

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 712046)

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

中图分类号: S532

文献标识码: A

文章编号: 94047-(2017)04-047-05

马铃薯是世界上继小麦、水稻、和玉米之后的第四大粮食作物,在农业生产和人民生活中均占有重要的地位。马铃薯植株具有生长容易、生物量大,遗传转化体系较完善、转化周期较短,通过无性繁殖快繁可获得转化基因植株等特点,备受科研工作者的青睐。马铃薯是最早进行转基因研究的一种植物,也是田间实验品种最多的转基因作物之一^[1]。转基因的方法有很多种,无论采用哪种方法,最终转基因的结果都是转化细胞只能占少数,因此,可以对转化细胞进行筛选。科学研究常利用标记基因与目的基因之间的连锁关系,通过检测标记基因,从而证明目的基因的存在。目前,NPT II 基因是标记基因中应用最广泛的一种,其编码产物可使氨基糖苷类抗生素发生磷酸化而失活(如:新霉素、卡那霉素等),植物将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]。再生植株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检测。

PCR技术是在生物体外快速特异地扩增目的基因片段并进行初步检测的有效方法^[3],扩增产物经琼脂糖凝胶电泳、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。

本实验对经过工程农杆菌(含有pARTGF植物表达载体)转化的A、B、C马铃薯茎段所得愈伤组织分化苗进行卡那抗性筛选,将筛选所得抗性苗以及相应的未经转化的马铃薯茎段(作为阴性对照)为材料,进一步利用PCR技术进行鉴定,期待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

经工程农杆菌(含有pARTGF植物表达载体)转化的A、B、C马铃薯茎段所得愈伤组织分化苗;未进行转化的对应马铃薯试管苗。

1.2 引物及酶

TaqDNA聚合酶,购自大连宝生物工程有限公司;

标准DNA分子量Marker V、MarkerDL2000,购自天为时代公司;

引物gl-1/gl-6, G1/gl-6,其组成见下表。

收稿日期: 2017-11-03

作者简介: 张萍(1983—),女,陕西永寿人,讲师,研究方向:生物技术。

扩增所用引物及构成
(Table 1 Primers for fragments amplification)

引物	引物序列(5'--3') The Sequence of primer
gl-1	GC GGATCC CTC GAG ATG GCA AGC ATC ACA GCT TC
gl-6	GC ATC GAT GGT ACC AGC AGG CGG TGT ATTTT ATC G
G1	GC GAGCTC GCGGCCG GTG GAA CGG AGA CAT GTT ATG A

1.3 抗生素及其配制

(1) 头孢霉素 (250mg/ml): 称取5.0g头孢霉素溶于无菌蒸馏水, 定容至20ml, 再用0.22um滤膜过滤分装, -20℃保存。

(2) 卡那霉素 (100mg/ml): 称取2.0g卡那霉素溶于无菌蒸馏水, 定容至20ml, 再用0.22um滤膜过滤分装, -20℃保存

1.4 培养基^[4]

(1) MS1培养基: 在MS培养基的基础上将肌醇含量增加到140mg/L、蔗糖含量增加到30g/L配制而成, 用于马铃薯组培苗继代培养。MS母液^[6]配制方法如下:

母液 I (20×): 每升含 33g NH₄NO₃、38g KNO₃、8.8g CaCl₂·2H₂O、7.4g MgS·7H₂O、3.4gKH₂P O₄;

母液 II (200×): 每升含 0.166g KI、4.46g MnSO₄·4H₂O、1.24g H₃BO₃、1.72g ZnSO₄·7H₂O、0.05g Na₂MoO₄·2H₂O、0.005g CoCl₂·6H₂O、0.05g CaSO₄·5H₂O;

母液 III (100×): 每升含 5.56gFeSO₄·7H₂O、7.4gNa₂·EDTA·2H₂O;

母液 IV (200×): 每升含0.1g烟酸、0.1g盐酸吡哆醇、0.4g甘氨酸、0.02gVB₁;

(2) MS2抗性筛选培养基: 对转基因马铃薯植株进行抗性筛选, 是在MS1培养基的基础上添加70mg/L Km配制而成。

(3) MS3生根培养基: 诱导外植体形成根系, 是在MS1培养基的基础上添加70mg/L Km和300mg/L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 mol/L Tris-乙酸

