

研究报告

# 蚕豆叶绿体 DNA BamH I 克隆库的 构建及含 16S—23S rRNA 基因克隆的分析

李加\* 汪训明 唐愨\* 何国顺

(复旦大学遗传学研究所, 上海)

蚕豆叶绿体 DNA (ct-DNA) 经 BamH I 酶切产生 26 个片段, 最大的为 14.00kb, 最小的为 0.42kb。本文以 pBR322 为载体, *E. coli* HB101 为受体菌, 采用标准分子克隆法构建了蚕豆 ct-DNA BamH I 克隆库, 并从库中分离得到含叶绿体 rRNA 基因的克隆。

<sup>32</sup>P 标记的 *E. coli* 16S、23S rRNA 能和蚕豆 ct-DNA BamH I 第 6 (B<sub>6</sub>, 5.65kb) 和第 9 (B<sub>9</sub>, 4.70kb) 个片段杂交, 含有这二个片段的克隆分别命名为 pVFB32 和 pVFB16。利用几种限制性内切酶酶切和 Southern 印迹法构建了 pVFB16 的物理图谱。

pVFB16 电镜下观察到有一变性环 (A-T 丰富区), 经 Hind III 酶切, 电镜观察定位此 A-T 丰富区位于 16S 和 23S rRNA 基因的间隔顺序内, 推测该环可能与 DNA 复制有关。

**关键词** 叶绿体 DNA; 克隆库; rRNA 基因; 蚕豆

叶绿体是植物进行光能转化的细胞器, 具有遗传自主性, 其 DNA 编码一系列重要核基因不编码的性状, 例如光合作用中固定 CO<sub>2</sub> 的 RuBPCase 大亚基, 并且与植物的雄性不育有关<sup>[1]</sup>, 是染色体外遗传研究的主要对象之一, 因此对 ct-DNA 的研究具有一定的理论和实际意义。

蚕豆 ct-DNA 与大多数高等植物的 ct-DNA 不同, 它不象后者那样具有二个反向重复区和相应的二套 rRNA 基因<sup>[2]</sup>, 相反, 它不含有反向重复区, 只具有一套 rRNA 基因<sup>[3]</sup>。与那些具有反向重复顺序的叶绿体基因组相比, 它们的基因组较小。目前尚未确定较小的叶绿体基因组是否比较大的叶绿体基因组编码的遗传信息少。因此, 对这两类不同的 ct-DNA 作出比较, 并研究其编码能力和基因的结构与功能间的差异是很有意义的。ct-DNA 克

隆库的构建为这一研究提供了方便。

近年来, 人们先后对烟草<sup>[4,5]</sup>、绿豆<sup>[6,7]</sup>、豌豆<sup>[7,8]</sup>、菠菜<sup>[7,9]</sup>、油菜<sup>[10]</sup> 等的 ct-DNA 限制性酶切片段进行了克隆和研究。有关蚕豆 ct-DNA 的物理图谱<sup>[3,11,12]</sup>、基因定位<sup>[13-16]</sup>、基因克隆<sup>[11,17]</sup>、顺序测定<sup>[18,19]</sup> 方面的工作国外均有报道, 但迄今尚未见蚕豆 ct-DNA BamH I 克隆库的构建及 rRNA 基因中 Xba I、Bgl II、EcoR V 位点位置的报道。

本文报道以 pBR322 为载体, *E. coli* HB101 为受体菌, 构建成蚕豆 ct-DNA BamH I 克隆库, 并从中分离得到含 rRNA 基因的克隆。同时对携带有 16S rRNA 基

本文于 1986 年 8 月 28 日收到。

\* 杭州大学生物系生化教研室。

本实验曾受到复旦大学遗传学所电镜室刘玉顺老师, 三室王琪等同志的帮助, 特此致谢。

因、16S—23S rRNA 基因间隔顺序, 部分23S rRNA 基因的重组质粒作了物理图谱, 并进行了电镜观察分析。

## 材 料 和 方 法

### (一) ct-DNA 的制备

本实验所用蚕豆种子 (*Vicia faba* 启新1号) 由江苏省启东农科所提供。ct-DNA 的提取按 Kenton Ko 等的方法<sup>[11]</sup> 进行。所得 ct-DNA 溶于 TE 缓冲液 (10mM Tris 1mM EDTA, pH8.0)。

