

# 利用反义基因沉默策略构建水稻 突变体库及突变体筛选

陈远玲, 张群宇, 简玉瑜, 杨跃生, 刘耀光

(华南农业大学 遗传工程研究室, 广东 广州 510642)

**摘要:** 尝试利用鸟枪反义基因沉默策略构建水稻突变体库. 利用水稻反义 cDNA 文库转化粳稻品种中花 11, 获得了来源于 105 块潮霉素(Hm)抗性愈伤组织的 1 486 个转化植株. 随机选择来源于 11 个独立转化系的 335 个 T<sub>0</sub> 植株进行 Hm 离体叶片筛选, 结果表明所有植株均呈抗性, 并且与 PCR 检测结果相吻合, 说明 T<sub>0</sub> 植株中不存在假转化体. Southern blot 分析结果表明 T<sub>0</sub> 植株大部分为单位点整合. T<sub>0</sub> 及 T<sub>1</sub> 代转化植株均呈现了一些形态变异, 如矮化、无分蘖或多分蘖、结实率降低、粒型或穗型改变、小穗结构改变等. 利用 Hm 离体叶片筛选法对部分 T<sub>1</sub> 群体进行筛选, 得到了 1 个变异性状与 Hm 抗性共分离的突变体, 该突变体的变异表型为结实率比非转化对照下降约 50%, 每穗颖花总数比对照减少约 40%, 二者的总效应导致突变体单穗产量比对照约下降 70%.

**关键词:** 水稻; 突变体库; 反义基因沉默; 突变体筛选

中图分类号: Q754

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2004)04-0053-05

## Generation of a rice mutant library by shotgun antisense gene silencing and mutant screening

CHEN Yuan-ling, ZHANG Qun-yu, JIAN Yu-yu, YANG Yue-sheng, LIU Yao-guang  
(Genetic Engineering Lab, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** A strategy of shotgun antisense gene silencing was used to generate a rice mutant library. A total of 1 486 transgenic rice plants were obtained from 105 independent Hygromycin (Hm) resistant calli transformed with rice antisense cDNA library, using *japonica* cultivar Zhonghua 11 as transformation material. A total of 335 T<sub>0</sub> transformants from 11 independent calli were selected randomly to test Hm resistance by leaf segments screening. The results showed that all T<sub>0</sub> plants tested were Hm resistant, coincident with the results of PCR analysis, indicating that no escapee existed in T<sub>0</sub> transformants. The result of Southern blot analysis revealed that most of the transgenic plants contained single T-DNA insertion. Some morphological variations were observed in T<sub>0</sub> and T<sub>1</sub> transgenic plants such as dwarf, non-tiller or multi-tillers, decrease of seed-setting, changes of grain or panicle shape or spikelet structure. One mutant was characterized, the mutative traits of which cosegregated with Hm resistance. The mutant displayed about 50% decrease of seed-setting rate and 40% decrease of total number of spikelets per panicle, resulting in about 70% decrease of seed production per panicle as compared with non-transgenic control.

**Key words:** rice (*Oryza sativa* L.); mutant library; antisense gene silencing; mutant screening

大规模地分析基因功能和分离基因, 目前最直接有效的方法是利用多种策略构建基因功能敲除 (knock out) 或功能获得 (knock on) 的突变体库, 通过突变体分析而鉴定基因功能. 据韩国科研人员报道,

收稿日期: 2003-12-12

作者简介: 陈远玲(1966-), 女, 助理研究员, 博士研究生. 通讯作者: 刘耀光(1954-), 男, 研究员, 博士, 长江学者.

