林业科学研究 2009, 22(5): 630～634
Forest Research

文章编号: 1001-1498(2009)05-0630-05

转多基因杨树中抗生素标记基因 *NPT* II表达量分析研究

侯英杰[1,2], 苏晓华[1*], 张冰玉[1], 褚延广[1]

(1. 中国林业科学研究院林业研究所,国家林业局林木培育重点实验室,北京 100091;
2. 北京航空航天大学附属中学,北京 100191)

摘要:对转基因库安托杨及银腺杂种杨(含1～5个外源基因)中选择标记基因新霉素磷酸转移酶基因(*NPT* II)进行PCR扩增,证实该基因稳定存在于转基因杨树的基因组中。应用酶联免疫吸附测定法(ELISA)对2种转基因杨树中NPTII蛋白的表达量进行定量检测,结果显示:NPTII蛋白的表达量并没有随着目的基因数量的增加而升高,说明与转单个基因杨树相比,转多个基因杨树可能由标记基因引起的生物安全问题并不会加剧。

关键词:转基因杨树;新霉素磷酸转移酶基因;酶联免疫吸附测定

中图分类号: S794 **文献标识码**: A

Expression Analysis of Neomycin Phosphotransferase II (NPT II) Gene in Multigenes Transgenic Poplar

HOU Ying-jie[1,2], *SU Xiao-hua*[1], *ZHANG Bing-yu*[1], *CHU Yan-guang*[1]

(1. Research Institute of Forestry, CAF; Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Beijing 100091, China; 2. The High School Affiliated to Beihang University, Beijing 100191, China)

Abstract: PCR amplification was applied on selectable marker gene *neomycin phosphotransferase* II (*NPT* II) in two transgenic poplar species, *P.* ×*euramericana*‘Guariento’ and *Populus alba* ×*P. glandulosa* which contain one to five foreign genes. The results showed that this gene was stable integrated in the genome of poplar trees analyzed. To quantify the expression of *NPT* II gene, enzyme linked immunosorbent assay was performed on both transgenic poplar species. The results showed highly significant linear correlation between quantity of NPTII proteins and their OD values, while the quantity of NPTII proteins expressed in different transgenic lines did not increase with the increased number of transgenes in both poplar species. Our results indicated that the potential biosecurity risk caused by multiplegenes transgenic poplar was not more serious than that of single gene transgenic poplar.

Key words: transgenic poplar; *neomycin phosphotransferase* II (*NPT* II); enzyme linked immunosorbent assay

在转基因植物中,导入植物体内的外源基因通常包括2类,一类是目的性状相关基因,一类是选择标记基因。目前最常用的选择标记基因为*NPTII*基因[1-2],该基因编码的新霉素磷酸转移酶能使植物产生抗卡那霉素特性,因此可以用卡那霉素对转化植株进行筛选。近年来,抗生素标记基因可能产生的生物安全问题逐渐成为人们争论的焦点[2-4]。理论上,抗生素标记基因编码产生的蛋白质可改变抗

收稿日期: 2008-03-27
基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD01A15);国家“973”项目(2009CB119107)及“948”创新重大项目(2006-4-C01)
作者简介: 侯英杰(1978—),女,山西省代县人,博士.
*通讯作者: suxh@caf.ac.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

生素的分子结构,使抗生素失效,因此,人们担心食用此类转基因植物是否会产生抗生素抗药性,并推测这类基因也可能对动物、微生物及其它植物存在潜在的危害。转基因林木虽然不涉及到食品安全问题,但鉴于其可能对其它动植物、微生物以及土壤和地下水产生影响,因此有必要对转基因林木,特别是转多基因林木中的选择标记基因 *NPTII*的表达量进行检测,分析目的基因数量的增加是否导致标记基因 *NPTII*表达量的增加,从而为评价其生物安全性提供线索。

