

## 转座子在植物基因分离中的应用研究进展

朱乾浩

(浙江省农科院作物所 杭州 310021)

转座子(transposon)最早由美国的玉米遗传学家 B. McClintock 在玉米中发现。但转座子的概念直到 1967 年在大肠杆菌(*E. coli*)的半乳糖操纵子研究中发现插入序列这类转座因子后才被普遍承认和接受,此后,在其它真核生物中也相继发现了转座子,如酵母菌的  $T_y^{-1}$ , 果蝇的 P 因子、Copia、Tip、412, 玉米的 Enhance、modulator, 金鱼草的 Tam3 等(Greenlatt, 1984; Ballcells 等, 1991; 盛祖嘉等, 1988)。

转座子的发现对遗传学的发展有着深远的意义。利用基因的转座原理可阐述基因的调控模式, 可为细胞的分化和发育提供依据。因为转座子在染色体上转移, 控制了结构基因的开启, 造成了不同细胞中基因启动上的差异(周希澄等, 1992)。此外, 转座理论还可启发对癌细胞发生原因的研究。就目前来说, 转座子最重要的应用是作为基因定位的标记和通过转座子在不同染色体上的插入和嵌合, 转移和克隆基因, 这对鉴定困难的基因尤为适合。如利用转座子标记引起插入突变, 已分离得到玉米和金鱼草的一些基因(Balcells 等, 1991)。

### 一、利用转座子分离植物基因的基本原理

转座子是从一个基因座位转移到另一座位的 DNA 片段, 但原来位置的 DNA 片段(转座子)并未消失, 发生转移的只是转座子的复制品。基因发生转座最重要的遗传效应是引起插入突变, 即使是插入位置的基因失活并诱导产生突变型, 或在插入位置上出现新基因。通过转座子上的标记基因(如抗药性)就可以检测突变基因的位置和分离出突变基因。从理论上讲, 用转座子标记法克隆表达产物、表达部位和

活性时间都未知的基因是行之有效的(Federoff 等, 1984)。

### 二、可供利用的转座子

许多生物的基因组中存在转座子。但真正用于植物基因分离研究的转座子仅局限于玉米的解离因子(Ds)和活化因子(Ac)。

Ac 长 4565bp, 由两个编码序列(基因), 三个非编码区和不完全的反向终端重复序列组成。终端重复序列长 11 bp。Ac 含有编码转座酶的基因, 是一个自主性的转座子。

目前分离得到的 Ds 因子有 Ds-a、Ds-b 和 Ds-c 三个, 其中以 Ds-a 为最长与 Ac 相比, Ds-a 缺少一段正好位于转座酶部位的片段(1946p); Ds-b 和 Ds-c 与 Ac 相比缺失的片段更长些, 如 Ds-c 只保留了 Ac 的反向终端重复序列。由于各个 Ds 因子均缺乏转座酶, 它们均不能自主地转座; 但各 Ds 因子都含有 Ac 的反向终端重复序列, 因此, 借助于 Ac 提供的转座酶, 它们就可以在染色体上转座。Ac 因子为 Ds 因子提供转座动力, 这就是 McClintock 发现的 Ds-Ac 系统。

为了把这些转座子应用于还没有发现转座子的植物的基因分离, 需先把 Ac 等转座子转化到要进行基因分离的植物中。利用土壤农杆菌介导的转化系统可以较方便地把转座子导入目标植物中。研究表明, Ac 导入马铃薯后, Ac 不再与原来的 DNA 序列相邻, 这说明 Ac 已从马铃薯基因组的插入起始点转移到了其它位置。目前, Ac 在番茄、马铃薯、烟草、亚麻、胡萝卜、拟南芥菜、牻牛儿苗等植物中, Ds-Ac 系统在亚麻中能有效地转座; 玉米的另一转座

