

赵金艳, 卢 宏, 张振武, 等. 快速 PCR 介导的 *NeuroD*-3'UTR 的定点突变研究[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(4): 83-86.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.04.021

快速 PCR 介导的 *NeuroD*-3'UTR 的定点突变研究

赵金艳, 卢 宏, 张振武, 梁 洋

(东北林业大学, 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要:糖尿病是一种由遗传和环境因素共同引起的代谢紊乱综合征。与肝细胞核因子有关的幼年发病的成人型糖尿病(MODY)属于特殊类型的糖尿病,分为6型,其中VI型MODY为bHLH家族转录因子*NeuroD*突变引起的疾病。在体内*NeuroD*能够与A类bHLH的转录因子E47结合,进而形成二聚体。这种二聚体能够与胰岛素基因的E盒高亲和力结合,从而激活胰岛素相关基因的转录表达;因此,*NeuroD*对胰腺β细胞的生理功能有很重要的影响。本试验利用PGMT-*NeuroD*-3'UTR质粒,通过一次PCR方法使*NeuroD*-3'UTR上的多个位点发生定点突变,并筛选出突变的的目的片段;随后将突变的片断连接到萤光素酶报告载体PGL3-CONTROL上,构建了PGL3-3'*NeuroD*突变载体。该结果可为探讨*NeuroD*基因在胰腺β细胞发育中的生理功能,及进一步治疗糖尿病的研究提供了试验基础。

关键词:*NeuroD*;PCR;突变;载体构建;糖尿病

中图分类号:Q754 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)04-0087-03

糖尿病(diabetes mellitus)是一种代谢性疾病,其特征为由于胰岛素分泌不足、胰岛素功能障碍或两者同时存在而导致的,以慢性高血糖并伴有碳水化合物、脂肪和蛋白质代谢紊乱^[1]。糖尿病是一种由多种因素导致的疾病,这些因素包括遗传因素、自身因素(自身免疫)及环境因素^[2]等。

神经分化因子1(*NeuroD*-1)是一种bHLH蛋白^[3]。在生物学中,*NeuroD*-1又称为β细胞E盒转录激活因子2(*Beta*-2)。*NeuroD*-1/*Beta*-2对靶基因的转录激活/抑制作用主要通过和靶基因中的特异性序列结合来实现的。同时,*NeuroD*-1/*Beta*-2也能够与其他靶基因的转录因子发生作用,协同调节靶基因的活性状态,进而影响相关基因的生理功能。随着生物学的不断发展,相关研究表明*NeuroD*-1/*Beta*-2基因发生突变时,对糖尿病的发生有一定的影响^[4]。在利用模式生物小鼠研究*NeuroD*-1/*Beta*-2的生物学功能时发现,当*NeuroD*-1/*Beta*-2基因缺失时,小鼠发生严重的糖尿病,并且这些患有严重糖尿病的小鼠在围产期发生死亡。在*NeuroD*-1/*Beta*-2基因纯合缺失的小鼠中表现的酮尿证实,这种严重的糖尿病是由于β细胞功能发生异常导致的^[5]。因此,*NeuroD*-1/*Beta*-2基因对研究胰腺发育和糖尿病机制具有重要的意义。

基因突变技术常用于研究基因调控、表达和蛋白质的结构功能等,其中,定点突变技术已经越来越被生物学家广泛应用于基因工程、蛋白质工程研究。目前使用较广泛的主要有重组PCR法、重叠延伸法、U模版法和大引物突变法等。其

中,重叠延伸的方法和大引物突变的方法均需要多次PCR和多对引物,才能使得目标突变率高,这种方法操作复杂并且步骤繁琐。快速PCR介导的定点突变方法仅需1次PCR反应,目标突变效率高,操作简单,节约成本^[6]。

本试验为了构建*NeuroD*-3'UTR的定点突变,进一步研究*NeuroD*基因与糖尿病之间的生物学机制,采用快速PCR定点突变的方法,对*NeuroD*-3'UTR同时进行多个位点的突变,并筛选出突变的的目的片段,构建了PGL3-3'*NeuroD*突变载体,为探讨*NeuroD*基因在胰腺β细胞发育中的生理功能,及进一步治疗糖尿病的研究提供试验基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

