DOI [illegible]
河南农业科学，2011，40(10)：41-43
Journal of Henan Agricultural Sciences

转植酸酶基因(*phyA*)玉米的PCR检测

赵丽娜，关淑艳*，王丕武，楚海娇，季丽丽
（吉林农业大学 生物技术中心，吉林 长春 130118）

摘要：采用CTAB法和SDS法对通过花粉管通道法导入植酸酶基因(*phyA*)的玉米植株，进行基因组提取并做了对比，认为SDS法效果更好，进而进行了PCR检测，并对PCR反应体系及反应条件进行优化，得出最适反应条件为57 ℃、模板含量1μL，检测得到了转基因阳性植株，初步证明外源目的基因已整合到玉米基因组中。

关键词：花粉管通道法；玉米；PCR检测；植酸酶基因
中图分类号：S513　　文献标识码：A　　文章编号：1004-3268(2011)10-0041-03

PCR Detection of *phyA* Transgenic Maize

ZHAO Li-na, GUAN Shu-yan*, WANG Pi-wu, CHU Hai-jiao, JI Li-li
(Biotechnology Center of Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: The CTAB method and SDS method were separately used to extract genome from *phyA* transgenic maize obtained by the pollen-tube pathway. By comparison, the SDS method obtained a better result. The genome was analyzed by PCR method, and the reaction system and reaction conditions were optimized. The optimal reaction condition was 57 ℃ with 1μL DNA as template. The result of PCR detection showed that positive transgenic plants were obtained and the foreign *phyA* gene was integrated into maize genome.

Key words: Pollen-tube pathway; Maize; PCR detection; *phyA*

玉米在农业生产中占有重要的地位，对粮食和饲料生产起着举足轻重的作用[1]。因此，提高玉米的产量和质量成为当务之急。一直以来，培育具有高产、抗虫、抗病等优良性状的玉米是育种工作者不断追求的目标。如，运用分子生物学手段把从微生物、植物、动物体中获得的优良基因进行重组和改造，通过基因枪、电击、花粉管通道等方法将构建好的外源基因转入到植物中，使植物获得优良的抗虫、抗病、抗除草剂、抗重金属等性状，最终实现高产增效的目的[2]。其中，花粉管通道法(pollen-tube pathway)是利用植物授粉后所形成的天然花粉管通道，将外源DNA携入胚囊，以达到遗传转化的目的。近年来，育种工作者们正通过各种育种手段提高玉米产量，改善玉米质量。食品级植酸酶在国外已开始被试用于处理粮食，以分解粮食中的植酸，减少植酸对微量元素的螯合，提高粮食的营养价值，开发高级保健食品[3]，成为国内外研究的热点之一[4-8]。

植酸酶属于磷酸单脂水解酶，是磷酸酶的一种类型，能将肌醇六磷酸分解成为肌醇和磷酸。植酸酶可以专一性地水解植酸中的磷酯键，将磷酸基团从植酸分子上逐个切下，形成中间产物，最终转化为无机磷酸，从而可提高植物的营养价值[9,10]。而将植酸酶基因(*phyA*)导入玉米，可改变玉米对磷的吸收，提高玉米的产量和附加值，对发展营养品质、商业品质、加工品质优良的优质玉米具有重要的意义。因此，本研究对采用花粉管通道法将*phyA*基因转入玉米自交系丹598和丹988的T_1代植株，分别通过CTAB微量提取法和SDS微量提取法提取基因组，并进行PCR检测，期望通过*phyA*基因在玉米

收稿日期：2011-04-25
基金项目：国家转基因专项(20082X08003-005)；吉林省财政厅项目(200806)；吉林省科技厅成果转化补助项目(20095044)
作者简介：赵丽娜(1985-)，女，吉林榆树人，在读硕士研究生，研究方向：玉米遗传转化。
*通讯作者：关淑艳(1971-)，女，吉林榆树人，副教授，博士，主要从事生物技术在作物遗传育种中的应用研究。
E-mail: guanshuyan@yahoo.com.cn

染色体上的整合及后期的表达，获得转 *phyA* 基因玉米籽粒，为进一步培育对磷高效利用的玉米种质资源奠定基础。

1　材料和方法

1.1　试验材料

供试材料为玉米自交系丹 598、丹 998 T_0 代转化植株的种子。质粒为：pCAMBIA3301-ZmGLU1P-phyA-Nos（含有 *bar* 基因），由吉林农业大学生物技术中心提供。

1.2　试验方法

1.2.1　转化植株的基因组提取　种植将目的基因导入后收获的 T_1 代种子，当植株（T_1 代）长出 4～5 个叶片时进行检测，取植株叶片分别按 CTAB 微量提取法和 SDS 微量提取法提取总 DNA，进行 PCR 检测[11]。