子 Enhancer 在马铃薯和烟草中有效;金鱼草的 Tam3 在烟草中也能转座。相对而言, Ac 结构简单, 转座频率较高, 应用最广泛。

### 三、利用转座子分离植物基因的操作步骤

1. 构建含转座子的质粒载体, 已分离得到的转座子与选择标记需整合到适当的质粒基因组中才能用于目标植物的遗传转化。目前, 用于构建转座子载体的质粒主要是根癌农杆菌的 Ti 质粒和 pBR322 等。如 Taylor 等(1989)利用二元载体 pBT175 通过根癌农杆菌把 Ac 导入烟草中, 其 pBT175 的 T-DNA 边界间插入了

Ac 和选择标记 NPT-Ⅱ 基因(氨基酸葡萄糖磷酸转移酶基因)。Ellis 等(1992)也利用此载体成功地把 Ac 导入到亚麻中。他们还利用 pBR322 和去臂 Ti 质粒 pBV3850 的共整合构建了 pKU4-2' DRF、pKU4-2' FRO、p1' AcGN-Neo、p1' DsGN-2' ORF 和 p1' DsGN-2' FRO 等转移 Ac、Ds 的载体系统(如图)。其中前两个载体共整合的选择标记为卡那霉素(25μg/ml), 后三个载体的共整合选择标记为链霉素(Sm)和 Sp(各 100 μg/ml)。转化植株的选择标记为 Nos-Npt-Ⅱ 基因。

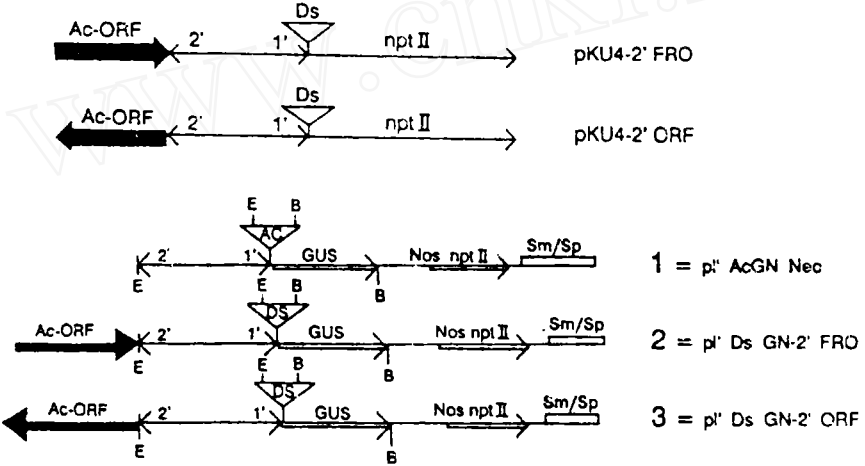


图 Ellis 等(1992)用于向亚麻导入 Ac、Ds 转座子的载体

2. 目标植物的遗传转化 现常用带有载体系统的根癌农杆菌进行转化。Ellis 等(1992)转化亚麻的方法为:从 6 天苗龄的幼苗上取下子叶,用刀切出伤口后用根癌农杆菌处理,培养伤口上长出的愈伤组织得到转基因植株。

3. 转座及拷贝数的检测 转座子从载体质粒基因组中转座到目标植物基因组中是利用转座子定位和分离目标基因所必需的。这可通过 Southern 杂交分析实现。下面以 Ellis 等(1992)检测 As-Ds 转座的方法为例加以说明。1)探针制备:以来自 667 bp Alu I 片段(含 1'和 2'启动子)的 Cal I-Alu I 片段作为 1'探针,以转座子 Tn5 的 Bgl Ⅱ-Xho I 片段作为 NpT-Ⅱ

