

AtCS82 基因 T-DNA 插入突变体筛选和 过表达转基因植株的获得

陈锦华^a, 郭磊^b, 易力雄^a, 刘春林^b, 阮颖^{a*}

(湖南农业大学 a.生物科学技术学院; b.农学院, 湖南 长沙 410128)

摘 要: *AtCS82* 是拟南芥中一个功能未知的基因, 推测该基因可能与种子油脂合成代谢相关。为探明 *AtCS82* 基因的功能, 采用半定量 RT-PCR 法对 *AtCS82* 基因在拟南芥不同组织(茎、叶、花、果荚)中的表达情况进行了分析, 发现其在果荚中的表达量较高, 而在茎、叶、花中的表达量明显偏低, 推测 *AtCS82* 基因可能参与种子发育; 使用三引物法对 T-DNA 插入突变体进行纯合子筛选, 并通过 RT-PCR 检测纯合子植株中 *AtCS82* 基因的表达情况, 试验结果证明获得了稳定遗传的 *AtCS82* 基因沉默纯合突变体; 通过构建 *pCambia1300-35S::CS82* 过表达载体, 并转化拟南芥哥伦比亚野生型(Col)的方式, 获得了 *AtCS82* 基因的过表达转基因植株。

关 键 词: 拟南芥; *AtCS82* 基因; 纯合子筛选; 过表达; 转基因植株

中图分类号: Q786

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2013)03-0253-06

Screening of T-DNA insertion mutants and construction of plants with *AtCS82* over expressed

CHEN Jin-hua^a, GUO Lei^b, YI Li-xiong^a, LIU Chun-lin^b, RUAN Ying^{a*}

(a. College of Bioscience and Biotechnology; b. College of Agronomy, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: The function of *AtCS82* gene in *Arabidopsis* is still unknown, but it is supposed to be associated with seed oil anabolism. To investigate the function of *AtCS82* gene, semi-quantitative RT-PCR was used to analyze the expression of *AtCS82* gene in different tissues of *Arabidopsis* (stem, leaf, flower, pod), the results show expression of *AtCS82* gene was high in pod, but low in stem, leaf and flower, indicating the participation of *AtCS82* gene in seed development. Three primers were used to screen homozygous mutants with T-DNA insertion, and the expression of *AtCS82* gene in homozygous mutant plant was tested using RT-PCR, the results proved the obtaining of stable pure mutant with *AtCS82* gene silenced. *AtCS82*-overexpressing transgenic plants were obtained by constructing *pCambia1300-35S::CS82* recombinant plasmid, followed by transforming into *Arabidopsis thaliana* of Columbia ecotype (Col).

Key words: *Arabidopsis thaliana*; *AtCS82* gene; screening homozygous mutant; over expression; transgenic plants

目前, 油菜已成为第三大经济作物^[1], 而菜籽油已经成为第二大植物油^[2]。油菜菜籽油产量及其品质的提高一直是油菜育种工作者重点关注的问题, 而探寻脂肪酸代谢调控机理是油菜分子育种研

究的一项重要内容。目前, 关于植物脂肪酸合成的部位与主要生化过程的研究成果^[3-5]较多, 而对其分子调控机理的报道较少。甘蓝型油菜为异源四倍体, 且生长周期较长, 研究难度较高。相比之下,

收稿日期: 2013-03-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071455)

作者简介: 陈锦华(1989—), 女, 湖南新化人, 硕士研究生, 主要从事植物分子生物学研究, kongbai122@yahoo.com.cn; *通信作者, yingruan@hotmail.com

同属十字花科的拟南芥具有植株小、生长周期短、易于转化、基因组小且遗传信息丰富^[6]等优点,加之二者在基因组结构上有一定的保守性^[7-12],拟南芥中的许多功能基因与油菜中的同源基因具有相似的功能^[13],这使得人们可以利用拟南芥的生物信息和 DNA 资源,通过对拟南芥中同源基因的研究来加快对油菜基因组的研究。

本课题组在系统分析油菜种子发育和代谢产物转化过程的基础上,以开花后 20 d 和 35 d 的油菜种子作为抑制性消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)的材料,构建了油菜种子发育中同化产物转化 2 个关键时期的 SSH 文库^[14]。以该 SSH 文库为基础,分析 EST 序列^[15],并与拟南芥基因比对,筛选得到一个同源性较高、预期与油脂合成代谢相关的拟南芥基因序列,命名为 *AtCS82*。

