

潘晓寒. 模式植物基因功能突变数据库资源报告[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(2): 39-42.

模式植物基因功能突变数据库资源报告

潘晓寒

(南京大学生命科学学院, 江苏南京 210093)

摘要:拟南芥与水稻是植物基因组中的模式生物,植物的基因功能及基因结构间的相关联系一直是研究的重点,通过对这 2 种模式生物进行基因敲除来确定基因功能是目前对植物基因研究最为普遍的做法。目前,关于基因功能突变体的数据资源的介绍并不充分,针对这种情况,本文介绍了基因功能研究的大规模随机敲除突变的常见载体标签及其方法,并给出了与其相应的相关数据库的介绍。

关键词:基因敲除;数据库;模式生物;标签

中图分类号: Q754 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)02-0039-04

目前,基因研究已逐渐由结构基因组学向功能基因组学领域展开。拟南芥和水稻作为模式生物,在植物中率先展开基因功能的研究^[1]。目前,对基因功能的研究方法有许多种,而建立敲除突变体库是最常见的方法^[2]。基因敲除是指用方法使植物基因失活,然后通过观察表型来确定基因结构和功能的关系。最初, γ 射线、化学诱变剂 EMS 等物理化学诱变方法被用来制作突变体^[3],之后同源重组^[4]、基因沉默、RNA 干扰^[5]等方法也被用来制作突变体,但这些方法都不足以在多细胞生物体中构建能够包含所有基因的突变体库。自农杆菌在单子叶植物中的转化技术获得成功后,利用外源序列对植物基因组的大规模插入来构建突变体库成为最常用也是最可靠的办法^[6-7]。根据插入元件的不同,大规模外源基因的插入建立的突变体库可以大致分为 3 种:T-DNA 插入构建的突变体库^[8-9]、转座子插入构建的突变体库^[10-11]以及

反转座子插入构建的突变体库^[12-13]。目前在全世界范围内已建立了大量的上述 3 种元件作为突变工具的水稻和拟南芥的突变数据^[14-15]。

随着研究深入,更多的突变体库在全世界范围内建立起来^[16],在拟南芥中更是实现了几乎全部基因都有敲除突变的高覆盖率^[2]。在其他植物(如玉米、马铃薯、小麦、苜蓿等)中也都有插入突变数据库的存在^[17-19],不过数据尚不够充分。本文介绍了一些重要的拟南芥和水稻突变体库目前的规模和制造突变株的方法,为需要突变株种子以及数据的学者提供方便。

1 大规模外源基因插入构建突变体库的几种常用方法

1.1 T-DNA 插入构建突变体库

T-DNA 突变体库的建立首先需要制作载体 Ti 质粒。抗性基因被整合入载体,然后导入农杆菌中。取植物的愈伤组织进行诱导和继代培养,将继代培养的植物愈伤组织放入农杆菌培养液之中,使其感染农杆菌,最后转入选择培养基培养。在进行完 2 次选择培养后,将长出的抗性愈伤组织通过组织分化形成植株,对植株进行转基因检测来确保基因敲除

收稿日期:2013-07-18

作者简介:潘晓寒(1988—),女,江苏宜兴人,硕士研究生,研究方向为生物进化。E-mail:huajianji00@163.com。

生长情况来看,香蕉汁处理的生根率、根数、根长都优于马铃薯汁处理,在培养 65 d 时,3 个香蕉汁处理的平均根长都在 0.65 cm 以上,其中以添加 25% 香蕉汁处理的效果最好,其根长达 0.84 cm。从丛生芽的生长情况来看,香蕉汁和马铃薯汁对铁皮石斛丛生芽的生长都有促进作用,在培养 65 d 时各处理的平均株高达到 1.86~2.1 cm,且香蕉汁处理的平均株高均稍大于马铃薯汁处理,其中 25% 香蕉汁处理的株高最大,为 2.1 cm。综合试验结果,本研究认为,香蕉汁比马铃薯汁更有利于铁皮石斛壮苗生根培养,且以 25% 香蕉汁处理效果最佳,这可能是香蕉汁和马铃薯汁所含的成分不同所致,有关这方面还需进一步研究。

参考文献:

- [1]王宪楷,赵同芳. 石斛属植物的化学成分与中药石斛[J]. 中国药学杂志,1986,21(11):666-669.
- [2]杨一令,来平凡,蒋士鹏. 铁皮石斛的研究进展[J]. 山东中医药大学学报,2008,32(1):82-85.

