

拟南芥 T-DNA 插入突变体 *atsuc3* 的 PCR 鉴定

李敏 杨双 阮燕晔 樊金娟 张立军*

沈阳农业大学生物科学技术学院, 沈阳 110161

Identification of *atsuc3* with T-DNA Insertion by PCR

LI Min, YANG Shuang, RUAN Yan-Ye, FAN Jin-Juan, ZHANG Li-Jun*

College of Life Science and Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China

提要 应用两种植物 T-DNA 插入突变体 PCR 鉴定方法, 即“三引物法”和“双引物法”对拟南芥 T-DNA 插入突变体 *atsuc3* (目的基因两条染色体均发生 T-DNA 插入的纯合突变体) 进行鉴定和比较的结果表明, “三引物法”由于易产生非特异性扩增而无法得到 PCR 鉴定结果, 从而导致鉴定失败; “双引物法”则可避免此种现象, 得到可靠、有效的鉴定结果。

关键词 拟南芥; *atsuc3*; T-DNA 插入突变; 蔗糖转运蛋白; PCR

基因功能的主要研究方法包括: (1) 克隆相关基因, 进行异体超表达研究 (Meyer 等 2000, 2004; Schulze 等 2003); (2) 利用 T-DNA 插入突变技术, 获得目的基因敲出突变体 (Bouche 和 Bouchez 2001; Parinov 和 Sundaresan 2000), 再通过筛选出的纯合突变体, 研究目的基因的功能 (Meyer 等 2004)。与前者相比, 后者具有许多优势 (Meyer 等 2004), 已成为反向遗传学研究的主要手段 (Bouche 和 Bouchez 2001; Parinov 和 Sundaresan 2000)。

蔗糖是植物光合作用同化产物最主要的转运形式, 其转运的方向和速率对于高等植物的生长发育至关重要, 而其跨膜转运及在体内分配的过程与蔗糖转运蛋白 (SUTs 或 SUCs) 密切相关 (Barker 等 2000; Dreyer 等 1999)。研究表明, 拟南芥基因组中包含 9 个编码蔗糖转运蛋白的基因 (*AtSUC1*~*AtSUC9*), 构成拟南芥蔗糖转运蛋白基因家族 (Meyer 等 2000)。其中, *AtSUC3* 是该家族中基因和蛋白质结构最为特殊、功能最具争议的成员 (Barker 等 2000; Meyer 等 2004)。目前, 关于 *AtSUC3* 功能的信息多来自酵母突变体异体表达研究的结果 (Barker 等 2000; Meyer 等 2000, 2004), 而针对拟南芥植株本身的研究也主要集中于对 *AtSUC3* 表达规律的探索, 尚未见生理功能的报道。T-DNA 插入突变技术的反向遗传学研究策略是研究 *AtSUC3* 生理功能的一个系统和直观的途径 (Bouche 和 Bouchez 2001; Meyer 等 2004; Parinov

和 Sundaresan 2000)。

反向遗传学研究的首要条件是获得大量 *AtSUC3* 基因敲除突变体, 建立一套快速、可靠的 T-DNA 插入突变体鉴定方法对其进行鉴定很重要。目前, 鉴定方法主要有 2 种 (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.html>): “三引物法”和“双引物法”。

“三引物法”的原理如图 1 所示, 即采用三引物 (LP、RP、LB) 进行 PCR 扩增。野生型植株 (wild type, WT) 目的基因的两条染色体上均未发生 T-DNA 插入, 所以其 PCR 产物仅有 1 种, 分子量约 900 bp (即从 LP 到 RP); 纯合突变体植株 (homozygous lines, HM) 目的基因的两条染色体上均发生 T-DNA 插入, 而 T-DNA 本身的长度约为 17 kb, 过长的模板会阻抑目的基因特异扩增产物的形成, 所以也只能得到 1 种以 LB 与 LP (或 RP) 为引物进行扩增的产物, 分子量约 410+N bp (即从 LP 或 RP 到 T-DNA 插入位点的片段, 长度为 300+N bp, 再加上从 LB 到 T-DNA 载体左边界的片段, 长度为 110 bp); 杂合突变体植株 (heterozygous lines, HZ) 只在目的基因的一条染色体上发生了 T-DNA 插入, 所以 PCR 扩增后可同时得到 410+N bp 和 900 bp 两种产物。上述 3 种

