

RMD 水稻突变体信息及基因型鉴定

李燕, 龙湍, 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: 李燕, 龙湍, 吴昌银. (2018). RMD 水稻突变体信息及基因型鉴定. *Bio-101*: e1010107. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010107.

关键词: 水稻, 突变体, 侧翼序列, 鉴定

材料与试剂

1. 2 ml 离心管
2. PCR 管
3. 各种型号吸头 (20 μ l, 200 μ l, 1 ml)
4. 75%乙醇
5. Primers

载体左端测序引物: NTLB5 5'>AATCCAGATCCCCCGAAT TA<3'

载体右端测序引物: PFRB4 5'>TGCAGGTTCTCTCCA AAT<3'

仪器设备

1. PCR 仪
2. 移液器
3. 超净工作台
4. 电泳装置

实验步骤

一、RMD 水稻突变体相关信息

背景介绍: 突变体对于遗传学研究有着重要作用, 随着拟南芥和水稻等物种全基因组测序的开展, 人类积累了前所未有的基因序列信息, 为了弄清这些基因序列的生物学信息,

寻找该基因区段序列发生变异的突变体是阐释基因功能最直接最有效的方法。

植物在自然的环境条件下也会产生突变性状，早期普通正向遗传学研究往往通过寻找与某种生物学特性相关的突变体来发掘或定位某个特定基因。为配合植物功能基因组研究高通量的策略，构建水稻等物种的大型突变体库已成为必然，借助水稻全基因组测序信息、通过反向遗传学的手段大规模地筛选突变体库，理论上可以获得基因组中任一基因的突变体，最终实现阐释基因功能的目的。

突变体构建原理：

1. 农杆菌介导的 T-DNA 插入

农杆菌是寄主范围非常广泛的土壤杆菌，它能够通过伤口侵染植物导致冠瘿瘤和毛状根的发生。1974 从根癌农杆菌中分离出一种与肿瘤诱导相关的质粒，称为致瘤质粒 (Tumor-inducing plasmid)，简称 Ti 质粒。Ti 质粒上存在一段 DNA，能够转移并整合到植物基因组中，称为 Transferred DNA，简称 T-DNA。

研究发现，T-DNA 两端存在非常保守的同向重复的 25bp 序列，分别称为左边界(LB)和右边界(RB)。T-DNA 的转移只与边界序列相关，尤其是 RB，而与 T-DNA 区段的其它基因或序列无关。我们将 T-DNA 区段上的致瘤基因和其它无关序列去掉，利用其转移的特性，实现农杆菌介导的 T-DNA 转入水稻愈伤，从而构建水稻突变体库。大量研究表明，农杆菌 T-DNA 整合到植物基因组中的位置是随机的，并且整合到植物基因组中的 T-DNA 能稳定遗传。由于插入到植物基因组中的 T-DNA 区段序列已知，这样随机插入到植物基因组中的 T-DNA 类似于给植物基因“贴”了一个序列标签。我们利用这个标签，通过各类 PCR 技术最终可以获取其插入的位点。

2. 水稻 *Tos17* 反转录转座子

创造水稻突变体的另一种方法是利用植物的反转录转座子，它们是以 DNA→RNA→DNA 的方式进行转座，在水稻上已发现大约 40 种长末端重复的反转录转座子，它们是 *Tos1-Tos32*，*RIRE1-RIRE8*，其中 5 类被证明是有转座活性的，分别是 *Tos10*、*Tos17*、*Tos19*、*Tos25* 和 *Tos27*。这些反转录转座子只有在组织培养条件下才具备转座活性，其中 *Tos17* 的转座活性最强，容易插入到富含基因的区域，因此可以直接用于创造插入失活的突变体库。利用含有 *Tos17* 插入的水稻突变体库，可以进行突变性状的筛选。

Tos17 反转录转座子正成为水稻功能基因组研究的一个有力工具。由于 *Tos17* 反转

录转座子为水稻内源的转座子，不需要进行转基因的过程，而且平均每株含有8个Tos17个拷贝，在正常情况下能够稳定遗传，因此Tos17转座子突变体库是水稻功能基因组研究的一个有用资源。但也有研究表明，Tos17在转座过程中存在几类转座热点，它容易插入到与抗病相关基因及蛋白激酶基因中。同时，Tos17插入突变体库中观察到的突变体大约只有10%的突变是真正由于Tos17插入造成，另外的突变可能是由于组织培养过程中体细胞变异造成的，也有可能是组织培养激活了其它类的转座子发生转座所致。