1.2.2　转化植株的 PCR 检测

1.2.2.1　PCR 引物　根据已知 *phyA* 基因的 cDNA 序列，通过分子生物学分析软件 Primer Primier 5.0 设计寡核苷酸扩增引物，交由赛百胜生物技术有限公司合成。上游引物：5′-ATGGGCGTCTCTGCTGTTCT-3′；下游引物：5′-CTAAGCAAAACACTCCGCCG-3′。

1.2.2.2　反应体系的优化　反应体系中分别加入不同的模板量：在 0.5 mL 的 Eppendorf 管内配置 25 μL 的反应体系 1：ddH_2O 17.3 μL，10× Buffer 2.5 μL，$MgCl_2$ 2.5 μL，dNTP 0.5 μL，引物 1 0.5 μL，引物 2 0.5 μL，模板 DNA 1 μL（质量浓度为 22.88 ng/μL），*Taq* 酶 0.2 μL。

在 0.5 mL 的 Eppendorf 管内配置 25 μL 的反应体系 2：ddH_2O 17.8 μL，10× Buffer 2.5 μL，$MgCl_2$ 2.5 μL，dNTP 0.5 μL，引物 1 0.5 μL，引物 2 0.5 μL，模板 DNA 0.5 μL（质量浓度为 11.44 ng/μL），*Taq* 酶 0.2 μL。

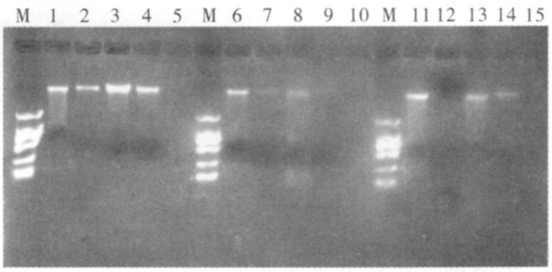
1.2.2.3　PCR 反应条件的优化　分别采用不同的退火温度对反应条件进行优化：94 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 55 s，56 ℃/57 ℃/58 ℃退火 55 s，72 ℃延伸 80 s，共 32 个循环；72 ℃ 后延伸 8 min。

1.2.2.4　琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 和 PCR 产物　用 1.0% 琼脂糖凝胶进行电泳，在 254 nm 紫外灯下摄影，用凝胶成像系统成像。

2　结果与分析

2.1　应用 CTAB 法和 SDS 法提取玉米 T_1 代转化植株基因组的结果

分别采用 CTAB 微量提取法和 SDS 微量提取法对转 *phyA* 基因的玉米丹 598 和丹 988 T_1 代植株进行基因组提取，得到的总 DNA 在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳（图 1）。从图 1 看出，采用 SDS 法提取的总 DNA 的电泳条带较亮，结果与预期一致。

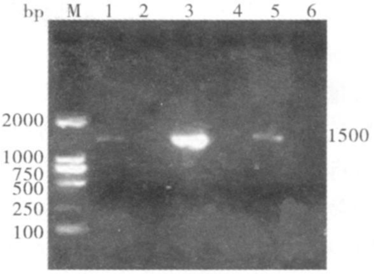


1、6、11. SDS 法提取丹 598 的转基因植株；2、7、12. CTAB 法提取丹 598 的转基因植株；3、8、13. SDS 法提取丹 988 的转基因植株；4、9、14. CTAB 法提取丹 988 的转基因植株；5、10、15. 阴性对照

图 1　CTAB 法和 SDS 法提取玉米 T_1 代转化植株的基因组

2.2　丹 598 和丹 988 T_1 代植株的 PCR 检测结果

对通过花粉管通道法转化的玉米自交系丹 598、丹 988 的 T_1 代植株进行 *bar* 基因的初步筛选，对筛选后得到的植株提取基因组 DNA，进行 PCR 扩增，目标片段大小约为 1 506 bp，同时以转化的表达质粒作阳性对照，以未转化植株作阴性对照。转化的玉米植株所扩增片段和阳性对照片段大小一致，未经转化的植株没有扩出目的片段（图 2），初步证明了 *phyA* 基因已经转入到玉米中。



1. 丹 598 转基因植株；2. 丹 598 未转基因植株；3. 阳性对照；4. 阴性对照；5. 丹 988 转基因植株；6. 丹 988 未转基因植株

图 2　丹 598 和丹 988 T_1 代植株的 PCR 检测结果

3　结论与讨论

CTAB 法能很好地去除糖类杂质，对于含糖较高的玉米材料，改良后效果更好。CTAB 法的应用已经很成熟，也是文献报道中使用最多的 DNA 提取方法，但由于步骤多、试剂组成复杂、易污染等缺点，在使用上受到了一定的限制。而 SDS 是一种阴离子去垢剂，在高温条件下能裂解细胞，使染色体离析、蛋白变性，同时 SDS 与蛋白质和多糖结合成复合物，释放出核酸，提高盐浓度并降低温度（冰浴），

