

## 利用实时荧光定量 PCR 方法分析转基因水稻外源基因拷贝数

杨立桃<sup>1,3</sup> 赵志辉<sup>2</sup> 丁嘉羽<sup>1</sup> 张承妹<sup>4</sup> 贾军伟<sup>4</sup> 张大兵<sup>1</sup>

(1. 上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240; 2. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095; 3. 南京大学生命科学学院, 江苏 南京 210093; 4. 上海市农业科学院生物技术研究中心, 上海市农业遗传育种重点实验室, 上海 201106)

**摘要:**为分析转基因水稻外源基因拷贝数,利用新型、灵敏、高通量的实时荧光定量 PCR 方法进行转基因水稻外源基因拷贝数的分析。转基因外源基因的拷贝数通过转基因水稻外源基因(*GUS* 和 *HPT* 基因)和水稻内标准 *SPS* 基因含量的比较计算获得。定量分析了 14 株  $T_0$  代的转基因水稻植株,得到了外源基因插入分别为 1、2、3 和 4 的转基因植株,同时利用 Southern Blot 方法进行验证分析。随机选择 18 个已经过定量 PCR 检测分析的转基因水稻植株,用 Southern Blot 的方法分析转基因水稻植株中的 *HPT* 或 *GUS* 基因的拷贝数,Southern Blot 分析结果显示有 15 个转基因水稻植株的分析结果与定量 PCR 分析的结果是一致的,3 个植株定量 PCR 分析的转基因拷贝数稍高于 Southern Blot 的分析结果,主要原因是 Southern Blot 方法在同一个插入位点有多拷贝的 T-DNA 片段插入时,转基因植株的基因组在完全酶切时会产生相似的 DNA 片段,电泳分析时很难分辨清楚。定量 PCR 方法则完全避免了这种情况的发生,除非目的基因 DNA 片段在 PCR 引物处发生断裂。两种方法分析结果的比较显示定量 PCR 方法分析转基因拷贝数更加有效、适用。

**关键词:**植物;转基因;稻(米);聚合酶链反应;基因剂量

### Estimating copy number of transgenes in transformed rice by real-time quantitative PCR

YANGLi-tao, ZHAO Zhi-hui, DINGJia-yu, ZHANG Cheng-mei, JIA Jun-wei, ZHANG Da-bing  
(School of life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

**Abstract:** In transgenic plants, the transgene copy number can greatly influence the expression level and genetic stability of the target gene. Estimation of transgene copy number is an important part of genetically modified (GM) crop research. Currently, transgene copy numbers are estimated by Southern analysis, which is laborious, time-consuming, requires relatively large amounts of plant materials and may involve hazardous radioisotopes. Here, report the development of a sensitive, high-throughput real-time PCR technique for estimating transgene copy number in GM rice was reported. This system uses TaqMan quantitative real-time PCR and comparison to a novel rice endogenous reference gene, sucrose phosphate synthase (*SPS*), to determine the copy numbers of exogenous  $\beta$ -glucuronidase (*GUS*) and hygromycin phosphotransferase (*HPT*) genes in transgenic rice. The *GUS* and *HPT* copy numbers in primary rice transformants ( $T_0$ ) were calculated by comparing quantitative PCR results of the *GUS* and *HPT* genes with those of the internal standard, *SPS*. With optimized PCR conditions, we achieved significantly accurate estimates of 1, 2, 3 and 4 transgene copies in the  $T_0$  transformants. Furthermore, the copy number estimations for both the *GUS* reporter gene and the *HPT* selective marker gene showed that rearrangements of the T-DNA occurred more frequently than is generally believed in transgenic rice.

**Key Words:** Plants, Transgenic; Rice; Polymerase Chain Reaction; Genes Dosage

基金项目:上海市科技兴农重点攻关项目(农科攻字(2002)第3-43号),上海市科学技术委员会科研计划项目(03ZD05032)。

作者简介:杨立桃 男 博士

通讯作者:张大兵 男 教授 上海交通大学生命科学技术学院

This work was supported by the Science and Technology Start Agriculture Plan of Shanghai (Nongkegongzi (2002) No. 3 ~ 43) and Science and Technology Plan of Shanghai(03ZD05032), China.

