因序列号 Gene ID	内含子 Intron	核基因组同源基因所在染色体 Chromosome including NDNA homologous gene	表达产物 Gene expression product	类别 Classification
<i>orf176</i>	3950719	—	chr12	hypothetical protein OrsaiPp33	I
<i>atp9</i>	3950695	—	chr12	ATP synthase F0 subunit 9	I
<i>orf152b</i>	3950715	—	chr9,12	hypothetical protein OrsaiPp35	I
<i>rpl2</i>	3950683	+	—	ribosomal protein L2	II
<i>rps19</i>	3950746	—	—	ribosomal protein S19	III
<i>nad4L</i>	3950693	—	—	NADH dehydrogenase subunit4L	III
<i>orf241</i>	3950686	—	—	hypothetical protein OrsaiPp39	III
<i>cob</i>	3950681	—	—	apocytochrome b	III
<i>mat-r</i>	3950675	—	—	maturase-related protein	III
<i>rps1</i>	3950690	—	—	ribosomal protein S1	III
<i>ccmFn</i>	3950740	—	—	cytochrome c biogenesis Fn	III
<i>ccmFc</i>	3950691	+	—	cytochrome c biogenesis Fc	II
<i>orf165</i>	3950749	—	chr9,12	hypothetical protein OrsaiPp45	I
<i>orf284</i>	3950688	—	chr9,12	hypothetical protein OrsaiPp46	I
<i>cox1</i>	3950761	—	chr9,12	cytochrome c oxidase subunit 1	I
<i>rpl5</i>	3950714	—	chr9	ribosomal protein L7	I
<i>orf173</i>	3950737	—	chr1,3	hypothetical protein OrsaiPp50	I
<i>orf162</i>	3950736	—	chr1,12	hypothetical protein OrsaiPp51	I
<i>ccmB</i>	3950692	—	—	cytochrome c biogenesis B	III
<i>orf160</i>	3950680	—	chr9	hypothetical protein OrsaiPp53	I
<i>nad2</i>	3950765	+	—	NADH dehydrogenase subunit 2	II
<i>atp1</i>	3950678	—	chr9	ATP synthase F0 subunit 1	I
<i>nad9</i>	3950743	—	chr1	NADH dehydrogenase subunit 9	I

3 结论与讨论

水稻线粒体蛋白质编码基因克隆方法的研究,应充分考虑不同序列的特性与差异。在诸多影响因素中,内含子、核基因组同源序列和叶绿体基因组同源序列是基因克隆所需关注的首要问题。以往很多线粒体基因克隆的方法(常规方法)并不考虑内含子的问题,而是直接把线粒体基因组等同于细菌的基因组,这种方法的依据是线粒体进化理论中的内共生起源学说(endosymbiosis theory)。该学说指出,线粒体是好氧细菌被原核生物吞噬后,通过共生关系而逐渐形成的一种细胞器^[13]。从细胞器起源的角度分析,线粒体基因组的结构总体上类似于细菌基因组,因此线粒体基因组中似乎也不应该存在内含子。然而,在漫

长的共生过程中,线粒体基因组与细胞核基因组发生了大量的序列交换。线粒体基因组的大多数蛋白质编码基因都被转移到细胞核基因组中。与此同时,源于细胞核基因组中的内含子也被交换到线粒体基因组中。该文结果表明,在水稻线粒体基因组中发现 9 个蛋白质编码基因(II 类)含有内含子。常规的克隆方法并不可以去除内含子的干扰,只有 RT-PCR 法才能适用于此类基因。

水稻线粒体基因组中与核基因组同源的序列占 13.4%,该研究表明,水稻线粒体蛋白质编码基因中的核基因组同源序列至少来自 6 条染色体,其中以 12 号染色体所占比例最大,这也为进化生物学的研究提供了佐证。I 类基因不含有内含子序列,但含有细胞核基因组同源序列,所以在基因克隆时应关注细胞核基因组同源序列的干

扰。先将线粒体提取出来,再进行 mtDNA 提取即可有效避免上述序列的干扰。必要时,可以加入适量 DNase I 进一步降解细胞核 DNA。Ⅲ类基因既不含有内含子序列,也不含有细胞核基因组同源序列,所以对于这 13 个基因的克隆可以采用最为便捷的简易方法。水稻线粒体基因组中含有 6.2% 叶绿体基因组同源序列,常规方法为了排除叶绿体基因组同源序列的干扰,通常选用水稻黄化苗为材料进行克隆。该研究表明,水稻线粒体基因组中与叶绿体基因组同源的序列并不包括蛋白质编码基因,所以在克隆过程中无需考虑叶绿体 DNA 的干扰。

