

转番木瓜环斑病毒复制酶基因番木瓜的多重定性检测

阮小蕾¹, 马丽娟², 李华平^{1*}

(1.华南农业大学 资源环境学院, 广东 广州 510642; 2.中山大学 新华学院, 广东 广州 510520)

摘 要: 为监测和管理转基因番木瓜华农 1 号的商品化生产、销售, 建立了相应的转基因定性检测方法. 选用木瓜蛋白酶作为番木瓜的内源对照基因, 建立对转基因番木瓜 PRSV-Rep 基因、外源 CaMV 35S 启动子序列、NOS 终止子序列和 NPT II 基因的常规 PCR 检测体系. 退火温度为 40~60 °C 时, 都分别扩增出了清晰的目的基因. 单基因常规 PCR 检测转基因模板量的下限为 5×10^{-7} g. 建立的三重 PCR 检测技术, 检测了包括 NPT II、Rep 和 CaMV 35S; NPT II、Rep 和 Nos; NPT II、Rep 和 Papain 等 3 个组合. 建立了 NPT II、ReP、CaMV35S 和 Nos 4 个基因的四重 PCR 检测技术.

关 键 词: 番木瓜环斑病毒; 转基因番木瓜; 多重聚合酶链式反应

中图分类号: Q735 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)06-0626-04

Qualitative detection assay for transgenic papaya with replicase gene of papaya ringspot virus

RUAN Xiao-lei¹, MA Li-juan², LI Hua-ping^{1*}

(1.College of Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642,China; 2.Xinhua College, Sun Yet-sen University, Guangzhou 510520,China)

Abstract: A set of transgenic detection methods and technology had been established to supervise and manage the commercial producing and selling of the transgenic papaya-Huanong No.1 *Papain* (*Pn*) was chosen as the endogenous comparison genes of papaya and primers were designed to detect the transgenic papaya and non-transgenic papaya. The regular PCR was established to detect the PRSV-Rep, exogenous *CaMV 35S* promoter sequence, *NOS* terminator sequence and the *NPT II* of transgenic papaya. The clear bands were amplified when the annealing temperature was 40 °C to 60 °C. The sensitivity of the single gene was 5×10^{-7} g. The Triple-gene-PCR detection system was created to detect three combination genes of *NPT II*, *Rep* and *CaMV 35S*; or *NPT II*, *Rep* and *Nos*; or *NPT II*, *Rep* and *Papain*. And the Quad-PCR system was built to test four genes of *NPT II*, *Rep*, *CaMV35S* and *Nos* as well.

Key words: papaya ringspot virus; transgenic papaya; multiplex polymerase chain reaction

据农业生物技术应用国际服务组织(ISAAA)的统计资料显示,截至 2007 年,种植转基因作物的国家和地区已达 23 个,全球转基因作物年种植面积达到 1.23×10^8 hm²,比 1996 年增长了 67 倍^[1],

转基因植物田间试验的数量超过万例,转基因作物品种达 100 多个,由转基因作物加工的食品和食品成分达 4 000 多种^[2].随着转基因技术的迅速发展,与大规模应用,转基因作物的种类越来越多,含有

收稿日期: 2010-04-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(30671358); 公益性行业(农业)科研专项(nyhyzx 07-029)

作者简介: 阮小蕾(1973—),女,内蒙古包头市人,博士,讲师,研究方向为植物病理学,ruanxl@scau.edu.cn; *通讯作者, huaping@scau.edu.cn

的外源基因成分也日趋复杂,其检测任务逐渐繁重.与此同时,为了防止漏检,避免引发贸易纠纷,需要对多个可能基因同时进行检测,以准确判定结果,迫切需要研究开发快速、准确、简便、经济的多基因检测技术.

目前,国内外对转基因作物的检测技术综合起来主要有两大类型:一是基于转入的外源基因核酸水平上的检测;二是基于转入外源基因表达产物蛋白质水平上的检测.前者的检测,以采用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)定性检测为主^[4-5].番木瓜不仅可以食用,还具有极其重要的工业应用价值^[4].华南农业大学植物病毒研究室通过转番木瓜环斑病毒(papaya ringspot virus, PRSV)广东地区优势株系Ys复制酶(Rep)基因的方法,获得了高度抗PRSV的转基因番木瓜植株.通过调查T₁~T₅代转基因植株的田间抗病性,发现转Rep基因的番木瓜高抗华南地区的PRSV,而且这种抗病性可以稳定遗传^[6-9].2005年获得了转基因纯合系植株(结果未发表).转基因番木瓜“华农1号”于2006年获得农业部准予商品化生产应用的安全证书,成为中国商品化生产的第1例转基因果树作物.

为了建立转基因番木瓜的检测行业标准,笔者建立了华农1号的多重PCR检测技术,旨在监测和管理华农1号的商品化生产、销售,以及作为种质资源的育种应用等,为华农1号番木瓜的市场准入奠定技术基础.