### (二) 载体 pBR322 DNA 的制备

用碱变性法<sup>[20]</sup> 提取 pBR 322 DNA, 然后用氯化铯-溴化乙锭密度梯度离心法进一步纯化<sup>[21]</sup>。

### (三) 限制性酶切和凝胶电泳

实验用酶均为 New England Biolab 公司产品, 并按其说明进行酶解反应。双酶解反应均在盐浓度较低的缓冲液中进行。酶解 DNA 在 0.7% 琼脂糖平板胶上电泳, 6V/cm 15min, 4V/cm 5h。电泳结束后, 凝胶在 1 $\mu$ g/ml 的 EtBr 染色液中染色 0.5h, U.V. 透射灯下观察照相, “岛津” CS 610 薄层扫描仪扫描估量。

### (四) ct-DNA 在 *E. coli* 中的克隆

采用鸟枪法对 ct-DNA 进行克隆。将分别用 BamH I 酶切的 5 $\mu$ g 蚕豆 ct-DNA 和 1 $\mu$ g pBR322 DNA 置于 30 $\mu$ l 连接反应液中, 并加入 1 $\mu$ l T4 DNA 连接酶 (400u/ $\mu$ l), 15 $^{\circ}$ C 5h 后再加 90 $\mu$ l 连接反应液 (不含连接酶), 继续反应过夜, 连接液对 *E. coli* HB101 的转化按 Mandel 和 Higa 等<sup>[22]</sup> 的方法进行。转化液涂布于含 50 $\mu$ g/ml 氨苄青霉素 (Ap) 的 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养使其长出菌落。然后应用 Ap 平板和四环素平板 (Tc 平板), 筛选出重组子 (Ap<sup>r</sup> Tc<sup>s</sup>), 并进行编号。按 Barnes 的

方法<sup>[23]</sup> 对重组子进行快速抽提, 电泳检测, 参照电泳结果, 用碱变性法提取大小不同的重组质粒, 分别用 BamH I 对其进行酶切, 然后和经同样酶切的 ct-DNA 进行电泳比较。

### (五) 特定 ct-DNA 片段在 *E. coli* 中的克隆

ct-DNA 用 BamH I 酶切后, 在 0.7% 低熔点琼脂糖 (Sigma 公司产品) 凝胶上电泳。从凝胶上切下所需片段, 65 $^{\circ}$ C 10min 保温后, 用等体积的酚、氯仿-异戊醇 (1:1) 抽提, 水相液用两倍酒精沉淀回收所需片段。将纯化的 ct-DNA 片段和经 BamH I 酶切的 pBR322 DNA 连接, 然后转化 *E. coli* HB101。

### (六) rRNA 探针的制备和 Southern 印迹法

探针为 *E. coli* 16S、23S rRNA (New England Biolab 公司产品)。按 Maxam 和 Gilbert 的方法<sup>[24]</sup>, 用  $\gamma$ -<sup>32</sup>P ATP (Amersham Corp) 对探针进行末端标记。DNA 片段转移至硝酸纤维素滤膜上以及和探针的分子杂交, 按 Southern 的方法<sup>[25]</sup> 进行。

### (七) pVFB16 DNA 的电镜观察分析

pVFB16 DNA 用甲酰胺铺展法进行电镜制样<sup>[26]</sup>。铺展溶液含有, 0.5 $\mu$ g/ml DNA, 50% 甲酰胺, 0.1M Tris-HCl (pH8.5), 10mM Na<sub>2</sub>EDTA, 0.05mg/ml 细胞色素 C。下相液含有 20% 甲酰胺, 0.01M Tris-HCl (pH8.5), 1mM EDTA。蘸有样品的铜网在 0.1% PTA (磷钨酸) 中染色 8 秒, 然后置于 90% 乙醇中漂洗 10 秒。空气中干燥后用钨-铍合金投影。电镜下 (日立 H500H 型) 放大 10000 或 20000 倍观察并照相, 电镜底片经放大 7 倍描绘其图形, 用五一式指北针中的里程表测量长度。

