

卡那霉素叶片涂抹法筛选转基因大豆植株的有效性*

刘 斌^{1,2}, 吴 迪², 侯文胜^{1,2}

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 中国农业科学院 作物科学研究所, 北京 100081)

[摘 要] 以吉林小粒1号大豆为材料进行卡那霉素梯度涂抹试验, 确定卡那霉素筛选的最佳浓度和筛选临界观察时间, 并在此基础上, 对转基因大豆植株(含 $np\ t\ II$ 基因)分离后代进行卡那霉素涂抹检测和PCR检测, 检验2种方法的符合度。结果表明, 卡那霉素的最佳筛选浓度为500 mg/L, 观察时间以3 d为宜; 抗和高抗卡那霉素植株2种检测方法的符合度为90.8%, 感和高感卡那霉素植株的符合度为87.1%。可见, 卡那霉素叶片涂抹法完全可以用于大豆转基因植株的快速筛选。

[关键词] 大豆; 转基因植株; PCR; 卡那霉素

[中图分类号] S52 035 3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)12-0079-04

随着植物转基因研究的不断深入和规模化水平的不断提高, 对转基因植株的快速、大规模筛选提出了新的要求。为了便于选择, 大多数研究通常利用标记基因与目的基因的连锁关系, 通过检测标记基因的存在, 间接证明目的基因的存在。

目前, 在用于转基因植株筛选的多种遗传选择标记基因中, 仍以 $np\ t\ II$ 基因应用最为广泛, 其编码产物——氨基糖苷磷酸转移酶(NPT II)^[1], 可使氨基糖苷类抗生素(如卡那霉素、新霉素等)发生磷酸化而失活, 从而使植物产生相应的抗生素抗性, 因此可以利用卡那霉素对转化植株进行筛选^[2]。但这种筛选方法多用于组织培养阶段, 获得再生植株后应用该法筛选的研究报道较少。利用PCR技术扩增目的基因片段, 通常是获得再生植株后采用的筛选方法, 据此可初步检测目的基因是否存在于植株中。但这种方法工作量大, 难以实现规模化检测, 不便对大量转基因植株或后代分离群体进行规模化筛选, 因此建立转基因植株的田间快速筛选方法已越来越受到重视。

卡那霉素田间涂抹快速筛选转基因植株的方法, 在转基因棉花研究中已有很多报道, 技术相对较为成熟^[3], 但在转基因大豆植株筛选方面尚未见报道。为此, 本研究借鉴棉花中的研究成果, 探讨了卡

那霉素叶片涂抹法在转基因大豆植株田间快速筛选中的具体应用方案, 并比较了其检测结果与PCR检测结果的符合度, 探讨了其有效性和可靠性, 为实现田间转基因大豆的快速检测奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为受体大豆品种吉林小粒1号(*Glycine max* [L.] Merr. cv. Jilinxiaoli No. 1)和本课题组在突变体库构建研究中获得转基因大豆植株(含 $np\ t\ II$ 基因), 这些转基因植株的目的基因尚未纯合, 试验材料种植于中国农科院北圃场试验田。硫酸卡那霉素购自北京拜尔迪生物公司。

据 $np\ t\ II$ 基因序列设计1对特异引物^[4], 上游: 5'AAA TCT CGT GAT GGC AGG TTG G-3'; 下游: 5'GAT GGA TTG CAC GCA GGT TC-3'。引物由北京三博远志生物技术有限责任公司合成。

1.2 大豆卡那霉素叶片涂抹筛选浓度和观测时间的确定

1.2.1 叶片变色反应标准的划分 参照朱加保等^[5]的方法, 以叶片变黄程度为标准, 对涂抹卡那霉素后叶片的反应进行分级: 处理部位不变色, 记为I级; 处理部位稍有失绿, 呈现差异, 记为II级; 处理部

* [收稿日期] 2005-11-25

[基金项目] 国家“973”项目(2002CB111301-3)

[作者简介] 刘 斌(1981-), 男, 甘肃庆阳人, 在读硕士, 主要从事植物遗传学研究。

[通讯作者] 侯文胜(1969-), 男, 北京房山人, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事植物基因工程研究。

