

转基因马铃薯植株的抗性筛选及其 PCR 鉴定

张 萍

(咸阳职业技术学院,陕西 咸阳 712000)

摘 要:近年来,转基因技术研究发展很快,筛选、鉴定转基因植株是基因转移的必须环节。本实验利用农杆菌(含有 pARTGF 植物表达载体)介导法将外源基因转入马铃薯植株,经过含有卡那霉素培养基的抗性筛选,初步筛选出转基因马铃薯植株 A、B、C 分别为 5 株、7 株、8 株;将筛选的转基因马铃薯植株利用 PCR 进行检测,经分析,其结果初步表明,已成功将目的基因转入马铃薯基因组中,并获得阳性植株分别为 2 株、4 株、5 株。

关键词:转基因;PCR;马铃薯;转基因鉴定

马铃薯作为世界上第四大粮食作物,在人民生活 and 农业生产中占有重要地位。马铃薯植株具有易生长、生物量大;遗传体系较完善、转化周期短;可通过无性繁殖获得转化基因植株等特点而备受科研工作者青睐。马铃薯是最早进行转基因研究的植物,也是田间实验品种最多的转基因作物之一^[1]。目前,有很多种方法可获得转基因植株,无论哪种方法,最终的结果都是转化细胞只能占少数,可以通过筛选转化细胞,确定转化植株。可以通过检测标记基因,来证明目的基因的存在。目前,应用最广的标记基因为 NPT II 基因,其编码产物可使氨基糖苷类抗生素磷酸化而失活(如:新霉素、卡那霉素等),植物会产生相应的抗生素抗性,因此可利用卡那霉素对转化植株进行筛选^[2]。植株也可能会逃避选择成为假转化体,因此,还需对卡那霉素筛选后的转基因植株中的外源基因进行进一步的检测。

PCR 技术是在生物体外快速扩增目的基因片段并进行初步检测的有效方法^[3],可放大目的 DNA 片段的分子生物学技术。产物经琼脂凝胶电泳,溴化乙锭染色后会很容易观察,不需通过杂交分析就可以鉴定出基因组中是否存在目的序列,具有灵敏度高,简便、快速等特点。因此这项技术被广泛用于转化及抗性筛选所得生物体的筛选鉴定。

笔者实验对经卡那霉素抗性筛选,将筛选所得抗性苗、相应的未经转化的马铃薯茎段(作为对照)为材料,利用 PCR 技术进行进一步鉴定,筛选鉴定出转化植株,并进行移栽,以便进一步的研究。

1 材料

1.1 植物材料

愈伤组织分化苗(经工程农杆菌转化的 A、B、C 马铃薯茎段所得);未进行转化的对应的马铃薯试管苗。

1.2 引物及酶

TaqDNA 聚合酶(大连宝生物工程有限公司);

标准 DNA 分子量 Marker V、Marker-DL2000(天为时代公司);

引物 gl-1/gl-6, G1/gl-6, 其组成见表 1。

表 1 扩增所用引物及构成

引物	引物序列(5'-3')
gl-1	GC GGA TCC CTC GAG ATG GCA AGC
	ATC ACA GCT TC
gl-6	GC ATC GAT GGT ACC AGC AGG CGG
	TGT ATT TTT ATC G
G1	GC GAGCTC GCGCCGC GTG GAA CGG
	AGA CAT GTT ATG A

1.3 抗生素及其配制

(1) 头孢霉素($250 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$):称取 5 g 头孢霉素溶解于无菌蒸馏水中,定容至 20 mL,用 0.22 μm 滤膜过滤分装, -20°C 保存。

(2) 卡那霉素($100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$):称取 2 g 卡那霉素溶解于无菌蒸馏水中,定容至 20 mL,用 0.22 μm 滤膜过滤分装, -20°C 保存。

1.4 培养基

MS 母液^[6] 配制方法:

收稿日期:2018-01-02 修回日期:2018-02-23

作者简介:张萍(1983-),女,陕西永寿人,咸阳职业技术学院讲师,研究方向:生物技术。

母液 I (20×): 每升含 33 g NH_4NO_3 、38 g KNO_3 、8.8 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、7.4 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、3.4 g KH_2PO_4 ;

母液 II (200×): 每升含 0.166 g KI、4.46 g $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、1.24 g H_3BO_3 、1.72 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.05 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.005 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.05 g $\text{CaSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$;

母液 III (100×): 每升含 5.56 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、7.4 g $\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;

母液 IV (200×): 每升含 0.1 g 烟酸、0.1 g 盐酸吡哆醇、0.4 g 甘氨酸、0.02 g VB_1 ;

