

1 种适用于转基因玉米 PCR 检测的 DNA 快速提取方法

戴军^{1,2}, 汪海², 朱莉², 黄大昉², 郎志宏^{2*}

(1. 西南科技大学生命科学与工程学院, 四川绵阳 621010; 2. 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

摘要 [目的] 建立一种快速提取玉米基因组 DNA 的方法。[方法] 对改良 CTAB 法进行进一步简化, 不需要进行沉淀、洗涤、溶解和 RNA 消化等步骤, 建立一种快速提取玉米基因组 DNA 的方法。[结果] 该方法获得的 DNA 完整性及 PCR 扩增效果与试剂盒提取方法相比无明显差异; 经过对样品 ELISA 检验可知, 该方法得到的 DNA 用于 PCR 检测结果准确。[结论] 该方法能够满足转基因玉米 PCR 检测中快速、高效、准确、高通量的要求。

关键词 转基因玉米; 基因组 DNA; 快速提取; PCR 检测

中图分类号 S513 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)12-03494-03

A Rapid DNA Extraction Method Applying to PCR Detection of Transgenic Maize

DAI Jun, LANG Zhi-hong et al (School of Life Science and Engineering, Southwest Science and Technology University, Mianyang, Sichuan 621010; Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract [Objective] To establish a fast method to extract maize genome DNA. [Method] Improved CTAB method was further simplified, a method for rapid extraction of the maize genome DNA was established without the steps of alcohol precipitation, washing, dissolving and RNA digestion. [Result] The DNA integrity and the PCR amplification using this method showed no significant difference from the plant genomic DNA extraction kit method. Furthermore, it was same detection results with ELISA analysis and with PCR detection using DNA template obtained by this method. [Conclusion] Therefore, this method is a rapid, efficient, accurate, high-throughput method that meets the PCR detection requirements of genetically modified maize.

Key words Transgenic maize; Genomic DNA; Rapid extraction; PCR detection

玉米作为我国重要的粮食作物和工业原料, 近年来需求不断上升, 我国已从玉米净出口国转变成净进口国, 玉米自给率不断下降^[1], 粮食安全问题引起国人的注意。植物基因工程技术快速发展, 为培育优质、高产、抗逆的玉米新品种, 满足我国对玉米的需求, 保证国家粮食安全提供了新方法^[2]。在转基因玉米研究和培育过程中, 阳性植株的筛选、插入序列分析、安全检测一般都离不开分子检测, 最常用的分子检测手段是 PCR 检测。PCR 检测的基础是提取满足检测需要的基因组 DNA。目前, 高质量的基因组 DNA 提取方法主要有 CTAB 法、SDS 法、离心柱提取试剂盒法和磁珠提取试剂盒法^[3-6]。但是前 2 种方法费时费力, 后 2 种方法费用较高^[7], 都难以适用于转基因植株检测时大批量提取基因组 DNA 的要求。在研究或者筛选群体较大(如转基因植株的大批量筛选、遗传规律分析等)时, 提取基因组 DNA 就会成为一项繁重的工作, 并成为检测和筛选速度的一个重要制约因素。因此出现了碱裂解法^[8]和高温水煮法^[9]等一步法提取 DNA 的方法。这些简易方法成本低、速度快, 但是存在 DNA 提取质量差、PCR 效果不理想和保存时间短等问题。

笔者通过对改良 CTAB 法进一步简化, 摸索出经过 2 步处理得到用于 PCR 检测的基因组 DNA 提取方法(简称“2 步 CTAB 法”); 同时比较了离心柱试剂盒提取法和 2 步 CTAB 法在 DNA 提取质量、耗费时间、成本和 PCR 扩增效果上的差异, 并对 PCR 检测结果进行验证, 以期为大批量检测 PCR 提供理论依据。

基金项目 转基因生物新品种培育重大专项(批准号:2013ZX08003-001); 国家自然科学基金(批准号:30970231)。

作者简介 戴军(1986-), 男, 湖北十堰人, 硕士研究生, 研究方向: 植物分子生物学与基因工程。* 通讯作者, 研究员, 从事植物基因工程研究。

收稿日期 2014-04-14

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象。材料为实验室获得的转 Bt *cry1Ah* 基因抗虫材料 A1 和 A2 事件及非转基因玉米自交系综 31。

