

水稻抗白叶枯病 T-DNA 插入突变体侧翼序列的分离和分析

乔枫¹ 赵开军² 耿贵工³ 陈志¹

1. 青海师范大学生命与地理科学学院, 西宁 810008; 2. 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081;
3. 青海省农林科学院作物育种栽培研究所, 西宁 810016

摘要 采用 PCR-walking 方法对水稻抗白叶枯病突变体 G48 的侧翼序列进行分析。通过特异性嵌套引物扩增和序列比对分析获得了该突变体 T-DNA 左、右边界侧翼序列, 确定 T-DNA 插入水稻日本晴第三染色体 clone OSJNBa0076E06 (AC132215.1) 位点上, 左、右边界插入位点分别位于该克隆的第 93 750、93 824 碱基处。PCR-walking 方法为 T-DNA 的侧翼序列分析提供了一种简单、高效的方法。

关键词 T-DNA 插入突变体; 水稻; PCR-walking; 侧翼序列

中图分类号 S 188 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)03-0001-07

植物产生突变体的方法主要有理化诱变、T-DNA 插入、转座子插入和逆转座子插入等^[1-4]。利用 T-DNA 随机插入水稻基因组来产生突变体, 并以 T-DNA 为标签分析突变性状和突变基因的方法得到了广泛应用^[5-8]。目前, 分析突变体 T-DNA 侧翼序列的方法主要有 3 种: 反向 PCR (inverse-PCR)^[9-11]、TAIL-PCR^[12-14] 和 PCR-walking 法^[15]。目前 PCR-walking 方法是实现从已知序列探知未知序列的较好方法, 应用该方法进行 DNA 大片段的测序已有研究报道^[15]。

本研究采用 PCR-walking 方法对 1 个水稻 T-DNA 插入抗白叶枯突变体 G48 的侧翼序列进行分析, 通过在 NCBI 中进行序列比对, 确定 T-DNA 插入的确切位置。

1 材料与方法

1.1 植物材料

水稻突变体 G48 和对照日本晴 (*Oryza sativa* L. *japonica* cv. *nipponbare*) 由中国农业科学院路铁刚研究员提供。

带有 T-DNA 的载体 pSMR-J18 见图 1, 载体中含有标记基因 *BoGUS*, 潮霉素磷酸转移酶基因 *HYG*。

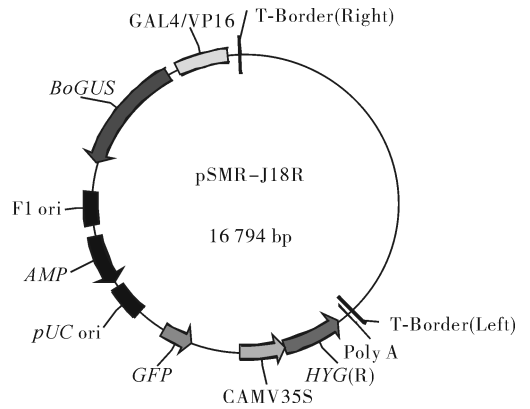


图 1 载体 pSMR-J18R 的结构

Fig. 1 Picture of vector pSMR-J18R

1.2 水稻白叶枯病抗性鉴定

水稻白叶枯病抗性鉴定采用人工剪叶法^[16]。在苗期用灭菌剪刀蘸取 10^9 个/mL 的 2 d 菌龄的白叶枯病鉴别小种 P6 (PX099) 菌液, 距叶尖 2~3 cm 处剪叶, 每株接种 5 片叶。接种 14 d, 调查植株对病菌的抗感反应, 记录病斑占叶片面积的百分率, 根据抗感反应的分级标准^[16]来分析植株的抗、感性。

1.3 DNA 的提取与 Southern 杂交

采用改良 CTAB 法提取水稻叶片基因组 DNA^[17], Southern 杂交采用 TaKaRa 试剂盒进行。

1.4 引物设计及 PCR 扩增

根据突变体载体 pSMR-J18R (图 1), 采用

收稿日期: 2012-07-25

基金项目: 教育部博士点基金项目(202500218)

