

简报

抗阿特拉津基因 PCR 检测方法的 建立与应用

翟文学 朱立煌 傅骏华 李连城 岳绍先

(中国科学院遗传研究所 北京 100101) (中国农业科学院作物研究所 北京 100081)

阿特拉津是一种均三氮苯类除草剂,其作用机理是取代质体醌与叶绿体类囊体膜上的 32kDa 蛋白的结合,从而阻断光系统 I 的电子传递而使光合作用受阻。32kDa 蛋白由叶绿体 *psbA* 基因编码,*psbA* 基因的突变使 32kDa 蛋白的第 264 位丝氨酸变为甘氨酸或丙氨酸,从而丧失与阿特拉津结合的能力,导致对阿特拉津除草剂的抗性^[1]。由于阿特拉津除草剂在大豆产区的广泛使用,选择和培育阿特拉津抗性的品种已成为大豆品种改良的重要目标。我们通过转移抗性 *psbA* 基因曾获得了阿特拉津抗性植株^[2],在进一步转育抗阿特拉津的大豆品系乃至品种的过程中,仍然涉及对抗性植株的鉴别和验证,以往使用的分析方法包括田间表型观察,叶绿体荧光诱导检测和分子杂交等^[2~4]。通常分子水平的 Southern 杂交能为外源基因的整合提供可靠的证据,但是由于导入的抗性 *psbA* 基因与叶绿体中的内源的敏感 *psbA* 基因只有个别核苷酸的差异,仅仅使用抗性的 *psbA* 基因作探针难以为相应的转基因植株提供有力的证据。Wing Y C 等人曾采用 PCR 与 Mae I 酶切相结合的方法来检测阿特拉津抗性基因^[5],但检测过程较长,而且缺少参照对照, Mae I 十分昂贵不利于使用。另外这种方法也无法用于大豆等材料的检测。

我们根据 *psbA* 抗性基因和敏感基因 DNA 序列的个别碱基的差异设计引物,建立了直接通过 PCR 扩增 *psbA* 基因来检测阿特拉津抗性的方法。将该方法用于抗阿特拉津转基因大豆的筛选,获得了与其它方法较为一致的结果。进一步对转基因植株抗性特异的扩增片段进行测序,证明了该片段确实是源于外源导入的抗阿特拉津的 *psbA* 基因。与其它方法比较,此方法具有直接、简便、灵敏、快速等优点。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

本实验所用的大豆材料是黑龙江大豆品种的 83117 大豆品系。田间初步筛选的 *psbA* 转基因植株的 F₁ 至 F₇ 代作为待测植株,未经转基因处理的植株后代作为阴性对照,带有龙葵 (*Solanum nigrum*) *psbA* 抗性基因的质粒 pSB135 DNA 作为阳性对照^[2]。

1.2 大豆总 DNA 的提取

大豆单株叶片 1 至 5g 用于提取总 DNA。将不超过 5g 的叶片液氮下研磨成粉末,加入 1ml 巯基乙醇并同时加入 16ml 预热的 DNA 提取液 (100 mmol/L Tris · HCl, 5mmol/L EDTA, 500mmol/L NaCl, 1.25% SDS), 混匀后于 65℃ 保温 5min, 再加入 5ml 5mol/L KAc 溶液, 混匀, 于冰浴中保温 10min, 4500r/min 离心 10min, 取上清液加等体积氯仿抽提 1min, 6500r/min 离心 10min, 取上清液加等体积异丙醇沉淀 10~20min, 收集 DNA 沉淀, 并用 70% 乙醇和无水乙醇洗涤。将干燥后的 DNA 沉淀溶于 50μl TE 溶液或无菌水中, 于 0.7% 的琼脂糖凝胶上电泳检测 DNA 浓度和质量。

1.3 引物设计

根据本实验室先前发表的龙葵 *psbA* 抗性基因序列^[4]和大豆 *psbA* 基因序列^[6]设计了两对引物。R₁ 和 R₂ 是抗性 *psbA* 基因的特异引物, 用来扩增抗性基因的特异片段, C₁ 和 C₂ 是抗性基因和敏感基因共