自 1994 年首例转基因番茄“FLAVR SAVR”面世以来,至今己有多种不同农艺性状的转基因植物在全球范围内广泛种植。在过去的 7 年里,全球转基因植物的种植面积由 1996 年的 170 万公顷增长到了 2003 年的 6770 万公顷<sup>[1]</sup>。在新的转基因植物研究过程中,对由于转基因重组子的随机插入获得的转基因转化植株的分子生物学的性状研究非常重要,因为随机插入的数量影响外源基因的表达,甚至会造成外源基因沉默。

Southern Blot 方法是最常用的转基因植株外源基因拷贝数分析方法,CGH、FISH、Micro array 等方法也常用于外源基因拷贝数的分析<sup>[2~5]</sup>。但是上述方法存在多方面的不足,例如,需要的实验材料(DNA)量多、工作量大、费时,甚至使用放射性同位素,对于发生重排的外源基因检测不够准确。由于这些原因,一种快速、准确、高效的实时荧光定量 PCR 技术已经被用于转基因烟草、玉米和番茄的外源基因拷贝数的分析<sup>[6~8]</sup>。但是到目前为止,还没有关于转基因水稻外源基因拷贝数的分析方法的报道,本工作应用 TaqMan 实时荧光定量 PCR 技术,通过与水稻内标准基因比较的相对定量的方法建立了转基因水稻中的外源基因(*GUS* 和 *HPT*)拷贝数分析体系。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

转基因水稻 ZCM 系列和非转基因水稻 9522 由上海市农业科学院生物技术研究中心研究四室提供。转基因水稻 ZCM 系列是通过农杆菌介导的植物转化方法将植物表达载体 pCambia 1301

(GenBank No. AF234297) 转入到水稻中,获得了 T<sub>0</sub> 代转基因水稻植株。

植物基因组 DNA 抽提试剂盒购自上海瑞丰农业科技公司, Taq DNA 聚合酶及其缓冲液、dNTPs、MgCl<sub>2</sub> 购自上海美源生物科技有限公司, DNA *Hind* 和 *EcoR* Marker 购自上海晶美生物技术有限公司,尼龙膜购自上海基因公司, - [<sup>32</sup>P]-dCTP 购自北京福瑞公司, Random Primer DNA Labeling kit 购自大连宝生物工程有限公司,其余试剂均为分析纯。

DY-501 型核酸电泳仪, BECKMAN 公司的 DUR 640 核酸和蛋白分析仪,图像分析系统为上海天能公司生产的凝胶成像系统, PCR 仪为 Corbett Research, Australia, Rotor-Gene 2000。

### 1.2 方法

1.2.1 水稻 DNA 的抽提和纯化 利用植物基因组 DNA 抽提试剂盒提取和纯化水稻基因组 DNA, DNA 试样的质量用琼脂糖凝胶电泳和核酸定量检测的方法进行评价。取一定量 DNA 溶液在含有溴乙锭的 1% 琼脂糖里进行凝胶电泳分析,判断其浓度和纯度。再利用 BECKMAN 公司的 DUR 640 核酸和蛋白定量分析仪对 DNA 试样进行质量测定及浓度定量。

1.2.2 PCR 引物 根据质粒 pCambia 1301 (GenBank No. AF234297) 和 Ding 等报道<sup>[9]</sup> 的水稻内标准基因 *SPS* 基因的序列,利用美国 ABI 公司的 Primer Express 2.0 软件设计了 *GUS*、*HPT* 和 *SPS* 基因的 TaqMan 引物和探针。引物和探针由上海博亚生物科技有限公司合成,其核苷酸序列和扩增片段长度见表 1。

表 1 定量 PCR 引物和探针序列

名称	引物/探针方向	引物/探针序列(5'~3')	编号 GeneBank No.	引物/探针 位置(bp)
GUSF	Forward primer	TTAACTATGCCGGAATCCATCGC		702~724
GUSR	Reverse primer	AACCGTGACATCACCATTGGC	AF234297	830~850
GUSP	Forward probe	ATGCTCTACACCACGCCGAACACCTG		731~756
HPTF	Forward primer	CTATTTCTTTGCCCTCGGACGA		8944~8965
HPTR	Reverse primer	GGACCGATGGCTGTGTGAAGAAG	AF234297	9000~9020
HPTP	Reverse probe	CGCCGATAGTGGAACCGACGCC		8972~8995
SPSF	Forward primer	TTGCCCTGAACGGATAT		1055~1072
SPSR	Reverse primer	CGGTTGATCTTTTCGGGATG	U33175	1116~1135
SPSP	Reverse probe	GACGCACGGACGGCTCGGA		1096~1114