为了从分子水平研究 *AtCS82* 基因的功能,首先需要获得 *AtCS82* 基因沉默的纯合突变体和过表达转基因植株。笔者通过对 T-DNA 插入突变体的筛选,获得了 1 株稳定遗传的 *AtCS82* 基因沉默纯合突变体株系;通过构建 *pCAMBIA1300-35S::CS82* 过表达载体,并转化拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)哥伦比亚野生型(Col),获得了 *AtCS82* 基因的过表达转基因植株,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)哥伦比亚生态型(Col)由湖南农业大学植物发育与表观遗传调控实验室保存;*AtCS82* 基因 T-DNA 插入突变体 *cs82* 种子购自美国俄亥俄州立大学拟南芥生物资源中心。将拟南芥种子播种于盛有浸透营养液的蛭石的小钵中,避光 4℃ 春化 3 d,转至 22℃、16 h(光)/8 h(暗)光周期下培养,每周浇灌 1~2 次营养液。以生长 45 d 的 Col 野生型植株为试验材料,进行 *AtCS82* 基因表达水平分析;以生长 25 d 的突变体植株为试验材料,进行纯合子筛选。

1.2 *AtCS82* 基因 T-DNA 插入纯合突变体的筛选

1.2.1 拟南芥不同组织中 *AtCS82* 的表达水平检测

为了探寻 *AtCS82* 基因在拟南芥不同组织中的

表达水平,根据 TAIR 网站(<http://www.arabidopsis.org>)上公布的拟南芥 *AtCS82* 基因 cDNA 序列,采用 Primer Premier 5 引物设计软件设计了 1 对引物 CS82-S/CS82-A。引物序列为:CS82-S, 5'-ATGAATGCTATTAAGTTTGTGTAC-3'; CS82-A, 5'-TCACGGTTTAGGCCCG-3'。

分别取生长 45 d 的 Col 野生型拟南芥的茎、叶、花及生长 4、7 d 的果荚,采用 Trizol 法^[16]提取各组织的总 RNA,将其反转录为 cDNA,以 CS82-S/CS82-A 为引物,进行 PCR 扩增。预期 PCR 产物大小为 432 bp。

1.2.2 T-DNA 插入纯合子的三引物检测

使用三引物法^[15]筛选 T-DNA 插入纯合突变体(以下简称纯合突变体)基因型的鉴定需要 3 条引物(LP、RP 和 BP),使用 T-DNA Primer Desig 网站(<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>)提供的在线工具设计所需的 3 条引物,序列分别为:CS82-F(LP), 5'-GGCCTAGACCGAAAGCAATAC-3'; CS82-R(RP), 5'-CAACAACCGTTGTTTTTCCTG-3'; LBb1.3(BP), 5'-TAGCATCTGAATTCATAACC AATCTCGATACAC-3'。

将购买的突变体 *cs82* 种子播种于盛有蛭石的小钵内,待植株生长 25 d 后,随机选取 10 株(编号为 *cs82-1* ~ *cs82-10*)生长良好者,以 Col 野生型拟南芥为对照,分别提取全基因组 DNA,分别采用 LP/RP 和 BP/RP 引物组合,以全基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,根据电泳结果判断该植株是否为纯合突变体。LP/RP 和 BP/RP 预期 PCR 产物大小分别为 1 220 bp 和 559~859 bp。

1.2.3 纯合突变体中 *AtCS82* 表达的 RT-PCR 验证

根据表达部位分析试验的结果,选取适当生长时期的已初步鉴定的纯合突变体和 Col 野生型拟南芥的适当组织作材料,提取总 RNA,反转录为 cDNA,以 CS82-S/CS82-A 为引物,进行 RT-PCR 检测。