1 材料和方法

1.1 材料

番木瓜华农1号植株、非转基因的番木瓜园优一号、little white由华南农业大学植物病毒研究室提供.

Ex Taq DNA聚合酶、dNTPs、DNase I (RNase free) 购自广州 TaKaRa 生物有限公司.

1.2 方法

1.2.1 转基因番木瓜总DNA的提取

取供试植株幼嫩叶片0.1g进行抽提,参照文献[10]方法进行.

1.2.2 引物设计与合成

根据NCBI上公布的序列,利用Primer Premier 5.0和DNASTAR软件设计、合成5对引物,其中,选用木瓜蛋白酶基因(*Papain*, *Pn*)作为番木瓜的内源对照基因.扩增的外源基因为转基因番木瓜的*Rep*基因、外源*CaMV 35S*启动子序列、*NOS*终止子序列和*NPT II*基因.引物由英骏生物有限公司合成.引物序列见表1.

表1 PCR引物及引物序列

Table 1 The primer sequence

基因	引物	序列
<i>NPT II</i>	<i>NPT II</i> 1	5'-ATGATTGAACAAGATGGATTG-3'
	<i>NPT II</i> 2	5'-TCAGAAGAAGTCTCGTCAAGAAG-3'
<i>Rep</i>	<i>Rep</i> 1	5'-GTGGTTCATGTCACATCGAG-3'
	<i>Rep</i> 2	5'-AATACACCAGTAGCTCAGGC-3'
<i>CaMV 35S</i>	<i>35S</i> 1	5'-GATAGTGGGATTGTGCGTCA-3'
	<i>35S</i> 2	5'-GCTCCTACAAATGCCATCA-3'
<i>Nos</i>	<i>Nos</i> 1	5'-GAATCCTGTTGCCGGTCTTG-3'
	<i>Nos</i> 2	5'-TTATCCTAGTTTGCGCGCTA-3'
<i>Papain</i>	<i>Papain</i> 1	5'-GGGCATTCTCAGCTGTTGTA-3'
	<i>Papain</i> 2	5'-CGACAATAACGTTGCACTCC-3'

1.2.3 单重PCR检测

不同退火温度的单重PCR反应体系参照文献[11]方法进行.

在引物设计过程中,尽量使引物*T_m*值在理论上相差不大,为后续的多重PCR减少误差.对各单基因片段进行了40~60℃不同退火温度的扩增,取10个温度梯度.

PCR反应的条件为:94℃预变性5min;94℃变性30s;40~60℃退火40s;72℃延伸60s.进行35个循环.

选择以*Rep*基因为靶序列,以华农1号DNA为模板,在单重PCR的25μL体系中,模板的量的梯度设置为10⁰、10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶,分别对应鲜叶重为5×10⁻⁴、5×10⁻⁵、5×10⁻⁶、5×10⁻⁷、5×10⁻⁸、5×10⁻⁹、5×10⁻¹⁰g.

1.2.4 三重PCR检测

在预备试验过程中,对各单基因片段的扩增进行了退火温度的筛选.结果表明,在退火温度为52℃时,各片段均能较好地扩增,所以在三重PCR中,退火温度均使用52℃.总体系采用50μL.分别检测*NPT II*、*Rep*和*CaMV35S*,*NPT II*、*Rep*和*Nos*,*NPT II*、*Rep*和*Papain*3个组合.

PCR体系为：10×PCR Buffer 2.5 μL，dNTPs(100 mmol/L)0.25 μL，引物*NPT II*1(10 μmol/L)4 μL，引物*NPT II*2(10 μmol/L)4 μL，引物*Rep*1(10 μmol/L)2 μL，引物*Rep*2(10 μmol/L)2 μL，引物 35*S*1(*Nos*1 或 *Papain*1)(10 μmol/L)2 μL，引物 35*S*2(*Nos*2 或 *Papain*2)(10 μmol/L)2 μL，*Taq* 酶(5 U/μL)0.2 μL，DNA 模板(10~50 ng)1 μL，用ddH₂O补足体系至 50 μL。

PCR 扩增参数为：94 °C 预变性 3 min；94 °C 变性 40 s，52 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 40 s。进行 35 个循环。

12.5 四重 PCR 检测

检测 *NPT II*、*Rep*、*CaMV35S* 和 *Papain* 4 个基因时，引物除了 *NPT II* 1 和 *NPT II* 2 采用 3.5 μL 之外，*Rep*，*CaMV 35S* 和 *Nos* 基因 3 对扩增引物均采用 2 μL。PCR 扩增体系、扩增参数以及产物的电泳方法同三重 PCR 检测。

