

转基因小麦的PCR快速检测^{*}

孟超敏¹, 张晓东², 陈天佑³

(1 河南科技大学 农学院, 河南 洛阳 471003; 2 北京农业生物技术研究中心, 北京 100089;

3 西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 采用改进的CTAB法, 研究了与PCR相匹配的转基因小麦单株微量DNA的快速提取方法。结果表明, 该提取方法简便、快速、有效, 提取的DNA产量和质量完全可以用于PCR扩增。对标准PCR的反应体系进行优化, 建立了最佳的转外源高赖氨酸基因小麦植株的PCR扩增体系, 即10×Reaction Buffer 2.5 μL, MgCl₂ 25 mmol/L, dNTPs 2.5 mmol/L, 模板DNA 30~60 ng, 引物1.2 μmol/L, Taq酶1 U, 加ddH₂O至25 μL, 优化的PCR反应体系显著提高了转基因小麦植株筛选和鉴定的效率。

[关键词] 转基因小麦; DNA提取; PCR; 反应体系优化

[中图分类号] S512; Q78

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)10-0024-05

转基因小麦是利用基因工程技术, 将外源基因导入小麦基因中, 经过筛选得到的能够表达目的基因的小麦。在基因转移和表达研究中, 需要对经转化处理的幼苗进行分子检测, 以淘汰非转化植株。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)已被广泛用于转化植株和组织的筛选, 但在某些情况下, 这种筛选效果不可靠^[1~3]。聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)技术是筛选和鉴定外源基因整合情况的最常用和有效的技术^[4,5]。该技术以极少量的DNA为模板, 加入适当的引物, 在DNA聚合酶(如Taq酶)作用下, 快速扩增出模板DNA的某一靶片段, 从而筛选和鉴定相关基因的整合情况。

基因枪微弹轰击转化小麦的转化体系^[6~9], 有力地促进了转基因小麦的发展。随着小麦遗传转化体系的成熟和完善, 转化处理的小麦群体已达到一定的规模。转化后大规模群体植株的筛选是小麦基因转化技术中极为重要的一个环节。然而目前转基因小麦单株微量DNA快速提取方法和分子筛选体系存在不稳定、重复性差、效率低等缺陷。为此, 本试验尝试研究了快速、简便、操作性强、实用性强的转基因小麦单株微量DNA快速提取方法, 并且建立了适于转基因小麦的PCR检测反应体系和条件, 以便进行大规模的转基因植株筛选和鉴定, 从而大大提高了外

源基因筛选和鉴定的效率。

1 材料与方法

1.1 材料

含有外源高赖氨酸基因(*wblp*)的质粒pBPC102, 由北京农业生物技术研究中心小麦分子生物学研究室构建和保存; 经基因枪转化法转化质粒pBPC102的小麦植株; 未转化普通六倍体小麦。

4种dNTPs, Taq酶, MgCl₂和10×Reaction Buffer均购自华美生物工程公司。所用仪器有日本岛津牌UV-120-02紫外可见分光光度计和Whatman Biometra公司的PCR热循环仪。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA的提取 采用改进的CTAB法。取0.5 g冷冻干燥的小麦叶片在1.5 mL离心管中研磨至粉末状, 加0.65 mL CTAB提取液(10 mmol/L EDTA, 0.7 mol/L NaCl, 0.1% β-巯基乙醇, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)), 充分混匀, 65℃温浴30 min; 加等体积氯仿-异戊醇(体积比为24:1)抽提, 边温浴边抽提, 约20~30 min后, 8 000 r/min离心10 min, 用剪口的枪头吸出上清液; 加2/3体积的预冷异丙醇沉淀15 min以上, 待析出絮状沉淀后, 11 000 r/min离心10 min, 倒出液体, 将沉淀物及离心管用体积分数75%乙醇清洗, 吹干沉淀物, 溶于适量ddH₂O或TE(10 mmol/L Tris-HCl,