(1) MS_1 培养基: 用于马铃薯组织培养苗继代培养, 在 MS 培养基的基础上肌醇含量增加至 $140 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、蔗糖含量增加至 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 配制而成。

(2) MS_2 抗性筛选培养基: 对转基因马铃薯植株进行抗性筛选, 在 MS_1 培养基的基础上加入 $70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Km 配制而成。

(3) MS_3 生根培养基: 诱导外植体形成根系, 在 MS_1 培养基的基础上添加 $70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Km 和 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 头孢霉素配制而成。

1.5 琼脂糖凝胶电泳缓冲液及 EB 染色液

Tris-乙酸(TAE)

贮存液 (50X) 使用浓度(1X)

242g Tris 碱 $0.04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-乙酸

57.1 mL 冰乙酸 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA

100 mL $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA(pH8.0)

称取 5 g 溴化乙锭(Ethidium Bromide, EB), 溶于无菌蒸馏水, 定容 10 mL, 避光保存。使用前用电泳缓冲液稀释 1 000 倍, 使其最终浓度达到 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;

1.6 其它试剂

2×CTAB 溶液(2%CTAB, $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH8.0 Tris-HCl, NaCl $1.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; EDTA $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH8.0); PVP 1%); 无水乙醇; 70%乙醇; β -巯基乙醇; 氯仿-异戊醇=氯仿:异戊醇=24:1; 以上药品及试剂均为化学纯或分析纯。

1.7 仪器

基因扩增仪(DTC-100?); 电泳仪凝胶成像系统(Bio-rad GelDoc); 微量移液器(Eppendorf, Germany); 电泳仪(GYECF, 北京君意东方电泳设备有限公司); 雪花机(XB, 宁波格兰特制冷设备制造有限公司); 实验室专用超纯水机(KL-RO-20, 成都康宁实验专用纯水设备厂); 高速

冷冻离心机(KDC-160HR, 科大创新股份有限公司中佳分公司); 双面超净工作台(SW-CJ-ZF, 苏州净化设备有限公司); 隔水式电热恒温培养箱(PYX-DHS-40X50-BS, 上海跃进医疗器械厂); 电热恒温水浴锅(HH-S4 型, 北京科伟永兴仪器有限公司); 超低温冰箱; 数据超声波清洗器(KQ-500DB); 干燥箱(101, 北京科伟永兴仪器有限公司)。

2 方法

2.1 转基因马铃薯植株的抗性筛选

剪下马铃薯茎段的愈伤组织分化苗, 接种在 MS_2 筛选培养基上, $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $1500 \sim 2000 \text{ Lx}$ 光照下培养, 进行转基因植株的抗性筛选。

2.2 转基因马铃薯植株的 PCR 检测

2.2.1 转基因马铃薯植株抗性苗的扩繁 将经卡那霉素抗性筛选获得的马铃薯抗性苗 A、B、C 接入 MS_1 继代培养基上, 进行扩大培养, 以获得大量的实验材料为下一步 PCR 检测做准备。

2.2.2 转基因马铃薯植株的抗性苗的 DNA 提取 马铃薯植株的抗性苗的 DNA 提取采用 CTAB 提取法^[7], 具体操作如下:

(1) 在 5 mL 离心管中加入 1 mL 的 2×CTAB 和 $20 \mu\text{L} \beta$ -巯基乙醇, 在 60°C 水浴锅中预热;

(2) 取 2.2.1 试验中筛选出来的马铃薯抗性材料 0.5 g, 放入经液氮预冷的研钵中, 加入液氮研磨至粉末状, 用无菌不锈钢勺转移粉末到预热的 CTAB 离心管中, 注意需封口以防止巯基乙醇挥发, 混合均匀后置 60°C 水浴锅中保温 30 min, 同时需不断轻轻震动摇晃试管;

(3) 用冰块迅速将取出的 CTAB 离心管冷却至室温, 加入等体积的氯仿/异戊醇, 轻轻颠倒摇晃使溶液混合均匀, 室温下 5 000 rpm 离心 10 min, 将上清液移至另一新管中;

(4) 加入等量氯仿提取液(约 1 mL) 抽提两次, 混合均匀, 注意不要剧烈摇晃, 以防 DNA 断裂, 每次室温下 5 000 rpm 离心 10 min;

(5) 取上清液移至另一离心管, 加入 2 倍体积(约 1.2 mL) 无水乙醇, 轻轻混合均匀, 室温下 5 000 rpm 离心 10 min 回收 DNA 沉淀;

