

## 油菜抗逆相关基因FOX拟南芥文库构建

王道杰<sup>1\*</sup>, 杨翠玲<sup>1</sup>, 柴冬梅<sup>2</sup>, 董龙<sup>1</sup>, 李艳萍<sup>1</sup>

<sup>1</sup>河南大学生命科学学院, 棉花生物学国家重点实验室, 植物逆境生物学重点实验室, 河南开封475004; <sup>2</sup>河南农业职业学院, 河南中牟451450

**摘要:** 利用FOX hunting system技术, 结合高通量的Gateway技术, 以模式植物拟南芥为载体, 建立了一个油菜抗逆相关基因功能研究体系, 构建了一个超表达油菜抗逆相关基因的拟南芥文库, 并将其命名为油菜-FOX-拟南芥文库。根据拟南芥抗逆信号转导研究基础, 筛选出80个拟南芥抗逆相关基因并与油菜基因组信息进行同源性比对, 最终获得70条具有完整ORF的EST序列。PCR扩增上述70个候选基因。利用Gateway技术构建35S强启动子驱动的70个候选基因的植物表达文库。农杆菌介导的拟南芥Flower-dip法转化600多株Col-0生态型拟南芥, 收获种子约30 000粒。PPT筛选和PCR鉴定得到355个转化株, 其中328个单株收获到种子。经Mannitol、NaCl和ABA平板培养基上筛选, 获得根长不敏感植株68株, 根长敏感植株65株。在Mannitol和NaCl平板培养基上筛选到子叶变绿不敏感植株11株。同时在FOX库中发现5株形态表型异常的植株(包括叶片卷曲, 植株矮小等)。

**关键词:** 非生物胁迫; FOX hunting system; Gateway; 油菜; 拟南芥

## Construction of Rape-FOX-*Arabidopsis* Library Overexpressed Stress-Related Genes in *Brassica napus*

WANG Dao-Jie<sup>1\*</sup>, YANG Cui-Ling<sup>1</sup>, CHAI Dong-Mei<sup>2</sup>, DONG Long<sup>1</sup>, LI Yan-Ping<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Key Laboratory of Cotton Biology, Key Laboratory of Stress Biology, College of Life Science, Henan University, Kaifeng, Henan 475004, China; <sup>2</sup>Henan Vocational College of Agriculture, Zhongmou, Henan 451450, China

**Abstract:** In this study, a platform was set up for function analysis of oilseed rape stress-related genes using FOX hunting system and high throughput Gateway technology. We constructed a rape-FOX-*Arabidopsis* library overexpressed the *Brassica napus* stress-related genes, designated as rape-FOX-*Arobidopsis* library. 80 *Arabidopsis* stress-related genes were selected based on stress signal transduction and aligned with rape genome sequence. 70 rape EST sequences with complete ORF were screened out. 70 genes were all amplified by PCR, and an overexpression library were constructed driven by CaMV 35S (cauliflower mosaic virus 35S) promoter using Gateway technology. Then the library with 70 genes was introduced into Col-0 ecotypes *Arabidopsis thaliana* (more than 600 plants) by floral-dip method, and harvested about 30 000 seeds. 355 transformants were screened out by PPT and confirmed by PCR, and 328 transformants completed growth period and set seeds. According root growing, 68 stress-resistant plants and 65 sensitive plants were screened out on MS medium with Mannitol, NaCl or ABA, and based on cotyledon greening, 11 plants were screened out on MS medium with Mannitol or NaCl. 5 plants were found with abnormal phenotypes in the FOX library, which were leaf curl, dwarf, etc.

**Key words:** abiotic stress; FOX hunting system; Gateway; *Brasicca napus*; *Arabidopsis thaliana*

随着基因组学的发展, 高通量、高效率地鉴定基因并进行功能研究显得尤为重要。FOX hunting system (Full-length cDNA Over-eXpressing gene hunting system)是一项新的高通量基因功能研究技术。2006年, FOX hunting system作为一种独创的植物功能获得性基因筛选方法首次被提出(Ichikawa等2006), 可用于系统性研究植物基因的功能。FOX hunting system可以应用于各种植物, 这项技

术的运用并不依赖于该植物的基因组详细信息, 只需获得该植株的全长cDNAs即可。这一特性使得该项技术在不同植株的基因功能分析中具有很大优势, 因为在许多非模式植物中, 基因组的信息

收稿 2015-04-16 修定 2015-07-20

资助 国家自然科学基金(31470085和31201148)。

\* 通讯作者(E-mail: wangdj@henu.edu.cn; Tel: 0371-23881387)。

还很匮乏。另外,对于一些基因功能有冗余的多倍体植物功能基因组的研究,传统的功能缺失型突变很难奏效。比如,有些基因家族的成员较多,功能冗余,使用T-DNA插入技术突变其中一个基因,植株的表型与野生型相比并不会太大的改变。因此,对于这类基因的研究,FOX hunting system有它的独到之处。