## 结果和讨论

### (一) ct-DNA的限制酶分析

蚕豆ct-DNA经BamH I、Hind III、Sal I、Pst I、Xho I 酶切所呈电泳带型见图版 I-1。它们分别把ct-DNA切成26、21、6、11、12个片段,分别用B<sub>1-26</sub>, H<sub>1-21</sub>, S<sub>1-6</sub>, P<sub>1-11</sub>, X<sub>1-12</sub>表示。由EtBr染色后的区带相对亮度或U.V.扫描结果判断,B<sub>7</sub>, B<sub>11</sub>, B<sub>19</sub>, B<sub>22</sub>, B<sub>23</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>11</sub>, H<sub>12</sub>, H<sub>13</sub>, H<sub>18</sub>, S<sub>1</sub>, S<sub>3</sub>, X<sub>10</sub>各含有2倍量的DNA, B<sub>18</sub>则含有3倍量的DNA。根据蚕豆ct-DNA不含反向重复序列可以推断:这些片段可能为迁移率相同或相近的不同片段。用λ-DNA Hind III和φX174 DNA Hae III酶切片段作为分子量标准,根据各片段的电泳迁移率,测量出它们的大小。测得整个ct-DNA分子的平均大小为121.7kb,与Kenton Ko所报道的122.91 kb接近。

### (二) ct-DNA 克隆库的构建

限制性核酸内切酶BamH I在pBR322的四环素抗性基因内只有一个切点<sup>[27]</sup>,用BamH I酶切蚕豆ct-DNA产生的片段,最大的为14.00kb,最小的为0.42kb,正好都在易于克隆进pBR322的大小范围内,故我们选用它来构建蚕豆ct-DNA克隆库。

经BamH I酶切的ct-DNA和pBR322,用T4-DNA连接酶连接后,转化*E. coli* HB101。先在Ap平板上选择转化子,然后筛选出Ap<sup>r</sup>Tc<sup>s</sup>重组子。我们从700个转化子中得到71个重组子。分别对71个重组子进行快速抽提检测。

根据电泳结果,提取出大小不同的重组质粒,用BamH I酶切,然后和经同样酶处理的ct-DNA同时电泳比较(图版

表1 蚕豆叶绿体DNA BamH I 克隆库  
Table 1 *Vicia faba* chloroplast DNA clone bank

pBR322 Clone designation	BamH I Fragment cloned
pVFB1	1
pVFB59	2, 15, 23
pVFB46	3, 19
pVFB26	4, 22
pVFB4	5, 7
pVFB32	6
pVFB12	8
pVFB16	9
pVFB5	10
pVFB33	11
pVFB43	12
pVFB42	13
pVFB20	14
pVFB15	15
pVFB24	16
pVFB63	17
pVFB66	18, 19
pVFB7	20
pVFB14	21
pVFB13	24
pVFB67	25
pVFB35	26

I-2)。大多数ct-DNA BamH I片段(21/26)已被克隆进*E. coli* HB101。为了快速而有效地得到含有另外5个片段的克隆,我们从低熔点琼脂糖凝胶上直接回收这5个片段,然后和脱磷的pBR322进行连接,分别转化*E. coli* HB101。这样,我们得到了蚕豆ct-DNA BamH I的26个片段的克隆库(表1)。从图版 I-2和表1可以看出,有的克隆可同时含有2个甚至3个ct-DNA插入片段。

蚕豆叶绿体基因组的所有部分已被克隆这个事实说明,此ct-DNA不含有在克隆豌豆叶绿体基因组中遇到并干涉克隆过程的特定序列<sup>[7]</sup>。最近, Kenton Ko等<sup>[11]</sup>报道了蚕豆ct-DNA Pst I克隆库的构建,但由于Pst I产生的ct-DNA片段较大,较难克隆,故他们借助于EcoR I

