

程 孝,焦翠翠,孙丙耀. 水稻稃片白化突变体 Ds 标记基因的外显子改组分析[J]. 江苏农业科学,2015,43(12):22-25.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.12.006

水稻稃片白化突变体 Ds 标记基因的外显子改组分析

程 孝,焦翠翠,孙丙耀

(苏州大学医学部基础医学与生物科学学院,江苏苏州 215123)

摘要:以含 Ds 元件的水稻稃片白化突变体为材料,采用 TAIL-PCR 技术分离 Ds 侧翼序列,并基于 cDNA 末端快速扩增技术(RACE)扩增 Ds 标记基因 cDNA 的 3'端序列,分析突变体基因组上 Ds 插入引起的标记基因外显子改组现象。结果显示,水稻稃片白化突变体基因组含 2 个 Ds 拷贝,分别插入于 1 号和 3 号染色体上的类 CBS 结构域蛋白基因和推定的氧化还原酶基因的编码区;cDNA 和基因组 DNA 经比对分析显示,Ds 插入后,2 个基因均导致基因的外显子改组,类 CBS 结构域蛋白基因和推定的氧化还原酶基因分别出现部分内含子序列和 Ds 序列的外显子化现象;Ds 标记基因的编码区虽都出现了截短,但 RACE 扩增证实其在 Ds 插入后仍可表达出成熟的 mRNA,这意味着 Ds 等转座元件介导的外显子改组,可能在基因组进化和蛋白质组多样化中发挥重要作用。

关键词:水稻;稃片;白化突变体;Ac/Ds;外显子改组;3'-RACE

中图分类号:S511.01 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)12-0022-04

外显子改组被认为是内含子重组产生外显子新组合的自然过程^[1-3],是新基因形成的重要分子机制。近几年研究显示,转座元件在介导外显子改组及产生新基因过程中发挥重要作用^[4-5]。同时,转座元件序列的外显子化也被发现与新基因的产生和种内多样性有关^[6]。目前,有关转座元件外显子化的研究主要集中在灵长类反转录转座元件 Alu^[7],而植物转座元件外显子化的报道相对较少。玉米基因组的 Ac/Ds 转座元件是最早发现的 hAT 超家族(hobo/Ac/Tam³)成员,最近,Huang 等分析转基因烟草中 Ds 元件插入 EPSPS 标记基因后的 Ds 外显子化发现,Ds 元件偏爱为外显子化提供剪接供体位点^[8]。本研究旨在以水稻品种 Dongjin Ac/Ds 插入突变库中筛选到 1 株含 Ds 插入的稃片白化突变体材料,在分离 Ds 侧翼序列的基础上,采用 cDNA 末端快速扩增技术(RACE)扩增 Ds 标记基因的 cDNA 序列,通过分析基因转录

水平表达产物,以分析 Ds 插入引起的相关基因外显子改组现象。

1 材料与方法

1.1 材料

稃片白化突变体来源于水稻品种 Dongjin (*Oryza sativa* L. var. japonica cv. Dongjin)的 Ac/Ds 插入突变体系,由韩国国立庆尚大学 Han Chang-deok 教授实验室提供,种子播种并栽培于江苏太湖地区农业科学研究所试验田。取田间栽培的野生型与突变体水稻完整植株,带回实验室观察表型,并取其幼嫩的新鲜叶片,提取植物基因组 DNA 用于后续试验研究。稃片白化突变体水稻与野生型水稻在抽穗期时表型及稃片存在明显差异,突变体水稻稃片表现出白化的特征(图 1)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据转座子 Ds 的序列特点,在 Ds 3'末端设计引物 SP1、SP2、SP3,分别与随机简并引物 AD1、AD2、AD3、AD4 搭配,进行温度不对称交错 PCR(TAIL-PCR)的第 1、第 2、第 3 轮扩增;以 TAIL-PCR 扩增获得的侧翼于 Ds 序列的水稻基因组序列设计 3'-RACE 扩增特异引物。除 3'-RACE 的通用引物外,其他引物均采用 Primer Premier 6.0 和 Oligo 7 软件进行设计。引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成,引物序列见表 1。

收稿日期:2015-04-06

基金项目:江苏省苏州市应用基础研究计划-农业部分(编号:SYN201204)。

作者简介:程 孝(1989—),女,安徽人,硕士,主要从事植物结构与发育生物学研究。E-mail:chengxiaol372113@163.com。

通信作者:孙丙耀,副教授,主要从事植物分子遗传学研究。Tel:(0512)65882833;E-mail:sunbingyao@suda.edu.cn。

亲本及其对菌核病抗性的研究[J]. 植物学通报,2005,22(3):292-301.