FOX hunting system能够在转基因植株中超量表达单个或有限数量的目标基因的全长cDNA,这些异常表达的全长cDNA有可能会引起转基因植株显著的突变表型。根据研究者的实验目的对表型发生改变的功能获得型突变植株进行PCR筛选和测序分析,鉴定转基因突变植株中所携带外源基因及其功能。Ichikawa等(2006)将约10 000个独立的拟南芥全长cDNA进行均一化处理,在相同的摩尔比例下混合创建全长cDNA超表达文库并转入拟南芥,得到约15 000株超表达拟南芥全长cDNA的转基因拟南芥植株,通过以上实验获得了这些转化后的植株并命名为拟南芥FOX植株。运用同样的技术方法,有研究者也建立了FOX文库并对筛选出的部分拟南芥FOX植株进行筛选和功能分析,成功克隆了与高碳/氮胁迫、高海藻糖胁迫及毛状体发育相关的基因*ATL31 (CNI)*、*bZIP11*和*GT-2-LIKE1 (GTL1)* (Breuer等2009; Sato等2009; Ma等2011)。Kondou等(2009)利用FOX hunting system建立了23 000多株独立的水稻FOX拟南芥植株。并已经利用水稻FOX拟南芥植株分离克隆到一些水稻的功能基因(Higuchi-Taktch等2012; Dubouzet等2011)。在此基础上Sakurai等(2011)建立了水稻FOX数据库(rice FOX database)。目前,FOX hunting system已经成功应用到水稻功能基因的研究中。Kinoshita等(2007)建立了约12 000株转基因水稻,超表达水稻全长cDNA,命名为FOX水稻植株。通过对FOX水稻植株的表现型分析,发现了许多可见突变表型,包括矮化、失绿和灰绿、虚弱和致死、受伤害、生活周期缩短、愈伤组织变绿、窄叶和高分蘖等。FOX hunting system也可以用于逆境相关基因功能的研究。Fujita等(2007)根据转录因子的微阵列分析数据,将其中与逆境应答相关的43种胁迫诱导转录因子的全长cDNA混合转入到拟南芥。在鉴定T<sub>1</sub>代筛选出的

224株耐高盐胁迫植株时,发现这些抗性植株几乎都含有相同的转基因*AtbZIP60*。*AtbZIP60*基因编码bZIP型转录因子,与内质网相关,涉及盐胁迫和强光胁迫应答。

FOX hunting system技术首先在拟南芥中得到成功应用,并在水稻中也得到成功应用。Higuchi-Taktch等(2012)首先构建了13 000个水稻基因的全长cDNA文库,然后借助FOX hunting system技术构建了水稻FOX拟南芥超表达库。本研究运用FOX hunting system技术,构建了含70个油菜抗逆相关基因的FOX拟南芥文库,为油菜抗逆基因的快速筛选和功能鉴定奠定了基础,同时为油菜等多倍体大基因组且生育期较长的植物功能基因组的研究提供了新的思路。

## 材料与方法

### 1 实验材料

#### 1.1 植物材料

甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)品系R29是从20个来源不同的甘蓝型油菜品系中经抗旱性鉴定筛选出来的抗旱性较好的品系(王道杰等2012)。拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)为Col-0生态型。

#### 1.2 引物与载体图谱

实验所用的引物(表1)利用Primer 5.0软件设计并交由Invitrogen公司合成。

### 2 试验方法

#### 2.1 材料处理及RNA提取

Hoagland营养液置于长、宽、高为40 cm×30 cm×25 cm的塑料盒中,将饱满的种子消毒后均匀排列于尼龙网框上,间隔距离为2 cm。将尼龙网框置于塑料水盒中,漂浮在培养液上且种子接触液面。置于25 °C培养室中,16 h/8 h光/暗培养7 d后,用含20% (W/V) PEG-6000的Hoagland营养液处理12 h后取样,液氮速冻,TRIzol法提取RNA。

#### 2.2 cDNA合成及目的基因扩增

用First cDNA Synthesis Kit (TaKaRa)反转录合成cDNA第一链。以cDNA为模板,根据目的基因序列设计的上述70对引物,用KOD高保真酶(ToYoBo)进行PCR扩增。由于引物的GC%含量不同,因此退火温度也有所差异。先通过预实验选择合适的退火温度。扩增产物经电泳检测,回收