基金项目: 国家 973 项目 (G1999011603)

他们利用 T-DNA 标签、基因捕捉载体以及激活标签建立了具有 10 万个插入系的水稻 (*Oryza sativa*) 突变体库<sup>[1-3]</sup> (<http://www.postedh.ac.kr/life/pfg/risd>)。我国于 1999 年开始设立水稻功能基因组学研究计划, 迄今也获得了 20 000 个独立的 T-DNA 插入系和 5 000 多个 A c/Ds 插入系<sup>[4]</sup>。利用具有目标基因特异片段回文结构的 RNAi 载体可有效引发同源基因沉默<sup>[5]</sup>, 这也是获得突变体的一条途径。但是在没有开发出可自动生成回文结构的 RNAi 载体之前, 在水稻上利用此法构建大规模的突变体库是比较困难的, 因为它依赖于逐个片段的载体构建和转化。

导入正义或反义序列可引发植物内部同源基因沉默。尽管反义片段的沉默效率低于能形成发夹 RNA 的 RNAi 载体<sup>[5,6]</sup>, 但由于可以方便地构建反义 cDNA 文库, 又能导致插入失活与反义沉默双重效果, 因而该途径可以以整个基因组为失活目标, 适于大规模建立突变体库。

本研究尝试利用鸟枪反义基因沉默策略构建水稻穗部性状突变体库。即建立穗部性状特异的缩减杂交反义 cDNA 文库, 通过农杆菌介导法转化水稻, 获得 T-DNA 插入突变体及反义沉默突变体, 通过突变体分析了解基因功能, 并进一步分离基因。

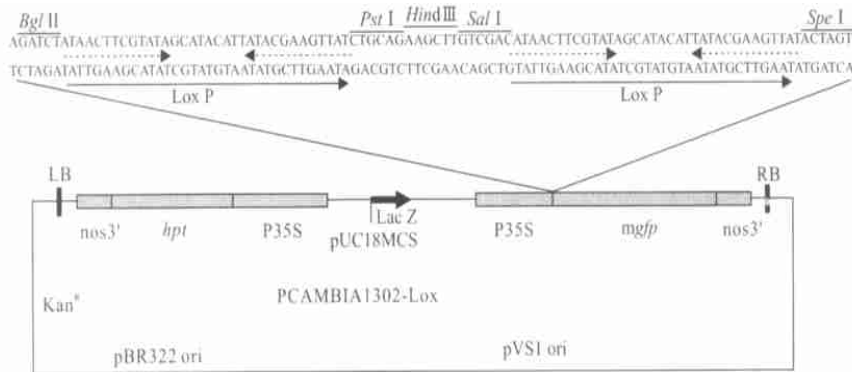
## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

籼稻品种明恢 63 用于建立反义 cDNA 文库, 粳稻品种中花 11 用作农杆菌转化受体材料。

### 1.2 方法

1.2.1 反义 cDNA 文库的建立 构建文库的载体基础来源为 pCambia 1302。为了便于将来利用 Cre-LoxP 系统切除转化植株中的反义片段, 笔者对 CaMV35S 启动子和 *mgfp* 基因之间的克隆位点作了改造, 加入了 2 个同向的 LoxP 位点, 见图 1。反义片段插在 2 个 LoxP 位点之间。



LB, 左边界; RB, 右边界; P35S, CaMV 35S 启动子; nos3', 胭脂碱合成酶基因终止子; *hpt*, 潮霉素磷酸转移酶基因; *mgfp*, 改造的绿色荧光蛋白基因; pUC18MCS, pUC18 多克隆位点; Kan<sup>R</sup>, 卡那霉素抗性基因

LB, left border; RB, right border; P35S, CaMV 35S promoter; nos3', nopaline synthetase gene terminator; *hpt*, hygromycin phosphotransferase gene; *mgfp*, modified green fluorescence protein gene; pUC18MCS, pUC18 multiple cloning site; Kan<sup>R</sup>, kanamycin resistant gene

图 1 反义 cDNA 文库载体

Fig. 1 Vector for antisense cDNA library

混合采集明恢 63 各个时期的幼穗提取 RNA, 逆转录为 cDNA, 并与叶 cDNA 进行缩减杂交, 富集穗部性状特异基因。之后以反义方向插入载体 pCambia 1302-Lox, 建成水稻反义 cDNA 文库。

文库混合质粒用电击法导入农杆菌 LBA 4404。混合收集转化后的农杆菌, -70 °C 保存。

1.2.2 农杆菌介导转化水稻 以授粉后 12 ~ 15 d 的幼胚为外植体, 转化方法主要参考 Hiei 等<sup>[7]</sup> 和胡国成等<sup>[8]</sup> 的方法。