[14]刘宏波,郭 翔,崔鹏,等. 甘蓝型油菜抗病虫双价基因转化体系的建立[J]. 核农学报,2011,25(1):26-31.

[15]余青兰. 高产双低高含油量甘蓝型春油菜杂交种青杂 5 号(305)的选育[J]. 陕西农业科学,2007(4):56-57.

[16]Murashige T,Folke S. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture[J]. Physiologia Plantarum,1962,15(3):473-497.

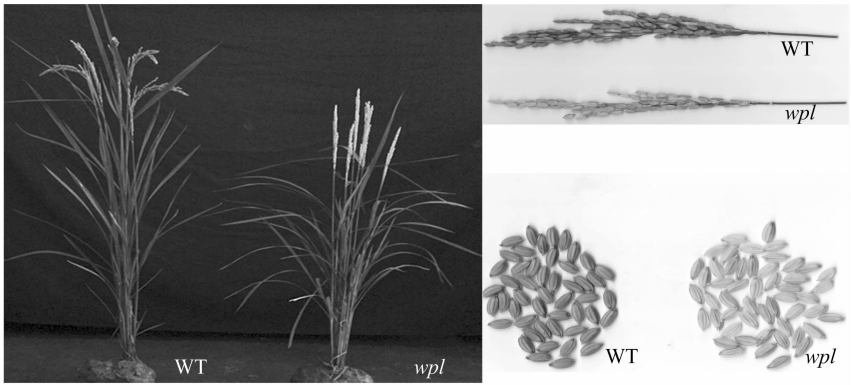
[17]Gamborg O L,Miller R A,Ojima K. Nutrient requirements of

suspension cultures of soybean root cells[J]. Experimental Cell Research,1968,50(1):151-158.

[18]杨长友,袁中厚,郑小敏,等. 甘蓝型油菜高效离体再生体系的建立[J]. 生物技术通报,2013(1):111-115.

[19]Bhalla P L,Singh M B. Agrobacterium-mediated transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea*[J]. Nature Protocols,2008,3(2):181-189.

[20]Mason H S,Lam D K,Arntzen C J. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plant[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,1992,89(24):11745-11749.



WT—野生型；wpl—稃片白化突变体
图1 稃片白化突变体抽穗期表型及色泽差异

表 1 用于 TAIL-PCR 和 3'-RACE 扩增的引物

引物名称	引物序列(5'→3')	引物用途
SP1	ACCCGACCGGATCGTATCGGT	TIAL-PCR 特异引物
SP2	TATGAAATGAAAACGGTAGAGG	TIAL-PCR 特异引物
SP3	GTTACCGACCGTTTTTCATCC	TIAL-PCR 特异引物
AD1	AGWGNAGWANCANAGA	TAIL-PCR 随机简并引物
AD2	TTGIAGNACIANAGG	TAIL-PCR 随机简并引物
AD3	TCTTICGNACITNGGA	TAIL-PCR 随机简并引物
AD4	GTGASNTGSWATGG	TAIL-PCR 随机简并引物
RACE1-1	GCATACAAACTGAATCTCCGACTG	3'-RACE 特异引物(1 号染色体插入位点)
RACE1-2	TCTGGTGCTGCTCAAGTCTGG	3'-RACE 特异引物(1 号染色体插入位点)
RACE1-3	CTGGCAGGAATCGTAACCTGAGAG	3'-RACE 特异引物(1 号染色体插入位点)
RACE3-1	CCATACACCACTACCCCTCCTTGC	3'-RACE 特异引物(3 号染色体插入位点)
RACE3-2	CAGGAAGGATGGCAGGTGGTTAC	3'-RACE 特异引物(3 号染色体插入位点)
US	CTAATACGACTCACTATAGGGC	RACE 通用引物
UL	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	