通讯作者: 乔枫, 博士, 副教授。研究方向: 分子生物学与生物化学。E-mail: qiaofnm@163.com

primer 3.0 设计引物(表 1),引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

BoGUS 基因的 PCR 反应体系的总体积为 25 μL ,其中包含 150 ng 模板 DNA,0.2 mmol/L dNTPs,0.4 $\mu\text{mol/L}$ 引物 BoGUS-F,0.4 $\mu\text{mol/L}$ 引物 BoGUS-R,1 \times PCR Buffer (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 50 mmol/L KCl),2.5 mmol/L Mg^{2+} ,1.2 U *Taq* 酶(华美生物公司)。PCR 反应参数:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,然后进入 PCR 循环,即 94 $^{\circ}\text{C}$ 50 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 50 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,共进行 35 个循环,

最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

1.5 PCR-walking 方法

操作方法参照 Tissier^[18]和 Jeon 等^[19]的方法。

Adaptor 配备:接头(USBA,100 $\mu\text{mol/L}$)和接头(LSBA,100 $\mu\text{mol/L}$)等体积混合(序列见表 1),92 $^{\circ}\text{C}$ 变性处理 6 min 后,65 $^{\circ}\text{C}$ 20 min,自然冷却至室温退火,形成接头的不对称性,3'-末端的封闭氨基可以抑制第二轮的嵌套 PCR 反应的非特异性扩增,也可抑制 PCR 副反应发生。接头引物为 AP1 和 AP2(序列见表 1)。

表 1 引物和接头名称及序列

Table 1 Sequence of primers and adaptor

引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	在 pSMR-J18R 上的位置 Position in the pSMR-J18R
BoGUS-F	CCG TCC CAA GCA GTT ACA AT	14 461~14 480
BoGUS-R	CCG TCC CAA GCA GTT ACA AT-	15 030~15 049
LB1	GTC GAT GCG ACG CAA TCG TCC GAT C	6 772~6 796
LB2	GTC TGG ACC GAT GGC TGT GTA GAA G	6 698~6 722
LB3	GGT TTC GCT CAT GTG TTG AGC AT	6 524~6 546
RB1	GAC ACT CCC AGT TGT TCT TCA GAC	16 483~16 506
RB2	GAG GAC AGG AGC TTC ATT GTT GG	16 581~16 603
AP1	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGC	
AP2	CTATAGGGCTCGAGCGGC	
接头 USBA ¹⁾	CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC	CGCCCGGGGAGGT (1-44)
接头 LSBA ²⁾	ACCTCCCC- NH2	

1)接头 USBA 包括引物 AP1 部分序列(下划线)、AP2 全序列(框内) Adaptor USBA including partial sequence of primer AP1 (under line) and whole sequence of primer AP2 (in box); 2)接头 USBA 的 3'末端序列(阴影区域)和接头 LSBA 序列(阴影区域)成反向互补 3'ending sequence (shadow area) of adaptor USBA and adaptor LSBA sequence (shadow area) are reverse complement.

1.6 PCR 产物的回收、序列分析

PCR 扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,将特异片段回收(TaKaRa,DNA 片段凝胶回收试剂盒),连接到 pGEM[®]-T Easy Vector (Promega)载体,采用电激法转化至大肠杆菌菌株(*Escherichia coli*) DH5 α ,提取质粒 DNA (UltraPure[™] 质粒 DNA 小量提取试剂盒),酶切鉴定,选送 2 个阳性克隆进行测序(上海生工)。测定序列用 DNAssist 分析,并在 NCBI 网站进行 Blast 分析。

2 结果与分析

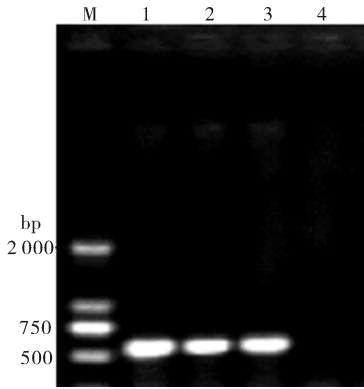
2.1 突变体白叶枯病抗性鉴定

日本晴对水稻白叶枯病菌 P6 表现为感病(病斑面积>30%),T-DNA 插入突变体有可能对白叶枯病菌的反应发生改变。水稻突变体 G48 种植于中国农科院作物科学研究所水稻温室,苗期接种结

