

葛慧雯, 李佳佳, 王高华, 等. 利用 HiTAIL-PCR 技术鉴定 T-DNA 在 RNAi-OsRhoGAP2 水稻中的插入位点[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(9): 55-59. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.09.011

利用 HiTAIL-PCR 技术鉴定 T-DNA 在 RNAi-OsRhoGAP2 水稻中的插入位点

葛慧雯, 李佳佳, 王高华, 闫鑫甜, 安文静, 杜京尧, 石佳, 彭静静, 王美娜, 梁卫红
(河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453007)

摘要: 水稻 *OsRhoGAP2* 基因是前期从幼穗 cDNA 文库中筛选获得的功能未知基因, 采用 DNA 重组技术构建 *OsRhoGAP2* 基因 RNA 干扰载体, 并转化水稻。对转基因水稻的表型分析显示, *OsRhoGAP2* 基因 RNA 干扰水稻株高显著高于对照水稻。采用高效热不对称交错 PCR 法 (HiTAIL-PCR) 对 RNAi-OsRhoGAP2 转基因水稻 T-DNA 插入位点的侧翼序列进行分析, 利用特异性嵌套引物扩增, 结合序列对比分析, 发现在 4 个不同的转基因水稻株系中, T-DNA 均插入到水稻 *OsRhoGAP2* 基因的第 5 个外显子内, 本研究将为后续对该基因的功能鉴定提供重要依据。

关键词: *OsRhoGAP2* 基因; HiTAIL-PCR; 侧翼序列; T-DNA; 转基因水稻; 插入位点

中图分类号: Q754; S511.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)09-0055-05

近年来, 随着农杆菌介导的遗传转化技术的发展, T-DNA 插入技术已经广泛应用于水稻等模式植物转基因研究^[1]。但是, 在转基因植物的研究过程中发现外源基因在转基因植物中并不都能实现预期表达, 其表达的稳定性问题有待解决^[2]。已有研究报道, 转基因植物中外源基因能否在植物基因组中稳定表达受到多种因素的影响, 如外源基因自身的结构、启动子等^[3-4]。此外, 也与其插入位点的侧翼序列和染色体定位有关, 外源基因插入到染色体的不同位置, 其表达稳定性和表达效率可能也不同^[5]。因此, 鉴定外源基因的插入位点, 了解其侧翼序列及染色体定位对于后续的基因功能研究有重要意义。目前 T-DNA 插入位点侧翼序列的鉴定多采用 PCR 扩增的方法, 主要包括热不对称交错 PCR 法 (thermal asymmetric interlaced-PCR, TAIL-PCR)^[6]、反向 PCR (inverse PCR, I-PCR)^[7] 和 PCR-walking 法^[8] 3 种。

前期研究发现水稻 ROP (Rho of plant) 基因 *OsRacD* 与水稻

稻育性相关^[9], 为研究其功能和作用机制, 利用酵母双杂交技术, 以 *OsRacD* 为诱饵筛选水稻幼穗 cDNA 文库, 获得了若干功能未知基因^[10-11], 其中包括 *OsRhoGAP2*。为了鉴定 *OsRhoGAP2* 基因的功能, 本研究利用 Gateway 克隆技术, 构建了 *OsRhoGAP2* 的 RNA 干扰植物表达载体 pANDA-OsRhoGAP2, 对水稻进行遗传转化, 筛选获得阳性转基因植株, 并发现转基因水稻株高显著高于对照水稻。为确定鉴定外源载体的整合位点, 本研究采用改良的高效热不对称交错 PCR 法 (high-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR, HiTAIL-PCR) 对 RNAi-OsRhoGAP2 转基因水稻 T-DNA 的侧翼序列进行分析, 旨在为研究 RNAi-OsRhoGAP2 转基因水稻表型变化的分子基础提供依据。

1 材料与与方法

1.1 植物材料

本研究所用植物材料包括水稻粳稻栽培品种日本晴 (*Oryza sativa* L.) 野生型 (简称 WT) 和笔者所在的实验室前期筛选获得的 T₁ 代 *OsRhoGAP2* 干扰转基因水稻植株 (简称 RNAi-OsRhoGAP2), 遗传背景为日本晴。

