

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.01017

番茄叶片基因组 DNA 快速制备技术及其在基于实时荧光定量 PCR 的转基因检测中的应用

王伟伟, 朱长青, 刘小花, 陈昆松, 徐昌杰

浙江大学农业与生物技术学院园艺系, 杭州 310058

摘要: 以番茄(*Solanum lycopersicum* L. cv. Micro-Tom)叶片为试材, 建立了一种简便快速制备叶片基因组 DNA 的方法。2~20 mm² 的叶片即可满足制备要求, 制备过程只需一种提取试剂、只涉及 1 次移液和 1 次离心操作, 不涉及沉淀。确定了所制备的 DNA 用于实时荧光定量 PCR 的合适用量为 0.1~0.2 μL (反应总体积为 12.5 μL), 发现过量模板的使用可降低 PCR 效率且可导致扩增失败。该项 DNA 快速制备及相适应的实时荧光定量 PCR 技术已成功应用于番茄转基因植株检测。

关键词: 番茄; DNA 快速制备; 实时荧光定量 PCR; 转基因检测

Techniques for rapid preparation of tomato leaf DNA and its application in real-time quantitative PCR-based transgene detection

WANG Wei-Wei, ZHU Chang-Qing, LIU Xiao-Hua, CHEN Kun-Song, XU Chang-Jie

Department of Horticulture, College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

Abstract: Using tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv. Micro-Tom) leaf as material, a simple and rapid DNA preparation protocol was established. This method required only 2–20 mm² leaf with only one extraction solution and involved one pipetation and one centrifugation each. No precipitation was required. The suitable volume of prepared DNA solution, as PCR template, for real-time quantitative PCR was determined to be 0.1–0.2 μL in 12.5 μL final reaction volume. The excessive template DNA solution was confirmed to reduce PCR efficiency and even can result in PCR failure. This technique for rapid preparation of DNA and a compatible real-time quantitative PCR were successfully applied in transgene detection of tomato plants.

Keywords: tomato; rapid DNA preparation; real-time quantitative PCR; transgene detection

1983 年首例转基因烟草植株的获得将植物生物学研究引入了转基因时代, 20 余年来, 转基因技术已发展成为植物生物学研究与应用的重要手段, 尤

其是植物功能基因组学研究必不可少的一项技术。由于在基因转化过程中所获得的抗性植株不一定全是转基因植株, 因此, 转基因检测是植物转基因研

收稿日期: 2010-12-21; 修回日期: 2011-05-18

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(编号: 2011CB100602), 国家自然科学基金重点项目(编号: 31030052)和浙江省自然科学基金重点项目(编号: Z3100171)资助

作者简介: 王伟伟, 硕士研究生, 专业方向: 园艺植物生物技术。E-mail: weilwkl@163.com

通讯作者: 徐昌杰, 教授, 研究方向: 园艺植物生物技术。E-mail: chjxu@zju.edu.cn

网络出版时间: 2011-7-18 8:49:26

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20110718.0849.003.html>

究的必需环节。Southern 杂交和普通 PCR 经常用于植物转基因检测,但前者存在需要相对较大量的植物材料以及技术本身较为复杂等缺点,后者则存在假阳性高的问题。近年来,在 PCR 基础上发展起来的实时荧光定量 PCR 由于其准确、操作简便而在植物转基因检测中常有应用^[1~4]。

由于植物转基因检测往往涉及大批样品,尤其是当抗性植株中转基因比例较低时更是如此。因此,建立一种快速、简便、只需要微量植物组织、适于实时荧光定量 PCR 的 DNA 制备方法显得至关重要。国内外已有一些关于 DNA 快速提取的方法,如改良 SDS 法^[5]、快速一步法(ROSE)^[6]、改良 CTAB 法^[7]。总体而言,这些方法的步骤仍然相对繁琐,大部分需涉及多次移液、离心及沉淀等操作,在大批样品 DNA 制备时效率较低。

本文介绍一种简便快捷的番茄叶片基因组 DNA 制备方法,提取过程简便,每个样品只需一种提取试剂、1 次移液和 1 次离心操作,不涉及沉淀,便可获得用于 PCR 反应的模板 DNA。本文同时就该方法制备的 DNA 在基于实时荧光定量 PCR 的转基因检测技术中的应用进行了研究。

1 材料和方法

1.1 植物材料

野生型以及抗潮霉素的 Micro-Tom 番茄(*Solanum lycopersicum* L.)植株由本实验室先前培育。番茄转基因流程按刘小花等^[8]进行,用于转化的植物表达载体携带潮霉素磷酸转移酶(*HPT*)基因,转化时应用 10 mg/L 潮霉素进行抗性筛选。