位失绿与正常叶色差异明显,记为Ⅲ级;处理部位严重失绿,叶色转白,记为Ⅳ级(图1)。

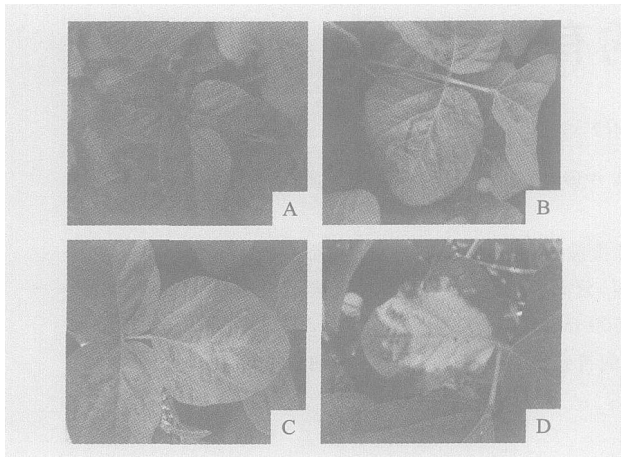


图1 卡那霉素处理大豆叶片反应分级标准
A. I级反应;B. II级反应;C. III级反应;D. IV级反应

Fig 1 Reaction standard of the leaves
under different Km concentrations

a. I degree; B. II degree; C. III degree; D. IV degree

1.2.2 卡那霉素筛选浓度及观察时间的确定 以转基因受体大豆吉林小粒1号为材料,借鉴朱加保等^[5]的方法进行试验,田间试验采用随机区组设计,每处理重复3次,每重复10株,挂牌标记。将卡那霉素分别配制成50,200,400,500,600和800 mg/L的溶液,用毛笔涂抹于植株的第一片新生三出复叶上,以湿润为准,处理后每天观察记录叶片的反应情况,以确定卡那霉素筛选浓度和观察时间。

1.3 大豆转基因植株后代的卡那霉素叶片涂抹和PCR检测

1.3.1 卡那霉素叶片涂抹检测 以500 mg/L浓

度的卡那霉素对转 $np\ t\ II$ 基因的转基因大豆植株后代进行叶片涂抹检测,第3天观察,记录。

1.3.2 PCR检测 (1)大豆DNA的提取。参考王晓丹等^[6]报道的CTAB方法并略做改动。取约0.1 g大豆幼嫩叶片,液氮研磨后加入65 预热的CTAB提取缓冲液(含体积分数1% β 巯基乙醇),65 温浴30 min,12 000 r/min离心10 min。取上清液,加入500 μ L V(酚) V(氯仿)=1 1的抽提液抽提,12 000 r/min离心10 min。取上清液,加入Rnase 37 温浴30 min,再加入与上清液等体积的V(酚) V(氯仿) V(异戊醇)=25 24 1抽提液抽提,12 000 r/min离心10 min。取上清液,加入3/4体积的异丙醇,室温放置30 min,沉淀核酸,12 000 r/min离心10 min。收集沉淀,用体积分数为70%乙醇洗涤沉淀,沉淀在超净台上风干后,加50 μ L 无菌超纯水溶解。(2)PCR反应和电泳检测。25 μ L反应体系中含大豆基因组DNA 100 ng,上、下游引物各0.2 μ mol/L, dNTP 200 μ mol/L, Taq 酶0.75 U和2.5 μ L 10 $\times$ PCR Buffer,加ddH₂O至25 μ L。PCR反应程序为94 预变性5 min;94 变性1 min,59 退火45 s,72 延伸30 s,循环次数为30次;最后72 延伸10 min。PCR反应产物用10 g/L琼脂糖凝胶水平电泳进行检测,用UVP成像系统照相。

2 结果与分析

2.1 卡那霉素的筛选浓度及观察时间

不同浓度卡那霉素对转基因大豆叶片变色反应的影响结果见表1。

表1 不同浓度卡那霉素处理后转基因大豆叶片的反应级数
Table 1 Impairing degree to leaves under different Km concentrations

卡那霉素浓度/ (mg · L ⁻¹) Km concentration	反应级数 Impairing degree						
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
50	I	I	I	I	I	I	I
200	I	I	I	I	I	I	II
400	I	II	II	II	II	II	III
500	II	II	III	III	III	III	IV
600	II	III	IV	IV	IV	IV	IV
800	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV

注:反应级数按重复中≥80%植株反应级别进行归类。

Note: It is classified when there are more than 80 percent plants have the same reaction degree

由表1可知,当筛选浓度≤200 mg/L时,随着反应时间的延长叶片颜色几乎无变化,主要呈现I级反应;当筛选浓度为400 mg/L时,大豆叶片对卡那霉素的反应随时间的延长变化不明显,主要表现

为II级反应,因此若以此浓度进行筛选,会增加假阳性单株的数量,影响选择的效果;当卡那霉素浓度≥600 mg/L时,叶片颜色迅速变黄,甚至枯死。因此以500 mg/L作为临界筛选浓度较为理想,在该筛选