1.2.3 转化植株的潮霉素 (Hm) 离体叶片筛选 主要参考刘巧泉等<sup>[9]</sup> 的方法。

1.2.4 转化植株的 PCR 分析 参考 Clark<sup>[10]</sup> 的方法微量提取 T<sub>0</sub> 及 T<sub>1</sub> 代植株 DNA, 分别设计引物 PCR

扩增 *hpt* 基因和反义插入片段。

*hpt* 基因扩增引物: hyg910 5' GTCCGTCAGGACATTGTTGGAG 3', *hptf* 5' GTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGG 3'。

反义片段扩增引物: 35S2 5' CACGGGGACTCTTGACCATGG 3', *gfp2* 5' TTTGTGCCATTAAACATCACCATCT 3'。

PCR 程序:

35 cycles  
94 °C → 94 °C → 58 °C → 72 °C → 72 °C  
3 min 40 s 40 s 1 min 5 min

1.2.5 转基因植株的形态变异调查 T<sub>0</sub> 再生植株

炼苗后定植于盆中,  $T_1$  株系单株种植于大田, 与非转化对照处于同等生长条件. 调查记录分蘖期、抽穗期、花粉育性、株高、分蘖数、茎节位高低等性状. 单株收种, 考察结实率、穗长、着粒密度等性状.

## 2 结果与分析

### 2.1 农杆菌介导水稻转化

转化共获得 Hm 抗性愈伤组织 105 块, 移栽成活抗性再生植株 1 486 株. 见图 2.

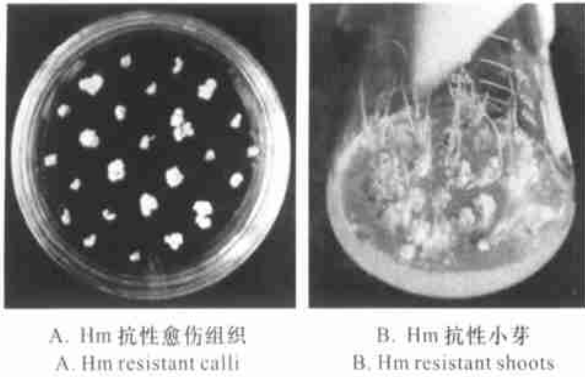


图2 Hm 抗性愈伤组织及其再生芽

Fig. 2 Hm resistant calli and shoots regenerated from the calli

### 2.2 $T_0$ 转化株的筛选与鉴定

2.2.1 Hm 离体叶片筛选 对 11 个独立转化系的 335 株  $T_0$  植株进行 Hm 离体叶片筛选, 结果表明所有  $T_0$  植株均呈抗性, 而非转化对照植株则表现敏感. 见图 3. 初步表明  $T_0$  转化株中不存在假转化体.

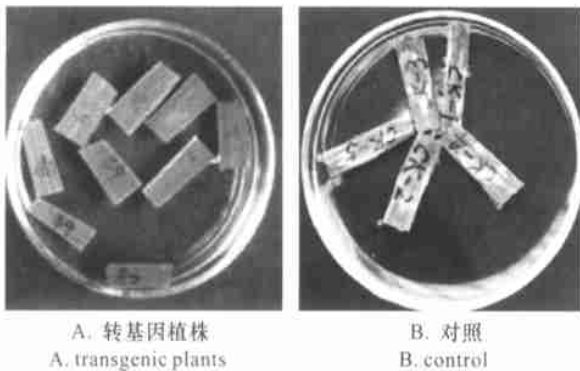


图3 Hm 离体叶片筛选

Fig. 3 Leaf segments selection with Hm solution

2.2.2 PCR 分析 为了进一步确定 Hm 离体叶片筛选的可靠性, 笔者对部分  $T_0$  植株进行了 PCR 检测, 结果见图 4 和表 1. 试验共检测了 67 个转化植株, 这些植株 *hpt* 基因和反义插入片段扩增均呈阳性, 而非转化植株 PCR 呈阴性.