1.2 质粒和菌株

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 由笔者所在的实验室保存; pAD-OsRhoGAP2 来自酵母双杂交筛选, 由笔者所在的实验室保存; pENTR/D gateway 入门载体购自 Invitrogen 公司;

收稿日期: 2017-09-10

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31171182); 河南省高校科技创新团队支持计划 (编号: 15IRTSTHN020); 河南省基础与前沿技术研究项目 (编号: 132300410137)。

作者简介: 葛慧雯 (1993—), 女, 山东郓城人, 硕士研究生, 主要从事植物发育分子生物学研究。E-mail: 458986129@qq.com。

通信作者: 梁卫红, 博士, 教授, 主要从事植物发育分子生物学研究。E-mail: liangwh@htu.cn。

[16] de Bianchi S, Betterle N, Kouril R, et al. *Arabidopsis* mutants deleted in the light-harvesting protein *Lhcb4* have a disrupted photosystem II macrostructure and are defective in photoprotection [J]. *The Plant Cell*, 2011, 23(7): 2659-2679.

[17] Mozzo M, Passarini F, Bassi R, et al. Photoprotection in higher plants: the putative quenching site is conserved in all outer light-harvesting complexes of photosystem II [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2008, 1777(10): 1263-1267.

[18] Miloslavina Y, de Bianchi S, Dall'osto L, et al. Quenching in *Arabidopsis thaliana* mutants lacking monomeric antenna proteins of photosystem II [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(42): 36830-36840.

[19] Kargul J, Turkina M V, Nield J, et al. Light-harvesting complex II protein CP29 binds to photosystem I of *Chlamydomonas reinhardtii* under state 2 conditions [J]. *FEBS Journal*, 2005, 272(18): 4797-4806.

RNAi 干扰植物表达载体 pANDA 由山东省农业科学院谢先芝研究员馈赠。

1.3 供试试剂

SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒购于生工生物工程(上海)股份有限公司;2 × Taq Master Mix 购于北京康为世纪生物科技有限公司;2 × VazymeLamp[®] Master Mix 购于南京诺唯赞

生物科技有限公司;高保真 PrimeSTAR[®] PrimeSTAR 聚合酶、DNA Marker 购于宝生物工程(大连)有限公司。

1.4 引物设计及合成

本试验所用引物(表 1)均在苏州金唯智生物科技有限公司合成。

表 1 引物序列及用途

引物名称	序列(5'→3')	用途
P1	CACCCTGTTTTTCAGTTGAG	<i>OsRhoGAP2</i> 基因 RNA 干扰载体构建上游引物
P2	GATTGGTCAGAAATGAATAG	<i>OsRhoGAP2</i> 基因 RNA 干扰载体构建下游引物
P3	CATGAAGATGCGGACTTACG	转基因水稻检测上游引物
P4	ATCCACGCCGTATTCCG	转基因水稻检测下游引物
LAD	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCVVNVNNGGAA	HiTAIL-PCR 第 1 轮扩增引物
HYG-R1	GCAGTTCGGTTTCAGGCAGGT	HiTAIL-PCR 第 1 轮扩增引物
AC1	GAGTTTAGGTCACGCGTCCGTCGACGATGGACTCCAGAG	HiTAIL-PCR 第 2 轮扩增引物
HYG-R2	CGCAGCTATTTACCCGCAGGA	HiTAIL-PCR 第 2 轮扩增引物
AC2	GAGTTTAGGTCACGCGTCCGCT	HiTAIL-PCR 第 3 轮扩增引物
HYG-R3	GCCGTCAGTTCAGGCTTTTTTC	HiTAIL-PCR 第 3 轮扩增引物

注:V = A、C 或 G;N = A、C、T 或 G。

1.5 *OsRhoGAP2* 基因的 RNA 干扰载体的构建及水稻的遗传转化

将 *OsRhoGAP2* 基因的 cDNA 序列提交 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),以 Blastn 进行检索,并用 DNAMAN 软件进行序列同源性比对。根据 RNAi 载体设计原则,选取 *OsRhoGAP2* 基因 cDNA 序列的 3'端 261 bp 的特异区段作为 RNA 干扰片段。

