

禾谷类作物 T-DNA 插入突变体库 专用载体 pBA9N 的构建

丁 博¹, 白子彧¹, 王俊斌², 李 明¹, 蒲 鹏¹, 谢晓东^{1*}

(1. 天津农学院 农学与资源环境学院, 天津-布里斯托环境变化对作物影响研究中心, 天津 300384;

2. 天津农学院 基础科学学院, 天津 300384)

摘要: 为进行小麦等禾谷类作物的突变体库构建, 以 pBRCT806 载体为基本骨架, 通过 Gateway 克隆技术, 将选择标记基因 *Npt II*, 置于玉米 ubiquitin 启动子的控制之下, 构建了 pBA9N 载体。该载体适于在单子叶植物中进行遗传转化, 且小仅有 6 478 bp, 易于操作; 此载体与 psoup 载体共转化, 保证了 T-DNA 片段高效整合到植物基因组中。应用该载体构建突变体群体, 可稳定持续高效表达 *Npt II* 抗性标记基因, 易于检测。

关键词: 禾谷类作物; pBA9N; T-DNA; 突变体库; ubiquitin 启动子; *Npt II* 基因

中图分类号: Q78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)07-0010-04

Construction of pBA9N Vector for T-DNA Insertional Mutagenesis of Cereal Crops

DING Bo¹, BAI Zi-yu¹, WANG Jun-bin², LI Ming¹, PU Peng¹, XIE Xiao-dong^{1*}

(1. Tianjin-Bristol Research Centre for the Effects of Environmental Change on Crops, College of Agronomy,

Resources and Environmental Sciences, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China;

2. College of Fundamental Sciences, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

Abstract: In order to establish the T-DNA mutant libraries for cereal crops, the pBA9N vector was constructed using pBRCT806 vector as the basic framework by the Gateway cloning technology which placed the selectable marker gene *Npt II* in the control of maize ubiquitin promoter. The pBA9N vector was suitable for the genetic transformation of monocots, which was only 6 478 bp and easy to be operated. The pBA9N vector could be co-transformed with the psoup carrier to ensure the efficient integration of T-DNA fragment into the plant genome. The mutant population constructed by the vector could highly and stably expressed the *Npt II* gene, and the transgenic plants could be easily detected.

Key words: cereal crops; pBA9N; T-DNA; mutant library; ubiquitin promoter; *Npt II* gene

随着高等植物基因组测序工作的迅速推进, 基因功能及其表达调控的研究也在全基因组水平展开。生物体内存在大量的、功能不明的基因^[1], 要想阐释这些基因的功能, 一个重要途径是构建

突变体库, 对这些基因的生物学功能进行解析。构建突变体库的方法很多, 包括物理诱变、化学诱变和插入突变等^[2]。其中 T-DNA 插入突变法易于进行突变基因的定位和克隆, 而且 T-DNA 序列

收稿日期: 2014-02-28

基金项目: 国家 863 计划项目 (2012AA10A309); 天津农学院科学研究发展基金计划项目 (2011N11); 天津市教委科研计划项目 (20130606)

作者简介: 丁 博 (1982-), 女, 天津人, 实验师, 硕士, 主要从事作物遗传育种工作。E-mail: yuancircle@126.com

* 通讯作者: 谢晓东 (1975-), 男, 内蒙古兴安盟人, 研究员, 博士, 主要从事植物抗逆机制研究。E-mail: xiexiaod@gmail.com

中的标记基因使得突变体筛选更高效,因而该方法应用较为广泛^[8]。

采用 T-DNA 和转座子插入突变法,在拟南芥、油菜^[4]、二穗短柄草^[5]、水稻^[6]、玉米^[7]等作物中都已构建了突变体库。但在小麦、大麦等作物中 T-DNA 突变体库还未见报道。目前应用较为广泛的双子叶植物 T-DNA 突变体库是拟南芥的 SALK T-DNA 突变体群体,有超过 225 000 个农杆菌 T-DNA 突变体,其中有 88 000 个突变体进行了精确定位,突变体插入位点分布在 21 700 多个基因上^[8]。单子叶模式植物水稻的突变体库也已构建起来,其中,韩国 POSTECH-RISD 数据库应用反向 PCR 技术进行 T-DNA 侧翼序列分离^[9-11],目前已有 80 259 条侧翼序列被定位于水稻染色体上。