探针。当 Ac 或 Ds 位于 NPT-Ⅱ 基因座位上时,1'探针检测到一条 2.3 kb 的带,NpT-Ⅱ 探针检测到一条 3.6 kb 的带。当 Ac 或 Ds 从 NPT-Ⅱ 上切离后,两个探针均检测到一条 3.0 kb 的带,其中 Ac 探针为玉米蜡质基因(WX)的等位基因 WX-m9,Ac 3'端探针为 Ac 因子 AccI 位点(4191bp)到 PstI 位点的片段,5'端探针为 Ac BamHI 位点(181 bp)到 NruI 位点(584 bp)的片段。2)DNA 制备:从转化植物(或愈伤组织)及其后代植株中制备 DNA。3)Southern 杂交分析:植株 DNA 用 Hind Ⅲ 酶切。当 Hind Ⅲ 的酶切片段表现为共迁移而不能分辨清楚时,用 EcoR I 和 Acc I 酶切的 DNA 进行分析,效果很好。Southern 分析的原理是:当 Ac 或

Ds 转座到新基因座上后, 植株-Ac-DNA 或 T-DNA-Ac 连接的 5' 或 3' 端均要变化, 但只有当因子(Ac 或 Ds)两侧的 DNA 都与因子原来两侧的 DNA 都不同时才能确认因子发生了转座。这可通过 Ac 3'—端探针和 5'—端探针的杂交而实现。为进一步证实 Ac-Ds 的转座, 还与 1' 探针和 NPT-Ⅱ 探针杂交, 以证明这些 T-DNA 探针没有与转座子的末端杂交。

4. 转座子插入突变的鉴定及其分离 这两种方法。1) 定靶标记: 首先分离特定的基因作为靶, 然后把含靶基因的植株与含转座子的纯合隐性突变植株杂交。这时, 多数子代从母本得到有活性(非突变)的基因, 但极少量配子中含插入了转座子的基因。从而子一代表现为突变。用这种方法成功地分离了金鱼草 *deficiens* 座位的突变和玉米一些转座子的诱发突变。但这种方法的效率很低。如在 4.5 万株金鱼草中, 仅鉴定到 17 个 *deficiens* 突变株。此外, 自花授粉作物获得大量杂交子代的成本较高。2) 无靶标记: 在不破坏 Ac 蛋白(转座酶)的前提下, 在 Ac 两个末端间插入对抗生素有抗性的基因, 然后用相应的药物处理, 即可跟踪和筛选由转座引起的突变。利用这种方法筛选到的抗性植株, 其大部分转座子位于新座位, 如果该座位在基因内, 转座子使基因失活。但这些植株是杂合体, 突变表型需自交一代后才能表现和筛选到。此法优于定靶标记, 这是由于它不但可得到特定基因的突变型, 而且还有可能发现其它有价值的突变。

分离得到突变体后, 还要证明突变确系转座子的插入引起。这可通过它的不稳定性加以证实。因为大多数由转座子插入引起的突变体的回复突变会产生斑点组织和无突变的配子。

#### 四、提高 Ac 转座频率的研究

Ac 表达一段 3.5kb 的 mRNA, 它由转座子中 300~4301 bp 的 DNA 编码, 该 mRNA 的表达水平很低, 这可能是限制转座频率的主要原因。这是由于该 mRNA 所编码的蛋白质(由 807 个氨基酸组成)是 Ac 转座必需的。内部缺失或其它突变均可阻止此蛋白的合成, 从而阻

止转座。如玉米基因组中的 Ds 即为编码 Ac 蛋白的基因的缺失体, 它不能自主地转座。

由此可见, 提高 Ac 转座频率的关键是提高 Ac mRNA 的表达水平。研究表明, 除去 Ac 本身的启动子代之以有较强启动力的启动子, 可有效地提高转座频率, 如用 T-DNA 2' 启动子代替 Ac 启动子(Ellis 等, 1992)。此外, 利用转座子的 cDNA 以消除内含子和不翻译的长先导序列也可望提高转座子的转座频率。

