

基因及构建特异性PCR方法检测转基因香石竹

贾军伟^{1,2}, 孙建萍², 白蓝³, 李鹏², 潘爱虎²

(¹厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005; ²上海市农业科学院生物技术研究所, 上海市农业遗传育种重点实验室, 农业部转基因植物环境安全监督检验测试中心(上海), 上海 201106; ³南京农业大学生命科学学院, 南京 210095)

摘要:以澳大利亚 Florigene 公司和日本 Suntory 公司研发的两种转基因香石竹 Moonshade、Moonlite 为研究对象, 针对内参照基因 ANS 和外源基因 F3'5'H、CHS 启动子、D8ter, 建立基因特异性定性 PCR 检测方法。此外, 分别在外源 MAC 启动子和 DFR 基因上设计 PCR 引物, 开展构建特异性 PCR 检测, 定性 PCR 方法的检测灵敏度为 0.5%。该方法的建立为转基因香石竹的进口检测、中国监管和环境安全评价提供了初步数据。

关键词:转基因; 香石竹; 基因特异性; 构建特异性; PCR 检测

中图分类号: S3

文献标志码: A

论文编号: 2010-0382

Gene and Construct-specific Qualitative PCR Detection of Transgenic Carnations

Jia Junwei^{1,2}, Sun Jianping², Bai Lan³, Li Peng², Pan Aihu²

(¹ College of Life Science, Xiamen University, Xiamen Fujian 361005;

² Biotech Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, The Supervision, Inspection and Test Center for Environmental Safety of GM Crops of MOA, Shanghai 201106;

³ College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: In this study, In view of the endogenous reference gene ANS and the exogenous genes such as F3'5'H, CHS promoter, D8ter, the gene and construct - specific qualitative PCR detection methods were established for transgenic carnations——Moonshade, Moonlite which were developed by Japanese Suntory company and Australian Florigene company. In addition, PCR primers were designed respectively in the exogenous MAC gene promoter and the DFR gene, construct - specific qualitative PCR detection was carried out. The detection sensitivity reached 0.5%. The establishment of this method provides preliminary data for the transgenic carnation import detection, domestic supervision and environmental safety assessment.

Key words: transgenic; carnation; gene-specific; construction-specific; PCR detection

0 引言

香石竹 (*Dianthus caryophyllus* L.), 又名康乃馨, 石竹科石竹属多年生草本植物, 是当代世界主要的切花品种。其生产面积和销售量居切花品种之首, 全球生产总面积已达 8700 多 hm²^[1]。尽管传统育种方法在香石竹遗传改良方面取得了显著成就, 但仍不能满足

当前市场对优质花色品种的需求。随着生物技术的飞速发展, 基因工程已经广泛应用于花卉育种。从 1987 年首例基因工程改造花色以来, 已在多种植物上成功地进行了花色、花形、花香、花寿命等基因工程操作^[2]。目前, 以基因工程技术为核心的现代分子育种技术成为香石竹育种的重要研究方向。

基金项目:上海市科技兴农重点攻关项目“转基因植物田间试验监测技术体系建立和产品检测方法研究”(沪农科攻字 2008 第 8-9 号)。

第一作者简介:贾军伟, 男, 1970 年出生, 副研究员, 主要从事转基因植物检测和环境安全评价的研究。通信地址: 201106 上海市北翟路 2901 号上海市农科院生物所。Tel: (021)62208750, E-mail: jwjia1126@gmail.com。

通讯作者:潘爱虎, 男, 1976 年出生, 副研究员, 主要从事转基因植物检测和环境安全评价的研究。通信地址: 201106 上海市北翟路 2901 号上海市农科院生物所。Tel: (021)62208750, E-mail: aihup@yahoo.com.cn。