收稿 2005-05-30 修定 2005-11-21

*通讯作者 (E-mail: ljzhang@syau.edu.cn, Tel: 024-88487163)。

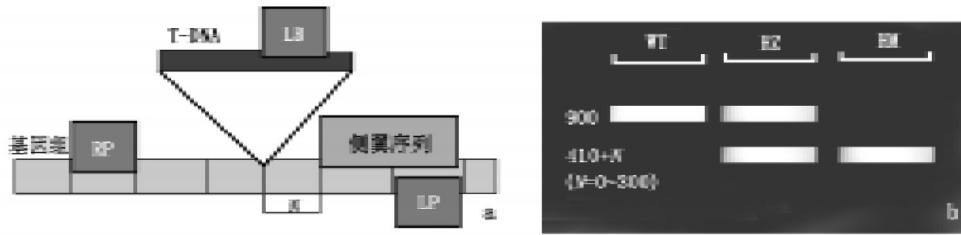


图1“三引物法”原理示意(<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.html>)

a: T-DNA 插入目的基因编码序列的方式、位置以及 PCR 鉴定反应所需引物。LP、RP: 与目的基因片段互补的特异引物; LB: 插入 T-DNA 片段的特异引物; N: T-DNA 的实际插入位点与侧翼序列之间的距离(通常为 0~300 bp)。b: 3 种可能的基因型植株 PCR 产物的差异。WT: 野生型植株; HZ: 杂合突变体植株; HM: 纯合突变体植株。

情况的电泳结果差异明显,能有效区分不同基因型的植株。此法优点是可同时鉴定出纯合突变体并确证 T-DNA 的插入情况。

“双引物法”的基本原理与“三引物法”相似,即采用特异引物扩增目的基因片段和 T-DNA 插入片段,通过比对扩增结果进行突变体的鉴定。具体方法如图 2 所示:首先以基因组 DNA 作为模板,用一对特异引物(LP 和 RP)扩增目的基因片段,初步鉴定出纯合突变体(图2-a);然后再以基因组 DNA 为模板,由 T-DNA 片段的特异引

物(LB)与 LP 或 RP 组成一对引物,扩增目的基因 T-DNA 插入片段,以确证所获突变体为 T-DNA 插入目的基因的突变体(图2-b) (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.html>)。此法的不足之处是完成最终鉴定需进行两轮 PCR 扩增。

本文采用上述两种 PCR 方法,对 T-DNA 插入突变体 *atsuc3* 进行了鉴定,并比较其鉴定结果,旨在寻找一种针对 T-DNA 插入突变体 *atsuc3* 快速、有效的鉴定方法,为进一步研究基因功能奠定基础。

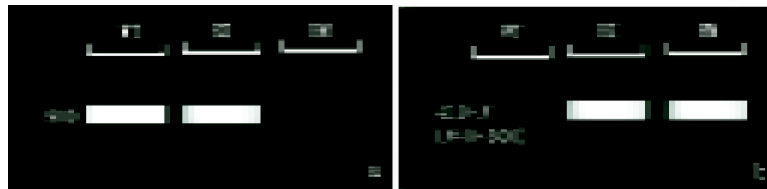


图2 双引物普通PCR法原理示意(<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.html>)

a: 以 LP、RP 为引物,不同基因型植株 PCR 产物的差异。b: 以 LP、LB 或 LB、RP 为引物,不同基因型植株 PCR 产物的差异。N、WT、HZ、HM 同图 1。

材料与方法

1 植物材料和试剂

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)野生型(Columbia-0型)和T-DNA插入突变系(Salk_077715) T₁代种子由美国俄亥俄州立大学ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center)提供。种子播于混合基质(营养土:草炭土:珍珠岩=1:1:1)中,16 h光照/8 h黑暗,23~25℃控温培养。