1.2.2 突变体水稻 Ds 侧翼序列的扩增 参照 Zhu 等的试验方法^[9],从野生型和突变体水稻叶片中提取基因组 DNA;采用核酸微量紫外分光光度计(Thermo Scientific NanoDrop 2 000)对提取的 DNA 进行浓度和纯度检测,选取纯度较高的 DNA 作为后续 PCR 反应模板;依照文献[10]描述的方法,对稃片白化突变体基因组 DNA 是否含 Ac/Ds 元件插入进行验证,确认含 Ds 插入后进行后续的 Ds 侧翼序列扩增;以 Ac/Ds 稃片白化突变体基因组作为 TAIL-PCR 首轮模板,以不同随机简并引物(AD1~AD4)分别与特异引物 SP1、SP2、SP3 搭配进行 TAIL-PCR 的 3 轮扩增反应,扩增 Ds 侧翼序列;扩增反应结束,采用凝胶电泳分析第 2、第 3 轮产物,根据特异引物设计的特点,TAIL-PCR 第 2、第 3 轮扩增反应的产物大小应相差 36 bp;选择第 2 轮反应产物中的特异片段,割胶,采用 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver. 4.0 回收、纯化特异扩增产物;将纯化的回收产物连接至 pMD19-T Simple Vector 进行 TA 克隆,16℃下连接 0.5~1 h;连接产物转化至大肠杆菌 JM109 感受态细胞,蓝白斑筛选,挑取 10 个单菌落,LB 液体培养基过夜培养;进行菌液 PCR 验证,将阳性克隆菌液送苏州金唯智生物科技有限公司进行序列测定,获得 Ds 侧翼序列。

1.2.3 Ds 标记基因 cDNA 3'端的扩增 对野生型和稃片白

化突变体的不同组织,采用 Trizol 法提取组织总 RNA;采用 TaKaRa 公司 Reverse Transcriptase M-MLV,并参照产品说明书建立反转录反应体系,将提取的总 RNA 反转录为 cDNA,产生的 cDNA 第一链作为 RACE 扩增的模板;依据预测的 RACE 目标条带大小,选取第 2 轮或第 3 轮反应中合适的电泳迁移条带,经胶回收、TA 克隆,将菌液送至苏州金唯智生物科技有限公司进行序列测定。

50 μL 首轮 RACE 反应体系:10×buffer 5 μL,2.5 mmol/L dNTPs 3 μL,引物 US 1 μL,引物 UL 0.2 μL,第 1 轮特异引物 1 μL,5 U/μL rTaq DNA Polymerase 0.25 μL,cDNA 模板约 200 ng。反应循环参数为:94℃ 30 s,67℃ 30 s,72℃ 2 min,25 个循环。第 2、第 3 轮反应中,以通用引物 NUP 分别与第 2、第 3 轮的特异引物搭配,退火温度依据特异引物与 NUP 的 *T_m* 值确定。

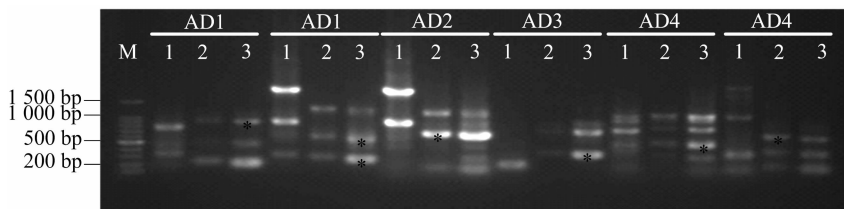
1.2.4 突变体中 Ds 的染色体定位、插入位点及 Ds 标记基因的生物信息学分析 将测序获得的 Ds 侧翼序列与 NCBI 数据库(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)中序列进行在线比对,确定突变体基因组上 Ds 的染色体定位和基因位点;提取 Ds 插入位点上游和下游序列,采用 Fgenesh 2.0 分析 Ds 标记基因的结构及编码氨基酸信息;将测序获得的 cDNA 3'端序列与 NCBI 数据库中序列进行在线比对,分析 Ds 插入

前、后标记基因的结构。

2 结果与分析

2.1 Ds 在水稻稃片白化突变体基因组上的插入位点

以稃片白化突变体基因组 DNA 为模板进行 TAIL-PCR 扩增,第 2 轮或第 3 轮扩增产物中出现特异条带(图 2)。经

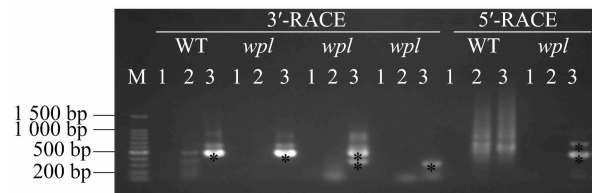


M—100 bp DNA ladder; 泳道 1、2、3—TAIL-PCR 第 1、第 2、第 3 轮反应产物; AD1~AD4—每组反应搭配使用的随机简并引物; 星号标示的条带为第 2 轮或第 3 轮扩增产物中的特异条带