浓度下, 叶片失绿明显, 且随着筛选时间的延长反应级明显升高, 便于区分和观察。由表1还可看出, 除50, 200, 800 mg/L 处理随着时间的延长叶片反应无明显变化外, 其他浓度处理, 1~3 d 反应级持续增高, 3 d 后基本趋于稳定, 故观察时间以3 d 为宜。

2.2 大豆转基因植株后代的卡那霉素叶片涂抹和PCR 检测结果

2.2.1 卡那霉素叶片涂抹检测 共筛选转基因植株后代257株, 其中I级反应34株, 记为高抗; II级反应161株, 记为抗; III级反应37株, 记为感; IV级反应25株, 记为高感。

2.2.2 PCR 检测 部分植株检测结果见图2, 在检测的257株转基因植株后代中, 185株表现为PCR阳性。卡那霉素叶片涂抹试验中对卡那霉素高抗的所有植株PCR检测均为阳性, 161株抗性材料中有143株为PCR阳性, 62株感和高感材料中有8株为PCR阳性。

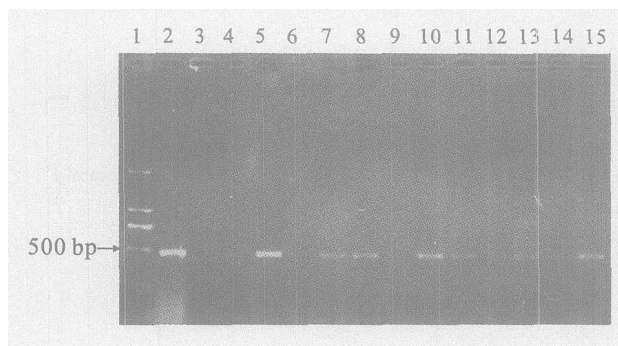


图2 部分转基因大豆植株PCR 检测结果

1 DL 2000 DNA 标样; 2 阳性对照;
3 阴性对照; 4 水对照; 5~15 检测植株

Fig. 2 Result of partial transgenic
soybeans PCR detection

1 Marker DL 2000; 2 CK⁺; 3 CK⁻;
4 Water; 5-15 Transformed plants

2.3 卡那霉素涂抹与PCR 检测差异及符合度分析

综合分析卡那霉素叶片涂抹和PCR 检测的结果(表2)可知, 对卡那霉素表现高抗的I级反应植株, PCR检测阳性率为100%;表现抗的II级反应植株, PCR检测阳性率为88.8%;表现感的III级反应植株, PCR检测阳性率为16.2%;高感的IV级反应植株, PCR检测阳性率为8.0%。在对卡那霉素表现高抗和抗性的植株(反应I~II级)中, 卡那霉素叶片涂抹检测结果与PCR检测结果的符合度为90.8%, 2种方法差异不显著;表现感和高感的植株(反应III~IV级)中, 卡那霉素涂抹检测结果与PCR检测结

果的符合度为87.1%。这些结果表明, 卡那霉素叶片涂抹法完全可以用作转基因大豆植株(含 $np t II$ 基因)的快速筛选, 其检测结果与PCR检测结果具有较好的一致性。

表2 转基因大豆植株卡那霉素叶片涂抹
与PCR 检测筛选结果的比较

Table 2 Results of smearing Km on
leaves and PCR detection

卡那霉素检测 Kanamycin treatment		PCR 检测阳性 植株数 No. of positive plants	PCR 检测阳性 植株率/% The ratio of positive plants
分级 Degree	植株数 No.		
I级	34	34	100.0
II级	161	143	88.8
III级	37	6	16.2
IV级	25	2	8.0

3 讨 论

卡那霉素是目前基因工程中广泛使用的选择用抗生素, 其对植物细胞的毒性机理是干扰细胞叶绿体及线粒体的蛋白质合成, 最终导致植物细胞死亡, 而含有 $np t II$ 基因的转基因植株由于可以合成氨基糖苷磷酸转移酶, 使卡那霉素的氨基糖苷发生磷酸化而失活, 从而抑制了卡那霉素对植株的伤害作用^[7], 因此通过卡那霉素涂抹大豆叶片来筛选大豆转基因植株, 从理论上是可行的。