根据 *OsRhoGAP2* 基因 3'端的特异序列设计引物 P1 和 P2。以 pAD - *OsRhoGAP2* 质粒为模板,用高保真 PrimeSTAR[®] rHS DNA 聚合酶扩增 *OsRhoGAP2* 基因的 RNA 干扰片段。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后,PCR 产物参照 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒步骤回收定量后,与 pENTR/D gateway 入门载体连接,将载体命名为 pENTR/D - *OsRhoGAP2*。

将 pANDA 空载体和 pENTR/DN*OsRhoGAP2* 按比例混匀,将 pENTR - *OsRhoGAP2* 和 pANDA 载体进行 LR 反应后,转到 DH5 α 感受态细胞中,将质粒命名为 pANDA - *OsRhoGAP2*。

采用农杆菌介导法^[12]将 pANDA - *OsRhoGAP2* 转化水稻愈伤,筛选阳性愈伤,诱导分化,获得再生植株,2016 年 5 月 10 日移植到河南师范大学生物实验园地,鉴定后于同年 10 月收获 T₀ 代种子。

1.6 水稻基因组 DNA 的提取

将 T₀ 代转基因水稻种子,消毒后置于 27 °C 恒温培养箱中培养 7 d,获得 T₁ 代转基因水稻幼苗。取其叶片,液氮冷冻后,迅速研磨至粉末,然后以 CTAB 法^[13]提取基因组 DNA,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测质量。

1.7 转基因植株的 PCR 鉴定

按照 2 × Taq Master Mix 说明书配制 PCR 反应体系(20 μ L):2 × Taq Master Mix (10 μ L)、P3 (0.8 μ L)、P4 (0.8 μ L)、基因组 DNA(0.4 μ L)和无菌水(8 μ L)。PCR 反应程序为:94 °C、2 min;94 °C、30 s,55 °C、30 s,72 °C、30 s,共 35 个循环;72 °C 延伸 5 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电

泳检测。

1.8 T-DNA 在水稻基因组中插入位点的鉴定

采用 HiTAIL-PCR 技术扩增 T-DNA 侧翼序列,反应体系和反应程序见表 2、表 3。将第 3 轮反应产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,送至苏州金唯智生物科技有限公司测序。

表 2 HiTAIL-PCR 反应体系

反应顺序	反应体系	反应体积(μ L)
第 1 轮:加无菌水至 25 μ L	2 × VazymeLamp [®] Master Mix	12.50
	HYG-R1	0.75
	LAD	2.50
	模板(基因组 DNA)	1.00
第 2 轮:加无菌水至 25 μ L	2 × VazymeLamp [®] Master Mix	12.50
	HYG-R2	0.75
	AC1	0.75
	模板(第 1 轮反应产物稀释 50 倍)	1.00
第 3 轮:加无菌水至 50 μ L	2 × VazymeLamp [®] Master Mix	25.00
	HYG-R2	1.50
	AC2	1.50
	模板(第 2 轮反应产物稀释 10 倍)	2.00

1.9 序列比对和分析

采用 DNAMAN 软件对测序结果进行序列分析,T-DNA 在水稻基因组 DNA 上插入位点的分析采用 Blast 结合 DNAMAN 软件。

2 结果与分析

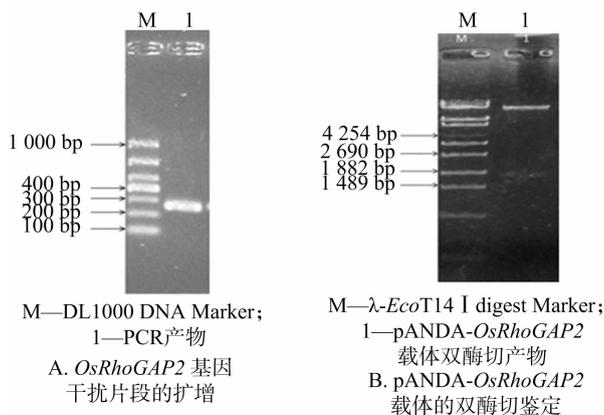
2.1 *OsRhoGAP2* 基因 RNA 干扰载体的构建

以 pAD - *OsRhoGAP2* 质粒为模板,用引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增 *OsRhoGAP2* 基因特异片段。电泳检测显示,扩增产物与预期的 261 bp 长度相符(图 1-A),回收该扩增条带,连入 pENTR/D gateway 入门载体,筛选阳性克隆,并测序确认后,将其与 pANDA 载体进行 LR 反应,然后将反应产物转化到感受态细胞,筛选转化子,并从中提取重组载体。