2 单株总 DNA 的提取

采用改进的拟南芥基因组 DNA 提取法(杨双

等 2005)提取单株总 DNA。

3 “三引物法” PCR 鉴定

以所提取的植株总 DNA 为模板,进行 PCR 扩增。PCR 所用引物的设计参照 SIAGnAL 的相关资料(<http://signal.salk.edu/isectprimers.html>),PCR 试剂盒由大连博亚生物技术有限公司提供。3 条物分别为: LP, 5' TCGACACCGAGTCACTCATCG 3'; RP, 5' TCACCTTCACAATCACACACA 3'; LBa1, 5' TGGTTCACGTAGTGGCCATCG 3'。反应体系共 20 μL: 1 μL 模板、1 μL (20 μmol·L⁻¹) 引物、0.4 μL (10 mmol·L⁻¹) dNTPs、2 μL 10×PCR

缓冲液、3.6 μL ($25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) MgCl_2 、Taq DNA 聚合酶1 U (BBI)、双蒸水。循环参数: 94°C 1 min, 58°C 1 min, 72°C 2 min, 30次循环。1.7% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果, 于波长 300 nm 的透射光下观察, 照相记录。

4 “双引物法” PCR 鉴定

4.1 纯合突变体的初步鉴定 以所提取的植株总DNA为模板, 进行PCR扩增, 引物为LP、RP(序列同3)。反应体系、循环参数及扩增结果的检测和记录方法同3。

4.2 T-DNA插入突变的确证 以4.1初步鉴定为纯合突变株的总DNA为模板, 以LBA1、LP和LBA1、RP(序列同3)分别作为一对引物, 进行PCR扩增。反应体系、循环参数及扩增结果的检测和记录方法同3。

结果与讨论

1 “三引物法” 鉴定的结果

“三引物法”PCR鉴定结果如图3所示, 1~W均在溴酚蓝前沿出现较宽且模糊的条带, 分子量小于100 bp。改变反应温度后, 仍无法得到特异性扩增条带(资料未列出)。产生这种结果的原因可能是PCR反应体系的引物浓度过高, 或者是某条引物与反应过程中某个阶段的PCR产物结合, 形成非特异扩增所致。

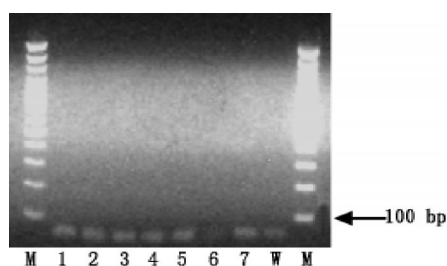


图3 三引物(LP、RP、LBA1) PCR图谱

M: Marker; W: 野生型(Columbia-0型)植株; 1~7: 待鉴定植株。

2 “双引物法” 鉴定的结果

纯合突变体的初步鉴定结果如图4所示, 除3外, 1~W均得到清晰的特异性扩增条带, 产物分子量在1031~1200 bp之间, 与目的基因特异

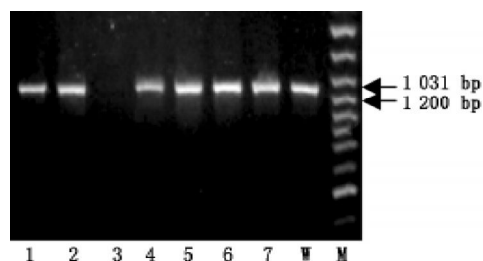


图4 特异引物(LP、RP) PCR图谱

M: Marker; W: 野生型(Columbia-0型)植株; 1~7: 待鉴定植株。

性扩增产物(1104 bp)基本上相同。表明3号植株可能为目的基因被敲出的 *atsuc3* 突变体, 而1、2、4、5、6、7号植株为杂合突变体或野生型植株。

以3号植株总DNA为模板, 确证T-DNA的插入突变, 扩增结果如图5(RP与LBA1)和图6(LP与LBA1)所示。图5中W和3只在溴酚蓝前沿出现较宽且模糊的条带, 分子量小于100 bp, 具有引物二聚体的典型特征。这说明RP与LBA1之间