图2 突变体基因组上 Ds 侧翼序列的 TAIL-PCR 扩增产物的电泳分析

2.2 Ds 标记基因 cDNA 末端序列的特异性

在 TAIL-PCR 扩增 Ds 侧翼序列、确认 Ds 在类 CBS 结构域蛋白基因和推定的氧化还原酶基因编码区内插入位点的基础上,提取 Ds 标记的 2 个基因的相关序列,分别设计 3'-RACE 特异引物,并分别以野生型和突变体水稻叶片总 RNA 反转录产生的 cDNA 为模板,以类 CBS 结构域蛋白基因(第 1 号染色体上 Ds 标记基因)相关序列设计的特异引物进行 3 轮 3'-RACE 扩增反应,并对扩增产物进行电泳分析。由图 3 可见,野生型模板扩增的产物中约有 400 bp 的主带,突变体中除扩增到 400 bp 的条带外还有 1 个约 200 bp 的条带。这些条带经凝胶回收、序列测定,结果显示,大小约为 400、200 bp 的序列均包含第 3 轮扩增的特异引物序列和 poly(A),证实野生型和突变体中均扩增到特异条带。另外,突变体中扩增到 2 个特异的片段,这表明突变体中 Ds 插入在基因型上属于 Ds⁺Ds⁻杂合型。



WT—野生型; wpl—稃片白化突变体; M—100 bp DNA ladder, 泳道 1、2、3—3'-RACE 的第 1、第 2、第 3 轮反应产物。凝胶回收的条带以星号标示。下图同

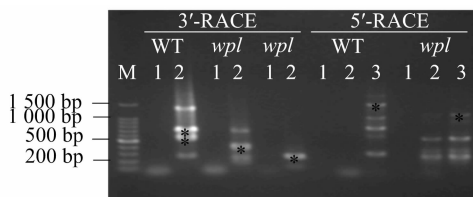
图3 3'-RACE 扩增 1 号染色体上 Ds 标记基因的 cDNA 序列

以推定的氧化还原酶基因(第 3 号染色体上 Ds 标记基因)相关序列设计的特异引物进行 3'-RACE 扩增反应发现,尽管第 1 轮扩增未出现条带,但第 2 轮扩增产物出现了明显的条带(图 4)。选取第 2 轮产物中的主带进行凝胶回收,其中野生型模板扩增产物选择约 670、550 bp 的主带,突变体模板扩增产物选取约 350、250 bp 的主带,经序列测定显示,野生型中 670 bp 片段和突变体中 350 bp 片段为特异扩增产物。

2.3 Ds 标记基因的外显子改组

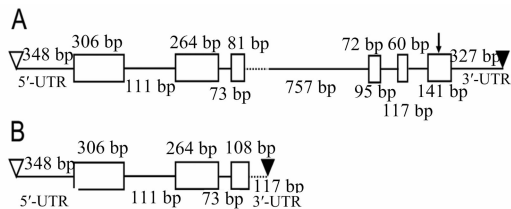
采用 3'-RACE 技术,从野生型材料中分离编码类 CBS 结构域蛋白基因 cDNA 的 3'端序列及 Ds 插入后外显子改组后的 Ds 标记基因 cDNA 序列,由图 5 可见,Ds 插入于类 CBS 结构域蛋白基因的第 6 个外显子(末位外显子)上,Ds 插入引

凝胶回收、TA 克隆和序列测定,分离到 Ds 侧翼序列;通过 NCBI 序列数据库在线比对发现,Ds 在 1 号染色体(BAC 克隆:B1103C09,序列号:dbj|AP003333.4)和 3 号染色体(BAC 克隆:OSJNBa0054H04,序列号:gb|AC106887.3)均有插入,分别插入于类 CBS 结构域蛋白基因和推定的氧化还原酶基因编码区内。



3'-RACE 进行 2 轮扩增

图4 3'-RACE 扩增 3 号染色体上 Ds 标记基因的 cDNA 序列



A—Ds 插入前的基因结构; B—Ds 插入后的基因结构

空心和实心三角形分别表示转录起始位点(TSS)和多聚腺苷酸尾 poly(A); 方框表示外显子,方框间连线表示内含子;外显子、内含子、5'-UTR 和 3'-UTR 等元件的大小标示于各元件相应部位;向下箭头标示 Ds 插入位点;虚线部分的序列含 Ds 插入后外显子化序列和 Ds 标记的新基因的 3'-UTR 序列