部分酶切ct-DNA的Pst I 大片段和构建一个 ct-DNA Sal I 片段的部分克隆库才得以构成完整的克隆库。

**(三) ct-DNA 16S-23S rRNA 基因的定位**

以<sup>32</sup>P标记的*E. coli* 16S、23S rRNA 为探针，与转移至硝酸纤维素滤膜上的蚕豆ct-DNA BamH I 片段和Pst I 片段进行杂交。杂交结果见图版 I -4。rRNA 专一地与B<sub>0</sub>、B<sub>1</sub>和P<sub>3</sub>杂交。B<sub>0</sub>与B<sub>1</sub>的大小分别为 5.65kb 和 4.70kb，P<sub>3</sub>的大小为 15.8kb。分别含有B<sub>0</sub>和 B<sub>1</sub>的克隆亦已从克隆库中分离得到，它们是 pVFB32 和 pVFB16，并通过和<sup>32</sup>P标记的rRNA 探针杂交而得到进一步证实（结果未列出）。

**(四) pVFB16物理图谱的构建**

为了了解pVFB16所含ct-DNA片段的特性，我们用 BamH I、Pst I、Sal I、EcoR I、Hind III、Kpn I、Sma I、Bgl II、Pvu II、Xho I、Xba I 和 EcoRV 对其进行单酶切或双酶切，酶切产物在 0.7% 琼脂糖凝胶电泳上分析（图版 I -3），然后转移到硝酸纤维素滤膜上与rRNA 探针杂交（结果未列出）。用λ-DNA Hind III 和 φX174 DNA Hae III 片段作为分子量标准，测量出各单酶切或双酶切片段的 大小，总结于表 2。参照pBR322已知切点，从上述结果可推出 pVFB16 DNA 的物理图谱（图 1）。

如图 1 所示，pVFB16含有一个4.70kb

表 2 pVFB16 DNA 的限制性酶切片段  
Table 2 Restriction fragments of pVFB16 DNA produced by cleavage with various restriction endonucleases

酶 Enzymes	分子量 Molecular weights (kb)					Sum
	片段 Fragments					
EcoR I	5.00		3.63	0.43		9.06
EcoR I + BamH I	3.98	1.01	3.63	0.38	0.06	9.06
EcoR I + Sal I	3.71	1.28	3.04	0.59	0.43	9.05
EcoR I + Pst I	4.24	0.75	3.22	0.41	0.43	9.05
Sal I	4.74		4.32			9.06
Sal I + BamH I	4.09	0.65	4.05	0.27		9.06
Pst I	7.46		1.60			9.06
Pst I + BamH I	4.23	3.23	1.12	0.47		9.05
BamH I	4.70		4.36			9.06
EcoRV	7.26		1.00	0.81		9.07
EcoRV + BamH I	4.18	3.08	1.00	0.62	0.19	9.07
Pvu II	3.90		3.87	1.29		9.06
Pvu II + Hind III	3.90		2.33	1.54	1.29	9.06
Hind III	9.06					9.06
Xba I	9.06					9.06
Hind III + Xba I	6.46	2.60				9.06
Xho I	9.06					9.06
Xho I + Hind III	4.55	4.51				9.06
Xho I + BamH I	4.36	4.20	0.50			9.06
Bgl II	9.06					9.06
Bgl II + Xho I	6.19	2.87				9.06
Sma I	9.06					9.06
Sma I + Sal I	4.74	3.05	1.28			9.07
Sma I + BamH I	4.36	3.70	1.0			9.06

