

# 转基因草莓植株 cNHX1 基因表达水平和拷贝数的 Real Time PCR 分析

魏振林<sup>1</sup>, 董玲<sup>2</sup>, 焦传珍<sup>1</sup>, 陈英剑<sup>3</sup>

(1. 山东省德州学院生物系, 253023; 2. 山东省德州学院机电系, 253023; 3. 山东济南军区总医院, 250000)

**摘要:** 分析了转 cNHX1 基因的草莓不同植株的外源基因表达水平和 cNHX1 基因的拷贝数。结果表明: 不同转基因株系 cNHX1 基因表达水平存在差异, 而且这种差异随盐胁迫时间的延长而更明显。在 6 个株系中, T6 株系有最高和最稳定的 cNHX1 基因表达水平, 而 T2 株系的表达水平最低。对转基因植株基因组 cNHX1 基因拷贝数的分析表明, T3、T6、T8 和 T14 的含量相似, 而与 T2 株系相差 289%~310%, 推测 T3、T6、T8 和 T14 株系为单拷贝植株, 而 T2 株系为 3 拷贝株系。

**关键词:** Real Time PCR; 基因表达; 拷贝数  
**中图分类号:** S 668. 403. 6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)05-0037-03

一个成功的转基因实验依赖于低拷贝的外源基因整合和稳定的基因表达, 通常 1 或 2 个拷贝的转基因植株外源基因表达量最高, 含有多拷贝外源基因的转基因植株表现出易于发生转基因沉默的倾向<sup>[1]</sup>; 而不同的转基因植株由于受到插入位点等多种因素的影响导致表达水平存在明显差异。目前的转基因技术还不能有效控制外源基因整合与表达能力, 而需要在转化结束之后进行大量筛选。

实时定量 PCR (Real Time PCR) 不仅是一种高敏感、高特异的检测核酸分子的定性方法, 而且也是一个能对核酸分子进行精确定量的有力工具, 目前它作为一个有效的实验方法, 已被广泛地应用于分子生物学研究的各个领域<sup>[2-5]</sup>。实时定量 PCR 技术较之以终点法为基础的定量 PCR 技术具有无与伦比的优势: 首先, 它不仅操作简便、快速高效, 而且具有更高的灵敏度 ( $< 5$  copies) 和特异性 ( $< 2\%$  standard deviation)<sup>[5]</sup>。其次, 由于在封闭的体系中完成扩增并实时检测, 大大降低了污染的可能性并且简化了操作步骤。最近, Real Time PCR 方法也被成功用于分析农杆菌或基因枪介导的转基因植株的拷贝数<sup>[6,8]</sup> 和外源基因表达的研究<sup>[7,10]</sup>。但是这些研究多以模式植物为试材, 关于利用 Real Time PCR 技术对转基因果树材料的研究尚未见报道。本实

验利用 Real Time PCR 技术分析了转基因草莓 cNHX1 基因的表达水平并分析了基因拷贝数的比值, 从而为 Real Time PCR 技术在果树材料外源基因的表达和拷贝数分析的研究中的应用进行了初步尝试。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

转化有 cNHX1 基因的弗吉尼亚草莓 (*Fragaria X ananassa* Duch.) 由实验室保存; ImProm II<sup>TM</sup> 反转录酶购自 Promega 公司; EX Taq 酶和 dNTP 购自 TaKaRa 公司; SYBR Green I 购自 ABI 公司; 引物由上海生工公司合成。

### 1.2 定量 PCR 引物的设计与序列

根据 cNHX1 基因的碱基序列, 利用软件 Primer3 和 OMIGA 软件设计并评价了不同引物对的  $T_m$  值、自身及引物间配对情况, 从中筛选出引物组合 SYBR2 作为实验用引物:

SYBR2: F5'GGTTTGATTATGGCTGGAAGAG 3'  
F5'TTGAGTGTGCCCTGACCTAGTA 3'

### 1.3 反转录反应

采用 CTAB 法<sup>[1]</sup> 提取 200mM NaCl 处理 1d 和 3d 的不同转基因系草莓的总 RNA, 利用甲醛变性电泳结合测量 OD 值的方法定量, 利用 ImProm II<sup>TM</sup> 反转录酶进行 RT-PCR 反应, 20 $\mu$ L 反应体系含如下成分: 2 $\mu$ g 总 RNA, Oligo dT 2 $\mu$ L, 5 $\times$  buffer 4 $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> 4.8 $\mu$ L, dNTP 1 $\mu$ L, RNasin 1 $\mu$ L, 反转录酶 1 $\mu$ L, 42 $^{\circ}$ C 反应 60min。

