

T-DNA 插入突变及其研究进展

王凤华, 李光远

(河南科技大学 林学院, 河南 洛阳 471003)

摘要: T-DNA 插入突变在反向遗传学和功能基因组学研究中发挥着重要作用。文中综述了 T-DNA 插入突变的原理以及在拟南芥和水稻等模式植物中的研究现状, 同时指出了该技术的优缺点及发展方向。

关键词: T-DNA 插入; 突变体; 激活标签

中图分类号: Q52 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2007)06-0012-03

突变体在植物基因分离及遗传学研究中发挥着重要作用。物理诱变、化学诱变、同源重组、基因沉默以及插入突变等方法都可以用来构建突变体。物理、化学诱变比较容易得到饱和突变体库, 但突变基因的克隆要用较复杂的图位克隆法, 相对比较困难。同源重组在酵母和鼠类中获得了成功, 但在植物中同源重组率比较低。基因沉默在线虫的突变体库构建中得到成功应用, 但并不适合于植物, T-DNA 插入突变能方便地进行正向和反向遗传学研究, 因而受到重视^[1]。同时, 基因组测序工作的完成使得从位点到表型的反向遗传学研究成为可能, 从而使通过 T-DNA 插入技术构建突变体来研究功能的反向遗传学技术逐渐取代了传统的化学诱变、图位克隆等技术。

1 T-DNA 标签载体的发展

T-DNA 插入技术中关键是 T-DNA 标签载体。T-DNA 标签载体随着研究不断被改造革新, 主要经历了 3 次革新。

(1) 启动子标签载体: 这是最初的 T-DNA 标签载体。这类载体的特点是左右边界内只包含 1 个选择标记基因。在用这类载体建立的突变体库中, 能得到部分基因功能缺失的突变体, 但不能得到有功能冗余及致死效应的基因突变体, 也很难研究具有高度多效性的基因^[2]。

(2) T-DNA 捕获标签载体: 包括增强子捕获、启动子捕获和基因捕获载体。这类载体是通过插入的报告基因的表达来研究被插入基因的表达模式,

而且对致死基因也可以在杂合状态下进行研究^[1]。

(3) 激活标签载体: 这类载体可以产生获得功能性的突变体, 能够研究存在功能冗余或具有高度多效性以及致死效应的基因的功能^[1]。第一种获得植物功能性突变体的方法是利用 CaMV 35S 基因的增强子原件: 在靠近 T-DNA 边界处有 4 个串联的 CaMV 35S 增强子, 当其插入到一个基因的附近可以引起该基因的过量表达。研究发现, 激活标签可以使插入位点上下游基因超表达产生功能, 获得突变。激活标签技术还能产生功能缺失的突变体, 可以方便采用 TAIL-PCR 或质粒挽救方法扩增相关基因, 避免了 T-DNA 突变分离功能基因的不便。

2 T-DNA 插入突变研究进展

2.1 T-DNA 整合方式的研究

T-DNA 插入突变技术中, 关键是 T-DNA 怎样整合到受体基因组中, 因此, T-DNA 在基因组中的插入位点显得尤为重要。曾经认为, T-DNA 插入基因组是一个随机的过程, 但近年来的研究表明, 这种随机性只是相对的, T-DNA 优先整合于染色体中基因丰富、转录活性高的区域。An 等^[3]分析表明, 在翻码区起始和终止位置以及接近 ATG 起始密码子的上游区域插入的频率较高; T-DNA 在插入基因的类型上没有倾向性, 插入频率在染色体末端较高, 着丝点处较低。Schneeberger 等^[4]研究表明: T-DNA 在染色体着丝点和 rDNA 区插入频率较低, 往染色体末端逐渐增多, 在蛋白质的 5' 和 3' 侧翼区以及 RNA 聚合酶 I 转录 rRNA 基因重

收稿日期: 2006-12-19

基金项目: 河南科技大学人才科学研究基金项目; 河南科技大学校青年基金项目(2006QN008)

作者简介: 王凤华(1972-), 女, 四川邛崃人, 博士, 研究方向: 园艺植物生物技术。

复区分布也较多, 具有较高 GC 分布区域是偏好区。Jeong 等^[5]研究表明, T-DNA 既可插入基因区也可插入到基因间隔区, 染色体作图表明, T-DNA 整合频率与染色体大小成正比, 并且 T-DNA 插入在每条染色体上分布并不均匀: 着丝点附近低, 末端高, 这一结论与 An^[3] 和 Schneeberger^[4] 结果一致。