用的参照引物。这些引物在 psbA 基因的位置与序列见图 1。引物在 ABI391A 全自动 DNA 合成仪上合成，并经 OPC 柱纯化，干燥后溶于超纯水，用于 PCR 扩增。

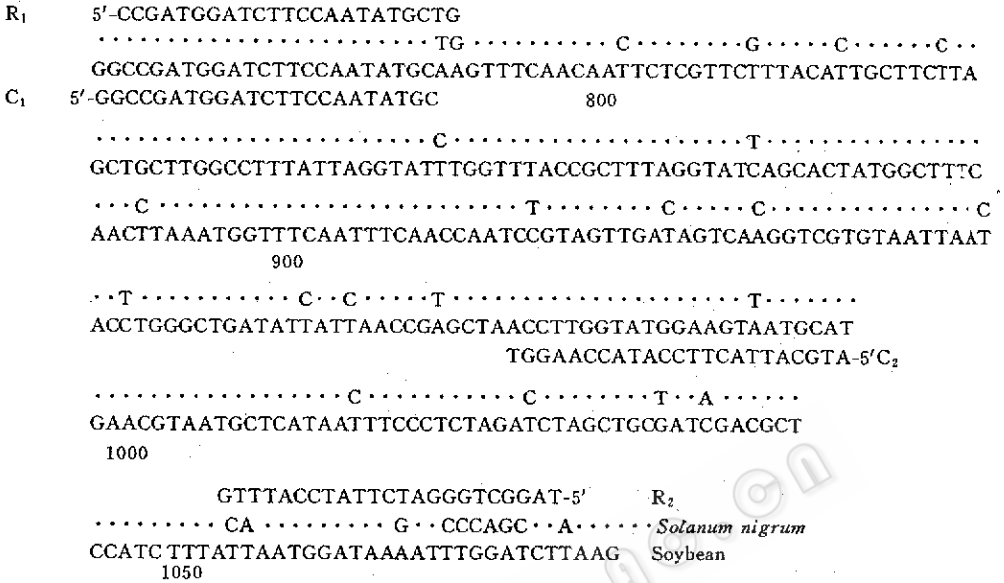


图1 阿特拉津抗性龙葵和敏感大豆的 psbA 基因的部分序列以及所设计的引物序列

1.4 PCR 扩增与 PCR 产物的检测

扩增反应的 Taq 酶是本实验室的产品，浓度为 5u/μl。每一样品的反应体积为 50μl，含模板 DNA 0.5μg（或阳性对照质粒 DNA 1ng），每个引物 25pmol，Taq 酶 1 单位。反应缓冲液 10mmol/L Tris·HCl (pH9.0)，50mmol/L KCl，1.6mmol/L MgCl₂，每种 dNTP 200μmol/L。反应体系混匀后加 40μl 石蜡油封液面，于 94℃ 预变性 4min，再以 94℃ 60s，55℃ 30s，72℃ 60s 进行 30 个循环，最后于 72℃ 保温 5min。整个过程均在 PE-480 热循环仪上进行。

PCR 扩增结果用琼脂糖凝胶电泳鉴定。用上述扩增反应液 15μl 加入 2.0% 的琼脂糖凝胶样品孔中，以 1×TBE 为电泳缓冲液，100V 电泳约 4h，EB 染色后，在紫外灯下观察或照相。

1.5 扩增片段的克隆与序列分析

将 PCR 产物按 J. Fenton Williams⁽⁵⁾方法处理后进行电泳，按 Pharmacia SephaglasTM Band Prep Kit 说明从凝胶中回收扩增片段，直接连接到 pUC18 的 Smal I 位点，转化 JM103，连接反应和转化按瞿峰等的方法⁽⁷⁾进行。用稍作修改的碱法⁽⁶⁾提取重组体 DNA，经限制性酶切的 PCR 筛选后，将带有扩增片段的重组体用双脱氧链终止法序列分析，具体操作按照 ABI 全自动序列分析反应试剂盒说明书进行。

