

# 低能 $N^+$ 注入诱导拟南芥变异及 突变体特异表达 cDNA 克隆\*

常凤启 李银心 刘选明 刘公社\*\* 朱至清\*\*

中国科学院植物研究所, 北京 100093

**摘要** 低能  $N^+$  离子注入拟南芥引起处理当代 ( $M_0$ ) 种子的萌发率降低, 并且降低的幅度随剂量的升高而增大. 较高剂量离子处理的  $M_2$  代植株中出现了较明显的表型变异, 包括黄化、半致死、形态变异以及开花结实性状的改变等. 对  $M_2$  代植株进行随机引物扩增多态性 DNA (RAPD) 分析的结果表明, 离子注入处理的拟南芥中有 RAPD 条带的缺失或增加, 且变化频率与离子注入的剂量相关, 而对照未发现有明显变化. 80 次剂量处理的  $M_1$  代植株中有一株特别矮小, 为典型的矮化变异体. 以它的一个稳定的  $M_6$  代矮化突变体 T80II 为材料, 用 PCR 增效的减法杂交技术, 构建减法文库, 克隆特异表达的 cDNA 片段, 其中 1 个 712 bp 的片段与 GRF 基因有部分同源性.

**关键词** 低能离子束 拟南芥 变异 cDNA 减法文库

近年来低能离子注入已逐步发展成为一个新的诱变育种手段, 并且离子注入对生物体的诱变效应已经被广泛证明<sup>[1-5]</sup>. 中国科学院等离子体物理研究所余增亮等在已经发现的低能离子注入可以造成植物细胞壁刻蚀并产生局部穿孔现象的基础上<sup>[6]</sup>提出了低能离子束介导外源 DNA 转化的设想. 他们<sup>[6]</sup>和杨剑波等<sup>[7]</sup>, 吴丽芳等<sup>[8]</sup>分别应用低能离子注入技术获得了转基因植株. 除诱变育种以外, 基因转化也是低能离子注入技术的应用之一.

我们用不同剂量的  $N^+$  注入拟南芥, 研究了低能离子注入对拟南芥的诱变效应, 并用 PCR 增效的减法杂交技术, 首次构建了低能离子注入诱发的突变体—T80II 特异表达 cDNA 的减法文库, 并对特异表达的片段进行了序列分析.

## 1 材料与方 法

### 1.1 拟南芥的 $N^+$ 离子束辐照处理

所有处理的干种子均来源于同一株拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*), Columbia 生态型; 中国科学院等离子体物理研究所提供离子源, 离子注入的

具体方法依据 Yu 等<sup>[1]</sup>进行. 每次脉冲剂量  $1 \times 10^{15} N^+ / cm^2$ , 处理的剂量分别为 0 (作为对照), 40, 60 和 80 次. 每个剂量处理 300 粒种子.

### 1.2 辐照后拟南芥的培养

处理的种子种植在温室中, 白天  $25^\circ C$ , 夜间  $12^\circ C$ , 光照 16 h. 在 80 次剂量处理的拟南芥植株中发现的矮化变异体, 经过 5 代自交稳定后, 取其中的一个矮生突变株系 T80II (详见结果) 和野生型对照拟南芥作为构建减法文库的实验材料.

### 1.3 基因组总 DNA 的提取

取对照和  $M_2$  代  $N^+$  处理的部分植株进行基因组 DNA 的提取, 方法按照 Rogers 等<sup>[9]</sup>进行.

### 1.4 RAPD 标记

随机引物购自赛百盛公司 (CYA1~20), Taq 聚合酶和 dNTP 购自上海生工公司. 扩增条件为:  $25 \mu L$  的反应体系,  $94^\circ C$  预变性 5 min, 然后进入下列循环:  $94^\circ C$  变性 1 min,  $45^\circ C$  复性 1 min,  $72^\circ C$  延伸 2 min, 35 个循环, 最后  $72^\circ C$  保温 10 min. 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离.

