

水稻插入突变体侧翼序列的分离

Identification of the Sequences Flanking the Insertion in Rice Mutant

龙湍, 杨莹, 符德保, 吴昌银*

作物遗传改良国家重点实验室, 华中农业大学, 武汉

*通讯作者邮箱: cywu@mail.hzau.edu.cn

引用格式: 龙湍, 杨莹, 符德保, 吴昌银. (2018). 水稻插入突变体侧翼序列的分离. *Bio-101* e1010105.

Doi: 10.21769/BioProtoc.1010105.

How to cite: Long, T., Yang, Y., Fu, D. B. and Wu, C. Y. (2018). Identification of the sequences flanking the insertion in rice mutant. *Bio-101* e1010105. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010105. (in Chinese)

关键词: 水稻, 突变体, T-DNA, Tos17, 侧翼序列

一、用反向 PCR 分离水稻插入突变体侧翼序列

实验原理: 在含有 T-DNA 的水稻插入突变体中, 通过抽提突变体总 DNA 进行酶切并使酶切产物自连, 可以得到由 T-DNA 片段和与其相邻的基因组 DNA 组成的有效环状 DNA 分子。由于 T-DNA 序列是已知的, 通过在 T-DNA 上设计巢式 PCR 引物, 可以迅速扩增上述有效环状 DNA 分子中与 T-DNA 相邻的基因组 DNA 片段, 从而分离出 T-DNA 的侧翼序列 (图 1)。

实验目的: 分离水稻 T-DNA 插入突变体的侧翼序列。

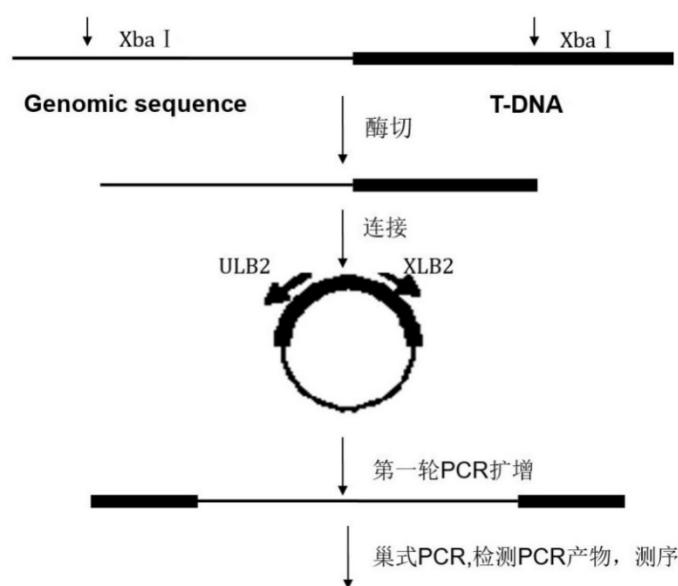


图 1. 反向 PCR 扩增 T-DNA 左端侧翼序列原理

材料与试剂

1. 2 ml 离心管
2. 1.5 ml 离心管
3. dNTP (Pharmacia, USA)
4. Xba I (Takara, Dalian, China)
5. T4 DNA ligase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
6. rTaq (Takara, Dalian, China)
7. BigDye Terminator Cycle Sequencing V3.1 (Applied Biosystems, USA)
8. 50% 甘油

仪器设备

1. 电热恒温隔水式培养箱 (SGSP-02, 黄石市恒丰医疗器械有限公司)
2. 冰箱 (BCD-243K F&R, 新飞)
3. GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA)
4. ABI3730xl 测序仪 (Applied Biosystems, USA)