目前,对转基因植物外源基因表达量进行检测的方法很多,其中对基因编码蛋白含量的检测最能直观反映该基因的实际表达水平。酶联免疫吸附测定法(ELISA)具有测定时间短、检测灵敏度高、可定量分析等诸多优点,因而在转基因植物检测中被广泛应用,但目前较多应用于转 *Bt*基因的研究中[5-9]。抗生素标记基因 *NPTII*表达量的检测最初依赖于放射性同位素 P^{32}标记 ATP的使用,但该方法存在耗时、稳定性差、受同位素半衰期限制等缺点。1990年 Baszczynski[10]首次使用 ELISA法来定量检测转基因烟草(*Nicotiana tabacum* L.)和欧洲油菜(*Brassica napus* L.)中 NPTII的含量,但仍需要使用 P^{32}标记的 ATP。1992年 Nagel[11]开始使用无同位素标记的 ELISA检测法,并开发出检测效果良好的试剂盒;同年 Glen[12]使用 ELISA检测法发现,在 3个不同的转基因棉花(*Gossypium hirsutum* L.)品系中,标记基因 *NPTII*的表达量为 0.04%～0.044%,获得了较好的检测效果。此外,McKenzie等[13]使用 ELISA法对 9种转基因植物中的 NPTII含量进行了检测,Laura等[14]则探讨了不同的提取及纯化程序对 NPTII含量检测效果的影响。国内对于转基因植物中的 NPTII含量检测方面的研究尚未见报道,特别是检测植物多基因转化中标记基因 *NPTII*表达量方面的研究更是空白。本研究对转多基因杨树中抗生素标记基因 *NPTII*表达量进行了检测,以期探讨 NPTII蛋白表达量是否随目的基因数量的变化而变化,也为转基因杨树生物安全性评价提供参考。

1　材料与方法

1.1　试验材料

试验林位于北京昌平韩村河东营苗圃,以采用基因枪转化法对库安托杨(*P.* ×*euramericana*'Guariento')及银腺杂种杨(*Populus alba* ×*P. glandulosa*)进行遗传转化得到的转基因株系及非转基因对照株系为试材。所转化的外源基因分别为:(1)透明颤菌血红蛋白基因(*vgb*),编码透明颤菌血红蛋白,与提高植物适应贫氧环境的能力有关;(2)果聚糖蔗糖转移酶基因(*SacB*),编码果聚糖蔗糖转移酶,与植物细胞渗透调节、提高植物的抗旱能力有关;(3) *BtCry3A*基因,编码 *Bt*杀虫晶体蛋白,对杨树天牛所隶属的鞘翅目具有高度专一的抗性;(4) *OC-I*基因,编码水稻半胱氨酸蛋白酶抑制剂,该抑制剂属半胱氨酸类蛋白酶抑制剂,对大部分鞘翅目害虫的生长具有抑制作用;(5) *JERFs*基因,编码 AP2/EREBP类植物转录因子,与植物抗逆性有关。目的基因中 *BtCry3A*和 *OC-I*位于同一载体上形成双价基因。标记基因为来自大肠杆菌转座子 Tn5的新霉素磷酸转移酶 II型(*NPTII*)基因,该基因使植株获得对卡那霉素的抗性。

选取转基因库安托杨 15个株系及 1个非转基因对照株系,这 15个株系含有不同数量的外源基因,其目的基因数量和种类已经过测定[9,15]。选取转基因银腺杂种杨 18个株系及 1个非转基因对照株系,这 18个株系也含有不同数量的目的基因,其基因数量也已经过测定[15]。参试转基因库安托杨及银腺杂种杨株系编号及其含有目的基因的数目与种类见表 1。

1.2　试验方法

1.2.1　转基因库安托杨标记基因 *NPTII*的 PCR检测　采用 CTAB法,从 16个库安托杨株系及 19个银腺杂种杨株系叶片中提取基因组 DNA,根据已知的 *NPTII*基因序列设计引物进行 PCR扩增。PCR引物序列为 NF: 5'-GAACAAGATGGATTGCACGC-3'; NR: 5'-GAAGAACTCGTCAAGAAGGC-3'; PCR反应体系如下:10 ×PCR buffer 2.5 μL, dNTPs 0.5 μL; NF 0.5 μL, NR 0.5 μL, rTaq 0.25 μL,模板 DNA 1 μL,加去离子水至 25 μL。反应程序如下:94 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 54 ℃ 30 s, 72 ℃ 50 s; 72 ℃ 7 min,共 36个循环。