2002-09-09 收稿, 2002-11-08 收修改稿

\* 国家自然科学基金重大项目 (批准号: 19605005) 资助

\*\* 联系人, E-mail: ccchu@ns.ibcas.ac.cn

### 1.5 减法杂交及相减后 cDNA 产物的分析、克隆和鉴定

减法杂交的过程及“示踪”cDNA的扩增引物依据文献[10]中所述的进行,略有改动.减法完成后,用初始总“排除”cDNA作为探针,对各轮减法的PCR产物进行梯度点杂交,鉴定减法效率,杂交用Boehringer Mannheim公司的DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I进行,方法依据产品说明书.相减后cDNA用pUC18克隆<sup>[11]</sup>.可能含有重组子的菌落用PCR扩增的方法进行鉴定后,再挑选插入片段大小较为合适的PCR产物点膜进行点杂交,以挑选阳性克隆.杂交操作如上所述.

### 1.6 Northern 杂交

Northern杂交按照文献[11]所述方法进行,杂交探针为克隆的T80IISH43(见结果),探针标记依据TaKaRa公司Random Primer DNA Labeling Kit产品说明书.

### 1.7 测序及序列分析

从点杂交中挑选部分阳性克隆送上海生工公司测序.测序引物是M13(+)和M13(-)通用测序引物.序列通过NCBI服务器,用BLAST软件进行序列同源性比较.

## 2 结果

### 2.1 $N^+$ 离子注入对拟南芥生长发育及表型变异的影响

低能离子处理的当代种子萌发率和成苗率与对照相比都有所下降,而且随离子注入剂量的增大,下

降的幅度升高.其中对照拟南芥种子的萌发率和成苗率分别为89.7%和77.0%,而40次剂量处理为74.7%和66.5%,60次剂量处理为45.3%和38.2%,80剂量为23.3%和21.4%.在3组处理的 $M_1$ 代植株中基本上没有发现变异株,但是在80次处理组中,有1个植株生长缓慢,且特别矮小,其果实也较对照短粗,花的着生状态也发生了明显的变化(图1).将其自交获得 $M_2$ 代, $M_2$ 代群体中矮株和高株的比例约为3:1,再选取分离后的矮株连续自交4代,获得遗传上已经稳定的 $M_6$ 代矮生突变株系T80II,用来构建cDNA减法文库.此外,在 $M_2$ 代植株中,40次剂量处理组的222个植株生长基本正常,形态与对照没有明显区别,60次剂量处理组的76株中发现3株在花序形成后顶端不能形成花芽,80次剂量处理的群体中存在较明显的表型变异,例如黄化、半致死、形态变异(花形、植株高度等)及开花结实性状的改变等(图2).我们在实验中也发现,当离子剂量增大,不完全花的分化频率增加(数据未给出).