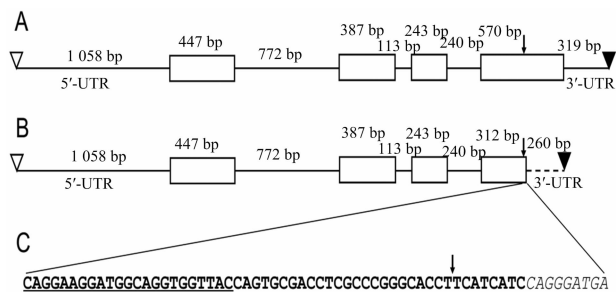
图5 第 1 号染色体上 Ds 插入前后相关基因的结构

起该基因外显子改组,表现为第 3 个外显子由 81 bp 增加至 108 bp,最后的 3 个外显子消失;原第 3 个内含子中 27 bp 的序列外显子化加入至原第 3 外显子,紧邻的长 117 bp 的序列转为 3'-UTR 序列。

同样,采用 3'-RACE 技术,从野生型扩增推定的氧化还原酶基因的 cDNA 3'端序列及外显子改组的 Ds 标记基因 cDNA 序列。由图 6 可见,与第 1 号染色体上插入位点相似,第 3 号染色体 Ds 插入位点也处于末位外显子上,Ds 插入后,外显子数码未发生变化,但末位外显子中出现改组,表现为末位外显子由 570 bp 缩短为 312 bp,缩短的外显子中还包括部分的 Ds 序列;Ds 标记基因的 3'-UTR 序列均为 Ds 序列。值得注意的是,cDNA 序列显示,末位外显子 3'端中存在 1 段未受 Ds 插入影响、连续编码的水稻序列。

3 结论与讨论

在先前研究中,笔者所在的实验室发现 1 株水稻稃片失



C—Ds 插入后基因最后一个外显子 3' 端序列, 其中加粗部分为水稻序列, 斜体部分为源于 Ds 元件的序列。虚线部分表示来源于 Ds 元件的序列。其他符号含义与图 5 同

图 6 第 3 号染色体上 Ds 插入前后相关基因的结构

绿突变体, 对该突变体进行初步鉴定发现, 该突变体为含 2 个 Ds 拷贝的插入突变体, Ds 元件分别插入于突变体的第 3、第 12 号染色体上, 分别对应于 GenBank 序列数据库中水稻的 B1339A06 和 OSJNB0030G16 克隆^[11]。有研究显示, 在玉米、大麦和水稻等 Ac/Ds 转座元件系统中均发现 2 个以上 Ds 拷贝存在于同一基因组的现象^[12-14]; 植物和酵母基因组中均具有 Ds 优先插入于基因编码区的转座特点^[15]。本研究结果表明, 新稗片白化突变体 Ds 元件分别插入于第 1 号和第 3 号染色体上, 白化突变体中的 2 个 Ds 拷贝插入于 2 个基因的编码区。由此可见, Ds 在不同植物种类基因组上的转座存在共同的特点。

较早关于 Ac/Ds 转座元件基因标签系统的研究主要集中于 Ds 插入引起标记基因功能丧失上, 而有关 Ds 插入后 Ds 标记基因的结构变化、表达产物的研究很少。已有研究证实, Ds 的插入与切离可引起基因失活, 也可造成基因结构的改变而产生新的功能。本研究以含 Ds 插入的稗片白化突变体为材料, 在分离 Ds 侧翼序列的基础上, 采用 RACE 扩增技术和生物信息学分析方法, 揭示 Ds 引起的外显子改组及部分 Ds 序列外显子化等现象, 同时发现, 稗片白化突变体 1 号染色体上尽管 Ds 插入于基因的末位外显子, 但可引起上游外显子改组。外显子改组被认为是新基因产生的重要机制^[2,16], 转座元件可与现有基因相互作用并通过外显子改组产生新基因^[3]。近年来, Ds 元件外显子化及 Ds 引起标记基因外显子改组现象已受到关注^[8,17], 但有关外显子化的分子机制仍不清楚。早期有研究发现, 玉米 Ds 元件可为不同的基因提供不同的剪接位点, 从而改变 Ds 标记基因 mRNA 前体的剪接模式^[18]。Chien 等对水稻 Ds 标记基因的结构分析结果表明, Ds 插入内含子区也可引起可变剪接事件和外显子化的发生, 产生新的转录本和蛋白质^[19]。但是, 关于 Ds 介导的外显子改组是否存在普遍性及 Ds 引起的可变剪接是否可充分解释 Ds 的外显子化, 仍有待深入分析。