表1 引物编号及序列

Table 1 Primer ID and sequences

引物编号	引物序列(5'→3')	引物编号	引物序列(5'→3')
DrT1F	CACCATGGTGGGCACGAGGGT	DrT38F	CACCATGAAAAAACTCAAACCTCATGGATC
DrT1R	TCATTCCTTAGCCATTTAGC	DrT38R	CTAGTAAGTTCCCGAGAAGAAAAGG
DrT2F	CACCATGGGGATTTGCATGAGTGT	DrT39F	CACCATGAACACATTCCTGCGT
DrT2R	TCAGACAAACAGAGGCGAAG	DrT39R	CTAATAACTCCAAAGGGACACG
DrT3F	CACCATGGGTGAGAAGAAAAGTGACAGA	DrT40F	CACCATGAGCTCTGAGCAAAACAAC
DrT3R	TCAAAAAGTTCTTCTTGGTGGA	DrT40R	TCAAATCCTCTGGACTTTATCC
DrT4F	CACCATGTCTGGTAAAGGAGAAGGTC	DrT41F	CACCATGGCTGCTCCGGATCGA
DrT4R	TTAGTCGACCTCTTCGATCTTAG	DrT41R	CTACGAGCATAACGTGCTCTTCT
DrT5F	CACCATGGAGTGGGAGGAACAAG	DrT42F	CACCATGACGGAGCCGACGATGA
DrT5R	TTACTTCTTCTTCTTTGGTG	DrT42R	TTAACCAATCTTTGAGATTAACCTCG
DrT6F	CACCATGACCTCATTTTCTACCTTTTCT	DrT43F	CACCATGGAATTTGTAAGGTTTCCG
DrT6R	CTAATAACTCCAAAGGGACACG	DrT43R	TCAAGCAACTGGACTTGGAT
DrT7F	CACCATGGCTGTTGCGATGGATAT	DrT44F	CACCATGGCAACCCGCTCTCCTC
DrT7R	TCACTTGTAAAGGAGCAAAAATGA	DrT44R	TCACGCAATTCAGCGAT
DrT8F	CACCATGGAGGAGCTAGATCGTTTAC	DrT45F	CACCATGGCGACTGTAATCGACG
DrT8R	CTAAGCTTGGATGGGAATGTC	DrT45R	CTAGTGATTGAATCTATCATTCTCTG
DrT9F	CACCATGGAGGATGAGATAGATCGTTCC	DrT46F	CACCATGGTAAGAGAGAGATGGGAGAA
DrT9R	CTAATGCCGTTCTGCACTG	DrT46R	TTAGTCTTGCTTGGGAGAATC
DrT10F	CACCATGGTCGGAGCAAAACCTAT	DrT47F	CACCATGGGAGAAGAGTCAGAGGC
DrT10R	TCAAGCAGGTGTAGTAGAAGTCC	DrT48F	CACCATGTCGTCCACTTCTTTTACC
DrT11F	CACCATGAACTCAGTCTCTACTTTTTCTG	DrT48R	CTAGTACTTCAGCCCAAGGT
DrT11R1	CTAATAATTCCAGAGGTTTATGTC	DrT49F	CACCATGTCCAATGAAACCAAAAGATT
DrT12R	CTAATAACTCCAGAGGTTTATGTC	DrT49R	TCAATGCTCTTGCTTGAAGA
DrT13F	CACCATGACCTCATTTTCTGCCTTC	DrT50F	CACCATGGACCAGTACTCATCGTCTT
DrT13R	TTAATAACTCCAAAGGGACACKTC	DrT50R1	CTATTTCTCGGTTTGATTCTGTT
DrT14F	CACCATGGGTTGGATCCCGTG	DrT50R2	CTACTTGTCGGTTTGATTCTGTT
DrT14R	TCAGACCACCTCTTTGATCT	DrT51F	CACCATGTCTAATGAAACCAAAAGATCTAAC
DrT15F	CACCATGTTGGATTCTCTAGTGTGCGAA	DrT51R	TCAAGGTTCTTGTTGAAGAAAAC
DrT15R	CTAGTGATTAGAGTCATCAAATTGTC	DrT52F	CACCATGTACGGACAGAGCGAGGT
DrT16F	CACCATGAAGGCTGAGCTAAATTTACC	DrT52R	TTACACAACCTCGCATTTAC
DrT16R	TCACCCCTGATGACCAAAAAC	DrT53F	CACCATGGCATCGCTTTTGGAT
DrT17F	CACCATGAAAGCAGAGCTAAACTTACCT	DrT53R	TCAAGCTCTACTGAGATCAGTAGG
DrT17R	TTACCCCTGTGGAGCAAAAAC	DrT54F	CACCATGGGCTCAACTCCCTTCTG
DrT18F	CACCATGAAGGCGAGCTAAATTT	DrT54R	TCAAGCAGCTGAAGCAATT
DrT18R	TTACCCCTGAGAACCAAAAAC	DrT55F	CACCATGAATTTCAAGAACAACAACAAC
DrT19F	CACCATGAAAGCAGAGCTGAACTTACCA	DrT55R	TCACCAAGGTCTGACTCTG
DrT19R	TCACCCCTGTGGAGCAAAAAC	DrT56F	CACCATGGCCGAAGAGTACAAGAA
DrT20F	CACCATGAAAGCAGGGCTAAACTTACCA	DrT56R	TTAAGCATCAGACACCTTTTCT
DrT20R	TCACCCCTGTGGAGCAAAAAC	DrT57F	CACCATGGACGGTGGAAACGGGT
DrT21F	CACCATGTCAGAAATACAGCTGCCTC	DrT57R	TCAAACATTTGCTGATACTCTGGA
DrT21R	CTARTAAGGCTTGGGCATGTT	DrT58F	CACCATGGAGACTAATTCGTCTGGAG
DrT23F	CACCATGGTGAAAGCAGGGGCT	DrT58R	TCATGTTGAAGTTTGTGTTTCC
DrT23R	TTAGAAAGTTCTCTGCCGAACA	DrT59F	CACCATGGTTCTCGACGGAAAACG
DrT24F	CACCATGGGAGTTAGAGAGAAGGATCC	DrT59R	TCAGATCATAACAGCGTATCCC
DrT24R	TCATTGCCTAAACTCGTACATTTG	DrT60F	CACCATGTCTACCACCGGACAGATC
DrT25F	CACCATGGCGATTCTGCTTTTCG	DrT60R	TCAAGCACCCATGGTGATG
DrT25R	CTAGTAGCTGAACCAACAACATG	DrT61F	CACCATGGATCCTTACAAGTACCGTC
DrT26F	CACCATGGCCACTATCACCGTCG	DrT61R	CTAGATGCTTGGCCCTACGT
DrT26R	CTAGTACGGCTCCACAGGCT	DrT62F	CACCATGAAGATACAGTGTGATGTGTGTG
DrT27F	CACCATGACGATTAGAAGAGTGGGC	DrT62R	TTAGCCTAGATCAGGGACAATG

表1 (续)