* [收稿日期] 2005-02-25

[作者简介] 孟超敏(1977-), 男, 陕西咸阳人, 讲师, 硕士, 主要从事农业生物技术研究。

pH 8.0; 1 mmol/L EDTA, pH 8.0; 高压灭菌) 中, 待全部溶解后保存在-20℃冰箱中。

1.2.2 目的基因PCR 扩增体系的优化 转基因小麦基因组DNA 含量的测定采用紫外分光光度法, 模板DNA 的用量为30~60 ng, 根据高赖氨酸基因 *w blrp* 的序列, 设计并合成了P₁ 和P₂ 对引物(上海生工生物公司合成), P₁ 的上游引物为: 5'-CAT TAT GGG TGT TTT CAC ATA TGA G-3'; 下游引物为: 5'-ATT GTA TTC AGG ATG GGC CAA AAG G-3'; P₂ 的上游引物为: 5'-ATG GGT GTT TTC ACA TAT GA G-3'; 下游引物为: 5'-TCA ATT GTA TTC AGG ATG GGC-3'。PCR 反应体系为25 μL。为了优化PCR 反应体系, 设计了不同的引物(P₁, P₂)、退火温度(分别为50, 54, 61, 66, 70和53, 55, 58, 60, 62)、引物浓度(2.00, 1.43, 1.00, 0.71, 0.50 μmol/L)和甜菜碱浓度(0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mol/L), 以进行优化筛选试验。

扩增反应在T_{GRADIENT} 热循环仪上进行, 具体程序为: 94℃ 4 min, 1个循环; 94℃ 1 min, 58℃ 30 s, 72℃ 1 min, 38个循环; 最后72℃ 延伸7 min。扩增产物直接进行琼脂糖凝胶电泳分离或保存在4℃冰箱中备用。

1.2.3 DNA 的电泳检测 总基因组DNA 用质量分数0.8%琼脂糖凝胶电泳, PCR 扩增产物用质量分数1.2%琼脂糖凝胶电泳, 电泳缓冲液为1×TAE, 电泳结果以凝胶成像系统记录分析。

2 结果与分析

2.1 转基因小麦基因组DNA 的质量

由图1可以看出, 用快速提取方法提取的基因组DNA, 所有样品电泳结果良好, 未出现RNA 污染和DNA 降解现象。用紫外分光光度计测定基因

组DNA 质量浓度, 1~4号样品分别为0.41, 0.34, 0.62和0.44 μg/μL, 提取的DNA 产量和质量完全可以满足PCR 扩增的需要。

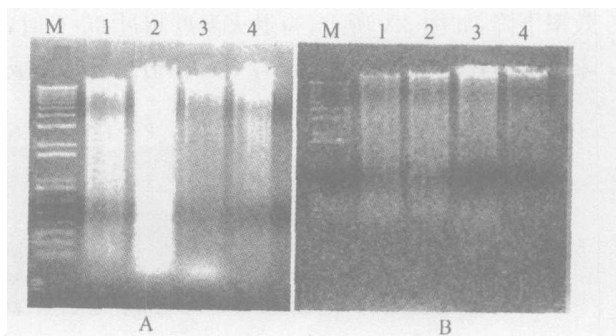


图1 转基因小麦基因组DNA 电泳图谱

A. 传统方法提取的DNA; B. 快速提取方法提取的DNA;

M. 1 kb Plus DNA Ladder; 1~4 转基因小麦

Fig 1 A garose-gel electrophoresis gram of transgenic wheat genomic DNA

A. DNA quality extracted using traditional method;

B. DNA quality extracted using fast method;

M. 1 kb Plus DNA Ladder; 1~4 Different transgenic wheat respectively

2.2 目的基因PCR 扩增体系的优化

2.2.1 不同引物对PCR 扩增结果的影响 高效、特异性强的引物是特异性扩增的关键。由图2可见, 引物P₁ 和P₂ 在相同的PCR 扩增条件下, 以P₁ 为引物可扩增出长477 bp 的特异性片段, 以P₂ 为引物可扩增出长406 bp 的特异性片段。以P₂ 为引物的阳性对照(质粒pBPC102)扩增出长406 bp 的特异性片段, 而阴性对照(非转基因植株)和转基因植株均未出现特异性片段(图2 II); 以P₁ 为引物的阳性对照(质粒pBPC102)扩增出了特异性片段, 转基因植株也扩增出了目标片段(图2 I)。表明引物P₁ 与预测的结果完全吻合, 而引物P₂ 尚需改变PCR 反应条件进一步验证。