57.1ml冰乙酸

0.01 mol/L EDTA

100 ml 0.5mol/L EDTA (pH8.0) 称取5g溴化乙锭 (Ethidium Bromide, EB), 溶于蒸馏水中并定容到10mL, 避光保存。用前用电泳缓冲液稀释1000倍, 使其最终浓度达到0.5 μg/mL;

1.6 其它试剂

2×CTAB溶液 (2%CTAB, 100 mmol/L pH8.0 Tris-HCl, NaCl 1.4mol/L; EDTA 20mmol/L (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 (GYECP, 北京君意东方电泳设备有限公司); 雪花机 (制冰机) (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

将马铃薯茎段所得愈伤组织分化苗剪下, 接种在MS2筛选培养基 (在MS1培养基上添加70mg/L Km) 上, 25±1℃, 1500~2000Lx光照下培养, 进行抗性筛选。

2.2 转基因马铃薯植株的PCR检测

2.2.1 转基因马铃薯植株的抗性苗的扩繁 将上述经卡那抗性筛选获得的马铃薯抗性苗A、B、C接入MS1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。

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5ml离心管中加入1ml的 $2\times$ CTAB和 $20\mu\text{l}$ β -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0.5g,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,并封口防止巯基乙醇挥发,混匀后置 60°C 水浴中保温30min,并不时轻轻转动试管;

(3) 取出CTAB离心管用冰块迅速冷却至室温后,加入等体积氯仿/异戊醇,轻轻颠倒摇晃使溶液混合均匀,室温下5000rpm离心10 min,移上清液至另一新管中;

(4) 用等量氯仿(约1ml)抽提2次,混合均匀,不应剧烈,以防DNA断裂,每次室温下5000rpm离心10min。

(5) 取上清液至另一离心管,加入2倍体积(约1.2ml)无水乙醇,轻轻混匀,5000rpm离心10min回收DNA沉淀;

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

(7) 用0.8%琼脂糖凝胶电泳检测基因组DNA的完整性。

2.2.3 PCR检测 以2.2.2中提取的抗性马铃薯植株的总DNA为模板,分别以gl-1/gl-6、G1/gl-6分别为引物,以未转化的马铃薯试管苗总DNA为模板作阴性对照,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 $2.5\mu\text{L}$ $10\times$ PCR 缓冲液, $2.0\mu\text{L}$ $4\times$ dNTP (2.5mmolPL), $1\mu\text{L}$ 引物gl-1, $1\mu\text{L}$ 引物gl-6, $0.5\mu\text{L}$ TaqDNA 聚合酶, $1\mu\text{L}$ DNA模板,加入无离子水使反应体积达到 $25\mu\text{L}$ 。

(2) PCR反应参数: 95°C 变性5min;后30个循环为 94°C 变性50s, 54°C 退火50s, 72°C 延伸1min;后 72°C 延伸10min, 4°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 $1\mu\text{l}$ $10\times$ buffer加 $5\mu\text{l}$ 样品DNA,混匀后加样,以MarkerDL2000 ($5\mu\text{l}$)为对照,以90V、100mA进行电泳。电泳进行完后,把凝胶放在EB染液中染色5分钟,用凝胶成像系统拍照。

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1~2cm,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进行盆栽,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,大部分转化苗继续生长;一小部分转化苗停止生长,2~3周内逐渐叶片枯萎、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。初步说明抗性植株有可能是转基因植株。