2.2 T-DNA 插入突变体库及侧翼序列库的构建

T-DNA 插入突变最大的用处是构建突变体库, 在此基础上构建侧翼序列库; 目前在拟南芥中已经建立了接近饱和的 T-DNA 插入突变体库, 该突变体库包含超过 225 000 个独立的 T-DNA 插入株系, 在预测的 29 454 个基因中有 21 700 个基因发生了插入突变^[6]。含 T-DNA 激活标签的拟南芥群体已经获得, 并且在这些群体中已经获得大量的异常突变体和被标记基因。Sessiens 等采用 Tail-PCR 的方法分离了拟南芥插入突变体库 85 108 条 T-DNA 侧翼序列^[7]。同时 Weigel 等^[8] 的结果表明, 平均约 1 000 个拟南芥激活标签转化子能发现一个形态学突变。水稻中已建立了具有一定规模的突变体库, 但远没有达到饱和的程度。水稻上大约获得了 47 932 个 T-DNA 插入株系和 3 290 个水稻激活标签转化子, 同时扩增出 27 621 个侧翼序列。An 等从 6 749 个水稻标签系中分离了 3 793 条 T-DNA 侧翼序列, 并建立了侧翼序列数据库^[3]。Sallaud 等^[9] 分离了 7 480 条 T-DNA 侧翼的水稻基因组序列。Zhang 等^[10] 获得了 129 000 个水稻增强子捕获突变体。

2.3 基因分离与功能的研究

利用 T-DNA 插入突变方法可以直接采用质粒挽救和 Tail-PCR 扩增侧翼序列, 这为基因的分离与克隆带来了方便。利用该技术成功从拟南芥中克隆到的基因有: *AESP*, *AtNAP*, *AG*, *CH42*, *CHL1*, *COPI*, *CTRI*, *EMB30*, *FAD2*, *FAD3*, *FUS6*, *GLI*, *GL2*, *HY3*, *HY4*, *LD*, *TSL*, *WRKY7*, *COBR*, *CUL4*, *tMYB30* 等。运用激活标签法的研究也逐渐兴起, 已采用激活标签技术从拟南芥中分离出 *lep*, *sturdy*, *basl*, *brsl* 等 30 多种新基因。

拟南芥和水稻等模式植物的实践已经证明, T-DNA 插入突变技术可以成功构建植物突变体, 从而为相关植物的研究展示了一个美好的前景, 近年来, 这一技术的应用逐渐扩大。Helena Mathews 等^[11] 建立了一套高产量的激活标签技术, 利用该技术鉴别了番茄多种代谢途径调控的基因, 包括紫色突变系, 分析原因, 主要是控制花青素的基因发生表

达所致, 具体是由于 MYB 转录因子过量表达所致。Zubko 等^[12] 采用激活标签法在矮牵牛中分离了一个与细胞分裂素合成相关的基因 *sho*, 该基因在激活后过量表达产生明显的顶端优势, 开花推迟、衰老延缓。Imaizumi 等^[13] 应用激活标签技术获得 3 500 个豆类的 T-DNA 插入突变系, 其中, 45 个具有明显表型突变。Perez 等^[14] 利用农杆菌介导的遗传转化获得了 19 株香蕉转基因植株。

3 T-DNA 插入突变技术存在的问题及发展方向

总的来说, T-DNA 插入突变的研究还主要局限于少数模式植物。究其原因, 笔者认为, 一方面是由于植物本身的生物学特性和遗传特性所致。另一方面, T-DNA 标签载体也在很大程度上影响着研究进程与研究结果。目前的标签载体大多采用 CaMV 35S 增强子元件, 而 CaMV 35S 增强子具有组织特异性。据报道: 激活标签在叶片中活性很高, 在根中却很低^[8]。因此, 如果要利用此技术发现新基因, 必须构建新的载体。可诱导表达载体的构建是一大创举, 化学激活表达系统已经应用于鉴定植物胚胎形成的基因^[15]。研究发现, 在载体 T-DNA 的左边界或右边界附近添加一个热激启动子 HSP18.2, 可以促使附近温度依赖基因的表达^[16]。这为今后的研究奠定了很好的基础。笔者认为, 应用该技术将可能在以下几方面获得突破: 重要农艺性状功能基因的克隆、作物产量品质形成机理的研究、抗逆性机理研究以及作物重要病害的研究等。

参考文献:

- [1] 阎双勇, 谭振波, 李仕贵. 水稻插入突变库构建研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(6): 48-53.
- [2] Patricia S Springer. Gene traps: tools for plant development and genomics[J]. Plant Cell, 2000, 12: 1007-1020.
- [3] An G, Lee S, Kin S H, et al. Molecular genetics using T-DNA in rice[J]. Plant Cell Physiol, 2005, 46(1): 14-22.
- [4] Schneeberger R G, Zahng K, Tatarinova T, et al. Agrobacterium T-DNA integration in *Arabidopsis* is correlated with DNA sequence compositions that occur frequently in gene promoter regions[J]. Funct Integr Genomics 2005, 5(4): 240-253.
- [5] 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(1): 123-132.

