

图表清单

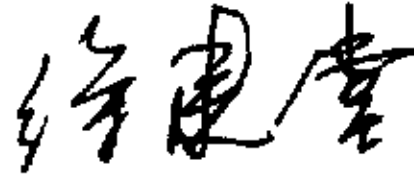
图 1. 供试质粒图谱	22
图 2. 质粒 DNA 琼脂糖检测图片	30
图 3. 红麻总 DNA 琼脂糖电泳检测图	32
图 4—A. 转基因红麻叶片室内喂养统计图	36
图 4—B. 非抗虫红麻叶片室内虫口喂养统计图	36
图 5—A. 抗虫红麻田间表现 (海南)	38
图 5—B. 不抗虫红麻田间表现 (海南)	38
图 5—C. 抗虫红麻田间表现 (福州)	38
图 5—D. 不抗虫红麻田间表现 (海南)	38
图 5—E. 抗虫红麻花田间表现 (福州)	39
图 5—F. 不抗虫红麻花田间表现 (海南)	39
图 5—G. 红麻田间虫害 (海南)	39
图 5—H. 田间抗虫植株筛选 (海南)	39
图 6. 含目的基因的质粒检测图谱	41
图 7. 抗虫转基因 PCR 检测图	41
图 8. 红麻转基因后代 ISSR 检测结果	41
图 9. 四个世代转基因红麻的 Southern 分子杂交图片	42
表 1. 红麻总 DNA 紫外分光光度检测	31
表 2. 用柱头滴加法将不同浓度抗虫基因质粒导入红麻受体效果统计表	34
表 3. 用子房注射法将不同浓度抗虫基因质粒导入红麻受体效果统计表	34
表 4. 两种方法综合统计表	34
表 5. 抗虫转基因株系室内抗害虫喂养鉴定统计表	35
表 6. 抗虫转基因室内造桥虫鉴定统计表	37
表 7. 田间考种数据对照	40

英文缩略表

所写符号	英文名字	中文名称
A	Absorbing	吸光度
Acr	Acrylamide	丙烯酰胺
AP	Ammonium Persulfate	过硫酸铵
Bis	Methylenebisacrylamide	N,N'-甲叉双丙烯酰胺
β -ME	β -Mercaptoethanol	β -巯基乙醇
bp	base pair	碱基对
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	苏云金芽孢杆菌
cDNA	complementary DNA	互补 DNA
CTAB	Cetyltrimethyl ammonium buomide	十六烷基三甲基溴化铵
DDRT-PCR	Diferential Display Reverse Transcription	差异显示反转录 PCR
dNTP	Deoxyribonucleoside	脱氧核苷三磷酸
dsDNA	Double Strain DNA	双链 DNA
EB	ethidium bromide	溴化乙锭
EDTA	Ethylene diaminetetraacetic acid	乙二胺四乙酸
min	minute	分钟
PA	Peroxidase	过氧化物酶
PAGE	Polyacrylamide-gel-electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PB	phosphate bufer	磷酸缓冲液
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
PEG	Poly ethylene glycol	聚乙二醇
PVP	Polyvinylpyrrolidone	聚乙烯吡咯烷酮
RACE-PCR	Rapid Amplified cDNA End PCR	cDNA 末端快增 PCR
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA	随机扩增多态性 DNA
s	senond	秒
SDS	Saiumd Aecylsulfat	十二烷基硫酸钠
SSC	standard saline citrate	标准柠檬酸盐溶液
TE	Tris and EDTA	Tris EDTA 缓冲液
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylene diamim	N,N,N',N'-四甲基乙二胺
Tris	trishdryxymethylaminomethane	三羟甲基氨基甲烷

独创性声明

本人声明, 所呈交的学位(毕业)论文, 是本人在指导教师的指导下独立完成的研究成果, 并且是自己撰写的。尽我所知, 除了文中作了标注和致谢中已作了答谢的地方外, 论文中不包含其他人发表或撰写过的研究成果。与我一同对本研究做出贡献的同志, 都在论文中作了明确的说明并表示了谢意, 如被查有侵犯他人知识产权的行为, 由本人承担应有的责任。

学位(毕业)论文作者亲笔签名:  日期: 06.6.3

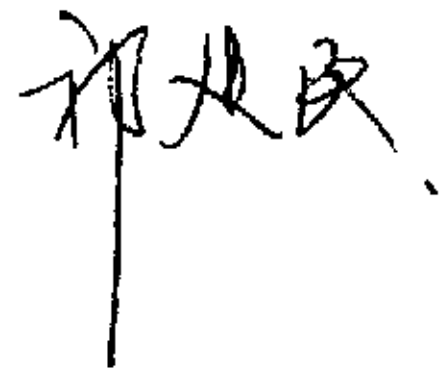
论文使用授权的说明

本人完全了解福建农林大学有关保留、使用学位(毕业)论文的规定, 即学校有权送交论文的复印件, 允许论文被查阅和借阅; 学校可以公布论文的全部或部分内容, 可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。