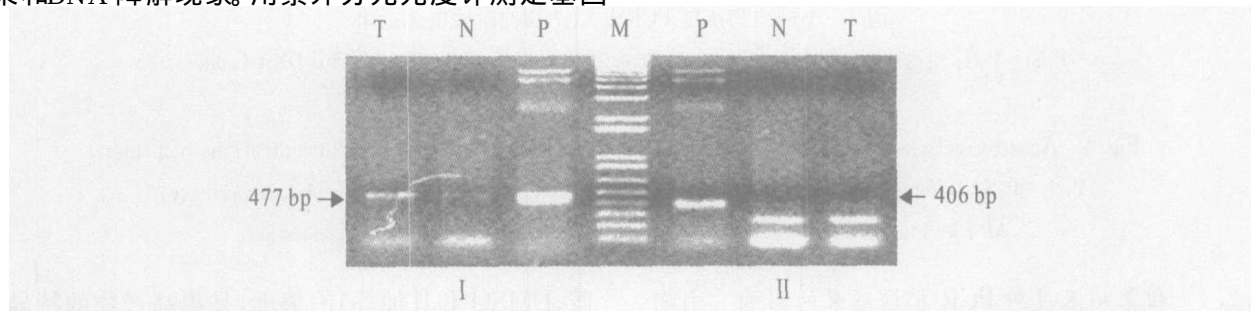


图2 不同引物PCR 扩增产物的凝胶电泳结果

I. 引物为P₁; II. 引物为P₂; M. 1 kb Plus DNA Ladder; P. 质粒pBPC102; N. 非转基因植株; T. 转基因植株

Fig 2 A garose-gel electrophoresis of PCR products preformed by different primers

I. Primer P₁; II. Primer P₂; M. 1 kb Plus DNA Ladder; P. Plasmid pBPC102; N. Non-transgenic wheat; T. Transgenic wheat

2.2.2 退火温度对PCR 扩增结果的影响 退火温度决定PCR 的特异性与产量。温度高, 特异性强, 但温度过高, 则引物不能与模板牢固结合, DNA 扩增效率下降, 如图3A 所示, 当退火温度超过66 时, 未扩增出任何条带。温度低, 产量高, 但过低可造成

引物与模板错配, 非特异性产物增加, 如图3A 所示, 当退火温度为50 时, 阴性对照 N_1 扩增出了非特异性条带。对于G+C 含量约为50% 的20 个碱基的寡核苷酸引物, 退火温度在55~ 60 较为适宜(图3B)。

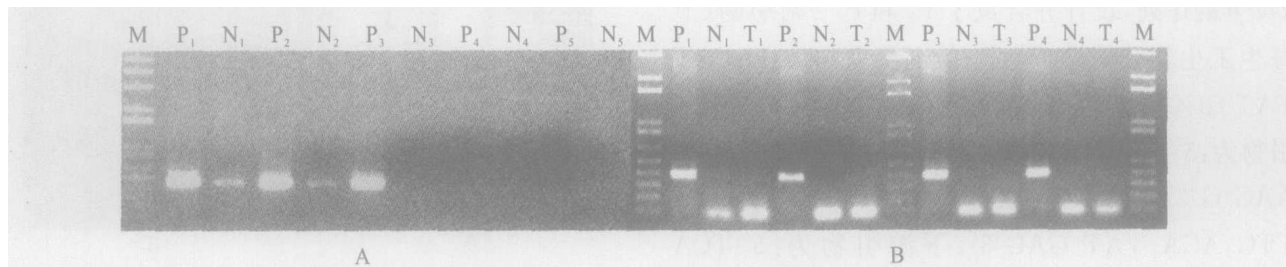


图3 不同退火温度PCR 扩增产物的凝胶电泳结果

A. $P_1N_1 \sim P_5N_5$ 表示退火温度分别为50, 54, 61, 66 和70 ; B. $P_1N_1T_1 \sim P_4N_4T_4$ 表示退火温度分别为53, 55, 58 和60 ; M. 1 kb Plus DNA Ladder; $P_1 \sim P_5$ 质粒pBPC102; $N_1 \sim N_5$ 非转基因植株; $T_1 \sim T_4$ 转质粒pBPC102 的小麦植株

Fig. 3 A garose-gel electrophoresis of PCR products preformed by different anneal temperatures