1.2.2　NPTII蛋白表达量的 ELISA检测　分别以当年生库安托杨 16个株系及银腺杂种杨 19个株系的叶片为材料,每个株系选取 3株,尽量在相同位置取 3片叶,使用美国 Agdia公司生产的 PathoScreen kit for neomycin phosphotransferase II试剂盒进行 NPTII蛋白含量的测定。测定方法如下:在 3 mL PEB1溶液中加入 0.1 g叶片,即样品和 buffer的比

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

例为 1∶30(质量/体积),用研棒充分研磨后,1 000 r·min^{-1}离心 1 min。用 1 mL PEB1溶解阳性对照粉,充分混匀,并用 PEB1进行稀释后使用。按照设计,在酶标板每孔中加入 100 μL标准样品、待测样品和空白对照(PEB1溶液),反应停止后用 Model 680 Microplat Reader(Bio-Rad)仪测定其 OD_{450}值,该试剂盒可检测浓度范围为 4 ng·mL^{-1}～125 Pg·mL^{-1}。

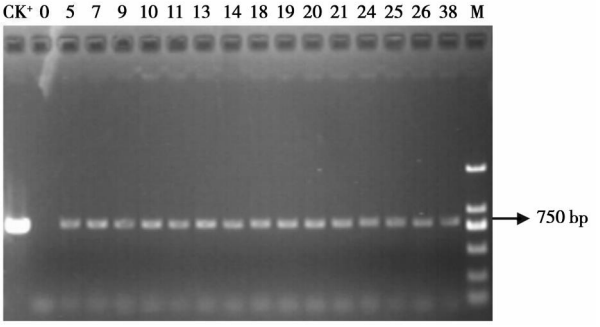
表 1 参试杨树株系及其所含外源基因数目与种类

树种	株系	目的基因数/个	目的基因种类
库安托杨	D5-0	0	-
	D5-5	1	*JERFs*
	D5-11	1	*vgb*
	D5-25	2	*vgb*, *JERFs*
	D5-38	2	*vgb*, *JERFs*
	D5-7	3	*vgb*, *BtCry3A*+*OC*-I
	D5-10	3	*vgb*, *BtCry3A*+*OC*-I
	D5-13	3	*vgb*, *BtCry3A*+*OC*-I
	D5-14	3	*vgb*, *BtCry3A*+*OC*-I
	D5-9	5	*vgb*, *SacB*, *JERFs*, *BtCry3A*+*OC*-I
	D5-18	5	*vgb*, *SacB*, *JERFs*, *BtCry3A*+*OC*-I
	D5-19	5	*vgb*, *SacB*, *JERFs*, *BtCry3A*+*OC*-I
	D5-20	5	*vgb*, *SacB*, *JERFs*, *BtCry3A*+*OC*-I
	D5-21	5	*vgb*, *SacB* *JERFs*, *BtCry3A*+*OC*-I
	D5-24	5	*vgb*, *SacB*, *JERFs*, *BtCry3A*+*OC*-I
	D5-26	5	*vgb*, *SacB*, *JERFs*, *BtCry3A*+*OC*-I
银腺杂种杨	D13-0	0	-
	D13-14	1	*SacB*
	D13-30	1	*vgb*
	D13-40	1	*SacB*
	D13-29	2	*vgb*, *JERFs*
	D13-3	3	*SacB*, *BtCry3A*+*OC*-I
	D13-39	3	*SacB*, *BtCry3A*+*OC*-I
	D13-48	3	*SacB*, *BtCry3A*+*OC*-I
	D13-55	3	*SacB*, *BtCry3A*+*OC*-I
	D13-60	3	*SacB*, *BtCry3A*+*OC*-I
	D13-35	4	*SacB*, *JERFs*, *BtCry3A*+*OC*-I
	D13-47	4	*SacB*, *JERFs*, *BtCry3A*+*OC*-I
	D13-53	4	*SacB*, *JERFs*, *BtCry3A*+*OC*-I
	D13-54	4	*SacB*, *JERFs*, *BtCry3A*+*OC*-I
	D13-10	5	*vgb*, *SacB*, *JERFs*, *BtCry3A*+*OC*-I
	D13-25	5	*vgb*, *SacB*, *JERFs*, *BtCry3A*+*OC*-I
	D13-26	5	*vgb*, *SacB*, *JERFs*, *BtCry3A*+*OC*-I
	D13-36	5	*vgb*, *SacB*, *JERFs*, *BtCry3A*+*OC*-I
	D13-42	5	*vgb*, *SacB*, *JERFs*, *BtCry3A*+*OC*-I