另外, 本研究未获得 Ds 标记基因的全长 cDNA 序列, 在后续研究中, 采用 5' - RACE 技术克隆全长 cDNA 序列, 从而更全面地分析 Ds 插入介导的外显子改组事件。

参考文献:

[1] Kolkman J A, Stemmer W P. Directed evolution of proteins by exon shuffling[J]. Nature Biotechnology, 2001, 19(5): 423 - 428.

[2] Wang W, Zheng H, Yang S, et al. Origin and evolution of new exons in rodents[J]. Genome Research, 2005, 15(9): 1258 - 1264.

[3] Dooner H K, Weill C F. Give - and - take; interactions between DNA transposons and their host plant genomes[J]. Current Opinion in Genetics & Development, 2007, 17(6): 486 - 492.

[4] Feschotte C, Pritham E J. DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes[J]. Annual Review of Genetics, 2007, 41: 331 - 368.

[5] Elrouby N, Bureau T E. Bsl, a new chimeric gene formed by retrotransposon - mediated exon shuffling in maize[J]. Plant Physiology, 2010, 153(3): 1413 - 1424.

[6] Morgante M, Brunner S, Pea G, et al. Gene duplication and exon shuffling by helitron - like transposons generate intraspecies diversity in maize[J]. Nature Genetics, 2005, 37(9): 997 - 1002.

[7] Moeller - Krull M, Zemmann A, Roos C, et al. Beyond DNA: RNA editing and steps toward Alu exonization in primates[J]. Journal of Molecular Biology, 2008, 382(3): 601 - 609.

[8] Huang K C, Yang H C, Li K T, et al. Ds transposon is biased towards providing splice donor sites for exonization in transgenic tobacco[J]. Plant Molecular Biology, 2012, 79(4/5): 509 - 519.

[9] Zhu H, Qu F, Zhu L H. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride[J]. Nucleic Acids Research, 1993, 21(22): 5279 - 5280.

[10] 赵丁丁, 乔中英, 程孝, 等. 水稻基因组上一个 Ds 切离及其双位点插入行为的分子鉴定[J]. 遗传, 2014, 36(12): 1249 - 1255.

[11] 杨婉婷, 孙丙耀. 水稻 Ds 插入稗片失绿突变体的初步鉴定[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(10): 58 - 61.

[12] Heinlein M. Excision patterns of activator (Ac) and dissociation (Ds) elements in *Zea mays* L.: implications for the regulation of transposition[J]. Genetics, 1996, 144(4): 1851 - 1869.

[13] Chin H G, Choe M S, Lee S H, et al. Molecular analysis of rice plants harboring an Ac/Ds transposable element - mediated gene trapping system[J]. Plant Journal, 1999, 19(5): 615 - 623.

[14] Singh J, Zhang S, Chen C, et al. High - frequency Ds remobilization over multiple generations in barley facilitates gene tagging in large genome cereals[J]. Plant Molecular Biology, 2006, 62(6): 937 - 950.

[15] Lazarow K, Du M L, Weimer R, et al. A hyperactive transposase of the maize transposable element activator (Ac)[J]. Genetics, 2012, 191(3): 747 - 756.

[16] 张胜利, 李东方, 何文博. 小麦条锈病不同抗性材料中 *Yr10* 基因第 1 外显子功能标记的初步研究[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(9): 20 - 22.

[17] Liu L Y, Chang Y C. Genome - wide survey of Ds exonization to enrich transcriptomes and proteomes in plants[J]. Evolutionary Bioinformatics, 2012, 8: 575 - 587.

[18] Dennis E, Sachs M, Gerlach W, et al. The Ds transposable element acts as an intron in the mutant allele *AdhlFm335* and is spliced from the message[J]. Nucleic Acids Research, 1988, 16: 3315 - 3328.

[19] Chien T Y, Daisy L L Y, Chang Y C. Analysis of new functional profiles of protein isoforms yielded by Ds exonization in rice[J]. Evolutionary Bioinformatics, 2013, 9: 417 - 427.