

利用转基因标记 *NPT II* 快速、规模化纯合转基因番茄

欧阳波^{1,2}, 龙芳², 张扬勇², 叶志彪^{1*}

(1. 作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070; 2. 华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070)

摘要: 利用卡那霉素喷施方法对带有 *NPT II* 标记基因和双价外源基因(烟草醇调蛋白基因 *AP24* 和菜豆几丁质酶基因 *Chi*) 的转基因番茄的 3 个世代在温室或田间环境进行规模化筛选, 成功获得 8 个单拷贝转基因纯合植株。含有单个拷贝 *NPT II* 标记基因的转基因株系后代, 对卡那霉素的抗感分离符合 3:1 的孟德尔分离比例, T_2 代中一些株系表现为对卡那霉素全抗, 表明这些株系的外源基因已经纯合, 这一结果在 T_3 代中进一步得到证实。但对于含有两个拷贝外源基因的转基因株系, 外源基因的遗传则比较复杂。同时, 结合 Km 喷施和多重 PCR 技术对外源基因的异常遗传进行了初步分析。用 PCR 分析进一步证实了该方法的准确性, 该方法是对转基因番茄进行大规模、快速遗传分析的理想方法。

关键词: *NPT II*; 卡那霉素; 多重 PCR; 转基因番茄; 遗传分析

中图分类号: Q3-3

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2006)01-0012-05

Rapid and Large-scale Genetic Analysis of Transgenic Tomato by *NPT II* Marker

OUYANG Bo^{1,2}, LONG Fang², ZHANG Yang-Yong², YE Zhi-Biao^{1*}

(1. National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Wuhan 430070, China;

2. College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Transgenic tomato plants with tobacco osmotin gene *AP24* and bean basic chitinase gene *Chi* together with the *NPT II* marker gene were screened by kanamycin spraying test for several generations. The transgenic offspring of single copy lines showed the expected 3:1 segregation ratio, and absence segregation patterns for some lines were detected in T_2 seedlings, which indicated they were homozygous lines. Some of the homozygous lines were further checked on the T_3 generation. More than 8 different homozygous transgenic lines were obtained in this experiment. However, as to double copy transgenic lines, the inheritance of transgenes are complex. Multiplex-PCR analysis was introduced into investigation of abnormal transgene segregation. The accuracy of this method was confirmed by PCR analysis, it is an optimal method in rapid and large-scale screening of transgenic tomato plants with *NPT II* marker in open field, and this method may be extend to other crops easily.

Key words: *NPT II*; Kanamycin; Multiplex-PCR; Transgenic tomato; Genetic analysis

在植物转基因研究中, 标记基因对于转化体的筛选十分重要, 以往的研究在这方面做了大量的工作^[1]。在转基因材料的利用中, 外源基因的快速纯合是育种利用的必要前提, 而遗传分析则是调查外源基因遗传稳定性的一个重要环节。PCR, Southern 分子杂交以及免疫杂交等方法由于成本高昂、耗时耗力均不适合大规模的遗传分析。充分利用标记基因的直观效果进行外源基因遗传稳定性研究和规模化的材料纯合的报道则比较少见。

NPT II 基因是植物转基因研究中应用最广泛的标记基因, 一些研究利用抗生素在培养基中筛选该

标记基因^[2-4]。直接在培养基中加入 Km 来筛选转基因植株的方法似乎简单, 但多数时候对不含标记基因的植株是致死的, 在幼苗移栽时则遇到移栽死苗率高的问题, 而且对多个株系进行操作时十分复杂, 因此很难对转基因后代进行大规模的遗传分析。另一些研究人员则将研究工作转移到温室或大田中, 马丽华等^[5]用 Km 溶液涂抹田间棉花叶片快速地鉴别出了转 *Bt* 基因抗虫棉。Weide 等^[6]对卡那霉素喷施用于检测 *NPT II* 基因进行了初步探讨, 但未见其具体应用研究, 且其研究在温室条件下进行, 条件限制严格, 研究结果也没有 PCR 技术进行分子

收稿日期: 2005-07-04, 修回日期: 2005-11-30。

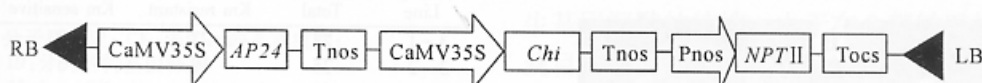
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30270914)。