- [3]淳泽. 药用石斛的资源危机与保护对策[J]. 资源开发与市场,2005,21(2):139-140.
- [4]刘瑞驹,蒙爱东,邓锡青,等. 铁皮石斛试管苗快速繁殖的研究[J]. 药学报,1988,23(8):636-640.
- [5]张治国,刘烨,王黎,等. 铁皮石斛原球茎增殖的培养条件研究[J]. 中草药,1992,23(8):431-433.
- [6]廖俊杰,许继勇,李进进,等. 铁皮石斛试管种苗产业化生产的技术因素分析[J]. 中药材,2006,29(6):533-535.
- [7]曾宋君,程式君,张京丽,等. 五种石斛兰的胚培养及其快速繁殖研究[J]. 园艺学报,1998,25(1):76-81.
- [8]郭洪波. 铁皮石斛(*Dendrobium candidum*)组培快繁及其抗癌作用的研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2008:3-10.
- [9]魏梅娟,李雪,叶清梅,等. 铁皮石斛组培苗生长的影响因素研究[J]. 北方园艺,2011(2):146-148.
- [10]曹改义,刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州:甘肃科学技术出版社,2002:85-126.
- [11]刘晓燕,向青云,刘玲玲,等. 基本培养基及附加物对蝴蝶兰原球茎增殖效果的影响[J]. 种子,2005,24(6):18-20,26.

工作的完成。提取植物 DNA,用 TAIL-PCR 等方法得到旁邻序列,测序比对全基因组序列得到 T-DNA 插入的具体位置^[20]。

1.2 转座子插入构建突变体库

转座子系统分为一元系统和二元系统 2 种。二元系统是将 Ac 转座子和 Ds 转座子分别插入到 2 个 T-DNA 载体之中^[21],侵染植株,让 2 种植株杂交得到 F₁ 代,又通过自交得到 F₂ 代,在 F₂ 代中对 Ac 转座酶进行筛选。为了稳定 Ds 的插入位置使其不再转移,需要对 Ac 转座子的存在进行排除。一元系统简化了二元系统,同时将 Ac 的转座酶编码序列和 Ds 转座子载入一个 T-DNA 载体上,通过转座酶的存在使 Ds 跳跃移位。因此在第一代中就能得到 Ds 跳跃的植株^[22-23]。当 Ds 转座子转移出原插入位点后,则可以通过筛选将转座酶基因去除,得到稳定遗传突变株。目前作为转座子插入的转座子有玉米转座子 *Ac/Ds*、*En/Spm* 以及金鱼草转座子 *Tam3*。

1.3 反转座子标签插入法

1999 年,Sato 等利用水稻逆转座子 *Tos17* 基因敲除体系分离了 6 个水稻 kn1-型同源异型框基因,发现了水稻矮化突变基因 *OSH15*。*Tos17* 从此成为植物基因水稻中的一个内源反转座子突变载体^[24],主要被用来在水稻中进行突变体数据库的研究^[25]。*Tos17* 在自然条件下约有 4 个拷贝数,在组培的条件下激活,可有 5~30 个拷贝数插入,分化成植株后就失活,因此 *Tos17* 插入引起的突变可以稳定遗传^[26]。*Tos17* 的拷贝数随着组织培养时间延长而增多,可以通过控制组织培养时间来控制转座的拷贝数^[27]。