保密, 在 年后解密可适用本授权书。 ☐

不保密, 本论文属于不保密。 ☐

学位(毕业)论文作者亲笔签名:  日期: 06.6.3

指导教师亲笔签名:  日期: 06.6.3

摘 要

为促进红麻抗虫转基因育种研究的发展,本研究以国家级重点推广的 6 个红麻高产优质抗病新品种为受体,采用花粉管通道法(即柱头滴加法和子房注射法)将抗虫(*Bt*)基因导入受体红麻品种。通过对重点受体品种福红 952 转基因后代四个世代田间观察抗虫效果和实验室内虫口喂养鉴定以及实验室内的 PCR 检测、ISSR 分子标记检测和 Southern 分子杂交验证鉴定,获得了转基因研究的阶段性成果,并建立了红麻简捷高效转基因分子育种的有效途径与核心技术体系。试验结果如下:

1. *Bt* 质粒制备与纯化:研究表明采用大量法制备含有抗虫(*Bt*)目的基因的质粒,经过纯化后其 OD_{260/280} 在 1.9-2.0 即可用于转基因;
2. 遗传转化效率:采用柱头滴加法和子房注射法得到的共处理红麻花 470 朵,当代结实率分别是 68.8%和 51.7%,后代少虫口分别为 7.2%和 24.5%,经 PCR 检测两种方法得到的总体转化效率为 0.48%;获得具有抗虫特性的红麻品种福红 952;
3. 抗虫性室内虫口喂养鉴定:将抗虫的红麻叶片与非转基因的红麻叶片做对照,在室内进行抗虫喂养实验,喂食后第二天死亡率达 65.5%,第 4 天后全部死亡,而非抗虫转基因红麻未表现明显的抗虫特性;
4. 目的基因 PCR 分子检测:对抗虫转基因红麻福红 952 的四个不同世代的红麻叶片同时进行 PCR 分子检测,结果都检测到了目的基因的特征条带,其抗虫特性能稳定遗传;
5. 抗虫特异稳定性 ISSR 分子标记检测:首次对抗虫转基因红麻进行 ISSR 分子标记检测,发现抗虫红麻与非转基因对照品种的谱带比较出现特异多态性;结果表明 ISSR 分子标记可用于抗虫转基因检测;
6. 抗虫遗传稳定性分子杂交检验:采用地高辛 Southern 分子杂交对 4 个不同世代抗虫转基因红麻进行检测,四个遗传世代都检测到了三条目的条带,分别是约为 2500bp、1500bp 和 680bp 大小的片断。
7. 抗虫转基因红麻福红 952 育成:从 97 个少虫口转基因红麻 T₂代中,在海南高密度虫口下田间自然鉴定,已获得三个具明显抗虫特性的转基因品系,并育成抗虫、高产、福红 952 抗虫转基因品系。

关键词:红麻;花粉管通道法;抗虫转基因;*Bt* 基因;遗传稳定性

Studies on the introduction of *Bt* gene into kenaf and the inheritance genetic stability

Abstract: In order to promote the development of kenaf breeding in insect-resistant transgene, six types of state-level spreading kenaf varieties with high yield, high quality and disease-resistant been injected *Bt* gene by Pollen Tube Pathway, that is stigma addition and ovary injection. The insect-resistant effect were detected in *Bt* transgenic variety of Fuhong 952 for 4 generations by field investigating and insect feeding, as well as by PCR and ISSR marker-assisted detection, Southern molecular hybridization confirmation, the result obtained showed that:

- 1、 The preparation and purification *bt* plasmid: preparing the plasmid which contains *Bt* gene, $OD_{260/280}$ between 1.9-2.0 was available after purified.
- 2、 The genetic transfer efficiency :deal with 470 flowers through stigma addition and ovary injection, the progeny setting seed rate were 68.8% and 51.7% respectively, inheritance less insect eating plants were 7.2% and 24.5% respectively, and the total transfer efficiency of the two procedures was 0.48% by PCR detecting, and obtained the varieties of fuhong 952 which has insect-resistant character.
- 3、 Identification of insect feeding on the culture plate: put the insect-resistant and nontransgene kenaf leaves as comparison, feed the insect on the culture plate and the insect-resistant has insect-resistant character.
- 4、 PCR molecular detection of target gene: By detecting different generations kenaf leaves with PCR molecular detection, the result showed that they are all have the target genes
- 5、 ISSR molecular marker detection target gene: By detecting the insect-resistant kenaf and nontransgenic kenaf with ISSR molecular marker detection for the first time, the result showed that they have polymorphisms. The result showed that ISSR molecular marker detection can be used as a way of insect-resistant detection.
- 6、 Southern molecular hybridization detection: Detecting four generations of transgenic kenaf with digoxin Southern molecular hybridization, and there are three target gene copies in the four generations, which were 2500bp, 1500bp, 680bp copies.
- 7、 Breeding of the varieties fuhong 952 with insect-resistant gene: obtained three well-resistant insect strains with the detection of nature from 97 different individuals, and bred the new kenaf varieties with insect-resistant and high-production of

Key Words: Kenaf; Pollen Tube Pathway; Insect-resistant; Transgene; *Bt* gene; Genetic Stability.