PGMT-*NeuroD*和PGL3-CONTROL载体由笔者所在实验室保存。

JM109感受态细胞,D2000 Plus DNA ladder购自北京索莱宝科技有限公司;1 kb DNA Ladder Marker购自于北京艾德莱生物技术有限公司;限制性内切酶*Xba*I与*Fse*I(NEB公司),*T*₄ DNA连接酶(TaKaRa公司);DNA凝胶回收试剂盒、快速质粒小量提取试剂盒均购自Omega公司;琼脂糖购自Biowest公司,其余试剂为国产分析纯试剂;PCR引物、质粒测序均由上海英骏生物技术有限公司完成。

1.2 试验方法

1.2.1 突变引物设计与合成 根据*NeuroD*的编码序列(GenBank序列号:gi:226493587)(粗体为突变位点)设计上游引物P1,序列为:5'-GAAAAAACCACAAATTCGT-CAATTTGAGCAATTCATCT-3',下游引物P2,序列为:5'-AGATGAATTGCTCAAATTGACGAATTGTGTTTTTTTC-3'。

1.2.2 快速PCR介导的突变 以PGMT-*NeuroD*-3'UTR为模板,采用PCR方法使*NeuroD*-3'UTR发生多个位点的定点突变。PCR反应体系为20 μL,反应条件为:94℃初始变性5 min,16个循环(94℃1 min,58℃40 s,72℃5 min),72℃

收稿日期:2015-11-02

基金项目:淡水鱼育种国家地方联合工程实验室开放课题(编号:KF-2015-003)。

作者简介:赵金艳(1989—),女,硕士研究生,主要从事发育生物学研究。E-mail:xnzjy@163.com。

通信作者:梁 洋,博士,高级工程师,主要从事发育生物学研究。E-mail:liang11yang@126.com。

延伸 10 min,4 ℃ 保存。扩增片段大小应为 3 432 bp,纯化 PCR 扩增的产物。

1.2.3 NerouD-3'UTR 突变质粒构建及鉴定 回收产物用 DPN1 酶消化模版,消化时间为 8 h。消化反应体系为:PGMT-NerouD-3'UTR(PCR 回收)17.5 μL,10×DNPI buffer 2 μL,DNP 1(10 U/μL)1 μL。将消化产物转化进 JM109 大肠杆菌感受态细胞,筛选得到阳性克隆,经菌液 PCR 验证后提取质粒,所提质粒经 PCR 验证后用 *Xba* I 与 *Fse* I 酶进行双酶切检测,用琼脂糖凝胶验证突变片段正确后,将获取的目的 DNA 送上海英骏生物技术有限公司测序鉴定。

1.2.4 PGL3-3'UTR 载体的构建与鉴定 用 *Xba* I 与 *Fse* I 酶分别对 Pgmt-NeuroD-3'UTR 和 PGL3-CONTROL 进行双酶切处理,1% 琼脂糖凝胶电泳后,用胶回收试剂盒回收相应目的 DNA 和质粒酶切片段。DNA 片段与酶切的 PGL3-CONTROL 载体采用 T₄ DNA 连接酶 16 ℃ 过夜连接,转化后经菌液 PCR 验证所提质粒,*Xba* I 与 *Fse* I 双酶切鉴定后,将重组质粒命名为 PGL3/NeuroD-3'UTR 载体。

2 结果与分析

2.1 PCR 介导的 PGMT-NeuroD-3'UTR 突变

设计突变引物 P1/P2,以实验室自存 PGMT-NeuroD 为模板,采用一次快速 PCR 方法将 PGMT-NeuroD-3'UTR 上多个碱基突变。将扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,鉴定结果显示,扩增产物约为 3 432 bp 左右的 DNA 条带且特异性较高,同预期片段的大小符合(图 1)。

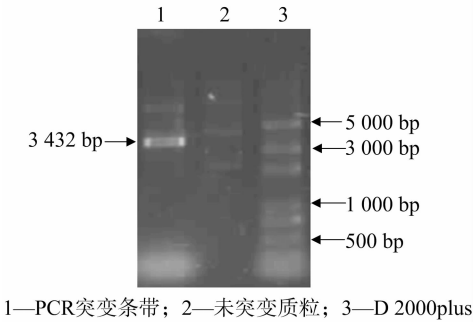


图1 PCR介导的PGMT-NeuroD-3'UTR突变

2.2 PCR 介导的 PGMT-NeuroD-3'UTR 突变检测

将突变产物经 DPN1 消化后转入大肠杆菌感受态细胞 JM109 中,挑取克隆,通过菌液 PCR 检验克隆的准确性,将菌液 PCR 鉴定正确的菌液用质粒提取试剂盒提取突变质粒,利用引物 P1/P2 对所提取的质粒进行 PCR 检测,PCR 产物约为 417 bp,通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检验,条带大小符合预计(图 2)。