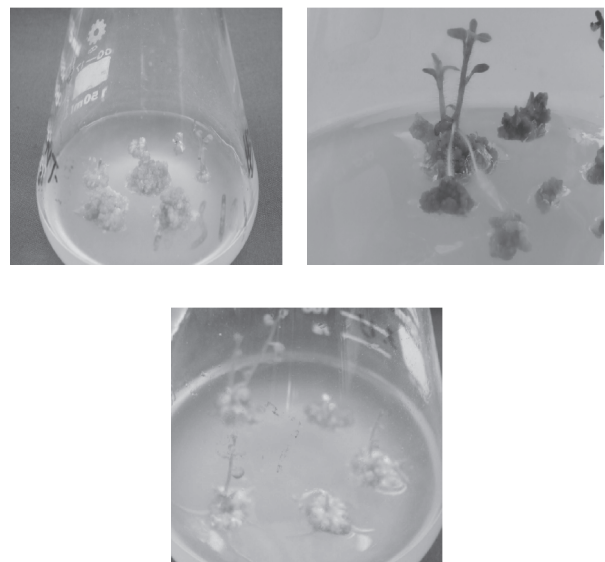


图2 经过筛选获得的马铃薯愈伤组织分化苗A、B、C

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,并可以确定样品来源于马铃薯。见图3。

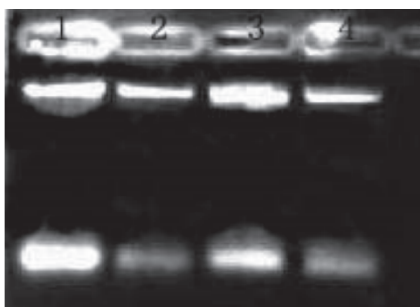


图3

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。

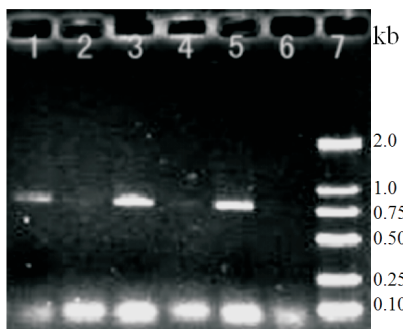


图4 以gl-1/gl-6为引物的转基因植株PCR检测

1、3、5依次为A、B、D抗性苗
2、4、6阴性对照 7 D12000

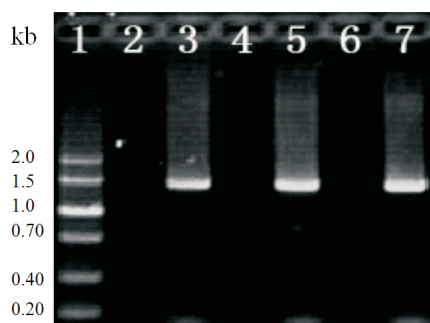


图5 以G1/gl-6为引物的转基因植株PCR检测

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提取的影响因素

马铃薯的块茎中含有多种小分子物质和糖类，这些物质均会影响马铃薯DNA的提取，从而影响PCR反应中酶的活性。本实验用CTAB提取液同时使用PVP，可除去多糖杂质的影响。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影响。

4.2 利用抗性基因和卡那抗性选择试剂的优点

给目的基因5'端加上启动子，3'端加上终止子，可使目的基因在转基因植物中有序高效表达。转基因植物的目的基因都有一个共同特性，也就是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^[5]，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^[6]，也可以此预测目的基因的遗传。

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现象。农杆菌对卡那霉素是极为敏感的^[7]，对经卡那霉素筛选存活的再生植株进行PCR检测后发现，所存活的抗性植株并未全部转入外源基因，说明产生了假转化体，它们虽没有转入外源基因却逃脱了选择压力。形成假转化体的主要原因有：①外植体的某些表层细胞稳定表达了外源抗性基因，降低了其周围培养基中卡那霉素浓度，为其他非转化细胞提供了屏障，逃避了选择压力的影响而继续分化；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, 逃避了选择压力的影响而继续分化; 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。

马铃薯是无性繁殖作物, 在理论上只要得到若干株转化植株, 就可以通过快繁得到大量的转化体。本研究中, 每代快繁培养基上均加抗性筛选, 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^⑧。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, 03(30).
- [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] 王蒂. 植物组织培养[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004, 6, 26~27.
- [5] 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(1): 95.
- [6] 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(2): 1~2.
- [7] 傅荣昭, 刘敏, 梁红健等. 通过根瘤农杆菌介导法获得菊花转基因植株[J]. 植物生理学报, 1998, 24(1): 72~76.
- [8] 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, 1.

[责任编辑、校对: 王军利]

The Resistance Selection and PCR Evaluation of the Transgenic Potato Plants

ZHANG Ping

(Xianyang Vocational Technical College, Xianyang, Shaanxi 712000)

Abstract: In recent years, transgenic engineering has been widely used in medicine, industry, agriculture, environmental protection, energy, new materials and other fields. The research progress is well-developed, and transgenic plants screening has become an essential part of transgenic engineering. In this experiment, agrobacterium with PARTGF plant expression vector was transferred into potato plants by mediated, after resistance selection by kanamycin medium, the transgenic potato plants A, B and C were screened out 5, 7 and 8 plants, The results showed that the target gene has been successfully transferred into the potato genome and get 2, 4, 5 positive plants.

Key words: transgenic, potato, resistance selection