

油菜 (*B. napus*) 花药开裂相关基因 *BnDAD1* 克隆的 相关技术

姓名：郭媛 指导老师：蒋立希

摘要： 本试验以宁油 7 号的基因组 DNA 为模板，通过拟南芥花药开裂相关基因 *DAD1* 与油菜花药开裂相关基因 *BnDAD1* 序列进行比对，应用 PCR 技术克隆油菜花药开裂相关基因 *BnDAD1*。应用反义 RNA 手段，沉默相关基因，选择雄性不育的突变体，进而探求一条新型杂种优势利用体系的新途径。论文中详细介绍了有关 *BnDAD1* 克隆的相关技术，主要有培养基、感受态细胞的制备，基因组 DNA 的提取，DNA 片断的 PCR 扩增、核酸电泳等方面的内容。

关键字： 油菜；*BnDAD1*；基因克隆；PCR

拟南芥作为双子叶植物的模型，其生理生化机理在分子水平上得到人类前所未有的认识，而油菜和拟南芥同属十字花科，亲源关系非常相近。花药开裂是花药发育的最后一个阶段，过去认为花药开裂是一个普通的花药组织脱水过程。而最新的研究表明，在拟南芥中 *DAD1* 控制着花药按时开裂。破坏该基因的功能，将导致内源茉莉酸合成受到阻碍、花药开裂延迟、花粉不能及时受精而造成雄性不育。通过喷洒外源茉莉酸类激素可以恢复该突变体的结实，从而使雄性不育的突变体得以传代。

1. 实验技术与方法

1.1 DNA 的提取

1.1.1 DNA 提取方法：

以 Tapidor 和“宁油 7 号”为材料，采用“尿素法”提取 DNA。方法参考 Cell(1986)35:225-223.

1.1.2 DNA 纯度测定

本实验分别采用测定吸光值 (A260/A280, 好的 DNA 质量, 该比值应该在 1.80 左右) 和电泳法。

1.2 *DAD1* 和 *BnDAD1* 的序列获得及其比对

本实验分别利用软件方法 (Megalign) 和 NCBI 网站比对法对二者进行比较分析。

1.3 双元载体的构建以及引物设计

实验的目标是在 Ti 质粒 (pCambia1300 系统) 上构建 Pro*BnDAD1*_*BnDAD1*(反义)_*BnDAD1*(反义)_TNOS 这样的结构，用于转基因。引物设计如下表：启动子 1 为 GY-DAD1-P-1 和 GY-DAD1-P-2，启动子 2 为 GY-DAD1-P-3 和 GY-DAD1-P-2，编码区为 GY-DAD1-cDNA-1 和 GY-DAD1-cDNA-2。

Primer 名称	序列(5' to 3')
GY-DAD1-P-1	CCAAGCTTGACTTCACTGGCATGG
GY-DAD1-P-2	TCTAGAGGGAGAAGAGTGTGTGTC
GY-DAD1-P-3	AAGCTTTAGCAAACGACCAACGATGA
GY-DAD1-cDNA-1	GAGCTCATGAGATTCTCTCTTTCTCCC
GY-DAD1-cDNA-2	TCTAGAGTAGATACGTCTTCAGCTCGT

1.4 感受态细胞的制备

1.4.1 大肠杆菌培养基的制备过程

用 Sigma 公司提供的 LB、LB+Amp (100)、LB+Kan (50) 干粉参照其说明进行配制。

1.4.2 大肠杆菌感受态细胞的制备过程

用冰冷的 CaCl_2 处理 DH5 α 和 JM101 菌株的细胞壁 (所有的操作过程应尽量处于低温进行)。

1.4.3 培养基与感受态细胞的验证方法

将新鲜制作的 DH5 α , JM101 与 TV+AYAD1 (有 Amp 抗性), PME18 (有 Kan 抗性) 在 3 种培养基板上划线, 再用膜封好, 倒扣在 37 度恒温箱内一夜, 观察结果。

1.5 PCR 扩增

(1) 加样总体积为 25 μl : H_2O 17 μl , P1 1 μl , P2 1 μl , 5X PCR 5 μl , N2 1 μl

(2) 步骤: 1: 94 $^{\circ}\text{C}$, 2 min. 2: 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 sec. 3: 55 $^{\circ}\text{C}$, 90 sec. 4: 72 $^{\circ}\text{C}$, x min. (x=所扩序列的长度) 5: Goto step 2 , 32 个循环. 6: 72 $^{\circ}\text{C}$, 8 min. 7: 16 $^{\circ}\text{C}$ forever, 8: end

启动子 1 为 2935bp, 启动子 2 为 1398bp, 编码区为 1276bp。

1.6 电泳 (琼脂糖凝胶电泳)

1.7 从琼脂糖胶中分离 DNA (GFX 柱子)