1.3 *AtCS82* 基因过表达载体的构建

1.3.1 引物设计及 *AtCS82* 全长 CDS 片段的克隆

根据 TAIR 网站上公布的拟南芥 *AtCS82* 基因序列,采用 Primer Premier 5 引物设计软件设计 1

对引物 82CDS-F/82CDS-R, 用来扩增 *AtCS82* 基因的全长 CDS, 预期扩增产物大小为 432 bp。根据载体 *pCAMBIA1300-35S* 带有的限制性酶切位点, 在正反引物的 5' 端分别加上 *XbaI* 和 *SacI* 位点, 序列为: 82CDS-F, 5'-GCTCTAGAATGAATGCTATTAAGTTTGTGTAC-3' (下划线部分为 *XbaI* 位点); 82CDS-R, 5'-CGAGCTCTCACGGTTTAGGCCCCG-3' (下划线部分为 *SacI* 位点)。根据合成引物的预测退火温度设计 PCR 的温度梯度, 确定了引物 82CDS-F/82CDS-R 的最适退火温度为 59 °C。

以 Col 野生型拟南芥为材料, 采用 Trizol 法提取拟南芥叶片总 RNA, 并将其反转录为 cDNA。以该 cDNA 为模板, 82CDS-F/82CDS-R 为引物, 扩增得到 *AtCS82* 基因的全长 CDS。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳初步检测后切胶回收并纯化, 然后使用 pMD®19-T Vector 试剂盒连接到 pMD19-T 载体上, 构成 pMD19-T-*AtCS82* 载体。采用热激法^[17]将此载体转化到感受态大肠杆菌 DH5 α 中, 挑选阳性克隆送博尚生物公司测序。

1.3.2 载体连接及农杆菌 GV3101 的转化

用 *XbaI* 和 *SacI* 限制性内切酶分别对 pMD19-T-*AtCS82* 和 *pCAMBIA1300-35S* 载体进行双酶切。经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳初步检测后分别回收目的片段和目的载体。用 Rapid DNA Ligation Kit 试剂盒将 *AtCS82* 全长 CDS 连接至 *pCAMBIA1300-35S* 载体的相应位点, 构建 *pCAMBIA1300-35S::CS82* 过表达载体。采用冻融法^[17]将构建好的过表达载体转化到根癌农杆菌 GV3101 中, 挑取阳性克隆进行菌落 PCR 鉴定和双酶切鉴定。

1.4 根癌农杆菌介导的拟南芥的遗传转化以及转化子的筛选和鉴定

挑取经验证已转入 *pCAMBIA1300-35S::CS82* 过表达载体的阳性根癌农杆菌单菌落于含有卡那霉素(50 mg/L)、庆大霉素(30 mg/L)和利福平(100 mg/L)的 YEB 液体培养基中活化, 采用浸花法^[17]转化 Col 野生型拟南芥, 并收获 T₀ 代种子。将收获的 T₀ 代种子铺在含有潮霉素(20 mg/mL)的 MS 固体培养基上, 待植株生长 15 d 后, 将抗性植株移栽至蛭石中。为了检测目的片段是否已经整合到转化子

的基因组上, 根据 *pCAMBIA1300-35S::CS82* 载体序列信息, 设计 1 对检测引物, 序列分别为: 1300JC-F, 5'-GACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTT-3'; 1300JC-R, 5'-TCACGGTTTAGGCCCCG-3'。

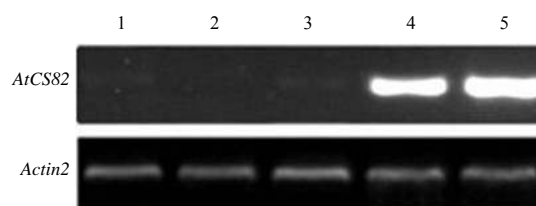
用 CTAB 法^[17]提取抗性植株总 DNA, 以此作模板, 用 1300JC-F/1300JC-R 进行 PCR 检测, 鉴定转化子。

2 结果与分析

2.1 T-DNA 插入纯合突变体的筛选结果

2.1.1 *AtCS82* 基因在拟南芥不同组织的表达情况

拟南芥不同组织中 *AtCS82* 表达情况电泳结果(图 1)表明, *AtCS82* 在 4 d 和 7 d 的果荚中表达量较高, 其中在 7 d 果荚中的表达量又稍高于 4 d 果荚的表达量, 而在茎、叶、花中的表达量明显偏低; 因此, 在对纯合突变体植株的 RT-PCR 验证试验中, 将采用生长 7 d 的果荚作为试验材料。