收稿日期: 2010-02-03, **修回日期:** 2010-03-15。

澳大利亚 Florigene 公司和日本 Suntory 公司从杂交矮牵牛中克隆到二氢黄酮醇-4-还原酶基因 (Dihydroflavonol-4-Reductase, DFR) 基因和类黄酮-3',5'-羟基化酶基因 (Flavonoid-3',5'-Hydroxylase, F3' 5' H) 基因, 构建载体 pCGP1470 并通过农杆菌介导转化白色的香石竹品种 FE123, 经筛选获得花色呈蓝紫色的转基因香石竹^[3-4]。月之霓裳 (Moonshade)、月之伊人 (Moonlite) 是其中的两个品系。该香石竹是在中国进行环境安全评价中间试验的第一例商业化的转基因花卉。笔者针对这两种转基因香石竹的内源基因 ANS 以及外源基因 F3' 5' H、CHS、D8ter 进行定性 PCR 检测, 设计 PCR 引物, 优化反应条件, 建立了适用于转化载体 pCGP1470 的转基因香石竹的基因特异性 PCR 检测方法。在此基础上, 分别在 MAC 启动子和 DFR 基因上设计 PCR 引物, 进行构建特异性的 PCR 检

测, 并探索了定性 PCR 反应的最低检测限, 为转基因香石竹的进口检测、中国监管及环境安全评价提供初步数据。

1 材料与方法

1.1 材料

转基因香石竹品系月之霓裳 Moonshade、月之伊人 Moonlite 与亲本 FE123 的插条由澳大利亚 Florigene 公司提供。图 1 为该转基因香石竹所用的质粒 pCGP1470 示意图。SuRB 是变异的乙酰乳酸合成酶基因, 来源于烟草。CHS 启动子来源于金鱼草, 控制目的基因在花瓣上皮细胞高水平表达。F3' 5' H 和 DFR 共同控制翠雀花素的合成。MAC 启动子控制 DFR 基因的表达。

D8ter 和 MAS 终止子来源于杂交矮牵牛和农杆菌。其他花卉材料阴性对照购自上海花卉市场。

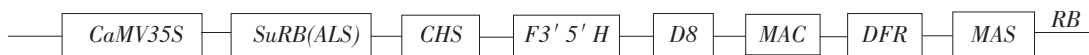


图1 pCGP1470质粒示意图

1.2 试剂

dNTP Mixture、10×PCR buffer(含 Mg²⁺)、DL2000 DNA Marker、Taq DNA 聚合酶、核糖核酸酶(RNaseA)等均购自宝生物工程(大连)有限公司, 其它试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器设备

SYNGENE 自动凝胶成像分析系统、VERITI PCR 扩增仪、电泳仪、Biophotometer 核酸蛋白分析仪。

1.4 PCR 引物

根据转基因香石竹内源基因 ANS、外源基因 F3' 5' H、CHS、D8ter、MAC、DFR 基因序列设计 PCR 引物。引物由英潍捷基上海贸易有限公司 (Invitrogen) 合成,

各引物序列、扩增片段长度及其性质见表 1。

1.5 DNA 的提取与纯化

取适量香石竹叶片或其它植物材料, 液氮研磨至粉状, 参照农业部标准方法进行植物材料总 DNA 的提取和纯化^[5]。采用紫外分光光度法测定 DNA 浓度和纯度。

1.6 PCR 体系及反应条件

PCR 反应体系见表 2, 反应条件见表 3。

每个样品设两个平行反应。设置阳性对照、阴性对照和空白对照。

PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 以 DL2000 为分子量标记。应用凝胶成像系统储存图像并分析。

表1 转基因香石竹 PCR 检测所用引物

检测基因	引物名称	引物序列(5'-3')	PCR 产物大小(bp)	基因来源
内源基因 ANS	ANS-1F	CGTCCAAATTCACGCTAIGTCTC	359	香石竹内源
	ANS-2R	GGAGGTCACCATACCCGTGAAG		
基因特异性 F3' 5' H	F35H-1F	CATGCATAGTCGATGGTTATTAC	218	矮牵牛外源
	F35H-2R	CTTGGAGTAACCATAGCTTCAAG		
基因特异性 D8ter	D8ter -1F	TTGTTTTACAACCCAATCCTCA	286	矮牵牛外源
	D8ter -2R	TCAGTCTCCCGTGTAATCCTT		
基因特异性 CHS	CHS -1F	TTTTTCTTGTAGTGGGCATCCT	271	金鱼草外源
	CHS -2R	GTACATTTGCATTGTCTCGAA		
构建特异性 Mac1-DFR	Mac1-1F	CGCGGGTATTCTGTTTCTATTTC	835	
	DFR -2R	AAGTTTTTGTGCTCTTGCACA		