目 录

1	1.1 论文说明：图表清单、英文缩略表
2	1.2 独创性声明及论文使用授权的说明
3	1.3 摘要
4	1.4 英文摘要
5	2 前言
6	3 文献综述
7	3.1 红麻转基因国内外研究概况和研究水平
8	3.2 植物基因转化方法研究进展
9	3.2.1 根癌农杆菌 Ti 质粒介导基因转化
10	3.2.2 发根农杆菌 Ri 质粒载体基因转化
11	3.2.3 植物病毒载体介导基因转化
12	3.2.4 DNA 直接导入基因转化
13	3.2.5 种质系统介导基因转化
14	3.3 花粉管通道法分子育种技术的提出
15	3.3.1 转基因受体分类
16	3.3.2 转化方法
17	3.3.3 转基因后代材料的检测鉴定
18	3.3.4 后代的遗传特性
19	3.4 花粉管通道法转基因的应用
20	3.5 利用花粉管通道法进行红麻抗虫转基因
21	3.6 花粉管通道法转基因技术评价与发展望
22	3.7 转基因植物的检测与检验
23	3.7.1 蛋白质检测
24	3.7.2 DNA 检测
25	4 材料和方法
26	4.1 供试材料及来源
27	4.2 方法
28	4.2.1 质粒大量和小量提取所需药品
29	4.2.2 质粒 DNA 的小量制备操作步骤
30	4.2.3 质粒 DNA 的大量制备操作步骤
31	4.2.4 田间实验设计
32	4.3 红麻总 DNA 提取及 PCR 检测
33	4.3.1 提取缓冲液
34	4.3.2 用 CTAB 法提取红麻总 DNA 步骤
35	4.3.3 转基因红麻的 PCR 检测
36	4.3.4 转基因红麻的 ISSR 检测
37	4.4 转基因红麻的 Southern 杂交检测
38	5 结果与分析
39	5.1 质粒提取结果与分析
40	5.2 DNA 提取结果与鉴定

□4.3	田间实验结果与分析
□4.3.1	不同浓度抗虫基因质粒导入六个红麻受体品种的效果统计
□4.3.2	抗虫转基因室内鉴定
□4.3.3	室内鉴定实验重复验证实验
□4.3.4	抗虫红麻的田间观察
□4.3.5	红麻对照与抗虫转基因的考种数据比较
□4.4	转基因后代的 PCR 检测
□4.5	转基因后代的 ISSR 检测结果
□4.6	Southern 杂交结果
□5	讨论
□5.1	红麻的花粉管通道转基因方法
□5.2	提高花粉管通道法转基因成活率、成株率、转化率的对策
□5.3	利用分子标记 ISSR 或 RAPD 分析外源基因整合的原理
□5.4	导入的外源基因稳定性问题
□	参考文献
□	致谢

1 前言

红麻 (*Hibiscus cannabinus* L.) 为锦葵科 (Malvaceae) 木槿属 (*Hibiscus*) 一年生韧皮纤维作物, 是麻纺和造纸工业的重要原料。具有耐旱、耐盐碱、耐贫瘠、易栽培、速生、纤维产量高等特性, 且不与粮争地 (山地、盐碱地、洲滩地均可种植), 是目前我国栽培面积最大、总产最高的重要麻类纤维作物之一。又由于红麻具有巨大的生物产量 (为树木的 3—5 倍), 极强的 CO_2 吸收能力 (为森林的 4—5 倍), 纤维品质优良 (全杆造纸可与尖叶林相媲美), 以及用途广泛等突出优点, 被视为 21 世纪极具潜力和倍受青睐的优势作物^[1, 2]。近年来, 随着人类环保意识和对自然纤维织物需求的提高, 加强和发展红麻生产, 可减少造纸对森林资源的破坏, 满足人类对自然纤维的需求, 具有重要的社会、经济和生态意义。

由于红麻为高秆作物, 利用农药防治日益猖獗虫害。虽可减轻虫害问题, 但是高秆作物防治难度较大、成本较高, 由此引发的人畜危害及环境问题日益引起人们的忧虑。因此, 在福红系列红麻新品种中导入抗虫基因 (*Bt* 基因) 是目前生产上的紧迫和具有长远社经济和生态效益的课题。与传统育种方法相比, 基因工程技术可以打破生物种间的杂交障碍, 加速生物变异和遗传改良速度, 可提高育种效率, 满足生产的迫切需求。

近年来, 随着基因工程技术的发展, 棉花等作物抗虫或抗除草剂转基因育种的成功, 产生了巨大的社会经济和生态效益。红麻与棉花均为锦葵科, 但麻类转基因研究起步较晚, 国内外尚未有抗虫和抗除草剂的转基因红麻优良品种应用于生产。为此, 本研究拟将抗虫目的基因导入福红系列品种中, 建立红麻转基因分子育种技术体系, 选育高产、抗虫转基因红麻新品种, 并在福建建立基地, 大批量繁育转基因红麻良种。对提高福建及全国红麻生产水平和经济效益, 发展旱地节水农业, 推进可持续农业和造纸与麻纺工业的发展, 都具有十分重要的理论和现实意义。