### 1.4 Real Time PCR 实验方法

所用仪器为杭州大和公司生产的 Line-Gene FQD 33A 型 Real Time PCR 仪。25 $\mu$ L 反应体系的包括: 引物 0.2 $\mu$ M, EX Taq 1U, dNTP 200 $\mu$ M, 模版 1 $\mu$ L, 加入 MgCl<sub>2</sub>

第一作者简介: 魏振林 (1974-), 男, 2004 年毕业于山东农业大学园艺学院, 获农学博士学位, 现任德州学院生物系生物技术实验室主任, 副教授, 主要从事植物逆境基因工程研究, Email: wzl19741028@163.com.  
收稿日期: 2007-01-05

至终浓度为 2.0mg/L, 40×SRBR Green I 储存溶液 0.5μL, 按照如下的程序进行反应: 94℃ 2min, 94℃ 15s, 60℃ 20s, 72℃ 15s, 共 40 循环。

1.5 标准曲线的制作

分别取系列稀释的 Y15 质粒加入对照草莓 cDNA 或 50ng 草莓基因组 DNA 溶液中, 取 1μL 进行反应, 利用仪器自带程序制作标准曲线。

1.6 转基因草莓 cNHX1 基因表达量的定量分析

按照文献<sup>[4]</sup>的方法进行: 分别取不同转基因系的反转录产物 1μL, 稀释 10 倍, 取 1μL 加入定量 PCR 反应体系中进行定量 PCR 反应, 结果采用 PCR 仪自带的程序分析 Ct 值, 并利用标准曲线计算转录产物分子数。

1.7 转基因草莓 cNHX1 基因相对拷贝数的定量分析

按照文献<sup>[6]</sup>的方法修改进行: 取 50ng 转基因草莓组培苗基因组 DNA, 加入到定量 PCR 反应体系中反应, 反应结束后利用标准曲线计算分子数, 计算相互比值。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的制作

采用 10<sup>7</sup>~10<sup>3</sup> 拷贝系列稀释的质粒进行定量 PCR 反应, 得到标准曲线, 利用样点拟合法得到 cDNA 扩增回归直线方程:  $Y = -3.58 \times \log(\text{copynumber}) + 41.00$ , 相关系数为 -0.999。基因组扩增回归方程为  $Y = -3.89 \times \log(\text{copynumber}) + 43.82$ , 相关系数为 -1.000, 表明曲线的斜率和相关系数符合实验要求, 可以用于定量分析。

2.2 转基因草莓 cNHX1 基因转录产物的定量分析

以转基因草莓 cDNA 为模版进行 Real Time PCR, 结果表明不同转基因系之间 cNHX1 基因表达量有明显差异(图 1A 和 B)。NaCl 处理 1d 时, cNHX1 基因表达量由高至低依次是 T6、T14、T3 和 T2, 对应的分子数分别为 1.51×10<sup>5</sup> 至 6.42×10<sup>4</sup>, 不同株系之间表达量最高达相差 2.35 倍(表 1)。NaCl 处理 3d 时, 转基因植株 cNHX1 基因表达量均有不同程度降低, cNHX1 基因表达量由高至低依次是 T6、T3、T14 和 T2, 对应的分子数分别为 1.53×10<sup>5</sup> 至 1.21×10<sup>4</sup>, 表达量的下降水平分别为 T3(36.2%)、T6(15.5%)、T14(82.2%) 和 T2(81.2%) (表 2)。T6 植株的表达量仍然维持在 10<sup>5</sup> 数量级, 其余 3 个转基因株系的表达量均下降到 10<sup>4</sup> 数量级。