作者简介: 欧阳波(1973-), 男, 博士, 副教授, 从事植物分子生物学研究; 叶志彪, 教授, 博士生导师, 从事植物分子生物学研究。

* 通讯作者(E-mail: zbye@mail.hzau.edu.cn)。

鉴定。

本试验以带有 *NPT II* 标记基因的转基因番茄为材料,利用卡那霉素喷施 (Kanamycin spraying test) 方法直接用于转基因番茄后代的遗传分析,快捷地获得了转基因番茄纯合株系,并对 Km 喷施方法的效果进行了 PCR 验证,使其能直接应用于田间转基因植株的规模化筛选。同时结合 Km 喷施和多重 PCR 对外源基因的遗传进行了初步分析。



RB:右边界;LB:左边界;Pnos:Nos 启动子;*NPT II*:*NPT II* 标记基因;Tnos:Nos 终止子;Tocs:Ocs 终止子;CaMV35S:35S 启动子;*AP24*:烟草渗透调节蛋白基因;*Chi*:菜豆几丁质酶基因
RB:Right border; LB:Left border; Pnos:Nopaline synthase gene promoter; *NPT II*:Neomycin phosphotransferase gene; Tnos:Nopaline synthase terminator; Tocs:Octopine synthase terminator; CaMV35S:Cauliflower mosaic virus 35S promoter; *AP24*:Tobacco 24 kD osmotin gene; *Chi*:Bean basic chitinase gene

图1 质粒 pHAC35 的 T-DNA 区结构示意图

Fig. 1 Diagram of the T-DNA region of the binary vector pHAC35

(*Agrobacterium tumefaciens*) 介导的转化方法获得,其选择标记为 *NPT II* 基因。对照材料为 A53。

1.2 温室 Km 喷施试验

转基因植株后代和对照材料种子用 10% 的 Na_3PO_4 溶液处理 20 min,清水冲洗后播种于塑料钵,每钵 30~60 粒种子。三叶一心期在叶面均匀喷洒 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的卡那霉素 (Km, Amresco 公司产品) 溶液,平均每钵喷 40~50 mL,连续喷施 3 d,期间停止浇水,5~7 d 后调查结果。叶面出现褪绿斑点的植株计为阴性植株。

1.3 田间 Km 喷施试验

番茄种子用 10% 的 Na_3PO_4 处理 20 min,清水冲洗后条播于育苗床,每株系 30~60 粒种子。三叶一心期在叶面均匀喷洒 $120 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的卡那霉素溶液,喷洒至叶面有水滴落为止,重复喷 2~3 次,连续喷施 3 d,期间停止浇水。如遇雨天,则用塑料薄膜覆盖。5~7 d 后调查结果。

1.4 PCR 检测与 Km 喷施结果的验证

为检测 Km 喷施的效果,在试验前随机挑选一个单拷贝株系的 19 个植株和 1 个没有转化的对照植株,参照 Ouyang 等^[7] 的方法:小量法抽提 DNA 并利用 *NPT II* 基因的引物 (Forward: 5'-AGACAATCG-GCTGCTCTGAT-3'; Reverse: 5'-TCATTTCAAC-CCCAGAGTC-3') 进行 PCR 扩增,扩增产物用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测,理论扩增条带为 740 bp。

1.5 Multiplex-PCR 检测外源基因的遗传行为

在喷施 Km 后双拷贝的一些植株遗传行为比较

1 材料和方法

1.1 转基因番茄材料

转基因番茄亲本为番茄自交系 A53 (*Solanum lycopersicum* cv. A53),导入的外源基因为双价病程相关蛋白基因 (菜豆几丁质酶基因 *Chi* 和烟草渗透调节蛋白基因 *AP24*,构建于质粒 pHAC35 中),其 T-DNA 的结构见图 1。转基因番茄通过根癌农杆菌

