

应用 T-DNA 标签进行基因功能分析的步骤和方法

侯雷平, 李梅兰

(山西农业大学园艺学院, 太谷 030801)

摘要: 概述了应用 T-DNA 标签进行基因功能分析的步骤及获得突变体后标签基因的分离方法, 对应用 T-DNA 标签进行基因功能分析研究具有一定的参考价值。

关键词: T-DNA 标签; 分析步骤; 基因克隆; 功能分析

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2008)04-0014-03

The Procedure and Methods for Analyzing Gene Function by T-DNA Tagging

HOU Lei-ping, LI Mei-lan

(Horticulture College of Shanxi Agricultural University, Taigu 030801)

Abstract: The paper summarized the procedure for analyzing gene function by T-DNA tagging and the methods to clone the tagged gene of mutants gotten by transformation, which would facilitate the analysis of gene function using T-DNA tagging.

Key words: T-DNA tagging; analysis procedures; gene cloning; functional analysis

T-DNA 标签(tagging)就是利用 T-DNA 作为插入突变原或分子标记, 来分离或克隆因为插入而失活的基因并研究基因功能的方法。随着生物技术手段的逐渐进步及测序技术的日趋完善, 许多植物的基因序列已经测得^[1-3], 但有关基因功能的了解还远远落后于此, 因此基因功能研究就成为一项艰巨而迫切的任务, 有待于人们去完成。在植物基因的功能分析研究中, 插入突变已经成为一种有效的手段。其中由于 T-DNA 插入具有稳定、单拷贝、方法易于采用等优点, 因此利用 T-DNA 作为插入突变源进行突变体的筛选并进行基因功能的研究在许多植物中应用并取得成功^[4-5]。

1 应用 T-DNA 标签进行基因功能分析的步骤

在实际应用中, 利用 T-DNA 标签进行植物突变体的诱发和基因功能的研究要经过一段漫长的时间和繁杂的程序。在具体使用中主要按照以下步骤

进行^[6-7]:

1.1 根据不同的研究目的构建不同的 T-DNA 载体, 进行植物的转化

构建载体是关系成败的一个重要步骤。如果进行启动子的诱捕, 就采用 DNA 区边界处不含有植物启动子但内部含有报告基因的载体; 如果进行基因的标签, 那就需要将启动子放于 T-DNA 的边界处, 或者采用强启动子。

1.2 对转化的后代进行表型分析, 识别突变体, 确定与野生型生长发育的差别

如果是外部形态方面的突变体比较容易鉴别, 但如果是生理生化代谢和抗病性方面的突变体, 鉴定就要借助于一定的测定手段, 根据研究目的进行选择 and 测定。

1.3 进行突变体的遗传分析

当得到突变体后, 就要观察突变体后代 T-DNA 与表型遗传分离的相关性, 确定 T-DNA 与表型几代稳定共分离的突变体以进行下一步的研究。

1.4 对稳定的突变体通过 PCR 的方法分离 T-DNA 插入位点的侧翼序列, 并进一步证实 T-DNA 的插入导致表型的变异

证实方法一般通过转基因技术重新转入突变的基因恢复原有的性状或者比较几个独立的转化植

收稿日期: 2008-02-14

基金项目: 山西省自然科学基金(20041091)

第一作者简介: 侯雷平(1963-), 男, 山西垣曲人, 硕士, 副教授, 主要从事设施园艺方面的教学和科研研究。Tel: 0354-6288771; E-mail: lim eilan_2@hotmail.com.

通讯作者: 李梅兰

物, 若 T-DNA 插入位点相同而且表型也相同, 说明确实是插入的基因引起了表型的差异, 这样就明确了突变基因的功能, 并可对该基因进行进一步的遗传定位^[8]。

2 标签基因的分析方法

突变体识别后, 为了确定引起表型改变基因的序列, 就要对突变体 T-DNA 插入位点的侧翼序列进行分析, 这样才能进一步明确基因的结构、功能并进行染色体的定位。分析方法都是基于 PCR 的方法改良而成^[7, 9]。

2.1 质粒挽救(plasmid rescue)方法

该方法在进行载体构建时在 T-DNA 内部包含了质粒如 pBR322 等, 一旦发现突变体并进行了遗传分析鉴定, 确定突变的表型是由于 T-DNA 插入引起的话, 就可以利用该质粒来测得植物的相关片

段。具体步骤如下^[10]：
提取突变体植物基因组 DNA→→ 酶切(该酶在 T-DNA 内没有或者只有一个酶切位点)→→ 分子内环化进行连接(内部包含质粒序列)→→ 将连接产物导入大肠杆菌 →→ 包含 T-DNA 的克隆(也包含植物的 DNA)就可以在抗生素培养基上生长出来 →→ 那么连接的植物 DNA 就可以被分离出来。