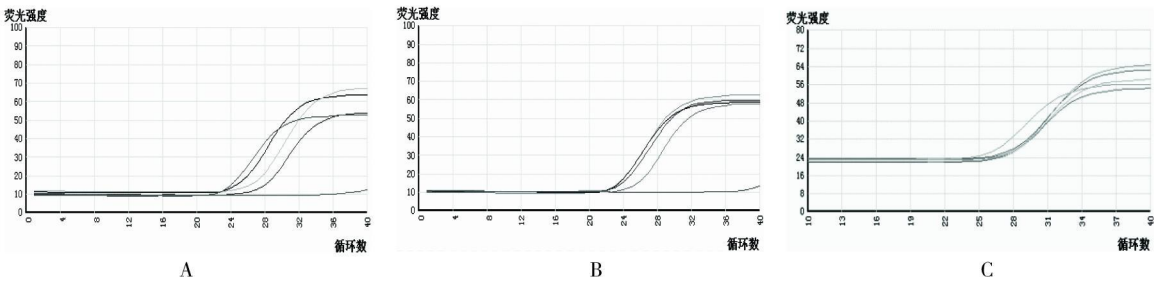
表 1 NaCl 处理 1d 转基因草莓植株 cNHX1 基因表达量

曲线颜色	植株编号	Ct 值	分子数
红色	T3	22.62	1.36×10 <sup>5</sup>
靛色	T6	22.18	1.81×10 <sup>5</sup>
蓝色	T14	22.25	1.73×10 <sup>5</sup>
绿色	T2	23.79	6.42×10 <sup>4</sup>
浅蓝			NTC

表 2 NaCl 处理 3d 转基因草莓植株 cNHX1 基因表达量

曲线颜色	植株编号	Ct 值	分子数
蓝色	T3	23.32	8.68×10 <sup>4</sup>
红色	T6	22.44	1.53×10 <sup>5</sup>
靛色	T14	24.93	3.08×10 <sup>4</sup>
绿色	T2	26.39	1.21×10 <sup>4</sup>
浅蓝			NTC

2.3 转基因植株 cNHX1 基因拷贝数的分析



注: A: NaCl 处理 1d 不同转基因株系 cNHX1 基因表达水平的荧光强度-循环数曲线; B: NaCl 处理 3d 不同转基因株系 cNHX1 基因表达水平的荧光强度-循环数曲线; C: 不同株系 cNHX1 基因相对含量分析的荧光强度-循环数曲线

图 1 Real Time PCR 结果

利用 Real Time PCR 分析了不同转基因株系基因组 DNA 中 cNHX1 基因的含量(图 1C), 结果表明在 50ng 基因组 DNA 中, 不同株系 cNHX1 基因扩增产物量有差异。但 T3、T6、T8 和 T14 分子数相差不大, 相互之间最高相差 7.21%(T3 与 T6 比较), 表明这些株系中 cNHX1 基因的含量基本相同。而这些株系与 T2 株系最低相差 287.7%(与 T3 株系比较), 最高相差 308.5%(与 T6 株系比较), 表明 T3、T6、T8 和 T14 株系和 T2 株

系基因组中 cNHX1 基因含量明显不同(表 3)。根据草莓基因组大小的粗略数据推测 T3、T6、T8 和 T14 可能为单拷贝株系, 而 T2 株系可能为 3 拷贝。

3 讨论

外源基因的表达水平是决定转基因效果的重要因素, 通常外源基因的表达水平受到多种因素的影响而在一个较大的范围内变动<sup>[3]</sup>。目前关于 NHX 基因转化植物的实验中, 尚未见在盐胁迫对外源基因表达水平进行

定量研究的报道。由于 Real Time PCR 技术具有高度灵敏度和精确性, 需要极少的植物材料, 并且操作相对简单的特点, 是研究转基因植物外源基因表达水平的良好方法, 目前已经有 Real Time PCR 技术应用于转基因植物外源基因表达研究的报导<sup>[10]</sup>。

表3 不同转基因株系基因组DNA 中 cNHX1 基因含量

曲线颜色	植株编号	Ct 值	分子数
绿色	T3	25.79	4.31×10 <sup>4</sup>
黄绿	T6	25.91	4.02×10 <sup>4</sup>
蓝色	T14	25.84	4.19×10 <sup>4</sup>
灰色	T2	24.00	1.24×10 <sup>6</sup>
紫色	T8	25.88	4.09×10 <sup>4</sup>

研究结果表明: 不同的转基因系 cNHX1 基因的表达水平存在差异, 而且这种表达水平的差异随盐胁迫处理时间的延长而扩大(表 1 和 2), 这种差异可能与转基因的位置效应或特殊的插入方式有关<sup>[3]</sup>。受到插入位点两测序列的影响, 某些转基因位点表达能力较差, 或者易于受到其它因素的影响而不能持续、稳定的表达。不同株系在盐胁迫条件下转基因表达水平的变化可能意味着耐盐能力的不同, 而且确实观察到不同株系盐胁迫条件下耐盐能力的差异(未发表资料), 这种基因表达水平的差异与转基因植株耐盐性关系的进一步研究正在进行之中。