采用 *Kpn* I 和 *Sac* I 双酶切鉴定重组载体,电泳结果显

表 3 HiTAIL-PCR 反应程序

步骤	反应程序		
	第 1 轮反应	第 2 轮反应	第 3 轮反应
1	93 °C 2 min	93 °C 2 min	93 °C 2 min
2	95 °C 1 min	95 °C 1 min	95 °C 1 min
3	94 °C 30 s	94 °C 30 s	94 °C 30 s
4	60 °C 1 min	68 °C 1 min	68 °C 1 min
5	72 °C 3 min	72 °C 3 min	72 °C 3 min
6	3~5 步骤, 11 个循环	94 °C 30 s	94 °C 30 s
7	94 °C 30 s	68 °C 1 min	68 °C 1 min
8	25 °C 2 min	72 °C 3 min	72 °C 3 min
9	升至 72 °C, 0.3 °C/s	94 °C 30 s	94 °C 30 s
10	72 °C 3 min	50 °C 1 min	50 °C 1 min
11	94 °C 30 s	72 °C 3 min	72 °C 3 min
12	60 °C 1 min	3~11 步骤, 13 个循环	3~11 步骤, 7 个循环
13	72 °C 3 min	72 °C 5 min	72 °C 5 min
14	11~13 步骤, 25 个循环		
15	72 °C 5 min		

图 1 pANDA-*OsRhoGAP2* 载体的构建

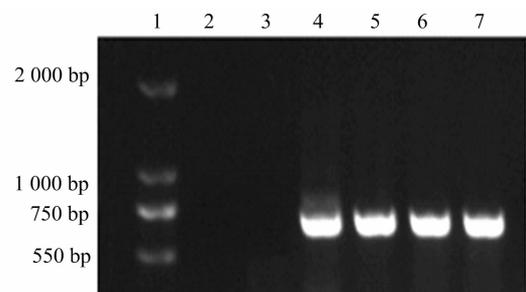
示,重组载体释放出 1 条 1 800 bp 左右的目的条带(图 1-B),条带大小与预期一致,说明 *OsRhoGAP2* 基因 RNA 干扰载体构建成功(图 1-C),进一步测序确认。

2.2 RNAi-*OsRhoGAP2* 水稻的筛选及表型分析

通过农杆菌介导法,将 pANDA-*OsRhoGAP2* 载体转入到水稻愈伤组织中,筛选潮霉素抗性愈伤,并进一步诱导分化为再生植株。提取再生水稻植株的基因组 DNA,利用载体上序列设计的特异性引物 P3 和 P4 进行 PCR 扩增。电泳检测显示,所检测的 4 个不同株系的转基因植株均可以扩增出特异性片段,且片段长度与预期的 638 bp 大小相符(图 2),而以水为模板的阴性对照,以及对照 WT 水稻中均未扩增出该条带,表明载体已经整合到水稻基因组中。比较转基因水稻和对照的表型,结果显示 RNAi-*OsRhoGAP2* 转基因植株的株高显著高于对照水稻(图 3)。

2.3 RNAi-*OsRhoGAP2* 水稻 T-DNA 侧翼序列的扩增

根据 pANDA 载体上的潮霉素基因设计 3 条特异性嵌套引物 HYGR1、HYGR2 和 HYGR3,参考文献[14]的方法设计 3 条随机简并引物 LAD、AC1 和 AC2,采用 HiTAIL-PCR 方法