2 文献综述

2.1 红麻转基因国内外研究概况和研究水平

自 1983 年世界上第一例转基因作物——抗除草剂烟草问世以来, 转基因作物的研究与应用取得了很大进展。据统计, 迄今全球转基因成功的植物已有 35 科 120 种^[3], 转基因作物的种植面积由 1996 年的 170 万 hm^2 猛增至 2001 年的 5260 万 hm^2 ^[4]。在纤维作物方面, 棉花抗虫、抗除草剂转基因育种取得较大进展, 产生了巨大的经济效益。但麻类作物转基因育种研究起步较迟, 进展不大。1996 年黑龙江农科院王玉富等、刘燕等报道了将外源 DNA 导入亚麻获得变异植株的初步研究成果^[5-6]; 1999 年福建农林大学祁建民等利用花粉管通道法将外源 DNA (黄麻) 导入红麻, 并育成了茎秆稀有无刺高种子产品高亚油酸的红麻新型品种金光无刺 1 号^[7-8]; 2000 年安徽省种子总公司引育种中心李爱青和安徽农业大学曹德菊等报道了花粉管法将外源抗除草剂基因导入红麻青皮 3 号的有效方法及参数可行性的初步研究成果^[9-10], 2001 年福建农林大学周东新、祁建民等报道了黄麻 RAPD 和 ISSR 分析的影响因素并建立了技术体系^[11], 近年来, 中国麻类科学研究所所在苧麻转基因育种研究上也取得了阶段性成果, 这些研究为开展红麻转基因分子育种奠定了基础和积累了经验, 也为进一步开展红麻抗虫、抗除草剂分子育种奠定了基础。

我国是世界红、黄麻三大主产国之一, 红麻育种水平居世界领先水平, 红麻单产居世界首位。自 20 世纪 80 年代以来, 福建农林大学和中国麻类研究所等单位红麻育种取得了突破性进展。近年来, 福建农林大学与安徽省种子总公司引育种中心协作, 已育成超高产、强适应性红麻新品种福建红 2 号、福红 3 号、福红 951、福红 952、福红 991、福红 992 等, 中国麻类所育成的红引 135、KB2、KB11、H305 等品种 (组合), 产量或品质均居国内外领先或先进水平, 并在生产上较大面积推广应用。因此, 将抗除草剂和抗虫基因转入高产、优质红麻品种, 将会产生巨大的社会经济和生态效益。但迄今, 国内外红麻转基因育种研究, 除本项目组抗虫和转基因育种已取得具有明显的抗虫特性的阶段性成果外, 安徽农业大学报道过采用花粉管通道法建立抗除草剂转基因技术体系, 但至今未见国内外其他单位有抗虫、抗除草剂转基因红麻品种应用于生产的报道。

2.2 植物基因转化方法研究进展

自 1983 年 Zambryski 获得世界上第一例转基因植株, 1985 年 Horsch 首创叶盘法以来, 分别建立了农杆菌介导法、PEG 介导法、电激穿孔法、病毒介导法、显微注射法、花粉管通道法、超声波法、基因枪法等转基因方法, 迄今为止, 媒介农杆菌法获得的转基因植物占转基因植物总数的 85% 左右, 主要集中在双子叶植物, 但近年来在单子叶植物上的研究进展很快。到目前为止, 转有农业价值的工作主要集中在水稻、棉花等作物上, 转其它粮食作物主要是标记基因和报告基因^[12]。

2.2.1 根癌农杆菌 Ti 质粒介导基因转化

转化植物细胞的农杆菌有两类, 即根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 和发根农杆菌 (*A. rhizogenes*)。前者含 Ti 质粒, 后者含 Ri 质粒。根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) Ti 质粒基因转化系统是目前研究最多、理论机理最清楚、技术方法最成熟的基因转化途径。根癌农杆菌为土壤喜居菌, 革兰氏染色呈阴性, 是一种植物病原菌, 通过伤口感染植物后导致植物产生冠瘿瘤, 根据其诱导植物产生冠瘿碱的种类不同可分为三种类型: 胭脂碱型 (nopaline type)、章鱼碱型 (octopine type) 和农杆菌型 (gropine type), 不同菌株类型转化植物表现出不同的转化效率。Ti 质粒分子很大, 由以下几部分组成: (1) 转移 DNA 区 (T-DNA 区), 约 20kb, 占 Ti 质粒的十分之一。T DNA 的两端是两个 25bp 的正向重复序列, 分别称为左边界和右边界; (2) 毒性区 (Vir 区), 30kb, 有 VirA, B, C, D, E, G, H 等 7 个操纵子共 24 个基因, 起共协调作用, 参与 T-DNA 的加工和转移; (3) 冠瘿碱代谢基因、复制起点及质粒不相容性控制基因^[13]。