同时利用 *Xba* I 与 *Fse* I 对所提质粒进行双酶切检测,经 1% 琼脂糖凝胶电泳,短片段约 417 bp,长片段 3 000 bp 左右,符合预计大小(图 3)。

将突变完成的质粒送到公司测序,测序结果显示正确,目标位置成功突变,位于 1854、1855、1856 位置的碱基由 TTG-CACA 变成 TTCGTAC,并且没有出现其他碱基的突变(图 4)。

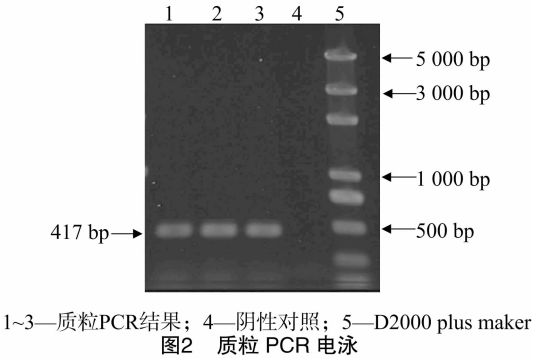


图2 质粒 PCR 电泳

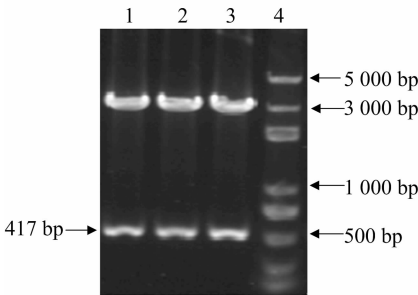


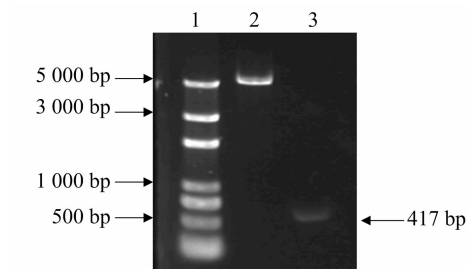
图3 双酶切电泳结果

Query	53	GCTCTAG-AAAGTTATTGCGTTGCCTTAGCACTTCTTTCTTCTCTAATTGTAAGGTT	111
Sbjct	1770	GCT-TAGAAAGTTATTGCGTTGCCTTAGCACTTCTTTCTTCTCTAATTGTAAGGTT	1828
Query	112	AGAAAAGAAAAAACAACAAATTTCG-TCAATTTGAGCAATTTCATCTCACTTTAAAGTT	170
Sbjct	1829	AGAAAAGAAAAAACAACAAATT-GCACAATTTGAGCAATTTCATCTCACTTTAAAGTT	1887
Query	171	TTTCCTGCTCGCTCCCTAAAAATAGAAACCAGACCCATAACACTCAAGAGGATGAAAACCG	230
Sbjct	1888	TTTCCTGCTCGCTCCCTAAAAATAGAAACCAGACCCATAACACTCAAGAGGATGAAAACCG	1947
Query	231	AAATGCATTCTTATCAAAACACATCAATTCACTTGCACAAGCTTGTAATACATAT	290
Sbjct	1948	AAATGCATTCTTATCAAAACACATCAATTCACTTGCACAAGCTTGTAATACATAT	2007
Query	291	TATAAATAAATGCCAACACACACTCCTTTAAATCAAAAGCTGCTTGACTATCACATACAA	350
Sbjct	2008	TATAAATAAATGCCAACACACACTCCTTTAAATCAAAAGCTGCTTGACTATCACATACAA	2067
Query	351	TTTGCACTCTTTCTTTTGTGCTTTTACTTCTTTGAATTCATGATTTTACGGAGTGTTT	410
Sbjct	2068	TTTGCACTCTTTCTTTTGTGCTTTTACTTCTTTGAATTCATGATTTTACGGAGTGTTT	2127
Query	411	GAAGATATTGATGTTTCCAGAAAAATATAAATGCATGATTTTATACATAGTCAAAACAAATG	470
Sbjct	2128	GAAGATATTGATGTTTCCAGAAAAATATAAATGCATGATTTTATACATAGTCAAAACAAATG	2187
Query	471	GTGGTT	476
Sbjct	2188	GTGGTT	2193