1.2.3 定量 PCR 体系及反应条件 PCR 反应体积为 25 μl, 1 × PCR 缓冲液, 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol/L 的 dATP、dCTP、和 dGTP, 0.4 mmol/L 的 dUTP、1.5 U Taq DNA 聚合酶、0.2 U Amperase uracil

N-glycosylase (UNG)、1 μl DNA 模板溶液,以及优化好的 500 nmol/L HPTF/HPTR 引物和 300 nmol/L HPTP 探针, 500 nmol/L GUSF/GUSR primer 引物和 100 nmol/L GUSP 探针, *SPS* 基因的定量 PCR 反应体

参见 Ding 等报道<sup>[9]</sup>。

定量 PCR 扩增的反应条件为:94 5 min,94 30 s、60 30 s、72 30 s,共 50 个循环。每个试样平行做 3 个反应,重复实验 3 次。实验数据用 Rotor Gene 2000-4.6 软件(Corbett Research, Australia)分析。

表 2 HPT 和 GUS 基因定量 PCR 反应体系的重演性

DNA 质量	平均 Ct 值			相对标准差	标准偏差
	1	2	3		
HPT 基因					
1 ×10 <sup>9</sup>	18.69	18.72	18.66	6.56	0.02
1 ×10 <sup>7</sup>	25.39	25.31	25.42	4.70	0.05
1 ×10 <sup>5</sup>	32.42	32.37	32.31	5.38	0.04
1 ×10 <sup>3</sup>	39.03	39.28	39.29	4.15	0.12
GUS 基因					
1 ×10 <sup>9</sup>	12.51	12.59	12.50	7.15	0.04
1 ×10 <sup>7</sup>	19.45	19.32	19.29	3.62	0.07
1 ×10 <sup>5</sup>	26.01	25.74	26.04	2.33	0.13
1 ×10 <sup>3</sup>	32.63	32.74	32.38	0.57	0.15

1.2.4 转基因拷贝数的分析方法 采用相对定量的方法计算转基因的拷贝数,首先分别根据构建的转基因和内标准基因的定量校正曲线计算出转基因和内标准基因的拷贝数,即根据每一个待测试样定量 PCR 检测的 Ct 值和构建的校正曲线(公式 1)计算出转基因和内标准基因的拷贝数;然后通过公式 2 计算转基因植株中转基因的拷贝数,公式 2 中待测试样转基因拷贝数/待测试样内标准基因拷贝数计算的结果表示转基因植株的外源基因与内标准基因的比值,由于水稻是双倍体植物,且水稻单倍体基因组中 SPS 为单拷贝的,所以转基因植株的外源基因与内标准基因的比值 ×2 所得的值就是转基因植株外源基因的拷贝数了。

$$Lg = K_1 \times Ct + K_2, \quad (1)$$

$K_1, K_2$ :常数;Lg:待测基因拷贝数。

$$\text{植株转基因拷贝数} = (\text{待测试样转基因拷贝数} \times 2) / \text{待测试样内标准基因拷贝数} \quad (2)$$

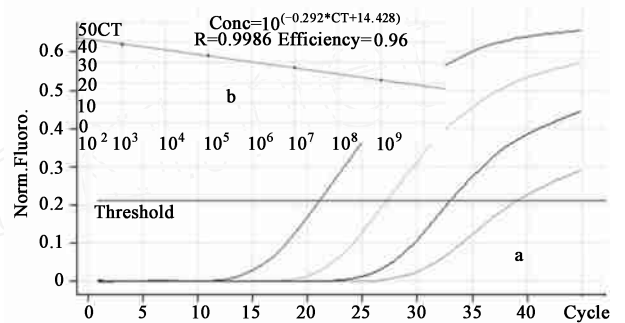
以一系列浓度梯度的 pCambia 1301 质粒 DNA 溶液(10<sup>9</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>5</sup> 和 10<sup>3</sup> 拷贝/μl)为定量 PCR 反应扩增模板,构建 GUS 基因和 HPT 基因的校正曲线;水稻内标准基因 SPS 的校正曲线的构建参见 Ding 等的报道<sup>[9]</sup>。