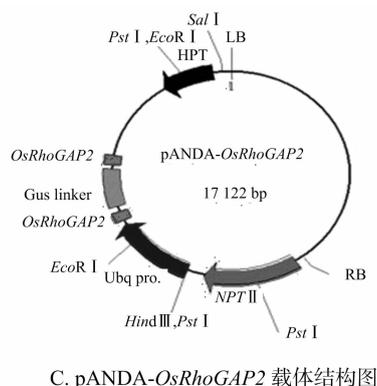


1—DL 2000 DNA Marker; 2—以水为模板的 PCR 产物;
3—WT 水稻基因组 DNA 扩增产物;
4~7—不同株系转基因水稻的基因组 DNA 扩增产物
图 2 RNAi-*OsRhoGAP2* 转基因水稻的 PCR 鉴定

扩增左侧翼序列。以提取的水稻基因组 DNA 为模板,用以上引物分别进行 3 轮扩增,取第 3 轮扩增产物,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。结果显示,4 个检测的株系均扩增出约 1 200 bp 的条带(图 4),与预期的扩增产物大小相符,将这些 PCR 产物测序作进一步分析。

2.4 T-DNA 在 RNAi-*OsRhoGAP2* 水稻插入位点的分析

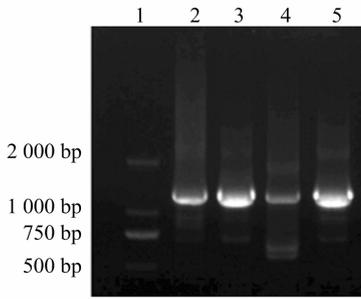
使用 DNAMAN 软件,对 4 个转基因水稻株系 PCR 产物的测序结果进行比对,结果显示序列完全相同,表明 T-DNA



标尺—20 cm
图 3 RNAi-*OsRhoGAP2* 转基因水稻与 WT 水稻的株高比较

插入到水稻基因组的同一位置。将测序序列与水稻 *OsRhoGAP2* 基因的基因组 DNA 序列、pANDA 载体的左边界序列进行对比,结果显示,测序序列与水稻 *OsRhoGAP2* 基因的基因组序列、pANDA 载体的左边界序列均有重合部分(图 5),说明载体序列已整合到水稻基因组 DNA 序列中。

将测序结果经 NCBI 网站 Blast 确定 RNAi-*OsRhoGAP2* 水稻 T-DNA 左边界插入位点,发现 T-DNA 插入位于日本晴水稻第 2 号染色体克隆 NC029257.1 中,其左边界插入位点位于 *OsRhoGAP2* 基因编码区的第 2 669 位,处于该基因的



1— DL 2000 DNA Marker; 2~5—不同转基因水稻株系HiTAIL-PCR 第 3 轮扩增产物

图4 HiTAIL-PCR第 3 轮扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

第 5 个外显子内(图 6)。

3 讨论与结论

水稻 *OsRhoGAP2* 是通过酵母双杂交筛选到的与水稻 ROP 蛋白 *OsRacD* 相互作用蛋白的编码基因。有研究显示, *OsRacD* 参与水稻育性调控^[9]。之前的试验表明, *OsRhoGAP2* 只与 GTP 结合的、处于激活形式的 *OsRacD* 发生结合, 并可能是负调控 *OsRacD* 活性的蛋白, 在 *OsRacD* 的信号调节通路中扮演重要角色, 但其功能未知。前期试验结果显示, *OsRhoGAP2* 在细胞分裂旺盛的幼叶、幼根、幼穗或成熟根中高表达(未发表), 说明该基因可能参与了相关组织的生长分化过程。