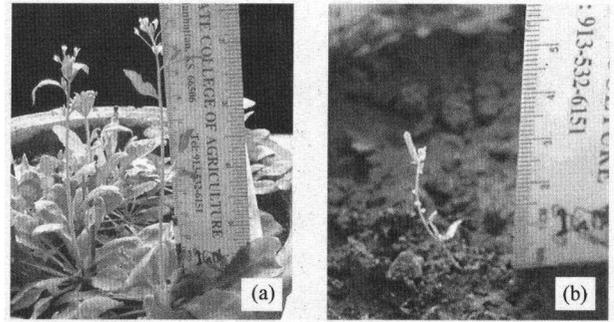


图1 拟南芥对照植株(a),株高超过11 cm和 $M_1$ 代矮化变异体(b),株高仅约3 cm

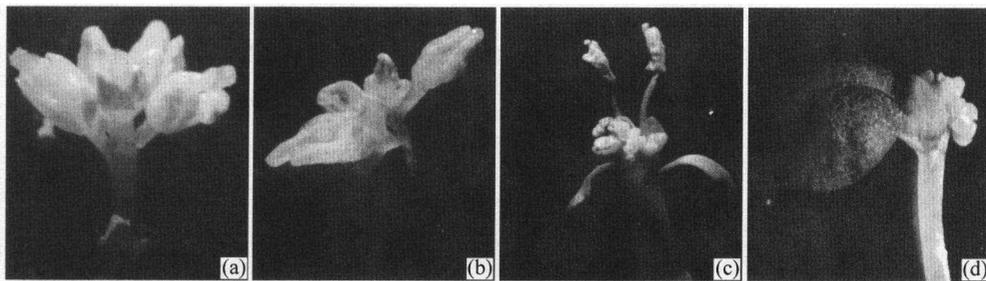


图2 低能离子诱导的拟南芥 $M_2$ 代部分植株花的形态变异

(a) 对照; (b) 40次剂量处理的拟南芥,能进行正常的花序、花芽分化; (c) 60次剂量处理的拟南芥出现无柄花的花芽分化,花序难以伸长; (d) 80次剂量处理的植株形成的无柄花,只有花瓣,没有正常的雄蕊与雌蕊的分化,花序不能正常形成

### 2.2 RAPD 分析

使用20个随机引物进行RAPD扩增,16个引物有扩增产物,产物大小分布在200~1200 bp之间.从

中挑选稳定性较好的引物CYA-10和CYA-19对对照及40,60和80次剂量处理的47株植株进行了RAPD分析.其中对照组在10个植株中都未发现条带差异,

而经  $N^+$  离子处理的拟南芥  $M_2$  代植株与对照相比大多有条带的增加或缺失, 而且差异的出现与离子剂量相关. 此外, 我们在实验中发现, 同一条带有时还有扩增量的差异(部分 RAPD 结果见图 3).

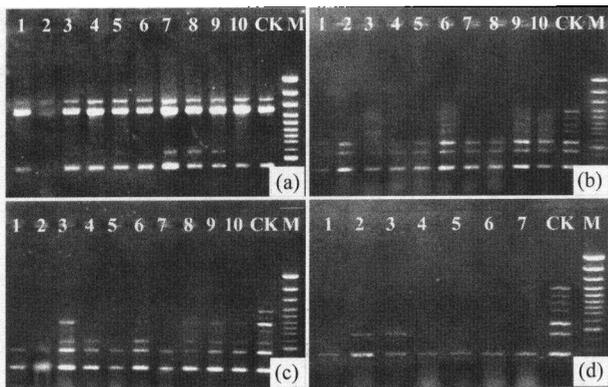


图 3 用 CYA-10 和 CYA-19 对对照和离子注入处理的  $M_2$  代部分植株进行 RAPD 扩增的结果

(a) 为 CYA-19 对对照和 60 剂量处理的植株扩增的结果; (b), (c) 和 (d) 为 CYA-10 分别对对照和 40, 60 和 80 剂量处理的植株扩增的 RAPD 图谱; CK 为对照; 1~10 为不同剂量处理的不同株系的编号. M 为 DNA 分子量标准

### 2.3 $N^+$ 离子注入诱发的矮化突变体中特异表达 cDNA 的克隆分析

为了获得低能离子注入诱导的拟南芥特异表达的 cDNA, 我们用矮化突变体 T80II 作为“示踪”材料, 对照植株作为“排除”材料, 进行 cDNA 减法文库的构建. 经过 4 次减法杂交过程后, 我们用初始总“排除”cDNA 作为探针对各轮减法的 PCR 产物进行梯度点杂交, 确定减法效率(图 4(a)). 从点杂交的结果可以看出, 每经过一轮减法/杂交过程后, 杂交信号就减弱一些. 经过 4 轮减法杂交后, 基本上没

有杂交信号出现. 此外, 我们用总“示踪”cDNA 作为探针, 再进行一次杂交, 杂交结果(图 4(b))显示, 每次减法杂交的产物与总“示踪”cDNA 探针都有很强的杂交信号出现, 证明相减后剩余的 cDNA 来源于 T80II. 对阳性克隆中质粒所携带的插入片段的 PCR 扩增和点杂交结果(结果未给出)也显示插入片段是来源于 T80II 的, 因此 cDNA 减法文库的构建是成功的.