2 相关植物突变数据库的介绍

2.1 拟南芥突变数据库

下面分别介绍了水稻和拟南芥的一些常用的重要突变数据库,表 1 列出了质粒中所存在的各种元件及其作用。

表 1 质粒中存在的各种元件的名称与作用	
缩写名称	作用
19S CaMV Pro	花椰菜花叶病毒 19S 启动子
35S CaMV Pro	花椰菜花叶病毒 35S 启动子
<i>Amp</i>	氨苄青霉素抗性基因
F ₁ ori	F ₁ 噬菌体复制起始位点
<i>GAL4/VP16</i>	酵母转录激活蛋白 <i>Gal4</i> 基因/单纯疱疹病毒蛋白 VP16 蛋白基因
<i>GFP</i>	绿色荧光蛋白基因
<i>GUS</i>	转 β-葡糖醛酸酶基因
<i>Hph</i>	潮霉素抗性基因 <i>aph(4)-Ia</i>
<i>Hyg</i>	潮霉素抗性基因 <i>aph(4)-Ib</i>
I2	水稻 α 微管 A1 基因第二内含子
MAS Pro	甘露碱合成酶双向启动子
<i>Nos pro</i>	农杆菌胭脂碱启动子
<i>Nos Ter</i>	农杆菌胭脂碱终止子
<i>Npt II</i>	新霉素磷酸转移酶,抗卡那霉素基因
<i>OsTubA1</i>	水稻 α 微管 A1 基因
<i>OsTubA1 Pro</i>	水稻 α 微管 A1 基因启动子
<i>OsTubA1 Ter</i>	水稻 α 微管 A1 基因终止子
ployA	ployA 尾巴
pUC ori	pUC 质粒的复制起点
pUC18 patial sequence	pUC18 质粒部分序列
<i>SulI</i>	磺胺药物抗性基因

2.1.1 SALK T-DNA 数据库 SALK 实验室是目前用 T-DNA 插入的方法建立的拟南芥基因组插入突变数据库中突变最为可观的实验室。数据库使用传统的 T-DNA 载体,对拟南芥生态型 col 进行基因敲除工作。目前完成 137 259 个转基因植株,敲除拟南芥 96% 以上基因。这个插入数目在拟南芥中已经接近饱和^[2]。SALK 实验室使用的质粒载体是 pROK2,这是一个由 pBIN19 改良后的质粒,拥有卡那霉素抗性基因^[28]。图 1 给出了 SALK 实验室的载体结构。

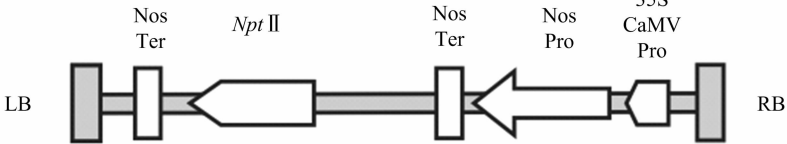


图1 SALK实验室的载体构造

2.1.2 RATM(Riken) *Ac/Ds* 转座子敲除数据库 RATM 数据库是一个采用 Ds 转座子对拟南芥进行基因敲除的数据库^[29]。这个基因敲除数据库已有 17 671 个突变株。突变体库采用二元载体的方法,将含有 Ac 转座酶序列的 T-DNA 插入突变株与含有 Ds 转座子的 T-DNA 插入突变株杂交,得到突变株种子,然后对种子进行植株培养,再自交对种子进行筛选,剔除那些含有 Ac 转座酶的不稳定植株。图 2 给出了 RTAM 转座子标签的结构。

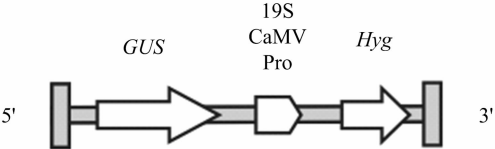


图2 RATM数据库的载体构造

2.1.3 GABI-Kat T-DNA 数据库 GABI-Kat 数据库是一个使用 T-DNA 对拟南芥生态型 col-0 进行基因敲除的数据库,在 T-DNA 插入数据库数目仅次于 SALK T-DNA 数据库。目前已有 130 000 条侧翼序列标签以及 70 578 左右的突变株系。其中被敲除的基因数量达 62.5%^[30]。质粒是 pAC161、pADIS1、pAC160 和 pGABI^[31],通过加入增强子作为激活标签。F₁ 代抗性植株的种子在 F₂ 代时可能会丢失插入的 T-DNA,因此所有的二代种都必须经过检验确定 T-DNA 插入。目前这个数据库的 T-DNA 保留率在 78% 左右^[32]。图 3 给出了 GABI-Kat 载体 pAC161 的结构。