上述不同物种突变体库构建所用载体的 T-DNA 序列,含有用于驱动外源基因表达的胭脂碱合成酶基因 Nos 启动子和花椰菜花叶病毒(CaMV) 35S 启动子等^[12],适于在双子叶植物中激活外源基因的过量表达,而由于这些启动子在单子叶植物中调控基因表达效率降低^[13],势必影响对突变体的筛选和鉴定。因此,拟构建的单子叶植物突变体库宜采用适于单子叶植物基因表达的启动子。

pBRAC (http://www.jic.ac.uk/corporate/index.htm) 是用于大麦和小麦等单子叶植物基因功能研究和遗传改良的系列载体。其中部分载体采用 Gateway 技术进行外源基因的重组,并且采用玉米泛素基因(*UBIQUITIN*)的启动子来控制基因的表达。*ubiquitin* 启动子实际上包括 *UBIQUITIN* 基因的启动子区,5' 非翻译区和第一内含子。该启动子能控制基因在单子叶植物中过量的表达^[14],在基因功能研究中具有非常好的应用前景。

已构建植物突变体库所用的载体特征各有不同,但都有一个共同点,T-DNA 插入序列上的基因受 CaMV 35S 等启动子控制,而研究表明,这些启动子在双子叶植物中的基因调控水平较高,而在单子叶植物中则降低^[13],这势必影响对阳性植株的筛选。为提高单子叶植物 T-DNA 突变体的筛选效率,T-DNA 序列中的基因应处于 *ubiquitin* 启动子的调控下,为了便于操作,所用载体应尽可能的小。因此,本研究采用表达载体 pBract806,运用 Gateway 技术将卡那霉素抗性标记基因置于 *ubiquitin* 启动子的控制下,得到 1 个小于 7 000 bp 的单子叶植物 T-DNA 插入突变体库专用载体 pBA9N,为进一步进行小麦等禾谷类植物的突变体库构建奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

质粒 pBRAC806、pDONR (amp)、pEASY-ubi-npt II 均为天津-布里斯托环境变化对作物影响研究中心保存。大肠杆菌(*E. coli*)菌株 DH5 α 和 DB3.1 感受态细胞由实验室人员制备。感受态细胞制备方法参照李振宇等^[15]的方法。

1.2 主要试剂和生物学软件

BP ClonaseTM II Enzyme Mix 和 LR ClonaseTM II Enzyme Mix 试剂盒购自 Invitrogen 公司。琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(TaKaRa Agrose Gel DNA Purification Kit)购自宝生物工程(大连)有限公司,质粒提取试剂盒购自上海生工生物工程技术服务有限公司,Phusion 超保真 DNA 聚合酶购自 NEB 公司;生物信息学分析所用软件为 Invitrogen 公司软件 Vector NTI ADVANCED 11 和 Biomatters Ltd 公司 Geneious Basic 5.5.6 软件。本试验的测序和引物合成由北京奥科鼎盛生物科技有限公司完成。2 \times Es Taq MasterMix(含染料)购自北京康为世纪生物技术有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 目的片段的 PCR 扩增 PCR 扩增反应体积为 50 μ L,反应体系中含 1 \times Buffer,200 μ mol/L dNTPs,0.5 μ mol/L 引物,1 U phusion DNA 聚合酶,200 ng DNA 模板。

反应程序为:98 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环的程序为 98 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 2 min,最后 72 $^{\circ}$ C 10 min。

