

# 水稻端粒酶 RNA 模板基因序列鉴定体系的建立

杨力媛, 郑洁, 马登旭, 马国兴, 刘小川

(浙江理工大学生物工程研究所, 杭州 310018)

**摘要:** 利用水稻端粒酶对端粒序列的合成作用,对模板基因序列进行定点突变,构建了 pCambia1301-T 突变型、pCambia1301-Y 野生型载体。经农杆菌介导,选用水稻不同品种和组织,探索候选序列的鉴定体系。结果显示,不同水稻品种诱导愈伤,差异显著,其中中花 11 号可快速诱导愈伤,比广陆矮 4 诱导时间缩短一半,用成熟胚和幼胚分别诱导愈伤,无明显差异;对突变型、野生型、正常组织进行基因组 DNA 端粒鉴定和端粒酶活性分析,发现突变型端粒酶活性明显高于对照。这些均表明该鉴定体系完整、可靠,为端粒酶 RNA 模板基因序列的鉴定建立了有效的方法。

**关键词:** 水稻; 端粒酶 RNA; 模板序列鉴定技术; 定点突变

**中图分类号:** Q785 **文献标志码:** A

## 0 引言

端粒酶通过识别端粒末端序列,与自身携带的 RNA 模板互补配对,以延伸端粒缩短的序列,保证端粒的正常长度,维持细胞内遗传物质的稳定性。端粒酶中的 RNA 成分包含一个短的模板序列(TER),决定了端粒的重复合成序列<sup>[1]</sup>。在端粒酶保持一定活性的情况下,端粒酶 RNA 模板基因序列直接决定了延伸得到的端粒末端序列。由于植物基因组内端粒酶 RNA 模板为单基因,通过基因突变改变水稻端粒酶 RNA 模板基因序列可导致基因组端粒末端重复序列的改变,从而对端粒酶 RNA 模板序列实施有效鉴定。

建立一套完备的端粒酶 RNA 模板基因序列鉴定体系还需要水稻转基因技术相辅助。研究表明,水稻转基因采用 NB 培养基更有利于水稻愈伤组织的诱导,预培养 4~5 d 的水稻愈伤组织更利于形成抗性愈伤<sup>[2-3]</sup>。经过验证,水稻成熟胚与幼胚均可诱导出质地较好的愈伤组织。基于水稻成熟胚取材便捷,使用继代 4 次的水稻成熟胚愈伤组织预培养 4 d 可作为农杆菌侵染的材料。

同时,在水稻转基因过程中,宿主菌和诱导环境的选择也很重要。农杆菌多应用于双子叶植物转基因,但对一些重要的单子叶植物,如水稻,已经打破这一界限,其应用技术逐渐成熟<sup>[4]</sup>。在农杆菌侵染水稻愈伤组织时,培养基中需加入一定量的乙酰丁香酮(AS),诱导外源基因的表达,同时拓宽可选择的农杆菌菌种范围<sup>[5-6]</sup>。研究选择农杆菌 LBA4404 菌种,通过转基因菌种与水稻愈伤组织共培养方法将基因整合到水稻基因组中。

此外,转基因愈伤组织中端粒酶活性测定方法的选择,对于正确评价实验的可靠性具有重要意义。同时,由于端粒酶活性的检测已经成为了现代肿瘤恶性、良性判断的新指标<sup>[7-8]</sup>,有效的检测方法对其也具有一定指导意义。常用的检测方法主要有端粒重复序列延伸法和端粒重复序列扩增法(TRAP)及其改良方法。对于 TRAP 法进行改良的方法有很多,如核素-TRAP 法、银染 TRAP 法以及在其基础上建立的端粒酶延伸产物的液体闪烁计数法<sup>[9]</sup>。另外,端粒酶活性检测中,引物的设计极其关键,因此,通过对其引物的研究也可以得到较好的改进方法<sup>[10]</sup>。