引物编号	引物序列(5'→3')	引物编号	引物序列(5'→3')
DrT27R	TTATAATTCGCTTGATAGAACATAA	DrT63F	CACCATGGTGGCGTCAGCTTT
DrT28F	CACCATGATGAAGAGATTAAGCAGTTCAG	DrT63R	TTAGAGGTAAGTGAACAGGATACC
DrT28R	TCAGTTCCTGATCAACGG	DrT64F	CACCATGACGGGGAAGGCGTT
DrT29F	CACCATGGCGATTACGGTGCC	DrT64R	TCACGAGAAGATCCTGAAGAGG
DrT29R	TTAAAGCTTGAAGGAGACTTG	DrT65F	CACCATGGAGAAGTACGAGCTGGTG
DrT30F	CACCATGGCTGAAGAGTACAAGAACG	DrT65R1	TCAACTGATTCTCACTTCTCCG
DrT30R	TCATCCTTCTAAATCATCGGACT	DrT65R2	TCACACTTCTCCACTTGCGT
DrT31F	CACCATGACCTCATTCTGCCTTT	DrT67F	CACCATGTCGTCGGATGAGGAAG
DrT31R	CTAATAACTCCAAAGGGACACG	DrT67R	TCAAGAGGAAGAACAGCAAGAG
DrT32F	CACCATGACCTCATTCTACCTTCTCTG	DrT68F	CACCATGGCAGACAACAAGCAGAG
DrT32R	TTAATAACTCCAAAGGGACACG	DrT68R	CTACTTGTTTCATGCCGGTCT
DrT33F	CACCATGGCGATGTCWTTCTCAGG	DrT69F	CACCATGGGAAARAGCGAGGAAC
DrT33R	TCATGCCTTTGTRGTGTCCT	DrT69R	TTAGCGAGCAGCTACACCRT
DrT34F	CACCATGTTGAAAAGAAGAGAGTAATGAGAGTG	DrT70F	CACCATGGCTCTTGAGACTCTCAATTC
DrT34R	TTAGAAGGAMGGAACAATTCCATAA	DrT70R1	TTAAGATATCACAACCTGCGACTTG
DrT35F	CACCATGACCTCAGTTTCTGCGTTCT	DrT70R2	TCAACGTTTAGATATCACAACCTGC
DrT35R	TTAATAACTCCAGAGGGATATGTCG	M13F	GTAAAACGACGGCCAG
DrT36F	CACCATGAACTCAGTCTCTACTCTTCTGAA	M13R	CAGGAAACAGCTATGAC
DrT36R	CTAATAACTCCAGAGGTTTCATGTCA	AttB1	ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
DrT37F	CACCATGGTTGCTATTTTCAGAGATCA	AttB2	ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT
DrT37R	TCAACAAACAGGTCTTCCAAG		

纯化特异性的单一扩增片段。取1  $\mu\text{L}$  DNA纯化产物, 测量其浓度( $c$ ,  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ), 以每个DNA片段的长度(bp)表示其近似相对摩尔质量( $M$ ),  $c/M$ 为其近似摩尔浓度, 根据该近似摩尔浓度, 按比例混合70个目的基因的扩增产物。

### 2.3 Gateway入门文库构建

按照pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kits反应体系进行连接反应(PCR产物和载体的摩尔比例为1:1), 室温(22~23  $^{\circ}\text{C}$ )静置10 min。使连接产物转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞, LB固体抗性筛选培养基(50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 卡那霉素)上37  $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养筛选, 使长出的单菌落数量为克隆基因数目的10倍以上, 保证每个基因都成功克隆。随机挑选单菌落进行PCR鉴定。将所有的单菌落洗脱下来, 于LB液体培养基(50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 卡那霉素)中37  $^{\circ}\text{C}$ 、200  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养后提取质粒备用。

### 2.4 植物表达文库构建

根据Gateway® LR Clonase™ Enzyme Mix Kit (Invitrogen)说明书进行LR反应, 将目的基因片段由入门载体转移到表达载体pEarlygate100 (Earley等2006)中。按下面反应体系进行加样: 2  $\mu\text{L}$  Entry Clone (300  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ); 1  $\mu\text{L}$  pEarlygate100 (150

$\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ); 2  $\mu\text{L}$  5 $\times$ LR Clonase Reaction Buffer; 3  $\mu\text{L}$  TE Buffer。

混匀后加2  $\mu\text{L}$  LR Clonase™ Enzyme, 轻轻混合均匀, 25  $^{\circ}\text{C}$ 静置1 h。向反应液中加入1  $\mu\text{L}$ 的蛋白酶K (2  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) 37  $^{\circ}\text{C}$ 水浴10 min终止LR反应。取3  $\mu\text{L}$  LR反应液转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞, LB固体筛选培养基中37  $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养, 同样要保证长出的单菌落数量为克隆基因数目的10倍以上。随机挑选单菌落进行PCR鉴定。将所有的菌落洗脱下来, 于LB液体培养基(50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 卡那霉素)中37  $^{\circ}\text{C}$ 、200  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养后提取质粒备用。

### 2.5 农杆菌文库构建

取上述LR反应后转化成功的质粒电击转化农杆菌GV3101, YEP固体抗性筛选培养基(50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 卡那霉素+50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 利福平)进行筛选, 保证菌斑的数量是目的基因数目的10倍以上。随机挑取单菌斑进行PCR鉴定, 保证阳性克隆的效率为90%以上。将所有的阳性克隆洗脱下来, 置于250 mL YEP液体培养基(50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 卡那霉素+50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 利福平)中, 28  $^{\circ}\text{C}$ 、200  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 过夜培养, 保存菌种备用。