实验步骤

1. 用 2 ml 离心管法制备基因组 DNA 备用 (参见: 2 ml 离心管法快速制备水稻高质量

总 DNA [符德保等, 2018])。

2. 在灭菌的 1.5 ml 离心管中加入如下体系, 于 37 °C 温箱酶切 10 h:

| | |
|------------------------|--------------------------------|
| 基因组 DNA | 7 μ l (完整 DNA 约 1 μ g) |
| 10x M buffer | 5 μ l |
| 10x BSA | 5 μ l |
| Xba I (15 U/ μ l) | 0.7 μ l |
| 加灭菌 ddH ₂ O | 至终体积 50 μ l |

3. 在步骤 2 的酶切体系中加入如下体系, 于 4 °C 冰箱连接 16 h:

| | |
|--------------------------------|------------------|
| 10x T4 DNA ligase buffer | 10 μ l |
| T4 DNA ligase (400 U/ μ l) | 0.035 μ l |
| 灭菌 ddH ₂ O | 至终体积 100 μ l |

4. 以步骤 3 中连接产物作为反向 PCR 第一步反应的模板。分离 T-DNA 左端侧翼序列的 PCR 反应体系如下:

| | |
|-----------------------|-----------------|
| 10x PCR Buffer | 2 μ l |
| 50%甘油 | 2 μ l |
| dNTP (2 mmol/L) | 2.5 μ l |
| ULB2 (10 μ mol/L) | 0.5 μ l |
| XLB2 (10 μ mol/L) | 0.5 μ l |
| rTaq (5 U/ μ l) | 0.1 μ l |
| 连接产物 | 0.8 μ l |
| 灭菌 ddH ₂ O | 至终体积 20 μ l |

反应程序为: 95 °C, 5 min; (95 °C, 1 min; 56 °C, 1 min; 72 °C, 3 min) x 35 cycles; 72 °C, 7 min; 25 °C, 10 min。

分离 T-DNA 右端侧翼序列的引物为 URB1 和 XRB1, 反应体系和左端一致, 反应程序和左端一致但退火温度改为 62 °C。

5. 以步骤 4 中相应的 PCR 产物为模板分别对 T-DNA 的左右端侧翼序列进行第二轮 PCR 扩增。分离 T-DNA 左端侧翼序列的第二轮 PCR 引物为 ULB3 和 XLB3, 反应体系和第一步相同, 反应程序只需将退火温度修改为 59 °C 即可。分离 T-DNA 右端侧翼序列的第二轮 PCR 引物为 URB4 和 XRB3, 反应体系和程序均参照第一步, 但退火温度需调整为 58 °C。

6. 取 5 μ l 第二轮 PCR 的产物于 1% (w/v) 0.5x TBE 琼脂糖凝胶中电泳检测，挑选有大于 250 bp 条带的 PCR 产物用双脱氧链终止法进行测序 (图 2)。从 T-DNA 左端得到的 PCR 产物用 ULB3 测序，从右端得到的产物用 URB4 测序。

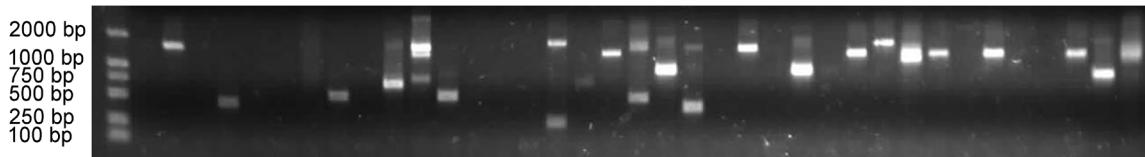


图 2. 反向 PCR 第二轮 PCR 产物电泳检测

7. 在 NCBI 数据库中(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)用 BLASTN 工具将测序结果与水稻基因组序列进行同源比对，以最好的匹配结果为插入位点。
8. 反向 PCR 使用的引物序列如下：

ULB2: 5'CCAGATAAGGAAATTAGGGTT 3'

XLB2: 5'TCTTCATTGTTATATCTCCTTGGAT 3'

ULB3: 5'CCAGTACTAAAATCCAGATCCC 3'

XLB3: 5'GATGTGTCCCTTATGGACGTG 3'