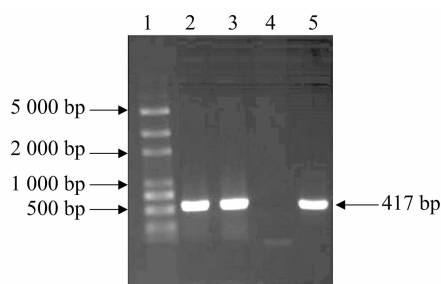
图4 测序结果比对

2.3 PGL3 - NeuroD3'UTR 突变载体的构建

将表达载体 PGL3 - CONTROL 与突变完成的质粒用 *Xba* I 与 *Fse* I 双酶切,并胶回收,1% 琼脂糖凝胶电泳检验酶切胶回收结果,条带大小符合预计(图 5)。连接转化后挑取 4 个单克隆菌落培养过夜,通过菌液 PCR 检验克隆的准确性,引物为 P1/P2,全长为 417 bp,通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检验,有 2 个克隆的条带大小符合预计(图 6)。

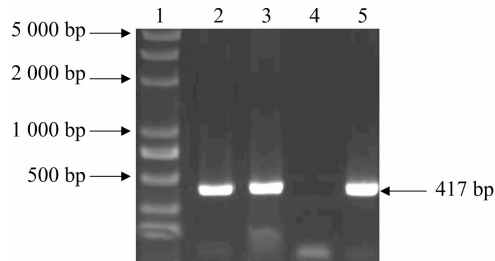


1—D2000 plus marker; 2—PGL3-CONTROL 双酶切结果; 3—突变质粒 PGMT-NeuroD-3'UTR 双酶切结果
图5 表达载体与质粒双酶切结果电泳



1—D2000 plus marker; 2、3—阳性菌液 PCR 结果;
4—阴性对照; 5—阳性对照
图6 菌液 PCR 检测电泳结果

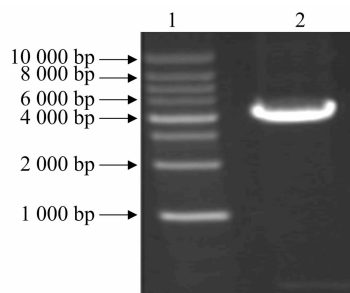
将菌液 PCR 鉴定正确的菌液用质粒提取试剂盒提取质粒,利用提取的质粒,通过扩增引物 P1/P2,做质粒 PCR,条带位于 400 ~ 500 bp 之间(图 7),符合预计大小。同时利用 *Xba* I 与 *Fse* I 双酶切检测所提取的质粒,条带符合预计大小(图 8),显示 PGL3 - NeuroD - 3'UTR 突变载体构建成功。



1—D2000plus; 2、3—质粒 PCR 结果;
4—阴性对照; 5—阳性对照
图7 质粒 PCR 检测电泳结果

3 讨论

糖尿病(diabetes mellitus)是一组由于胰岛素分泌不足、胰岛素功能障碍或两者同时存在而导致的代谢性疾病。其特征为慢性高血糖并伴有碳水化合物、脂肪和蛋白质代谢紊乱。糖尿病是一种由多种因素导致的疾病,这些因素包括遗传因



1—1000 bp marker; 2—双酶切检测结果,短条带约 400 bp
图8 双酶切检测电泳结果

素、自身因素(自身免疫)及环境因素。*NeuroD - 1/Beta - 2* 对靶基因的转录激活/抑制作用主要通过和靶基因中的特异性序列结合来实现的。同时,*NeuroD - 1/Beta - 2* 也能够与其他靶基因的转录因子发生作用,协同调节靶基因的活性状态,进而影响相关基因的生理功能,调节靶基因的最终活性状态^[7]。前期研究表明 *NeuroD - 1/Beta - 2* 基因发生突变时,对糖尿病的发生有一定的影响,且 *Beta - 2* 作为一种转录因子能够激活磺脲类受体基因 1(*SUR - 1*)^[8]。在生物体中, β 细胞胰岛素的分泌情况受 *SUR - 1* 的调节,这种调节机理主要是 *NeuroD - 1* 能够和 *SUR - 1* 的 E3 元件结合,进而诱导相关的组织发生特异性表达。研究发现 MEK - ERK 信号通路在葡萄糖刺激下能够影响 *NeuroD - 1* 的活性,*NeuroD - 1* 发生入核,促进了胰岛素相关基因的转录表达^[9]。因此,*NeuroD - 1* 基因对研究和治疗糖尿病具有重要的意义。