表2 转基因香石竹PCR检测的反应体系

试剂	储备液浓度	加入PCR反应体系的体积/ μL
10 \times PCR Buffer (含 Mg^{2+} , TaKaRa)	-	3.0
dNTPs	2.5 mmol/L	3.0
上游引物 5' primer	10 pmol/ μL	1.0
下游引物 3' primer	10 pmol/ μL	1.0
Taq 酶	5 U/ μL	0.3
DNA 模板 DNA template	100ng/ μL	2.0
ddH ₂ O	-	补足反应体积 30 μL

注:反应体系中各试剂的量可根据实际情况或不同的反应总体积进行适当的调整。

表3 转基因香石竹PCR扩增反应条件

基因名称	变性	扩增条件	循环次数	最终延伸
ANS、F35H、D8ter、CHS	94 $^{\circ}\text{C}$ 5min	94 $^{\circ}\text{C}$ 30s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30s	35	72 $^{\circ}\text{C}$ 7min
Mac1-DFR	94 $^{\circ}\text{C}$ 5min	94 $^{\circ}\text{C}$ 30s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5min	35	72 $^{\circ}\text{C}$ 7min

注:反应条件可根据不同的仪器适当调整。

2 结果与分析

2.1 ANS 内源基因的特异性PCR检测

用香石竹花青素合成酶基因作为内标准基因对转基因香石竹、非转基因香石竹试样进行了PCR扩增。结果所有香石竹样品中均被扩增出了359 bp的PCR产物,空白对照以及其它对照物种均没有扩增出目的片段(图2)。

2.2 基因特异性PCR检测

对转基因香石竹的外源基因F3'5'H、D8ter、CHS基因进行PCR扩增,PCR产物经琼脂糖凝胶电泳分析表明,转基因香石竹Moonshade及Moonlite中分别检出了F3'5'H基因、D8终止子、CHS启动子,且片段大小与目的基因片段大小相符。同时,矮牵牛中检出F3'5'H和D8ter基因,金鱼草中检出CHS启动子,阴

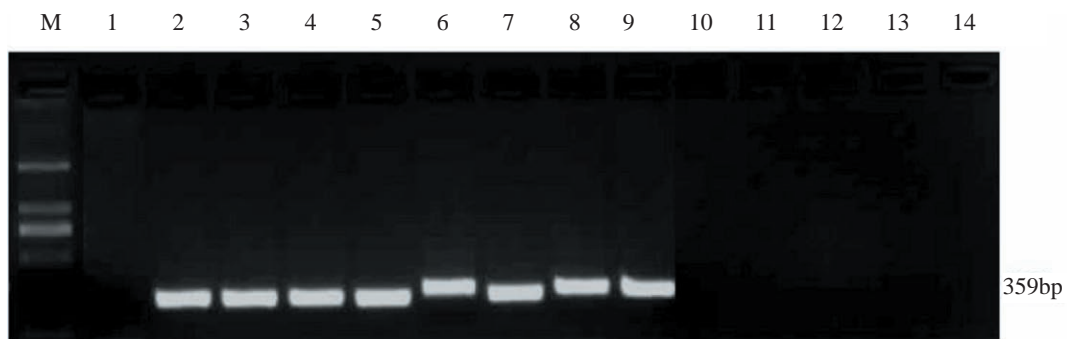
性对照和空白对照中未出现PCR产物(图3)。

2.3 构建特异性PCR检测

在基因特异性检测的基础上,分别在MAC基因上设计了左侧引物,DFR基因上设计了右侧引物,进行构建特异性的定性PCR检测。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳分析表明,转基因香石竹Moonshade及Moonlite中检出了与设计相符的片段,而矮牵牛与金鱼草中均未扩增出该片段,阴性对照和空白对照中未出现PCR扩增产物(图4)。