URB1: 5'GATGGAGGACAGGGAGCTCA 3'

XRB1: 5'GTGAATTACAGGTGACCAGCTC 3'

URB4: 5'TTGCGAAGTTAAACTATCAGTGT 3'

XRB3: 5'CGGGGGATCCACTAGTTCTA 3'

注意事项

1. 本方法所使用的引物是根据创建 RMD (<http://rmd.ncpqr.cn/>)突变体库所使用的 T-DNA 载体设计的，仅适用于来源于 RMD 的 T-DNA 插入突变体侧翼序列的分离。
2. 在高通量分离侧翼序列时，可以使用 96 孔板进行酶切和连接反应。使用 96 孔板时，应该加盖而不是加矿物油防止水分蒸发。
3. 当仅针对少数感兴趣的突变体分离侧翼序列时，含有多个 DNA 条带的 PCR 产物可以分别挖胶回收测序。
4. 改变内切酶的种类并根据载体序列重新设计引物有可能分离出更多的侧翼序列。

二、用接头 PCR 分离水稻插入突变体侧翼序列

实验原理：接头 PCR 也需要抽提插入突变体的总 DNA 并进行酶切。酶切后，用连接酶在酶切产物两端连上经过化学修饰并且序列已知的接头。通过锚定于接头和插入元件上的巢式 PCR 引物，可以扩增与插入元件相邻的基因组 DNA 片段。由于接头经过化学修饰，锚定于接头上的 PCR 引物自身不能配对进行指数型扩增，从而抑制了非特异性扩增（图 3）。