复杂,从 T_2 代中随机选取 27 株敏感植株和 19 株抗性植株提取 DNA,利用 Multiplex-PCR 检测标记基因和目的基因 *Chi* (*Chi* 基因引物为 Forward: 5'-AGTG-GTGTGGATGCTGTAG-3', Reverse: 5'-GAAGGTG-GACCTGGA TATGA-3',理论扩增带大小为 210 bp)。25 μL 扩增反应液中含 2.5 μL PCR 反应缓冲液 (MBI fermentas), 1.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 4 条引物各 40 $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs, 1.25 U Taq DNA 聚合酶和 2 μL 模板 DNA。扩增在 PTC-100 PCR 仪 (M. J. Research, Inc.) 上进行,扩增程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 58 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min, 35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存扩增产物。扩增产物用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 数据分析

根据转基因番茄分子杂交预测的外源基因拷贝数,利用卡方检测 (Kai square test) 外源基因的分离比例,显著水平为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 T_1 代 Km 喷施结果

T_1 代播种于温室,喷施 Km 6 d 后调查结果。从对照植株上可以看到明显的褪绿斑点,而转基因株系则表现为明显的性状分离 (图 2: A, B)。从 3 个单拷贝转基因植株 (3、12、42) 的后代 (T_1) 对 Km 抗性的分离来看,均符合 3:1 的分离规律 (表 1),而对照则全部表现为 Km 敏感。根据遗传学理论,抗 Km 的植株中既含有外源基因纯合的植株,也含有

杂合型的植株,其比例为 1:2,在 T_1 的后代中,理论上应出现对 Km 全抗的株系也即外源基因纯合的株系。而对于双拷贝的植株(25 和 27),Km 敏感的植株比例明显偏高,若两个拷贝不连锁或未发生其它特殊的遗传行为,理论比例应为 $(9:3:3):1=15:1$,但 27 号株系检测结果卡方值显著,显然不符合 15:1,25 号株系由于植株数过少,未进行检测,但也可以看出在 7 个植株中就出现了 2 个 Km 敏感,比例偏高。

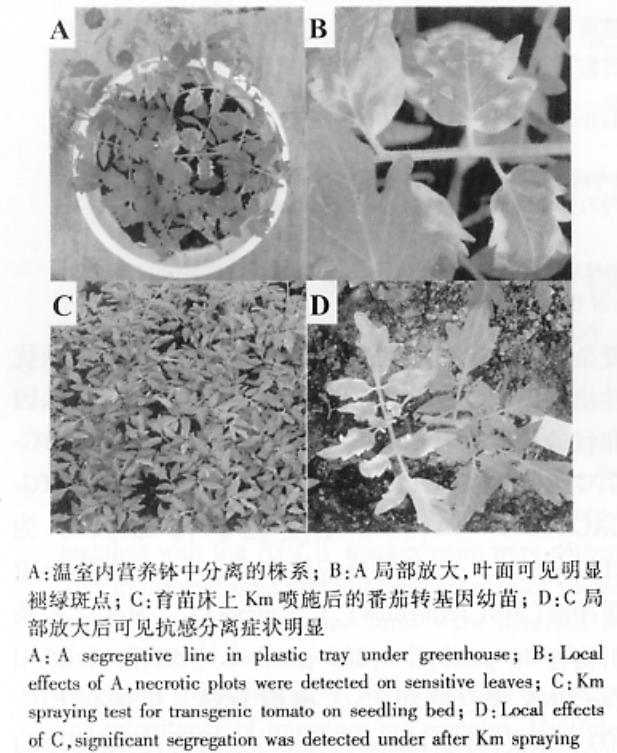


图 2 温室和田间 Km 喷施的结果

Fig. 2 Km spraying test for transgenic tomato in greenhouse or open field

表 1 T_1 代转基因番茄对 Km 的抗性分离

Table 1 Progeny analysis on Km resistance in T_1 generation of transgenic tomato

株系号 Line	外源基因 拷贝数 Transgene copy	总株数 Total	Km 抗性 株数 Km resistant	Km 敏感 株数 Km sensitive	卡方测验 χ^2 test
3	1	30	22	8	0.000
12	1	34	28	6	0.628
42	1	30	24	6	0.178
25	2	7	5	2	-
27	2	18	14	4	5.348 *
CK	0	18	0	18	50.074 *

* $\chi^2_{0.05, df=1} = 3.84$ 。

2.2 T_2 代 Km 喷施结果

将 T_1 代 Km 抗性植株栽植于田间,分单株留种,得到 T_2 种子。将 T_2 种子播种于温室,喷施 Km 6 d 后调查结果。从 3 个单拷贝株系的 T_2 代表现来看,确实出现了全抗 Km 的株系,如 3-3、12-7 和 42-2