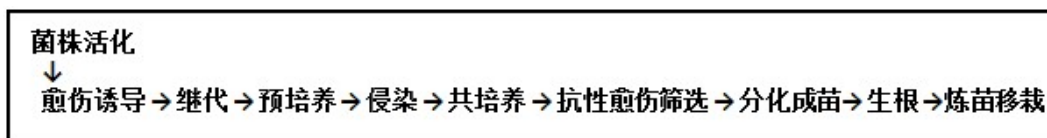
3. 水稻突变体库功能

由于 T-DNA 在植物基因组中能稳定遗传，且拷贝数较低，对于突变体的遗传分析较容易。加之 T-DNA 序列已知，一旦发现某个突变性状与 T-DNA 共分离，则采用 Tail-PCR、Inverse-PCR 或质粒拯救等方法很容易分离 T-DNA 侧翼植物基因组序列。欲寻找某个基因的突变体，可以设计相应引物，采用 Pool-PCR 的方法高通量地筛选突变体库。

另外，通过构建 T-DNA 侧翼序列数据库，也可以大规模地寻找基因的突变体。采用 Tail-PCR 的方法分离 T-DNA 插入突变体库的侧翼序列，有助于将 T-DNA 插入位点在染色体上定位，寻找已知基因不同区段的突变体。此外，在 T-DNA 区段构建 Gene trap、Enhance trap 等元件后，还可通过检测报告基因来反映靶位点基因的表达模式。

4. 遗传转化体系建立

农杆菌介导的转化主要依据Hiei等(1994)的水稻转化方法并有所改动。简单流程如下：



粳稻品种愈伤组织诱导/继代、预培养/共培养及筛选培养基用 N6 培养基，分化和生根用 MS 培养基具体参见“农杆菌介导粳稻遗传转化” (陈秋红等，2018)。

5. 突变体库转化植株的编号

为了便于突变体库产生的所有信息如植株种子、T-DNA侧翼序列、报告基因的表达模式等的统一管理，本研究中水稻突变体库的管理参照统一的数据库管理和编号方

法进行，如编号“01Z11AB90”，“01”表示该突变体产生的年份为2001年；“Z11”表示转化的野生型亲本为中花11号，中花15的编号则为“Z15”，“AB”表示不同英文字母的组合，代表不同的区号；“90”为阿拉伯数字编号，表示同一小区内的顺序号，编号范围为“01-96”。

二、RMD 水稻突变体基因型鉴定

1. 水稻突变体发芽

由于突变体发芽率会普遍降低，我们建议发芽的方法是：首先取 10-20 粒突变体种子，采用常规催芽的方法，若最后突变体发芽率高于 60%的，即可将余下的种子进行常规催芽。如果发芽率偏低，我们建议您采用组培发芽 [具体方法见“组培水稻种子” (李燕等, 2018)]。

2. 突变体 DNA 的快速提取

突变体长到三叶一心后移栽至田间，移栽 2-3 天后可取叶片快速提取 DNA [参见方法“水稻 DNA 小样抽提” (凌飞等, 2018)] 用于基因型的鉴定。

3. 突变体基因型鉴定

3.1 构建水稻突变体载体介绍

T-DNA 突变体库我们一共用过 3 个载体：pFX, pSMR 和 pEGFP。它们在结构上没有差别，仅在报告基因位置存在差异(图 1 中蓝框)，其余位置完全一样。因此，无论是哪个载体，鉴定基因型的步骤都是一样的。