果显示:T₀代突变体 G48 对 P6 抗病,病斑面积<10%;在 T₁代突变体 G48 群体发生明显的抗感分离,病斑面积<10%的有 12 株,病斑面积在 15%~60%的有 47 株, $n_{\text{抗病}}:n_{\text{感病}}=12:47$ 。

2.2 PCR 扩增和 Southern blot 鉴定

用所设计的引物组合 BoGUS-F/ BoGUS-R 对 T₀代水稻突变体 G48 基因组 DNA 进行 PCR 扩增,PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,发现有特异片段,片段长度与预期大小(580 bp)相符,结果见图 2,阴性对照日本晴没有扩增出条带,突变体 G48 有预期条带,表明突变体 G48 有 T-DNA 插入。对 T₀代突变体 G48 进行 Southern blot 检测,用 BoGUS 基因为探针进行杂交(图 3),结果表明:经 HindIII 酶切,对照 CK 日本晴没有杂交信号,G48 有 1 条带,杂交结果为 1 个拷贝。对 G48 突变体的 T₁代植株进行 BoGUS 基因的 PCR 扩增,抗病植株



M:DL-2000 marker; 1~3:G48; 4. 日本晴 Nippobare.

图 2 *BoGUS* 基因片段的扩增

Fig. 2 Fragment amplification of *BoGUS* gene

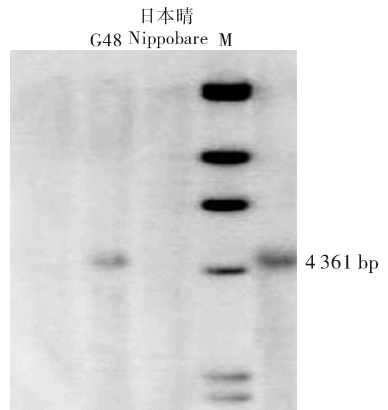
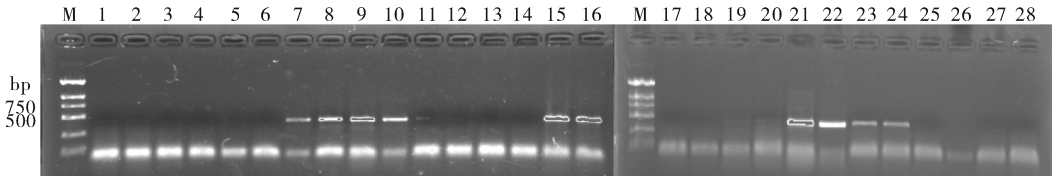


图 3 杂交结果

Fig. 3 Southern-blot results



M:DL-2000 marker; 1:无菌水; 2:日本晴; 3~6,11~14,17~20,25~28 为感病植株; 7~10,15~16,21~24 为抗病植株。M:DL-2000 marker; 1:ddH₂O; 2:Nippobare; 3-6,11-14,17-20,25-28 were susceptible plants; 7-10,15-16,21-24 were resistant plants.

图 4 T₁ 代水稻突变体植株的 *BoGUS* 基因扩增结果

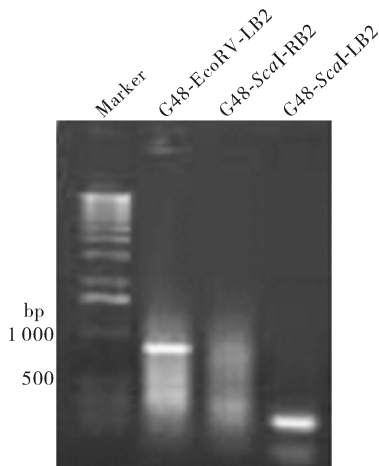
Fig. 4 Fragment amplification of *BoGUS* gene in T₁ mutant plants