实验目的：分离水稻 T-DNA 和 Tos17 插入突变体的侧翼序列。

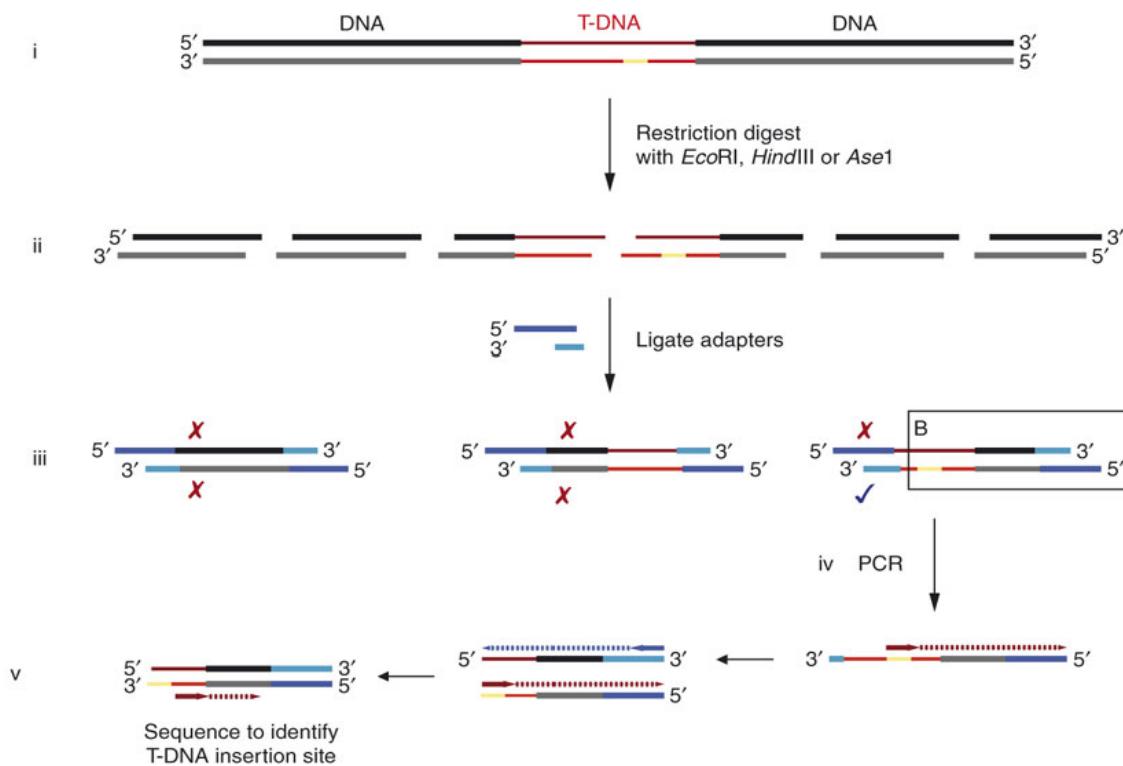


图 3. 接头 PCR 分离 T-DNA 侧翼序列原理示意图

材料与试剂

1. dNTP (Pharmacia, USA)
2. Dra I (Takara, Dalian, China)
3. T4 DNA ligase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)
4. rTaq (Takara, Dalian, China)
5. BigDye Terminator Cycle Sequencing V3.1 (Applied Biosystems, USA)

6. 50%甘油
7. dNTPs
8. L14\TRB1
9. ADS-1

仪器设备

1. 电热恒温水浴锅 (HH SY11-Ni, 北京市长风仪器仪表有限公司)
2. GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA)
3. ABI3730xl 测序仪 (Applied Biosystems, USA)

实验步骤

1. 用 2 ml 离心管法制备基因组 DNA 备用 (参见: 2 ml 离心管法快速制备水稻高质量总 DNA [符德保等, 2018])。
2. 用 ddH₂O 将接头引物 AD-L 和 AD-S 分别稀释到 100 μmol/L, 等体积混合, 94°C 水浴变性 4 min, 自然冷却至室温后即为 50 μmol/L 的接头。
3. 在灭菌的 0.5 ml 离心管中加入下列反应体系, 室温 (25 °C) 孵育 16 h:

| | |
|--------------------------|---------------------------|
| 基因组 DNA | 1 μl (完整 DNA 约 50-200 ng) |
| 接头(50 μmol/L) | 0.2 μl |
| 10x M buffer | 1 μl |
| 10x T4 DNA ligase buffer | 1 μl |
| DraI (15 U/μl) | 0.15 μl |
| T4 DNA ligase (400 U/μl) | 0.04 μl |
| 灭菌 ddH ₂ O | 至终体积 10 μl |

反应结束后 65 °C 水浴 10 min 终止反应。

4. 以步骤 3 中的酶切连接产物作为第一轮 PCR 反应的模板, 反应体系如下:

| | |
|------------------|--------|
| 10x PCR Buffer | 2 μl |
| 50%甘油 | 2 μl |
| dNTP (2 mmol/L) | 2 μl |
| L14\TRB1 (10 μM) | 0.5 μl |
| ADS-1 (10 μM) | 0.5 μl |
| rTaq (5 U/μl) | 0.2 μl |

酶切连接产物 2 μ l
灭菌 ddH₂O 至终体积 20 μ l
反应程序为: 94°C, 5 min; (94°C, 30 sec; 72°C, 3 min) x 7 cycles; (94°C, 30 sec; 67°C, 3 min) x 32 cycles; 67°C, 7 min; 25°C, 10 min。

L14 为分离 T-DNA 左端侧翼序列的引物, TRB1 为分离 Tos17 右端侧翼序列的引物。

5. 以步骤 4 中相应的 PCR 产物为模板分别对 T-DNA 左端和 Tos17 右端的侧翼序列进行第二轮 PCR 扩增, 反应体系如下:

10x PCR Buffer 2 μ l
50% 甘油 2 μ l
dNTP (2 mmol/L) 2 μ l
LBT2\TRB2 (10 μ M) 0.5 μ l
ADS-2 (10 μ M) 0.5 μ l
rTaq (5 U/ μ l) 0.2 μ l
上轮 PCR 产物 2 μ l
灭菌 ddH₂O 至终体积 20 μ l