(6) 用 70% 乙醇清洗沉淀两次, 吹干后将沉淀溶于 $80 \mu\text{L}$ 的无菌水中;

(7) 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测提取的基因组 DNA。

2.2.3 PCR 检测 以 2.2.2 中提取的抗性马铃薯植株的 DNA 为模板,分别以 gl-1/gl-6、G1/gl-6 为引物,以未转化的马铃薯试管苗总 DNA 作阴性对照,进行 PCR 扩增检测,反应体系及参数如下:

(1)PCR 反应体系:在 0.2 mL PCR 反应管中依次加入 2.5 μ L 10 \times PCR 缓冲液,2.0 μ L 4 \times dNTP(2.5 mmolPL),1 μ L 引物 gl-1,1 μ L 引物 gl-6,0.5 μ L TaqDNA 聚合酶,1 μ L DNA 模板,并加入无离子水使反应体积达到 25 μ L。

(2)PCR 反应参数:首先 95 $^{\circ}$ C 环境变性 5 min;后 30 个循环为 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s,54 $^{\circ}$ C 退火 50 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min;后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 永久保存。

2.2.4 电泳及凝胶成像 制备 1% 的琼脂糖凝胶,取 1 μ L 10 \times buffer 加 5 μ L 样品 DNA,混和均匀后加样,以 MarkerDL2 000(5 μ L)为对照,以 90 V、100 mA 进行电泳。电泳结束后,在 EB 染液中染色 5 min,用凝胶成像系统拍照观察。

2.3 转基因马铃薯植株生根及移栽

2.3.1 转基因马铃薯植株的生根 切取筛选的马铃薯转基因植株(A、B、C)茎段 1~2 cm,分别

将其转入 MS₃ 生根培养基上,诱导其生根形成完整植株。见图 1。



图 1 诱导生根形成的植株

2.3.2 转基因马铃薯植株的盆栽 将 2.3.1 中生根的转基因马铃薯移植盆栽,可为后期对外源基因是否转入的生理生化实验及 PCR-Southern 杂交验证做准备。

3 结果与分析

3.1 转基因马铃薯植株的抗性筛选

经 2.1 的抗性筛选,结果表明大部分转化苗均能够继续生长;只有一小部分转化苗停止生长,2~3 周后叶片逐渐枯萎、死亡。获得待鉴定的转基因马铃薯植株 A 5 株、B 7 株、C 8 株,见图 2。成活的抗性植株有可能是马铃薯转基因植株。



图 2 经过筛选获得的马铃薯愈伤组织分化苗 A、B、C

3.2 转基因马铃薯植株抗性苗的 DNA 提取

将 2.2.2 中提取的 DNA 进行电泳,结果显示转基因马铃薯的 DNA 电泳条带清晰,说明提取的 DNA 样品符合 PCR 反应的要求,可用于外源基因检测,同时也确定了样品来源于马铃薯。见图 3。



图 3 转基因马铃薯 DNA 电泳图

3.3 转基因马铃薯植株抗性苗的 PCR 鉴定

用实验 2.2.2 中 CTAB 法提取转基因马铃薯植株及未转化的马铃薯植株的总 DNA 做为模板,以 2.2.3 中的方法进行 PCR 检测,所得 PCR 产物经 2.2.4 中琼脂糖凝胶电泳检测,结果表明以 gl-1/gl-6 作为引物扩增产物大小均为 800 bp 左右的特异扩增目的条带(图 4),以 G1/gl-6 作为引物的均出现 1400 bp 大小的特异扩增目的条带,而同时以未转化植株的叶片总 DNA 为模板的阴性对照没有任何条带出现(图 5),初步说明我们的组织特异性启动子及其所携带的外源融合基因整合到了这些植株的基因组中。其中 A、B、C 经 PCR 检测得到的阳性植株分别为 2 株、4 株、5 株。