有预扩带,感病植株没有预扩带(图 4)。

2.3 PCR-walking 结果

通过 PCR-walking 方法,通过嵌套引物扩增, T₁代抗病植株 G48-1 的第 2 次 PCR 扩增结果见图 5。选用 *EcoRV* 单酶切,用内套引物 AP2/LB2 扩增左边界序列,获得了约 900 bp 的条带,编号为 G48-*EcoRV*-LB2;*EcoRV* 单酶切右边界序列没有扩增出带,原因是在右边界没有该酶切位点。选用 *ScaI* 酶单酶切,用内套引物 AP2/LB2、AP2/RB2 分别扩增左、右边界序列,编号分别为 G48-*ScaI*-LB2、G48-*ScaI*-RB2,其中 G48-*ScaI*-RB2 带模糊,G48-*ScaI*-LB2 带清晰。将 2 条清晰的特异片段(编号为 G48-*EcoRV*-LB2 和 G48-*ScaI*-LB2)分别回收、连接 pGEM-T Easy Vector,选阳性克隆送上海生工测序。

测序结果显示:编号 G48-*EcoRV*-LB2(简称为 G48EcL)的侧翼序列有水稻序列,表明 T-DNA 侧翼水稻序列含有 *EcoRV* 酶切位点,但是侧翼载体序列不含有 *EcoRV* 酶切位点;G48-*ScaI*-LB2 是载体序列,没有水稻序列,可能原因是 T-DNA 侧翼水稻序列不含有 *ScaI* 酶切位点,但是侧翼载体序列含有 *ScaI* 酶切位点。G48EcL 测序结果为 1 116 bp



G48-*EcoRV*-LB2:*EcoRV* 单酶切,选用内套引物 AP2/LB2 第 2 次 PCR 扩增左边界序列;G48-*ScaI*-RB2:*ScaI* 单酶切,选用内套引物 AP2/RB2 第 2 次 PCR 扩增右边界序列;G48-*ScaI*-LB2:*ScaI* 单酶切,选用内套引物 AP2/LB2 扩增左边界序列;Marker 为 1 kb marker。G48-*EcoRV*-LB2:Left-bound second-amplification by inner primers AP2/LB2 with *EcoRV* restriction; G48-*ScaI*-RB2: Right-bound second-amplification by inner primers AP2/RB2 with *ScaI* restriction; G48-*ScaI*-LB2: Left-bound second-amplification by inner primers AP2/LB2 with *ScaI* restriction; Marker: 1 kb marker.

图 5 突变体 G48-1 的 PCR-walking 扩增结果

Fig. 5 PCR-walking result in mutant G48

(图 6), 其中 1~289 对应于突变体载体 pSMR-J18R 序列(6 722~6 435)序列; 在载体与水稻插入点丢失了左边界 109 bp 序列(6 326~6 434, 包括 LB 边界序列 26 bp); 序列 289~301 ATCTACTGC-

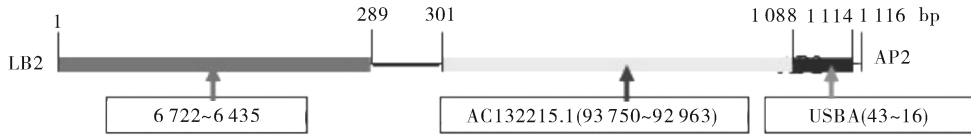


图 6 G48-EcoRV-LB2 序列

Fig. 6 Sequence result of G48-EcoRV-LB2

2.4 特异引物扩增突变体左右侧翼序列

根据水稻序列 AC132215.1 设计 2 条引物 JQ1 和 JQ2, 具体序列如下:

JQ1(F): 5'-TTC GAA AGC CTC CCT ACA AAG AGG-3'(AC132215.1:92 727~92 750)

JQ2(R): 5'-TCC CAG TCT CTG CAG GCA TAT GT-3'(AC132215.1:94 748~94 770)