基因突变技术应用很广泛,这种技术制备的突变体可用于研究基因的调控表达情况、蛋白质的结构与功能^[10]。随着定点突变技术的发展,蛋白质的结构与功能主要通过突变体研究来实现。寡聚核苷酸引物与靶 DNA 杂合分子中间的单个碱基的错配并不影响扩增效率,因此利用引物区域的错配使 PCR 产物定点突变的方法可以导致 DNA 的定点突变。近年来,产生了一种新型定点突变的 PCR 方法,该方法是把需要突变的基因克隆到质粒载体上,用 2 个突变引物同时扩增质粒 DNA,用限制性内切酶对模板 DNA 进行消化,然后转入大肠杆菌并筛选阳性克隆。由于该方法仅需 1 次 PCR 反应,很大程度地降低了反应时间,所以被称为快速 PCR 法,这种新的 PCR 方法减少了反应中因碱基错配而造成的非特异突变,提高了目标突变率。

本试验即根据上述原理,采用一次快速 PCR 定点突变方法,对 *NeuroD - 3'UTR* 的多个位点进行定点突变,经 PCR 检测及测序鉴定,目标位置突变成功,1854、1855、1856 位置的碱基由 TTGCACA 变成 TTCGTAC(图 4),测序结果显示,没有出现其他碱基的突变,降低了碱基错配的概率,提高了突变效率。随后将突变片段连接到萤光素酶报告载体 PGL3 - CONTROL 上,经 PCR 和酶切鉴定,成功构建了 PGL3 - NeuroD - 3'UTR 突变载体(图 7、图 8),为后续 *NeuroD* 基因的研究,以及通过该基因为糖尿病的研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Lee J E. Basic helix - loop - helix genes in neural development [J]. *Curr Opin Neurobi*, 1997, 7(1): 13 - 20.

刘颖,叶生鑫,彭强,等. 水稻穗长和有效穗数的 QTL 定位分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(4):86-91.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.04.022

水稻穗长和有效穗数的 QTL 定位分析

刘颖¹, 叶生鑫¹, 彭强², 张大双², 吴健强², 王际凤², 黄培英², 朱速松²

(1. 贵州师范大学, 贵州贵阳 550001; 2. 贵州省水稻研究所, 贵州贵阳 550006)

摘要:水稻的穗长和有效穗数与产量有着密切的关系。本试验以籼稻品系中的 V20B 为母本, 爪哇稻品系中的 CPSLO17 为父本杂交, 经单粒传法构建重组自交系(RIL)为作图群体, 对水稻穗长和有效穗数 2 个穗部性状进行 QTL 定位及分析。利用 SLAF 标签构建的高密度遗传图谱, 结合定位软件 MapQTL5 进行区间作图, 阈值设为 3.9, 在 3 条染色体上共检测到 7 个 QTL, 其中 5 个控制穗长 QTL ($qPL1-1$ 、 $qPL1-2$ 、 $qPL6-1$ 、 $qPL6-2$ 、 $qPL6-3$) 分别位于第 1、第 6 号染色体上, QTL 的贡献率分别为 6.41%、22.22%、6.15%、12.24%、13.01%, 增效位点主要来自于 CPSLO17, 且 $qPL1-1$ 为一个新的 QTL; 2 个控制有效穗数 QTLs ($qPN1$ 、 $qPN4$) 分别位于第 1、第 4 号染色体上, QTL 的贡献率分别为 13.15%、8.18%, 且增效位点来自于亲本 V20B。这些位点的标记为进一步克隆穗长和有效穗数 QTL 及分子标记辅助选择奠定理论基础。