2.2 水稻突变数据库

2.2.1 POSTECH RISD T-DNA 数据库 RISD 数据库是由韩国 postech 中心植物功能基因组实验室构建的以传统的 T-DNA 为载体的数据库,大约有 47 932 个 T-DNA 插入突

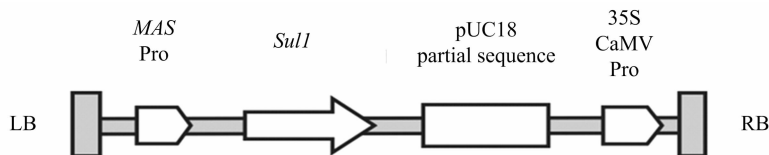


图3 GABI-Kat载体pAC161的构造

变株^[33-34]。另外在 T-DNA 的插入过程中,需通过组培的阶段,因而产生反转座子 *Tos17* 的新插入,生成一部分新的突变株。使用的载体有 pGA2707、pGA2717 以及激活标签载体

pGA2715、pGA2772^[35]。图 4 给出 postech 实验室 T-DNA 载体 pGA2707 的结构。

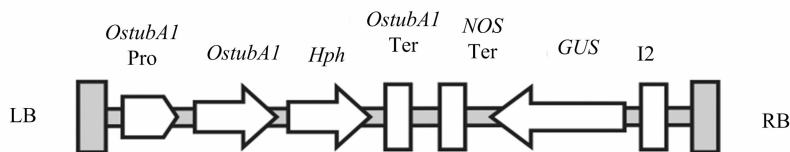


图4 RISD 载体 pGA2707 的构造

2.2.2 SHIP T-DNA 数据库 SHIP 数据库是中国科学院上海植物生态生理研究所建立的 T-DNA 插入突变体库,以水稻粳稻中花 11 作为受体品种。对插入到基因的突变株植株

进行分离,使用的质粒为 pSMR-J18R,这是水稻基因突变研究较常见的载体,少数植株采用质粒 pCambia1301^[36]。图 5 给出 SHIP 实验室 T-DNA 载体 pSMR-J18R 的结构。

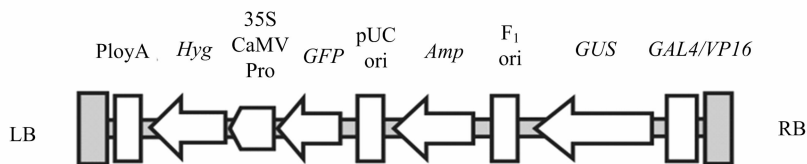


图5 SHIP载体 pSMR-J18R 的构造

2.2.3 RTIM *Tos17* 突变数据库 RTIM 数据库由日本农业资源研究所 (NIAS) 开展构建,采用的水稻株系是粳稻品种日本晴^[37]。该数据库利用 *Tos17* 反转座子来制造突变数据库^[38],突变株中反转座子插入位点数量较高,通常每个突变株都带有 10~12 个反转座子插入。

3 植物突变数据库的研究前景

基因功能的研究继基因结构研究之后对生物自身信息进一步解密,直接关系到生物表型和遗传信息之间的联系,因此尤为被关注。目前,植物基因功能研究正如火如荼地展开,单个基因进行敲除后进行培育获得的稳定遗传的纯和突变株系为后续展开的基因功能的研究提供了很好的研究模型。例如,在植物信号传导、抗逆性研究上突变株起到了不可替代的作用。此外,基因功能获得突变株也和功能缺失突变株系一样在研究中得到重视。本文介绍的这些数据库大部分都提供突变株种子,以满足研究者们对基因功能研究的需要。