1.1.2 主要试剂。CTAB 提取液(CTAB 4 g, NaCl 16.364 g, 1 mol/L Tris-HCl 20 ml(pH8.0), 0.5 mol/L EDTA 8 ml, 先用 70 ml ddH₂O 溶解, 再定容至 200 ml 灭菌)、氯仿/异戊醇(24:1)、2×Taq mix 和植物基因组 DNA 提取试剂盒, 均购自北京康为世纪生物科技有限公司; ELISA 试剂盒, 购自 EnviroLogix 公司。

1.2 方法

1.2.1 2 步 CTAB 法提取玉米基因组 DNA。①取 50~100 mg 的玉米叶片, 放入 1.5 ml EP 管中。将 EP 管放入液氮中, 等取完所有的样品后, 用在液氮中快速冷冻过的玻璃棒将叶片研磨成粉末(大批量操作时可以在 EP 管中放入珠子, 在自动磨样机上把样品砸碎)。加入 500 μl CTAB 提取液, 在 65℃水浴 10 min。②在水浴后的 EP 管中加入 500 μl 氯仿/异戊醇(24:1), 振荡混合, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清作为 PCR 模板。

1.2.2 试剂盒法提取玉米基因组 DNA。按照康为世纪公司《植物基因组 DNA 提取试剂盒使用说明书》进行操作, 最后溶解在 100 μl ddH₂O 中。

1.2.3 提取的基因组 DNA 完整性分析。在提取的 DNA 中加入 0.5 μl RNase(10 mg/ml), 37℃消化 30 min, 取 5 μl 提取的 DNA, 加入 1 μl 6×loading buffer, 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 在凝胶成像仪上观察、成像。

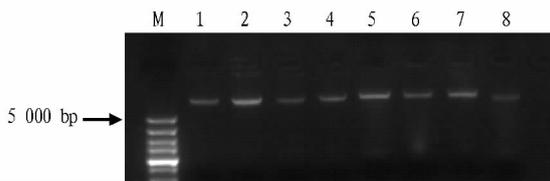
1.2.4 PCR 检测效果分析。将提取的 DNA 稀释 10 倍, 取 1 μl 为模板, 外源基因 *cry1Ah* 的特异性引物 F1: CGGATG-

GCAAATTGGAGGAG, R1: ACTTGAGGGAATGGCACGGGT, 用于扩增 A1 事件的 *cry1Ah* 基因片段。F2: GCATCTCCACCTA-CACCGACTA, R2: CGGCTGGAATCTGGGTAATC 用于特异性扩增 A2 事件的 *mcry1Ah* 基因片段。反应体系如下: 基因组 DNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 0.5 μl , 5' primer (10 pmol/ μl) 0.25 μl , 3' primer (10 pmol/ μl) 0.25 μl , $2 \times \text{Taq mix}$ 10 μl , ddH₂O 9 μl 。扩增条件如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 扩增循环数 30; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min。

1.2.5 对 PCR 检测结果的验证。按照 CTAB 2 步法提取转基因玉米 A1 和 A2 事件的基因组 DNA, 进行 PCR 检测。同时提取样品的总蛋白, 用 ELISA 的方法进行对植株分离情况进行鉴定, ELISA 的操作方法按照操作说明进行。

2 结果与分析

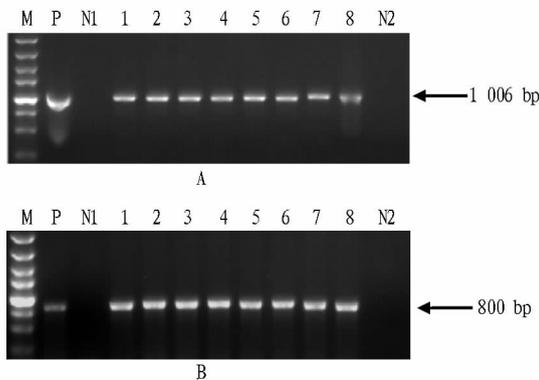
2.1 提取基因组 DNA 的完整性检测 将 2 步 CTAB 法和试剂盒法 2 种方法提取的基因组 DNA 在琼脂糖凝胶上电泳检测。图 1 表明, 这 2 种方法提取的 DNA 电泳条带大小一致, 未见有明显的差异, 也未见明显的降解条带, 说明 2 步 CTAB 法提取的基因组 DNA 具有较好的完整性。