载体	报告基因
pFX	GUS&GFP
pSMR	GUS
pEGFP	GFP

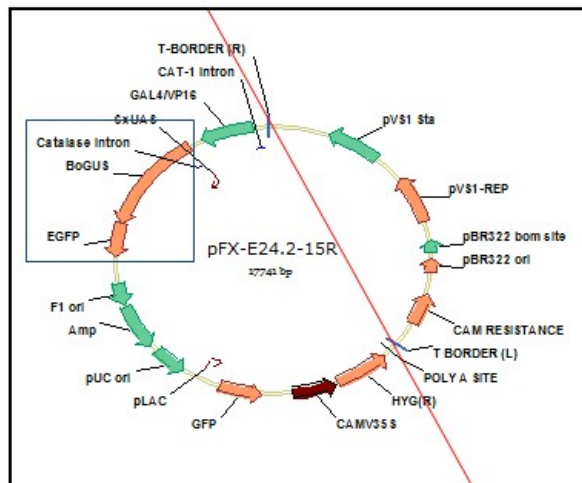


图 1. 构建水稻 T-DNA 突变体库所用载体图。图中斜线左侧为 T-DNA。

载体左端测序引物: NTLB5 5' AAT CCA GAT CCC CCG AAT TA 3'

载体右端测序引物: PFRB4 5' TGC AGG TTC TCT CCA AAT 3'

3.2 基因型检测的原理

对每个插入位点基因设计一对跨 T-DNA 或 *Tos17* 的基因组引物-Sense primer(S)和 Antisense primer(AS), 通过这两条基因特异引物(S 和 AS)与一条载体上已的引物(primer A 或 primer B)进行配对扩增, 就能确定后代的基因型 (见图 2)。

- 1) 如果 T-DNA 或 *Tos17* 在某位点的插入是纯合的, 当用基因组上一条引物 (S 或 AS)和载体引物进行配对扩增时, 能够得到目的条带。但是由于 T-DNA 或 *Tos17* 的插入使两条基因组引物(S 和 AS)间距太大, 所以用两条基因组引物 S 和 AS 不能扩增出条带;
- 2) 如果该位点没有 T-DNA 或 *Tos17* 插入, 当用两条基因组引物(S 和 AS)扩增时能够得到目标条带, 但用基因组上一条引物(S 或 AS)和载体引物配对扩增时不能得到目标条带;
- 3) 如果 T-DNA 或 *Tos17* 在某位点的插入是杂合的, 则用两条基因组引物(S 和 AS)以及一条基因组引物(S 或 AS)和载体引物的配对扩增都能得到目标条带。