农杆菌和宿主细胞之间的化学信号传递、遗传转化及相关代谢活动的原理是: 农杆菌通过基因转化把 T-DNA 上的基因导入到植物细胞并整合到核 DNA 上。这些外源基因在植物细胞中得到表达, 致使植物细胞转化为肿瘤状态, 并且大量合成冠瘿碱。这些冠瘿碱又是农杆菌的唯一碳源, 有利于农杆菌的繁殖和 Ti 质粒的转移, 进一步扩大侵染领域, 故农杆菌为自己设计了一个十分巧妙的化学分子内共生体系。这也是一个典型的存在于自然界的天然基因转化过程。该过程如下:

(1) 损伤的植物细胞产生植物酚类作为农杆菌的侵染信号; (2) 这些化学诱导物透过农杆菌的细胞膜, 活化 *virA* 和 *virG* 基因, 再诱导 *Vir* 区的其他基因; (3) *vir* 区基因的活化, 作用于 T-DNA 的加工及 T-DNA 的转移; (4) T-DNA 进入植物细胞后整合到核 DNA 上; (5) T-DNA 在植物细胞中表达产生冠瘿碱及植物激素; (6) 农杆菌 Ti 质粒上有专一性的冠瘿碱分解酶基因 (*ocs*)。该基因启动合成各种酶, 分解植物细胞产生的冠瘿碱作为唯一的碳源和氮源; (7) 冠瘿碱促进农杆菌附着及激活 *tra* 基因有利于 Ti 质粒的接合转移, 扩大侵染范围; 通过改造的 Ti 质粒便是良好的基因工程载体, Ti 质粒可以容纳相当大的 DNA 片段插入, 插入到 T-DNA 的外源基因能够同 T-DNA 一道在植物中表达, 整合进植物基因组的 T-DNA 及插入其间的外源基因不能在植物细胞中表达, 而且可根据人们的需要连接不同的启动子, 使外源基因能够在再生植物的各种组织器官中特意表达, 如在果实中表达, 在叶中表达, 甚至仅在根中表达, 即可进行认为的控制。而且转化的外源基因为单拷贝, 遗传稳定性好。

农杆菌介导法与其它转基因方法相比, 具有转化机理清楚、转化率高、方法成熟、简便易行、转移基因明确(为 T-DNA 左右边界之间的序列)、能够转化大片段的 DNA、外源基因以单或低拷贝整合到植物基因组中、遗传稳定性好、符合孟德尔定律等特点目前已成为棉花等作物常用的基因转化方法, 但其最大的局限在于严格受基因型的限制, 已成功转化的棉花品种(品系)多数限于珂 312, 315 和 201 等模式品种上, 这些转化的模式品种只能再通过传统育种手段将其有用性状转育至生产上大面积推广的品种中, 延长了转基因棉花的选育和推广周期。

2.2.2 发根农杆菌 Ri 质粒载体基因转化

发根农杆菌侵染植物细胞产生许多不定根, 这种不定根生长迅速, 不断分枝成毛状, 故称之为毛状根(hairy root)也称发状根, 分别简称为毛根或发根, Ri 质粒为根诱导质粒(root inducing plasmid)。长期以来, 人们很重视 Ti 质粒的研究, 并取得较好的进展。对发根农杆菌的研究主要集中在毛根的危害及与根癌农杆菌的相似性上。直到 80 年代以后科学家们才对 Ri 质粒研究开始产生兴趣, 特别使日本、欧洲、美国等发达国家的许多学者从多方面研究了 Ri 质粒及其特化特点。近年来国内有些实验室也相继开始了这一方面的研究工作。现在

认识到, 和 Ti 质粒相比, Ri 质粒具有许多优点: (1) Ri 质粒可以不经“接触武装 (disarm)”进行转化, 并且转化产生的发根能够再生植株; (2) 发状根是一个单细胞克隆, 可以避免嵌合体; (3) 可直接作为中间载体; (4) Ri 质粒和 Ti 质粒可以配合使用, 建立双元载体系统, 拓展了两类质粒在植物基因工程中的应用范围; (5) 发根适用于离体培养, 而且很多植物的发根在离体培养条件下都表现出原植株次生代谢产物的合成能力。因此, Ri 质粒不仅可以作为转化的优良载体, 而且可能用于有价值的次生代谢物的生产。

2.2.3 植物病毒载体介导基因转化

植物病毒对植物细胞的感染过程是一种自然界发生的基因转移过程, 病毒感染细胞后把其 DNA 导入寄主细胞, 并且这些病毒 DNA 能在寄主细胞中进行复制和表达, 因此病毒可以作为一种基因转化的载体, 并且已经在微生物和哺乳动物的基因转化及基因组分析研究中得到应用, 例如, 动物病毒 SV40 早已应用于动物细胞的基因转化。但是, 植物病毒作为载体的研究仍处于初级阶段。其原因首先是绝大部分的植物病毒是以 RNA 为遗传物质。它没有像 DNA 那样技术研究的成熟, 特别是尚未发现像动物细胞反转录病毒那样能够整合到宿主基因组的植物病毒。所以即使构建了植物病毒载体, 将外源基因通过系统感染引入植物细胞, 但它们只能以游离拷贝的形式存在于其中, 而不能整合到植物染色体上并通过有性繁殖传递给后代。