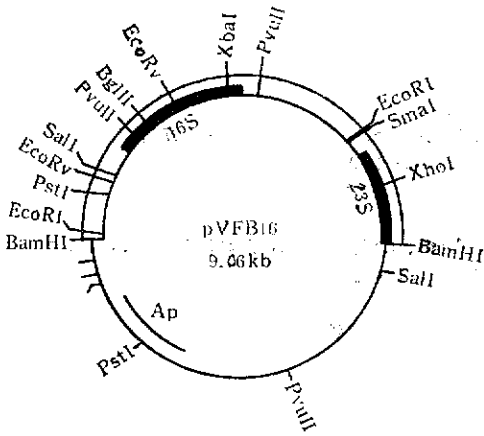


图1 pVFB16 DNA 的物理图谱

Fig. 1 Physical map of pVFB16 DNA

双线为叶绿体 DNA 部分，实线部分为 rRNA 基因的大致范围，单线为 pBR322  
Double line: chloroplast DNA, solid area: approximate rRNA gene region, single line: pBR322 sequence

的 ct-DNA BamH I 片段，在此片段内，Hind III, Kpn I 无切点，Pst I、Sal I、Sma I、Bgl II、Xho I、Xba I 各有一个切点，EcoR I、Pvu II、EcoR V 各有二个切点。根据杂交结果并参照文献报道<sup>[13,17]</sup>，插入的 4.70kb 片段中含有完整的 16S rRNA 基因，16S 和 23S rRNA 基因间隔顺序以及一小部份 23S rRNA 基因。同时，参照 Sugiura, M<sup>[16]</sup>、Bowman 和 Dyer<sup>[21]</sup> 等的报道，我们还可推测出 pVFB32 含有大部份 23S rRNA 基因及完整的 4.5S、5S rRNA 基因。

把 pVFB16 的物理图谱和已报道<sup>[17]</sup> 的蚕豆 rRNA 基因的物理图谱进行比较，发现两者在 BamH I、EcoR I、Xho I 切点位置以及 16S rRNA 基因位置上略有差异。这种差异原因可能有二种，一是由于定位时取向所造成，已报道的 16S rRNA 基因在 ct-DNA EcoR I 3.5kb 片段上的位置尚需用 Pvu II 和 EcoR I 双酶切来确定；另一可能是由材料的品种差异引起的。Palmer 等人<sup>[12]</sup> 认为，反向重复顺序

的存在对叶绿体基因组具有稳定作用，缺少反向重复顺序的叶绿体基因组发生重排的频率比较高，故不同品种间易产生差异。

(五) pVFB16 DNA 的电镜观察分析

pVFB16 DNA 通过甲酰胺铺展法进行电镜制样。电镜下观察时发现有一部分 pVFB16 DNA 具有一变性环 (Denaturation-loop)，即 A-T 丰富区 (图版 2-b)。为了确定该环的位置，我们用 Hind III 酶切此质粒，使其变成线状，然后用同样方法展开，电镜下观察照相 (图版 2-c)。测量 DNA 一端到另一端的距离，线性分子一端到变性环的距离为  $2.73 \pm 0.32\text{kb}$  ( $n=9$ ) (图 2)，变性环的大小为  $0.34 \pm 0.01\text{kb}$  ( $n=9$ )，从而定位此变性环位于 16S 和 23S rRNA 基因的间隔顺序内 (图 1)。最近，Takashi Yamada 等<sup>[28]</sup> 报道了小球藻 (Chlorella) ct-DNA 11kb Sst I 片段 (位于反向重复顺序内) 含有一复制环 (Displacement-loop) 结构。另外，Wang, X.M. 等<sup>[29]</sup> 报道了衣藻的 ct-DNA 在电镜下观察到复制环，并对此环在 ct-DNA 上进行了定位及克隆，并发现含此段复制区的次克隆也易产生变性环。故我们发现的这一变性环推测可能与 DNA 复制有关。对这一重组质粒的进一步研究正在进行之中。