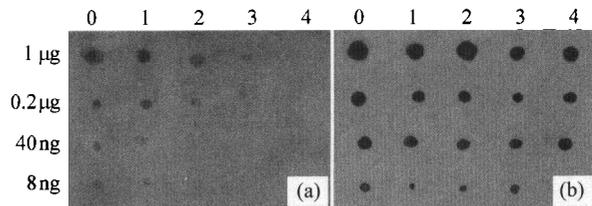


图 4 初始总“排除”cDNA 和总“示踪”cDNA 为探针与每步减法扩增产物杂交结果

(a) 总“排除”cDNA 与减法扩增产物杂交结果; (b) 总“示踪”cDNA 与减法扩增产物杂交结果; 0. 初始总“示踪”cDNA; 1. 1 次减法的扩增产物; 2. 2 次减法的扩增产物; 3. 3 次减法的扩增产物; 4. 4 次减法的扩增产物

### 2.4 重组克隆插入片段核苷酸的序列分析

我们测定了部分阳性克隆插入片段的序列, 并通过 NCBI 服务器, 用 BLAST2.0 软件进行序列相似性比较. 其中 T80IISH43(减法杂交后 43 号克隆菌落)的序列见图 5. 同源性比较结果显示, T80IISH43 在第 273~461 位碱基和 *Arabidopsis thaliana* 14-3-3 蛋白 GF14 nu (GRF7) gene (GenBank 登记号: AF145299)cDNA 的 3514~3702 位碱基有 98% 的同源性, 表明 T80IISH43 编码的蛋白质可能属于 14-3-3 蛋白家族.

```
GCGGGGGGATGGAGTTGTGGTCGCCGGTGGCCGAGATAATCCGGAGATCTAGTGAACCGT
CTCAATGTCTGGTCCAGTCCGGCGATGGAGCGAGGCAACAAGGCATGTGCGGCGAGATC
GTTCTGGCAATGCACCGTTTATGTGAGGTCTTACTAATCCGGGCTCCACTGTGTTATCTTTA
ATCGATTAGTAGCCTGATGTTTCATTGGTTAGCTCGGGAAAAGCTCTAGCCTTGCTGGTTTG
CCTTGTATCATTGGTCGGGTCAGTCGGATATATGGTCCGCTTTTGGTTTAAAGACCGAAACA
ACGAAAGCCGGGGATTTGAGCCTTTCTGATGATGCGCCTCCGGGCGGTAATGCTATTGG
GACATGGATTACATTCTGATCAATAGGGATTAATAGTATGGATTACTTTGTACTTCAGACT
AGGTTTTGGTCTCTCCGTTTTAGTAGTTGTTCTCGTGTGCTTAGAGTCTGTGTAGGTGG
TCTAAGAGATGATAATATTCTCATTGTGGAGTATTATCTATCTCATTGTGGTTTAAAAATGC
AATGGTTTCTCGATCAGGTAGCGCTGGATCCGATAGTGTTCAGGGTGATACTAGATCAAAA
CCATTGCATTTGGGGTCCAATTTGATAGTGGGGAATGTTATGTACCTTCAATTGGATGTAAT
CATTGGTAAATGAAAGTTGATGTTGAACCAAAAAAAAAA
```

图 5 克隆的 T80IISH43 的序列

### 2.5 T80IISH43 的 Northern 杂交分析

Northern 杂交的结果显示(图 6), T80IISH43 与 T80II 总 RNA 有明显的杂交信号, 而与对照植株的总 RNA 无杂交信号, 因此 T80IISH43 是在 T80II 中特异表达的 cDNA 片段。

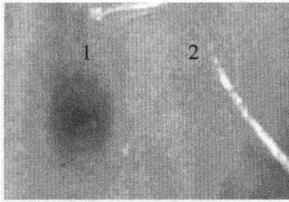


图 6 Northern 杂交的结果  
1. T80II; 2. 对照

### 3 讨论

我们以拟南芥为材料, 低能  $N^+$  作为诱变剂, 研究了不同剂量低能离子注入对拟南芥生长发育及其表型变异的影响, 并用 PCR 增效的减法杂交技术, 首次构建了低能离子注入诱导变异体 T80II 特异表达 cDNA 的减法文库, 并成功得到了低能离子注入诱导的突变体特异表达的 cDNA。这是对低能离子注入应用研究的一个新的拓展。

低能离子注入对于拟南芥处理当代种子的萌发有很大的影响。较高剂量的离子显著抑制种子的萌发, 并且种子的萌发率随着离子注入剂量的升高而降低。当剂量达到  $80 \times 10^{15} N^+ / cm^2$ , 多数种子失去了发芽力。这与张志宏等<sup>[3]</sup>用  $N^+$  离子注入烟草对种子萌发率影响的结果是一致的。