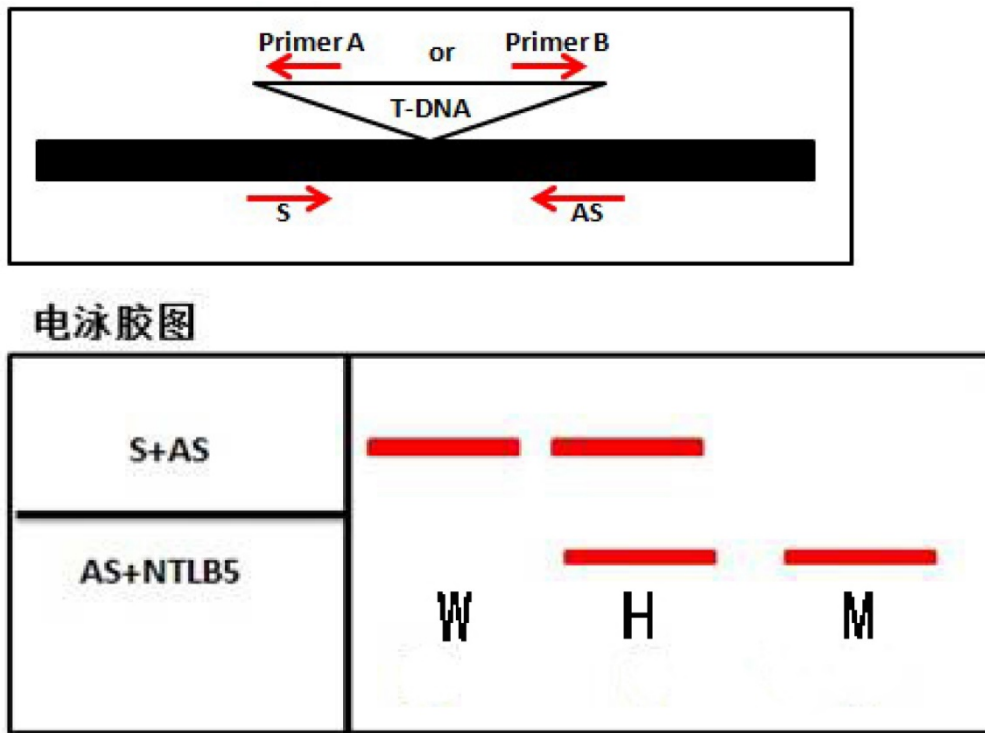


图2. 基因型检测原理图

3.3 引物选择

农杆菌 T-DNA 整合到植物基因组中的位置是随机的，可能出现正向插入和反向插入两种情况，同时我们分离侧翼序列时根据使用引物的不同，会分离到 T-DNA 左端侧翼序列和右端侧翼序列。当我们拿到感兴趣的突变体的编号后，如何选择合适的引物组合来进行基因型的鉴定呢？

第一步，确定序列比对中的 strand 值

具体方法是：将突变体的侧翼序列在 NCBI 上进行比对，比对结果中会出现一个 strand 值(如下图红框显示) (图 3)：

strand=Plus/Plus，代表我们分离到的侧翼序列与基因组正义链匹配；

Strand=Plus/Minus，代表我们分离到的侧翼序列与基因组反义链匹配；

```
>[ref|NC_008396.2|] [D] Oryza sativa Japonica Group
cultivar: Nipponbare
Length=37257345

Features flanking this part of subject sequence:
5890 bp at 5' side: hypothetical protein
2958 bp at 3' side: hypothetical protein

Score = 730 bits (395), Expect = 0.0
Identical: 404/404 (99%), Gaps = 0/404 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 1 GCAATGTA...TACTCACC...CGGCTAGCATACGACCTGC
Sbjct 5073229 GCAACGTA...TACTCACC...CGGCTAGCATACGACCTGC
```

图 3. 判断 strand 值及确定匹配方向示意图

但是，侧翼序列在基因组上的正反向并不能代表 T-DNA 在基因组上的的插入方向，我们还需要通过分析当初分离侧翼序列时使用的是 T-DNA 的左端还是右端的引物，来确定 T-DNA 在基因组上的的插入方向。

第二步，确定侧翼序列是在 T-DNA 左端还是右端

具体方法是：我们的突变体有统一的编号，前缀表示分离的方法等 (具体见 RMD 网站详细介绍)，后缀显示的是分离侧翼序列时所使用的引物 (见下图红框，测序时即可使用该引物) (图 4)。如果我们使用引物 NTLB5，代表分离得到的是 T-DNA 的左端序列，如果我们使用引物 PFRB4，代表分离得到的是 T-DNA 的右端序列。

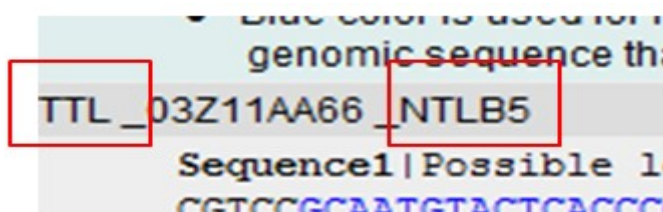


图 4. 侧翼序列标识图

第三步，T-DNA 在基因组上的的插入方向

根据第一步和第二步的结论，我们即可确定 T-DNA 在基因组上的的插入方向，并选择合适的检测基因型的引物 (结论见表 1，图 5)。

表 1. T-DNA 在基因组上的插入方向

分离侧翼序列引物	strand=Plus/ Plus	Strand=Plus/Minus
NTLB5分离	反向插入	正向插入
PFRB4分离	正向插入	反向插入

T-DNA 正向插入到基因组中情况:



T-DNA 反向插入到基因组中情况:



图 5. T-DNA 插入方向示意图

第四步，确定引物组合

根据第三步的结论，我们可以选择引物组合进行基因型鉴定(见表 2)。

表 2.基因型鉴定引物组合

分离侧翼序列的引物	T-DNA正向插入	T-DNA反向插入
NTLB5	S+AS/S+NTLB5	S+AS/AS+NTLB5
PFRB4	S+AS/AS+PFRB4	S+AS/S+PFRB4