2 实验结果

2.1 psbA 基因片段的扩增

根据 psbA 抗性基因和敏感基因的序列差异，设计了阿特拉津抗性基因的特异引物 R₁ 和 R₂。这对引物只有在扩增 psbA 抗性基因时才能给出一条 307bp 的扩增带，而且这对引物扩增 psbA 敏感基因时则不能进行扩增。同时为了消除 DNA 提取过程以及 PCR 各因素的影响，我们还根据 psbA 抗性基因和敏感基因的共同序列设计了一对参照引物。用这对引物扩增 psbA 基因时，抗性基因和敏感基因均能给出 231bp 的扩增带，作为特异 PCR 扩增的内部对照。对含有 psbA 抗性基因的质粒 DNA 和阿特拉津敏感大豆 DNA 用特异引物和参照引物进行 PCR 反应，证实了上述引物设计的合理性和正确性，并在以后的检测中作为阳性对照和参照对照。在此基础上用这两对引物分别扩增转基因处理的大豆后代的单

株 DNA, 除水对照外, 所有样品均给出了 231bp 的参照扩增带, 证明提取的 DNA 模板以及 PCR 扩增系统是正常的。其中有些后代植株的 DNA 样品给出了与阳性对照 pSB135 相同的 307bp 的扩增带, 表明这些转基因植株的后代带有 psbA 抗性基因序列。图 2 是分析的部分植株的 PCR 产物的凝胶电泳结果。我们还在同一 PCR 反应系统中进行两对引物同时扩增, 也得到了预期结果 (图 3), 抗性 psbA 基因扩增后有 307bp 和 231bp (含有 229bp) 两条带, 而敏感 psbA 基因扩增后只有一条 231bp 的对照带。

2.2 抗性特异的扩增片段的序列分析

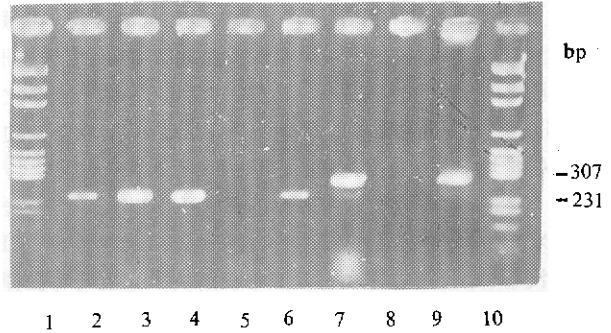


图 2 转基因大豆后代单株 DNA 用两对引物分别扩增

- 1, 8. 分子量标准; 2. 水对照
- 3~7. 不同的单株 DNA 样品
- C. 样品用参照引物扩增
- R. 样品用阿特拉津抗性特异引物扩增

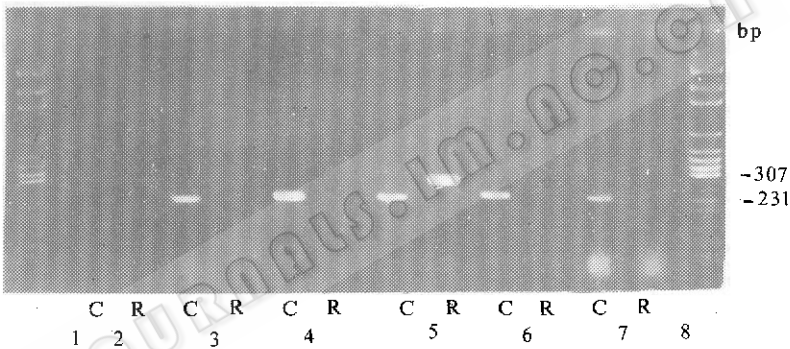


图 3 不同单株 DNA 在同一反应系统中用两对引物同时扩增

- 1, 10. 分子量标准; 5, 8. 水对照; 9. pSB135DNA 作为阳性对照; 2, 3, 4, 6, 7. 不同的单株 DNA 样品

将来自转基因大豆后代的抗性特异的扩增片段克隆在 pUC18 上, 转化大肠杆菌 JM103。提取带有 307bp 扩增片段的重组体 DNA, 用双脱氧链终止法测定序列, 结果表明其序列与图 1 中龙葵 psbA 抗性基因序列完全一样。而且随机挑选的 5 个含有 307bp 的重组体, 其插入片段序列完全相同, 证明了凝胶上显示的抗性特异的扩增带是均一的 psbA 抗性基因片段, 因此用我们设计的方法来检测阿特拉津抗性是可靠的。