注: M 为 DNA Marker; 1~4 为试剂盒提取法获得的基因组 DNA; 5~8 为 2 步 CTAB 法获得的基因组 DNA。

图 1 不同提取方法获得基因组 DNA 的琼脂糖凝胶检测结果

2.2 PCR 扩增分析 分别以这 2 种方法提取的基因组 DNA 为模板, 对 2 个不同材料的外源基因进行 PCR 扩增分析。图 2A 是使用引物 F1/R1 对 A1 事件进行 PCR 检测的结果, 目标条带大小为 1 006 bp, 图 2B 是使用引物 F2/R2 对 A2 事



注: A 中 M 为 DNA marker; P 为正对照; N1 为负对照, 非转基因植株, 试剂盒提取法; 1~4 为 A1 植株, 试剂盒提取法; 5~8 为 A1 植株, 2 步 CTAB 法; N2 为负对照, 非转基因植株, 2 步 CTAB 法。B 中 M 为 DNA marker; P 为正对照; N1 为负对照, 非转基因植株, 试剂盒提取法; 1~4 为 A2 植株, 试剂盒提取法; 5~8 为 A2 植株, 2 步 CTAB 法; N2 为负对照, 非转基因植株, 2 步 CTAB 法。

图 2 不同方法提取物为模板进行 PCR 扩增结果

件进行 PCR 检测的结果, 目标条带大小为 800 bp。PCR 扩增时以转化质粒为正对照, 以非转基因自交系综 31 植株为负对照。样品 N1 和 1~4 使用试剂盒提取基因组 DNA, 样品 5~8 及 N2 使用 2 步 CTAB 法提取基因组 DNA。结果表明, 2 个转基因株系使用 2 步法提取的 DNA 为模板都能扩增出预期大小的条带, 且条带清晰、明亮, 与试剂盒提取的 DNA 进行的 PCR 结果无明显差别。说明 2 步 CTAB 法提取的基因组 DNA 能够满足 PCR 反应的需要。

2.3 2 种提取方法的时间和成本比较 对试剂盒提取法和 2 步 CTAB 提取法的成本和提取时间进行比较, 分别以少量样品 (以 8 个样品为例) 和大量样品 (以 100 个样品为例) 2 种情况。由表 1 可知, 2 步 CTAB 法的提取成本远低于试剂盒, 提取所需要的时间也仅为试剂盒提取方法的 1/4, 在大批量操作时更具优势。

表 1 2 种提取 DNA 方法的成本及提取时间比较

| 提取方法 | 8 个样品 | | 100 个样品 | |
|------------|-----------------------------|-----------|------------------------------|----------------------------|
| | 试剂耗材成本 | 时间 | 试剂耗材成本 | 时间 |
| 试剂盒法 | 除一般耗材外, 试剂盒每个样品 5 元, 共 40 元 | 2 h 左右 | 除一般耗材和试剂外, 每个样品 5 元, 共 500 元 | 分 2~3 次提取, 每次 3 h, 共 6~9 h |
| 2 步 CTAB 法 | 只需要一般耗材 | 30 min 以内 | 只需要一般耗材 | 1 次提取, 2 h 以内 |

2.4 准确性分析 为了验证该方法的准确性, 对 134 株 A1 杂交植株、128 株 A2 杂交植株使用 2 步 CTAB 法提取基因组 DNA 进行 PCR 检测, 同时使用 ELISA 的方法对 PCR 检测的样品提取蛋白进行 Bt Cry1Ah 蛋白检测。由表 2 可知, 在所有的检测中, 二者检测结果一致。说明 2 步 CTAB 法提取基因组 DNA 进行 PCR 检测结果准确可靠。

表 2 PCR 检测与 ELISA 检测结果的对比

| 项目 | 样品数 | PCR 检测阳性个数 | ELISA 检测与 PCR 一致的样品数 | 一致性 |
|-------|-----|------------|----------------------|------|
| A1 事件 | 134 | 95 | 134 | 100% |
| A2 事件 | 128 | 70 | 128 | 100% |

3 结论与讨论

从 1996 年的 170 万 hm^2 到 2013 年的 1.75 亿 hm^2 , 全球转基因作物的种植面积增加了 100 多倍, 这使得转基因技术成为现代农业史上采用最为迅速的生物技术^[10]。转基因技术作为一项高新技术, 受到世界各国高度重视。“转基因生物新品种培育重大专项”的实施, 也为我国发展转基因农作物研究提供了国家战略支撑^[11]。玉米作为我国重要的粮食和工业原料, 获得一批优质、高产、抗逆的转基因玉米是该“重大专项”的一个重要目标之一。

