

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3636(2006)02-078-03

Inverse PCR 法快速测定转基因马铃薯中 T-DNA 的拷贝数

南相日

(黑龙江省农业科学院生物技术研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要: 利用 Inverse PCR 技术分析原生质体途径导入 PLRV-CP 基因的马铃薯转基因后代 T-DNA 拷贝数, 结果与 Southern Blot 相同。经 RT-PCR 分析, 低拷贝数的转基因后代显阳性反应, 多拷贝数的显阴性反应, 说明 T-DNA 多拷贝数影响外源基因的表达。Inverse PCR 技术能为早期快速准确预测转基因植株中外源基因的 T-DNA 拷贝数, 排除多拷贝重复串联序列诱导的外源基因沉默植株, 为获得稳定表达的转基因株系提供有效方法。

关键词: Inverse PCR; 拷贝数; 基因沉默

植物基因工程研究为培育作物优良新品种开辟了一条崭新的途径, 随着该学科的日益发展, 许多具有重要经济价值的转基因作物已开始进入实际应用阶段。然而大量研究表明, 外源基因在转基因植株中不能稳定表达, 甚至完全不表达是一个较为普遍的现象。外源基因存在于生物体内, 并未丢失或损伤, 但该基因不表达或表达量极低, 这种现象称为基因沉默 (Gene silencing)。这是基因工程中遇到的一个影响实际应用的重要问题。通过 DNA 直接导入法获得的转基因植株, 外源基因往往以多拷贝串联方式整合在寄主的基因组内。然而, 外源基因的拷贝数的增加并不意味着表达水平的提高, 反而经常导致外源基因的失活。这种由重复序列引

起的外源基因失活现象被称之为重复序列诱导的基因沉默 (Repeat induced gene silencing, RIGS)。因此尽早选择拷贝数低的转基因植株, 提高外源基因表达水平以及获得稳定表达的转基因株系等均具有重要的理论价值和实践意义。

1 材料与方法

1.1 材料

选用经过脱毒检测合格的马铃薯品种大西洋试管苗为原生质体分离的材料。质粒 pPCP 是由 pBI121 用 BamHI/SacI 双酶切去掉 GUS 基因, 连接 PLRV-CP 基因构建而成, 具体质粒图谱及酶切位点、引物位置见图 1。

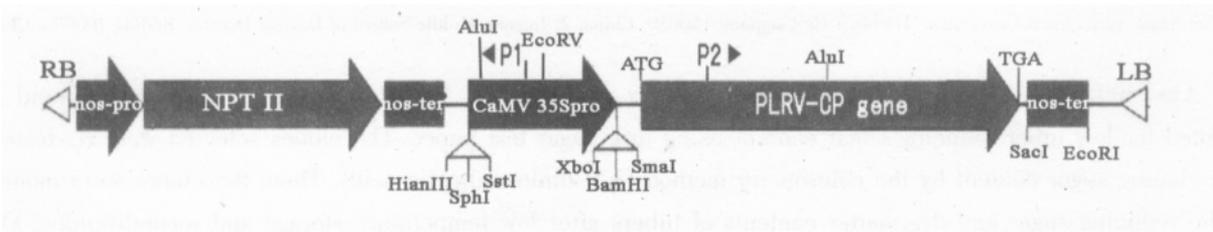


图1 质粒图谱及酶切位点

1.2 方法

1.2.1 转化

用碱裂解法提取质粒 pPCP^[1], 把最终浓度调

整为 2 mg·mL⁻¹。

PLQ (poly-L-Ornithine, Sigma) 法^[2], 将 PLRV-CP 基因导入到马铃薯原生质体中。首先将质粒 DNA 和 PLO 在 0.05 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液 pH=5.6 的中冰浴混合 10 min, 1 mol·L⁻¹ 甘露醇 1.25 mL, 0.5 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液 0.25 mL, 40 μg·mL⁻¹ PLO 0.5

收稿日期: 2006-01-23

基金项目: 十五黑龙江省攻关项目 GA010B101-08

作者简介: 南相日 (1976-), 男, 副研究员, 从事农业生物技术研究。

mL, 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质粒 DNA 0.5 mL), 然后与等体积的原生质体 5.0 $\times 10^6$ 2.5 mL, 0.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇) 相混合, 置冰浴中, 70 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡 10 min, 然后再静止 5 min。这时反应的最终浓度是: 质粒 DNA 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, PLO 4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 原生质体 1.0 $\times 10^6$ $\cdot\text{mL}^{-1}$, 0.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇。低速离心(80 $\times g$) 收集原生质体, K_8P 无激素培养基洗涤两次, 用 K_8P 初始培养基把原生质体浓度调整到 1 $\times 10^6$ $\cdot\text{mL}^{-1}$, 分装到 D=60 mm 培养皿中约 2 mL $\cdot\text{皿}^{-1}$, 黑暗 25 \pm 1) 浅层静止培养。培养 7 d 后, 转化 pPCP 质粒 DNA 的原生质体中加 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 卡那霉素进行筛选。原生质体培养按南相日等^[3]的方法。