A. $P_1N_1 \sim P_5N_5$ mean anneal temperature 50, 54, 61, 66 and 70 respectively; B. $P_1N_1T_1 \sim P_4N_4T_4$ mean anneal temperature 53, 55, 58 0 and 60 0 respectively; M. 1 kb Plus DNA Ladder; $P_1 \sim P_5$ Plasmid pBPC102; $N_1 \sim N_5$ Non-transgenic wheat; $T_1 \sim T_4$ Transgenic wheat

2.2.3 引物浓度对PCR 扩增结果的影响 由图4 可知, 引物浓度过高或过低对PCR 扩增都有很大影响。当引物浓度过低时, 扩增产物的量很少, 很难用电泳的方法进行检测, 如图4 中当引物浓度为0.50 $\mu\text{mol/L}$ 时, P_5 扩增产物未能被凝胶电泳检测到。而引物浓度过高会产生2 个问题: 一是易引起错配和产生非特异性扩增, 如图4 中当引物浓度为2.00

$\mu\text{mol/L}$ 时, N_1 扩增出了非特异性片段; 二是易生成引物二聚体。这些对于转基因植株鉴定来说很重要, 因为植物基因组很大, 而单拷贝的外源基因在基因组中所占的比例很小, 基因组DNA 提取又很粗, 这时若引物浓度高, 非特异性扩增极易发生。综合分析认为, 引物浓度为1.0~ 1.2 $\mu\text{mol/L}$ 为佳。

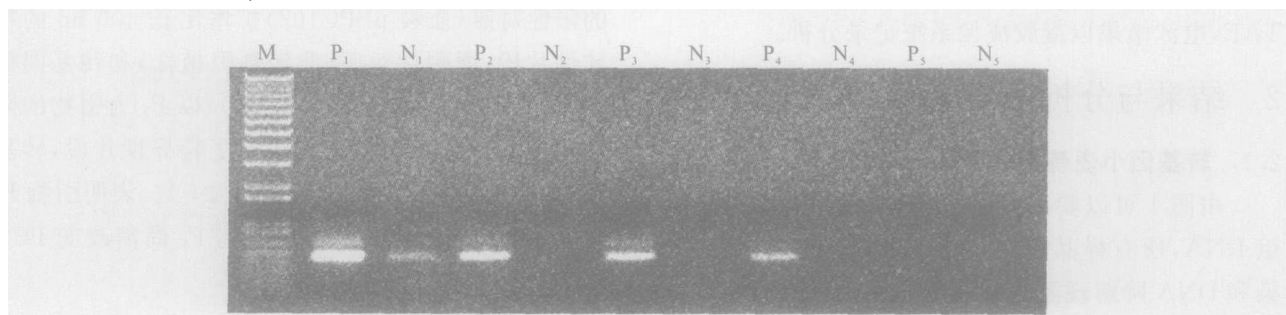


图4 不同引物浓度PCR 扩增产物的凝胶电泳结果

$P_1N_1 \sim P_5N_5$ 引物浓度分别为2.00, 1.43, 1.00, 0.71 和0.50 $\mu\text{mol/L}$; M. 1 kb Plus DNA Ladder; $P_1 \sim P_5$ 质粒pBPC102; $N_1 \sim N_5$ 为非转基因植株

Fig. 4 A garose-gel electrophoresis of PCR products preformed by different concentrations of primer

$P_1N_1 \sim P_5N_5$ Different concentrations of primer 2.00, 1.43, 1.00, 0.71 and 0.50 $\mu\text{mol/L}$ respectively;

M. 1 kb Plus DNA ladder; $P_1 \sim P_5$ Plasmid pBPC102; $N_1 \sim N_5$ Non-transgenic wheat

2.2.4 甜菜碱浓度对PCR 扩增结果的影响 引物设计、退火温度和引物浓度的优化, 足以对大多数模板进行高特异性的扩增, 但对某些模板, 如包括高G+C 含量的模板, 还存在一些缺陷。改变影响DNA 溶解温度的PCR 添加剂(包括甜菜碱、甲酰

胺、DM SO 和甘油等) 的浓度, 是提高产物的特异性和产量的另外一种方法。本试验为获得最佳结果, 优化了甜菜碱的浓度。由图5 可见, 甜菜碱浓度为1.0 mol/L 时, PCR 扩增产物的特异性最强。