2 结果和分析

2.1 不同退火温度下单基因的 PCR 检测

分别利用设计的引物进行 *NPT II*、*Rep*、*CaMV 35S* 和 *Nos* 基因的 PCR 扩增，并进行不同退火温度条件下的结果检测。PCR 扩增后，发现退火温度 40 ~ 60 °C 都分别扩增出了 *NPT II*、*Rep*、*Nos*、*CaMV35S* 基因，且条带清晰，无杂带。说明设计的引物特异性较强，可以用于相关基因的检测。

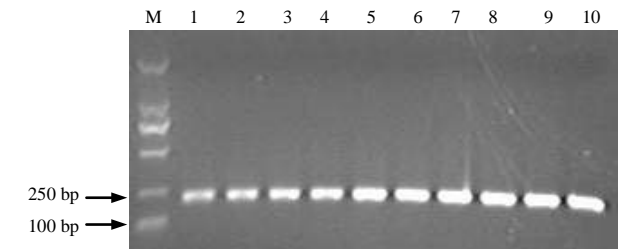
2.2 不同退火温度下内源参照基因的 PCR 检测

以 *Papain*1 和 *Papain*2 为引物，退火温度 40~60 °C，进行 PCR 扩增，发现退火温度 40 ~ 60 °C 都扩增出了 *Papain* 基因，并且电泳条带清晰，无杂带(图 1)。说明根据 *Papain* 基因设计的引物特异性较强，可以用做番木瓜内源基因的检测。

2.3 单基因 PCR 灵敏度的检测

以转基因番木瓜的 *Rep* 基因为靶序列，将模板 DNA 稀释之后进行 PCR 检测。电泳结果(图 2)显示：鲜叶重为 5×10⁻⁴g 的(DNA 模板量梯度为 10⁰)时，*Rep* 的条带清晰明亮；当鲜叶重为 5×10⁻⁸g 及以下时，则检测不到 *Rep* 的目的条带。表明单基因常规 PCR 检测转基因模板量梯度的下限为 10⁻³(5×10⁻⁷g

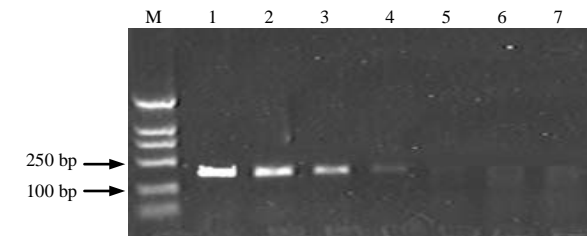
鲜叶组织)。



M DL 2000 分子量标准；1~10 退火温度分别为 40、42、44、46.4、48.8、52、53.6、56、58、60 °C。

图 1 转基因番木瓜中 *Papain* 基因的温度梯度 PCR 产物的电泳检测结果

Fig.1 Electrophoresis analysis of temperatuer gradient PCR products of *Papain*



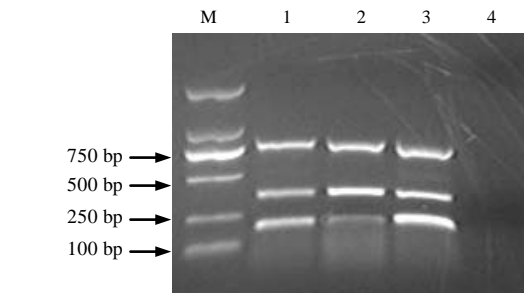
M DL2000 分子量标准；1~7 相当于鲜叶重分别为 5×10⁻⁴、5×10⁻⁵、5×10⁻⁶、5×10⁻⁷、5×10⁻⁸、5×10⁻⁹、5×10⁻¹⁰g。

图 2 转基因番木瓜中 *Rep* 基因的 PCR 扩增灵敏度试验的凝胶电泳结果

Fig.2 Electrophoresis analysis of sensitivity of PCR products of *Rep*

2.4 三重 PCR 检测结果

使用不同的引物组合，进行目的基因的重 PCR 扩增。电泳结果(图 3)显示：转基因番木瓜均扩增出了清晰的目地基因。3 个基因组合中，阴性对照非转基因番木瓜均无扩增条带出现，说明设计的引物特异性较强，可以用于番木瓜及杂交品系中转基因成分的检测。



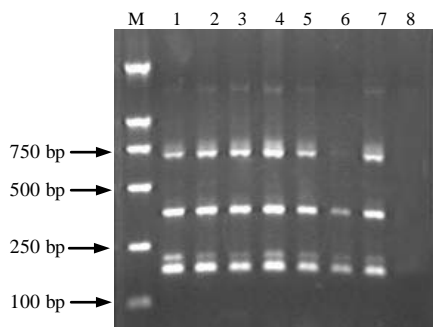
M DL 2000 分子量标准；1 *NPT II*、*Rep* 和 *CaMV35S*；2 *NPT II*、*Rep* 和 *Nos*；3 *NPT II*、*Rep* 和 *Papain*；4 阴性对照。