扩增引物为 Npt II-attBF:5'-GGGGACAAGT-TTGTA CAAAAAAGCAGGCTTAATGGCAATTACCT-TATCCGC-3';Npt II-attBR:5'-GGGGACCAC-TTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAGAAGAA-CTCGTCAAGAAGG-3'。

1.3.2 BP 反应和 LR 反应 将琼脂糖凝胶电泳回收的目的片段与 pDONR(amp)载体进行 BP 反应,目的片段将 pDONR(amp)载体上的 *ccdB* 位点置换,构建成氨苄青霉素抗性的入门载体。反应体系包括 PCR 产物 1 μ L,pDONR(amp)载体 1 μ L,BP clone II enzyme 1 μ L,ddH₂O 1 μ L。

将 BP 反应产物经转化大肠杆菌菌株 DH5 α 后,用氨苄青霉素(100 mg/L)进行筛选。将转化所得的菌斑培养提取质粒,进行菌落 PCR 鉴定。

将 BP 反应得到的入门载体与 pBRAC806 载体进行 LR 反应,得到表达载体。反应体系:入门载体 pDONRN 2 μ L,pBRAC806 载体 1 μ L,LR

clone II enzyme 1 μL , ddH₂O 1 μL 。反应程序参照试剂盒说明进行。

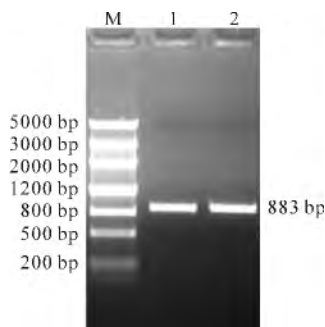
1.3.3 重组质粒的阳性克隆 PCR 鉴定 以挑取的单克隆作为 PCR 的模板,在反应液中轻沾,其余均按照常规 PCR 程序进行,模板体积在体系中忽略不计。

PCR 扩增总体积 10 μL :包括 2 \times Es Taq MasterMix 5 μL , T7 和 SP6 引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.4 μL , 模板为转化后的白色菌斑, RNase-Free Water 4.2 μL 。反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$, 2 min;35 个循环:94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。最后,PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖电泳检测,选择合适大小的阳性克隆测序。PCR 扩增引物为:Npt II-attBF 和 p806-nrev3: 5'-CGTCATGCATTACATGTTAA-3'。

2 结果与分析

2.1 目的片段 Npt II-attB 的扩增

PCR 扩增结果表明,琼脂糖凝胶电泳检测到 1 条长度大于 800 bp 的条带,同目的产物的大小一致(图 1),且 PCR 产物量满足回收纯化要求。



点样顺序:Marker, Npt II-attB(1,2 泳道)

图 1 片断 Npt II-attB 扩增

2.2 入门载体 pEntry-Npt II

本试验采用 Gateway 技术是一种基于 λ 噬菌体特异位点重组特性的通用克隆技术,即利用 λ 噬菌体位点特异重组系统的 BP 和 LR 为可逆双向反应,首先将 PCR 产物克隆到 Gateway 的入门载体,这样目的基因就可以迅速方便而且定向地重组到任何 Gateway 的表达载体上^[16]。再利用得到的 Npt II-attB 产物和 pDONR(amp)进行 BP 反应,目的基因编码序列将 pDONR(amp)载体上的 *ccdB* 位点置换,构建成具有氨苄青霉素抗性的入门载体 pDONRN(图 2)。将 BP 反应产物转化大肠杆菌菌株 DH5 α 后,用氨苄青霉素进行筛选,得到阳性克隆,对阳性克隆进行菌落 PCR 鉴定,结果显示目的基因编码序列全长已经插入 pDONR(amp)载体