等,卡方测验为显著,表明这些株系的外源基因已经纯合(表 2)。而双拷贝株系中若干单株的后代已经很难预测其拷贝数,根据预测为双拷贝的结果,卡方值检测有的显著,有的不显著,因此双拷贝植株后代的遗传行为变得十分复杂。

表 2 T_2 代转基因番茄对 Km 的抗性分离

Table 2 Progeny analysis on Km resistance in T_2 generation of transgenic tomato

株系号 Line	总株数 Total	Km 抗性株数 Km resistant	Km 敏感株数 Km sensitive	卡方测验 χ^2 test
3-1	27	27	0	7.716 *
3-2	25	19	6	0.013
3-3	32	32	0	9.375 *
3-4	15	13	2	0.556
3-5	23	23	0	6.391 *
3-6	22	17	5	0.000
12-1	21	16	5	0.016
12-3	23	23	0	6.391 *
12-4	24	19	5	0.556
12-5	25	21	4	0.653
12-6	30	23	7	0.000
12-7	18	18	0	4.741 *
42-1	29	20	9	0.287
42-2	30	30	0	8.711 *
42-3	22	16	6	0.000
42-4	31	23	8	0.011
42-6	14	11	3	0.000
42-7	15	12	3	0.022
25-1	20	16	4	4.32 *
25-2	27	27	0	0.891
27-1R	27	23	4	2.0765
27-2R	22	13	9	39.382 *

* $\chi^2_{0.05, df=1} = 3.84$ 。

2.3 T_3 代 Km 喷施结果

将 T_2 代检测为纯合的株系及尚未纯合的株系栽植于田间,继续分单株留种,得到 T_3 种子。将 T_3 种子条播于育苗床,喷施 Km 7 d 后调查结果。单拷贝纯合株系的子代(T_3)表现为对 Km 全抗(表 3),从 T_3 的结果来看,验证了 T_2 结果的准确性。同时,没有纯合的株系在田间仍然可以观察到对 Km 的抗感分离(图 2: C, D),因此 Km 喷施试验在田间仍然是可行的。

表 3 T_3 代转基因番茄对 Km 的抗性分离

Table 3 Progeny analysis on Km resistance in T_3 generation of transgenic tomato

株系号 Line	总株数 Total	Km 抗性株数 Km resistant	Km 敏感株数 Km sensitive	卡方测验 χ^2 test
3-3-8	32	32	0	9.3750 *
12-7-2	43	43	0	13.0310 *
42-2-1	36	36	0	10.7037 *

* $\chi^2_{30.05, df=1} = 3.84$ 。

2.4 单拷贝株系 PCR 验证

一个单拷贝株系 *NPT II* 基因 PCR 扩增结果与相应的 Km 筛选的结果完全一致,所有 14 个 Km 抗性植株全部能扩增出预期的条带,而对照与 4 株

Km 敏感植株均无扩增条带(图 3)。由此表明,利用卡那霉素在苗期筛选单拷贝转基因植株能够比较准

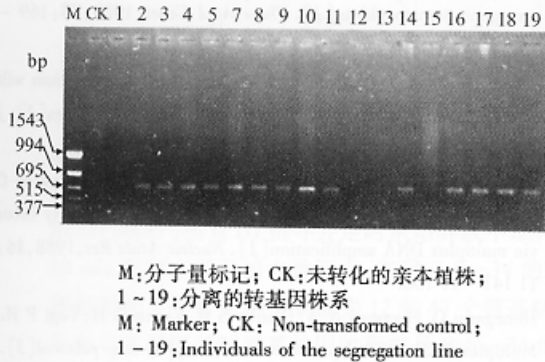
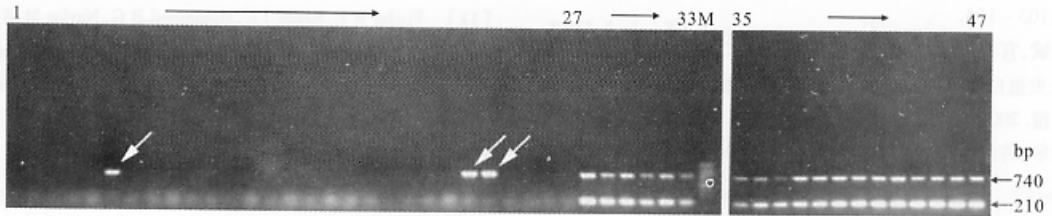