2.2.4 DNA 直接导入基因转化

(1) 化学诱导 DNA 直接转化

①PEG 介导基因转化: PEG 介导基因转化是 Davey 等(1980)和 Krens 等(1985)首先建立。主要原理是化合物聚乙二醇、多聚 L-鸟氨酸 (pLO)、磷酸钙及高 pH 值的条件下诱导原生质体摄取外源 DNA 分子。

②脂质体介导基因转化: 脂质体是根据生物膜的结构功能特性合成人工膜, 然后把 DNA 包裹在人工膜内成球体, 通过植物原生质体的吞噬或融和作用把内含物转入受体细胞, 因此也是化学方法之一。

(2) 物理法诱导 DNA 直接转化

①点激法介导基因转化

电激法利用高压电脉冲作用在原生质体膜上“电激穿孔”(electroporation), 形成可逆的瞬间通道, 从而促进外源 DNA 的摄取。此法在动物细胞中的应用较早并取得很好的效果。

②超声波介导基因转化

超声波基因转化的基本原理是利用低声强脉冲超声波的物理作用, 击穿细胞膜造成通道, 使外源 DNA 进入细胞。一般认为超声波的生物学效应主要是机械作用、热化作用及空化作用。

③显微注射介导基因转化

显微注射(microinjection)进行基因转化是一种比较静电的技术, 其理论和技术方法的研究都比较成熟。特别是在动物细胞和卵细胞的基因转化, 核移植及细胞器的移植方面应用很多, 并取得重要成果。其基本原理比较简明, 它是利用显微注射仪将外源 DNA 直接注入受体的细胞质或细胞核中。

④激光微束介导基因转化

激光微束照射是近代科学发展的新兴技术, 这种激光显微照射技术较常规的显微注射操作具有定位准确、操作简单对细胞损伤小等优点, 因而越来越受到生物学、医学核光学界的重视, 至今发展成为一门新的科学——激光生物学。其原理是将激光引入显微镜聚焦成微米级的微束照射培养细胞, 在细胞膜上可形成自我愈合的小孔, 是加入细胞培养基里的外源 DNA 流入细胞, 实现基因转移。

⑤基因枪法介导基因转化

基因枪法(Particle gun)又称粒子轰击法。基因枪根据动力系统可分为火药引爆、高压放电和压缩气体驱动三类。最先由美国 Cornell 大学生物化学系 John. C. Santord 等于 1983 年研究成功火药式基因枪, 1987 年该实验室的 Klein 等首次将携带细菌氯霉素乙酰转移酶(*Cat*)基因的烟草花叶病毒 RNA 用基因枪导入洋葱表皮细胞中并获得表达。Bio-Rad 公司出售的 PDS-1000/He 型基因枪属高压气体驱动式, 是目前国内外实验室广为采用的类型。基因枪基本原理是通过火药爆炸、高压放电或高压气体作为动力加速带有基因的金属颗粒(金粒或钨粒), 并使其进入带壁细胞, 在此过程中质粒 DNA 首先沉淀在微弹(金粒或钨粒)表面, 结合有 DNA 分子的微弹经加速而获得足够的动量, 进而穿透植物细胞壁进入靶细

胞,随后释放出 DNA 分子并随机的整合到寄主的基因组内^[14]。影响基因枪转化的因素主要有受体材料大小、渗透培养基中甘露醇的浓度、轰击前后渗透培养时间、金粉与 DNA 浓度、轰击距离等^[15]。基因枪法的最大优点是可转化多种组织和器官,转化受体可以是胚性悬浮细胞、愈伤组织、未成熟胚、分生组织,也可以是花粉和茎尖等,不受植物种类、基因型和器官限制,但可靠性较差、整合效率低、稳定遗传表达的效率也是很低的^[16]。

2.2.5 种质系统介导基因转化

(1) 花粉管介导基因转化

花粉管通道法的主要原理是授粉后是外源 DNA 能沿花粉管渗入,经过珠心通道进入胚囊,转化尚不具备正常细胞壁的卵、合子或早期胚胎细胞。这一技术原理可以应用于任何开花植物。

(2) 生殖细胞浸泡法介导基因转化

顾名思义,浸泡法是将供试外值体如种子、胚、胚珠、子房、花粉粒、幼穗悬浮细胞培养物等直接浸泡在外源 DNA 溶液中,利用渗透作用把外源基因导入受体细胞并稳定地整合表达。

(3) 胚囊、子房注射法介导基因转化

所谓胚囊、子房注射法是指利用显微注射仪把外源 DNA 溶液注入到子房或胚囊中,由于子房或胚囊中产生高的压力及卵细胞的吸收是外源 DNA 进入受精的卵细胞,从而获得转基因植株。