3.4 举例说明

鉴定基因型的步骤:

- 1) 用突变体的侧翼序列 (可在 <http://rmd.ncpgr.cn/> 查找)和水稻基因组比对 (推荐 NCBI), 找到 T-DNA 插入位点。以 03Z11AA66 为例, 其侧翼序列为:

```
>Sequence1|Possible location: Chromosome 3 (by Zhang Jian)
CGTCCGCAATGTACTCACCCGGCCTAGCATACGACCTGCTGCCTGT
CTTGAGAACGCCACGAAGCGGCAGCCTGCATGTCGTTTACGAGGA
GCCCTTAGATTCCCCTCCAGAATTAGGAGTACACGCCCTGTGTTGG
```


TGTCGATCAATCGATAATGTAGATTGATCGCAATCGAGATGGGTGTT
 GATGAGCAGGATCATATCCATCCTCCTCTTGGGGGTTTCTCTGCAG
 GCTCCTGACAGACAATGAATGTGTGCACATGATCAATGCAGATGCG
 TGCAGCTATCGAAATCTTGGTTGGTACTTGTCTGGATGGCTTGATT
 AGATTGTTAATACCAAACACATTTTTTCGCTCATACTGATATACGAG
 TAGTAGTAGGACTTCCTCGTGAGCTCTCTTGAATTCATCTCACTCGA
 CGA

- 2) 用该侧翼序列在 NCBI 上做 BLAST，由 BLAST 结果可知以下信息 (如图 6):
- T-DNA 插入点为第三染色体 5013391 处，
 - 该家系 strand=Plus/Plus，
 - 分离侧翼序列的引物为 NTLB5 (TTL_03Z11AA66 _NTLB5)
- 将 b 和 c 结果对应表应得知 T-DNA 是反向插入在基因组中。

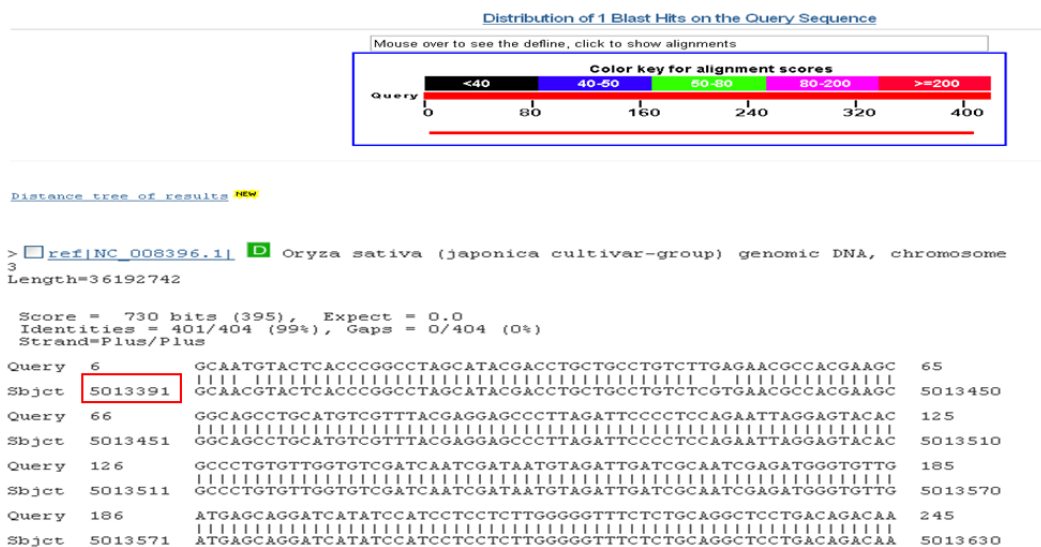


图 6. 03Z11AA66 侧翼序列 NCBI Blast 结果展示

- 3) 在插入位点(5013391)处，取前后 1Kb 的序列如下 (加粗为引物潜在区):
- 1 agcccaacc gaccctgcc cgctctgttg ccatccctag ctgcaacctc gggtgcccca
 61 ccagcgagca tgggcaattc cgtctcatca cccggtattc caacgaaaa gattcaaaa
 121 atgcacaaaa cgatcgaaat ggcaaagtga ctgtgagtac gcgcttcata ttgacatttt
 181 aacgaagcgt gttttgaga tggcattcca atgatactgt ttttaaacc tggtaaatg
 241 tccattttct agttcgggac ttcccagtc tagccatgta gctgagagc tgagatacac