收稿日期: 2012-11-07

作者简介: 杨力媛(1987-),女,河北邢台人,硕士研究生,研究方向为端粒与端粒酶。

通信作者: 刘小川,电子信箱: xcliu@zstu.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

穿梭质粒 pCambia1301、农杆菌 LBA4404 菌种以及中花 11 号水稻种子为本实验室所有。头孢噻肟钠、潮霉素 B 购自生工生物工程有限公司。T4 DNA ligase、pMD18-T vector 及相关限制性内切酶购自 Takara 公司。其他材料包括乙酰丁香酮(AS)、NB 培养基等。主要仪器为 Bio-Rad 电击转化仪、NANODROP 2000 spectrophotometer(Thermo SCIENTIFIC 公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 穿梭质粒载体的构建

研究采用三重 PCR 方法,在获得野生型基因的基础上,将待测模板基因中的-TTTAGGG-序列突变为-TTTTGGG-,从而获得突变型基因。再分三步将两组基因导入农杆菌 LBA4404 细胞:(1)清洁回收两组 PCR 产物,装载于 pMD18-T vector,测序验证序列的正确性。(2)测序正确的两组质粒双酶切后装载到 pCambia1301 载体中,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,扩增出大量阳性克隆质粒,通过菌液 PCR 进行阳性克隆鉴定。(3)分别抽提 pCambia1301-T 突变型质粒和 pCambia1301-Y 野生型质粒。同时,用 YEB 培养基培养农杆菌 LBA4404 细胞至 OD<sub>600</sub> 值为 0.6 左右,用冰上预冷的 10% 甘油重悬 3 次。100 ng 质粒与制备好的 100  $\mu$ L 农杆菌 LBA4404 细胞悬液混匀后电击转化。其中,Bio-Rad 电击转化仪参数为:C=25  $\mu$ F,V=2.4 kV,电击杯杯径 2.0 mm。

#### 1.2.2 水稻愈伤组织诱导

水稻愈伤的诱导、继代、预培养用 NBD<sub>2</sub> 培养基,共培养用 AAMD<sub>0.5</sub>-As 培养基,抗性筛选用 NBD<sub>0.5</sub>-CH<sub>1</sub> 培养基。具体组成见陈惠方法<sup>[11]</sup>。

水稻成熟胚愈伤组织诱导方法:水稻种子脱颖壳后浸入 75% 乙醇 1 min、25% 的次氯酸钠溶液 30 min。无菌水冲洗 3~5 次后,用滤纸吸干残液,接种于 NBD<sub>2</sub> 培养基上,进行愈伤组织诱导。14 d 后继代培养,以后每 10 d 继代 1 次。

水稻幼胚愈伤组织诱导方法:取开花 14 d 的水稻幼穗,脱粒后用 75% 的乙醇表面消毒 1 min,再转入 35% 的次氯酸钠溶液中消毒 1 h。无菌水冲洗 3~5 次后,用滤纸吸干,再用镊子挤出幼胚,将其接种于 NBD<sub>2</sub> 培养基上。后续培养方法同水稻成熟胚。

#### 1.2.3 农杆菌侵染水稻成熟胚愈伤组织

继代 3 次的愈伤组织转接到 NBD<sub>2</sub> 培养基上预处理 4 d。同时,准备含 50 mg/L 卡那霉素的 YEB 液体培养基,挑取农杆菌单菌落于 3 mL 培养基中,28℃、280 r/min 摇菌 16 h。次日,按照 1:100 的比例转接农杆菌于 50 mL 新鲜培养基中,继续摇菌约 6 h 至 OD<sub>600</sub> 值为 0.5。4℃、5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体。加入 50 mL 的 AAMD<sub>0.5</sub>-As 液体培养基,悬浮菌体。

