

烟草突变体筛选与鉴定方法篇：

6. 烟草 T-DNA 激活标签突变体侧翼序列筛选与鉴定

崔萌萌

(中国农业科学院烟草研究所, 青岛 266101)

通过激活标签技术 (activation tagging) 得到突变群体是构建突变体库的一种重要方法, 应用此种方法研究基因功能, 不管是用正向或反向遗传学方法, 都必须先获得插入位点的侧翼序列 (flanking sequence)。随着拟南芥、水稻及烟草等作物的侧翼序列数据库的不断完善及烟草全基因组测序的完成, 越来越体现出激活标签技术对于推动烟草功能基因组学研究具有巨大的潜力。

1 T-DNA 激活标签插入群体构建

T-DNA 激活标签技术是从早期的 T-DNA 标签技术发展改良而来的, 早期的 T-DNA 标签技术是将人工构建的 T-DNA 通过 Ti 或 Ri 质粒携带, 用农杆菌介导的方法^[1]随机插入到植物基因组中, 通常得到的是功能缺失型突变体, 并不适于功能冗余基因、多发育阶段作用基因、环境变化相关基因的研究。T-DNA 激活标签是在 T-DNA 的边界加入强启动子或多个串联增强子, 从而增强插入区附近 (上游或下游) 基因的表达, 产生显性功能获得型 (dominant gain of function) 突变体, 且这种突变是可稳定遗传的。通过对激活标签载体 T-DNA 区加入筛选标记 (如抗除草剂 Basta 的 Bar 基因和抗卡那霉素的 nptII 基因)^[2]可以筛选阳性植株。当激活标签插入到基因内部时也会产生传统插入失活突变体。2012 年采用叶盘转化法通过农杆菌侵染将激活标签载体 pSKI015 转入烟草品种红花大金元中, 获得了具有 Basta 抗性的转基因突变体 T0 代近 4 万份。

2 激活标签突变体的初步筛选

由于通过激活标签技术产生的功能获得型突变体表型为显性, 所以在当代即可进行初步的表型筛选, 通过观察得到一些外观性状明显的突变表型; 香气、烟碱等性状突变需要专业人员进行分析或测定; 一些肉眼不可见的形态突变要借助显微观察等方法。

3 侧翼序列的筛选

激活标签插入突变体侧翼序列筛选一般通过以下步骤进行: (1) 突变群体基因组 DNA 提取、DNA 定性及定量分析; (2) DNA 样品的阳性检测; (3) 侧翼序列扩增; (4) 琼脂糖电泳检测; (5) 特异性侧翼序列扩增产物测序分析。

激活标签突变体侧翼序列扩增的方法主要有: 热不对称交错 PCR 法 (thermal asymmetric interlaced-PCR, TAIL-PCR)^[3-4], PCR 步移 (PCR-walking)^[5], FPNI-PCR^[6]等。

TAIL-PCR 方法的原理是根据激活标签载体 T-DNA 区的左边界设计 3 个嵌套的特异性引物, 用它们分别与低 T_m 值的随机简并引物结合, 第一轮反应以基因组 DNA 为模板, 根据引物长短和特异性的不同设计热不对称的循环, 通过分级反应来得到特异性产物。

PCR-walking 方法是利用产生平滑末端的限制性内切酶（转基因元件里不应存在酶切位点）消化基因组 DNA，并与设计好的接头相连接，设计 T-DNA 特异性和接头特异性的引物进行第一轮 PCR 扩增；再用一对嵌套的特异性引物进行第二轮 PCR 扩增，从而获得特异性的扩增产物。

FPNI-PCR 方法通常需要三轮反应，第一轮反应和 TAIL-PCR 一样运用热不对称原理，第二和第三轮反应运用高严谨性循环选择性地扩增出特异性产物。

4 突变基因功能鉴定

农杆菌介导的激活标签插入在转基因植物中多为单拷贝，且能稳定遗传，通过实验确定其是单拷贝后那正常情况下它就是导致插入突变的突变原^[7]，其后代符合孟德尔遗传定律。从突变群体中筛选到具有突变表型的株系后，通过 T-DNA 插入序列设计引物进行 PCR 检测，初步判断突变性状是否与插入事件共分离，再通过侧翼序列与突变性状的共分离检测来确定突变是否是由 T-DNA 插入引起的。测序获得目标株系插入位点的侧翼序列信息，通过与数据库中的数据比对来判断激活标签的插入位点，确定候选基因^[8]。通过将候选基因的野生型拷贝转化入突变株进行过量表达，观察其表型恢复情况，或采用 RNAi 等方法进行基因功能验证。为保证遗传分析的准确性，每代每个株系群体应保持相应的数量，由于激活标签法产生的是显性功能获得型突变体，纯合体的获得需要多年自交筛选。

激活标签技术已经在拟南芥和水稻中得到了广泛的应用，在烟草中也有成功的应用。Hayashi 等^[9]首先在烟草中成功使用带有 4 个 CaMV35S 增强子^[10]的激活标签，得到了不需要外源生长素就可以生长的愈伤组织突变体。Weigel 等^[2]用 T-DNA 激活标签技术创建拟南芥突变群体，分析鉴定了 30 个不同表型的显性突变体，RT-PCR 表明插入位点附近的基因过量表达。Jeong 等^[11]构建了一个 T-DNA 中含有 CaMV35S 增强子的质粒载体 pGA2715，并用该载体构建了含有 13 450 个独立的水稻 T-DNA 插入标签系，反转录 PCR 分析表明，约 40% 的 T-DNA 插入株系中与插入位点相邻的基因表达明显增加，但不一定能产生明显的表型变化。