2.3 花粉管通道法分子育种技术的提出

花粉管通道法最初的萌芽是 1975 年 Pandey 对烟草的研究。试验将供体花粉用 γ 射线杀死后与受体新鲜花粉混合授粉得到转化结果,认为可不通过配子融合而发生基因转化。1980 年, Hess 等报道了利用吸收外源 DNA 的花粉转基因得到花色变异的矮牵牛。二十世纪七十年代,我国农民育种家李贞生培育出的玉米稻在国内育种界引起了巨大反响,但对其远缘杂交的机制众说纷纭。上海生化所的周光宇^[17]教授在广泛调查我国远缘杂交成功经验的基础上,对亲缘关系较远的杂交所产生的现象从生化角度于 1978 年提出了 DNA 片段杂交的假设。该假设

认为：尽管在染色体水平上(染色体数目、形态)没有变异，但是远源的 DNA 片段有可能整合进受体的染色体中，改变基因的顺序或者引起基因碱基的缺失、插入，从而在基因水平上发生突变，进而引起性状的变异。根据这一理论，周光宇等(1983 年)提出了自花授粉后的外源 DNA 导入方法——花粉管通道法。即将供体总 DNA 的片段在受体自花授粉一定时期后使之沿花粉管通道进入胚囊，转化受精卵或者其前后的细胞。以花粉管通道法为先导，我国育种界广泛应用外源 DNA 导入方法开展了分子育种。周光宇教授(1988 年)在分析我国远缘杂交的基础上，结合基因工程技术，把植物分子育种分为两个层次的生物工程技术。

(1) 整体植物分子育种技术，亦称外源 DNA 导入整体植物技术：将带有目的性状基因的供体总 DNA 片段导入植物，获得转化种子，并筛选出带有目的性状的后代及培育新品种。例如，花粉管导入法、胚囊注射法等。

(2) 植物基因工程育种技术：将目的基因分离出来，构建重组分子，导入植物的组织、细胞，再通过人工离体培养筛选获得目的基因表达的后代，培育新品种。例如农杆菌介导法、基因枪转化法等。从育种的角度看，分子育种培育的后代，除应具有转移的目的基因性状外，还必须符合农业生产要求的农艺性状，经济价值优于母体并能稳定遗传。植物整体水平的分子育种对这一点可能更为有利。但就其育种的目的性而言，植物基因工程技术更为优越，所以二者各有所长。随后许多科学家在不同的植物上进行了大量研究，建立了水稻、小麦、大豆、玉米、烟草、棉花以及番茄等重要农作物通过该方法转移外源基因的方法，并取得了一些重要成果。

2.3.1 转基因受体分类

前期以导入近缘种的总 DNA 为主，以后逐渐发展到导入其他远缘植物的总 DNA 和质粒 DNA、构建合成的基因、报告基因、抗虫基因、抗冻基因、耐盐基因、抗病毒基因等。

2.3.2 转化方法

利用花粉管通道法导入外源基因通常有以下几种方法：(1) 微注射法：一般适合于花器官较大的农作物如棉花等，该方法利用微量注射器将待转基因注射入受精子房；(2) 柱头滴加法：在授粉前后，将待转基因的溶液滴加在柱头上；(3) 花粉粒携带：用待转基因的溶液处理花粉粒，使花粉粒携带外源基因，然后授粉。

2.3.3 转基因后代材料的检测鉴定

形态鉴定：比如观察株高、株型、叶型明显变异等；抗性鉴定：通过除草剂、抗生素筛选转基因植株，由于未转基因植株缺乏抗性而将之淘汰，或者通过抗虫实验进行鉴定；荧光检测：转入荧光蛋白基因，对转化体进行快速的活体鉴定；分子生物学检测鉴定：如PCR, RAPD, ISSR, Southern Blot等。

2.3.4 后代的遗传特性

从目前的研究来看，花粉管通道法转基因的材料需要经过至少1-3代才能成为遗传稳定的品系。

在此前有可能不遵循孟德尔遗传规律。曾君祉等^[22]以小麦为材料研究了此转化方法的可重复性及基因型的影响等，并连续3代观察了外源基因在后代中的表达。通过实验发现，被观察的这批材料不遵循孟德尔氏遗传规律，而且发生了转基因沉默现象。这种基因沉默现象在转基因植株中经常发生，并被认为是由于DNA碱基的甲基化造成^[18-20]。

2.4 花粉管通道法转基因的应用

花粉管通道法在植物遗传转化和作物育种上有重要的应用价值。该方法将基因工程和常规育种合理的结合起来，为离体再生系统不完善的植物转化提供了另一条有意义的途径。在早期研究中，导入的一般都是外源总DNA给受体植物带来一些不希望的性状。总DNA导入后与受体基因组的整合是随机的，缺乏有效控制，因而实现的目的性较差。随着基因工程的发展，现在导入的一般都是重组分子，有益的基因连在质粒载体上导入受体，去除不必要的基因。而且基因来源也大大丰富了，可来源于其他植物、动物或微生物，得到抗虫、抗病毒、抗细菌的后代。给育种工作者提供更加广泛的选择。在最初的研究中，对转基因的检测基本是通过性状观测来实现的，说服力不强。在近几年的研究中，越来越多的研究者都给出分子检测的证据，证明该方法的可行性。