2.3 用 PCR 扩增法筛选阿特拉津抗性植株

按照上述建立的 PCR 检测方法, 在转基因大豆后代中筛选阿特拉津抗性植株。在全部检测的 134 份材料中有 7 份 DNA 给出与阳性对照一致的抗性扩增带, 在未导入抗性基因的对照植株材料中则没有给出抗性扩增带。而且 PCR 检测结果与田间施用除草剂或其它方法检测的结果相一致 (另文发表), 凡是 PCR 结果为阳性的植株, 其它检测方法也得到了阳性结果。

3 讨论

psbA 基因在不同植物中有很高的保守性, 不论抗性基因还是敏感基因, 其 DNA 序列差异不大。我们设计引物时不仅根据大豆和龙葵 psbA 基因序列, 还参考了其它植物 psbA 基因序列, 引物 R₁、C₁ 和 C₂ 在各种植物中具有通用性。如果用 R₁ 和 C₂ 作为一对引物扩增 psbA 基因, 在 PCR 条件稍作改变的情况下能得到一条 229bp 的抗性特异的扩增带 (结果略)。通用引物的可靠性还需要多种材料证实。

利用本文建立的方法进行转基因大豆后代的鉴定,检测结果与其它检测方法得到的结果一致。在7株 PCR 结果阳性的植株中,黑龙江大豆北87-8-2-4植株在不同时期两次取样,提取 DNA 进行 PCR 检测均为阳性,说明该方法有较好的重复性。

Wing Y. Cheung 等人曾建立了 PCR 与内切酶相结合的方法来检测植物的阿特拉津抗性^[9],首先用一对引物扩增 psbA 基因片段,再用内切酶 Mae I 切 PCR 产物,根据酶切片段的不同来区分敏感基因(189bp 和 88bp 两个片段)和抗性基因(只有 277bp 一个片段)。但这种方法不能检测大豆阿特拉津的抗性,因为 psbA 敏感基因的第 790 位没有 Mae I 切点,经 PCR 和 Mae I 酶切后不能给出两个片段,与抗性基因没有区别。我们建立的方法不仅解决了大豆阿特拉津抗性的检测问题,而且使用了一对参照引物,避免了对 PCR 产物的酶切分析,也使得阿特拉津检测的过程大大简便。与以前采用的其它方法比较,PCR 方法不仅快速方便,而且也使得在种子时期及苗的早期检测阿特拉津抗性成为可能,这对于作物育种非常有用。

致 谢 苑红丽同志参加了部分工作,在此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] 朱立煌. 遗传学报, 1986, 13 (6): 403.
- [2] 刘博林. 中国科学 (B 辑), 1989, 7: 699.
- [3] 岳绍先. 植物学报, 1990, 32 (5): 343.
- [4] 朱立煌. 遗传学报, 1989, 16 (5): 381.
- [5] Albert, Erhard Nucleic Acids Res., 1983, 11 (20): 7157.
- [6] Williams J F. Amplifications, 1989, Issue 3.
- [7] Feng Qu. On publication.
- [8] Applied Biosystems. User Bulletin, 1991, 18.
- [9] Wing Y C. Plant Molecular Biology Report, 1993, 11 (2): 142.

Design and Application of a PCR-based Assay for Atrazine Resistant Gene

Zhai Wenxue Zhu Lihuang

(Institute of Genetics, CAS, Beijing, 100101)

Fu Junhua Li Liancheng Yue Shaoxian

(Institute of Crop Breeding and Cultivation, CAAS, Beijing 100081)

Abstract Based on the sequence differences of the atrazine resistant gene and the susceptible gene (the chloroplast psbA genes), the primers were designed to amplify the psbA genes. By using the primers a PCR based assay for atrazine resistance was established. The assay was used in screening of atrazine resistance transgenic soybean progenies and proved to be a simple, rapid and applicable method for the identification of atrazine resistant plants.

Key words Atrazine resistance, psbA gene, PCR amplification, transgenic soybean