将愈伤组织切成小块,浸入 AAMD<sub>0.5</sub>-As 的农杆菌悬液中 20 min。用滤纸吸干残液,转接于 AAMD<sub>0.5</sub>-As 固体培养基,暗培养 3 d。用 500 mg/L 头孢霉素溶液清洗共培养后的愈伤组织 5 次,用滤纸吸干后,转接于 NBD<sub>0.5</sub>-CH<sub>1</sub> 培养基中进行筛选。14 d 后转接愈伤组织于新鲜的 NBD<sub>0.5</sub>-CH<sub>1</sub> 培养基上,再次筛选。

#### 1.2.4 基因组 DNA 端粒末端鉴定

愈伤组织材料分为 3 组:编号 Z,正常水稻愈伤组织;编号 Y,野生型水稻愈伤(导入 pCambia1301-Y 野生型质粒);编号 T,突变型水稻愈伤(导入 pCambia1301-T 突变型质粒)。3 组均采用 universal Genomic DNA Extraction Kit Ver. 3.0 试剂盒提取全基因组 DNA。根据陈波方法<sup>[12]</sup>,设计接头引物,制备端粒末端接头。采用 16℃ 与 DNA 连接 2 h 后用于 PCR 体外延伸反应。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析,用 GENE Genius Bio-imaging System 凝胶电泳成像系统进行分析。回收 T 组最亮条带,装载到 pMD18-T vector 中,样品可用于测序检测。

#### 1.2.5 端粒酶活性鉴定

准备 Z 组(正常)、Y 组(野生型)、T 组(突变型)愈伤各 300 mg,分别提取端粒酶蛋白。液氮研磨后加入 1 mL 端粒酶提取液,冰上混匀 10 min,4℃、13 000 r/min 离心 15 min 提取上清,分装后使用 NANODROP 2 000 spectrophotometer 进行蛋白含量测定。

按照刘红彦方法<sup>[13]</sup>,使用 300  $\mu$ L 反应体系,Z 组、Y 组、T 组及相应的对照组 Z-灭组、Y-灭组、T-灭组各加入 100  $\mu$ g 蛋白,对照组蛋白灭活处理,使用不含 dATP 和 dCTP 的 dNTP 进行体外酶促反应,酶促产物使用氯仿抽提,醋酸钠、乙醇沉淀纯化后,再次使用 NANODROP 2 000 spectrophotometer 进行 ssDNA 含量测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 构建的穿梭质粒载体图谱

*Nco* I 和 *Afl* II 双酶切已经装载了野生型和突变型基因的 pMD18-T vector 以及 pCambia1301 双元载体,同样条件下进行野生型基因、突变型基因与双元载体的连接,完成载体构建。所构建载体的 T-DNA 区示意图 1。



图1 双元载体 pCambia1301-T/Y 的 T-DNA 区结构

### 2.2 水稻愈伤组织诱导

#### 2.2.1 水稻成熟胚与幼胚愈伤组织诱导的比较

将中花 11 号水稻成熟胚、幼胚分别接种于 NBD<sub>2</sub> 培养基,经过 7 d 的暗培养,成熟胚和幼胚均诱导出膨大的淡黄色质地较硬的愈伤组织(见图 2,放大倍数均为 4 倍)。从形态上观察二者区别不大,只是成熟胚诱导出的愈伤组织较幼胚诱导出的愈伤组织稍小。