随着模式生物基因组研究的深入,各种非模式生物的基因组研究也开始进行。同一个基因结构在不同植物是否拥有相同的功能,基因结构进化的同时是否带入了功能的演变,基因在不断进化分化的同时,功能又受到怎样的影响,基因数量的演变与功能的存在有何关系,都是在植物功能数据库进一步完善后所需解决的问题。另外,载体的构建及抗性基因的筛选等步骤,都将在未来进一步精简,更多的为了专门的研究而提出的新方法也将陆续出现。

参考文献:

- [1] Arabidopsis G I. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nature*, 2000, 408 (6814): 796 - 815.
- [2] Alonso J M, Stepanova A N, Leisse T J, et al. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Science Signaling*, 2003, 301 (5633): 653 - 657.
- [3] Till B J, Colbert T, Codomo C, et al. High-throughput TILLING for *Arabidopsis* [J]. *Methods Mol Biol*, 2006, 323: 127 - 135.
- [4] Rong Y S, Golik K G. Gene targeting by homologous recombination in *Drosophila* [J]. *Science*, 2000, 288 (5473): 2013 - 2018.
- [5] Dietzl G, Chen D, Schnorrer F, et al. A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila* [J]. *Nature*, 2007, 448 (7150): 151 - 156.
- [6] Ülker B, Li Y, Rosso M G, et al. T-DNA-mediated transfer of *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal DNA into plants [J]. *Nature Biotechnology*, 2008, 26 (9): 1015 - 1017.
- [7] Lorieux M, Blein M, Lozano J, et al. In-depth molecular and phenotypic characterization in a rice insertion line library facilitates gene identification through reverse and forward genetics approaches [J]. *Plant Biotechnol J*, 2012, 10 (5): 555 - 568.
- [8] Fu F F, Ye R, Xu S P, et al. Studies on rice seed quality through analysis of a large-scale T-DNA insertion population [J]. *Cell Research*, 2009, 19 (3): 380 - 391.
- [9] Li Y, Rosso M G, Viehoveer P, et al. GABI-Kat SimpleSearch: an