1.2 方法

1.2.1 DNA 制备

取约 20 mm² 的番茄幼叶于 1.5 mL 离心管中,加入 100 μ L TPS 缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1 mol/L KCl, 10 mmol/L EDTA)^[9],研磨,然后沸水浴 10 min,再置冰上冷却 2 min 后,12 000 r/min 离心 2 min,上清液即可作为实时荧光定量 PCR 的模板。为分析不同叶片用量下制备的模板 DNA 对实时荧光定量 PCR 结果的影响,还取用了面积约为 2 mm²、5 mm²、10 mm² 和 50 mm² 的叶片用于 DNA 制备。

1.2.2 实时荧光定量 PCR

HPT 基因(目标基因, GenBank 登录号: V01499)以及番茄光诱导的早期蛋白(Early light-inducible protein, *ELIP*)基因(内标基因, GenBank 登录号: AY547273, 该基因在番茄中是单拷贝基因^[10])的实时荧光定量 PCR 引物应用 Genescript 软件在线设计(https://www.genscript.com/ssl-bin/gs_login),扩增长度均为 200 bp。引物由上海 Invitrogen 公司合成,引物序列如下: ELIPUP: 5'-ACAATACTAGTACTTCTTCACCTTT-3', ELIPDP: 5'-AACACGCGAAGTCCTATGAA-3', HPTUP: 5'-GCTCCGCATTGGTCTTGA-3', HPTDP: 5'-GGCGTCGTTTCCACTAT-3'。

实时荧光定量 PCR 应用宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa)的荧光定量试剂盒(SYBR Premix Ex TaqTM (Perfect Real Time))进行,反应体系的标准方案如下:SYBR Premix Ex TaqTM(2 \times) 6.25 μ L, DNA 模板 0.1 μ L, 上游引物(10 μ mol/L)和下游引物(10 μ mol/L)各 0.25 μ L, 无菌双蒸馏水 5.65 μ L, 反应总体积为 12.5 μ L。为分析不同模板 DNA 体积对实时荧光定量 PCR 结果的影响,模板 DNA 的体积还采用了 0.2 μ L、0.5 μ L 和 1.0 μ L,此时对无菌双蒸馏水的用量作了相应调整(分别减少 0.1 μ L、0.4 μ L 和 0.9 μ L)以维持反应总体积 12.5 μ L 不变。

实时荧光定量 PCR 在 Roche LightCycler 1.5 上运行,PCR 扩增程序为:95 预变性 30 s,95 变性 10 s,58 复性 20 s,72 延伸 20 s(在此步骤检测荧光信号),共进行 45 轮循环。

应用 LinRegPCR 软件^[11]直接基于 PCR 扩增曲线计算实时荧光定量 PCR 的效率。实时 PCR 的荧光阈值由 Roche LightCycler 1.5 随机软件给出。

1.2.3 PCR 产物电泳

参照《基因克隆理论与技术》^[12]进行,取 5 μ L PCR 产物与 1 μ L 上样缓冲液(6 \times)混合,点于 1.5%琼脂糖凝胶胶孔中,电泳缓冲液采用 1 \times TAE。于 100 V 电泳 20 min 后用紫外凝胶成像分析系统观察和拍摄。

2 结果与分析

2.1 DNA 的快速制备

按本文建立的 DNA 快速制备方案,实验表明,由于整个过程只涉及一次移液、一次离心,不涉及沉淀,

因而可在 30 min 内完成 12 个样品的 DNA 制备。短暂离心的目的是使叶片组织残渣沉于管底, 以便直接吸取上清液作为实时荧光定量 PCR 的模板, 而不必预先将上清液转移至新的离心管, 这样简化了操作。

2.2 DNA 模板体积对实时荧光定量 PCR 的影响

按 DNA 快速制备方案制备了来自两个番茄植株的 DNA 样品, 然后分别吸取 0.1 μL 、0.2 μL 、0.5 μL 、1.0 μL 和 0 μL (阴性对照)上清液作为 DNA 模板进行内标基因的实时荧光定量 PCR, PCR 反应作 3 管重复。

结果表明, 添加 0.1 μL 和 0.2 μL 上清液作为模板时均可实现 PCR 扩增, 而添加 0.5 μL 和 1.0 μL 时则不能扩增, 阴性对照没有扩增(图 1A)。这一结果