图 3 转基因 T_1 株系的 PCR 扩增
Fig.3 PCR analysis on one T_1 progeny of transgenic tomato



M:分子量标记; 1~27:Km 敏感植株,箭头所示为从 Km 敏感植株中扩增出的标记基因 *NPT II* 条带; 28~33,35~47: Km 抗性植株
M:DNA marker; Lane 1~27: Kanamycin susceptible plants, white arrows showed the 740 bp fragment of *NPT II* gene amplified from kanamycin susceptible plants; Lane 28~33,35~47: Kanamycin resistant plants, fragment sizes are indicated in bp

图 4 双拷贝植株的多重 PCR 扩增

Fig.4 Multiplex-PCR of T_2 progeny plants with double copy of T-DNA after kanamycin spraying test

3 讨论

本试验结果表明,利用 Km 喷施方法对含有 *NPT II* 标记基因的转基因番茄植株幼苗进行大规模筛选,是一种简便高效的筛选方法,成本相对很低。这种方法不但能够在温室进行,也能够在田间进行。对于本试验,如果要取得较理想的效果(表型明显),保持较好的条件是必要的,包括喷施前 1 d 停止浇水,选择晴好的天气进行都有利于取得理想的试验结果。苗床湿度较高时,适当提高卡那霉素溶液的浓度(从 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 提高到 $120\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)可取得同样的效果,如遇天雨,则需要覆盖塑料薄膜。

Km 喷施筛选 *NPT II* 基因对敏感植株是非致死性的,不会丢失重要的遗传分析材料,结合 PCR 技术很容易发现标记基因沉默现象。在植物遗传转化研究中,抗除草剂的 *bar* 基因也是一个比较重要的标记,它同样能够作为表型标记进行筛选,利用除草剂喷施可以找到高效表达的植株,但那些沉默表达或表达水平比较低的植株很容易遭到淘汰。直接喷洒抗生素的筛选方法能否用于含有潮霉素抗性基因

确地了解外源基因的分离情况。

2.5 Multiplex-PCR 检测双拷贝株系的遗传行为

利用 Multiplex-PCR 技术,从双拷贝株系 Km 筛选的抗性植株和敏感植株中随机挑选一些植株提取 DNA 扩增目的基因和标记基因。结果发现 19 个 Km 抗性植株目的基因和标记基因的特异条带均能扩增出来(图 4)。而在 27 个 Km 敏感植株中发现 3 株标记基因存在但表现为对 Km 敏感,可见其为发生基因沉默的植株。由于在全部敏感植株中未检测到目的基因 *Chi* 的存在,这基本上排除了正常重组导致目的基因沉默的可能,这种沉默也并非共抑制现象(Co-suppression),其很有可能为异常重组后部分目的基因片段丢失导致,进一步分析还有待进行。

或其它抗生素抗性标记,尚需进一步试验,然而这一思路显然是可取的。

Multiplex PCR(多重 PCR)技术是分析转基因复杂遗传的有效手段。多重 PCR 的特点是在同一 PCR 反应体系里加入两对以上引物,同时扩增出多个核酸片段的 PCR 反应。这一技术首先由 Chamberlain 等^[8]提出,此后在医学研究中有一些报道, Henegariu 等^[9]和黄银花等^[10]对多重 PCR 中的多种因素进行了优化。由于多重 PCR 能够同时检测多个 DNA 片段,因此是遗传分析中富有前景的工具,然而目前这种技术主要用于医学和检疫工作,转基因遗传分析中少见报道。本研究表明,多重 PCR 技术在外源基因的遗传分析中能够同时检测多个片段的存在状态,结合 Km 喷施方法检测 *NPT II* 标记基因的表达状况,可以很好地了解外源基因特别是标记基因的遗传行为。

遗传育种中应尽可能利用单拷贝的转基因植株。本研究进一步表明多拷贝外源基因的遗传行为相对复杂,主要原因在于很难确定各拷贝在染色体上的相互关系,因此在遗传育种中应尽可能利用单