GAP2_DNA.seq	0
CX1.seq	ACTAATTCGCCGATCTAGTAAACATAGATGACACCCGCGGGATAAATTTATCCCTAGTTTGCSCGCTATATTTTGGTTTCTATCGCGTATTAATGTATAATT	100
pANDA_LB_Seq.seq	ACTAATTCGCCGATCTAGTAAACATAGATGACACCCGCGGGATAAATTTATCCCTAGTTTGCSCGCTATATTTTGGTTTCTATCGCGTATTAATGTATAATT	100
Consensus	
GAP2_DNA.seq	0
CX1.seq	GGGGACTCTAATCATAAAAACCCATCTCATAAATAACGTCATGCATTACATGTTAAATTTATACATGCTTAACGTAATTCACACGAAATTTATATGATAAT	200
pANDA_LB_Seq.seq	GGGGACTCTAATCATAAAAACCCATCTCATAAATAACGTCATGCATTACATGTTAAATTTATACATGCTTAACGTAATTCACACGAAATTTATATGATAAT	200
Consensus	
GAP2_DNA.seq	0
CX1.seq	CATCGCAAGACCGGCAACAGGATTCAATCTTAAGAACAATTTATTGCCAAATGTTTGAACGATCGGGGAAATTCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGC	300
pANDA_LB_Seq.seq	CATCGCAAGACCGGCAACAGGATTCAATCTTAAGAACAATTTATTGCCAAATGTTTGAACGATCGGGGAAATTCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGC	300
Consensus	
GAP2_DNA.seq	0
CX1.seq	CAGTGTGCTGGAAATTCGCCCTTATCACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGTGGCGCGCCACCCTTACCCCTGTTTTTCAGTTGAGTAGGTCATGAAAA	34
pANDA_LB_Seq.seq	CAGTGTGCTGGAAATTCGCCCTTATCACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGTGGCGCGCCACCCTTACCCCTGTTTTTCAGTTGAGTAGGTCATGAAAA	400
Consensus	366
GAP2_DNA.seq	AATCAGGTGAAGCGGGACAAGCCCTGTGTATGATGTAATGACACAGTAGGGTGTAGTTGATAGTTTCCATTATTTTAGAGGCGATGTTTACTTAACATTTC	134
CX1.seq	AATCAGGTGAAGCGGGACAAGCCCTGTGTATGATGTAATGACACAGTAGGGTGTAGTTGATAGTTTCCATTATTTTAGAGGCGATGTTTACTTAACATTTC	500
pANDA_LB_Seq.seq	AATCAGGTGAAGCGGGACAAGCCCTGTGTATGATGTAATGACACAGTAGGGTGTAGTTGATAGTTTCCATTATTTTAGAGGCGATGTTTACTTAACATTTC	366
Consensus	
GAP2_DNA.seq	ATCAACCAATTGCTCTAGATTTTCGTGAGTAGAAGCTAGTAAGGTATTAGCCAAATTTGGTGGTAGTAGTACTGAACTACTGATGTCGAGTTCCTGCCTGTAT	234
CX1.seq	ATCAACCAATTGCTCTAGATTTTCGTGAGTAGAAGCTAGTAAGGTATTAGCCAAATTTGGTGGTAGTAGTACTGAACTACTGATGTCGAGTTCCTGCCTGTAT	600
pANDA_LB_Seq.seq	ATCAACCAATTGCTCTAGATTTTCGTGAGTAGAAGCTAGTAAGGTATTAGCCAAATTTGGTGGTAGTAGTACTGAACTACTGATGTCGAGTTCCTGCCTGTAT	366
Consensus	
GAP2_DNA.seq	ATTTCACACTATTCATTTTCIGACCAATCA	262
CX1.seq	ATTTCACACTATTCATTTTCIGACCAATCA	628
pANDA_LB_Seq.seq	ATTTCACACTATTCATTTTCIGACCAATCA	366
Consensus	

GAP2 DNA—*OsRhoGAP2* 基因组序列; cx1—HiTAIL-PCR 第 3 轮扩增产物; pANDA LB Seq—pANDA 载体的左边界序列; TGA—*OsRhoGAP2* 基因的终止密码子