### 2.6 植物转化

种植野生型(Col-0)拟南芥, 待其生长到花蕾

期时进行转化。取保存的农杆菌菌液5  $\mu\text{L}$ 加入到5 mL含抗生素(50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 卡那霉素+50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 利福平)的YEP液体培养基中, 28  $^{\circ}\text{C}$ 、200  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养16 h活化菌种。取1 mL活化后的菌种接种到200 mL的YEP液体培养基(50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 卡那霉素+50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 利福平)中, 28  $^{\circ}\text{C}$ 、200  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 过夜培养至 $\text{OD}_{600}$ 为1.2~1.6。室温5 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心20 min。弃上清, 沉淀用1 mL缓冲液(1/4MS盐、5%的蔗糖、0.03%的Silwet L-77)重悬。用上述缓冲液将菌液 $\text{OD}_{600}$ 值调到0.8左右。将拟南芥花序浸入上述转化液中30 s, 用保鲜膜把整盘植株罩起来保湿, 培养室内避光处理24 h。去除保鲜膜, 将植株重新放置于培养室继续光照培养。一周后植株若长出新花蕾, 可重复浸染1次, 以提高转化效率。

## 2.7 转基因材料筛选鉴定

转基因植株收获的种子, 经干燥及2周以上的后熟处理, 于4  $^{\circ}\text{C}$ 放置3 d进行春化后, 均匀播撒在含有营养土的托盘中。约3 d之后, 视种子的萌发情况, 喷洒PPT (35  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 每隔1 d喷洒1次, 连续喷洒3次, 待无抗性的幼苗与有抗性的幼苗可以明显区分为止。挑取阳性单株移栽于营养钵。待拟南芥抽苔后, 剪1~2叶片, 提取DNA, 用载体上重组位点的通用引物attB1和attB2进行PCR扩增鉴定(扩增条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 56  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  2.5 min, 30个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min)。

## 2.8 FOX植株抗逆性鉴定

将拟南芥种子点在正常的MS培养基上, 竖直培养5 d, 根长大约为1 cm时, 挑取根长一致的植株, 摆到不同的处理板上, 生长7~10 d, 比较FOX植株与WT的差异, 差异比较明显的植株初步确定为突变株。筛选条件根据文献报道和预实验确定为NaCl 150  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、甘露醇 300  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、ABA 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。每种胁迫处理筛选1 000株。

## 实验结果

### 1 油菜抗逆相关基因的克隆

根据拟南芥抗逆信号转导研究相关文献和芯片数据库信息, 筛选拟南芥中对盐、旱、冷、高温等非生物胁迫相关的基因, 共筛选出80个与拟南芥逆境信号相关的基因。以这些基因为种子序列, 与油菜基因组序列进行同源性比对, 筛选出相似度极高的具完整ORF的EST序列70条。

以课题组前期筛选出的耐旱油菜品系R29为材料, 经PEG-6000胁迫处理后提取的RNA反转录合成的cDNA为模板进行PCR扩增, 设计的70对引物全部扩增出预期大小的目的基因片段, 部分基因的扩增结果如图1所示。

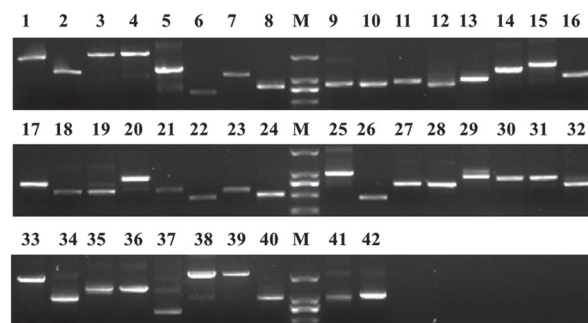


图1 油菜潜在抗逆相关基因PCR扩增  
Fig.1 Potential stress resistant genes were amplified by PCR  
1~42: 扩增的目的基因; M: DL2000 Marker.

### 2 油菜抗逆相关基因文库构建

上述目的片段回收后进行定量, 等摩尔混匀后克隆入Gateway入门载体pENTR™/D-TOPO®。为了保证每个目的片段都能够克隆入载体, 转化后的菌斑数至少应为目的基因数的10倍以上, 即至少达到70×10=700个克隆。经估算, 培养出的菌落有1 000个以上(分布于不同培养皿)。每个培养皿随机挑选40个单菌落进行PCR鉴定, 阳性克隆数达到97%以上。克隆的70个目的基因的长度在465~2 310 bp之间, 菌落PCR结果(图2-A)显示不同大小的片段随机分布在500~3 000 bp之间, 表明目的片段均已克隆成功。

上述入门文库菌落培养后提取质粒, 与植物表达载体pEarlygate100 (Earley等2006)等摩尔比例混合进行LR反应, 使目的基因由入门载体转移到植物表达载体上, 即植物表达文库。这一转化步骤同样要保证单菌落数量为目的基因数的10倍以上。随机挑取单菌落进行PCR鉴定, PCR产物电泳结果(图2-B)显示, 绝大多数克隆为单一条带, 少量克隆为双带(5%), 条带大小依然随机分布在500~3 000 bp之间, 表明目的片段均已成功克隆入表达载体上。每个平板随机选取的50个菌斑PCR鉴定结果表明, 阳性克隆占95%以上。