在转基因玉米转化筛选过程中, 一般都需要进行大批量的 PCR 检测, 以确定阳性植株。对获得的转基因材料的后代进行遗传规律分析时, 也需要一个比较大的检测群体进行 PCR 检测。检测的前提是提取质量可靠、可用于 PCR 检测的基因组 DNA, 现已有的一些提取方法虽然得到的基因组 DNA 质量高, 但提取步骤繁琐, 成本高, 费时费力, 尤其是不适用于大批量的群体检测^[12]。实验室在筛选转基因抗虫玉

米的工作中摸索出一种适用于 PCR 检测的玉米基因组 DNA 快速提取方法,该方法在改良的 CTAB 法的基础上进行进一步简化,不需要沉淀、干燥、溶解、RNase 消化等步骤,大大简化了操作过程,节省了操作时间。同时在 CTAB 的配方中不需要加入巯基乙醇,大大减少对人体的危害和对环境的污染。另外,简化操作步骤还可以减少对基因组的损伤,减小操作过程污染的可能性,减少 PCR 检测过程中出现的假阳性现象。经过和试剂盒提取法比较和应用 ELISA 的方法进行检验,发现其检测效果与试剂盒提取法无差异,准确度高,完全满足常规的 PCR 检测。实现了简捷、快速、高效、高通量提取玉米基因组 DNA 的要求。

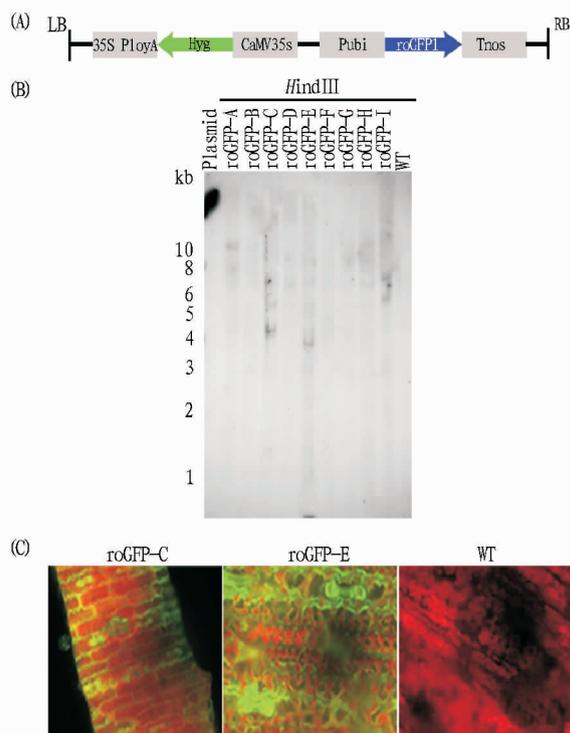
参考文献

- [1] 仇焕广,张世煌,杨军,等. 中国玉米产业的发展趋势,面临的挑战与政策建议[J]. 中国农业科技导报,2013,15(1):20-24.
- [2] 彭永刚,张磊,朱祯. 国内外转基因农作物研发进展[J]. 植物生理学报,2013,49(7):611-614.
- [3] STEWART JR C N, VIA L E. A rapid CTAB DNA isolation technique use-

ful for RAPD fingerprinting and other PCR applications [J]. Biotechniques, 1993, 14(5):748-750.

- [4] EDWARDS K, JOHNSTONE C, THOMPSON C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis [J]. Nucleic Acids Research, 1991, 19(6):1349.
- [5] 陈丽丽,张鹏,黄新,等. 玉米基因组 DNA 提取及浓度测定方法评价 [J]. 生物技术通报,2011(12):13.
- [6] 曹士亮,曹靖生,王成波,等. 玉米 SSR 分子标记技术操作流程研究进展 [J]. 中国农学通报,2012,28(15):1-4.
- [7] 楼巧君,陈亮,罗利军. 三种水稻基因组 DNA 快速提取方法的比较 [J]. 分子植物育种,2006,3(5):749-752.
- [8] 李筱婷,陈卓君,许文涛,等. 一种适于 PCR 扩增的植物基因组 DNA 快速提取新方法 [J]. 农业生物技术学报,2010,18(2):394-399.
- [9] 张晓祥,王玲,寿路路. 一种快速提取小麦基因组 DNA 的改良 CTAB 方法 [J]. 中国农学通报,2012,28(36):46-49.
- [10] JAMES CLIVE. ISAAA Report on Global Status of Biotech/GM Crops: 2013 [J]. China Biotechnology, 2014, 34(1):1-8.
- [11] 黄大防. 加快发展现代农业,大力推进转基因生物育种产业化 [J]. 中国农业科技导报,2007,9(3):9-12.
- [12] 孙璐宏,鲁周民,张丽. 植物基因组 DNA 提取与纯化研究进展 [J]. 西北林学院学报,2010,25(6):102-106.