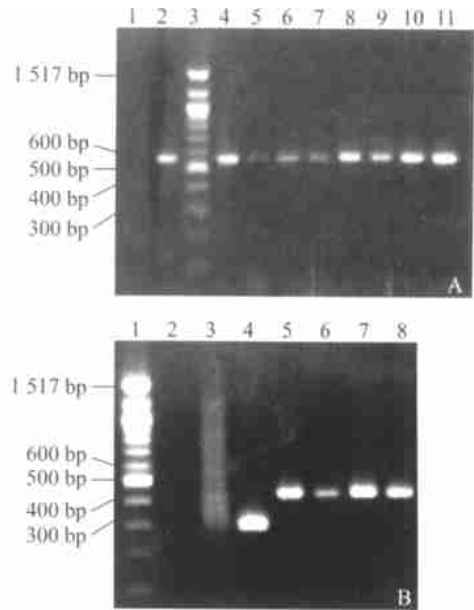


图4  $T_0$  植株 PCR 分析

Fig. 4 PCR analysis of  $T_0$  plants

通过比较 2 种检测方法对相同植株所得的检测结果, 发现二者互相吻合, 故可认为 Hm 离体叶片筛选是可靠的. 该方法快速、简便、不伤母株, 适于后代群体变异性状与转化事件的共分离分析.

表 1 还表明来源于同一抗性愈伤组织的多个再生植株存在着不同的转化事件, 例如转化系 ZC1、ZC2 和 ZM2, 均有 2 类植株, 分别插入了不同大小的反义片段. 这说明 1 块愈伤组织有数个细胞发生了转化. 此外, 植株 ZM1-2 可扩增出 300 bp 和 600 bp 2 个反义片段, 表明在单个细胞中发生了 2 个独立转化事件.

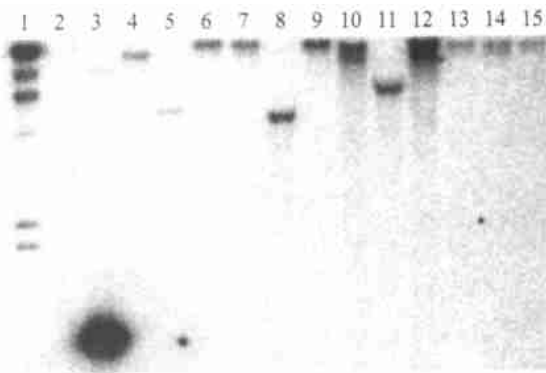
2.2.3 Southern blot 分析 选取 6 个独立转化系的 12 个植株, 以 *hpt* 基因作探针进行 Southern blot 分析, 结果见图 5. 基因组 DNA 消化所用内切酶 *Hind*III 在 T-DNA 区只有单一切点, 并且位于 *hpt* 之外, 因此, 杂交带数可反映 T-DNA 整合位点数. 图 5 表明, ZA88 和 ZM2-60 是双位点插入, 其余为单位点插入.

### 2.3 转基因植株的形态变异

2.3.1  $T_0$  代植株的形态变异  $T_0$  植株绝大部分可

表1 T<sub>0</sub> 植株 PCR 分析  
Tab. 1 PCR analysis of T<sub>0</sub> plants

独立转化系 independent transgenic lines	总检测株数 total no. tested	<i>hpt</i> 阳性株数 no. of <i>hpt</i> positive	反义片段 antisense fragments	
			大小 size (ca)/ bp	阳性株数 no. of positive
ZE	3	3	1 200	3
ZC1	14	14	300 400	10 4
ZC2	30	30	300 400	2 28
ZA	3	3	300	3
ZM1-2	1	1	300 及 600	1
ZM2	16	16	300 500	5 11
total	67	67		67



1.  $\lambda$ DNA *Hind* III marker; 2. 非转化对照; 3. *Xho* I 酶切质粒(含 *hpt* 基因的目标片段为1 094 bp); 4~15. T<sub>0</sub>转化株. 其中 4. ZE1; 5. ZC1-6; 6. ZC1-19; 7. ZC2-25; 8. ZC2-34; 9. ZC2-74; 10. ZA88; 11. ZA 164; 12. ZM2-60; 13. Z110-1; 14. Z110-6; 15. Z110-10