301 accccagcag tatcctgtgc aaggcatgat cgagtcgaat ccgccctgc caatggcaca
 361 agtctttca aggggtgtt tagcccctct cccccccc cccccctag ctagctgga
 421 gtggctggcg ctacgcatgc acaggcacgt cgcttcgcc gctgctgca tcatatgcat
 481 ccatccatct ggtctcctgt tttatggacg gacgggtcgc tgcacggcg gtctgcacgc
 541 tgtcacgcgc agcctggcat acgggcttgt catatgcaa agatgcagac acacacgaca
 601 caagagccag ttggggttg gaggttgcgc gtagccttt tccacacgt gaccccctc
 661 ctactctcc cactgccgc acaacttacc aggatccatg cgagaatcg accaaaaacg
 721 ccaccaatct cgtgaactcc accacctcca tcgtatgcc cggccttcc actagctagc
 781 agcctagcac acagctgac gatcggcgaa gctagtcacg ccacggcgat gcgattatcc
 841 cgggtcgtt tacgcgcg cgcctagggt gtcggatggg ctatgtctc gtcgttgcca
 901 ctgctgtgt gtgtacaaa tcgggtcgt ttttcgact gttggtgat gcgagtacct
 961 accgcatgt atggacggc ctgcaggcga cttgtgatg gcaacgtact caccggcct
 1021 agcatacgac ctgctgctg tctcgtgaa gccacgaagc ggcagcctgc atgtcgtta
 1081 cgaggagccc ttagattccc ctccagaatt aggagtacac gccctgtgt ggtgtgatc
 1141 aatcgataat gtagattgat cgcaatcgag atgggtgtg atgagcagga tcatatccat
 1201 cctcctctg ggggttctc tgcaggctcc tgacagacaa tgaatgtgt cacatgatca
 1261 atgcagatgc gtgcagctat cgaaatctg gttgtactt gtcctggatg gcttgattag
 1321 attgtaata ccaaacaca tttttcgtc catactgata tacgagtagt agtaggactt
 1381 cctcgtgagc tctcttgaat tcatgtgtt cggagcggca gcgtcacacg ctgcgccct
 1441 acgcattttt aggatctcag agcagtcac agtcttcgtg tacctcagta ctttgaattc
 1501 tctttgcctg tagcagatgc tttttttt tgacatgaat agcagatgca ttcactgtgc
 1561 attccctcc cccttctc gatcgacgcg acttaccgt atactgcac actgcaaact
 1621 cacataaatt taccgtgac cgtgtgccc tgtgatcac ctccaatcaa actgtccttc
 1681 cctttcacc taaaaggac cggccggaac gcttctctca tcttcagtc gtactattac
 1741 agtccagtcg ccgcaatgga tggctggcat gtcaaagatg atgaattgt gatggtggca
 1801 cccggttgca cttgcgccc cggctggcaa cgcggcatca cagatctac acgcgaggac
 1861 taaaaccga cgtgacaaca cggccgccc caacgacgag accggccgt atgggagctt
 1921 gccgctgcat gcgacgtcga cgttgatgtg gccaaagac ggagcgttac gtatagtgcg
 1981 ctctacgca ggcgcatg c

针对这段序列设计两条引物 (下图中 AS, S, 图 7), 产物大小在 800 至 1200bp 之间 (建议在 1Kb 左右), 插入位点在产物中间位置 (距离产物两端 400-600bp 均可)。