将LR反应后转化长出的菌落全部洗脱下来,

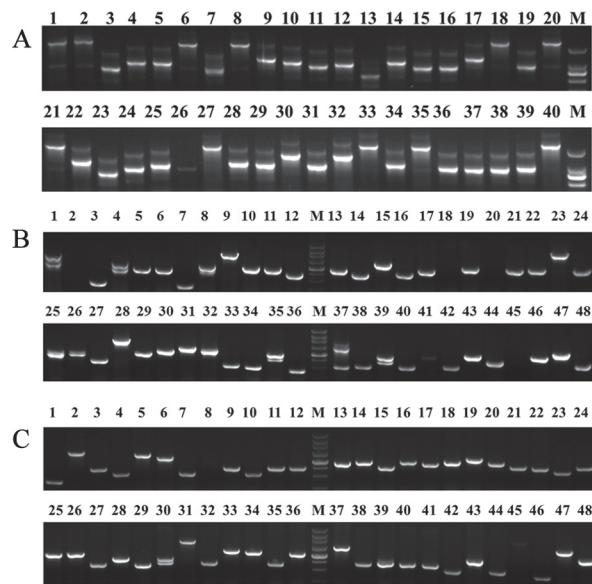


图2 不同文库单菌落PCR鉴定

Fig.2 Identification of single colony by PCR in different library

A: 入门文库, B: 表达文库, C: 农杆菌文库; M: DNA Marker III。数字指示不同文库随机挑选的单菌落PCR扩增产物。

富集培养后提取质粒, 电击转化农杆菌GV3101, 构建农杆菌文库用于植物的转化。为了保证70个目的基因全部成功转化入农杆菌, 同样要保证单菌落数量大于700个。每个培养皿随机挑选48个单菌落进行PCR鉴定, 结果显示, 阳性克隆占95%以上, 条带的大小随机分布于500~3 000 bp之间(图2-C), 克隆数约覆盖基因文库容量的9.5倍。其中多数为单一特异性条带, 双条带仅占2%。将所有菌落洗脱下来培养后保存菌种备用。

### 3 油菜FOX拟南芥文库构建

农杆菌文库转化Col-0野生型拟南芥626个单株, 其中558株正常结实。两批转化共收获种子约30 000粒。苗期经PPT筛选, 共获得381株抗性单株, 其中第1批69株, 第2批312株。部分植株的PCR鉴定结果如图3所示。PCR鉴定结果显示, 第1批69株抗性株中, 含单一插入片段的有55株, 双片段插入的9株, 插入3个片段的2株, 3株未扩增出条带, 为PPT筛选的假阳性植株。第2批312株抗性株中, 含单一片段的203株, 双片段插入的77株, 3片段插入的7株, 4个片段插入的2株, 23株未扩增出条带, 为PPT筛选的假阳性植株。阳性单株培养后混收种子, 构建成一个小型的油菜-FOX-拟南芥文库。

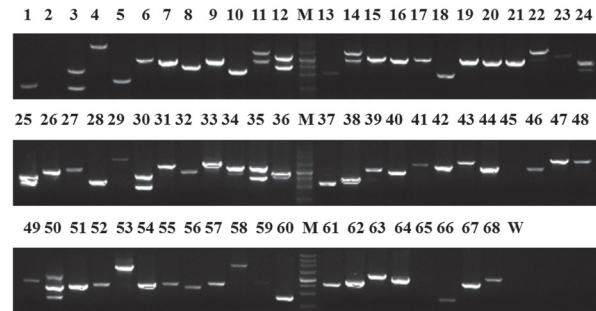


图3 转基因植株PCR鉴定

Fig.3 Identification of transgenic plants by PCR

1~68: 不同转基因植株的PCR鉴定结果; W: 野生型; M: DNA Marker 250 bp。

### 4 FOX植株的抗逆性筛选

根据文献报道及浓度梯度预实验结果, 选取300 mmol L<sup>-1</sup>的甘露醇、150 mmol L<sup>-1</sup>的NaCl、30 μmol L<sup>-1</sup>和5 μmol L<sup>-1</sup>的ABA进行抗逆植株的筛选, 主要筛选指标为根长及子叶变绿情况。部分FOX植株与WT有明显差异, 将这些差异明显的植株标记后移入营养钵中培养。经统计, 目前在甘露醇、NaCl和ABA板上分别筛选到根长不敏感表型植株12、31和25株, 根长敏感植株分别为16、28和21株。在甘露醇和NaCl板上分别筛选到子叶变绿不敏感植株9株和2株(表2)。这些结果初步表明我们构建的油菜-FOX-拟南芥文库是有效的, 将油菜可能的抗逆基因转入拟南芥后, 确实可以筛选到逆境胁迫相关的FOX植株, 同时说明这一方法可以用于大量基因的初步鉴定工作, 快速验证基因的功能。

### 5 T<sub>1</sub>代表型变异株鉴定

单株种植T<sub>1</sub>代转基因苗的过程中发现5株表型异常植株, 这些植株表现为植株矮小、叶片发

表2 FOX植株抗逆性筛选结果统计

Table 2 Statistics of stress selection in rape-FOX-*Arabidopsis* library

筛选条件	根长相关表型植株/株		子叶变绿表型植株/株	
	不敏感	敏感	不敏感	敏感
甘露醇300 mmol·L <sup>-1</sup>	12	16	9	0
NaCl 150 mmol·L <sup>-1</sup>	31	28	2	0
ABA 30 μmol·L <sup>-1</sup>	10	11		
ABA 5 μmol·L <sup>-1</sup>	15	10		