5 问题与展望

整合到基因组的 T-DNA 一旦出现多拷贝插入，就会对基因分离和性状分离造成麻烦，而且组培过程中也会产生突变，这些都增加了基因功能的分析难度。有研究表明，T-DNA 并不是完全随机插入，而是优先插入到转录活跃的区域^[12]，且在某些情况下由激活标签引起的表型经过几代会消失，这可能是由于插入的 T-DNA 或者侧翼序列甲基化导致的^[13-14]。虽然存在着一些问题，但 T-DNA 激活标签法还是植物基因功能研究的一个极具潜力的研究方法。

参考文献

- [1] 李子银, 胡会庆. 农杆菌介导的植物遗传转化进展[J]. 生物工程进展, 1998, 18(1): 22-26.
- [2] Weigel D, Ahn J H, Blazquez M A, et al. Activation tagging in Arabidopsis[J]. Plant Physiol, 2000, 122: 1003-1013.
- [3] Liu Y G, Whittier R F. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking[J]. Genomics, 1995, 25: 674-681.
- [4] Liu Y G, Chen Y L. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences[J]. Biotechniques, 2007, 43: 649-656.
- [5] Balzergue S, Dubreucq B, Chauvin S, et al. Improved PCR-walking for large-scale isolation of plant T-DNA borders[J]. Biotechniques, 2001, 30: 496-498.
- [6] Wang Z, Ye S F, Li J J, et al. Fusion primer and nested integrated PCR (FPNI-PCR): a new high-efficiency strategy for rapid chromosome walking or flanking sequence cloning[J]. BMC Biotechnology, 2011, 11: 109.
- [7] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2002: 220-221.

- [8] 代晓霞. 水稻 T-DNA 插入突变体库侧翼序列的分离和 OsBC1L 家族基因的功能研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- [9] Hayashi H, Czaja I, Lubenow H, et al. Activation of a plant gene by T-DNA tagging: auxin-independent growth in vitro[J]. Science, 1992, 258: 1350-1353.
- [10] Odell J T, Nagy F, Chua N H. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter[J]. Nature, 1985, 313: 810-812.
- [11] Jeong D H, An S, Kang H G, et al. T-DNA insertional mutagenesis for activation tagging in Rice[J]. Plant Physiol, 2002, 130(4): 1636-1644.
- [12] Brunaud V, Balzergue S, Dubreucq B, et al. T-DNA integration into the Arabidopsis genome depends on sequences of pre-insertion sites[J]. EMBO Rep, 2002, 3: 1152-1157.
- [13] Finnegan E J, Genger R K, Peacock W J, et al. DNA methylation in plants[J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1998, 49: 223-247.
- [14] Fagard M, Vaucheret H. (Trans)gene silencing in plants: How many mechanisms?[J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 2000, 51: 167-194.



《中国烟草科学》2013年征订启事

《中国烟草科学》是中华人民共和国农业部主管, 中国农业科学院烟草研究所、中国烟草总公司青州烟草研究所主办的国家级学术性科技期刊。1979年创刊, 《中国烟草科学》主要刊载我国烟草科学研究和烟草生产技术方面的科研成果、生产新技术、现代化经营管理等学术论文, 此外还刊登烟草研究领域具有一定前瞻性的综述文章。辟有烟草遗传育种、栽培技术、调制分级、生理生化、综合信息、专题论述、实用技术、测试分析、烟叶工业利用、吸烟与健康、现代烟草农业以及国外动态等栏目。主要读者对象是国内烟草科技工作者、院校师生、烟草生产管理干部和技术人员等。

《中国烟草科学》2000年被评选为中国科技核心期刊, 2008年底正式被评为中文核心期刊。先后成为英国CAB数据库、美国烟草文摘数据库收录期刊, 同时也被国内主要期刊数据库全文收录。

《中国烟草科学》在长期的实践中, 形成了自己的办刊风格, 有一支相对稳定的高水平作者群和广大的读者群, 发表的论文代表了我国烟草科学研究的先进水平, 为推进我国烟草科学技术创新和发展做出了很大贡献。我国许多著名烟草科学家均在本刊发表过许多颇具影响的重要学术论文, 至今影响深远。《中国烟草科学》是我国几代烟草科研和生产技术人员辛勤培育的一块重要学术园地。欢迎国内外广大科技工作者积极投稿。

《中国烟草科学》为双月刊, 逢双月未出版, A4, 100页。国内统一刊号CN37-1277/S, 国际标准刊号ISSN 1007-5119。本刊国内公开发行, 定价: 10.00元/期, 全年60.00元/份。全国各地邮局均可订阅, 邮发代号24-30。2013年《中国烟草科学》已开始征订, 请您速到当地邮局办理订阅手续; 或直接与我刊发行部徐建华联系, 电话: 0532-88702115, 传真: 0532-88702056。

主 编: 王元英

投稿网站: www.zgyckx.com.cn

电 话: 0532-88703238

传 真: 0532-88702056

E-mail: zgyckx@sina.com

联系地址: 山东省青岛市崂山区科苑经四路11号《中国烟草科学》编辑部

邮政编码: 266101