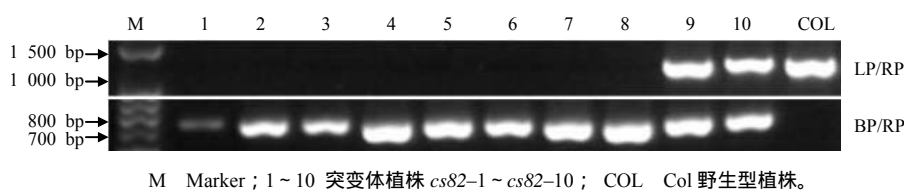
1 茎; 2 叶; 3 花; 4 花后 4 d 的果荚; 5 花后 7 d 的果荚。

图 1 拟南芥不同组织中 *AtCS82* 基因表达电泳结果

Fig.1 Expression analysis for *AtCS82* gene in different tissues

2.1.2 突变体植株 DNA 水平的检测结果

从 T-DNA 插入突变体植株 DNA 水平检测的 PCR 产物凝胶电泳图谱(图 2)可知, 作为对照的 Col 型植株由于没有 T-DNA 插入, 只有以 LP/RP 为引物时才有扩增条带, 以 BP/RP 为引物时没有扩增条带; 受试的 10 个 *AtCS82* 基因 T-DNA 插入突变植株中, *cs82-1* ~ *cs82-8* 只有以 BP/RP 为引物时才有扩增条带, 而 *cs82-9*、*cs82-10* 以 LP/RP 和 BP/RP 这 2 对引物进行扩增时均有扩增条带。这一结果说明, *cs82-1* ~ *cs82-8* 为 *AtCS82* 基因 T-DNA 插入纯合突变体, *cs82-9*、*cs82-10* 为 *AtCS82* 基因 T-DNA 插入杂合突变体。



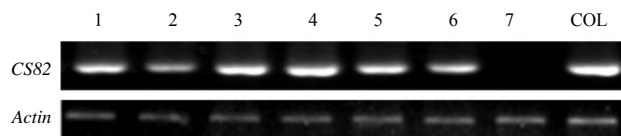
M Marker; 1~10 突变体植株 *cs82-1* ~ *cs82-10*; COL Col 野生型植株。

图2 *cs82* 纯合突变体 PCR 检测结果

Fig.2 PCR detection of *cs82* homozygous mutants

2.1.3 RT-PCR 验证结果

初步鉴定出的纯合突变体 *cs82-1* ~ *cs82-7* 的 RT-PCR 电泳结果(图 3)显示,作为对照的 Col 野生型拟南芥有扩增产物,与其比较,有 6 株纯合突变体(*cs82-1* ~ *cs82-6*)有明显扩增产物,而 *cs82-7* 没有扩增产物。这一结果说明,在 *cs82-7* 植株中 *AtCS82* 基因的表达因 T-DNA 插入而被完全沉默。将验证后的 *cs82-1* ~ *cs82-7* 植株继续培养,分单株收取种子,分别标注、保存、备用,其中 *cs82-7* 纯合突变体经 DNA 水平检测和 RT-PCR 检测,证实为 *AtCS82* 表达完全沉默的纯合突变体,可以作为研究