其中引物组合 JQ1/LB2 扩增 G48-1 左侧翼序列, 预期片段大小约为 1 300 bp 左右; 引物组合 JQ2/RB2 扩增右侧翼序列, 预期片段大小约为 1 200 bp 左右。

为了更进一步确定预期目的片段大小, 同时选用 4 组嵌套引物即 JQ1/LB2、JQ1/LB3、JQ2/RB2 和 JQ2/RB1 对 G48-1 进行 PCR 扩增, 结果见图 7, PCR 扩增条带符合预期目标大小, 其中引物组合 JQ1/LB2 和 JQ1/LB3 的 PCR 产物相差 152 bp, JQ2/RB2 和 JQ2/RB1 相差 75 bp。

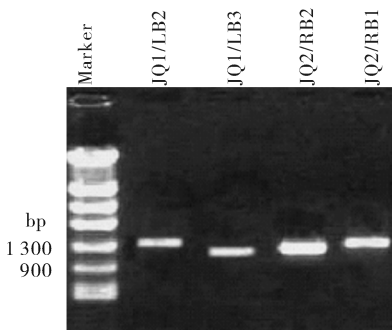


图 7 特异引物扩增 G48-1 T-DNA 左右侧翼序列

Fig. 7 T-DNA left and right flanking sequence of G48-1

将以上引物组合 JQ1/LB2 和 JQ2/RB2 的 PCR 产物进行测序。经 Blast N 分析比对序列, 完全符合预期结果。引物组合 JQ1/LB2 的测序结果

TAT 之间 12 bp 没有匹配上水稻或载体序列; 序列 301~1 088 对应于水稻 AC132215.1 (93 750~92 963); 序列 1 088~1 114 对应于接头 USBA (43~16)。

为 1 325 bp, 其中 1~289 序列对应于突变体载体 pSMR-J18R 序列(6 722~6 435)序列; 289~301 (ATCTACTGCTAT) 之间 12 bp 没有匹配上水稻或载体序列; 301~1 325 对应于水稻 AC132215.1 (93 750~92 727), 和上述 G48EcL 的序列分析完全一致, 进一步说明突变体 G48 中 T-DNA 插入水稻位点的正确性。

引物组合 JQ2/RB2 的测序结果为 1 217 bp, 见图 8, 其中序列 1~38 对应于载体 pSMR-J18R 右边界序列(16 583~16 620), 包括 RB2 引物序列; 序列 40~124 对应于载体 15 202~15 280 序列, 表明载体的前端序列插入了此位点; 序列 222~274 对应于载体 16 614~16 666, 插入点载体右边界缺失 68 bp (载体 16 667~16 734, 包括右边界 26 bp); 280~713 对应于水稻 AC132215.1 (93 824~94 257); 743~1 212 对应于水稻 AC132215.1 (94 287~94 765); 剩余序列没有比对上水稻或载体序列, 其中 274~280 为 TGTAT, 是载体和水稻的连接序列。

2.5 突变体 G48-1 中的 T-DNA 的具体插入位置

综上, 突变体 G48-1 的 T-DNA 左右边界插入位点见图 9。T-DNA 插入位于水稻 AC132215.1 上, 左、右边界插入位点分别位于水稻 AC132215.1 的第 93 750、93 824 碱基处, 而且外源基因的插入导致水稻缺失 73 bp (AC132215.1:93 751~93 823) 序列。经 Softberry FGENESH 预测两端序列的功能位点, G48-1 左边界位于 putative Avr9/Cf-9 elicited protein31 的上游 2 010 bp 处, T-DNA 的插入可能影响了 Avr9/Cf-9 诱导蛋白 31 的功能。G48-1 右边界位于细胞色素 P450 的下游 7 020 bp 处。在载体 pSMR-J18R 和水稻 AC132215.1 序列连接处

有少数核苷酸序列(与水稻和载体序列不匹配),载体左边界与水稻相连接处有 12 个核苷酸序列(ATCTACTGCTAT),且载体左边界缺失 109 bp

(pSMR-J18R :6 326~6 435);载体右边界与水稻相连接处有 5 个核苷酸序列(TGTAT),且载体右边界缺失 68 bp (pSMR-J18R:16 666~16 734)。