- Arabidopsis thaliana* T – DNA mutant database with detailed information for confirmed insertions[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35 (Suppl 1): D874 – D878.
- [10] Kumar C S, Wing R A, Sundaresan V. Efficient insertional mutagenesis in rice using the maize *En/Spm* elements[J]. *The Plant Journal*, 2005, 44(5): 879 – 892.
- [11] Schneider A, Kirch T, Gigolashvili T, et al. A transposon – based activation – tagging population in *Arabidopsis thaliana* (TAMARA) and its application in the identification of dominant developmental and metabolic mutations[J]. *FEBS Letters*, 2005, 579(21): 4622 – 4628.
- [12] Hirochika H, Miyao A, Yamazaki M, et al. Retrotransposons of rice as a tool for the functional analysis of genes[C]//Rice genetics IV. Proceedings of the Fourth International Rice Genetics Symposium, 2001: 279 – 292.
- [13] Petit J, Bourgeois E, Stenger W, et al. Diversity of the Ty – 1 copia retrotransposon *Tos17* in rice (*Oryza sativa* L.) and the AA genome of the *Oryza* genus[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2009, 282(6): 633 – 652.
- [14] 阎双勇, 谭振波, 李仕贵. 水稻插入突变库构建研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2004, 24(6): 48 – 53.
- [15] 赵 霞, 周 波, 李玉花. T – DNA 插入突变在植物功能基因组学中的应用[J]. *生物技术通讯*, 2009, 20(6): 880 – 884.
- [16] An G, Jeong D H, Jung K H, et al. Reverse genetic approaches for functional genomics of rice[J]. *Plant Molecular Biology*, 2005, 59(1): 111 – 123.
- [17] Supartana P, Shimizu T, Nogawa M, et al. Development of simple and efficient in planta transformation method for wheat (*Triticum aestivum* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Journal of Bio-science and Bioengineering*, 2006, 102(3): 162 – 170.
- [18] Scholte M, d'Erfurth I, Rippa S, et al. T – DNA tagging in the model legume *Medicago truncatula* allows efficient gene discovery[J]. *Molecular Breeding*, 2002, 10(4): 203 – 215.
- [19] Tadege M, Wen J, He J, et al. Large – scale insertional mutagenesis using the Tnt1 retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*[J]. *The Plant Journal*, 2008, 54(2): 335 – 347.
- [20] 李爱宏, 张亚芳, 吴昌银, 等. 水稻 T – DNA 插入突变体库的筛选及遗传分析[J]. *遗传学报*, 2006, 33(4): 319 – 329.
- [21] Johnson A A T, Yu S M, Tester M. Activation tagging systems in rice [M]//Rice functional genomics. New York: Springer, 2007: 333 – 353.
- [22] Wan S, Wu J, Zhang Z, et al. Activation tagging, an efficient tool for functional analysis of the rice genome[J]. *Plant Molecular Biology*, 2009, 69(1/2): 69 – 80.
- [23] Greco R, Ouwerkerk P B F, De Kam R J, et al. Transpositional behaviour of an *Ac/Ds* system for reverse genetics in rice[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 108(1): 10 – 24.
- [24] Sato Y, Sentoku N, Miura Y, et al. Loss – of – function mutations in the rice homeobox gene *OSH15* affect the architecture of internodes resulting in dwarf plants[J]. *EMBO J*, 1999, 18(4): 992 – 1002.
- [25] Hirochika H, Mew T W, Brar D S, et al. Insertional mutagenesis in rice using the endogenous retrotransposon[J]. *Rice Science: Innovations and Impact for Livelihood*, 2003: 205.
- [26] Miyao A, Tanaka K, Murata K, et al. Target site specificity of the *Tos17* retrotransposon shows a preference for insertion within genes and against insertion in retrotransposon – rich regions of the genome [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(8): 1771 – 1780.
- [27] Hirochika H. Insertional mutagenesis with *Tos17* for functional analysis of rice genes[J]. *Breeding Science*, 2010, 60(5): 486 – 492.
- [28] Ülker B, Peiter E, Dixon D P, et al. Getting the most out of publicly available T – DNA insertion lines[J]. *The Plant Journal*, 2008, 56(4): 665 – 677.
- [29] Ito T, Motohashi R, Kuromori T, et al. A resource of 5814 dissociation transposon – tagged and sequence – indexed lines of *Arabidopsis* transposed from start loci on chromosome 5 [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2005, 46(7): 1149 – 1153.
- [30] Kleinboelting N, Hupé G, Kloetgen A, et al. GABI – Kat Simple Search: new features of the *Arabidopsis thaliana* T – DNA mutant database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(Suppl 1): D1211 – D1215.
- [31] Rosso M G, Li Y, 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.
- [32] Riaño – Pachón D M, Nagel A, Neigenfind J, et al. GabiPD: the GABI primary database—a plant integrative ‘omics’ database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(Suppl 1): D954 – D959.
- [33] An G, Lee S, Kim S H, et al. Molecular genetics using T – DNA in rice[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2005, 46(1): 14 – 22.
- [34] Jeong D H, An S, Park S, et al. Generation of a flanking sequence – tag database for activation – tagging lines in japonica rice[J]. *Plant J*, 2006, 45(1): 123 – 132.
- [35] An S, Park S, Jeong D H, et al. Generation and analysis of end sequence database for T – DNA tagging lines in rice [J]. *Plant Physiology*, 2003, 133(4): 2040 – 2047.
- [36] Wu G Z, Shi Q M, Niu Y, et al. Shanghai RAPESEED Database: a resource for functional genomics studies of seed development and fatty acid metabolism of *Brassica*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(Suppl 1): D1044 – D1047.
- [37] Cheng C, Daigen M, Hirochika H. Epigenetic regulation of the rice retrotransposon *Tos17*[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2006, 276(4): 378 – 390.
- [38] Miyao A, Hirochika H. Transposon insertion lines of rice for analysis of gene function[M]//Rice blast: interaction with rice and control. Netherlands: Springer, 2004: 107 – 112.