中,活化保存菌株,并提取质粒。

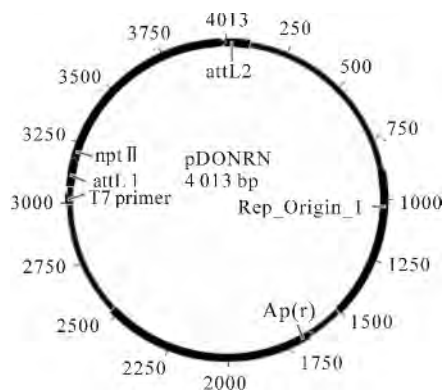


图 2 pDONRN 载体

2.3 表达载体 pBA9N

LR 反应将卡那霉素抗性基因整合到表达载体 pBRACT806 上,从而构建了含有卡那霉素抗性标记的双元表达载体 pBA9N(图 3)。对阳性克隆进行 PCR 扩增鉴定结果见图 4,挑取正确的菌落进行测序。测序结果(图 5)显示,Npt II 基因编码序列全长已经插入 pBRACT806 载体中。

此表达载体的卡那霉素抗性基因由玉米泛素基因 *UBIQUITIN* 的启动子诱导,可在小麦等禾本科植物的各个组织中高效表达。

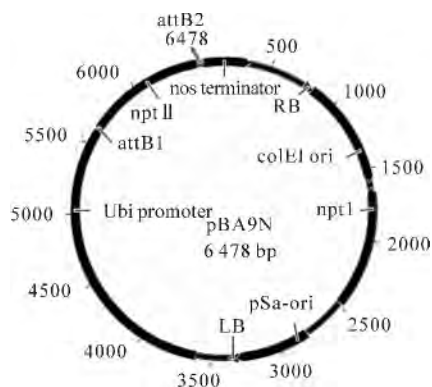
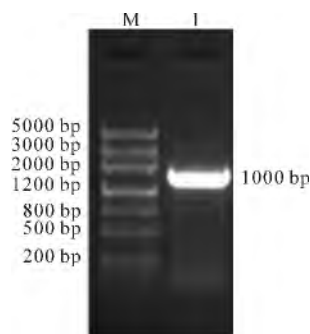


图 3 pBA9N 载体



点样顺序:Marker,PCR 扩增片段

图 4 LR 反应后菌落 PCR 检测

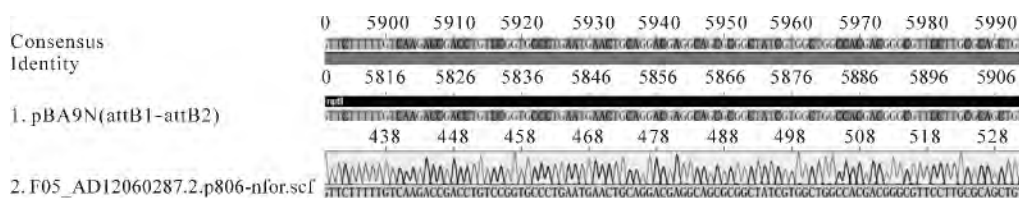


图 5 pBA9N 测序比对

3 结论与讨论

突变体是进行基因功能鉴定的理想试验材料,通过物理诱变、化学诱变或插入法等都可获得突变体。T-DNA 插入法可以测定插入位点的侧翼序列,因此只要确定突变和插入是共分离,则可以轻易地克隆相关基因^[17]。目前,T-DNA 插入法被广泛应用于植物突变体库的构建,美国 SALK 研究所 T-DNA express 网站上列出的 T-DNA 突变体库,拟南芥有 11 套,水稻则达 13 套。

小麦、大麦等作物中尚无此类突变群体,并且已有的用于植物突变群体构建的表达载体也不适于在小麦等单子叶植物中使用。鉴于此,本课题组构建了 pBA9N 载体,该载体 T-DNA 序列中的基因均受玉米 *UBIQUITIN* 基因启动子控制,该启动子在单子叶植物中的活性明显高于 CaMV 35S 或 Nos 等启动子,可专用于单子叶植物突变体库的构建。采用该载体系统的转基因株系,可稳定持续高效表达 *Npt II* 抗性标记基因,为转基因植株的筛选提高了精确性。