也得到 PCR 产物电泳的验证(其中样品 1 的电泳结果见图 1B)。因此, 应用本文方法时, 实时荧光定量 PCR 的 DNA 模板的取用量以 0.1 μL ~0.2 μL 为宜。就模板 DNA 体积为 0.1 μL 和 0.2 μL 时的扩增进行比较, 结果表明, 实时荧光定量 PCR 的 C_t 值大多并不随着模板用量的加倍而下降 1 左右, 有时下降并不明显(表 1)。实时荧光定量 PCR 效率的计算结果表明, 模板 DNA 体积为 0.2 μL 时的 PCR 效率总体上低于模板体积为 0.1 μL 时(表 1)。这表明过量的模板可导致 PCR 效率的下降。

2.3 不同叶片用量对实时荧光定量 PCR 的影响

为分析用于 DNA 制备的不同叶片用量对实时

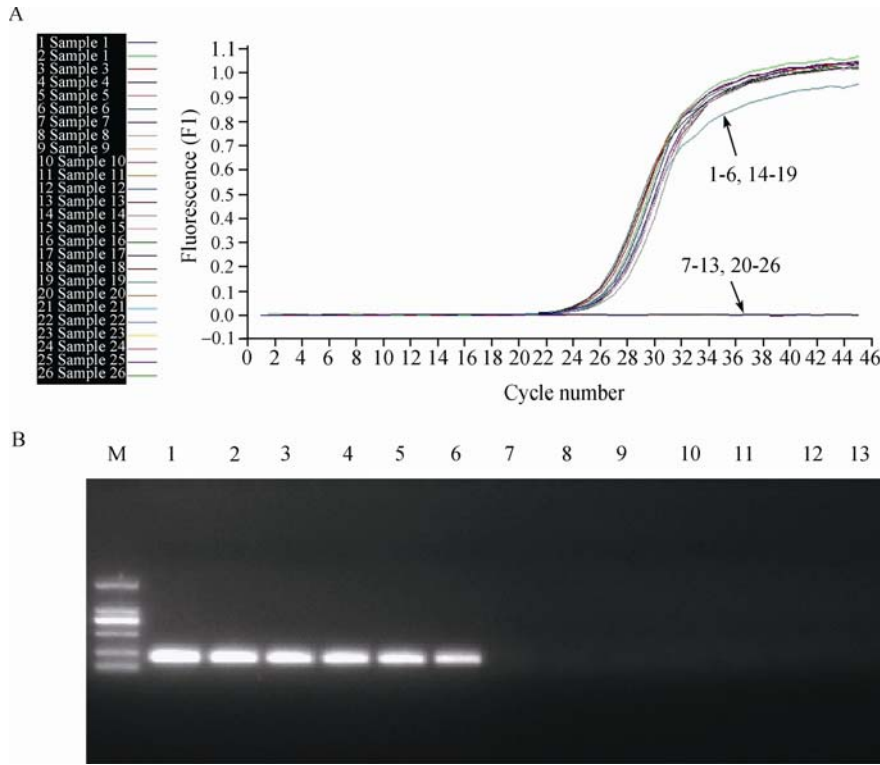


图 1 DNA 模板体积对实时荧光定量 PCR 扩增的影响

A: 扩增曲线; B: PCR 产物电泳。1~3: 样品 1, 0.1 μL ; 4~6: 样品 1, 0.2 μL ; 7~9: 样品 1, 0.5 μL ; 10~12: 样品 1, 1.0 μL ; 14~16: 样品 2, 0.1 μL ; 17~19: 样品 2, 0.2 μL ; 20~22: 样品 2, 0.5 μL ; 23~25: 样品 2, 1.0 μL ; 13、26: PCR 阴性对照; M: DL2000 DNA Marker。

表 1 DNA 模板体积对实时荧光定量 PCR C_t 和 PCR 效率的影响

DNA 模板体积(μL)	样品 1						样品 2					
	重复 1		重复 2		重复 3		重复 1		重复 2		重复 3	
	C_t	E (%)	C_t	E (%)	C_t	E (%)	C_t	E (%)	C_t	E (%)	C_t	E (%)
0.1	26.33	85.6	26.21	84.9	25.91	83.7	27.10	83.0	26.74	82.8	26.76	83.5
0.2	25.63	81.3	25.73	82.8	25.56	80.7	26.73	79.8	26.61	78.2	26.19	80.8