1.2.5 转基因拷贝数的 Southern blot 分析 转基因水稻植株转基因(GUS 和 HPT)拷贝数的 Southern blot 参见 Sambrook J 等的分子克隆(第 3 版)<sup>[10]</sup>,取 10 μg 转基因水稻基因组 DNA 用于 EcoR I 的完全酶切,然后通过电泳、转膜、标记探针、杂交、洗膜和放射自显影分析转基因水稻植株的转基因拷贝数,其

中杂交探针利用  $-[^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$  和 random primer DNA labeling kit 进行标记。

## 2 结果与讨论

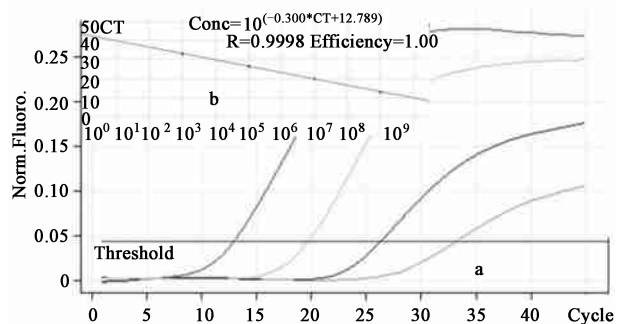
2.1 定量校正曲线的建立 转基因和内标准基因的定量 PCR 校正曲线的建立是用定量 PCR 的方法分析转基因水稻植株的外源基因拷贝数的关键步骤。在应用校正曲线计算外源基因或内标准基因的拷贝数前,首先确定建立的定量校正曲线的可靠性和合理性。实验建立的 GUS、HPT 和 SPS 基因的定量校正曲线的相关性系数在 0.9984 ~ 0.9990 之间,相关性很好。GUS 基因的定量 PCR 反应的反应效率是 1.00(图 1),HPT 基因的定量 PCR 反应的反应效率是 0.96(图 2),SPS 基因的定量 PCR 反应效率为 0.94(图 3),都满足定量 PCR 分析的要求。这些实验数据表明实验建立的 GUS、HPT 和 SPS 基因的定量校正曲线适合用于转基因拷贝数的分析。



(a):不同拷贝数梯度(10<sup>3</sup> 到 10<sup>9</sup>) GUS 基因的扩增曲线

(b):根据(a)的扩增曲线获得的定量校正曲线

图 1 GUS 基因的定量 PCR 扩增校正曲线

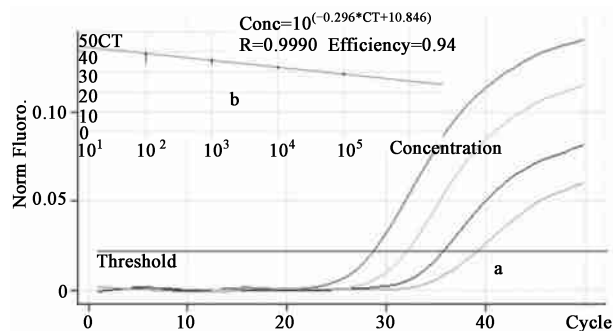


(a):不同拷贝数梯度(10<sup>3</sup> 到 10<sup>9</sup>) HPT 基因的扩增曲线

(b):根据(a)的扩增曲线获得的定量校正曲线

图 2 HPT 基因的定量 PCR 扩增校正曲线

2.2 GUS 和 HPT 基因的定量 PCR 反应的重演性检测 为了进一步证明实验建立的定量 PCR 反应的准确性和可重复性,重复进行 3 次实验,3 次定量实验结果的相对标准差为 0.57% ~ 7.15%,标准偏差为 0.02 ~ 0.15。说明实验建立的 GUS 和 HPT 基因的定量 PCR 反应具有很好的准确性和可重复性,依



(a) :不同拷贝数梯度( $10^2$  到  $10^5$ ) *SP5* 基因的扩增曲线  
 (b) :根据(a)的扩增曲线获得的定量校正曲线  
 图3 *SP5* 基因的定量 PCR 扩增校正曲线