该方法已经在植物的基因克隆中被成功应用^[11-12]。Weigel^[13] 通过该方法分离的植物序列长度可从几百个 bp 到 10kb 多。

2.2 反向 PCR(Inverse PCR)方法

经过验证为稳定的突变体后, 根据 T-DNA 的边界设计引物向外扩增, 以获得相关的植物序列。具体步骤与质粒挽救比较相似^[12, 14] (见图 1)。

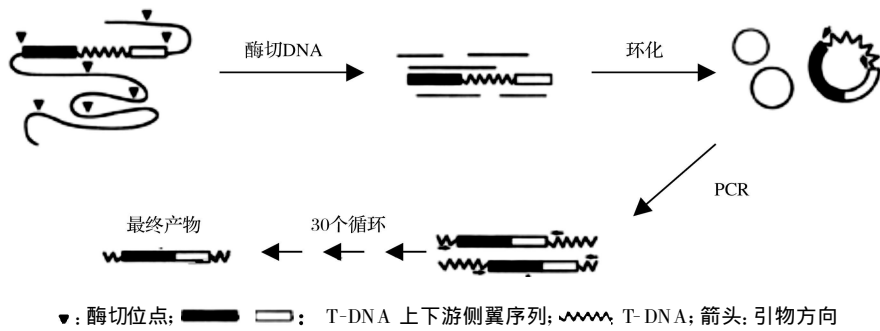


图 1 反向 PCR 示意图

- 2.2.1 提取突变体植物基因组 DNA。
- 2.2.2 酶切(该酶在 T-DNA 内没有或者只有一个酶切位点)后的产物进行酚和氯仿纯化。
- 2.2.3 环化进行自我连接。连接产物仍用等体积的酚、氯仿抽提, 并进行乙醇沉淀。
- 2.2.4 以环化的产物作为模板进行 PCR 扩增。引物位于 T-DNA 的边界, 这样与边界相连的植物序列就可以被扩增出来。

此外, 质粒挽救和反向 PCR 的产物可以直接作为探针, 筛选突变体的基因组文库, 以获得含有 T-DNA 外部序列的克隆, 进而获得更长的序列, 并进行基因功能的研究。

2.3 热不对称性交错 PCR(TAIL-PCR)法

TAIL-PCR (Thermal Asymmetric Interlaced PCR)与质粒挽救法和反向 PCR 法相比具有简便且准确的特点, 既不需要在 PCR 之前进行特殊的 DNA 处理, 以后也不需要大量的筛选, 而且扩增的特异性强, 准确度高。已成功地用于 BAC^[15]、YAC^[16] 和植物突变体的研究和基因克隆中^[5, 8]。

一般在 T-DNA 的边界处设计三条嵌套式的巢

穴引物和一个 T_m 值较低、碱基数较少的随机引物进行三轮扩增, 每轮扩增用一条特异引物, 但随机引物是相同的。不同的步骤采用不同的退火、延伸温度, 而且高严谨性循环和低严谨性循环交替进行, 以便使两种引物都能结合而且特异性引物又能充分发挥作用。扩增出的靶序列特异性较强, 而且扩增的产物可以直接测序并进行功能分析, 然后可以进行基因的定位。具体方法如图 2 所示。

随着分子生物学技术的普及及越来越多植物基因序列的获得, 基因功能分析变得日趋重要而紧迫。尽管进行功能基因组研究的方法有很多, 而且 T-DNA 标签在具体的应用中存在一些问题如: 在目的基因的确定方面具有盲目性, 突变的频率比较低, 而且工作量比较大, 但目前该方法仍是一种比较切实可行的研究植物基因功能的有效方法^[17-19]。因此利用 T-DNA 插入突变进行基因功能的分析就会变得越来越多, 相应的标签基因的分析就成为一个重要的环节, 相信随着分子生物学技术的逐步发展, 还会有新的方法产生, 而且更有效地应用于科学研究中。