由于缺乏草莓基因组大小的精确数据和已经证实的单拷贝转基因草莓植株, 因此本实验采用了较为简化的确定拷贝数方法<sup>[9]</sup>, 即将质粒 DNA 掺入基因组 DNA 中制作标准曲线, 然后以多代筛选的抗性苗(排除嵌合体的存在)基因组 DNA 为模版进行 Real Time PCR, 分析不同株系间外源基因含量的相对比值, 通过分析草莓基因组大小的粗略数据估算拷贝数。我们将进一步利用定量 PCR 的方法分析外源基因发生部分或不完整的插入及 DNA 的重排的现象及其规律。结合对基因表达

水平的定量分析, 可以快速的筛选拷贝数少, 表达量高而稳定的转基因植株。这 4 个株系的拷贝数确定之后, 即可以作为拷贝数标准, 按照 Mason 等的方法用于快速、大量筛选包括嵌合体在内的其它转基因植株。

参考文献:

[ 1 ] 彭立新. 水分胁迫下苹果 MAPK 基因的克隆、表达特性与信号转导作用[ D ]. 山东农业大学博士学位论文, 2003; p39.  
[ 2 ] Girzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream[ J ]. Experimental Hematology, 2002, 30: 503-512.  
[ 3 ] Halweg C, Thompson WF, Spiker S. The Rb7 Matrix Attachment Region Increases the Likelihood and Magnitude of Transgene Expression in Tobacco Cells: A Flow Cytometric Study[ J ]. The Plant Cell, 2005, 17: 418-429.  
[ 4 ] Kansai A, Muller S, Platz S, et al. Evaluation of a homemade SYBR Green I reaction mixture for Real-Time PCR quantification of gene expression[ J ]. BioTechniques, 2002, 32: 790-796.  
[ 5 ] Klein D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations[ J ]. TRENDS in Molecular Medicine, 2002, 8( 6 ): 257-260.  
[ 6 ] Mason G, Provero P, Vaira AM, et al. Estimating the number of integrations in transformed plants by quantitative real-time PCR[ J ]. <http://www.biomedcentral.com/2002/14726750/2/20>.  
[ 7 ] Miyamoto T, Nakamura T, Nagao I, et al. Quantitative analysis of transiently expressed mRNA in particle-bombarded tobacco seedlings[ J ]. Plant Molecular Biology Reporter, 2000, 18: 101-107.  
[ 8 ] 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[ J ]. Plant Cell Rep, 2001, 20: 422-428.  
[ 9 ] Song P, Cai CQ, Skokut M., et al. ( 2002 ) Quantitative real-time PCR as a screening tool for estimating transgene copy number in WHISKERS™-derived transgenic maize[ J ]. Plant Cell Rep, 2002, 20: 948-954.  
[ 10 ] Toplak N, Okrsar V, Gruden K. Quantitative real-time PCR assay for determining expression level of transgene in transformed tobacco plants 3rd SLOVENIAN Symposium on Plant Physiology[ C ]. Ljubljana Biološko sre disce, 2002.  
[ 11 ] Vaucheret H, Béclin G, Elmayan T, et al. ( 1998 ) Transgene-induced gene silencing in plants[ J ]. Plant J, 1998, 16: 651-659.

cNHX1 Gene Expression Level and Copy Number Analyze of Different Transgenic Strawberry Lines by Using Real Time PCR

WEI Zhen-lin<sup>1</sup>, DONG Lin<sup>2</sup>, JIAO Chun-zhen<sup>1</sup>, CHEN Ying-jian

( 1. Biology Department of DeZhou University, ShanDong 253023; 2. Mechanical and Electronical Science Department of DeZhou University, ShanDong 253023; 3. General Hospital of JiNan Military Area 250000)

**Abstract:** The expression level of cNHX1 gene of different transgenic strawberry lines were analyzed by using Real Time PCR, the results manifested the existence of difference in expression level among these lines, and this difference was more notable followed with the prolonged NaCl treating time. Among these lines, T6 lines had the most higher and steady expression level, while T2 lines had the most lower expression level. The relative cNHX1 fragment contents in genome of transgenic lines were analyzed also in this experiment, the results showed T3, T6, T8 and T14 lines had similar contents, and apparently different with it in T2 line( variety from 289% to 310%, respectively). By compared with the preliminary data of the genome size of strawberry, we speculated that T3, T6, T8 and T14 lines were one copy inserted lines, and T2 was 3 copy inserted line.

**Key words:** Real Time PCR; Gene expression; Copy number