图 3 三重 PCR 扩增的凝胶电泳

Fig.3 Electrophoresis analysis of triple-gene-PCR products

2.5 四重 PCR 检测结果

使用不同的引物组合, 进行 *NPT II*、*Rep*、*CaMV 35S* 和 *Nos* 基因的四重 PCR 扩增, 用非转基因番木瓜的基因组作为阴性对照。电泳结果(图 4)显示: 只有转基因番木瓜扩增出了目标基因, 非转基因番木瓜没有扩增条带出现, 而且扩增出的电泳条带较为清晰, 只是在约 1 700 bp 位置有 1 条微弱的杂带, 说明根据 *NPT II*、*ReP*、*CaMV35S* 和 *Nos* 设计的引物特异性较强, 可以用于转基因番木瓜及杂交品系的检测。



M DL 2000 分子量标准; 1~7 转基因番木瓜; 8 非转基因番木瓜。

图 4 *NPT II*、*Rep*、*CaMV35S* 和 *Nos* 基因四重 PCR 扩增的凝胶电泳结果

Fig.4 Electrophoresis analysis of Quad-PCR system to test four genes of *NPT II*, *Rep*, *CaMV35S* and *Nos*

3 讨论

目前, 已经建立了转基因大豆、油菜、玉米、烟草、马铃薯、棉花等作物的检测行业标准, 多重 PCR 技术已用于多种转基因作物的检测^[12-13]。Forte 等^[14]利用其设计的多重 PCR 方法对转基因大豆和转 *Bt* 基因的玉米样品进行检测, 结果能够准确检测食品中是否含有转基因成分, 其检测结果可以精确到 2% ~ 0.1%。赵锦等^[15]以转基因大豆 Round Ready 品种和转基因 *Bt*176 玉米及转抗菌肽基因的辣椒为材料建立了多重 PCR 检测方法, 取得了满意的结果。

笔者建立了转基因番木瓜多重 PCR 检测体系, 在一个反应体系中同时检测多个转基因成分, 既缩短了检测时间, 降低了成本, 也提高了检测效率和准确率, 有效避免了漏检现象。

影响多重 PCR 扩增最重要的因素是引物的设计^[16]。目前已经商品化的转基因植物, 其启动子、终止子、标记基因等在植物基因工程操作中具有通

用性, 而目的基因由于植物的种类不同而差异很大。本试验确定了常用的转基因番木瓜的 4 种外源基因, 即 *CaMV35S*、*NOS*、*NPT II*、*Rep* 等作为检测的目的片段, 以 *Papain* 基因作为内源基因。通过 GeneBank 查找上述 5 种基因的准确序列, 利用生物软件设计多重 PCR 检测转基因成分的引物。通过试验证明, 所采用的几对引物对已知转基因番木瓜的检测具有很好的特异性, 多重 PCR 电泳条带清晰, 容易区分各片段。

在本研究中, 筛选多重 PCR 退火温度时, 显示当退火温度在 52 °C 时, 各个基因电泳条带都很清晰, 扩增效率高。在 *NPT II*、*Rep* 和 *Nos* 基因的三重 PCR 和四重 PCR 扩增时, 出现 1 条大约 1 700 bp 微弱的杂带, 而且退火温度越低, 越容易出现非特异性条带, 所以在可能的范围内提高退火温度可以减少错配, 提高 PCR 扩增的特异性。

在本研究中对番木瓜其固有基因采用编码 *Papain* 的基因, *Papain* 基因在所有番木瓜品种中具有高度一致性^[17]。这个基因满足作为内源基因的四个条件: 该物种的所有品种都含有该基因, 其他生物不含有该基因, 或不存在扩增该基因的特异靶序列; 该基因在该物种中以单拷贝或恒定拷贝数存在, 很适合作为内源参照基因^[18]。本研究中以 *Papain* 基因作为反应样品内源参照基因, 扩增出的 *Papain* 条带单一, 清晰, 能有效地检测样品的来源。

参考文献:

- [1] Clive J. 2007 年全球转基因作物商业化发展态势——从 1996 到 2007 年的第一个 12 年[J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(2): 1-10.
- [2] 张莹, 张永军, 吴孔明, 等. 转基因植物的检测策略和检测技术[J]. 植物保护, 2007, 33(1): 11-14.
- [3] 薛达元. 转基因生物安全与管理[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 144-151.
- [4] Gonslaves D. Control of papaya ringspot virus in papaya: A case study[J]. Annu Rev Phytopathol, 1998, 36: 415-437.
- [5] 邵素琴, 李建中. 转基因食品的检测方法[J]. 农药科学与管理, 2002, 23(3): 26-27.

(下转第 682 页)