育畸形、抽苔早、花期较短等表型(图4-A)。提取这些表型异常株的叶片DNA, 利用载体上的通用引物PCR扩增插入片段(图4-B), 产物回收后测序, 经生物信息学分析, 扩增到的序列确为转入的油菜序列而非拟南芥序列。经Blast比对分析, 获得这些表型异常的单株中所转入的目的基因及其同源的拟南芥基因信息(表3)。从PCR扩增产物电泳结果及测序信息可知, T<sub>1</sub>-11和T<sub>1</sub>-14为双基因转化株, T<sub>1</sub>-20、T<sub>1</sub>-32和T<sub>1</sub>-66为单基因转化株(图4-B)。

## 讨 论

随着油菜基因组测序的完成, 功能基因组学的研究迫在眉睫。但目前应用于油菜功能基因组学研究的遗传材料及技术依然匮乏。油菜是异源四倍体植物, 多数基因存在冗余, 因此如果利用T-DNA或者转座子插入突变体进行基因功能研究时, 转化周期长, 工作量大, 单独沉默某一基因, 由于有冗余基因的功能存在, 有时并不能获得具有明显突变表型的突变体。而且甘蓝型冬油菜为两年生越冬植物, 直接在油菜体内通过超表达或沉默的方式研究基因的功能周期较长, 受自然条件影响较大。另外, 构建重组自交系和近等基因系进行QTL定位, 开发SSR等多态性标签等方式耗时费力, 且往往不能进行精细定位。本研究采用FOX hunting system技术和Gateway技术建立了油菜抗逆相关基因高通量克隆和功能分析体系。不同于

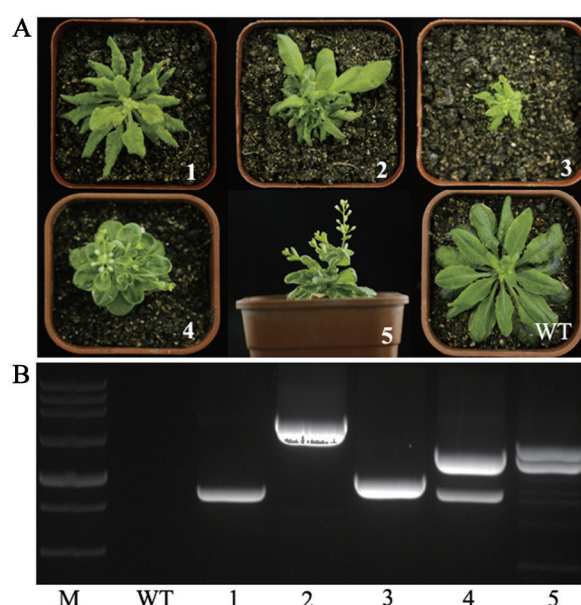


图4 T<sub>1</sub>代表型突变株及目的基因克隆

Fig.4 Identification of T<sub>1</sub> plants with mutant phenotypes and cloning of target genes

A: 表型突变体苗期植株生长状况; 其中, 1: T<sub>1</sub>-20; 2: T<sub>1</sub>-32; 3: T<sub>1</sub>-66; 4: T<sub>1</sub>-11; 5: T<sub>1</sub>-14; WT: Col-0野生型拟南芥。B: 表型突变体目的基因PCR扩增结果; 其中, M: DNA Marker III; WT: Col-0野生型拟南芥; 1: T<sub>1</sub>-20; 2: T<sub>1</sub>-32; 3: T<sub>1</sub>-66; 4: T<sub>1</sub>-11; 5: T<sub>1</sub>-14。

传统的功能缺失型(loss of function)研究方法, 在转基因植株中表达单个或有限数量的目的基因全长cDNA就可能引起转基因拟南芥植株明显的表型变化。

表3 有突变表型的T<sub>1</sub>突变体基因信息

Table 3 Information of inserted genes in the morphological mutant T<sub>1</sub> plants

编号	引物	插入基因	同源的拟南芥基因	基因注释
T1-11a	DrT7	AF2445201	AT1G74960	编码质体β-酮酯酰合成酶II, 参与16:0-ACP到18:0-ACP脂肪酸的延伸。基因敲除纯合子突变体胚致死, 表明胚的早期发育对16:0含量的升高是敏感的。
T1-11b	DrT61	JN163870.1 U68219.2	AT1G20630	利用亚铁血红素作为辅因子催化过氧化氢的还原。H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 可保护细胞免受毒性。
T1-14a	DrT21	AY245884.1	AT4G27410	编码干旱响应的NAC转录因子, 定位于细胞核, 在ABA介导的干旱响应中作为转录激活因子。
T1-14b	DrT22	AY245885.1		
	DrT26	AY307449.1	AT2G36530	参与光依赖的耐冷性反应, 编码烯醇化酶, 是磷酸化酪氨酸蛋白, 在拟南芥种子中磷酸化状态调控对ABA的响应。
T1-20	DrT34	AY496442.1 AY356370.1	AT5G15850	花期调控基因CONSTANS的同源基因。
T1-32	DrT8	AF314811.1	AT2G39800	编码一个Δ1-吡咯啉-5-羧酸合成酶, 此酶是脯氨酸生物合成中的限速酶。
T1-66	DrT17	AY245880.1	AT5G63790	编码NAC家族的一个转录因子。ANAC102在幼苗萌发期介导低氧胁迫(缺氧)的响应。
	DrT19	AY245882.1		
	DrT20	AY245883.1		