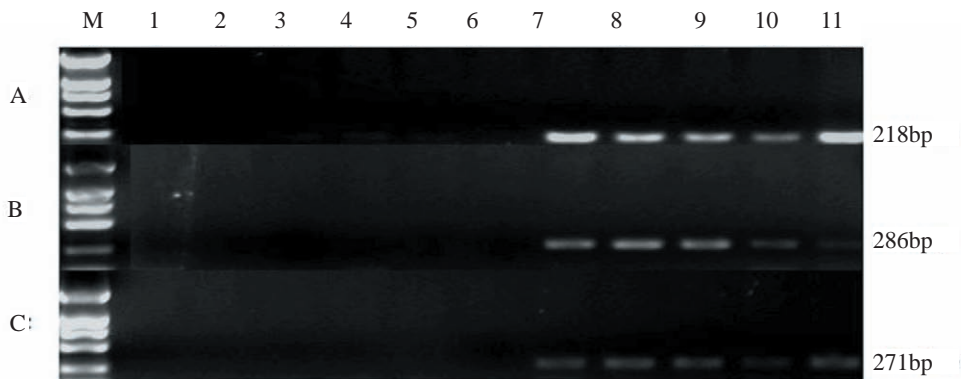
2.4 PCR扩增灵敏度检测

为了解此研究中PCR扩增的灵敏度,分别对转基因香石竹外源基因D8ter及构建特异性基因Mac1-DFR进行灵敏度检测试验,比较了转基因成分含量不同的DNA作为模板进行扩增的结果(图5)。结



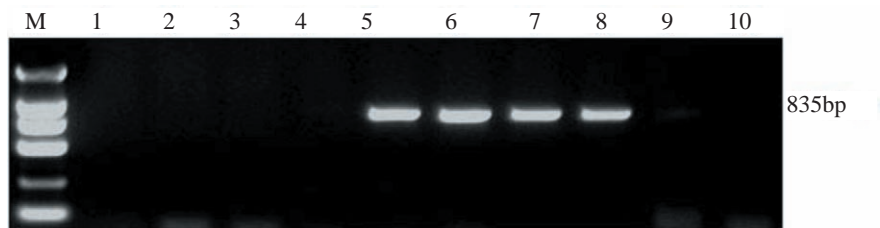
M: DNA marker DL-2000; 1: 空白对照; 2-3: 非转基因香石竹; 4-5: 转基因香石竹亲本 FE123; 6-7: 转基因香石竹 Moonshade; 8-9: 转基因香石竹 Moonlite; 10: 矮牵牛; 11: 金鱼草; 12: 大豆; 13: 玉米; 14: 棉花。

图2 内标准基因的PCR检测结果



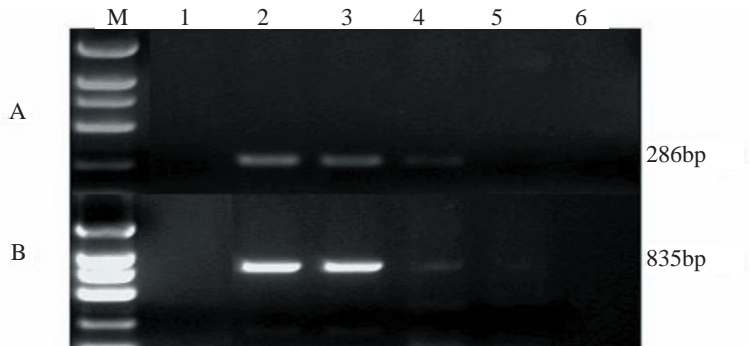
A: 转基因香石竹 F3' 5' H 的 PCR 检测结果; B: 转基因香石竹 D8ter 的 PCR 检测结果; C: 转基因香石竹 CHS 的 PCR 检测结果; 1-2: 空白对照; 3-4: 非转基因香石竹; 5-6: 转基因香石竹亲本 FE123; 7-8: 转基因香石竹 Moonshade; 9-10: 转基因香石竹 Moonlite; 11(图 A、图 B): 矮牵牛; 11(图 C): 金鱼草; M: DNA marker DL2000。

图3 外源基因的 PCR 检测结果



M: DNA marker DL-2000; 1-2: 空白对照; 3-4: 非转基因香石竹; 5-6: 转基因香石竹 Moonshade; 7-8: 转基因香石竹 Moonlite; 9: 矮牵牛; 10: 金鱼草

图4 外源基因 Mac1-DFR 的 PCR 检测结果



A: 用 D8ter 对不同含量转基因成分的扩增; B: 用特异性引物 Mac1-DFR 对不同含量转基因成分的扩增; M: DNA marker DL-2000; 1: 空白对照; 2-6: 转基因香石竹的 DNA 质量分数分别为 10.0%、3.0%、0.5%、0.1%、0.05%。