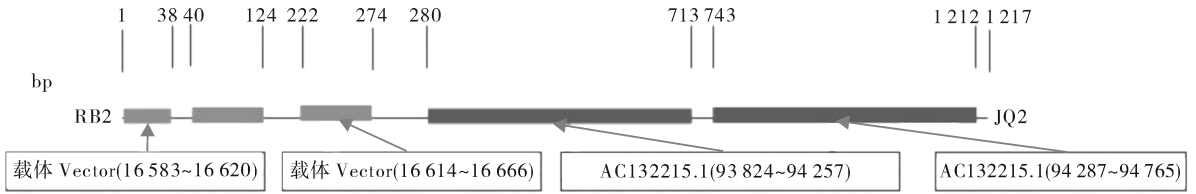


图 8 JQ2/RB2 序列分析结果

Fig. 8 Sequence result of JQ2/RB2

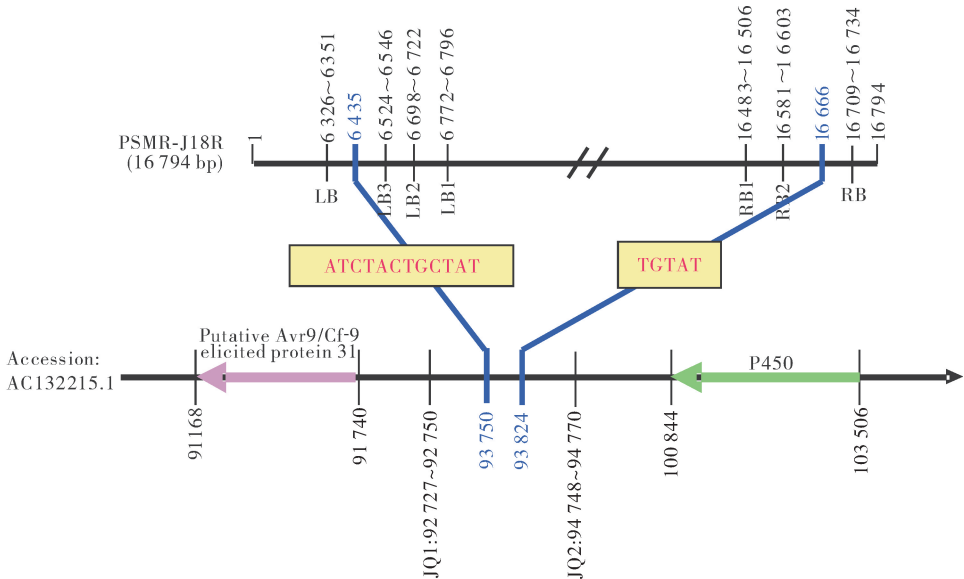


图 9 突变体 G48-1 的 T-DNA 左右边界插入位点

Fig. 9 T-DNA left and right border inserting site of mutant G48-1

3 讨论

已有研究证明,TAIL-PCR 方法能够高效地分离 T-DNA 标签的侧邻序列。马玉银等^[20-21]通过 TAIL-PCR 方法,获得 T-DNA 插入点侧翼的水稻基因组序列,并证实该侧翼序列与小粒矮突变性状共分离。侯雷平等^[22]采用 TAIL-PCR 成功扩增了转基因蓝猪耳 T-DNA 插入位点的侧翼序列,为利用 T-DNA 标签进行蓝猪耳基因克隆和功能分析提

供了实验技术上的保证。TAIL-PCR 是一种较为成熟的扩增 T-DNA 插入旁邻序列的技术,有许多优点:所需要的 DNA 模板量很少,且对 DNA 的纯度要求不高,在 PCR 扩增前不需要任何特殊的 DNA 操作(如限制性酶切、酶连等),PCR 产物可以直接用于测序。但 TAIL-PCR 方法也有缺陷:如整个 TAIL-PCR 需要一系列连续的反应,反应条件的设置要求比较精细,不是每次反应都有阳性结果,且需要的组合比较多等,需要多次调节 PCR 扩增