离子注入后代植株的 RAPD 分析发现, 谱带能较好的反映出诱变植株相比对照的遗传差异。如 80 次处理的后代表现出明显的表型变异, 而其 RAPD 谱带与对照也有明显的不同(图 3(d))。

减法杂交后的 cDNA 产物及克隆产物的分析表明, 构建低能离子注入 T80II 特异表达的 cDNA 减法文库是成功的。因此, 用 PCR 增效的减法杂交技术克隆低能  $N^+$  诱导的突变体中特异表达的基因是可行的。

用 T80IISH43 作为探针进行 Northern 杂交分析的结果显示, T80IISH43 是在 T80II 中特异表达的 cDNA 片段, 序列相似性比较的结果表明, T80IISH43 与 14-3-3 蛋白 GF14 nu (GRF7) gene 有部分同源性。14-3-3 蛋白是一个多基因家族, 它们被认为参与多种蛋白激酶的调节, 与信号转导过程中蛋白质磷酸化和去磷酸化的调节有关<sup>[12]</sup>。此外 Brandt 等<sup>[13]</sup>也认为 14-3-3 蛋白作为调节物质参与

磷酸化过程以应对多种外在的胁迫反应。T80IISH43 基因在 T80II 中特异表达, 它可能与突变体的多种突变性状相关。T80IISH43 的全长序列和可能的功能还有待进一步研究。

以模式植物拟南芥为材料, 进行低能  $N^+$  注入拟南芥种子诱变后代的生物学特性研究发现, 低能离子能引起拟南芥处理当代和后代的变异, 这些变异在后代能进行遗传、分离, 并表现出丰富的生物学特征的变化。此外, 我们用 PCR 增效的减法杂交技术, 建立了 80 次剂量低能离子处理获得的一个矮化突变体, T80II, 特异表达的 cDNA 减法文库, 证明通过减法杂交技术克隆低能离子诱发的突变体特异表达的 cDNA 是可能的。因此, 我们的研究为低能离子注入技术在生物学上, 特别是在分子生物学上的应用开辟了一个新的思路。

### 参 考 文 献

- 1 Yu Z L, et al. Mutation breeding by ion implantation. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, 1991, B59/60: 705
- 2 余增亮, 等. 离子注入生物学研究评述. *安徽农业大学学报*, 1994, 21: 221
- 3 张志宏, 等. 离子注入烟草种子引发的  $M_1$  代变异分析. *生物物理学报*, 1998, 14: 762
- 4 宋道军, 等.  $N^+$  离子注入对不同辐射敏感性微生物超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)活性的影响. *生物物理学报*, 1998, 14: 325
- 5 Wu L F, et al. Radiobiological effects of a low-energy ion beam on wheat. *Radiation and Environmental Biophysics*, 2001, 40: 53
- 6 Yu Z L, et al. Transferring GUS gene into rice cells by low energy ion beam. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, 1993, B80/81, 1328
- 7 杨剑波, 等. 应用低能离子束介导法获得水稻转基因植株. *科学通报*, 1994, 39: 1530
- 8 吴丽芳, 等. 建立低能离子束介导小麦转基因方法并获得转 GUS 基因植株. *遗传学报*, 2000, 27: 982
- 9 Rogers S O, et al. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Molecular Biology*, 1985, 5: 69
- 10 Clark M S 编. 顾红雅, 等译. 植物分子生物学实验手册. 北京: 高等教育出版社, 1998. 157~173
- 11 J. 萨姆布鲁克, 等著. 分子克隆实验指南(第二版). 北京: 科学出版社, 1993
- 12 Jarillo J A, et al. Two related low-temperature-inducible gene of Arabidopsis encode protein showing high homology to 14-3-3 proteins, a family of putative kinase regulators. *Plant Molecular Biology*, 1994, 25: 693
- 13 Brandt J, et al. A pathogen-induced gene of barley encodes a protein showing high similarity to a protein kinase regulator. *Plant J*, 1992, 2: 815