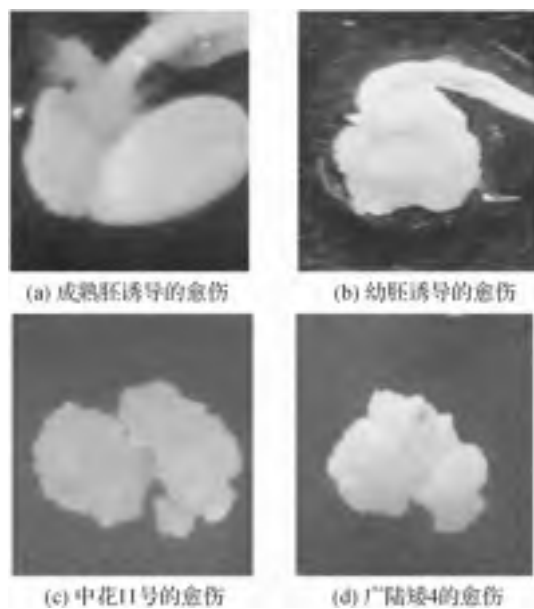


图2 水稻胚诱导出的愈伤组织

#### 2.2.2 中花 11 号水稻与广陆矮 4 水稻愈伤诱导的比较

比较使用中花 11 号水稻成熟胚和广陆矮 4 水稻成熟胚分别诱导的愈伤组织。观察发现,中花 11 号水稻成熟胚经诱导后可在一周内愈伤组织分化,分化率高、繁殖较快;而广陆矮 4 成熟胚愈伤组织分化需要两周时间,分化率较低、繁殖较慢。二者均可培养出淡黄色愈伤组织(见图 2)中花 11 号愈伤组织较广陆矮 4 愈伤组织培养时间少一个月。可见,使用中花 11 号水稻有助于缩短愈伤诱导时间。

#### 2.2.3 野生组与突变组愈伤组织抗性筛选比较

对农杆菌侵染后的中花 11 号水稻愈伤组织进行潮霉素抗性筛选,每 14 d 继代 1 次,均使用含潮霉素抗性的培养基培养。筛选出的抗性愈伤组织见图 3。

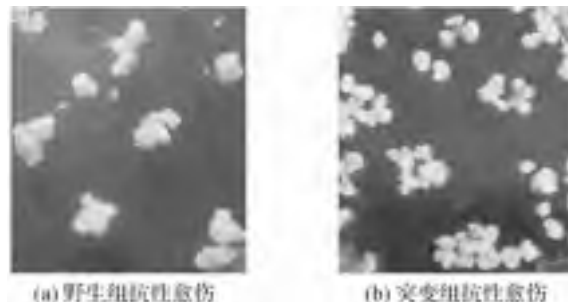


图3 潮霉素筛选的抗性愈伤

观察发现,野生型愈伤组织生长较慢,经过 28 d 筛选后大部分愈伤组织褐变死亡,少数边缘有淡绿色愈伤组织出现(图 3a)。突变型愈伤组织生长较快,经过 14 d 筛选大部分愈伤组织死亡,部分边缘有嫩绿色颗粒状组织存活(图 3b)。

### 2.3 基因组 DNA 端粒末端鉴定

3 组基因组 DNA 端粒末端经过特异引物扩增,产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测及总含量测定,结果见图 4。

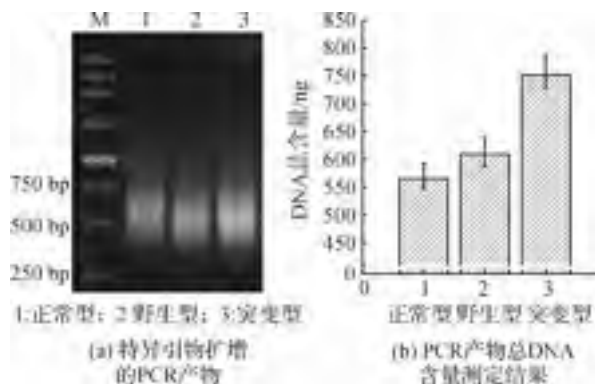


图4 基因组 DNA 端粒末端特异引物扩增及含量测定

图 4a 显示的是特异引物扩增产物的电泳结果,图 4b 为电泳总 DNA 含量的分析图。结果显示突变组 DNA 末端特异引物扩增出的 DNA 量较前两组多。表明端粒酶 RNA 模板基因序列所进行的碱基突变对其扩增造成了显著影响。