反应程序为: 94°C, 5 min; (94°C, 30 sec; 72°C, 3 min) x 5 cycles, (94°C, 30 sec; 67°C, 3 min) x 20 cycles; 67°C, 7 min; 25°C, 10 min。

LBT2 为分离 T-DNA 左端侧翼序列的引物, TRB2 为分离 Tos17 右端侧翼序列的引物。

6. 取 5 μ l 第二轮 PCR 的产物于 1% (w/v) 0.5x TBE 琼脂糖凝胶中电泳检测(图 4), 挑选有 250 bp 以上 DNA 片段的 PCR 产物用双脱氧链终止法进行测序。从 T-DNA 左端得到的 PCR 产物用 LBT2 测序, 而从 Tos17 右端得到的产物用 TRB2 或 TosRS 测序。

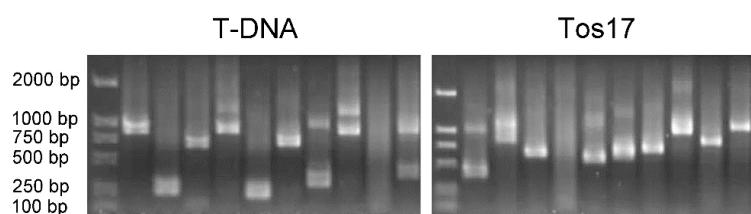


图 4. 接头 PCR 第二轮 PCR 产物电泳检测

7. 在 NCBI 数据库中(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)用 BLASTN 工具将测序结果与水稻基因组序列进行同源比对, 以最好的匹配结果为插入位点。
8. 接头 PCR 使用的引物序列如下:

接头制备引物:

AD-L: 5'CTAATACGAGTCACTATAGCGCTCGAGCGGCCGGGGAGGT 3'

AD-S: 5'Pi-ACCTCCCC-NH2 3'

ADS-1: 5'GGATCCTAATACGAGTCACTATAGCGC 3'

ADS-2: 5'CTATAGCGCTCGAGCGGC 3'

T-DNA 边界引物:

L14: 5'GCTCGAGTTCTCCATAATAATGTGTGAGTAGT 3'

LBT2: 5'ATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGCAT 3'

Tos17 边界引物:

TRB1: 5'GCATCTTCACACGTTCTCATTGTCAG 3'

TRB2: 5'CGGTTACATCTCTAAACTCAATGTG 3'

TosRS: 5'GAAGGGGGTGTAAATATATAC 3'

注意事项

1. 本方法适用于分离来源于 RMD(<http://rmd.ncpgr.cn/>)突变体库的 T-DNA 和 Tos17 插入突变体的侧翼序列。
2. AD-S 要在 3' 进行加氨基修饰, 5' 进行加磷酸基团修饰。
3. 在高通量分离侧翼序列时, 可以使用 96 孔板进行酶切连接反应。使用 96 孔板时, 应该加盖而不是加矿物油防止水分蒸发。
4. 当仅针对少数感兴趣的突变体分离侧翼序列时, 参照“用反向 PCR 分离水稻插入突变体侧翼序列”的注意事项。

三、用 TAIL-PCR 分离水稻插入突变体侧翼序列

实验原理: TAIL-PCR 是一种基于巧妙的 PCR 程序设计来分离侧翼序列的方法。该方法利用退火温度高的严谨循环来线性富集带有插入元件侧翼序列的目标 DNA 片段(锚定于插入元件上的特异引物单引物扩增), 用退火温度低的非严谨循环来指数型扩增所有