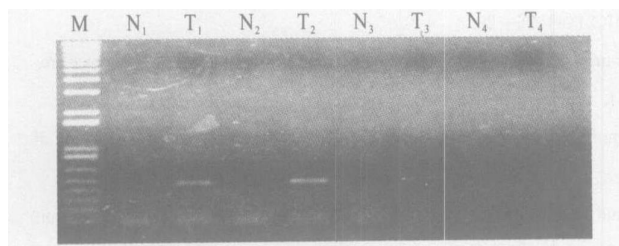


图5 不同甜菜碱浓度PCR 扩增产物的凝胶电泳结果

$N_1T_1 \sim N_4T_4$ 甜菜碱浓度分别为0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mol/L;

M: 1 kb Plus DNA ladder; $N_1 \sim N_4$ 非转基因植株;

$T_1 \sim T_4$ 转质粒pBPC102的小麦植株

Fig 5 A garose-gel electrophoresis of PCR products preformed by different concentrations of betaine

$N_1T_1 \sim N_4T_4$ Different concentrations of betaine

0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mol/L; M: 1 kb Plus DNA Ladder;

$N_1 \sim N_4$ Non-transgenic wheat; $T_1 \sim T_4$ Transgenic wheat

2.2.5 最佳反应体系的建立 通过以上对不同引物、退火温度、引物浓度和甜菜碱浓度等的优化筛选, 选用根据 *w blp* 基因设计的特异引物 P_1 , 建立总体积为 25 μ L 的最佳反应体系为: 10 $\times$ Reaction Buffer 2.5 μ L, MgCl₂ 25 mmol/L, dNTPs 2.5 mmol/L, 模板DNA 30~60 ng, 引物 1.2 μ mol/L, Taq 酶 1 U, 加ddH₂O 至 25 μ L, 退火温度 58 $^{\circ}$ C。对用快速微量提取方法提取的转质粒pBPC102小麦单株DNA 进行PCR 扩增, 结果见图6。由图6可以看出, 在470 bp 处, 质粒和样品4 均扩增出了特异性条带, 而非转基因植株未扩增出条带。

多次PCR 试验结果均证明, 该反应体系稳定性好, 重复性强, 大大提高了转化后大规模群体植株的筛选和鉴定效率。

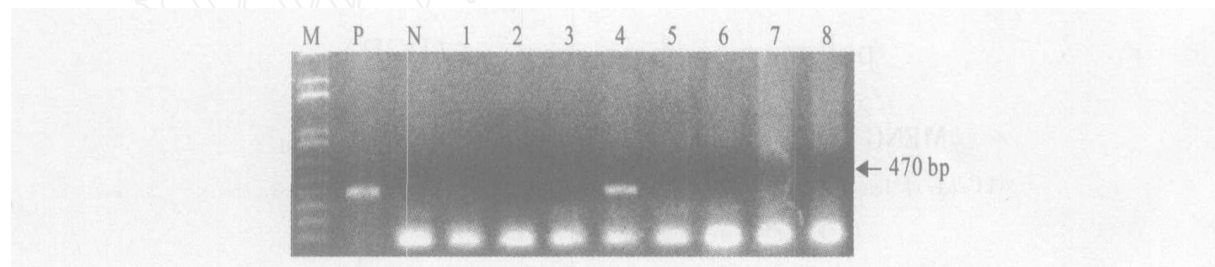


图6 *w blp* 基因的PCR 扩增产物的凝胶电泳结果

M: 1 kb Plus DNA ladder; P: 质粒pBPC102; N: 非转基因小麦; 1~8 转质粒pBPC102的小麦植株

Fig 6 A garose-gel electrophoresis of PCR products preformed by *w blp*

M: 1 kb Plus DNA ladder; N: Non-transgenic wheat; 1~8 Transgenic wheat; P: Plasmid pBPC102