Lane 1,  $\lambda$ DNA *Hind*III marker; lane 2 nontransgenic control; lane 3, plasmids digested with *Xho*I (the resultant band is 1 094 bp *hpt* gene); lanes 4-15 T<sub>0</sub> transformants. lane 4, ZE1; lane 5, ZC1-6; lane 6, ZC1-19; lane 7, ZC2-25; lane 8, ZC2-34; lane 9, ZC2-74; lane 10, ZA88; lane 11, ZA164; lane 12, ZM2-60; lane 13, Z110-1; lane 14, Z110-6; lane 15, Z110-10

图5 T<sub>0</sub> 植株的 Southern blot 分析

Fig. 5 Southern blot analysis of T<sub>0</sub> transformants

移栽成活, 气候条件合适时大部分可结实, 但结实率和每穗总粒数普遍低于对照. 从 15 个 T<sub>0</sub> 独立转化系 214 个植株的考种结果来看, 约半数的植株结实率低于 50%, 每个株系的平均结实率为 40%~50%, 每穗平均总粒数为 50~82 粒. 而同期生长的非转化对照结实率在 80%以上, 每穗总粒数约 100 粒. 从形态特征来看, T<sub>0</sub> 植株呈现了以下变异类型: 矮化、分蘖力改变(0分蘖至 40 多个分蘖)、育性降低(结实率 0~90%)、着粒密度改变、粒型改变(细长、粗短、大粒有芒)、穗型改变、不抽穗、株型改变(直立、披散)等.

2.3.2 T<sub>1</sub> 代植株的形态变异 笔者选择了来源于 10 个独立转化系的 135 个种子量较多的 T<sub>0</sub> 单株, 将其种子种植为 135 个 T<sub>1</sub> 小区. 该群体呈现了株高、分蘖力、育性、着粒密度、粒型、株型等性状的变异. 其中来源于独立转化系 ZE 的 8 个小区结实率高低明显分离. 但从总体看, 其他 T<sub>0</sub> 代植株的一些变异性状在 T<sub>1</sub> 代基本恢复正常, 如结实率、株高等性状. T<sub>1</sub> 代植株还呈现出一些 T<sub>0</sub> 代所没有的变异性状, 但经检测均未观察到与转化事件共分离, 这说明它们并非转化所造成.

## 2.4 突变性状与转化事件共分离突变体的筛选

对 52 个 T<sub>1</sub> 小区植株进行了 Hm 离体叶片筛选, 其中 45 个小区抗感分离明显, 从中筛选到一个重要的突变体.

来源于 ZE 转化系的 8 个 T<sub>1</sub> 小区的植株, 其结实率、着粒密度 2 个性状与 Hm 抗性呈现共分离现象. 即 Hm 抗性植株结实率低于 70%, 平均 39.3%; 而 Hm 敏感植株结实率在 80%以上, 平均 92%, 与非转化对照株相似. Hm 抗性植株的着粒密度小于 3.5, 平均为 2.8; 而 Hm 敏感植株着粒密度大于 4, 平均为 4.9, 与非转化对照株相似. 以上结果表明, 结实率、着粒密度 2 个性状的变异是由转化事件造成的, 其效应是导致结实率比对照降低约 50%, 着粒密度比对照降低约 2 粒/cm(由于穗长性状基本不变, 为 21 cm, 故可视为每穗颖花总数降低约 40%).

其他 Hm 抗感分离的小区, 未观察到与转化事件共分离的可见突变表型.

## 3 讨论

### 3.1 所得突变体的意义

上述突变体的 2 个变异性状是重要的产量相关

性状。转化事件不仅造成每穗颖花总数减少约40%，还导致结实率降低约50%，二者的总效应导致突变体单穗产量比对照约下降70%。由此可见，分离这2个突变性状的相关基因具有重要价值。

既然上述突变性状与转化事件共分离，那么突变就是反义沉默或插入失活造成的。如果突变是插入失活造成，那么杂合体应表现为野生型。而该突变体在杂合情况下依然表现为突变型(另文发表)，这与反义沉默的特征相吻合，故可初步认为以上突变性状是反义基因沉默造成的。目前笔者已对该反义片段作了序列分析，进一步的验证工作正在进行之中。