## 3 讨论

研究和建立一套完整的水稻端粒酶 RNA 模板基因候选序列鉴定体系需要从三方面取得突破。首先,在体系建立过程中,愈伤组织的诱导与培养是限速步骤,如何快速获得生长状态良好的愈伤组织是

首要解决的问题。通过使用不同的水稻组织诱导愈伤,发现成熟胚与幼胚诱导出的愈伤组织在诱导时间及生长状态上基本无差异,鉴于成熟胚取材便捷的特点,优先选择其作为材料;通过不同品种成熟胚愈伤组织的诱导比较,发现中花 11 号与广陆矮 4 差异较大,其中,中花 11 号易诱导出适于转基因的愈伤组织,生长较快,可极大地缩短培养时间。研究还发现,如果共培养后的愈伤组织表面有大量农杆菌附着,则不利于获得较为干燥、无污染的愈伤组织,故而,共培养阶段对农杆菌生长的抑制也很重要。为改善这一状况,在共培养阶段,设计两组实验,一组在培养基上加滤纸,将愈伤组织放至滤纸上进行看护培养,一组则不加。结果发现,在后续筛选阶段,加有滤纸看护培养的愈伤组织周边不再有农杆菌生长,植物组织生长状态良好;而未加滤纸的一组,农杆菌生长旺盛,植物组织生长较慢。因而,加入滤纸看护培养可有效弥补抗性筛选中抗生素对农杆菌生长抑制的不足。

此外,转基因愈伤组织的抗性筛选也是实验成败的决定因素。正常生长的水稻愈伤组织不具有潮霉素抗性。而经过转基因的愈伤组织,在获得目的基因片段的同时获得了与目的基因片段连锁的潮霉素抗性基因。因而,共培养后的愈伤组织在有效的潮霉素筛选下大部分褐变死亡,部分因为继承潮霉素抗性基因而存活。由此可见,有效的潮霉素浓度有利于抗性愈伤的筛选。此外,潮霉素有抑制植物生长的作用,抗性愈伤组织在含潮霉素的培养基上生长较慢。因而,其浓度也不宜过高。参考陈惠方法<sup>[11]</sup>,培养基使用 25 mg/L 的潮霉素浓度,发现突变型愈伤组织筛选与其方法中所用时间一致,比野生型愈伤组织筛选时间缩短一半,因而,后续筛选阶段潮霉素浓度不宜再提高。突变型愈伤组织生长较快可能是待测基因的插入提高了植物体内的端粒酶活性,可间接证明该序列与端粒酶有重要关联。

再者,整个鉴定体系的完成还需要有效的检测手段相辅助。采用两种方法对转基因愈伤组织进行了鉴定和分析。其一是,基因组 DNA 端粒末端扩增方法。研究只需筛选获得一条按照突变型基因合成的端粒序列则可证明待测序列的正确性。因此,对水稻不同染色体近端粒区设计上游引物并对设计上游引物进行初次筛选,得到突变型扩增量较大的结果后再进一步筛选。根据实验设计,接头进行单碱基改变,只与突变型端粒末端序列完全匹配,与其余组相差一个碱基,能够更好与突变型端粒连接,

但退火温度较低,其余组可通过端粒的滑动作用进行少量扩增,导致泳道内有条带。经过退火温度不断调整,可实现前两个泳道有很少条带,突变型泳道有较亮条带,此时突变型 PCR 产物中即含有突变基因的延伸产物。回收筛选出的基因片段,加载到 pMD18-T vector 上进行测序,如果测序结果中任意结果显示扩增产物的端粒序列发生了碱基突变,则证明待测序列为水稻端粒酶 RNA 模板基因序列。其二是,端粒酶活性的检测方法,假设通过端粒酶活性检测得出剔除 dATP 后的突变型保持延伸特性,正常的端粒酶实验条件下延伸特性基本丧失则可证明突变的序列对于端粒酶的活性具有举足轻重的作用,但由于正常、野生型、突变型 3 组的愈伤组织生长状态不一致而使测定时间无法保持一致,但并不影响最终结果。使用两套方案进行抗性愈伤的鉴定能够更充分证明候选序列的可能性。本研究可从量上证明端粒酶 RNA 模板基因序列的正确性,基于基因组 DNA 端粒末端扩增得到的序列较多,端粒酶活性的检测方法也需要大量的愈伤组织材料反复验证,因而其序列的报道仍需要对上述两种方法的数据进行大量比较分析。