3 讨论

对转基因小麦植株进行快速PCR 检测, 首先要有一套快速、简便、成本低的, 与PCR 相配套的转基因单株基因组DNA 提取方法。目前, 植物总DNA 提取方法较多, 但大多数操作复杂、提取时间较长^[10, 11]。为此, 许多研究者难以在转基因植株 T_1 代幼苗期, 采集到足够量的样品用于PCR 检测, 而必须在 T_1 代成株期或 T_2 代进行, 造成人力、物力的浪费。本试验在传统DNA 提取方法的基础上^[12], 对提取过程及技术进行改进, 采用研磨玻璃棒将样品在聚丙烯离心管中直接研磨, 取材少, 研磨省力, 速度快, 便于操作, 同时也最大限度地避免了提取过程中样品之间的交叉污染; 另外试验简化了传统的提取

过程, 使提取过程简便、快捷、有效, 而且提取的DNA 产量和质量完全可以满足PCR 扩增的需要, 为PCR 结果的稳定性提供了重要保证。

聚合酶链反应(PCR)技术是转基因植物分子鉴定中最常用的一种方法^[4, 5], 但由于PCR 对实验程序和条件的变化很敏感, 不同研究单位的实验室及不同操作人员的试验结果难以比较和交流, 因此根据研究对象的不同, 对PCR 试验条件进行优化十分必要。本研究对标准PCR 的反应体系和条件进行了优化, 建立了最佳的转外源高赖氨酸基因小麦植株的PCR 扩增体系, 经多批次的DNA 扩增验证, 该反应体系稳定性好, 重复性强, 大大提高了转化后大规模群体植株的筛选和鉴定效率。

[参考文献]

- [1] De B M, Herrera E, Van M M, et al Expression of foreign in regenerated plants and in their progeny[J]. EMBO J, 1984, 3: 1681- 1689
- [2] 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[J]. Plant Mol Bio, 1985, 5: 299- 302
- [3] Jefferason R A. A ssaing chimeric genes in plants: *GUS* gene fusion gene fusion system[J]. Plant Mol Biol Rep, 1987, 5: 387- 405

- [4] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [5] 陶生策, 张治平, 张先恩. PCR 技术研究进展[J]. 生物工程进展, 2001, 21(4): 26- 29.
- [6] Vasil V, Castillo A M, Fromm M, et al. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plant obtained by micro projectile bombardment of regenerable embryogenic calls[J]. Bio/Technology, 1992, 10: 667- 674.
- [7] Takumi S, Shimada T. Variation in transformation frequencies among six common wheat cultivars through particle bombardment of scutellar tissues[J]. Genes Genet Syst, 1997, 72(2): 63- 69.
- [8] Zhang X D, Liang R Q, Cheng X Q, et al. Transgene inheritance and quality improvement by expressing novel HMW glutenin subunit (HMW-GS) genes in winter wheat[J]. Chinese Science Bulletin, 2003, 48(8): 771- 776.
- [9] Meng C M, Cheng X Q, Liang R Q, et al. Expression of lysine-rich protein gene and analysis of lysine content in transgenic wheat[J]. Chinese Science Bulletin, 2004, 49(10): 2053- 2057.
- [10] Bebenich A J, Anderson R S, Ward B L. Plant DNA: long, pure and simple, genome organization and expression[M]. New York: Plenum Press, 1980. 31- 33.
- [11] Dellaport S L, Wood J, Hicks J B. A plant DNA miniprepation: version II [M]. Plant Mol Biol Rep, 1983, 1: 19- 21.
- [12] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning- a laboratory manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Rapid confirmation of the transgenic wheat lines by polymerase chain reaction (PCR)

MENG Chao-min¹, ZHANG Xiao-dong², CHEN Tian-you³

(1 College of Agronomy, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China;

2 Beijing Agrobiotechnology Research Center, Beijing 100089, China;

3 College of Agronomy, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712000, China)

Abstract: A new rapid DNA extraction method was developed for transgenic wheats identified by PCR. The result showed that this method was convenient, quick and effective. The quality of DNA extracted using this method was suitable for PCR analysis. An optimal reaction system suitable for alien lysine-rich gene PCR was also established in this research: 10 × Reaction Buffer 2.5 μL, MgCl₂ 25 mmol/L, dNTPs 2.5 mmol/L, Genomic DNA 30- 60 ng, primers 1.2 μmol/L, Taq enzyme 1 U, ddH₂O to 25 μL.

Key words: transgenic wheat; DNA extraction; PCR; optimization of the reaction system