### 3.2 转化体的变异类型

从试验结果来看，转化植株及其后代呈现了不少形态变异类型，如结实率降低、雄性不育、柱头异常、稀穗、分蘖力改变、矮秆、叶色变异、株型披散、不抽穗、苗期致死等。但许多性状并不与转化事件共分离，说明这些变异并非转化造成，而可能是组织培养过程中的体细胞无性系变异(somaclonal variation)。这种变异不是标签插入所致，因而无法用已知标签分离相应基因。在构建突变体库时应尽量减少体细胞无性系变异。

### 3.3 转化体的筛选手段

本试验结果表明，许多转化植株与非转化对照并无明显的形态差异。这与前人的报道相似。据报道，在拟南芥中只有10%以下的被标基因可能呈现可见的形态变异<sup>[2]</sup>。这可能与基因的功能冗余性有关，一些重要的性状可能是多因一效的。另一可能性是转化所涉及的是控制非形态性状的基因。在后一种情况下，单纯依靠可见的形态指标来筛选转化体则会造成许多重要突变体的丢失。因此，有必要开发一些简易可行的生理生化手段来分析非形态变异性状。

### 3.4 各种突变体库的互补与整合

欲从基因组水平系统地研究各基因的功能及其相互关系，理想的条件是获得饱和突变体库。据 Joen 等<sup>[2]</sup>估计，需建立471 000个水稻 T-DNA 插入系才能保证以99%的概率在每个基因内都找到一个插入事件。由此可见，这是一项庞大的工程。目前各种建立突变体库的方法均存在一定的局限性。例如 T-DNA 标签、转座子标签、反义失活等方法只能造成基因功能丧失，不适于分离冗余基因，也不适于分离一些因功能丧失会致死的基因<sup>[11]</sup>。然而利用激活标签则可造成被标基因的激活表达从而呈现突变表型。由此可见，多实验室合作、开发多种互补途径建立突变体

库并实现各种突变体库信息资源的整合与共享是必要的。

此外，由于基因组的复杂性，宜采用分部击破、化整为零的策略建立水稻各器官特异或发育时期特异的突变体库，以避免大量重复工作，提高针对性和有效性。

致谢：中国水稻所孙宗修研究员及其同事在水稻转化方面提供了热情指导，华南农业大学98级本科生余任冲同学参加了本研究的部分工作。在此对他们表示衷心感谢！

### 参考文献：

- [1] JEON J S, LEE S, JUNG K H, et al. T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice[J]. *The Plant Journal*, 2000, 22(6): 561-570.
- [2] JEON J S, AN G. Gene tagging in rice: a high throughput system for functional genomics[J]. *Plant Science*, 2001, 161: 211-219.
- [3] JEONG D H, AN S, KANG H G, et al. T-DNA insertional mutagenesis for activation tagging in rice[J]. *Plant Physiol*, 2002, 130(4): 1 636-1 644.
- [4] XUE Y, LI J, XU Z. Recent highlights of the China rice functional genomics program[J]. *TRENDS in Genetics*, 2003, 19: 390-394.
- [5] WESLEY S V, HELLIWELL C A, SMITH N A, et al. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants[J]. *The Plant Journal*, 2001, 27(6): 581-590.
- [6] UPADHYAYA N M, ZHOU X R, ZHU Q-H, et al. Transgenic rice[A]. BRIEN L O, HENRY R J. *Transgenic cereals* [C]. St Paul, Minnesota: American Association of Cereal Chemists, 2000. 28-87.
- [7] 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]. *The Plant Journal*, 1994, 6(2): 271-282.
- [8] 胡国成, 肖 晗, 于永红, 等. 农杆菌介导的抗除草剂基因转入两系杂交稻恢复系的研究[J]. *应用与环境生物学报*, 2000, 6(6): 511-515.
- [9] 刘巧泉, 陈秀花, 王兴稳, 等. 一种快速检测转基因水稻中潮霉素抗性的简易方法[J]. *农业生物技术学报*, 2001, 9(3): 264.
- [10] CLARK M S. *植物分子生物学——实验手册*[M]. 顾红雅, 瞿礼嘉主译. 北京: 高等教育出版社, 1998. 6.
- [11] WEIGEL D, AHN J H, BLAZQUEZ M A, et al. Activation tagging in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol*, 2000, 122: 1 003-1 013.

【责任编辑 柴 焯】