

文章编号:1000-8551(2003)05-350-04

离子束介导甘蓝全 DNA 转化 拟南芥菜的 RAPD 分析

卞 坡^{1,2} 秦广雍² 余增亮¹ 霍裕平² 王 燕²

(1. 中国科学院等离子体物理所,安徽 合肥 230031; 2. 郑州大学离子束生物工程实验室,河南 郑州 450052)

摘 要:在离子束介导甘蓝外源全 DNA 转化拟南芥菜的当代发现了 2 株表型变异株,以其中的 1 株(编号为 T6)作为研究对象,用 40 对 10 碱基的随机引物对该株和其后代株进行 RAPD 分析,发现 S168 号引物对 T6 和其后代株的 RAPD 结果与对照相比有明显差异,说明离子束介导外源基因转化可以引起受体基因组变异,并且该变异有遗传性。对差异条带测序后同拟南芥菜基因组序列比对,发现该条带的序列在 ABC Transporter 结构基因的内部。

关键词:离子束;RAPD;拟南芥菜;全 DNA 转化

RAPD ANALYSIS OF *Arabidopsis thaliana* TRANSFERRED WITH TOTAL DNA OF CABBAGE BY ION BEAM

BIAN Po^{1,2} QIN Guang-yong² YU Zeng-liang¹ HUO Yu-ping² WANG Yan²

(1. Institute of Plasma Physics of Chinese Academy of Sciences, Hefei, Anhui, 230031;

2. Ion Beam Bio-Engineering Lab of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, 450052)

Abstract: Two mutants were found among the *Arabidopsis thaliana* transferred with total DNA of cabbage. Variation of genome of T6 and its offspring were analyzed by RAPD-PCR with 40 random primers. The result from S168 primer was different from the CK, indicating that variation of genome can be made by total DNA transferring by use of ion beam, and this variation is hereditary. It is found that S₁₆₈₋₁₈₅₀ is included within the gene of ABC transporter by aligning with genome of *Arabidopsis thaliana* in TAIT.

Key words: ion beam; RAPD; *Arabidopsis thaliana*; transferring; genome

低能离子束介导植物转基因是近几年发展起来的一种遗传转化技术。低能离子作为一种集质、荷、能于一体的离子首先应用于材料表面改性的研究。余增亮^[1]发现低能离子与生物组织相互作用时,动量和能量的沉积引起的物理和化学溅射作用能对生物组织进行层层刻蚀,因为生物组织本身的结构具有极度的不均一性,刻蚀的结果是在生物组织内部形成可供大分子通过的“通道”。另外,低能离子作为带电离子,在与生物样品的作用过程中,富集在细胞表面的正电荷能改变细胞膜的通透性,这些低能离子与生物组织作用的独有特性使这项技术很快应用到植物转基因工作中来,并在水稻、棉花、小麦和烟草上得到成功的应用^[2,3]。但对离子束介导外源全 DNA 转化技术却颇有争议,外源 DNA 片断能否进入受体,其整合规律和对受体基因组的影响以及转化受体的遗传性和遗传规律等都是需要研究和解决的。本文以拟南芥菜为转化受体,以拟南芥菜的同科植物甘蓝为转化供体,用 RAPD 作为分析手段,研究离子束介导外源 DNA 转化中的基本规律。

收稿日期:2002-05-16

基金项目:国家科技攻关项目资助课题(2001BA302B-03)

作者简介:卞坡(1973-),男,河南人,在读博士,从事离子束介导转基因的机理研究。

1 材料与方法

1.1 材料

拟南芥菜为 Columbia 生态型,来自英国 Nottingham 大学拟南芥菜储存中心,编号 N1092。甘蓝为红甘蓝。宿主菌 DH5 α , T-载体 pUCm-T。

离子注入机为俄罗斯产 TITAN 源低能离子注入机,PCR 扩增仪型号为 GeneAmpPCR System 2400, DNA 测序仪器为 ABI PRISM 377-96,测序试剂为 BigDye terminator v2.0。基因组 DNA 小量制备试剂盒(No. SK252), UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒(No. SK131, NaI version), T-载体 PCR 产物克隆试剂盒(D0211, pUCm-T vector), RAPD 引物, Taq plus DNA Polymerase, dNTP 以及相关试剂购自上海生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 供体甘蓝基因组的提取 采取 CTAB 法^[4],所得基因组片段长度 30~50kb,集中于 40Kb。OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 1.9,溶解于 pH8.0 的 TE,调整浓度为 800 μ g/ml。