条件。

水稻 T-DNA 插入突变体的表型分析为水稻基因功能的研究提供了重要线索,突变体的侧翼序列分析将有助于分离重要农艺性状的相关基因。贾芝琪等^[23]采用 PCR-walking 方法,在番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 转基因植株中扩增出外源基因 Avr3a 的两翼序列,结果发现,外源基因的插入位点有 40 bp 的碱基缺失;最后利用侧翼序列和边界序列设计的引物,在转基因 T₀代植株中筛选出纯合单株,这些植株在 T₂代经验证确实为纯合单株。

本研究采用 PCR-walking 方法扩增 T₀代水稻突变体 G48 的 T-DNA 侧翼序列,结果显示 T-DNA 整合后两端出现缺失现象,载体左边界缺失 109 bp,右边界缺失 68 bp。载体 pSMR-J18R 在水稻 AC132215.1 上的插入位点处,缺失了 73 bp。PCR-walking 方法可以有效地分离 T-DNA 侧翼序列,将为水稻基因克隆和研究未知功能基因提供帮助;经酶切、接头连接、2 次 PCR 特异扩增的过程,大大提高了目的片段的扩增效率和特异性,成为分析植物 T-DNA 侧翼序列的有效方法。本研究报道的 PCR-walking 方法与其他方法如反向 PCR、TAIL-PCR 等相比,具有显著的优点:(1)扩增效率高、特异性好,不含侧翼序列的假阳性克隆比例低;(2)所需模板 DNA 量少,操作简便、快速,不需多次调节 PCR 反应体系就可得到 PCR 结果,而 TAIL-PCR 法需反复调节 PCR 反应体系才能得到稳定的 PCR 结果;(3)PCR-walking 法操作程序较成熟,接头和载体引物可通用,适用于同时处理大批量样品。不过,PCR-walking 方法也存在一定的缺陷,需要多种限制性内切酶切割后进行 PCR 扩增。但总体上,PCR-walking 不失为一种简便高效的基因克隆方法,尤其在后基因组时代作为分离突变体插入标签侧翼序列的有效方法,值得推广。