图5 多序列比对确定 T-DNA 的插入位点

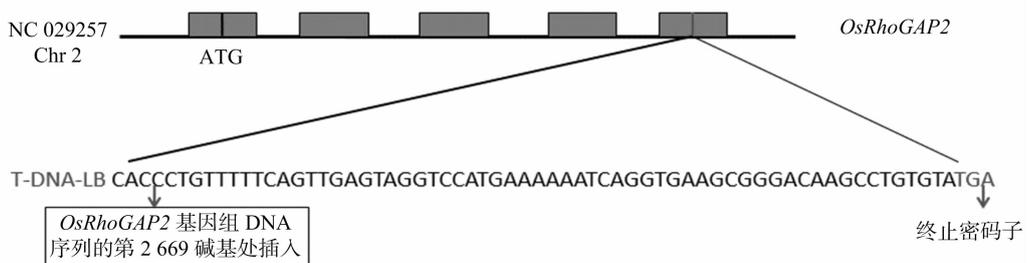


图6 T-DNA 在 RNAi-*OsRhoGAP2* 转基因水稻中的插入位置图示

为了研究水稻 *OsRhoGAP2* 基因的功能, 本研究构建了 *OsRhoGAP2* 的 RNA 干扰转基因水稻, 并发现 RNAi - *OsRhoGAP2* 转基因水稻的株高与对照水稻相比, 株高差异显著。为鉴定外源载体在转基因水稻中的插入位点, 本研究采用 HiTAIL - PCR 方法对 RNAi - *OsRhoGAP2* 转基因水稻的 T - DNA 的侧翼序列进行扩增和分析, 以期了解株高发生显著变化相关的分子信息, 为后续利用转基因水稻开展对 *OsRhoGAP2* 基因的功能研究奠定基础。

热不对称交错 PCR 法 (TAIL - PCR) 最早由 Liu 等报道^[15]。该技术可以有效地分离 T - DNA 侧翼序列, 只须经 3

次 PCR 特异扩增过程, 大大提高了目的片段的扩增效率和特异性, 成为分析植物 T - DNA 侧翼序列的有效方法。使用 TAIL - PCR 方法高效地分离 T - DNA 的侧翼序列已有报道, 例如, 邵彦春等采用 TAIL - PCR 法成功分离了红曲霉突变株 T - DNA 插入位点的侧翼序列, 不仅丰富了丝状真菌的生物信息学资源, 也为深入研究这些序列包含的功能信息奠定了基础^[16]。王海燕等利用 TAIL - PCR 成功扩增了小麦抗叶锈病基因同源序列 RGA1 侧翼序列, 为克隆目的基因 *Lr35* 奠定了基础^[17]。TAIL - PCR 有许多优点: 简单快速, 不需要特殊的酶切连接甚至是转化等操作, PCR 产物可以直接用于测

序;具有高特异性和高灵敏性,设计的3条嵌套特异性引物,很好地利用了巢式PCR的原理来选择特异性的产物,此外通过巧妙的控制高温和低温的退火次数,让特异性产物占优势^[18]。因此该技术广泛应用于许多生物的分子生物学研究之中^[19],包括在拟南芥和水稻中大规模检测T-DNA和转座子插入位点,以及分离已知序列的上游(启动子)和下游序列^[20-24]。不过,TAIL-PCR技术也有自身的缺陷:一是随机简并引物太多,能扩增出特异产物的数量有限,因此须要通过大量试验筛选和确定;二是结果不稳定,第3轮PCR有弥散的情况,很难得到特异性的条带,或者得到了清楚的条带,却因为太短没有测序的价值。

本试验采用的HiTAIL-PCR是Liu等针对上述问题改进后的方法^[25],该方法结合了TAIL循环和抑制PCR的优点,且第2轮和第3轮PCR不再使用随机简并引物,而是利用AC引物代替了随机简并引物,这样就抑制了短的特异产物的扩增,有效扩增长片段靶序列。反应的成功率高于90%,在大多数情况下获得的主要产物的大小为1~3 kb。笔者利用HiTAIL-PCR技术扩增RNAi-OsRhoGAP2转基因水稻T-DNA的侧翼序列,结果显示T-DNA插入到水稻OsRhoGAP2基因的第5个外显子内,推测OsRhoGAP2水稻的表型改变可能是OsRhoGAP2基因的结构发生改变引起的。同时,也说明OsRhoGAP2基因可能与水稻的株高性状控制相关,值得后续深入的研究。

参考文献:

[1] Sha Y, Li S, Pei Z, et al. Generation and flanking sequence analysis of a rice T-DNA tagged population [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 108(2): 306-314.

[2] 华志华, 黄大年. 转基因植物中外源基因的遗传学行为 [J]. 植物学报, 1999, 41(1): 1-5.

