

以 PCR 鉴定转基因植株的 微量 DNA 提取方法

①
巩振辉¹ Cecchini E² Milner J J² Cecchi, E

(1 西北农业大学园艺系, 陕西杨陵 712100)

(2 Institute of Biomedical & Life Science, Glasgow University, Glasgow, G12 8QQ UK)

A
摘要 报道了将 Dr Marc Zabeau 的 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 技术中的 DNA 提取方法用于以 PCR (Polymerase Chain Reaction) 技术鉴定转基因植物——拟南芥、烟草和芜菁中。该方法需约 1 h 可完成植物 DNA 的提取, 样品用量仅为 30~100 mg, 产量可达 30~80 μg/g。粗提 DNA (溶于 10 μL TE 缓冲液) 不必经过纯化, 用 TE 缓冲液稀释 5~10 倍即可直接用于 PCR 分析。在拟南芥、烟草和芜菁转基因植物鉴定中应用表明这一方法是目前以 PCR 法鉴定转基因植株 T₁ 代单株幼苗的一种简便、快速、有效的方法。

关键词 DNA 提取方法, PCR 分析, 转基因植株鉴定, 拟南芥, 烟草, 芜菁

中图分类号 S603.5

在植物基因转移与表达研究中, 需要对经转化处理的幼苗进行分子检测, 以尽早淘汰未含目标基因的非转化植株。此外, 一种新的基因转移方法——真空渗入法亦要求对大量的 T₁ 代单株幼苗进行分子检测^[1]。选择标记基因 (如新霉素磷酸转移酶基因、氯霉素乙酰转移酶基因和潮霉素磷酸转移酶基因等) 和报告基因 (如 β-葡萄糖苷酸酶基因和荧光素酶基因等) 已广泛应用于转化植株和组织的筛选, 但在一些情况下, 这种筛选效果不可靠^[2~4]。由于 PCR (聚合酶链式反应) 技术的发展, 使得人们仅利用微量植物基因组 DNA 在体外可大量扩增目标基因, 然而目前缺乏与 PCR 相配套的转基因单株微量 DNA 提取方法。许多植物 DNA 大量或小量提取方法需要样品较多, 提取时间较长及复杂的纯化程序均不适用以 PCR 检测转基因植株^[5~10]。笔者在 Dr Marc Zabeau 的 AFLP 技术的基础上^[11], 建立了与 PCR 相配套的转基因单株微量 DNA 提取方法, 并在拟南芥、烟草和芜菁转基因植株检测试验上取得了令人满意的结果。

1 单株微量 DNA 提取程序

① 将待检测转基因植株放入暗室 (20±2℃) 2~3 d 后, 采集叶样 (拟南芥 1~4 片幼叶, 烟草、芜菁各 30~100 mg 幼叶) 装入 1.5 mL 的离心管 (Eppendorf), 注入液氮, 用装有塑料钻头的电钻将样品研至细粉末。将装有制备样品的离心管放入冰块中备用。

② 给装有样品的离心管中加 750 μL 抽提缓冲液, 离心管加盖后迅速上下摇动几次, 使样品与抽提缓冲液充分混匀, 然后将离心管置于 65℃ 的水浴中保温 8~10 min。

提缓冲液: 50 mmol/L Tris HCl (pH8.0), 10 mmol/L EDTA (pH8.0), 100 mmol/L

NaCl, 1.0% SDS(w/v), 10 mmol/L β -巯基乙醇(使用前 2 min 以内加入)。

③加 150 μ L 5 mol/L 乙酸钾, 轻缓地上下摇动混匀, 冰浴 15~20 min, 4℃下 13 000 r/min 离心 10 min。

④将 800 μ L 上清液转入一个新的离心管, 加入等体积(800 μ L)异丙醇。在 4℃下 13 000 r/min 离心 2 min, 使核酸沉淀。可能会有少量叶组织混入核酸, 下一个步骤⑤会除去这些叶组织。

⑤用 75%乙醇清洗后干燥, 悬浮在 200 μ L 无菌蒸馏水中。4℃下 13 000 r/min 离心 2 min, 使残余的叶组织沉淀在离心管底部。用移液管吸取 180 μ L 上清液转入另一个新的离心管, 再加入 20 μ L 3 mol/L 的乙酸钾。充分混匀后加 500 μ L 无水乙醇, 上下摇动数次后置-70℃ 5 min 或-20℃ 10 min 以上。在 4℃下 13 000 r/min 离心 5 min 使核酸沉淀。这一步骤会完全除去④所残留的叶组织。