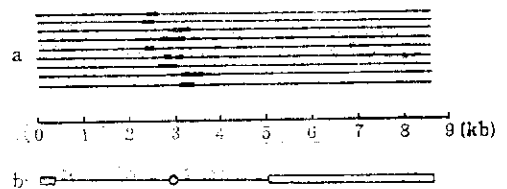


图2 线状 pVFB16 DNA 变性环位置图

Fig. 2 Map of linear pVFB16 DNA showing the position of denaturation loop

a. 一变性环 Loop  
b. -o- 变性环 Loop  
— 叶绿体 DNA 插入片段 ct DNA insert  
□ pBR322 DNA

## 参 考 文 献

- [1] 李融耕, 遗传, 6(6): 41—44, 1984.
- [2] Bedbrook, J.R. and Kolodner, R., *Ann.Rev.Plant Physiol.*, 30:593—620, 1979.
- [3] Koller, B. and Delius, H., *Mol. Gen. Genet.*, 178:261—269, 1980.
- [4] Zhu, Y.S. et al., *Ibid.*, 187:61—66, 1982.
- [5] Fluhr, R. et al., *Gene*, 25:271—280, 1983.
- [6] Palmer, J.D. and Thompson, W.F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 78:5535—5537, 1981.
- [7] Palmer, J.D. and Thompson, W.F., *Gene*, 15:21—26, 1981.
- [8] Chu, N.M. et al., *Plasmid*, 6:279—292, 1982.
- [9] Erion, J.L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 78:3459—3463, 1981.
- [10] 高家国等, 遗传学报, 14(1): 12—18, 1987.
- [11] Kenton, Ko. et al., *Curr. Genet.*, 7:255—263, 1983.
- [12] Palmer, J.D. and Thompson, W.F., *Cell*, 29:537—550, 1982.
- [13] Kenton, Ko. et al., *Curr. Genet.*, 8:359—367, 1984.
- [14] Mubumbila, M. et al., *Ibid.*, 8:379—385, 1984.
- [15] Sugiura, M. et al., *Ibid.*, 2:95—96, 1980.
- [16] Shinozaki, K. et al., *Mol. Gen. Genet.*, 197:363—367, 1984.
- [17] Chong-Rong Sun, et al., *Jpn. J. Genet.*, 57:397—402, 1982.
- [18] Bonnard, G. et al., *Curr. Genet.*, 9:417—422, 1985.
- [19] Kuntz, M. et al., *Nucl. Acids Res.*, 12:5037—5047, 1984.
- [20] Birnboim, H.C. and Doly, J., *Ibid.*, 7:1513—1523, 1979.
- [21] Bowman, C.M. and Dyer, T.A., *Biochem. J.*, 183:605—613, 1979.
- [22] Mandel, M. and Higa, A., *J. Mol. Biol.*, 53:154—162, 1970.
- [23] Barnes, W.M., *Science*, 195:393—394, 1977.
- [24] Maxam, A.M. and Gilbert, W., *Method in Enzymology*, Vol. 100, editor by Ray Wu and Lawrence Grossman, pp. 499—560, 1983.
- [25] Southern, E.M., *J. Mol. Biol.*, 98:503—517, 1975.
- [26] 龚启薰, 细胞生物学杂志, 3:503—517, 1981.
- [27] Bolivar, F. et al., *Gene*, 2:95—113, 1977.
- [28] Takashi Yamada, et al., *Plant Mol. Biol.*, 6:245—252, 1986.
- [29] Wang, X.M. et al., *Nuc. Acids Res.*, 12:3857—3872, 1984.

## CONSTRUCTION OF CLONE BANK OF *VICIA FABA* CHLOROPLAST DNA BamH I FRAGMENTS AND ANALYSIS OF CLONE CONTAINING 16S—23S rRNA GENES

Li Jia\*      Wang Xunming      Tang Su\*      He Guoshun

(Institute of Genetics Fudan university, Shanghai)

Chloroplast DNA of *Vicia faba* was digested into 26 fragments with BamH I, the largest is 14.00kb, the smallest is 0.42kb. The clone bank of *Vicia faba* ct-DNA BamH I fragments has been constructed using pBR322

\*Department of Biology, Hangzhou University

DNA as cloning vector and *E. coli* HB101 as the recipient.

$^{32}\text{P}$ -labeled *E. coli* 16S and 23S rRNAs were shown to hybridize with BamH I fragments 6 (B6, 5.65kb) and 9 (B9, 4.70kb). The clones of those two fragments have been isolated and identified, and named pVFB32 and pVFB16 respectively. Physical map of the plasmid pVFB16 has been analysed by single or double restriction fragments with  $^{32}\text{P}$ -labeled *E. coli* 16S and 23S rRNAs as the probe.