#### 五、利用转座子分离植物基因的现状

目前, 虽已有较完善的分离产物已知基因的方法(Maniatis, 1982), 但许多重要植物基因的产物还不清楚。因此, 用一般方法很难加以克隆。

克隆产物未知的植物基因的方法之一就是转座子标记法。如果某物种的转座子已研究得很清楚, 用这种方法克隆基因是行之有效的(Federoff 等, 1984); 对那些转座子特性尚不清楚的植物可通过导入转座子引起插入突变的方法进行基因克隆。目前, 多数植物的转座子特性尚是个谜, 因此, 均需用后一种方法来实现基因克隆。从理论上讲, 只要能通过遗传转化而导入转座子的物体都可用此法进行基因克隆(Baker 等, 1986)。事实也如此, 一些用使统生化方法难以分离的基因已用转座子标记法分离得到, 如金鱼草中控制花瓣及雄蕊发育的基因(*deficiens*)和与花发生及发育有关的基因(*floricaula*)(Balcells 等, 1991), 亚麻中的抗锈基因  $L^6$ (Ellis 等, 1992)等。

此外, 一个由欧共体资助的研究小组正利用转座子标记法进行从拟南芥中分离出影响花发生时间的基因并分析其特征的研究, 以期进而能调节重要经济作物的开花时间。美国、荷兰等国也分别在利用转座子分离拟南芥种子中脂肪酸合成的基因和研究植物病原体的抗性。

转座子标记法虽具有可分离产物未知基因的优点, 但其目前的应用仍十分有限。这主要是由于可供利用的转座子种类太少, 目前主要是利用 Ac、Ds 等转座子; 即使是这些转座子,

其转座频率在物种间也存在很大的差异,尚需针对不同的需要对其进行相应的修饰改进。此外,繁琐复杂的转化、突变鉴定的筛选方法以及有的植物至今尚不能从原生质体进行植株再生等均限制了转座子标记法的应用范围。

### 参考文献

[1]周希澄等编著,1992. 分子遗传学,河南大学出版社,

开封。

[2]盛祖嘉等编著,1988. 分子遗传学,复旦大学出版社,上海。

[3]Ellis, J. G. et al., 1992. Appl Genet 85:46—54

[4]Federoff N. W. et al., 1984. Proc. Natl. Acad. Sci USA 81:3825—3829

[5]Genetics, 108:471—485.

[6]Jones, J. D. E. et al., 1989, Science, 244:204—217.

[7]Poterson, T., 1990, Genetics, 126:469—476

[8]Taylor, B. H. et al., 1989. Plant Mol. Biol. 13: 109—118.

## Advances in Research of Transposon Tagging Method for Isolating Plant Genes

### Abstract

At the base of outline the principle of isolating plant genes use transposon tagging method, this paper reviewed briefly 1) the transposons used for isolating plant genes, 2) general method of isolating plant genes use transposon tagging method, and 3) the research results of improving transposition frequency of transposon in target plants. The present situation and prospect of the transposon tagging method for isolating plant genes is finally presented.

(上接第 15 页)

[43] Hooker, B. S., Lee, J. M. Biotechnol. Bioeng., 1992;39:765—774

[44] Heide, L., Nishioka, N., Fukui, H. et al. Phytochem., 1989;28(7):1873—1877

[45] Mol, J. N. M. et al. In progress in plant cellular and molecular biology (Nijkamp, H. J. J. et al. eds) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 1990;712—716

[46] Steincke, P. et al. EMBO J. 1992;11: 1525—1530

[47] Dujon, B. Gene, 1989;82:91—114

[48] Halseloff, Gerlach, W. L. Nature,

1988;344:585—591

[49] Young, M., Gerlach, W.: Gene manipulation in plant improvement II, Plenum staler genetics syposia series ed. by Gustafson, J. P., New York, 1990;133

[50] 叶寅, 刘怡之, 赵丰等. 中国科学(B) 辑, 1992;5:491—496

[51] Agricell Report, 1993;20(5):36

[52] Lindsey, K, Journal of Biotechnology, 1992;26:1—28

[53] Lacy, E., Roberts, S., Evans, E. P. et al. Cell, 1983;34:343—358