2. 实验结果与分析

2.1 DNA 提取的结果与讨论

2.1.1 DNA 提取的结果

1. 测定吸光值判断法

T1 $A_{260}/A_{280}=1.3505$; T2 $A_{260}/A_{280}=1.7065$; N1 $A_{260}/A_{280}=1.4027$; N2 $A_{260}/A_{280}=1.8031$

从吸光值可以大致推出 N2, T2 质量好, N1, T1 质量欠佳。

2. 电泳法: 电压 100v , 时间 120 分钟

见图 (1) , 第 1 点样孔为 Marker, 第 2-5 点样孔分别为 T1 N1 T2 N2。

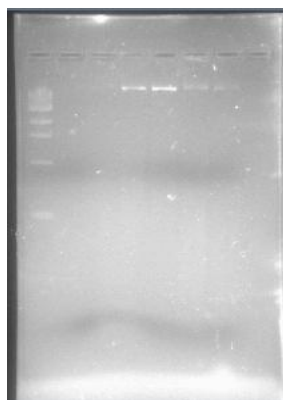


图 (1)

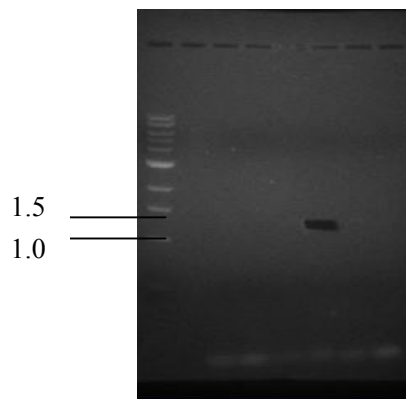


图 (2)

从图 (1) 中明显看出 N2, T2 质量好。

2.1.2 结论与分析

$A_{260}/A_{280}>1.8$, 有 RNA 污染; $A_{260}/A_{280}<1.8$, 样中还有蛋白质。

1.2 大肠杆菌与感受态细胞制备的结果

(1) 实验的结果: 在 LB 板上: DH5 α , JM1014 , PME 18, 3 个菌种都能生长繁殖; 在 LB+Amp100

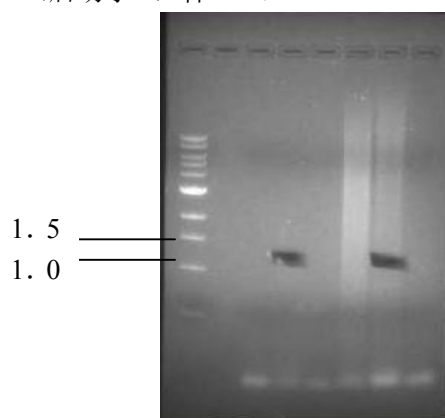
板上：没有菌株繁殖；在 LB+Kan50 板上：只有 PME18 能繁殖。

(2) 结果讨论：说明 TV+AYAD1 菌株失活，制作的培养基和感受态细胞是合格的。

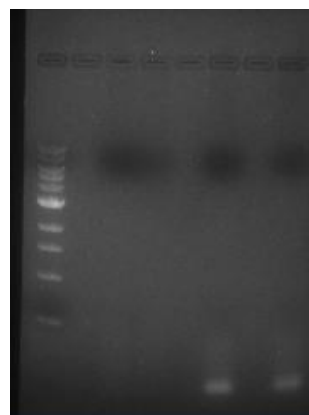
1.3 PCR 分离的结果

一. 第一次实验结果（普通 Taq 酶）

见图（2），第 1 点样孔为 Marker，3—8 点样孔分别为样 1（启动子 1）样 1' 样 2（编码区）样 2' 样 3（启动子 2）样 3'。



图（3）



图（4）

本次实验只扩出了样 2（*BnDAD1*）的编码区，且带比较暗，启动子区未能扩出。

二. 第二次实验（普通 Taq 酶）

见图(3)。将退火温度调为 52 度，循环数增加至 34。其余与上次实验相同。第 1 点样孔为 Marker，3—8 点样孔分别为样 1、2、3、4、5、6。样 4、样 5、样 6 在前 3 个的基础上多加 1ul Taq 酶。

本次实验只扩出了 *BnDAD1* 的编码区（样 2 和样 4），启动子区仍未能扩出，其中样 2 很亮，样 4 比较暗。样 4、样 5、样 6 有非特异性扩增，原因可能是 Taq 酶过多。

通过比较，可以得出 *BnDAD1* 编码区的扩增应选用第二次的方案。

三. 第三次实验（ACCU-Taq LA 酶）

见图（4），第 1 点样孔为 Marker，第 3、4 点样孔为样 1，第 6、8 点样孔为样 3。

从图（4）中看到样 3 形成了明显的二聚体，所以可能是引物造成启动子没有扩出。

3. 讨论

基因沉默是指生物体中特定基因由于种种原因不表达。常用的基因沉默手段有反义 RNA 和 RNA 干扰，本试验选用反义 RNA 手段沉默有关基因，选择雄性不育的突变体，探求一条新型杂种优势利用体系的新途径。RNAi 基因沉默效果往往更好，但因为 *BnDAD1* 基因没有内含子，不宜采用 RNAi 策略。实验中 *BnDAD1* 启动子部分的克隆未能实现，可能原因与拟采取的对策：退火和变性温度太高或太低；引物设计不好；退火和延长时间太短或太长；酶量、Mg²⁺浓度不太够；目标区段 GC 含量高等。

实验中启动子是否特异，转基因技术是否成熟以及转基因片段在油菜基因组插入位置和拷贝数目的剂量效应等方面的研究，有待于我们进一步的探索。

参考文献（略）