1.2.2 植物总 DNA 提取、酶切、Inverse PCR

用 CTAB 法^[3]提取转 PLRV-CP 基因马铃薯总 DNA。取 DNA 5 μL (0.6~1.0 μg), 10X buffer (NEB) 5 μL , AluI 1 μL (10 U), 0.5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ RnaseA 1 μL , 38 μL ddH₂O 总体积 50 μL , 37 水浴过夜酶切(用矿物油封), 加 TE 至 100 μL , 苯酚/氯仿, 氯仿各抽提一次, 取上相, 加 1/10 V 3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAc pH=5.2 混匀, 加 2X V 无水乙醇, -80 15 min, 15000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 用 200 μL 预冷 70%乙醇洗涤, 15000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 去上清, 干燥沉淀, 加无菌 ddH₂O 溶解。取 AluI 酶解后的 DNA 10 μL , 10X ligation buffer 20 μL , ddH₂O 170 μL , T4 DNA 连接酶 (NEB, 400 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 0.2 μL , 总体积为 200 μL , 14 过夜连接。用上述的方法提纯连接好的 DNA, 用 5 μL ddH₂O 溶解沉淀物。加入 10~20 u EcoR V, 37 水浴酶切 2 h, 苯酚/氯仿, 氯仿各抽提一次, 2X V 无水乙醇沉淀, 干燥沉淀, 10 μL TE 溶解。

根据基因库中 CaMV 35S 启动子和 PLRV-CP 基因全序列, 在 CaMV 35S 启动子中设计一个 3'-5' 的引物 P1-ACGGTTCGTGGTTAAAGGAAA, 在 PLRV-CP 基因中设计一个 5'-3' 的引物 P2 CTTTTTCCACGATGCTCCTC。取酶切后的 DNA 2 μL , 引物各 1 μL (25 pmol), 10 mM dNTPs 1 μL , 10 \times PCR Buffer 5 μL , Taq 1 μL , ddH₂O 39 μL , 总体积 50 μL 。反应条件: 95 5 min, 60 1min, 72 2 min; 95 1 min, 60 1 min, 72 2 min, 35 个循环; 72 延伸 10 min。取 20 μL PCR 扩增产物, 进行 1.2%琼脂糖电泳。

1.2.3 Southern blot

按照分子克隆实验指南进行酶切、电泳、转膜、预杂交、杂交、显影^[1]。

1.2.4 RT-PCR 分析

PLRV-CP 基因中设计一对引物, P3 5'-CGT-GCGATCAATTGTTAATG-3' P4 5'-ACTCTGAAG-GATCCTGCGGA-3'。通过特殊引物 5'-ACTCT-GAAGGATCCTGCGGA-3' 将 mRNA 反转录合成第一条 cDNA, 然后进行了 PCR 扩增。反应条件: 95 5 min; 94 45 s, 48 45 s, 72 90 s, 30 个循环; 最后 72 10 min; 1.2%琼脂糖电泳。

2 结果与分析

2.1 Inverse PCR

AluI 酶在 PLRV-CP 基因中只有一个酶切位点, 在植物基因组中每 44 个核苷酸即可遇到一个靶顺序, 而 EcoRV 则每 46 个核苷酸, 才能遇到一个特异的识别顺序。首先用限制性内切酶 AluI 酶切整个基因组, 获得很多 DNA 片段, 其中包括 CaMV 35S 启动子到 PLRV-CP 基因片段, 如果有几个 PLRV-CP 基因拷贝就有几个这种片段, 然后用连接酶任意连接, EcoRV 酶切, 然后利用一对反向引物 PCR 扩增, 所得到的不同片段应该代表 T-DNA 的拷贝数。通过马铃薯原生质体途径导入 PLRV-CP 基因, 所获得的转基因后代中提取总 DNA, 进行了 Inverse PCR 分析, 结果发现导入后代中有不同数量的拷贝数, 1~5 个拷贝各不同(图 2), 为了证实 Inverse PCR 准确性, 进行了 Southern blot 分析(图 3), 结果与 Inverse PCR 基本相同。Inverse PCR 关键要选择好限制性内切酶和酶切位点, 第一个限制酶内切酶要选择 4 个碱基的识别位点的, 如 TagI、AluI、AclI、HaeIII、HpaII、RsaI 等, 而且在外源基因和基因外应该有一个酶切位点。5'-3' 的引物起始点在 AluI 酶切位点的左侧(图 1)。