据此定量 PCR 体系获得的定量结果是稳定和可信的。

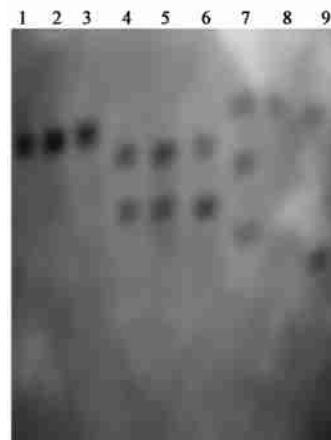
2.3 转基因水稻植株的 *GUS* 基因和 *HPT* 基因的拷贝数分析 根据校正曲线定量确定的转基因水稻植株 *GUS*、*HPT* 和内标准基因 *SP5* 的拷贝数,应用公式(1)计算出了转基因水稻植株的转基因(*GUS* 和 *HPT*)的拷贝数。每一个转基因水稻植株试样每次实验平行做 3 个反应,每个实验重复 3 次。实验共定量检测了 24 个转基因水稻植株,定量结果显示 14 个转基因水稻植株含有 1 个拷贝的 *HPT* 基因,7 个转基因水稻植株含有 1 个拷贝的 *GUS* 基因,其余的转基因水稻植株含有 2 个或 2 个拷贝以上的 *GUS* 或 *HPT* 基因,具体的定量结果见表 3。

表 3 *GUS* 和 *HPT* 基因拷贝数定量 PCR 检测结果和基因重排分析

转基因株系	<i>HPT</i>	<i>GUS</i>	基因重排
ZCM-1	1	1	No
ZCM-2	4	4	No
ZCM-3	3	3	No
ZCM-13	1	2	Yes
ZCM-14	1	2	Yes
ZCM-15	1	1	No
ZCM-16	1	1	No
ZCM-22	2	4	Yes
ZCM-23	1	2~3	Yes
ZCM-25	1	1	No
ZCM-27	4	5	Yes
ZCM-33	1	1	No
ZCM-36	2	1	Yes
ZCM-40	1	2	Yes
ZCM-46	1	4	Yes
ZCM-61	1	2	Yes
ZCM-65	3	3	No
ZCM-72	5	5	No
ZCM-73	4	4	No
ZCM-78	1	2	Yes
ZCM-80	3	3	No
ZCM-81	1	2	Yes
ZCM-87	2	2	No
ZCM-90	1	1	No

2.4 *GUS* 和 *HPT* 基因的重排分析 表 3 的定量检测结果显示转基因水稻的 *GUS* 和 *HPT* 基因的拷贝数在转基因水稻植株中并不总是一致的,表明在转基因过程中 T-DNA 插入发生了重排。在所有检测的 24 个转基因水稻植株中有 11 个株系发生了 T-DNA 重排,*HPT* 和 *GUS* 基因的拷贝数不一致,例如转基因水稻植株 ZCM-13、ZCM-14、ZCM-22、ZCM-23、ZCM-27、ZCM-36、ZCM-40、ZCM-46、ZCM-61、ZCM-78 和 ZCM-81。根据定量 PCR 检测结果计算得到的 45.8% 的重排率要比一般的分析结果高,例如 Southern Blot 等,主要原因是定量 PCR 可以同时分析多个目的基因和标记基因,而一般的方法只分析目的基因,这样就降低了原有的 T-DNA 插入的重排率。

2.5 定量 PCR 检测与 Southern Blot 分析转基因拷贝数的比较 为了进一步验证定量 PCR 方法分析转基因拷贝数的准确性,随机选择了 18 个已经过定量 PCR 检测分析的转基因水稻植株,用 Southern Blot 方法分析转基因水稻植株中的 *HPT* 或 *GUS* 基因的拷贝数,Southern Blot 的分析结果显示有 15 个转基因水稻植株的分析结果与定量 PCR 分析的结果是一致的,3 个植株的分析结果不一致,且定量 PCR 分析的结果转基因拷贝数稍高于 Southern Blot 分析结果(图 4)。主要原因是在同一个插入位点有多拷贝的 T-DNA 片段插入时,转基因植株的基因组在完全酶切时会产生相似的 DNA 片段,这样在电泳分析时很难分辨清楚,但是如果用定量 PCR 方法分析时,就完全避免了这种情况的发生,除非目的基因 DNA 片段在 PCR 引物处发生断裂。两种方法分析结果的比较显示定量 PCR 的方法对于分析转基因拷贝数更加有效、适用。



泳道 1:ZCM-1; 泳道 2: ZCM-15; 泳道 3: ZCM-16; 泳道 4: ZCM-22; 泳道 5: ZCM-36; 泳道 6: ZCM-87; 泳道 7: ZCM-3; 泳道 8: ZCM-65; 泳道 9: ZCM-80。