在材料的选取上,我们选择前期筛选出的耐旱性油菜品系R29幼苗进行胁迫处理后提取RNA,合成cDNA后作为基因扩增的模板。由于70个潜在抗逆相关基因中多数为逆境胁迫诱导表达的基因,预实验结果显示,未经胁迫处理的材料提取的RNA,有些基因不能有效得到扩增。因此,我们选用20% PEG-6000 (*W/V*)对材料进行处理后再提取RNA。另外,我们的前期研究发现,干旱胁迫相关基因的表达时间分布在PEG-6000处理后0.5~48 h内(王道杰等2012)。因此,我们选取不同时间段进行取样,等比例混合后,液氮冷冻,提取RNA,以此提高抗逆相关基因的表达和扩增效率。

研究所用的表达载体pEarley100上含有*ccdB*自杀基因,该基因翻译产物抑制质粒在F因子缺失的*E. coli*中复制。未参加LR反应重组的表达载体转化的细胞不能正常生长而被排除。发生位点特异性重组的入门载体中被置换进了*ccdB*基因,因此参加反应后的入门载体也被排除,另外载体上的抗生素筛选标记也增加了表达载体构建的选择效率。经PCR验证,阳性克隆效率均达到90%以上,菌落数量覆盖文库容量9倍以上。除此之外,还有一部分未参加反应的入门载体,由于其抗生素筛选标记和表达载体相同,转化大肠杆菌后无法通过抗生素筛选来排除。但未参加LR重组反应的入门载体中不含有农杆菌复制起点,即不能在农杆菌中复制,因此,这一小部分可能存在的未参加LR重组反应的入门载体转化的农杆菌不能产生抗性而无法存活下来。也可以被排除。通过对农杆菌GV3101的转化鉴定,目的基因的克隆效率进一步提高到95%以上,约覆盖目的基因文库容量的9.5倍,保证了所有目的基因包括在文库中。

### 参考文献

- 王道杰, 杨翠玲, 桂月靖, 张书芬, 朱家成, 王建平(2012). 油菜抗旱性及鉴定方法与指标. I. 油菜早期抗旱性鉴定模拟技术体系构建. 西北农业学报, 20 (12): 77~82
- Breuer C, Kawamura A, Ichikawa T, Tominaga-Wada R, Wada T, Kondou Y, Muto S, Matsui M, Sugimoto K (2009). The trihelix transcription factor GTL1 regulates ploidy-dependent cell growth in the *Arabidopsis* trichome. *Plant Cell*, 21: 2307~2322
- Dubouzet JG, Maeda S, Sugano S, Ohtake M, Hayashi N, Ichikawa T, Kondou Y, Kuroda H, Horii Y, Matsui M et al (2011). Screening for resistance against *Pseudomonas syringae* in rice-FOX *Arabidopsis* lines identified a putative receptor-like cytoplasmic kinase gene that confers resistance to major bacterial and fungal pathogens in *Arabidopsis* and rice. *Plant Biotech J*, 9: 466~485
- Earley KW, Haag JR, Pontes O, Opper K, Juehne T, Song K, Pikaard CS (2006). Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J*, 45: 616~629
- Fujita MI, Mizukado S, Fujita Y, Ichikawa T, Nakazawa M, Seki M, Matsui M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2007). Identification of stress-tolerance-related transcription-factor genes via mini-scale Full-length cDNA Over-eXpressor (FOX) gene hunting system. *Biochem Biophys Res Commun*, 364: 250~257
- Higuchi-Takeuchi M, Mori M, Matsui M (2012). High-throughput analysis of rice genes by means of the heterologous full-length cDNA overexpressor (FOX)-hunting system. *Int J Dev Biol*, 57: 517~523
- Ichikawa T, Nakazawa M, Kawashima M, Iizumi H, Kuroda H, Kondou Y, Tsubara Y, Suzuki K, Ishikawa A, Seki M et al (2006). The FOX hunting system: an alternative gain-of-function gene hunting technique. *Plant J*, 48: 974~985
- Kinoshita A, Nakamura Y, Sasaki E, Kyozuka J, Fukuda H, Sawa S (2007). Gain-of-function phenotypes of chemically synthetic CLAVATA3/ESR-related (CLE) peptides in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. *Plant Cell Physiol*, 48: 1821~1825
- Kondou Y, Higuchi M, Takahashi S, Sakurai T, Ichikawa T, Kuroda H, Yoshizumi T, Tsumoto Y, Horii Y, Kawashima M et al (2009). Systematic approaches to using the FOX hunting system to identify useful rice genes. *Plant J*, 57: 883~894
- Ma J, Hanssen M, Lundgren K, Hernández L, Delatte T, Ehlert A, Liu CM, Schlupepman H, Dröge-Laser W, Moritz T et al (2011). The sucrose-regulated *Arabidopsis* transcription factor bZIP11 reprograms metabolism and regulates trehalose metabolism. *New Phytol*, 191: 733~745
- Sakurai T, Kondou Y, Akiyama K, Kurotani A, Higuchi M, Ichikawa T, Kuroda H, Kusano M, Mori M, Saitou T et al (2011). RiceFOX: a database of *Arabidopsis* mutant lines overexpressing rice full-length cDNA that contains a wide range of trait information to facilitate analysis of gene function. *Plant Cell Physiol*, 52: 265~273
- Sato T, Maekawa S, Yasuda S, Sonoda Y, Katoh E, Ichikawa T, Nakazawa M, Seki M, Shinozaki K, Matsui M et al (2009). CNI1/ATL31, a RING-type ubiquitin ligase that functions in the carbon/nitrogen response for growth phase transition in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J*, 60: 852~864