1~7 纯合子突变体 *cs82-1* ~ *cs82-7* COL 野生对照植株。

图3 纯合突变体内 *AtCS82* 基因的转录情况

Fig.3 *AtCS82* gene transcription of the homozygous mutants

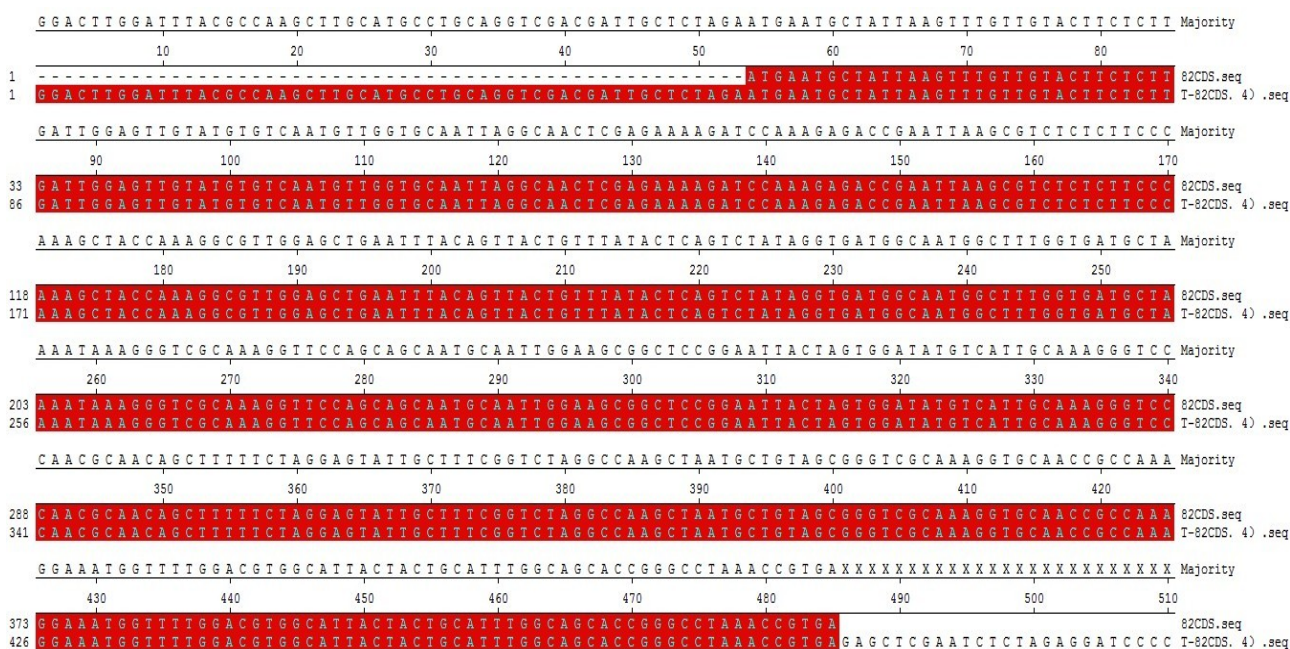


图5 序列比对结果

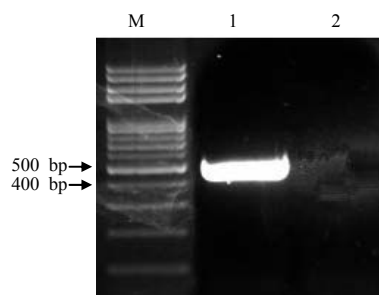
Fig.5 Result of sequence alignment

AtCS82 基因对植物生长发育的影响的试验材料。

2.2 *AtCS82* 基因过表达载体构建

2.2.1 目的片段的克隆结果

AtCS82 全长 CDS 的 PCR 电泳结果(图 4)表明,扩增得到了约 400~500 bp 的产物条带,其大小与预期的 *AtCS82* 基因全长 CDS 长度 432 bp 一致。



M Marker; 1 PCR 产物; 2 阴性对照。

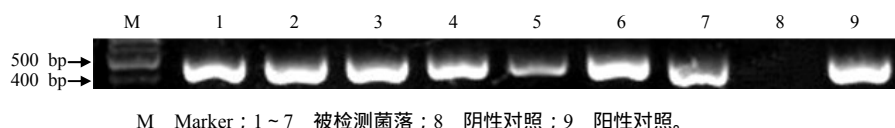
图4 *AtCS82* 全长 CDS 的克隆结果

Fig.4 Cloning of *AtCS82* full length CDS

测序结果(图 5)表明,扩增产物与 TAIR 网站上公布的 *AtCS82* 基因全长 CDS 序列同源率为 100%, 表明克隆结果正确,可以用于下一步试验。

2.2.2 重组质粒的构建结果

农杆菌 GV3101 单菌落的 PCR 结果(图 6)表明,所挑取的 7 个单菌落均为已转入 *pCambia1300-35S::CS82* 过表达载体的阳性菌落。

