

文章编号: 0529-6579 (2000) S2-0052-04

用于转基因植株检测的 DNA 快速微量提取方法*

卫剑文, 许新萍, 李宝健

(中山大学生物工程研究中心, 广州 510275)

摘 要: 建立了一个用于转基因小苗检测的 DNA 快速微量方法. 每 20 mg 新鲜叶片可提出约 10 μ g DNA, 且 DNA 有较好的完整性, $A_{260/280}$ 值在 1.7~1.9 范围内, 并适合于点杂交和 PCR 分析.

关键词: DNA 快速微量提取方法; 点杂交; PCR; 转基因小苗

中图分类号: Q812 **文献标识码:** A

随着植物组织培养技术和转化技术的不断改进, 目前植物转化效率有了很大的提高, 因而转化体的鉴定工作也就更为繁重. 提取植物 DNA 是进行 DNA 分子鉴定的重要环节. 常用的植物 DNA 提取方法^[1,2] 尽管 DNA 得率和纯度都较高, 但需要的植物材料多, 不能用于对转基因小苗进行早期鉴定; 而且操作繁琐、花费时间, 尤其检测大量转基因植株时, 工作量相当大. 为了快速、准确的对大量转化再生小苗进行早期分子检测, 参考 Doyle 等^[1] 的 CTAB 法, 设计了一种可以快速提取少至 10 mg 植物幼嫩叶片 DNA 的方法. 且证明使用该方法提取的 DNA 用于点杂交和 PCR 分析, 可以得到准确的鉴定结果.

1 材料与方 法

1.1 植物材料

供试水稻 (*Oryza sativa*, L.) 品种为台北 309. 水稻转化按照许新萍等^[3] 方法进行, 将含有 B.t. 基因的质粒 pFWZ16 与含有 hpt 基因的质粒 p35H 混合包裹在金粉上, 轰击转化台北 309 的胚性愈伤组织, 经过筛选和再生培养, 得到潮霉素抗性小苗用于分子检测.

1.2 试 剂

植物 DNA 提取缓冲液 2 $\times$ CTAB: ρ = 2% CTAB, 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 20 mmol/L EDTA (pH 8.0), 1.4 mol/L NaCl, ρ = 1% PVP-4000, ϕ = 0.2% β -巯基乙醇.

快速微量提取缓冲液 1 $\times$ CTAB: 由 2 $\times$ CTAB 稀释而成.

* 基金项目: 国家转基因植物研究与产业化专项资助项目 (J99-B-012); 华南生物技术研究中心重点资助项目 (950897)

收稿日期: 2000-01-03; 作者简介: 卫剑文 (1973~), 男, 讲师, 现在中山大学生物化学系工作.

1.3 植物 DNA 的快速微量提取

(1) 当转化再生小苗长出 3~4 片小叶时, 剪取一片嫩叶 (质量约 10~20 mg), 放入干净的 1.5 mL Eppendorf 管中;

(2) 将盛有叶子的 Eppendorf 管置于液氮中冷冻, 迅速用自制的小型玻璃研钵将叶片研磨成粉末状, 加入 400 μ L 60 $^{\circ}$ C 预热的 1 $\times$ CTAB 提取缓冲液, 混匀, 60 $^{\circ}$ C 恒温水浴 1 h;

(3) 加入 500 μ L 氯仿:异戊醇 (体积比为 24:1) 抽提一次 (12 000 r/min, 10 min);

(4) 吸取上清转移至新的 Eppendorf 管中, 加入等体积异丙醇, 室温放置 15~30 min, 离心沉淀 DNA (12 000 r/min, 10 min);

(5) 用 φ =70% 乙醇洗涤 DNA 沉淀, 离心, 去除乙醇;

(6) 待沉淀干燥后加 20 μ L TE (pH 8.0) 溶解, 于 -20 $^{\circ}$ C 保存.

1.4 植物 DNA 的中量提取

参照 Doly 等^[1]方法进行.

1.5 点杂交、PCR 分析和 Southern 杂交

1.5.1 点杂交 使用 36 孔点膜器, 点样方法参照卢圣栋等^[4]的方案进行, 以 0.2 ng pFZW16 质粒作正对照, 5 μ g 未转化植株 DNA 为负对照, 转化植株 DNA 点样量均为 5 μ g. 以由范云六教授提供的 B.t. 基因片段 (1.8 kb) 为探针, 按随机引物法 (Promega 公司的 Prime-a-Gene[®] Labeling System) 用 α - P^{32} dCTP 标记该片段, 分子杂交按 Sambrook 等^[5]方法进行.

1.5.2 PCR 检测 使用 Perkin Elmer 公司的 DNA Thermal Cycle 480 型 PCR 扩增仪和华美生物工程公司的 PCR Amplification System B. B.t. 基因扩增引物为: Primer1: 5' 端 5'GAA GGA TTG AGC AAT CTC TA 3' (301-320); Primer2: 3' 端 5'CAA TCA GCC TAG TAA GGT CG 3' (601-582). 扩增目的片段大小为 300 bp. 扩增反应为: ①预变性 94 $^{\circ}$ C 3 min; ② 94 $^{\circ}$ C 40 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min 共 5 个循环; ③ 94 $^{\circ}$ C 40 s, 57 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min 共 5 个循环; ④ 94 $^{\circ}$ C 40 s, 54 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min 共 20 个循环; ⑤ 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min; ⑥ 4 $^{\circ}$ C 贮存.

1.5.3 Southern 杂交 5 μ g 植物 DNA 未酶切和酶切 (*Hind* III, Promega) 样品, 0.02 ng pFZW16/*Hind* III 经电泳后按毛细管转移法^[6]转移到尼龙膜 (Nylon membrane charge modified, Sigma) 上, 分子杂交方案与点杂交相同.