使SDS－蛋白质复合物转变为溶解度更小的钾盐形式，使蛋白质及多糖杂质沉淀更加完全，离心后除去沉淀；上清液中的 DNA 用酚/氯仿反复抽提后，用乙醇沉淀水相中的 DNA。SDS 法操作简单、温和，也能提取到较高质量 DNA，故应用广泛[11]。本试验分别采用 CTAB 法和 SDS 法提取玉米基因组，结果表明，SDS 法效果更好。

在 PCR 反应中，引物与模板能否正确的结合，退火温度是主要影响因素之一。退火温度过低会造成引物和模板 DNA 之间的错配，产生非特异性产物；退火温度的提高能提高产物的特异性，但过高则阻碍引物和模板 DNA 之间的配对，减少产物的产量，甚至无产物。本试验证明，适宜的退火温度为 57 ℃，适宜的模板含量为 1 μL。

花粉管通道法是指授粉后利用花粉管的通道使外源 DNA 导入植物卵细胞、合子或早期胚细胞的技术[12 13]。在长期的科学研究中，花粉管通道法逐渐发展起来。谢道昕等利用花粉管通道法将抗虫基因(*Bt*)导入棉花和水稻，用分子生物学和酶学方法鉴定，都获得了转基因植株[14 15]。曾君祉等也报道用花粉管通道法转化玉米自交系获得了转基因植株[16]。本试验对通过花粉管通道法导入 *phyA* 基因的玉米丹 598 和丹 988 的 T_1 代植株进行 PCR 检测，初步证明了外源目的基因已整合到再生玉米植株中。

参考文献：

[1] 许芳，李鑫，罗欣，等．玉米中转基因成分的定性 PCR 检测[J]．武汉工业学院学报，2008，27(1)：5 8．

[2] 曹际娟，陈明生，卢行安，等．PCR 检测转基因玉米及其粗加工食品[J]．玉米科学，2001，9(2)：87 90．

[3] Chong K，Tan K H．Function analysis of *ver203* gene through antisense transgenic winter wheat plants[J]．Plant Physiclogy，1995，108(2)：475．

[4] Yi Z，Kornegay E T，Ravindran V．Improving phytate phosphrus availability in curne and soybean meal for broilers using microbial phytase and calculation of phosphorus equivalency values for phytase[J]．Poultry Science，1996，75：240 249．

[5] Denbow D，Ravindran V，Kornegay E T．Improving phosphorus availability in soybean meal for broilers by supplemental phytase[J]．PoultryScience，1995，74：1831 1842．

[6] 张兴会．植酸和微生物植酸酶在家禽营养中的应用[J]．饲料工业，1999，20(7)：1 4．

[7] 黄遵锡，章克昌．植酸酶基础与应用研究概括[J]．食品与发酵工业，1999，25(2)：54 58．

[8] Coelho M B，Kornegay E T．Phytase in animal nutrition and waste anagement[C]//BASF Corp，MT．Olive：NJ，1966．

[9] 李桂兰．植酸酶分泌型转基因大豆研究[D]．天津：南开大学，2001．

[10] Reddy N R，Sathe S K，Salunkhe D K．Phytates in legumes and cereals[J]．Adv Food Res，1982，28：1 9．

[11] 王关林，方宏筠．植物基因工程[M]．北京：科学出版社，2002．

[12] Gong Z H，Shen W F，Zhou G Y．Technique of transformation exogenous DNA into plant after pollination－DNA fragments were transferred into embryos via pollen tube[J]．Science in China，1988，6：611 614．

[13] Zhou G Y，Weng J，Gong Z H．*et al*．Molecular breeding of agriculture，a technique for introducing exogenous DNA into plants after self pollination[J]．Scientia Agricultura Sinica，1988，21(3)：1 6．

[14] 谢道昕，范云六，倪丕仲，等．苏云金杆菌杀虫基因导入中国水稻栽培品种中花 11 号获得转基因植株[J]．中国科学(B 辑)，1991，21(8)：830 834．

[15] 谢道昕，范云六，倪万潮，等．苏云金杆菌(*Bacillus huringiensis*)杀虫晶体蛋白基因导入棉花获得转基因植株[J]．中国科学(B 辑)，1991，21(4)：367 373．

[16] 曾君祉，王东江，吴有强，等．用花粉管途径获得小麦转基因植株[J]．中国科学，1993，23(3)：256 262．