拷贝的转基因植株。

此外, Fuchs 等^[11]对 *NPT II* 基因进行过严格的安全性评价, 结果表明 *NPT II* 蛋白不会带来安全问题。到目前为止, 还没有相关文献报道卡那霉素抗性基因编码蛋白对人兽有直接毒性。所以, 利用 *NPT II* 基因可以在温室或田间环境进行筛选, 不会造成明显的安全性问题。

参考文献:

- [1] 张余洋, 欧阳波, 叶志彪. 无抗性标记基因转基因植物研究进展[J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(5): 589-596.
- [2] 吴昌银, 叶志彪, 李汉霞, 唐克轩. 雪花莲外源凝集素基因转化番茄[J]. 植物学报, 2000, 42(7): 719-723.
- [3] 商鸿生, 王旭, 徐秉良. CP 基因转化的线辣椒抗卡那霉素和抗 CMV 特性的遗传[J]. 西北农林科技大学学报, 2001, 29(5): 103-106.
- [4] 林良斌, 官春云, 周小云, 何业华, 杨志新. 转基因抗虫油菜中 Bt 杀虫蛋白基因稳定遗传和高效表达及抗虫性研究[J]. 作物学报. 2002, 28(2): 175-178.
- [5] 马丽华, 许红霞, 胡育昌. 转 Bt 基因棉卡那霉素田间快速检测法[J]. 中国棉花, 2000, 27(12): 11-12.
- [6] Weide R, Koomeef M, Zabel. A simple nondestructive spraying assay for the detection of an active kanamycin resistance gene in transgenic tomato plants[J]. *Theor Appl Genet*, 1989, 78: 169-172.
- [7] Ouyang B, Li H X, Ye Z B. Increased resistance to *Fusarium* wilt in transgenic tomato expressing bivalent hydrolytic enzymes[J]. *J Plant Physiol Mol Biol*, 2003, 29: 179-184.
- [8] Chamberlain J S, Gibbs R A, Ranier J E, Nguyen P N, Caskey C T. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification[J]. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16: 11 141-11 156.
- [9] Henegariu O, Heerema N A, Dlouhy S R, Vance G H, Vogt P H. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol[J]. *Bio/Techniq*, 1997, 23: 504-511.
- [10] 黄银花, 胡晓湘, 徐慰倬, 高宇, 冯继东, 孙汉, 李宁. 影响多重 PCR 扩增效果的因素[J]. 遗传, 2003, 25(1): 65-68.
- [11] Fuchs R L, Ream J E, Hammond B G, Naylor M W, Leimgruber R M, Berberich S A. Safety assessment of the Neomycin Phosphotransferase II (*NPT II*) protein[J]. *Bio/Technol*, 1993, 11: 1 543-1 547.

欢迎订阅《武汉植物学研究》

《武汉植物学研究》为科学出版社出版、国内外公开发行的植物学综合性学术期刊(学报级)。主要报道植物学及各分支学科的基础研究和应用研究方面具创新性、有重要意义的最新研究成果, 植物学研究的新技术、新方法等。栏目设置有: 研究论文、技术与方法、综合评述、研究简报、学术讨论、重要书刊评介、学术动态等。主要读者对象为从事植物学研究的科技人员、大专院校师生, 以及相关学科, 包括农、林、牧、医药、轻工、水产和环保等方面的工作者。

本刊为中国科技核心期刊、中国中文核心期刊, 被中国科技论文与引文数据库(CSTPCD)、中国科学引文数据库(CSCD)、中国核心期刊(遴选)数据库、中国科技期刊精品数据库、中国生物学文摘、美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)等十多种国内外检索期刊、数据库作为核心期刊或统计源期刊收录。本刊曾荣获湖北省优秀科技期刊奖、全国优秀科技期刊奖、中国科学院优秀期刊奖。

本刊为双月刊, 大16开本, 双月末出版。国内定价15.00元, 全年90.00元。邮发代号38-103, 全国各地邮局均可订阅。如漏订, 本刊编辑部可办理邮购, 免收邮寄费。

编辑部地址: 武汉市 武昌磨山 中科院武汉植物园内(或武汉市 74006 信箱), 邮政编码: 430074; 电话: 027-87510755; E-mail: editor@rose.whiob.ac.cn

欢迎订阅 欢迎投稿