1.2.2 拟南芥菜种子的离子注入 注入离子为 Ar⁺,能量 30keV,剂量 1.5×10^{17} ions/cm²,脉冲注入,25Hz,400 μ s/plus。注入完成后立即浸入 800 μ g/ml 的甘蓝全 DNA 溶液,浸泡 12h 后,用 TE 溶液冲洗种子 3 遍,蒸馏水冲洗 1 遍,置 4 $^{\circ}$ C 冰箱春化 48h。种植于光照培养间,种植数目 100 粒。设同样数量的原种对照、离子注入对照、原种、离子注入浸泡 TE 对照。培养间条件:土壤为花卉营养土,pH 值 4.5~5.0,光强 5000~6000Lx,光照时间 16h,温度 20~22 $^{\circ}$ C,昼夜温差 2 $^{\circ}$ C。

1.2.3 RAPD 模板的提取 剪取拟南芥菜营养生长中期的鲜嫩叶片约 100mg。用酒精擦净叶面,蒸馏水冲洗 3 遍,-20 $^{\circ}$ C 保存。模板 DNA 抽提时,对抽提试剂盒 GENOMIC DNA MINPREPS KIT 的抽提步骤稍加改动(加入 Cell Lysis Solution 后 65 $^{\circ}$ C 温浴 1h,加入 Precipitation Solution 后 65 $^{\circ}$ C 温浴 30min),提取的 DNA 溶于 pH9.0 的 TE。基因组片段长度 40kb。

1.2.4 RAPD 反应 选择 40 条 10 碱基随机引物,25 μ l 反应体系,Taq Plus 10 \times Buffer 2.5 μ l, Taq plus DNA Polymerase 1 μ , 25ng 的模板 DNA, dNTP(dATP:dTTP:dCTP:dGTP = 1:1:1:1) 400 μ M, primer 0.4 μ M。RAPD 的反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 30s,46 个扩增循环为 95 $^{\circ}$ C 变性 30s,38 $^{\circ}$ C 复性 15s,72 $^{\circ}$ C 延伸反应 1min,46 个循环完成后,72 $^{\circ}$ C 补平 8min^[5]。按照任瑞文^[6]的方法进行优化实验。1.2% 的琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察照像。

1.2.5 转化 对 RAPD 结果中的感兴趣条带用胶回收试剂盒回收,克隆到 pUCm-T 载体后转化到预先制备的 DH-5 α 感受态宿主菌。平板培养,挑取白斑,摇瓶培养过夜,提取质粒,电泳验证目的片段是否插入到载体中。确证后测序。

2 结果

2.1 表型变异

在 100 株经离子束介导甘蓝全 DNA 转化的拟南芥菜中,出芽 94 个,成苗 90 株,黄化苗 3 株,表型变异 2 株,变异率为 5.6%。选择其中表型变异较大的 1 株(T6)作为本实验的研究对象(图 1-A)。该株在营养生长阶段从第 4 片叶原基发育开始异常,第 5 片叶原基位置错位,其后叶原基发育不再为螺旋状,叶子短小,形状极不规整,成簇状生长。进入生殖生长期的时间较对照晚 12d。I、II 型体节均正常,但整个株型较对照弱小。T6 株 2 代播种 10 粒,成活 4 株,表型与对照相比无明显差异。

2.2 RAPD 分析

提取的拟南芥菜样品 DNA 经紫外分光光度计检测,A260/280 > 1.8,经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测,DNA 片段整齐,片段大小 40kbp。符合 RAPD 实验的要求。RAPD 扩增中共选择了 40 条引物对 2 个 CK 和 T6 株的基因组做 RAPD 分析,这 40 条引物分别是 S₄₁₋₆₀ 和 S₁₆₁₋₁₈₀,其中 39 条引物对 CK 的 RAPD-