目标和非目标 DNA 片段(特异引物和随机引物配对扩增)。通过由严谨循环和非严谨循环组成的超级循环就能实现插入元件侧翼序列的特异性扩增 (图 5)。

实验目的：分离水稻 T-DNA 和 Tos17 插入突变体的侧翼序列。

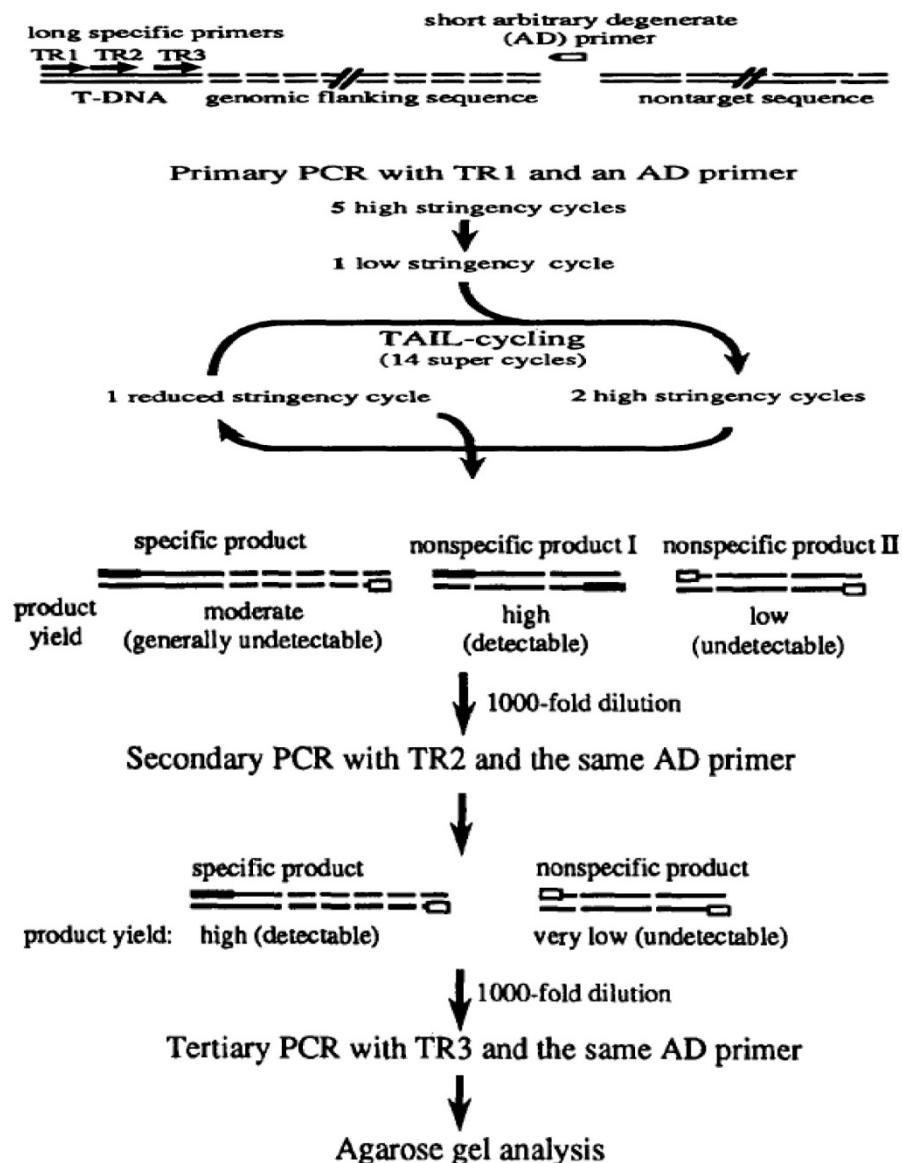


图 5. TAIL-PCR 扩增侧翼序列原理示意图

材料与试剂

1. dNTP(Pharmacia, USA)
2. rTaq (Takara, Dalian, China)
3. BigDye Terminator Cycle Sequencing V3.1 (Applied Biosystems, USA)