图5 对不同含量转基因成分的检测

果显示: 对于转基因香石竹的 DNA 质量分数为 0.5% 的样品, 分别在 286 bp 和 835 bp 处均能扩增到条带, 且随着阳性 DNA 含量的增加, 扩增条带亮度增加, 说明这两对引物的特异性较好, 灵敏度较高。

3 讨论

笔者根据 Florigene 公司提供的香石竹序列信息, 设计并合成了香石竹花青素合成酶基因(ANS)片段的引物, 对转基因香石竹及其亲本、非转基因香石竹、矮牵牛、金鱼草、大豆、玉米、棉花等物种进行了 PCR 扩增。结果表明, 所有香石竹试样中均被扩增出 359 bp

的 PCR 产物, 空白对照和其它物种中没有扩增出目的片段, 表明该基因是香石竹特有的内源基因。在转基因香石竹 Moonshade 及 Moonlite 中, 分别检出了 F3' 5' H、D8ter、CHS 基因, 且片段大小与目的基因片段相符, 在矮牵牛中检出 F3' 5' H 和 D8ter 基因, 在金鱼草中检出 CHS 基因, 从而对这些基因的来源进行了复核验证。

该文以转基因香石竹 Moonshade、Moonlite 为供试材料, 建立了适于转基因香石竹基因特异性检测和构建特异性检测的定性 PCR 方法。结果表明: 该方法特异性强, 可用于经载体 pCGP1470 遗传转化的转基因

香石竹的特异性检测;检测灵敏度较高,可达到0.5%的检测限,高于欧盟标准的要求(0.9%)。构建特异性引物可用于扩增Mac启动子和DFR基因之间的片段,其检测的特异性相对更高,有利于减少在检测过程中形成的交叉污染,提高检测的准确性。转基因香石竹月之清辉Moondust也是经质粒pCGP1470遗传转化获得,因此转基因香石竹Moonshade、Moonlite的基因和构建特异性检测方法同样适合于月之清辉Moondust品系。

此文建立的是基因特异性和构建特异性定性PCR检测方法,虽然该方法的检测灵敏度比较高,但无法象定量PCR方法一样准确检测供试材料中转基因成分的含量。目前,对转基因作物品系特异性定量PCR检测的报道越来越多^[6-8],随着国家对转基因生物监管力度的加大、转基因检测的标准化及其国际贸易对标准、检测方法互认的需求,定量PCR检测将成为重要的发展方向。笔者正在积极开发适合转基因香石竹定量检测的方法,为转基因香石竹的进口检测、安全监管和环境安全评价提供科学依据。

参考文献

- [1] 黄坚,顾其祥,池坚.香石竹生产技术[M].北京:中国农业出版社, 2004:4-5.
- [2] 李美茹,陈金婷,孙梓健,等.花卉分子育种的研究进展[J].热带亚热带植物学报, 2003,11(1):87-92.
- [3] Raghothama K G, Lawton K A, Goldsbrough P B, Woodson WR. Characterization of an ethylene-regulated flower senescence related gene from carnation[J].Plant Molecular Biology, 1991,17(1): 61-71.
- [4] Park K Y, Drory A, Woodson W R. Molecular cloning of an 1-aminocyclopropane -1- carboxylate synthase from senescing carnation flower petals[J].Plant Molecular Biology, 1992,18(2): 377-386.
- [5] 中华人民共和国农业部. NY/T 674-2003 中华人民共和国农业行业标准:转基因植物及其产品检测——DNA提取和纯化[S].北京:中华人民共和国农业部. 2003.
- [6] Pan Ai-hu, Yang Li-tao, Xu Song-ci, et al. Event-specific qualitative and quantitative PCR detection of MON863 maize[J]. Journal of Cereal Science, 2006,43: 250 - 257.
- [7] Isabel Taverniers, Pieter Windels, Marc Vařtilingom, et al. Event-Specific Plasmid Standards and Real-Time PCR Methods for Transgenic Bt11, Bt176, and GA21 Maize and Transgenic GT73 Canola. J. Agric. Food Chem. 2005,53:3041-3052.
- [8] Yang Li-tao, Pan Ai-hu, Zhang Hai-bo, et al. Event-Specific Qualitative and Quantitative Polymerase Chain Reaction Analysis for Genetically Modified Canola T45[J]. J. Agric. Food Chem. 2006, 54:9735-9740.