PCR 反应产生 130 条特异条带, T6 与对照相比有 4 个条带缺失, 占总数的 3.1%。这 4 个条带分别为 S161(740bp)、S168(1.85kb)、S176(1.9kb, 960bp)。其中 S168 引物拉出的条带与对照存在稳定差异, 分子量为 1.85kb(记为 $S_{168-1850}$) 的条带消失, 分子量为 2.5kb 的条带加强, 该条带的加强可能是受 $S_{168-1850}$ 消失的影响。用 S168 号引物对 4 个 2 代株基因组的 RAPD 检测结果和转化当代 T6 的结果完全一致, 如图 2。S168 引物产生的特异结果重复性好, 经 3 次重复, 结果稳定。S168 引物的序列为 5'-TTTGCCCGGT-3'。



图 1 当代变异株

Fig.1 Mutation of transfered generation

A:T6, B:CK

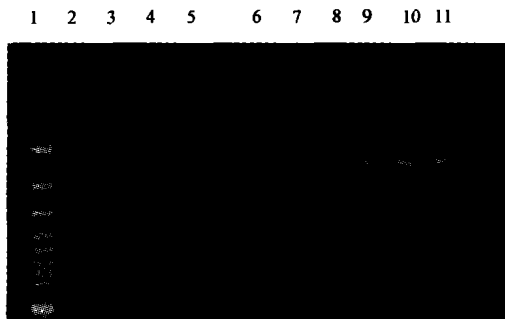


图 2 T6 和其 2 代的 RAPD 分析结果

Fig.2 RAPD results of T6 and its 2nd generation

1:Marker; 2,3:对照; 4,5:T6;6,7:2 代对照;
8,9,10,11:2 代株

1:Marker; 2,3:CK; 4,5:T6; 6,7:CK of 2nd generation;
8,9,10,11:2nd generation

2.3 测序结果

为了标定 $S_{168-1850}$ 在拟南芥菜基因组中的位置, 回收 CK 中 $S_{168-1850}$ 测序, 测序引物 M13(-), 测序结果如下:

5'-TTTGCCCGGTCTGGAAAGTACTAAAGCCGCTTGAAAAATCACTTACCGACACATAGTTATAAGGTGTTC-
TCTCTGTCTAATACTGTCTTGGACCTTCTTAGACGTAACCTTCTGTATAAAGTCTGCAACCCCTTTACTTTTCAG-
GACATTGGAAACTAAAGTATTCAAAGAACTCAAGAACGTTGTCGCCGTTGGCCTTGTAGACAATTTGGCCCTCGG-
AAAGCAAGATAATGTCGTCAAAAAGCACGAATGTCTCTGCTGCTGTTGTAGAAACGAAATAATCATCGTTACAT-
CCGAGATATGAACTAGTTGGCTCATGAACTTGCAAATTTGAAAGGTTGTGGAACATATCCAAC-3'

上述序列为从 RAPD S168 引物开始的 360 个碱基长度。除去了测序引物 M13(-) 和 RAPD S168 引物间的 91 个碱基长度, 这 360 个碱基长度在测序仪的有效测序范围内。该链为模板链。

3 讨论

本实验设计了严格的对照体系, 包括原种对照、离子注入对照、原种、离子注入浸泡 TE 对照。在以上的一系列对照中, 均没有产生黄化苗和表型变异的株系, 说明转化当代的变异和 T6 的 RAPD 分析中差异条带的产生是外源 DNA 片段的导入引起了受体基因组变异的结果。幼苗的主体组织结构实际上

是顶-基轴向模式(axial pattern)和辐射径向(radial pattern)的叠加。拟南芥菜胚中顶-基轴的模式是幼苗主体组织结构的胚胎来源。在拟南芥菜的两个子叶的凹陷处是茎分生组织,也叫茎端分生组织。在种子萌发后,植物地上部分的所有组织细胞包括叶与茎的形态发生都与茎分生组织密不可分。T6 在幼苗期的表型异常,说明了离子束介导的外源全 DNA 片段转化到了拟南芥菜种子胚的分生组织细胞。外源 DNA 片段对受体细胞的影响有两个方面,一是外源 DNA 片段整合到受体基因组中,改变了受体中某些基因的表达,或者基因的调控机制,作用是插入诱变。二是外源片段携带的完整基因整合到受体基因组的合适位点后,自身也可以在受体细胞中表达。以上两种情况导致的分生组织细胞变异都能影响拟南芥菜幼苗发育时的结构特异元件,从而使拟南芥菜在营养生长阶段表型异常。但幼苗期的主体结构模式来源于胚胎生成的建成模式,所以幼苗的主体建成模式没有改变。拟南芥菜成熟胚的茎分生组织是一个有多细胞形成的组织,通过这种基因转化操作发育成的植株是嵌合体。因为植物发育过程中的时间和位置效应,分生组织中受外源基因转化而产生变异的细胞最终发育成植株的那一部分器官没有明确的规律。如果生殖器官和当代变异部分没有同一的细胞来源,那么这些当代的变异就会在 2 代中丢失。这可能是 T6 的 2 代表型恢复正常的原因。如果生殖器官和某些当代的变异有同一细胞来源,当代变异的性状就会遗传到后代。以 $S_{168-1850}$ 作为分子标记,其在 T6 和其 2 代株中的缺失说明了这种外源基因的转化操作产生的某些基因组变异是可以遗传的。