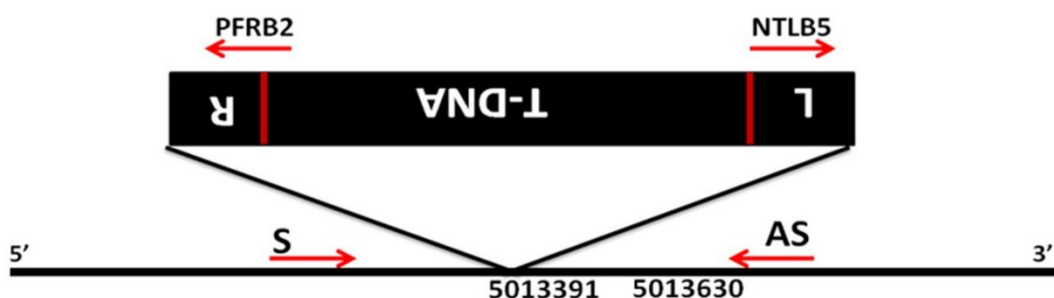


图 7. 03Z11AA66 T-DAN 在基因组上插入位置方向示意图

对于 03Z11AA66 家系而言，则应该选择引物组合为：S+AS/AS+NTLB5 或者 S+AS/S+PFRB4，由于我们分离出的是左端序列，您一般用 NTLB5 来验证杂合、纯合，即选用组合 S+AS/AS+NTLB5。当然也可以选择 S+AS/S+PFRB4 组合，特别是第一个组合扩增不出来的时候。

4) 使用引物检测基因型(条带位置根据你的引物而定) (图 8)

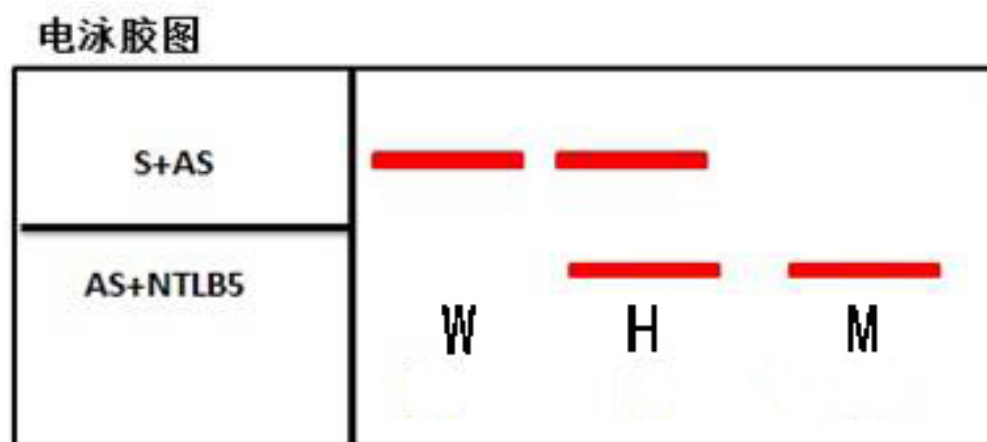


图 8. 引物检测基因型电泳示意图 (W: 野生型, H: 杂和型, M: 纯和型)

3.5 对于 *Tos17* 反转录转座子的突变体，检测原理与 T-DNA 插入突变体基因型检测原理步骤是一致的，引物选择如下表 3:

表 3. *Tos17* 反转录转座子突变体检测引物组合

分离侧翼序列的引物	<i>Tos17</i> 正向	<i>Tos17</i> 反向
TOSLS	S+AS/S+TOSLS	S+AS/AS+TOSLS
TOSRS	S+AS/AS+TOSRS	S+AS/S+TOSRS

参考文献

1. 陈秋红, 陈太钰. (2018). 农杆菌介导粳稻遗传转化. *Bio-101* e1010174. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010174. (in press)
2. 李燕, 龙湍, 吴昌银. (2018). 组培水稻种子发芽. *Bio-101* e1010183. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010183.
3. 凌飞, 吴昊. (2018). 水稻 DNA 小样抽提. *Bio-101* e1010101. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010101. (in press)
4. 吴昌银. (2003). 水稻 T-DNA 插入突变体库及其 Enhancer trap 系的创建. [博士学位论文]. 武汉: 华中农业大学图书馆.
5. Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. and Kumashiro, T. (1994). [Efficient transformation of rice \(*Oryza sativa* L.\) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA.](#) *Plant J* 6(2): 271-282.