关键词:水稻; QTL; 穗长; 有效穗数; 产量

中图分类号: S511.03 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)04-0086-04

提高水稻产量始终是水稻育种追求的目标^[1], 水稻产量的构成包括千粒质量、单株有效穗数、每穗实粒数、结实率 4 个部分, 其中有效穗数的变化对产量高低有着举足轻重的影响。水稻产量的构成与水稻各种穗部性状有着密切的关系^[2], 穗长是水稻穗部性状的一个重要组成部分, 在实践育种中, 虽然穗长这一性状被广泛研究, 但在阐明其与产量构成关系上却没有引起足够的重视^[3]。因此, 定位分析控制水稻穗长和有效穗数的 QTL 及分析二者关系更能直接有效地为分子标记辅助选择培育高产品种提供依据。目前, 大量研究表明, 水稻穗长^[4]和有效穗数^[5] 2 个穗部相关性状为多基因

控制的数量性状。近年来, 关于穗长和有效穗数的 QTL 定位分析已有许多报道。潘英华等利用日本晴/B0801 的 F₂ 群体定位了 4 个穗长 QTLs^[6], 分别位于第 1、第 2、第 5、第 9 号染色体上, 其中 $qPL9-1$ 为主效 QTL。袁爱平等利用中 156/谷梅 2 号的 RIL 群体, 在不同的环境下, 对有效穗数进行非条件和条件 QTL 定位分析, 定位 3 个有效穗数 QTLs, 分别位于第 2、第 7 号染色体上^[7]。徐建龙等利用 Lemont/特青的 RIL 群体, 检测出 4 个影响有效穗数的 QTLs, 分别位于第 3、第 4、第 11、第 12 号染色体上^[8]。

高密度遗传连锁图谱在基因和基因组的精细定位和图位克隆的应用中发挥着重要作用。SLAF-seq 技术是基于 SNP 的简化基因组深度测序技术, 该技术相比 RAPD、RFLP、SSR 等传统的定位方法具有通量高、准确性高、成本低、周期短、有效 reads 长、适用性广等突出优势^[9]。目前, 该技术在国内外已成功用于大豆^[10]、芝麻^[11]、黄瓜^[12] 等众多领域的遗传图谱构建和 QTL 定位, 且在国内也有用于水稻耐冷和粒质量等性状的研究, 宋佳谕等利用此技术进行水稻苗期耐冷关联分析^[13]; Xu 等利用此技术对水稻粒质量进行 QTL 定位^[14]。但

收稿日期: 2015-11-25

基金项目: 贵州省重大专项(编号: LH20126005、LH20106023); 贵州省农业科学院专项(编号: 2010004); 国家科技计划(编号: 2014AA10A604-11)。

作者简介: 刘颖(1990—), 女, 贵州贵阳人, 硕士研究生, 研究方向为分子遗传学。E-mail: 442852744@qq.com。

通信作者: 朱速松, 博士, 研究员, 硕士生导师, 主要从事水稻分子育种研究。E-mail: susongzhu@139.com。

[2] Naya F J. Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor [J]. Genes Dev, 1995, 9(8): 1009-1019

[3] Suzuki A, Nakauchi H, Taniguchi H. Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flow-cytometric cell sorting [J]. Diabetes, 2004, 53(8): 2143-2152.

[4] Zhou J, Wang X, Pineyro M A, et al. Glucagon-like peptide 1 and exendin-4 convert pancreatic AR42J cells into glucagon- and insulin-producing cells [J]. Diabetes, 1999, 48(12): 2358-2366.

[5] Cho J H, Tsai M J. The role of BETA2/NeuroD1 in the development of the nervous system [J]. Mol Neurobiol, 2004, 30(1): 35-47.

[6] 高川, 韩维涛, 宋云扬, 等. 一种改进的快速 PCR 定点突变技术[J]. 生物技术通报, 2006(3): 99-103.

[7] Means A L, Ray K C, Singh A B, et al. Overexpression of heparin-binding EGF-like growth factor in mouse pancreas results in fibrosis and epithelial metaplasia [J]. Gastroenterology, 2003, 124(4): 1020-1036.

[8] Hirabayashi J, Kasai K. The family of metazoan metal-independent β -galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution [J]. Glycobiology, 1993, 3(4): 297-304.

[9] Vacelet J. Etude en microscopie électronique de l'association entre bactéries et spongiaires du genre *Verongia* (Dictyoceratida) [J]. Microsc Biol Cell, 1975, 23(3): 271-288.

[10] Kumar M, Jordan N, Melton D, et al. Signals from lateral plate mesoderm instruct endoderm toward a pancreatic fate [J]. Dev Biol, 2003, 259(1): 109-122.