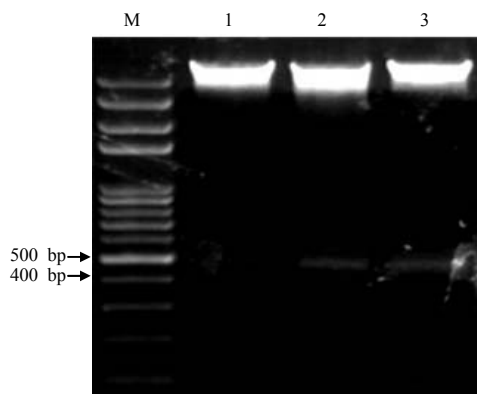


M Marker; 1~7 被检测菌落; 8 阴性对照; 9 阳性对照。

图 6 根癌农杆菌 GV3101 菌落 PCR 检测结果

Fig. 6 PCR detection of *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 colonies after transfection

用 *Xba*I 和 *Sac*I 限制性内切酶双酶切重组质粒,得到 1 条大小约为 400~500 bp 的条带(图 7),这与预期条带的大小相符,表明 *pCambia1300-35S::CS82* 过表达载体构建成功。



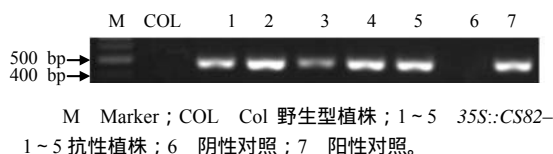
M Marker; 1 重组载体; 2~3 *Xba*I、*Sac*I 双酶切。

图 7 重组质粒的酶切验证结果

Fig. 7 Identification of recombinant vector by restriction enzyme digestion

2.3 转化子的获得和鉴定

从含有潮霉素的 MS 培养基上筛选出抗性苗 5 株(35S::CS82-1~35S::CS82-5)。PCR 产物的电泳结果(图 8)显示,Col 野生型没有出现条带,而 5 株转基因植株(1~5 号泳道)的 PCR 产物条带大小与阳性质粒对照(7 号泳道)的 PCR 产物片段一致,证明获得了 5 株转基因植株。



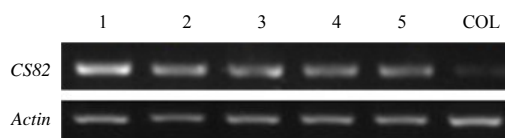
M Marker; COL Col 野生型植株; 1~5 35S::CS82-1~5 抗性植株; 6 阴性对照; 7 阳性对照。

图 8 抗性植株的 PCR 检测结果

Fig. 8 PCR identification of transgenic plants with hygromycin-resistance

2.4 转基因植株的过表达分析

转基因植株的过表达分析电泳结果(图 9)显示, *AtCS82* 基因在 5 株转基因植株中的表达明显高于野生型植株,说明 *AtCS82* 基因在 CaMV35S 强启动子的驱动下在转基因植株中得到了过表达。



1~5 转基因植株; COL 野生型对照。

图 9 *AtCS82* 基因表达水平的 RT-PCR 分析

Fig. 9 RT-PCR analysis of *AtCS82* expression

3 小结与讨论

本试验通过对 T-DNA 插入突变体的筛选,获得了稳定遗传的 *AtCS82* 基因沉默纯合突变体株系,通过构建 *pCambia1300-35S::CS82* 过表达载体,并转化 Col 的方式获得了稳定遗传的 *AtCS82* 基因的过表达转基因植株。

在本研究中,为了获得 *AtCS82* 基因沉默的纯合突变体,对购买的 T-DNA 插入突变体材料 *cs82* 进行了 DNA 水平检测和 RT-PCR 检测。DNA 水平检测获得了 8 株纯合突变体(*cs82-1*~*cs82-8*),而经过 RT-PCR 检测,发现仅有 1 株纯合突变体(*cs82-7*)中 *AtCS82* 基因的表达因 T-DNA 插入而被完全沉默。从理论上讲,由于 T-DNA 插入的片段较大,通过 T-DNA 插入技术得到的纯合突变体往往能够有效的使基因处于沉默状态,但本试验中只有 *cs82-7* 中 *AtCS82* 基因的表达因 T-DNA 插入而被完全沉默,其他纯合突变体中仍有一定水平的表达。

为了确认这一结果不是由于 RT-PCR 操作不当而造成的假性现象,对受试植株重新取花后生长 5 d 的果荚,分离 RNA,再次进行 RT-PCR 检测,试验结果与 7 d 果荚的 RT-PCR 结果一致,且 2 次试验中拟南芥 *Actin* 基因表达的扩增结果证明所分离的 RNA 质量很好,说明 *cs82-7* 植株中的 *AtCS82* 基因确实被有效沉默。产生这一现象的原因尚不清楚,有待进一步研究。