2 结果与分析

2.1 转基因杨树 NPTII基因的 PCR检测

对扩增的 PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳分析,电泳结果显示:库安托杨 15个转基因株系和银腺杂种杨 18个转基因株系均有 *NPT*II基因的扩增片断,产物长度为 786 bp,证明 *NPT*II基因仍稳定存在于各转基因株系的基因组中(图 1、2)。

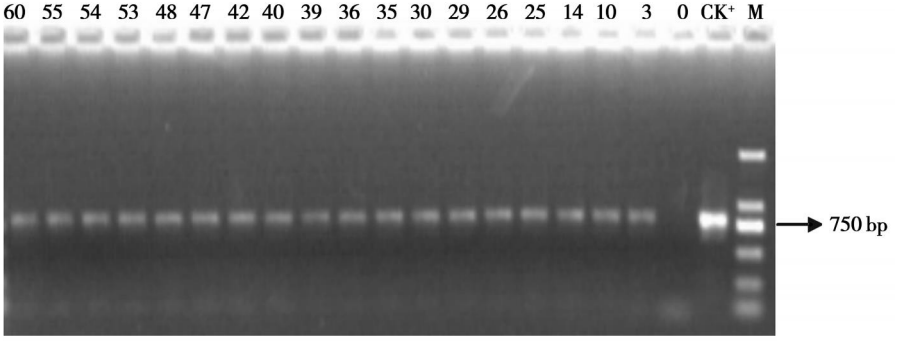


(CK$^+$为阳性对照,0为未转基因阴性对照,M为 DL2000 Marker,其它泳道为检测样品)

图 1 转基因库安托杨 *NPT*II基因的 PCR扩增

2.2 转基因杨树 NPTII蛋白的 ELISA检测

图 3中酶标板样品孔内显色的深浅代表 NPTII蛋白含量的高低,颜色越深说明检测样品的 NPTII蛋白含量越高,颜色越浅则表示含量越低。图中采用数字 1～19标出的样品孔内检测出 NPTII蛋白,随数字的增大样品颜色越深,NPTII蛋白含量也越高。通过酶标仪对反应板每个样品孔的检测,获得了每个样品相应的 OD_{450}值。



(CK$^+$为阳性对照,0为未转基因阴性对照,M为 DL2000 Marker,其它泳道为检测样品)

图 2 转基因银腺杂种杨 *NPTII*基因的 PCR扩增

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

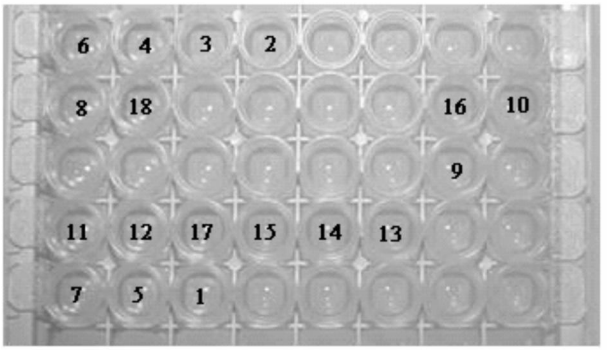


图 3　NPTII蛋白的 ELISA反应

2.3　转基因库安托杨 NPTII蛋白的 ELISA检测及分析

以标准 NPTII蛋白质量浓度为纵坐标,以经 ELISA法测定的相对应 OD_{450}值为横坐标绘制标准曲线。由图 4可知:随着标准品质量浓度的增加,其 OD_{450}值也逐渐增加。相关性分析表明,标准 NPTII蛋白相关系数为 0.999 3,线性回归方程为:

$$y = 12.841x - 1.286\ 5$$

标准 NPTII蛋白质量浓度与相对应测得的 OD_{450}值有良好的线性关系。

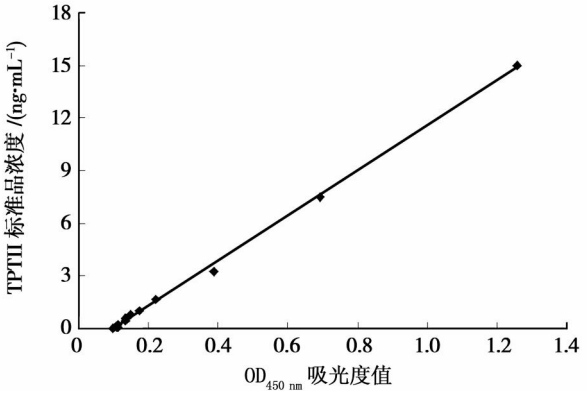


图 4　转基因库安托杨 NPTII蛋白标准曲线

以酶标仪原始读值减去空白对照读值作为 OD_{450}的最后读值。将各株系 OD_{450}值进行统计分析,算出含有相同目的基因数量株系的平均值,然后代入线性回归方程,即可得出待测样品的 NPTII蛋白含量。从表 2可知:转 1个目的基因的株系 NPTII蛋白质量浓度最高,但是转不同数量目的基因株系的 NPTII蛋白含量并没有随着目的基因数量的增加而增加。

2.4　转基因银腺杂种杨 NPTII蛋白的 ELISA检测及分析

以标准 NPTII蛋白质量浓度为纵坐标,以经 ELISA法测定的相对应 OD_{450}值为横坐标绘制标准曲线。由图 5可知:随着标准品质量浓度的增加,其 OD_{450}值也逐渐增加。相关性分析表明,标准 NPTII蛋白相关系数为 0.999 6,线性回归方程为:

$$y = 10.433x - 0.884\ 7$$

标准 NPTII蛋白质量浓度和相对应测得的 OD_{450}值有良好的线性关系。

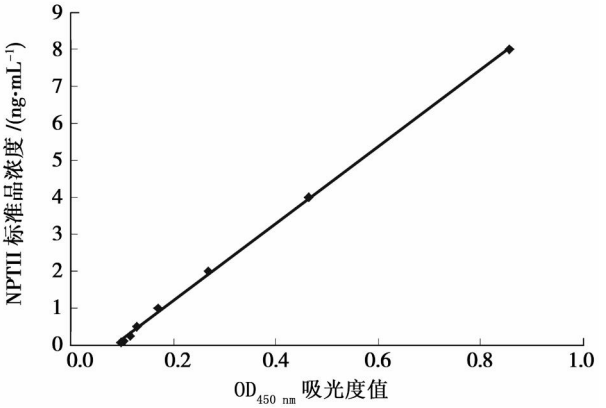


图 5　转基因银腺杂种杨 NPTII蛋白标准曲线

以酶标仪原始读值减去空白对照读值作为 OD_{450}的最后读值。将各株系 OD_{450}值进行统计分析,计算出含有相同数量目的基因株系的平均值,然后代入线性回归方程,得出待测样的 NPTII蛋白含量。由表 3可知:在含有 1、2、3、4个外源基因的株系中,其 NPTII蛋白含量的平均值随着目的基因数量的增加而增加,但是,有 5个外源基因株系的 NPTII蛋白含量的平均值最低,未表现出标记基因 NPTII蛋白的表达量随外源基因数量的增加而增加的趋势。

表 2　库安托杨 OD_{450}值及 NPTII蛋白含量

目的基因数量 /个	OD_{450}值	鲜叶蛋白含量 /(ng·g⁻¹)
1	0.171 5	27.47
2	0.149 5	19.00
3	0.151 3	19.69
4	-	-
5	0.143 6	16.72

表 3　银腺杂种杨 OD_{450}值及 NPTII蛋白含量

目的基因数量 /个	OD_{450}值	鲜叶蛋白含量 /(ng·g⁻¹)
1	0.092 6	2.44
2	0.096 0	3.51
3	0.097 0	3.82
4	0.108 9	7.54
5	0.102 7	5.60

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 讨论

ELISA方法是直接检测转基因植物外源基因蛋白表达量的手段之一,该方法有诸多优点,但也容易受检测环境的湿度和温度等条件的影响。本实验在相同环境条件下进行,并对每次实验同时进行了标准曲线分析,对每个样品进行了平行检测,同时设立空白对照,从而保证了所得试验数据的真实可靠。