注: E 表示 PCR 效率。

荧光定量 PCR 结果的影响, 在 DNA 制备时分别取用了面积约为 2 mm²、5 mm²、10 mm²、20 mm² 和 50 mm² 的叶片。DNA 制备后, 分别取 0.1 μL、0.2 μL、0.5 μL 和 1.0 μL 上清液用于内标基因的实时荧光定量 PCR。结果表明, 在试验的叶片用量范围内, 模板 DNA 取用量为 0.1 μL 和 0.2 μL 时均能实现扩增, 且 PCR 效率均比较理想(80%左右)(表 2), 而当模板 DNA 取用量为 0.5 μL 和 1.0 μL 时均不能扩增。因此, 该方法对叶片用量的要求相对比较宽泛(至少 2 mm²–50 mm² 之间均可), 而对添加的模板 DNA 的体积则有较严格要求(0.1 μL~0.2 μL)。

当模板 DNA 取用量相同时, 随叶片用量增加, Ct 值下降, 但 PCR 效率与叶片用量没有明显的相关性(表 2)。同时, 再次观察到模板 DNA 体积为 0.2 μL 时的 PCR 效率低于模板体积为 0.1 μL 时这一现象(表 2)。

表 2 叶片用量对实时荧光定量 PCR 扩增的影响

叶片面积 (mm ²)	模板 DNA 体积 (μL)	平均 Ct	平均 PCR 效率 (%)
2	0.1	28.52	82.3
	0.2	27.92	78.7
5	0.1	28.32	81.4
	0.2	28.12	72.3
10	0.1	27.50	85.7
	0.2	27.04	78.4
20	0.1	26.35	83.7
	0.2	25.84	78.9
50	0.1	25.04	83.3
	0.2	24.43	78.9

2.4 DNA 快速制备及相适应的实时 PCR 体系在转基因检测中的应用

应用本研究建立的 DNA 快速制备方案及相适应的实时 PCR 标准体系, 对 6 个通过 10 mg/L 潮霉素筛选获得的再生抗性植株和 1 个野生型阴性对照植株进行了转基因检测。分别应用内标基因和目标基因引物进行实时荧光定量 PCR, 相关结果见表 3, 同时进行了 PCR 产物电泳, 表明得到了正确的扩增(图 2)。

从表 3 和图 2 可知, 所有植株 DNA 在内标基因和目标基因的 PCR 扩增中均取得成功。终产物电泳结果表明, 植株 3、6、7 的目标基因 PCR 扩增产物浓度较高(图 2)。

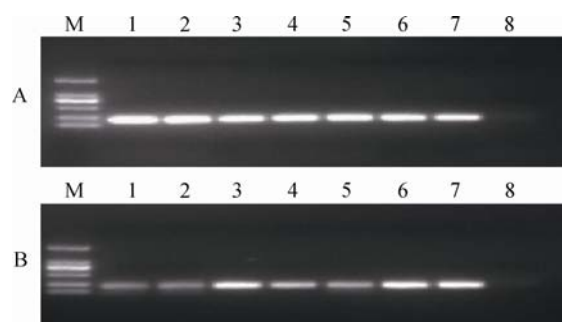


图 2 野生型番茄植株和潮霉素抗性番茄植株 *ELIP* 基因(A)和 *HPT* 基因(B)实时 PCR 扩增

1: 野生型阴性对照植株; 2~7: 抗性植株; 8: PCR 阴性对照。

在理想条件下(即目标基因和内标基因的 PCR 效率均为 100%), 可以根据目标基因和内标基因的 Ct 差值($\Delta Ct = Ct(HPT) - Ct(ELIP)$)计算转基因拷贝数。由于番茄是二倍体, 而单拷贝转基因是指在一个细胞中出现一个拷贝, 所以转基因拷贝数是内标基因与目标基因丰度比值的 2 倍, 即拷贝数 = $2 \times ELIP$ 丰度 / HPT 丰度 = $2 \times 2^{-\Delta Ct} = 2^{(1-\Delta Ct)}$ 。

根据这一公式, 对供试的 7 个植株进行了拷贝数分析, 结果表明, 植株 6 的拷贝数为 0.47, 而其他 6 个植株的拷贝数均要低得多, 仅约为 0.01~0.02(表 3), 两者相差 24 倍左右, 可明显分成两类。因此, 可判断植株 6 为转基因植株而其他植株为非转基因植株。这一结果得到 T1 植株潮霉素抗性及其 PCR 检验的验证(未发表数据)。