图 4 Southern Bolt 法分析转基因 *HPT* 基因拷贝数的结果

表4 定量 PCR 与 Southern blot 拷贝数分析结果比较

转基因株系	HPT		样品	GUS	
	定量 PCR 分析	Southern blot 分析 (EcoR I)		定量 PCR 分析	Southern blot 分析 (EcoR I)
ZCM-1	1	1	ZCM-1	1	1
ZCM-15	1	1	ZCM-15	1	1
ZCM-16	1	1	ZCM-16	1	1
ZCM-22	2	2	ZCM-13	2	2
ZCM-36	2	2	ZCM-14	2	2
ZCM-87	2	2	ZCM-87	2	2
ZCM-3	3	3	ZCM-3	3	3
ZCM-65	3	1	ZCM-65	3	2
ZCM-80	3	2	ZCM-80	3	3

## 参考文献

- [1] James C. Global status of commercialized transgenic crops [Z]. ISAAA Briefs, 2003, No. 30.
- [2] Larramendy M L, El-Rifai W, Kakkola A, et al. Comparative genomic hybridization reveals differences in DNA copy number changes between sporadic gastric carcinomas and gastric carcinomas from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer [J]. Cancer Genet Cytogene, 1998, 106 (1): 62-65.
- [3] Kallioniemi A, Visakorpi T, Karhu R, et al. Gene copy number analysis by fluorescence in situ hybridization and comparative genomic hybridization [J]. Methods, 1996, 9 (1): 113-121.
- [4] Armour JA, Sismani C, Patsalis PC, et al. Measurement of locus copy number by hybridization with amplifiable probe. Nucleic Acids Res, 2000, 28 (2): 605-609.
- [5] Lucito R, West J, Reiner A, et al. Detecting gene copy number fluctuation in tumor cells by microarray analysis of genomic representations [J]. Genome Res, 2000, 10 (11): 1726-1736.
- [6] Callaway AS, Abranches R, Scroggs J, et al. High-throughput transgene copy number estimation by competitive PCR [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2002, 20: 265-277.
- [7] Mason G, Provero P, Vaira AM, et al. Estimating the number of integrations in transformed plants by quantitative real-time PCR [J]. BMC Biotechnol, 2002, 2 (1): 20.
- [8] Song P, Cai CQ, Skokut M, et al. Quantitative real-time PCR as a screening tool for estimating transgene copy number in WHISKERS(tm)-derived transgenic maize [J]. Plant Cell Rep, 2002, 20: 948-954.
- [9] Ding J, Jia J, Yang L, et al. Validation of a rice-specific Gene, *Sucrose Phosphate Synthase*, used as the endogenous reference gene for qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenes [J]. J Agric Food Chem, 2004, 52 (11): 3372-3377.
- [10] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A laboratory manual; cold spring harbor laboratory press: cold spring harbor, NY [Z]. 2001, 3.

[收稿日期: 2004-12-18]

中图分类号: R15; Q343.1; S511 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2005)02-0140-05

## 第三届全国中青年流行病学工作者学术会议征稿通知

为提高我国流行病学研究水平,加强学术交流,探讨学科发展的新思想、新理论和新方法,由中华预防医学会流行病学分会主办、安徽医科大学公共卫生学院承办的“第三届全国中青年流行病学工作者学术会议”定于2005年10月12~16日在安徽省合肥市召开。

**会议主题:** 双重挑战,双重任务

**会议内容:** (1) 流行病学新理论、新方法及其应用, (2) 传染病与非传染病流行病学, (3) 突发事件流行病学, (4) 现场流行病学, (5) 精神卫生流行病学, (6) 临床流行病学, (7) 分子流行病学和遗传流行病学, (8) 营养、环境和职业流行病学, (9) 疾病和公共卫生监测, (10) 管理流行病学, (11) 计算机技术在流行病学中的应用等。

**截稿日期:** 2005年7月31日(只交流不发表的稿件2005年8月31日)

**稿件寄送:** E-mail 信箱: 2005epi@163.com 或 cjcp@mail.hf.ah.cn, 附件名称中请注明“会议征文”或连同软盘寄往: 安徽省合肥市梅山路81号; 安徽医科大学《疾病控制杂志》编辑部 许娴 收(邮编230032), 信封正面左下角注明“会议征文”

**电话:** (0551) 5161171 **传真:** (0551) 5118988