目前,国外采用 ELISA方法对转基因植物中的抗生素标记基因 *NPT*II的表达量进行了一些研究,但无转基因林木中的相关研究报道,而国内对转基因植物 NPTII蛋白表达量方面的研究仍是空白。鉴于抗生素标记基因 *NPT*II可能产生的生物安全问题[16],作者认为有必要对其表达量进行检测,特别是对于转多基因植物,抗生素标记基因 *NPT*II的表达量是否会随着目的基因的增加而增加,从而是否可能增加其生物安全的危险性尚不可知。

本研究以含有不同数量目的基因的 16个库安托杨株系及 19个银腺杂种杨株系为试验材料,对标记基因 *NPT*II进行 PCR检测,证明其仍稳定存在于杨树基因组中。应用 ELISA吸附检测法对其中的标记基因 NPTII蛋白含量进行检测,结果发现,在参试的 2种不同杨树中,含不同数量目的基因(0～5个)的各株系叶片中 NPTII蛋白含量并没有随着目的基因数量的增加而增加,表明与转单个目的基因杨树相比,由标记基因引起的生物安全问题并不会随着外源基因数量的增加而加剧。

参考文献:

[1] Gay P B, Gillespie S H. Antibiotic resistance markers in genetically modified plants: a risk to human health [J]. Lancet Infect Dis, 2005, 5 (10): 637 - 646

[2] 王紫萱, 易自力. 卡那霉素在植物转基因中的应用及其抗性基因的生物安全性评价 [J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23 (6): 9 - 13

[3] 司家钢. 转基因植物中的卡那霉素抗性 [J]. 生物技术通报, 1998, 14 (1): 29 - 31

[4] 徐茂军. 转基因植物中卡那霉素抗性 (Kanr)标记基因的生物安全性 [J]. 生物学通报, 2001, 36 (2): 18 - 19

[5] 崔林开, 叶华智. 3种 ELISA法检测 Bt杀虫蛋白的比较研究 [J]. 安徽农业科学, 2005, 33 (11): 2056 - 2057

[6] 刘光明, 苏文金. 应用间接 ELISA方法定量检测转基因抗虫玉米 [J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 22 (1): 49 - 52

[7] 严吉明, 叶华智, 伍光庆. 转 Bt抗虫基因植物中杀虫蛋白的酶联免疫检测技术研究 III 酶联免疫 (ELISA) 间接法检测 Bt杀虫蛋白研究 [J]. 四川农业大学学报, 2005, 23 (3): 280 - 284

[8] 李葱葱, 刘 娜, 康岭生, 等. 转基因抗虫玉米 Bt蛋白表达量的研究 [J]. 玉米科学, 2006, 14 (3): 40 - 41

[9] 王建革, 苏晓华, 纪丽丽, 等. 基因枪转多基因库安托杨的获得 [J]. 科学通报, 2006, 51 (23): 2755 - 2760

[10] Baszczynski C L. A rapid immunoprecipitation assay for neomycin phosphotransferase II expression in transformed bacteria and plant tissues[J]. Biochem Cell Biol, 1990, 68 (6): 983 - 987

[11] Nagel R J, Manners J M, Birch R G. Evaluation of an ELISA assay for rapid detection and quantification of neomycin phosphotransferase II in transgenic plants[J]. Plant Mol Biol Rep, 1992, 10 (3): 263 - 272

[12] Rogan G J, Ream J E, Berberich S A, *et al*. Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of neomycin phosphotransferase II in genetically modified cotton tissue extracts[J]. J Agric Food chem, 1992, 40 (8): 1453 - 1458

[13] McKenzie M J, Mett V, Jameson P E. Modified ELISA for the detection of neomycin phosphotransferase II in transformed plant species[J]. Plant Cell Rep, 2000, 19 (3): 286 - 289

[14] Anfossi L, Tozzi C, Giraudi G, *et al*. Evaluation of procedures for the extraction and purification of neomycin phosphotransferase II from a genetically modified *Agrobacterium* [J]. Annali di Chimica, 2004, 94 (1 - 2): 93 - 99

[15] 王建革. 基因枪转多基因杨树的获得 [D]. 北京:中国林业科学研究院, 2006: 40 - 44

[16] 邓 欣, 赵廷昌, 高必达. 转基因抗虫棉叶围卡那霉素抗性细菌种群动态及 *NPT*II基因漂移研究 [J]. 中国农业科学, 2007, 40 (11): 2488 - 2494

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net