[3] 王槐, 陈正华. 基质结合区(MARs)与转基因植物的基因表达 [J]. 生命科学, 1999(2): 54-57.

[4] Peach C, Velten J. Transgene expression variability (position effect) of CAT and GUS reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters [J]. Plant Molecular Biology, 1991, 17(1): 49-60.

[5] Fladung M. Gene stability in transgenic Aspen (*Populus*). I. Flanking DNA sequences and T-DNA structure [J]. Molecular Genetics and Genomics, 1999, 260(6): 574-581.

[6] Liu Y G, Chen Y, Zhang Q. Amplification of genomic sequences flanking T-DNA insertions by thermal asymmetric interlaced polymerase chain reaction [J]. Methods in Molecular Biology, 2005, 286: 341-348.

[7] Kim S R, Jeon J S, An G. Development of an efficient inverse PCR method for isolating gene tags from T-DNA insertional mutants in rice [J]. Methods in Molecular Biology, 2011, 678: 139-146.

[8] Cottage A, Yang A, Maunders H, et al. Identification of DNA sequences flanking T-DNA insertions by PCR-walking [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2012, 19(4): 321-327.

[9] 叶建荣, 黄美娟, 赵淑慧, 等. OsRACD 基因表达与光敏核不育水稻光周期育性转换的相关性 [J]. 自然科学进展, 2004, 14(2): 166-172.

[10] Liang W H, Tang C R, Wun A H, et al. Cloning and characterization of a new actin gene from *Oryza sativa* L. [J]. Progress in Natural Science, 2004, 14(10): 867-874.

[11] 梁卫红, 唐朝荣, 吴乃虎. 两种水稻 GDP 解离抑制蛋白基因的分离及特征分析 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2004, 20(6): 785-791.

[12] Hiei Y, Ohta S, Komari T, et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA [J]. Plant Journal, 1994, 6(2): 271-282.

[13] Doyle J. Isolation of plant DNA from fresh tissue [J]. Focus, 1990, 12: 13-15.

[14] 黄磊. 稻曲病菌 T-DNA 插入突变体 B-726、B-1015 侧翼相关基因的克隆 [D]. 南京: 南京农业大学, 2014: 20-22.

[15] Liu Y G, Whittier R F. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking [J]. Genomics, 1995, 25(3): 674-681.

[16] 邵彦春, 丁月娣, 陈福生, 等. TAIL-PCR 法快速分离红曲霉色素突变株 T-DNA 插入位点侧翼序列 [J]. 微生物学通报, 2007, 34(2): 323-326.

[17] 王海燕, 姜亚博, 杨文香, 等. 小麦抗叶锈病 *Lr35* 基因同源序列 RGA1 侧翼序列的扩增与分析 [J]. 分子植物育种, 2006, 4(3): 329-332.

[18] 郑岑, 张立平, 唐忠辉, 等. TAIL-PCR 技术及其在植物基因中的克隆 [J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(3): 544-548.

[19] 焦翠翠, 郭妍妍, 吴均章, 等. 水稻 Ds 标记的曲穗突变体的分子鉴定 [J]. 江苏农业科学, 2017, 45(11): 26-29.

[20] Liu Y G, Mitsukawa N, Oosumi T, et al. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR [J]. Plant Journal, 1995, 8(3): 457-463.

[21] Grossniklaus U, Vielle-Calzada J P, Hoepfner M A, et al. Maternal control of embryogenesis by *Medea*, a polycomb group gene in *Arabidopsis* [J]. Science, 1998, 280(5362): 446.

[22] 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 for Cell & Molecular Biology, 1999, 19(5): 615-623.

[23] 周延清, 王婉坤, 张喻, 等. 高效热不对称交互式 PCR 技术克隆地黄基因 [J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2015(1): 100-105.

[24] 裴忠有. 水稻 T-DNA 插入突变体筛选及其功能的初步分析 [D]. 北京: 中国科学院微生物研究所, 2004: 15-18.

[25] Liu Y G, Chen Y L. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences [J]. Biotechniques, 2007, 43(5): 649-656.