⑥用 75%乙醇冲洗核酸, 在真空干燥器或实验台上干燥核酸。将核酸溶于 10 μ L TE 缓冲液。

TE 缓冲液 10 mmol/L Tris HCl(pH7.5~8.0), 1 mmol/L EDTA(pH8.0)。

2 结果与讨论

用分光光度计测定, DNA 的产量为: 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) 30~50 μ g/g, 烟草(*Nicotiana tabacum*) 35~38 μ g/g, 芜菁(*Brassica campestris* spp. *rapifera*) 50~80 μ g/g。

未经 RNase 消解和纯化的粗提 DNA 原液(图 1G)或用 TE 缓冲液稀释 1~3 倍(图 1B, C, D)后进行扩增均未获得扩增 DNA 带, 但当粗提 DNA 原液稀释至 5 倍或 10 倍(图 1E, F)获得了较高产量的目标基因扩增片段。其原因可能是抽提 DNA 原液或将其稀释 1~3 倍后, 模板 DNA 中杂质浓度较高, 阻碍了 PCR 反应中聚合酶的合成作用。而当抽提 DNA 原液稀释 5 倍或 10 倍, 模板 DNA 中杂质浓度相对较低, 对聚合酶的合成作用影响极小或没有影响, 聚合酶链式反应正常, 扩增出了目标基因。这一结果表明, 利用单株微量 DNA 提取程序获得的 DNA 经稀释后, 可直接用于转基因植株单株 PCR 检测。从而, 省去了以纯化模板 DNA 进行 PCR 检测中, DNA 纯化的繁琐程序, 提高了转基因植株单株 PCR 检测的工作效率, 节省了人力和物力。

抽提 DNA 中主要杂质为碳水化合物, 如果按提取程序中①的方法在采样前将取样

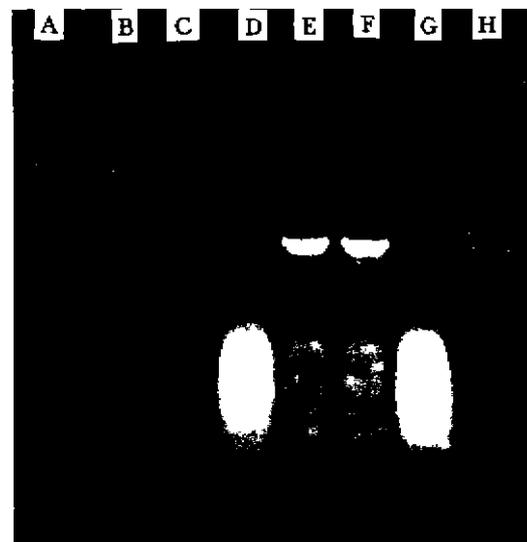


图 1 以 PCR 检测将 CaMV 基因 VI 导入拟南芥的转基因植株

A. 用限制性内切酶 KpnI 和 XbaI 双酶切 pJ0530::BJ1 GVI; B, C, D, E, F 和 G 分别表示抽提 DNA 原液稀释 3, 2, 1, 5, 10 和 0 倍; H 为 1 kb DNA 标样。

植株在暗室放置 2~3 d,可以大大降低叶片中可溶性碳水化合物的含量,从而可提高提取 DNA 的纯度。

图 2 表明,单株微量 DNA 提取程序获得的核酸,不仅含有足够的 DNA 可满足 PCR 检测中对模板 DNA 的需求,而且获得了较高产量的 DNA,笔者用其进行 Northern 杂交亦获得了 CaMV 基因 VI 的杂交带。因此,单株微量 DNA 提取程序也可作为植物 RNA 分离的一个新方法。

利用单株微量 DNA 提取程序获得的拟南芥叶片的 DNA 含量远远高于整个植株和胚轴(图 2)。虽取样部位的差异造成 DNA 提取产量的差异,但对于以 PCR 法检测转基因植株来说,供试不同取样部位所获得的 DNA 远远高于 PCR 扩增所需模板 DNA 的量。然而,就单株微量 DNA 提取程序本身来讲,建议最好采用叶片作为样品。

值得指出的是,为了提高 DNA 产量,在整个提取过程中,一是要避免机械振动过剧烈而造成 DNA 断裂降解;二是要避免 RNase 及 DNase 污染。RNase 污染本身虽不能降低 DNA 产量,但由于在 DNA 微量提取中,核酸含量愈低,愈难操作。因此,在提取过程中,要始终带手套,抽提缓冲液及用品要高压灭菌,植株材料要清洗干净。