(上接第 3493 页)



注:(A)为 roGFP1 基因示意图;(B)为 roGFP1 转基因植株的 Southern Blot 鉴定;(C)为转基因株系 roGFP-C、roGFP-E 以及 WT 玉米叶片荧光图片。

图 4 roGFP1 转基因植株的 Southern Blot 鉴定和荧光显微镜观察节,过表达 ABP9 基因提高了玉米的多种非生物逆境抗性^[13]。响应玉米体内氧化还原状态改变的 roGFP1 稳定表达系统的建立为进一步分离玉米 ROS 信号转导网络中的关键组分奠定了重要的基础。

参考文献

- [1] MITTLER R, VANDERAUWERA S, SUZUKI N, et al. ROS signaling: the new wave? [J]. Trends in Plant Science, 2011, 16(6):300-309.

[2] 薛鑫,张芊,吴金霞. 植物体内活性氧的研究及其在植物抗逆方面的应用 [J]. 生物技术通报,2013(10):6-11.

- [3] SWANSON S J, CHOI W G, CHANOCA A, et al. In vivo imaging of Ca^{2+} , pH, and reactive oxygen species using fluorescent probes in plants [J]. Annu Rev Plant Biol, 2011, 62:273-297.
- [4] BULGAKOV V P, AMININ D L, SHKRYL Y N, et al. Suppression of reactive oxygen species and enhanced stress tolerance in *Rubia cordifolia* cells expressing the roC oncogene [J]. Mol Plant Microbe Interact, 2008, 21:1561-1570.
- [5] HANSON G T, AGGELER R, OGLESBEE D, et al. Investigating Mitochondrial Redox Potential with Redox-sensitive Green Fluorescent Protein Indicators [J]. J Biol Chem, 2004, 279:13044-13053.
- [6] CHOI W G, SWANSON S J, GILROY S. High-resolution imaging of Ca^{2+} , redox status, ROS and pH using GFP biosensors [J]. The plant Journal, 2012, 70:118-128.
- [7] DOOLEY C T, DORE T M, HANSON G T, et al. Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators [J]. J Biol Chem, 2004, 279:22284-22293.
- [8] MEYER AJ, BRACH T, MARTY L, et al. Redox-sensitive GFP in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer [J]. The Plant Journal, 2007, 52:973-986.
- [9] JIANG K, SCHWARZER C, LALLY E, et al. Expression and characterization of a redox-sensing green fluorescent protein (reduction-oxidation-sensitive green fluorescent protein) in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2006, 141:397-403.
- [10] SCHWARZLÄNDER M, FRICKER M D, MÜLLER C, et al. Confocal imaging of glutathione redox potential in living plant cells [J]. Journal of Microscopy, 2008, 231(2):299-316.
- [11] YU S, QIN W, ZHUANG G, et al. Monitoring oxidative stress and DNA damage induced by heavy metals in yeast expressing a redox-sensitive green fluorescent protein [J]. Current Microbiology, 2009, 58(5):504-510.
- [12] WOLF A M, NISHIMAKI K, KAMIMURA N, et al. Real-time Monitoring of Oxidative Stress in Live Mouse Skin [J]. Journal of Investigative Dermatology, 2013. doi: 10.1038/jid.2013.428.
- [13] ZHANG X, WOLLENWEBER B, JIANG D, et al. Water deficits and heat shock effects on photosynthesis of a transgenic *Arabidopsis thaliana* constitutively expressing ABP9, a bZIP transcription factor [J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(4):839-848.
- [14] ZHANG X, WANG L, MENG H, et al. Maize ABP9 enhances tolerance to multiple stresses in transgenic *Arabidopsis* by modulating ABA signaling and cellular levels of reactive oxygen species [J]. Plant Mol Biol, 2011, 75:365-378.