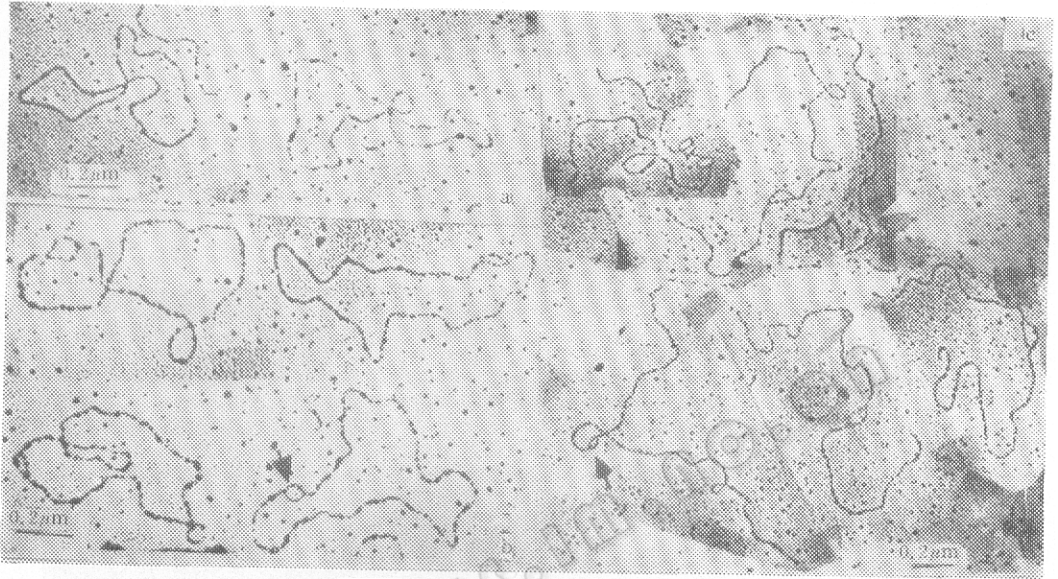
In addition, electromicrography of the HindIII digested pVFB16 showed that a denaturation loop was there and located in the spacer region between the gene of 16S and 23S rRNA. We infer that the loop might be involved in the replication of the ct-DNA.

### Kew words

Chloroplast DNA; clone bank; rRNA genes; *Vicia faba*

### 图版 I 说明

- 蚕豆叶绿体DNA限制性酶切片段的琼脂糖凝胶电泳图  
(1)  $\lambda$ -DNA Hind III 酶切片段和 $\phi\text{x174}$  DNA Hae III 酶切片段(2) — (6) 分别为经BamH I、Hind III、Sal I、Pst I、Xho I 酶切的叶绿体DNA  
Gel electrophoresis of restriction endonuclease digests of *Vicia faba* chloroplast DNA. Restriction patterns are shown for BamH I (lane(2)), Hind III (lane(3)), Sal I (lane(4)), Pst I (lane (5)), Xho I (lane (6)), and Hind III digested lambda DNA and Hae III digested  $\phi\text{x174}$  DNA (lane (1)). Fragment sizes are given in kilobase pairs
- 重组质粒 BamH I 酶切片段的琼脂糖凝胶电泳图 (1) 和 (20) 为 ct-DNA BamH I 酶切片段, (2) — (19) 为含有 ct-DNA 插入片段的重组质粒 BamH I 酶切片段  
Gel electrophoretic analysis of the 18 BamH I cloned fragments. Lanes 1 and 20 contain BamH I digested chloroplast DNA. Lanes (2) through (19) contain BamH I digested recombinant plasmid
- pVFB16 DNA 的各种限制性内切酶酶切片段的琼脂糖凝胶电泳图  
Agarose gel electrophoresis of digests of pVFB16 DNA with various restriction endonucleases  
a 和 b 为  $\lambda$ -DNA Hind III 及 $\phi\text{x174}$  DNA Hae III 酶切片段 a, b. Lambda DNA Hind III +  $\phi\text{x174}$  DNA Hae III. c, EcoR I. d, Sal I. e, Pst I. f, BamH I. g, EcoRV. h, EcoRV + BamH I. i, Pvu II. j, Pvu II + HHind III. k, EcoR I + Sal I. l, EcoR I + Pst I. m, Hind III. n, Hind III + Xho I. o, Bgl II + Xho I
- $^{32}\text{P}$  标记的 *E. coli* 16S, 23S rRNA 与蚕豆叶绿体 DNA 限制性酶切片段的分子杂交  
Blot hybridization of  $^{32}\text{P}$  end labelled *E. coli* 16S and 23S rRNAs to *Vicia faba* chloroplast DNA fragments. The rRNAs are hybridized to BamH I fragments 6(5.65kb) and 9(4.70kb) and Pst I fragment 3(15.8kb) of *V. faba* chloroplast DNA. The position of the bands are indicated by the arrows