在本试验中作者发现, 影响卡那霉素处理效果的因素很多。首先, 大豆叶片对卡那霉素存在一定的抗性, 因此只有选择超过大豆自身抗性范围的处理浓度, 才能进行有效的筛选。另外, 由于卡那霉素并不影响植株核基因组蛋白的正常表达^[8], 因此植株对卡那霉素处理表现出一定的滞后效应, 一般在3 d以后反应明显加剧。其次, 叶片生长的不同状态对卡那霉素处理结果有很大影响, 新展开的叶片对卡那霉素较敏感, 越老的叶对其抗性越强, 由于大豆个体间新展开叶发育状态很不一致, 往往给检测工作带来误差, 因此应以新生的三出复叶为检测对象, 并适当提高卡那霉素处理浓度, 以提高选择的准确性。再次, 不同生育时期的新展叶对卡那霉素的抗性表现也不同, 具体表现为生育时期越靠后, 新展叶对卡那霉素的抗性越强。因而利用卡那霉素涂抹进行转基因大豆检测, 临界浓度的选择是个动态的过程, 检测时期宜早不宜迟。

目前, 利用PCR技术对转基因植株后代进行检测已成为转基因植株检测的常规方法之一^[9-10]。本研究对经过卡那霉素涂抹检测的植株应用PCR方

法进行进一步检测,结果表明,对卡那霉素表现高抗和抗性的植株卡那霉素涂抹检测结果与PCR检测结果的符合度达90.8%,2种方法差异不显著;对卡那霉素表现感和高感的植株中有12.9%的植株仍能检测到 $np t II$ 基因。分析其原因可能是,PCR检测手段是针对基因进行的,基因的存在并不表明其必然表达,而植株对卡那霉素表现抗性是基因表达的结果,因而在卡那霉素检测的感和高感植株仍有可能存在 $np t II$ 基因,只是由于基因沉默^[11]等现象的存在,其并未表达出目的蛋白,从而不能使这类植株获得卡那霉素抗性。

得卡那霉素抗性。

卡那霉素叶片涂抹方法简单易行,便于大规模筛选,可大大节省时间和成本。本研究结果表明,通过选择合适的检测浓度和观察时间,利用卡那霉素叶片涂抹法对大豆转基因植株后代进行快速筛选是可行的,能够初步识别转基因植株,确定研究重点,特别适合于对大量转基因后代植株的初步筛选,当然,转基因植株的最终确定还需要Southern blot及Western blot等检测结果的确证。

[参考文献]

- [1] De Vries J, Wackemage W. Detection of $np t II$ (kanamycin resistance) genes in genomes of transgenic plants by marker-rescue transformation[J]. Mol Gen Genetics, 1998, 257(6): 595-605
- [2] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 304-307, 167-178
- [3] 李燕娥. 转基因棉花纯度快速测定法[J]. 中国棉花, 1998, 25(8): 14
- [4] Dveksler G S, Dieffenbach C W. PCR primer A laboratory manual[M]. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995: 321-334
- [5] 朱加保, 杨可胜, 产焰坤, 等. 转Bt基因抗虫棉卡那霉素田间鉴定技术研究[J]. 安徽农业大学学报: 自然科学版, 2005, 32(1): 19-21
- [6] 王晓丹, 吕惠颖, 张敬, 等. 以PCR为目的的大豆叶片DNA提取方法的比较研究[J]. 分子植物育种, 2004, 6(2): 891-894
- [7] Salah M A, M Iciar U. Universal and rapid salt extraction of high quality genomic DNA for PCR based techniques[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(22): 4692-4693
- [8] 李燕娥, 朱 祯. 豇豆胰蛋白酶抑制剂转基因棉花的获得[J]. 棉花学报, 1998, 10(5): 237-243
- [9] Hurst C D, Knight A, Bruce I J. PCR detection of genetically modified soya and maize in foodstuffs[J]. Molecular Breeding, 1999, 5: 579-586
- [10] Monma K, A raki R, Sagi N. Detection of genetically modified organism s in foreign-made processed foods containing corn and potato[J]. Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 2005, 46(3): 79-85
- [11] Baulcombe D. A silence that speaks volumes[J]. Nature, 2000, 404: 804-808

Effectiveness of screening the transformed plants by smearing Kanamycin on the soybean leaves

L IU Bin^{1,2}, W U Di², HOU Wen-sheng^{1,2}

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Crop Sciences, The Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Kanamycin can be used to select the transformed plants containing the $np t II$ gene. In order to assay the optimal screening concentration to $np t II$ gene, Kanamycin was smeared to the surface of the transformed soybean leaves of Jilinxiao li No. 1. It showed that 500 mg/L Km with 3 days' selecting was best. This method was compared with PCR as well, and the results suggested that the equivalent ratio was 90.8% between the high-resistant plants and the resistant plants, 87.1% between the sensitive plants and the hypersensitive plants. Accordingly, it is available to select the transformed soybean plants by smearing with Km.

Key words: soybean; gene-transformed plant; polymerase chain reaction; Kanamycin