#### 参考文献:

- [1] Blackburn E H, Greider C W. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts[J]. *Cell*, 1985, 43: 405-413.
- [2] 王晓锋, 何水林, 刘 峰. PEAS 表达载体构建及其农杆菌介导的水稻遗传转化初步研究[J]. *农业生物技术学报*, 2001, 10(3): 18-19.
- [3] Toki S, Hara N, Ono K, et al. Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high - speed transformation of rice[J]. *The Plant Journal*, 2006, 47 (6): 969-976.
- [4] Hiei Y, Komari T, Kubo T. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Plant Mol Biol*, 1997, 35(1-2): 205-218.
- [5] 邓 艺. 乙酰丁香酮在农杆菌介导的遗传转化中的作用机制及应用[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(5): 2229-2232.
- [6] Huang J Q, Wei Z M, An H L. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of rice with the spider insecticidal gene conferring resistance to leafhopper and striped stem borer[J]. *Cell Res*, 2001, 11(2): 149-155.
- [7] 杨江山, 高英堂. 端粒酶活性检测方法的研究进展[J]. *国外医学临床生物化学与检验学*, 1999, 20(6): 243-

- 245.
- [8] 王渭霞, 刘小川, 朱廷恒. 高等植物端粒和端粒酶的研究进展[J]. 遗传, 2003, 25(1): 113-118.
- [9] 张黎明, 印木泉, 贺 茜. 端粒酶活性测定方法研究[J]. 第二军医大学学报, 2002, 23(1): 102-103.
- [10] 刘小川, 梁永恒, 陈 波. 水稻端粒酶活性定量分析研究[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(5): 45-49.
- [11] 陈 惠. 一种改进的水稻成熟胚愈伤组织高效基因转化系统[J]. 植物学通报, 2008, 25(3): 322-331.
- [12] 陈 波, 梁江丽. 水稻愈伤组织端粒酶催化特征检测[J]. 浙江理工大学学报, 2009, 26(4): 597-621.
- [13] 刘红彦, 马国兴, 杨力媛, 等. 西兰花端粒酶分离与活性测定探究[J]. 浙江理工大学学报, 2012, 28(4): 604-608.

## Establishment of Identification System of Telomerase RNA Template Gene Sequence in Rice

YANG Li-yuan, ZHENG Jie, MA Deng-xu, MA Guo-xing, LIU Xiao-chuan

(Institute of Bioengineering, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** This paper conducts site-directed mutagenesis for template gene sequence by using the combining effect of rice telomerase for telomere sequence and establishes pCambia1301-T mutant type and pCambia1301-Y wild type carrier; selects different rice varieties and tissues through agrobacterium mediation and explores the identification system of candidate sequence. The result shows that different rice varieties have significance differences in callus induction; No. 11 Middle Flower can rapidly induce callus and the induction time is half of that of GLA 4; mature embryo and young embryo have no significant difference in callus induction; the analysis on identification of genome DNA telomerase activity of telomere for mutant type, wild type and normal tissues finds that mutant type telomerase activity is significantly higher than the control group. All this shows that this identification system is complete and feasible and establishes an effective method for the identification of RNA template gene sequence of telomerase.

**Key words:** rice; telomerase RNA; template sequence identification technology; site-directed mutagenesis

(责任编辑: 许惠儿)