烟草烟碱转化及生物碱优化研究进展

李超, 史宏志*, 刘国顺

(河南农业大学烟草栽培生理生化研究基地, 河南 郑州 450002)

摘要: 烟草群体中一些烟株会因为基因突变形成烟碱转化能力, 导致降烟碱含量显著升高, 烟碱显著降低, 从而降低了烟叶香味品质 and 安全性。从烟碱转化对烟叶可用性的不利影响, 烟碱转化的发生规律、生化 and 分子机理, 遗传改良进行生物碱组成优化几方面进行了综述。

关键词: 烟草; 烟碱; 降烟碱; 转化; 生物碱; 优化

中图分类号: S572 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2007)06-0014-04

生物碱是一类存在于生物(主要是植物)体内, 对人和动物有强烈生理作用的含有氮杂环的碱性物质。生物碱的分子结构多数属于仲胺、叔胺或季胺类, 少数为伯胺类。烟草为富含生物碱的作物, 烟草生物碱主要包括烟碱、降烟碱、新烟草碱和假木贼碱4种主要碱^[1], 其中烟碱为叔胺类生物碱, 其他3种为仲胺类生物碱。烟草生物碱的组成和含量对烟叶品质 and 安全性至关重要, 适宜的烟碱含量, 尽可能低的仲胺类生物碱含量是优质低害烟叶的重要特征。

1 烟碱转化及其不利影响

在正常情况下, 烟草中烟碱占生物碱的比例一

般在94%以上, 降烟碱的比例不超过3.5%。在栽培品种的烟株群体中, 一些植株会因为基因突变形成烟碱去甲基酶, 烟碱在此酶的作用下脱去甲基, 形成降烟碱, 导致降烟碱含量显著升高, 烟碱显著降低, 此类植株被称为转化株。降烟碱是仲胺类生物碱, 与叔胺类的烟碱相比具有较大的不稳定性, 其很容易发生氧化、酰化和亚硝化反应, 生成麦斯明、酰基降烟碱和亚硝基降烟碱(NNN)^[2], 这些物质的形成对烟叶的香吃味 and 安全性有重要的不利影响。史宏志等^[3]的研究表明, 随着烟碱转化程度的提高 and 降烟碱含量的增加, 白肋烟风格程度显著降低, 香气质逐渐下降, 香气量减少, 烟气浓度变淡, 生理强度

收稿日期: 2007-03-12

作者简介: 李超(1982-), 男, 河南正阳人, 在读硕士研究生, 主要从事烟草栽培生理研究。

通讯作者: 史宏志(1963-), 男, 河南滑县人, 教授, 博士, 主要从事烟草生理生化研究。

- [6] Alonso M, Anna N, Stepanva I, *et al.* Genome wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*[J]. Science, 2003, 301: 653-657.
- [7] Sessions A, Burke E, Presting G, *et al.* A high-throughput *Arabidopsis* reverse genetics system [J]. Plant Cell, 2002, 14: 2985-2944.
- [8] Weigel D, Ahn JH, Blazquez MA, *et al.* Activation tagging in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiol, 2000, 122: 1003-1013.
- [9] Sallaud C, Gay C, Larmande P, *et al.* High throughput T-DNA insertion mutagenesis in rice: a first step towards in silico reverse genetics[J]. Plant J, 2004, 39: 450-464.
- [10] Zhang J, Li C, Wu C, *et al.* RMD: a rice mutant database for functional analysis of the rice genome (Database Issue)[J]. 2006, 34: 745-748.
- [11] Helena Mathews, Stephanie K. Clendennen, *et al.* Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport[J]. Plant Cell, 2003, 15: 1689-1703.
- [12] Zubko E, Adams C J, Machdbkova I, *et al.* Activation tagging identifies a gene from *Petunia hybrida* responsible for the production of active cytokinins in plants [J]. Plant J, 2002, 29: 797-808.
- [13] Imaizumi R, Sato S, Kameya N, *et al.* Activation tagging approach in a model legume, lotus japonicus[J]. J Plant Res, 2005, 118(6): 391-399.
- [14] Pere-Hernandez J B, Swennen R, Sagi L. Number and accuracy of T-DNA insertions in transgenic banana (*Musa* spp.) plants characterized by an improved anchored PCR technique[J]. Transgenic Res, 2006, 15(2): 139-150.
- [15] Zuo J, Niu Q-W, Frugis G, Chua N-H. The WUSCHEL gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*[J]. Plant J, 2002, 30: 349-359.
- [16] Matsuhara S, Jingu F, Takahashi T. Heat-shock tagging: a simple method for expression and isolation of plant genome DNA flanked by T-DNA insertions [J]. Plant J, 2000, 22: 79-86.