以 $S_{168-1850}$ 的测序部分作为 Query,用 BLAST(Basic Local Align Search Tool)对 TAIT 的比对表明,该序列同比对结果中的高分值序列有着很高的同源性,匹配率为 96%, EXPECT 值 E-175,这说明我们的搜索结果就是 $S_{168-1850}$ 。BLAST 搜索的结果表明, $S_{168-1850}$ 和 ABC Transporter 转运蛋白的编码基因同源,检索名 AT1G66950,类型 orf, TAIT 检索号:Gene:2019692。该蛋白也称为 P-glycoproteins^[7],主要构成细胞的膜泵,它的一个重要功能是通过阻止有害物质在细胞内的积累,保护组织不受外来有毒物质的侵害。当一个有害的分子(如 Drug)进入细胞,该蛋白的胞内部分就迅速捕获到该物质,通过该蛋白的一系列作用将该有害分子“泵”出细胞。ABC Transporter 的编码基因的编码区的长度为 6223bp,有 20 个外显子。 $S_{168-1850}$ 的 3'端在该基因的 2202bp 位点处,此处为 exon 1791 - 2691。RAPD 反应在引物和模板 5'端不完全配对的情况下反应也能进行,因为 $S_{168-1850}$ 的 5'端没有测序,不能确定 5'端的具体位置,根据长度计算, $S_{168-1850}$ 的 5'端在该基因的第 2 个外显子(exon1-395)内部。本实验中 $S_{168-1850}$ 的缺失应该有以下 3 个方面的原因:(1)ABC Transporter 结构基因内部的 S168 引物结合位点的碱基组成发生变化;(2)两个 PCR 引物结合位点之间插入外源大片段,使两个引物之间的距离超过了 PCR 的扩增范围;(3)两个 PCR 引物结合位点之间(包括结合位点)的片段发生严重缺失。因为 $S_{168-1850}$ 在 ABC Transporter 结构基因的内部,可以肯定 $S_{168-1850}$ 的变异是 ABC Transporter 基因的一级结构变化引起的,其变化的细节和对该基因功能的影响还需进一步的研究。

参考文献:

- [1] 余增量. 离子注入水稻诱变育种初探. 安徽农业科学, 1989, 39(1): 12 ~ 16
- [2] Yu, ZL, Yang JB, Wu YJ, et al. Transferring GUS gene into intact rice cells by low energy ion beam. Nucl Instr Meth Phys Res, 1993, B80-81: 1328 ~ 1331
- [3] 吴丽芳, 李红, 等. 用低能氦离子束介导将水稻几丁质酶基因导入小麦. 科学通报. 2000, 21: 2316 ~ 2321
- [4] F. 奥斯伯, 等. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社. 1998, 37 ~ 38
- [5] Robert S. Reiter, John G. K. Williams, et al. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. Proc Natl Acad Sci. USA, 1992, (89)2: 1477 ~ 1481
- [6] 任瑞文, 卢强, 等. 提高 RAPD 稳定性的几点经验与探讨. 生物技术. 2001, (11)2: 38 ~ 40
- [7] Andrade A C, Zwiars L H, et al. ABC Transporters and their impact on pathogenesis and drug sensitivity. In: Pesticide Chemistry and Bio-Science Royal Society of Chemistry, Cambridge. U. K. 1999, 221 ~ 235.