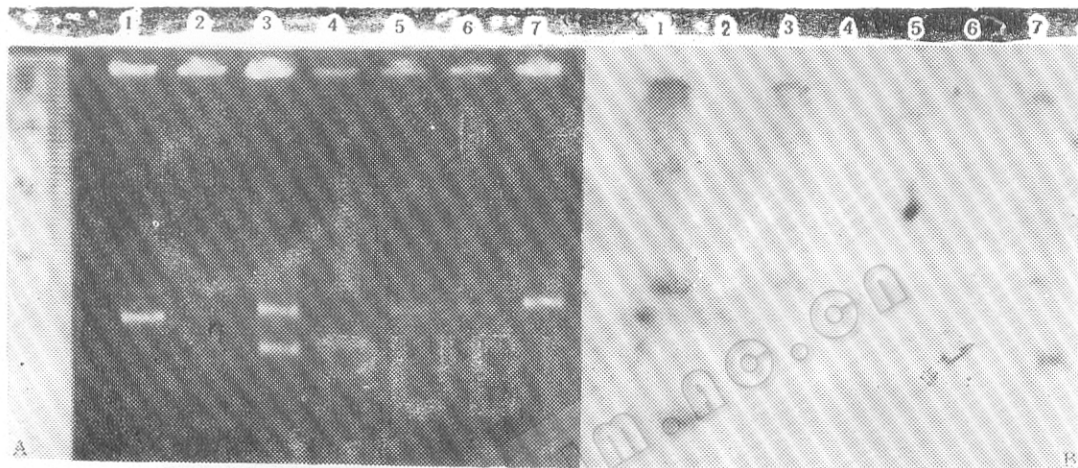
pVFB16 DNA 的电镜观察照片

Electron micrographs of pVFB16 DNA

- a. pVFB16 DNA
- b. 含有变性环的 pVFB16 DNA  
pVFB16 DNA containing a denaturation loop
- c. 含有变性环的 pVFB16 DNA  
Linear pVFB16 DNA containing a denaturation loop  
箭头所指处为变性环  
The position of the loop is indicated by arrows



Ding Xiaohua et al.: Localization of nitrogenase gene in the fast growing *Rhizobium japonicum*



- A. 巨型质粒在 0.7% Agarose 胶中的分布, 1—7 分别表示菌株 B421, D151, A251, 78-17-7, 725, D7 和 D2
- B. *nif HDK* 在巨型质粒上的杂交, 1—7 是相应于 A 的 1—7, 用 pSA30 为探针针对巨型质粒杂交以确定固氮酶基因的定位, B 中 1, 3, 5, 6 和 7 表明该基因定位于巨型质粒上, 而 2 和 4 未见杂交带
- A. Electrophoresis of megaplasmids on 0.7% agarose gel, 1—7 indicate the lanes which show the distribution patterns of the megaplasmids harboured in strain B421, D151, A251, 78-17-7, 725, D7 and D2 respectively
- B. Autoradiograph of hybridized megaplasmid, 1—7 show the corresponding position A 1—7 respectively