2.2 拷贝数对基因表达的影响

对转基因后代进行了 RT-PCR 分析, 结果发现有 4 个和 5 个拷贝的转基因植株, 虽然 PCR 和 Southern blot 都显阳性结果, 但是叶片中没有表达, 而拷贝数为 1 个和 2 个的转基因植株中都有 PLRV-CP 基因表达(图 4), 表明多拷贝重复序列引起外源基因失活, 也就是说外源基因沉默。因此说多拷贝重复序列与基因沉默有着密切的关系。重

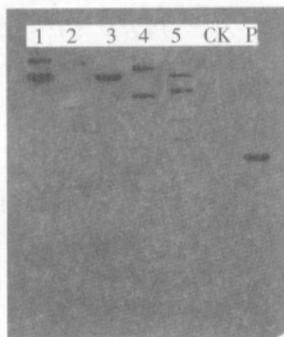
复序列引起的外源基因失活现象可能与重复序列之间异位配对 (Ectopic pair) 有关^[4]。值得注意的是,

在重复序列诱发的基因失活现象中常伴随着外源基因启动子区的甲基化现象^[5]。



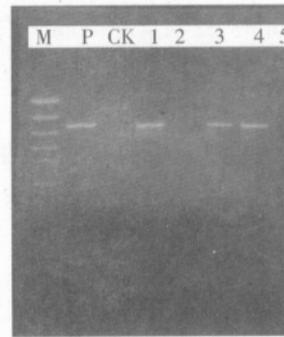
M: maker, 1-5: 转基因植株

图2 Inverse PCR



1-5: 转基因植株, CK: 对照, P: 质粒

图3 southern blot



M: maker, CK: 对照, P: 质粒, 1-5: 转基因植株

图4 RT-PCR

3 结 论

基因沉默的原因一般认为有3种情况: 位置效应的基因沉默、转录水平的基因沉默和转录后水平的基因沉默。DNA甲基化、重复序列诱发转基因失活、反式失活、共抑制等等引起外源基因沉默, 其中外源基因多拷贝引起重复串联序列诱发转基因失活在直接转化外源基因方法中经常出现问题^[5-6]。利用 Inverse PCR 方法早期分析外源基因的拷贝数, 选择低拷贝的转基因植株进行选育, 能够排除多拷贝引起的基因沉默而后代不表达的转基因植株, 减少了转基因后代的筛选工作量, 为获得稳定表达的转基因株系提供有效方法。

[参 考 文 献]

- [1] 萨姆布鲁克 J, 费里奇 E F, 曼尼阿蒂斯著 T. 分子克隆实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 1992: 19-22.
- [2] 南相日, 卫志明. 利用聚鸟氨酸提高大豆原生质体外源基因的转化效率 [J]. 实验生物学报, 1999, 32(4): 409-413.
- [3] 南相日, 刘文萍, 韩玉琴, 等. PLO 介导 PLRV-CP 基因转化马铃薯获转基因抗性植株 [J]. 黑龙江农业科学, 2004, (3): 1-3.
- [4] Stewart C N Jr., Via L E. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications [J]. Biotechniques, 1993, 14: 748-751.
- [5] 李旭刚, 谢迎秋, 朱祯. 外源基因在转基因植物中的失活 [J]. 生物技术通报, 1998, 3: 1-8.
- [6] Assaad F F, Tucker K L, Singer E R. Epigenetic repeat-induced gene silencing (RIGS) in Arabidopsis [J]. Plant Mol Biol, 1993, 22: 1067-1085.

A Quick Method to Estimate T- DNA Copy Number in Potato Transgenic Plants Using Inverse PCR

Nan Xiangri

(Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086, China)

Abstract: Inverse PCR technique was used to analyze T- DNA copy number in PLRV- CP gene transformed potato offsprings obtained by protoplasts mediated way. The results were identical to Southern Blot. Through RT-PCR analysis, low copy number transgenic plants showed positive reaction and multi- copy number showed negative reaction. It was suggested that the expression of foreign gene was influenced by the T- DNA copy number. Inverse PCR technique provides a quick and efficient way to estimate T- DNA copy number in potato transgenic plants at early stage and eliminate repeat induced gene silencing plants caused by multi- copy T- DNA number, providing a valid method to obtain a stable expression transgenic plant.

Key Words: inverse PCR; copy number; gene silencing