4. 50%甘油

仪器设备

1. GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA)
2. ABI3730xl 测序仪 (Applied Biosystems, USA)

实验步骤

1. 用水稻快速少量 DNA 抽提法制备基因组 DNA 备用(参见：2 ml 离心管法快速制备水稻高质量总 DNA [符德保等, 2018])。
2. 第一轮 PCR 反应。反应体系如下：

| | |
|--------------------------------|-----------------|
| 10x PCR Buffer | 2 μ l |
| dNTP (2 mmol/L) | 1.5 μ l |
| SP1 ^① (10 μ M) | 0.2 μ l |
| ADP ^② (100 μ M) | 0.12 μ l |
| rTaq (5 U/ μ l) | 0.12 μ l |
| 基因组 DNA | 1 μ l |
| 灭菌 ddH ₂ O | 至终体积 20 μ l |

反应程序为：94 °C, 5 min; (94 °C, 30 sec; 62 °C, 1 min; 72 °C, 2.5 min) x 5 cycles; 94 °C, 30 sec; 25 °C, 2 min; 72 °C (32% ramp), 2.5 min; (94 °C, 20 sec; 65 °C, 1 min; 72 °C, 2.5 min; 94 °C, 20 sec; 65 °C, 1 min; 72 °C, 2.5 min; 94 °C, 20 sec; 45 °C, 1 min, 72 °C, 2.5 min) x 15 cycles; 72 °C, 7 min; 25 °C, 10 min。

注^①：SP: Specific Primer。

注^②：ADP: Arbitrary Degenerate Primer。

3. 以步骤 2 中相应的 PCR 产物为模板进行第二轮 PCR 扩增。反应体系如下：

| | |
|---------------------|--------------|
| 10x PCR Buffer | 2 μ l |
| 50% 甘油 | 2 μ l |
| dNTP (2 mmol/L) | 1.5 μ l |
| SP2 (10 μ M) | 0.2 μ l |
| ADP (100 μ M) | 0.12 μ l |
| rTaq (5 U/ μ l) | 0.12 μ l |

上轮 PCR 产物 1 μ l
灭菌 ddH₂O 至终体积 20 μ l

反应程序为: 94 °C, 5 min; (94 °C, 20 sec; 65 °C, 1 min; 72 °C, 2.5 min; 94 °C, 30 sec; 65 °C, 1 min; 72 °C, 2.5 min; 94 °C, 30 sec; 45 °C, 1 min; 72 °C, 2.5 min) x 15 cycles; 72 °C, 7 min; 25 °C, 10 min。

4. 以步骤 3 中相应的 PCR 产物为模板进行第三轮 PCR 扩增。反应体系如下:

10x PCR Buffer 2 μ l
50% 甘油 2 μ l
dNTP (2 mmol/L) 1.5 μ l
SP3 (10 μ M) 0.2 μ l
ADP (100 μ M) 0.12 μ l
rTaq (5 U/ μ l) 0.12 μ l
上轮 PCR 产物 1 μ l
灭菌 ddH₂O 至终体积 20 μ l

反应程序为: 94 °C, 5 min; (94 °C, 30 sec; 45 °C, 1 min; 72 °C, 2.5 min) x 35 cycles; 72 °C, 7 min; 25 °C, 10 min。

5. 取 5 μ l 最后一轮^③PCR 的产物于 1% (w/v) 0.5x TBE 琼脂糖凝胶中电泳检测 (图 6), 挑选有大于 250 bp 以上 DNA 片段的 PCR 产物用双脱氧链终止法进行测序。

注^③: 分离 T-DNA 的侧翼序列一般做三轮 PCR 反应, 分离 Tos17 侧翼序列做两轮即可, 第二轮增加至 20 个循环。

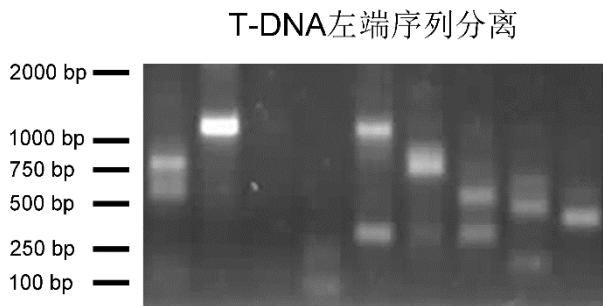


图 6. TAIL-PCR 第三轮 PCR 产物电泳检测

6. 测序结果在 NCBI 数据库中(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)用 BLASTN 工具与水稻基因组序列进行同源比对, 以最好的匹配结果为插入位点。
7. 各轮 PCR 引物及测序引物