此外,pBA9N 载体建立在 pBRACCT 系统上,大小只有 6 478 bp,易于遗传转化操作,通过与 pSoup 或 pAL154(komari 片段)^[18] 等 helper 载体共转化,pBRACCT 系统可将 T-DNA 序列高效整合到单子叶植物基因组中,构建突变体库,为单子叶禾谷类作物的功能基因组研究提供必备的试验材料。

致谢:感谢本研究中心构建 pEASY-ubi-npt II 载体的研究生杨文丽同学和提供表达载体 pBRACCT806 的 John Innes Centre。

参考文献:

- [1] D'Arcangelo G, Homayouni R, Keshvara L, *et al.* A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler[J]. *Nature*, 1995, 374: 719-723.
- [2] 刘晓蓓, 吴庚, 张芊, 等. 烟草突变体库的创建策略及其应用[J]. *中国农业科技导报*, 2010, 12(6): 28-35.
- [3] 赵霞, 周波, 李玉花. T-DNA 插入突变在植物功能基因组学中的应用[J]. *生物技术通讯*, 2009, 20(6): 880-884.
- [4] 赵小英, 唐冬英, 黄星群, 等. 油菜突变体库构建与激素

反应基因克隆分析[J]. *湖南大学学报: 自然科学版*, 2009, 36(9): 67-72.

- [5] 李慧玲. 二穗短柄草 (*Brachypodium distachyon*) T-DNA 插入突变体库构建[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [6] 闫双勇, 智庆文, 刘欣洁, 等. 水稻 T-DNA 插入突变体库的构建及突变类型的分析[J]. *遗传学报*, 2004, 31(12): 1388-1394.
- [7] Hanley S, Edwards D, Stevenson D, *et al.* Identification of transposon-tagged genes by the random sequencing of mutator-tagged DNA fragments from *Zea mays*[J]. *The Plant Journal*, 2000, 23: 557-566.
- [8] Alonso J M, Stepanova A N, Leisse TJ, *et al.* Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Science*, 2003, 301: 653-657.
- [9] Guiderdoni E, An G, Yu S M, *et al.* Rice functional genomics[M]. New York: Springer, 2007: 181-221.
- [10] Jeong D H, An S, Kang H G, *et al.* T-DNA insertional mutagenesis for activation tagging in rice[J]. *Plant Physiol*, 2002, 130: 1636-1644.
- [11] Jeong D H, An S, Park S, *et al.* Generation of a flanking sequence-tag database for activation-tagging lines in *japonica* rice[J]. *Plant J*, 2006, 45: 123-132.
- [12] 焦改丽, 孟钊红, 郭三堆, 等. 花椰菜花叶病毒 (CaMV) 35S 启动子在转基因棉花中的表达[J]. *作物学报*, 2004, 30(11): 1135-1139.
- [13] McElroy D, Brettell R I S. Foreign gene expression in transgenic cereals[J]. *Trends in Biotechnology*, 1994, 12: 62-68.
- [14] Christensen A H, Quail P H. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants[J]. *Transgenic Res*, 1996, 5: 213-218.
- [15] 李振宇, 徐开林, 潘秀英, 等. 氯化铯法制备感受态细胞[J]. *徐州医学院学报*, 2004, 24(4): 315-316.
- [16] Nakagawa T, Ishiguro S, Kimura T. Gateway vectors for plant transformation [J]. *Plant Biotechnology*, 2009, 26: 275-284.
- [17] 林钰琼, 刘松, 傅亚萍, 等. T-DNA 插入水稻突变体库的叶绿素和净光合速率变化[J]. *中国水稻科学*, 2003, 17(4): 369-372.
- [18] Wu H, Doherty A, Jones H D. Efficient and rapid *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) using additional virulence genes[J]. *Transgenic Res*, 2008, 17: 425-436.