采用 RT-PCR 对 *AtCS82* 基因在拟南芥中不同组织中的表达水平进行分析的结果表明,*AtCS82* 基因在 4 d 和 7 d 的果荚中表达量较高,而在茎、叶、花中的表达量明显偏低,推测 *AtCS82* 基因可能参与种子发育。由于 *AtCS82* 基因是通过筛选比对油菜种子发育中同化产物转化 2 个关键时期的 SSH 文库中的 EST 序列而得到的,在后续对 *AtCS82* 基因功能的研究中,可以侧重于探讨 *AtCS82* 基因是否参与拟南芥脂肪酸的代谢调控。

参考文献:

- [1] James C . Global review of commercialized transgenic crops[J] . Current Science , 2003 , 84(3) : 303-309 .
- [2] 潘刚,周永明.甘蓝型油菜遗传转化的研究进展[J].中国油料作物学报,2003,25(3):90-98.
- [3] Ohlrogge J B , Kuhn D N , Stumpf P K . Subcellular localization of acyl carrier protein in leaf protoplasts of *Spinacia oleracea*[J] . Proc Natl Acad Sci USA , 1979 , 76 : 1194-1198 .
- [4] Ohlrogge J , Browse J . Lipid biosynthesis[J] . Plant Cell , 1995 , 7 : 957-970 .
- [5] Thelen J J , Ohlrogge J B . Metabolic engineering of fatty acid biosynthesis in plants[J] . Metabolic Engineering , 2002 , 4 : 12-21 .
- [6] The Arabidopsis Genome Initiative . Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*[J] . Nature , 2000 , 408 : 796-815 .
- [7] Lagercrantz U . Comparative mapping between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica nigra* indicates that *Brassica* genomes have evolved through extensive genome replication accompanied by chromosome fusions and frequent rearrangements[J] . Genetics , 1998 , 150 : 1217-1228 .
- [8] Fourmann M , Barret P , Renard M , et al . The two genes homologous to *Arabidopsis FAE1* co-segregate with the two loci governing erucic acid content in *Brassica napus*[J] . Thero Appl Genet , 1998 , 96 : 852-858 .
- [9] Lagercrantz U . Comparative mapping in *Arabidopsis* and *Brassica* , fine scale genome collinearity and congruence of genes controlling flowering time[J] . Plant Journal , 1996 , 9(1) : 13-20 .
- [10] Sadowski J , Osborn T C , Kole C , et al . Comparison of flowering time genes in *Brassica rapa* , *B . napus* and *Arabidopsis thaliana*[J] . Genetics , 1997 , 146 : 1123-1129 .
- [11] Cavell A C , Lydiat D J , Parkin I A , et al . Collinearity between a 30-centimorgan segment of *Arabidopsis thaliana* chromosome 4 and duplicated regions within the *Brassica napus* genome[J] . Genome , 1998 , 41 : 62-69 .
- [12] Teutonico R A , Osborn T C . Mapping of RFLP and qualitative trait loci in *Brassica rapa* and comparison to the linkage maps of *B.napus* , *B.oleracea* and *Arabidopsis thaliana*[J] . Thero Appl Genet , 1994 , 89 : 885-894 .
- [13] Sillito D , Parkin I A , Mayerhofer R , et al . *Arabidopsis thaliana* : A source of candidate disease-resistance genes for *Brassica napus*[J] . Genome , 2000 , 43 : 452-460 .
- [14] 彭琦,胡燕,杜培粉,等.甘蓝型油菜种子不同发育时期 SSH 文库的构建[J].作物学报,2009,35(9):1576-1583.
- [15] 李敏,杨双,阮燕晔,等.拟南芥 T-DNA 插入突变体 *atsuc3* 的 PCR 鉴定[J].植物生理学通讯,2006,42(1):91-94.
- [16] 刘博宇.拟南芥功能未知基因 *AtCS25* 的初步研究[D].长沙:湖南农业大学生物科学技术学院,2012.
- [17] 马惠.*AtSDG26* 基因在植物抗逆中的功能研究[D].长沙:湖南农业大学生物科学技术学院,2012.

责任编辑:罗维

英文编辑:罗维