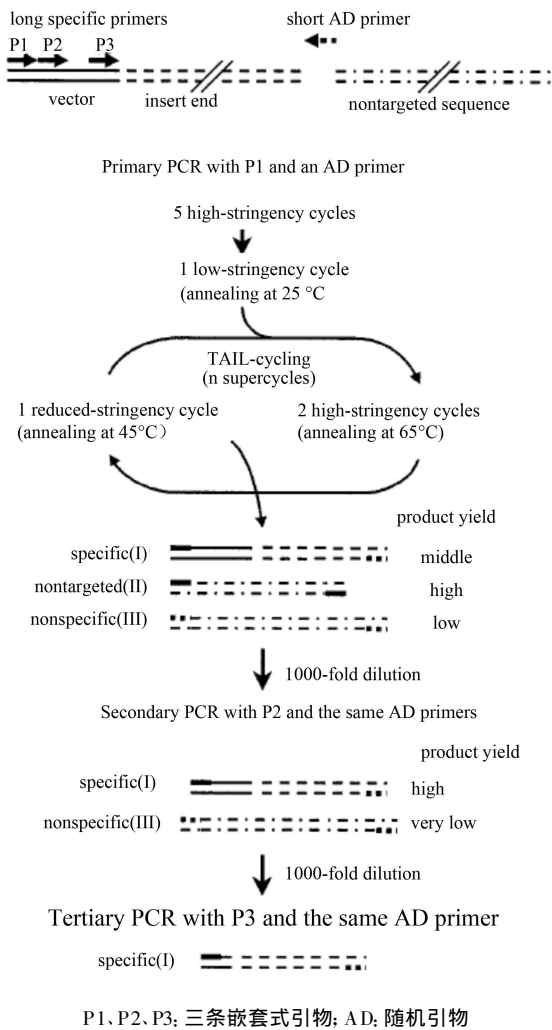


图2 转基因植物插入位点侧翼序列的 TAIL-PCR 扩增程序

参考文献:

[1] Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nature*, 2000, 408: 796-815.

[2] Kikuchi S, Satoh K, Nagata T, et al. Collection, mapping, and annotation of over 28, 000 cDNA clones from japonica rice [J]. *Science*, 2003, 301(5631): 376-379.

[3] Yang T J, Yu Y, Nah G, et al. Construction and utility of 10-kb libraries for efficient clone-gap closure for rice genome sequencing [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 107(4): 652-660.

[4] Jeon J S, Lee S, Jun K H, et al. T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice [J]. *Plant Journal*, 2000, 22: 561-570.

[5] Sessions A, Burke E, Presting G, et al. A High-Throughput Arabidopsis Reverse Genetics System [J]. *Plant Cell*, 2002, 14: 2985-2994.

[6] Krysan P J, Young J C, Sussman M R. T-DNA as an insertional mutagen in Arabidopsis [J]. *Plant Cell*, 1999, 11: 2283-2290.

[7] Azpiroz L R, Feldmann K A. T-DNA insertion mutagenesis in Arabidopsis: going back and forth [J]. *Trends in Genetics*, 1997, 13: 152-156.

[8] LIU Yaoguang, Mitsukawa N, Oosumi T, et al. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junction by thermal asymmetric interlaced PCR [J]. *Plant Journal*, 1995, 8 (3): 457-463.

[9] Ochman H, Ayala F J, Hartl D L. Use of polymerase chain reaction to amplify segments outside boundaries of known sequences [J]. *Methods of Enzymology*, 1993, 218: 309-321.

[10] Behringer F J, Medford J I. A plasmid rescue technique for the recovery of plant DNA disrupted by T-DNA insertion [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1992, 10: 190-198.

[11] Koncz C, Martini N, Mayerhofer R, et al. High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 1989, 86: 8467-8471.

[12] Ponce M R, Quesada V, Micol J L. Rapid discrimination of sequences flanking and within T-DNA insertion in the *Arabidopsis* genome [J]. *Plant Journal*, 1998, 14(4): 497-501.

[13] Weigel D, Ahn J H, Blazquez M A, et al. Activation tagging in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2000, 122: 1003-1013.

[14] Ochman H, Gerber A S, Hartl D L. Genetic application of an inverse polymerase chain reaction [J]. *Genetics*, 1988, 120: 621-623.

[15] LIU Yaoguang, HUANG Ning. Efficient Amplification of Insert End Sequences from Bacterial Artificial Chromosome Clones by Thermal Asymmetric Interlaced PCR [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1998, 16: 175-181.

[16] LIU Yaoguang, Whittier R F. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking [J]. *Genomics*, 1995, 25: 674-681.

[17] Tani H, Chen Xinwei, Nurmberg P, et al. Activation tagging in plants: a tool for gene discovery [J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2004, 4(4): 258-266.

[18] Pereira A. A transgenic perspective on plant functional genomics [J]. *Transgenic Research*, 2000, 9(4-5): 245-260.

[19] Rosso M G, Liyong, Strizhov N, et al. An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics [J]. *Plant Molecular Biology*, 2003, 53(1/2): 247-259.

我国第一家遗传病医院

院长 刘兴禹

主治: 遗传病、尿失禁、尿崩症、糖尿病、小儿神经性尿频。

地址: 山东省嘉祥县迎风路3号遗传病医院

邮编: 272400

电话: 0537—6824392 6805999

网址: <http://www.cnynz.com>

(www.cnynz.com.cn)