参 考 文 献

- [1] RAMACHANDRAN S, SUNDARESAN V. Transposons as tools for functional genomics[J]. *Plant Physio Biochem*, 2001, 39: 243-252.
- [2] AZPIROZ-LEECHAN R, FELDMANN K A. T-DNA insertion mutagenesis in *A. thaliana* going back and forth[J]. *Trends Genet*, 1997, 13: 152-156.
- [3] NILS K, GUNNAR H, ANDREAS K, et al. GABI-kat simple search: new features of the *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutant database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40: 1211-1215.
- [4] 谭秀明, 陈雪凤, 林敏怡, 等. 水稻基腐细菌 Tn5 插入突变体库的构建及其致病相关突变体的筛选[J]. *华中农业大学学报*, 2012, 31(2): 193-198.
- [5] SHA Y, LI S, PEI Z, et al. Generation and flanking sequence analysis of a rice T-DNA tagged population[J]. *Theoretical & Applied Genetics*, 2003, 108 (2): 306-314.
- [6] GUIDERDONI E, AN G, YU S M, et al. T-DNA insertion mutants as a resource for rice functional genomics [M]//UP-ADHYAYA N M. *Rice functional genomics*. New York: Springer-Verlag New York Inc, 2007: 181-221.
- [7] 李雪梅, 何宗顺, 余四斌, 等. 水稻穗形态建成基因 *PMM 1* 的遗传分析与初步定位[J]. *华中农业大学学报*, 2012, 31(1): 10-15.
- [8] 裴荣, 陆展华, 姚家玲. 批量筛选水稻 T-DNA 插入突变体库获得生殖发育相关突变体[J]. *华中农业大学学报*, 2012, 31(2): 133-138.
- [9] KIM S R, JEON J S, AN G. development of an efficient inverse PCR method for isolating gene tags from T-DNA insertional mutants in rice[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2011, 678: 139-146.
- [10] 杨坤, 吴学龙, 朗春秀, 等. 优化反向 PCR 法分离转基因油菜外源 T-DNA 侧翼序列的研究[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(10): 5002-5005.
- [11] 张静, 刘菊华, 徐碧玉, 等. 东方百合 T-DNA 插入突变株侧翼序列的分离及分析[J]. *热带作物学报*, 2010, 31(12): 2142-2146.
- [12] LIU Y G, CHEN Y L, ZHANG Q Y. Amplification of genomic sequences flanking T-DNA insertions by thermal asymmetric interlaced polymerase chain reaction[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2004, 286: 341-348.
- [13] SINGER T, BURKE E. High-throughput TAIL-PCR as a tool to identify DNA flanking insertions[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2003, 236: 241-271.
- [14] 魏进招, 陈秋玲, 裴忠有, 等. 水稻 T-DNA 插入群体的建立及侧邻序列的获得与分析[J]. *华北农学报*, 2011, 26(1): 31-36.
- [15] COTTAGE A, YANG A, MAUNDERS H, et al. Identification of DNA sequences flanking T-DNA insertions by PCR-walking [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2001, 19(4): 321-327.
- [16] 章琦, 王春连, 施爱农, 等. 野生稻抗稻白叶枯病性 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 的评价[J]. *中国农业科学*, 1994, 27(5): 1-9.
- [17] MURRAY M G, THOMPSON W F. Rapid isolation of high molecular weight DNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 1980, 8: 4321-4325.
- [18] TISSIER A. Multiple independent defective suppressor-mutator transposon insertions genomics in rice[J]. *Plant J*, 2000, 22: 561-570.
- [19] JEON J S, LEE S, JUNG K H, et al. T-DNA insertional muta-

- genesis for functional in *Arabidopsis*; a tool for functional genomics[J]. *Plant Cell*, 1999, 11: 1841-1852.
- [20] 马玉银, 张亚芳, 潘存红, 等. 水稻小粒矮突变性状与 T-DNA 插入标签的共分离检测[J]. *中国水稻科学*, 2008, 22(6): 571-577.
- [21] 马玉银, 李磊, 张亚芳, 等. 一个水稻小粒矮突变体的候选基因分析[J]. *扬州大学学报: 农业与生命科学版*, 2009, 30(2): 45-49.
- [22] 侯雷平, 王小菁, 李洪清, 等. 应用 TAIL-PCR 扩增蓝猪耳 T-DNA 侧翼序列[J]. *应用与环境生物学报*, 2009, 15(6): 871-874.
- [23] 贾芝琪, 张忠华, 崔艳红, 等. 利用外源基因侧翼序列扩增筛选番茄纯合转基因植株木[J]. *农业生物技术学报*, 2009, 17(5): 820-824.

Isolation of flanking sequence and analysis of a rice resistant blight bacteria mutant inserted by T-DNA

QIAO Feng¹ ZHAO Kai-jun² GENG Gui-gong³ CHEN Zhi¹

1. *Institute of Life and Geography Sciences, Qinghai Normal University, Xining 810008, China;*
2. *Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;*
3. *Institute of Crop Breeding and Cultivation, Qinghai Academy of Agriculture and Forestry, Xining 810016, China*

Abstract The flanking sequence of a rice T-DNA inserted mutant G48 with a blight bacteria resistance was analyzed via PCR-walking. Results showed the T-DNA was inserted into the clone OSJNBa0076E06 (chromosome 3, AC132215.1) in *Oryza sativa* L. *japonica* cv. *nipponbare*. The left and right border of T-DNA inserted was 93750th and 93824th nucleotide of OSJNBa0076E06, respectively. PCR-walking provided a simple and effective method for analyzing flanking sequence of T-DNA insertion.

Key words T-DNA inserted mutant; rice (*Oryza sativa* L.); PCR-walking; flanking sequence

(责任编辑:张志钰)