目前,现有的植物基因组 DNA 提取方法较多^[6~10],然而这些方法均需用大量的植物组织、昂贵的化学药品及较长的提取时间,而且多数方法涉及复杂的 DNA 纯化程序。正因为如此,许多学者难以在转基因植株 T₁ 代幼苗期采集足够量的样品(尤其对于一些生物学产量小的植物)用于 PCR 检测,而不得不在 T₁ 代的成株期或 T₂ 代进行,从而造成人力、物力的浪费。单株微量 DNA 提取程序则较好地克服了现有方法的弊端,而且在整个提取过程中,一个样品仅需 3 个离心管(eppendorf),即可进行转基因植株的 PCR 检测。笔者在拟南芥、烟草和芜菁转基因植株数百个样品试验表明,这一程序简便、快速、有效,大约 1 h 可同时完成 12 个转基因植株样品 DNA 的微量提取,供 PCR 检测之用。

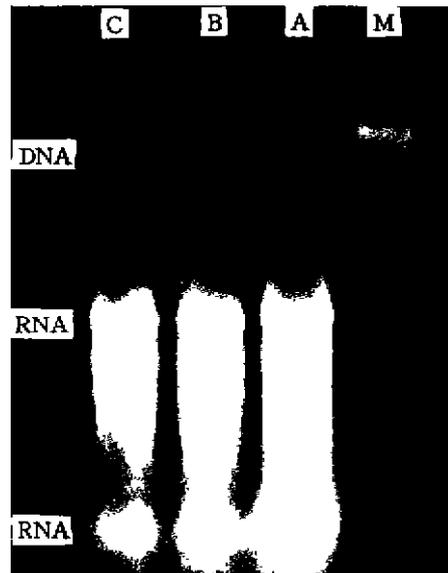


图 2 从拟南芥转基因植株微量制备核基因组 DNA

A、B 和 C 分别表示核酸提取样品为叶,整个植株和胚轴;M, DNA 分子标样,用 Hind III 消解 λ DNA,

参 考 文 献

- 1 巩振辉, Milner J J. 拟南芥基因转移新方法——真空渗入法的研究. 西北植物学报, 1996, 16(3): 209~215
- 2 De B M, Herrera E, Van M M et al. Expression of foreign genes in regenerated plants and in their progeny. EMBO J, 1984, 3: 1681~1689

- 3 Van den Elzen P J M, Tow send J, Lee K Y et al. A chimaeric hygromycin resistance gene as a selectable marker in plant cells. *Plant Mol Biol*, 1985, 5: 299~302
- 4 Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants, GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep*, 1987, 5: 387~405
- 5 Henvy A E. PCR technology, principles and application for DNA amplification. Stockton: Stockton Press, 1993, 1~30
- 6 Bendich A J, Anderson R S, Ward B L. Plant DNA, long, pure and simple, genome organization and expression. New York, Plenum Press, 1980, 31~33
- 7 Dellaporta S L, Wood J, Hicks J B. A plant DNA miniprep, version 1. *Plant Mol Biol Rep*, 1983, 1: 19~21
- 8 Murray H G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Res*, 1980, 8: 4321~4325
- 9 Taylor B, Powell A. Isolation of plant DNA and RNA. *Focus*, 1982, 4: 4~6
- 10 Paula P C, Roger F D, Jerry L S. Using polymerase chain reaction to identify transgenic plants. In, Gelvin S B ed. *Plant Molecular Biology Manual*. Printed in Belgium, Kluwer Academic Publishers, 1991, C3: 1~28
- 11 Marc Z. Amplified fragment length polymorphism technology, European. European Patent Application 92402629. 7 1993-05-03

A New Method of DNA Extraction for Identification of Transgenic Plants with PCR

Gong Zhenhui¹ Cecchini E² Milner J J²

(1 Department of Horticulture, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi, 712100)

(2 Institute of Biomedical & Life Sciences, Glasgow University, Glasgow, G12 8QQ, UK)

Abstract A DNA isolation method developed by Dr Marc Zabeau for the AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) technology to identify transgenic plants (*Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum* and turnip) with PCR was reported. The total time for the extraction procedure of the method was approximately an hour. Samples (rosette leaves or tissue) needed were only 30~100 mg and DNA yield could reached 30~80 $\mu\text{g/g}$. The crude isolation DNA (dissolved in 10 μL of TE buffer) does not need to be purified and could be directly used to PCR analysis after being diluted to 5~10 times. The application shows this method is convenient, quick and effective in identifying individual T₁ seedling of transgenic plants with PCR.

Key words DNA extraction, PCR assay, identifying transgenic plant, *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, turnip