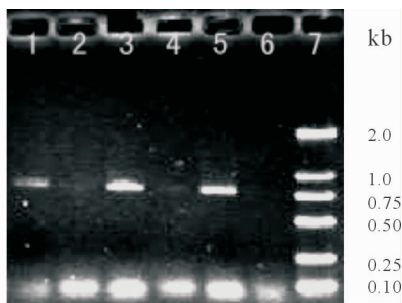


图 4 以 *gl-1/gl-6* 为引物的转基因植株 PCR 检测
1、3、5 依次为 A、B、D 抗性苗
2、4、6 阴性对照 7 DL2000

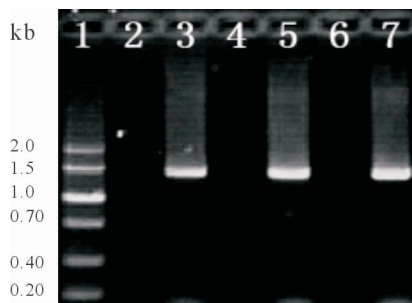


图 5 以 *G1/gl-6* 为引物的转基因植株 PCR 检测
1 Marker V、2、4、6 阴性对照
3、5、7 依次为 A、B、D 抗性苗

4 讨论

4.1 马铃薯 DNA 提取

由于马铃薯的块茎中含有多种小分子物质和糖类,这些物质不仅会影响马铃薯 DNA 的提取结果,还会影响 PCR 反应中酶的活性,使实验数据产生较大误差。本实验采用经典的 CTAB 提取法的同时使用 PVP 技术,此方法可除去多糖杂质的影响。经异丙醇沉淀 DNA 后,再用高盐醋酸钾洗涤,可除去小分子杂质的对 DNA 提取结果的影响。

4.2 利用抗性基因和卡那霉素抗性选择试剂的优点

所有转基因植物中都含有标记基因,目前常用的标记基因有抗生素抗性基因和除草剂抗性基因^[4],用的最多的是卡那霉素抗性基因,即新霉素磷酸转移酶 II(NPTII)^[6]。卡那霉素对植物细胞的毒性机理是干扰细胞线粒体及叶绿体合成蛋白质,最终导致细胞死亡。含有 NPTII 基因的转基因植株可以合成氨基糖苷磷酸转移酶,这种酶使卡那霉素的氨基糖苷磷酸化失活,抑制了卡那霉素对植株的伤害,所以选择 NPTII 基因序列作为筛选检测,具有一定的代表意义。有选择压力的条件下,利用抗性基因在转化体内表达,利于从大量非转化细胞中选择出转化克隆。经过转化后的细胞在选择性培养基中培养,能较容易地筛选出转化体,即带有异源 DNA 分子的受体细胞。在一定的选择压下,根据 R1 代种子发芽能力、去根幼苗生根情况,可以判断抗性基因是否经过减数分裂而传给下一代^[5],也可以此预测目的基因是否传给下一代。

4.3 假转化体现象

产生假转化体是目前遗传转化实验中较为普遍的一种现象。农杆菌对卡那霉素是极为敏感的^[6],用 PCR 检测技术对经卡那霉素筛选存活的再生植株进行检测发现,存活的抗性植株并非全部转入了外源基因,说明转化实验中一些没有转

入外源基因的植株却逃脱了选择压力,产生假转化体。形成假转化体的原因主要有:①外植体的某些表层细胞稳定表达了外源抗性基因,为其他非转化细胞提供了屏障,使其继续分化;②外植体细胞暂时表达外源抗性基因,为其他非转化细胞提供了屏障,使其继续分化;③培养基未冷却至 50℃ 以下加入了卡那霉素;④选择压力加的太少或太迟,未转化细胞已经分化。

笔者研究中,每代快繁培养基上均进行抗性筛选,对快繁得到的转化植株,进行 PCR 扩增,均可得到相应的特异性条带,说明转基因马铃薯的遗传稳定性较好,有望通过快繁得到大量的遗传性状一致的转基因植株^[7]。经 PCR 检测我们可以初步证明外源基因已成功转入马铃薯基因组中。若实验室有相应条件,后期还可在此基础上再对外源基因的整合与表达的分子生物学证据、物理数据(southern 杂交,northern 杂交,western 杂交)与表型数据(酶活性分析或其他)以及转基因植株的品质进行综合分析,从而可获得更准确的转基因马铃薯植株。

参 考 文 献:

- [1] 贾士荣. 植物基因工程的新进展[N]. 科技日报, 2002-1-31.
- [2] 蒋细旺,包满珠. 菊花转抗虫基因植物的 PCR 快速鉴定[J]. 湖北农业科学, 2003, (02): 72-74.
- [3] 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.
- [4] 盖树鹏,孟祥东. 转基因植物的筛选与检测 [J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2000, 31 (01): 95.
- [5] 贾士荣. 转基因植物食品中标记基因的安全性评价 [J]. 中国农业科学, 1997, 30 (02): 10-12.
- [6] 傅荣昭,刘敏,梁红健等. 通过根癌农杆菌介导法获得菊花转基因植株 [J] 植物生理学报, 1998, 24 (01): 72-76.
- [7] 李昌,金宁一等. 基因枪法转化马铃薯及转基因植株的获得 [J]. 作物杂志, 2003, (01): 12-14.