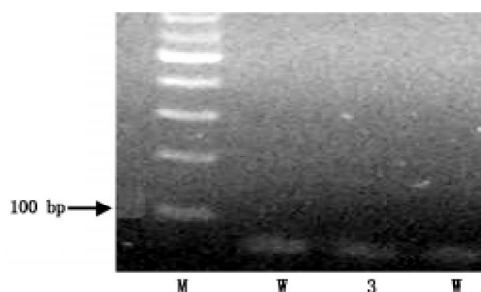


图5 使用RP、LBA1进行PCR检测的图谱

M: Marker; W: 野生型(Columbia-0型)植株; 3: 上述初步鉴定的纯合突变体植株。

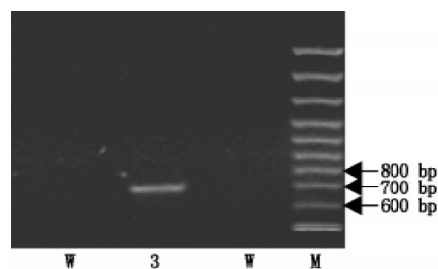


图6 使用LP、LBA1进行PCR检测的图谱

M: Marker; W: 野生型(Columbia-0型)植株; 3: 上述初步鉴定的纯合突变体植株。

片段过长,不能有效扩增,导致引物二聚体的形成,所以RP与Lba1不能用于鉴定T-DNA插入 $atsuc3$ 突变体。图6中只有初步鉴定的纯合突变体(3号)出现特异性扩增条带,产物分子量大约为700 bp。根据图4和图6的结果可以确证3号植株为T-DNA插入突变体 $atsuc3$,可用于进一步的鉴定和基因功能研究。

总之,“三引物法”虽在理论上是可行的,但在实际操作中由于PCR反应体系的引物浓度过高,或者是某条引物与反应过程中某个阶段的PCR产物结合,形成非特异扩增等原因,还无法获得理想的PCR扩增结果而导致鉴定失败。这虽可能采用特定的方法,即控制反应条件的方法以减少非特异扩增条带的产生,但这会大大增加实验的成本和复杂程度;而“双引物法”则可避免上述现象产生,鉴定成功率高,结果可靠,更适用于从大量拟南芥T-DNA插入突变体中快速鉴定出 $atsuc3$ 突变体。本文结果对其他拟南芥T-DNA插入突变体的筛选和鉴定也有一定的参考价值。

参考文献

杨双,阮燕桦,樊金娟,张立军(2005).一种简易的拟南芥幼苗单

- 株微量DNA提取方法.沈阳农业大学学报,36(1):99~100
- Barker L, Kühn C, Weises A, Schulz A, Gebhardt C, Hirner B, Hellmann H, Schulze W, Ward JM, Frommer WB (2000). SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *Plant Cell*, 12: 1153~1164
- Bouche N, Bouchez D (2001). *Arabidopsis* gene knockout: phenotypes wanted. *Curr Opin Biotechnol*, 4: 111~117
- Dreyer I, Horeau C, Lemaillet G, Zimmermann S, Bush DR, Rodriguez-Navarro A, Schachtman DP, Spalding EP, Sentenac H, Gaber RF (1999). Identification and characterization of plant transporters using heterologous expression systems. *J Exp Bot*, 50: 1073~1087
- Meyer S, Melzer M, Truernit E, Hümmel C, Besenbeck R, Stadler R, Sauer N (2000). *AtSUC3*, a gene encoding a new *Arabidopsis* sucrose transporter, is expressed in cells adjacent to the vascular tissue and in a carpel cell layer. *Plant J*, 24 (6): 869~882
- Meyer S, Lauterbach C, Niedermeier M, Barth I, Sjolund RD, Sauer N (2004). Wounding enhanced expression of *AtSUC3*, a sucrose transporter from *Arabidopsis* sieve elements and sink tissues. *Plant Physiol*, 134: 684~693
- Parinov S, Sundaresan V (2000). Functional genomics in *Arabidopsis*: large-scale insertional mutagenesis complements the genome sequencing project. *Curr Opin Biotechnol*, 11: 157~161
- Schulze WX, Reinders A, Ward J, Lalonde S, Frommer WB (2003). Interactions between co-expressed *Arabidopsis* sucrose transporters in the split-ubiquitin system. *BMC Biochem*, 4: 3~12