特异引物(SP)和测序引物:

| | T-DNA | | Tos17 | |
|------|-------------------|-------|--------|--------|
| | Left ^④ | Right | Left | Right |
| SP1 | L16 | PFRB1 | TosLP1 | TosRP2 |
| SP2 | L14 | PFRB2 | TosLP2 | TosRP3 |
| SP3 | LBT2 | PFRB3 | | |
| 测序引物 | LBT2,NTLB5 | PFRB4 | TosLS | TosRS |

效果较好的 ADP 主要有 AD2-1, AD8 和 AD11 三种, 三轮 PCR 反应使用同一种 ADP 即可。

注^④: 其它用于分离 TAIL-PCR 左端侧翼序列的较好引物组合还有 LP2, L16, LBT2, LSP2, LBT2, LBT3 等。

TAIL-PCR 反应中使用的引物序列如下:

T-DNA 左端引物:

L16: 5'CGTCTGGACCGATGGCTGTGTAGAAGTA 3'

L14: 5'GCTCGAGTTCTCCATAATAATGTGTGAGTAGT 3'

LBT2: 5'ATAGGGTTCGCTCATGTGTTGAGCAT 3'

NTLB5: 5'AATCCAGATCCCCCGAATTA 3'

LP2: 5'CTATCAGAGCTTGGTTGACGGCAATT; 3'

LSP2: 5'GAAGTACTCGCCGATAGTGGAAACC; 3'

LBT3: 5'CCAGTACTAAAATCCAGATCCCCCGAAT 3'。

T-DNA 右端引物:

PFRB1: 5'GAGAAAAGGGTCCTAACCAAGAA 3'

PFRB2: 5'GGGTCTAACCAAGAAAATGAAG 3'

PFRB3: 5'CAAGAAAATGAAGGAGAAAAACTAGAA 3'

PFRB4: 5'TGCAGGTTCTCTCCAAATGA 3'

Tos17 左端引物:

TosLP1: 5'GTGAAAAGGACAGTGGAGCAGTGGATAA 3'

TosLP2: 5'GACCATTGCTCTGATACCATCTTAACCTAATTGC 3'

TosLS: 5'CTGATACCATCTTAACCTAATTGC 3'

Tos17 右端引物:

TosRP2: 5'TACAAGTCGCTGATTCTTCACCAAGGC 3'

TosRP3: 5'CGGTTACATCTTCTCAAACCTCAATGTGGTAGA 3'

TosRS: 5'GAAGGGGGTGTAAATATATATAC 3'

简并引物(ADP):

AD2-1: 5'(ATCG)GACGA(CG)(AT)GA(ATCG)A(AT)GAA 3'

AD8: 5'AG(AT)G(AGCT)AG(AT)A(AGCT)CA(AT)AGG 3'

AD11: 5'TG(AT)GNAG(GC)ANCA(GC)AGA 3'

注意事项

1. 本方法适用于分离来源于 RMD(<http://rmd.ncpgr.cn/>)突变体库的 T-DNA 和 Tos17 插入突变体的侧翼序列。
2. TAIL-PCR 的优点是简便快速, 但缺点是效果不稳定。
3. 当仅针对少数感兴趣的突变体分离侧翼序列时, 更换特异引物和随机引物的组合有时能分离到不同的侧翼序列。

参考文献

1. 龙湍, 杨莹, 符德保, 吴昌银. (2018). [2 ml 离心管法快速制备水稻高质量总 DNA.](#) *Bio-101* e1010106. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010106.