综上所述,Ⅰ类、Ⅱ类、Ⅲ类水稻线粒体基因序列的克隆分别对应 3 类方法。由于水稻线粒体蛋白质编码基因的重要功能以及在进化上的独特地位,越来越多的此类基因将会被鉴定出来。该文分析了不同类别水稻线粒体蛋白质编码基因的克隆方法,为此类基因在细胞器基因组层面的研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Notsu Y, Masood S, Nishikawa T, et al. The complete sequence of the rice (*Oryza sativa* L.) mitochondrial genome; frequent DNA sequence acquisition and loss during the evolution of flowering plants[J]. *Mol Genet Genomics*, 2002, 268:434-445.
- [2] Das S, Sen S, Chakraborty A, et al. An unedited 1.1 kb mitochondrial *orfB* gene transcript in the Wild Abortive Cytoplasmic Male Sterility (WA-CMS) system of *Oryza sativa* L. subsp. *Indica*[J]. *BMC Plant Biology*, 2010, 10:39.
- [3] Wang Z H, Zou Y J, Li X, et al. Cytoplasmic Male Sterility of Rice with Boro II Cytoplasm Is Caused by a Cytotoxic Peptide and Is Restored by Two Related PPR Motif Genes via Distinct Modes of mRNA Silencing[J]. *The Plant Cell*, 2006, 18(3):676-687.
- [4] Hu J, Huang W C, Huang Q, et al. The mechanism of *OR-FH79* suppression with the artificial restorer fertility gene *Mt-GRP162*[J]. *New Phytologist*, 2013, 199(1):52-58.
- [5] Luo D P, Xu H, Liu Z L, et al. A detrimental mitochondrial-nuclear interaction causes cytoplasmic male sterility in rice[J]. *Nature Genetics*, 2013, 45(5):573-577.
- [6] Tian X J, Zheng J, Hu S N, et al. The Rice Mitochondrial Genomes and Their Variations[J]. *Plant Physiology*, 2006, 140:401-410.
- [7] Levings C S, Pring D R. Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA from normal and Texas cytoplasmic male-sterile maize[J]. *Science*, 1976, 193:158.
- [8] 裴得胜, 蔡平钟, 李名扬, 等. 提取水稻线粒体 DNA 的一种简易方法[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2002, 39(4):18-20.
- [9] 万雯婷, 董扬, 于洋, 等. 一种改良的水稻细胞质基因组制备方法[J]. *云南农业大学学报*, 2011, 26(4):437-443.
- [10] Kuhn J, Binder S. RT-PCR analysis of 5' to 3'-end-ligated mRNAs identifies the extremities of *cox2* transcripts in pea mitochondria [J]. *Nucleic acids research*, 2002, 30(2):439-446.
- [11] 赵国珍, 贾育林, 严宗卜, 等. 一种高效便捷的水稻 DNA 提取法及其应用[J]. *中国水稻科学*, 2012, 26(4):495-499.
- [12] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8(19):4321-4326.
- [13] Sagan L. On the origin of mitosing cells[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 1967, 14(3):225-274.

Genome-Wide Cloning of Protein-Coding Genes in the Rice Mitochondrial Genome

YANG Xiao-po^{1,2}, LIU Bing¹, TANG Yun-xuan¹, JIN Yu-xi¹, SHI Zhen¹, DU Xiao-li¹, SONG Li¹

(1. School of Life Science, Chifeng University, Chifeng, Inner Mongolia 024000; 2. Research Center for Philosophy of Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan, Shanxi 030006)

Abstract: In order to explore cloning method suitable for the mitochondrial gene, taking rice mitochondrial gene *ccmB* and *nad9* which are protein-coding genes as example, several methods were used for cloning. The results showed that the application scopes of different methods were discussed based on sequence analysis of mitochondrial protein-coding genes. The conventional method, RT-PCR method and the simple method were suitable for I, II and III genes respectively.

Key words: rice; mitochondrial DNA/mtDNA; protein-coding gene; gene cloning

(该文作者还有申玉华, 单位同第二作者)