就表 3 和图 2 的结果进行对比可以发现, 终产物电泳结果不能就样品是否是转基因植株作出准确判断。

3 讨论

本文介绍的 DNA 快速提取及相适应的基于实时荧光定量 PCR 的转基因检测技术具有快速、简便、微量、稳定、准确等优点。整个制备过程只涉及一次移液和一次离心而不涉及沉淀, 在 30 min 内可完成 12 个样品的 DNA 制备; 叶片用量可少至 2 mm², 但只要确保在 12.5 μL 的 PCR 反应体系中仅添加 0.1 μL~0.2 μL 的 DNA 模板, 叶片大小从 2 mm² 至 50 mm² 均可实现成功扩增; 快速制备的 DNA 用于实时荧光定量 PCR 进行转基因检测, 避免了普通 PCR 经常出现的假阳性, 具有准确性。本研究应用的抗性植株是在中低浓度(10 mg/L)潮霉素筛选下获得, 因此抗性植株中存在比较高比例的非转基因植株。应用本研究

表 3 DNA 快速制备及相适应的实时 PCR 体系在番茄转基因检测中的应用

植株编号	ELIP 平均 Ct	ELIP 平均 E (%)	HPT 平均 Ct	HPT 平均 E (%)	△Ct	拷贝数
1	26.86	87.3	36.17	88.0	9.31	0.003
2	27.81	86.0	34.82	87.6	7.01	0.016
3	27.74	83.2	35.57	85.7	7.83	0.009
4	26.96	84.0	34.64	82.2	7.68	0.010
5	27.90	92.1	35.77	90.5	7.87	0.009
6	25.79	85.6	27.87	86.9	2.08	0.473
7	27.75	84.7	35.00	80.9	7.25	0.013
8	/	/	/	/	/	/

E: PCR 效率; $\Delta Ct = Ct(HPT) - Ct(ELIP)$; 拷贝数 = $2^{(1-\Delta Ct)}$; 1: 野生型阴性对照植株; 2~7: 抗性植株; 8: PCR 阴性对照。

建立的方法从 6 个抗性植株中仅检测出 1 株转基因植株, 这与预期一致。在后续检测中, 转基因植株占抗性植株的比例也均在 10%~20%左右。根据具体目标基因和内标基因不同改变实时 PCR 引物, 这一方法还在本实验室的烟草转基因鉴定中取得成功。

在试验的叶片用量范围内, 应用制备所得的 DNA 作为实时 PCR 模板, 添加 0.1 μL 和 0.2 μL 时可成功实现 PCR 扩增, 而添加 0.5 μL 和 1.0 μL 时则不能成功。PCR 扩增效率分析结果表明, 模板用量为 0.2 μL 时的效率低于用量为 0.1 μL 时, 这表明随模板体积加大, 模板中的杂质对 PCR 扩增的抑制加强。过大的模板体积会引入过多的杂质, 导致 PCR 扩增完全受抑, 这一现象也见先前报道^[9]。通过将制备的 DNA 稀释 10 倍或 100 倍后用作 PCR 模板可保障 PCR 扩增成功进行^[9], 而本研究表明模板取用量减少至 0.1 μL 或 0.2 μL 即可成功实现 PCR 扩增, 简化了实验操作。

研究表明, 终产物电泳结果不能就样品是否是转基因植株作出准确判断。因此普通 PCR 用于转基因检测会有较大的假阳性。这一方面与实验环境中的 PCR 污染有关, 另一方面则与残留在外植体上的农杆菌有关。先前研究^[13-15]表明, 抗生素筛选往往只能抑制农杆菌的生长而不能全部杀灭, 而这些残留的农杆菌足以在普通 PCR 中引起假阳性。但与转基因植株组织中含有的目的基因的丰度相比, 这些因实验环境和残留农杆菌引起的污染往往较轻, 因此在实时荧光定量 PCR 分析时可得到有效区分。在实际检测中, 我们发现转基因植株目标基因与内标基因的 Ct 值差值往往在 3 以内, 而由于污染引起的非转基因植株组织为试材时, 目标基因与内标基因的 Ct

值差值常在 7 以上。因此, 应用本研究提出的方法, 可使转基因植株与非转基因植株得到明显区分。

通过实时荧光定量 PCR 还可以计算转基因拷贝数, 即拷贝数 = $2^{(1-\Delta Ct)}$ 。但实际分析我们发现, 极少有植株的计算结果能达到 1 或 2 等整数附近, 即使如此, 也往往不能在多次检测中得以重复。这是由于该计算公式仅适用于目标基因和内标基因的 PCR 效率均为 100%这一理想情况, 而根据本研究分析结果, PCR 效率则常在 75%~95%之间或者更低。因此, 本研究提出的计算方法并不适合转基因拷贝数的精确计算。尽管有一些研究提出了可计算转基因拷贝数的方法^[16, 17], 但也有研究者认为, 应用实时 PCR 鉴定计算出的转基因拷贝数仍有较大的差错可能^[18, 19]。