2 结果和讨论

待转化再生小苗长出 3~4 片叶时, 用微量法提取 DNA. 由图 1 可见快速微量提取法所得的 DNA (2~4 道) 与中量提取法所得的 DNA (5~6 道) 一样均在高分子量区有明显的主带, 说明微量提取法提取的 DNA 有较好的完整性. 且 DNA 得率可达 10 μ g DNA/20 mg 叶片, 所得 DNA $A_{260/280}$ (在 260~280 nm 范围内测定其吸光度) 值在 1.7~1.9 范围内. 使用该方法花 3 d 时间提取了 600 多株转基因水稻再生小苗的 DNA, 对 612 个样品进行了点杂交分析, 图 2 是部分样品的检测结果. 大部分转基因植株 DNA 呈阳性结果 (点 A4、A6-8、A10-12、B1-2、B4-7、B9-10、C2、C4、C6、C8-10、C12), 而未转化植株和小部分转化植株不能与探针杂交, 为阴性结果 (点 A2、A3、A5、A9、B3、B8、B11-12、C1、C3C5、C7、C11). 同时对部分植株进行了 PCR 检测, 电泳结果表明 (图 3) 点

杂交呈阳性的转基因植株 DNA (4、6~8、10~11、13~15 道) 在 300bp 的位置上出现特异性扩增带, 而未转化植株及 3 株点杂交阴性植株 (3、5、9、12 道) 则没有, 这说明 PCR 与点杂交结果相吻合。

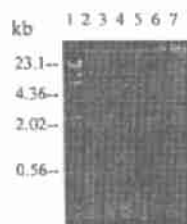


图 1 植物 DNA 电泳结果

- 1 λ /HindIII marker;
2~4 快速微量提取法所得 DNA;
5~6 中量提取法所得 DNA

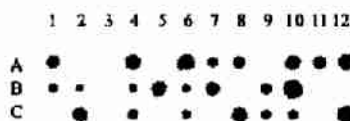


图 2 使用 B.t. 基因探针对转基因植株的点杂交分析

- A1 pFWZ16 质粒 (正对照);
A2 未转化植株基因组 DNA (负对照);
A3~A12, B1~B12, C1~C12 转化植株基因组 DNA

待转基因水稻植株长到分蘖期, 任选部分点杂交及 PCR 阳性植株, 按中量提取方法提取 DNA 进行 Southern 杂交分析。由图 4 可见, 未酶切的基因组 DNA (2, 6, 8 道) 与 B.t. 探针杂交时在较高相对分子质量 DNA 区域呈阳性信号, 较小相对分子质量 DNA 区域没有杂交信号。HindIII 酶切质粒 pFWZ16 可切下一段 4.5 kb 大小的 B.t. 嵌合基因片段, 经 HindIII 酶切的基因组 DNA (1, 7, 9 道) 在 4.5 kb 处出现明显的杂交主带, 与质粒对照 (4 道) 一致, 而未转化植株基因组 DNA 未酶切 (3 道) 与 HindIII 酶切 (5 道) 样品均呈阴性, 由此可见, B.t. 基因已经整合到水稻基因组中。Southern 杂交与点杂交及 PCR 分析结果相符, 说明使用该方法提取的 DNA 用于点杂交和 PCR 分子鉴定, 其结果是准确的。



图 3 转化植株基因组 DNA PCR 扩增结果

- 1 PCR marker; 2 pFWZ16 (正对照);
3 未转化植株基因组 DNA (负对照);
4~15 转化植株基因组 DNA

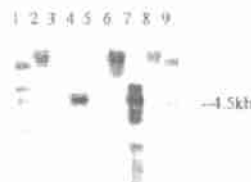


图 4 转化植株基因组 DNA Southern blot 分析

- 1, 7, 9 经 HindIII 酶切的转化植株基因组 DNA;
2, 6, 8 未酶切转化植株基因组 DNA;
4 HindIII 酶切的 pFWZ16;
3, 5 未转化植株基因组 DNA, 酶切(3)或未酶切(5)

这种植物 DNA 快速微量提取方法取材少, 可在苗期进行分子鉴定, 淘汰不含目的基因的转化植株, 从而减少以后的工作量; 且操作简便, 省略了 RNA 酶及酚抽提等步骤, 同时也避免了过多的机械剪切, 可在短时间内提取大量的样品, 这在分析目的基因在转基因后代中遗传分离状况时就更具优越性。

参考文献:

- [1] DOYLE, et al. Isolation of plants DNA from fresh tissue. *Focus*, 1990, 12 (1): 13 ~ 15.
- [2] MURRAY M G, et al. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acids Res*, 1980, 8: 4321 ~ 4325.
- [3] 许新萍, 等. 用基因枪法转化水稻获得转基因植株. *中山大学学报 (自然科学版)*, 1997, 36 (6): 25 ~ 29.
- [4] 卢圣栋, 等. 现代分子生物学实验技术. 北京: 高等教育出版社, 1993.
- [5] SAMBROOK J, et al. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989.
- [6] SOUTHERN E M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 1975, 98: 503 ~ 517.

Rapid Isolation of Small Amounts of Plant DNA for Transgenic Plant Analysis

WEI Jian-wen^{*}, XU Xin-ping, LI Bao-jian

Abstract: A simple rapid DNA extraction method for transgenic plant analysis is established. About 10 μg genomic DNA can be extracted from 20 mg fresh plant leaf. $A_{260/280}$ of DNA is 1.7 ~ 1.9. They are suitable for dot blot techniques and PCR analysis.

Keywords: rapid isolation of small amounts of DNA; dot blot; PCR; transgenic plant

^{*} School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China