参考文献(References):

[1] Schmidt MA, Parrott WA. Quantitative detection of transgenes in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] and peanut (*Arachis hypogaea* L.) by real-time polymerase chain reaction. *Plant Cell Rep*, 2001, 20(5): 422-428.

[2] 陈颖, 徐宝梁, 苏宁, 葛毅强, 王曙光. 实时荧光定量 PCR 技术在转基因玉米检测中的应用研究. *作物学报*, 2004, 30(6): 602-607.

[3] Beltrán J, Jaimes H, Echeverry M, Ladino Y, López D, Duque MC, Chavarriaga P, Tohme J. Quantitative analysis of transgenes in cassava plants using real-time PCR technology. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 2009, 45(1): 48-56.

[4] 敖金霞, 高学军, 仇有文, 郭士成. 实时荧光定量 PCR 技术在转基因检测中的应用. *东北农业大学学报*, 2009, 40(6): 141-144.

[5] Guillemaut P, Maréchal-Drouard L. Isolation of plant DNA: A fast, inexpensive, and reliable method. *Plant Mol*

- Biol Rep*, 1992, 10(1): 60–65.
- [6] 方宣钧, 孔巍, 金芑军. 快速一步法(ROSE 法)提取 DNA 应用于 RAPD-PCR 扩增. *高技术通讯*, 1997, 7(10): 40–43.
- [7] 陈绍宁, 崔继哲. 快速提取番茄总 DNA 应用于规模化 PCR 检测. *北方园艺*, 2004, (3): 46–47.
- [8] 刘小花, 张岚岚, 朱长青, 陈昆松, 徐昌杰. Micro-Tom 番茄矮化微型机制及其在植物功能基因组学研究中的应用. *遗传*, 2008, 30(10): 1257–1264.
- [9] Higgins CM, Hall RM, Campbell PR, Dietzgen RG. PCR rescue and analysis of transgene sequences directly from crude extracts of transgenic embryos and plants. *Plant Mol Biol Rep*, 2000, 18(3): 285a–285g.
- [10] Bruno AK, Wetzel CM. The early light-inducible protein (*ELIP*) gene is expressed during the chloroplast-to-chromoplast transition in ripening tomato fruit. *J Exp Bot*, 2004, 55(408): 2541–2548.
- [11] Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WMH, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJB, Moorman AFM. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(6): e45.
- [12] 王延华, 董坚, 齐建国. 基因克隆理论与技术(第二版). 北京: 科学出版社, 2009: 145–148.
- [13] Mogilner N, Zutra D, Gafny R, Bar-Joseph M. The persistence of engineered *Agrobacterium tumefaciens* in agro-infected plants. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1993, 6(5): 673–675.
- [14] Tang H, Ren Z, Krczal G. An evaluation of antibiotics for elimination of *Agrobacterium tumefaciens* from walnut somatic embryos and for the effects on the proliferation of somatic embryos and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep*, 2000, 19(9): 881–887.
- [15] Nain V, Jaiswal R, Dalal M, Ramesh B, Kumar PA. Polymerase chain reaction analysis of transgenic plants contaminated by *Agrobacterium*. *Plant Mol Biol Rep*, 2005, 23(1): 59–65.
- [16] Li ZW, Hansen JL, Liu Y, Zemetra RS, Berger PH. Using real-time PCR to determine transgene copy number in wheat. *Plant Mol Biol Rep*, 2004, 22(2): 179–188.
- [17] Yi CX, Zhang J, Chan KM, Liu XK, Hong Y. Quantitative real-time PCR assay to detect transgene copy number in cotton (*Gossypium hirsutum*). *Anal Biochem*, 2008, 375(1): 150–152.
- [18] Bubner B, Baldwin IT. Use of real-time PCR for determining copy number and zygosity in transgenic plants. *Plant Cell Rep*, 2004, 23(5): 263–271.
- [19] Bubner B, Gase K, Baldwin IT. Two-fold differences are the detection limit for determining transgene copy numbers in plants by real-time PCR. *BMC Biotechnol*, 2004, 4: 14.