截至目前已有多种农作物通过花粉管通道法获得成功转化，包括水稻^[23-27]，番茄^[28]，高粱^[29]，棉花^[30-33]，小麦^[34-35]，烟草^[36]，玉米^[37-38]等。我国目前推广面积最大的转基因抗虫棉就是用花粉管通道法培育出来的。

2.5 利用花粉管通道法进行红麻抗虫转基因

外源基因在转基因植物中遗传和表达的稳定性的,直接关系到转基因材料的应用前景。一般来说,无论采用哪种遗传转化方法获得的转基因植物,整合到植物基因组中的外源基因与常规杂交育种转育目标基因一样,能稳定地通过有性繁殖过程遗传给后代,并能进行稳定的表达^[39-40], Fearing等^[39]定量研究了转*Bt* (*Bacillus thuringiensis*) 基因玉米中毒蛋白的表达量,结果表明CryIA(b)基因在转基因植株的连续世代之间稳定表达; Maqbool等^[41]通过Western blot 分析表明。在转cryAc+cry2A+GNA(*Galanthus Navies Agglutinin*)三价基因的水稻中,这3个抗虫基因表现为单个显性基因的遗传方式,一起遗传给下一代并都能稳定地表达。采用棉铃虫室内生物测定方法对转*Bt*+*CpTI* (*Cowpea Trypsin Inhibitor*) 双价抗虫基因棉花4个连续世代的棉铃虫抗性进行了检测,结果表明4个世代在棉花的不同生育时期都对棉铃虫具有较高的抗性,且各世代抗性水平相近,可见该转基因抗虫棉对棉铃虫的抗性能在各世代之。曹德菊等^[9, 42]也报道了外源抗除草剂基因导入红麻的有效方法和参数及其分子验证。自2003年起,笔者利用花粉管通道法将携带有抗虫基因导入到红麻受体,并获得了三个抗虫转基因株系, T₁-T₄ 四个连续世代抗虫基因均能稳定遗传及其表达,为选育高效抗虫红麻新品种提供科学证据。

2.6 花粉管通道法转基因技术评价与发展望

花粉管通道法的主要原理是授粉后使外源DNA能沿着花粉管渗入,经过珠心通道进入胚珠,转化尚不具备正常细胞壁的卵、合子或早期胚胎细胞。这一技术原理可以应用于任何开花植物。从这一技术的研究开始一直充满着争论和分歧。经典的远缘杂交理论认为:只有精卵结合或染色体加倍才算远缘杂交。周光宇教授等认为,从近代分子生物学水平看,虽然就整体分子而言,亲缘关系愈远的生物间的染色体和染色体外DNA的结构愈不易亲和,很容易互相排斥,但从局部的DNA片段来看,两种植物的部分基因间的结构却可能保持一定的亲和性。因而当远缘DNA片段在母本DNA复制过程中有可能被重组而使子代出现变异。这种参与杂交的DNA片段可能带有可亲和远缘物种的结构基因、调控基因、甚至是断裂的无意义的DNA片段。后两种DNA片段如果整合到母本基因组中,将同样可能影响母本

基因表达而变异。万文举等^[43]认为外源DNA导入具有双重作用：一是基因转移作用，二是诱变作用。外源DNA导入可以达到基因转移目的，已经得到了很多的验证。关于诱变作用，他认为引起突变的物质本身就是遗传物质。外源DNA片段，甚至是单个或若干个碱基的插入都会引起移码突变。诱变作用具有一种“引发作用”或“再启动”作用，把在系统中曾经“潜伏”下来的性状又引发出来。并以细胞核和原生质体穿壁运动是正常现象为依据，认为比细胞核更小的外源DNA片段更可以穿过细胞壁进入受体细胞中，借助受体细胞中DNA连接酶整合(插入)到受体细胞中，并随染色体和细胞分裂遗传给子代细胞。

花粉管通道法已经成为目前转基因的有效方法之一。特别是从育种角度考虑，它有效的利用了自然生殖过程，简便、快捷。其主要特点有：

(1) 可直接获得转基因种子，在育种中有独到的优势，因为该方法不需要组织培养和诱导再生植株，操作方便；

(2) 适用范围广，可用于任何开花植物，进行任何物种甚至人工合成的基因转移，尤其适合于难以再生植株的大豆、小麦等粮食作物的遗传转化，这样给育种工作者带来更多的选择；

(3) 利用整体植株的卵细胞、受精卵或早期胚细胞进行转化，直接获得转基因植株，因此在鉴定时可直接针对目的性状的表现型来进行，从而可以避免一般情况下依赖于组织培养，鉴定过程中大量使用抗生素进行筛选的弊端；

(4) 转化速度较快，转化效率可达1%左右；

(5) 育种时间短，变异性状稳定较快，一般筛选到遗传稳定品系只需3-4代，比常规育种时间缩短一半左右；

(6) 方法简便，不需要复杂昂贵的仪器设备，可在大田、盆栽和温室中操作，易于掌握；

(7) 转化受体植物花期受限制，操作者对受体开花受精的时间过程必须精确掌握，使卵细胞能在最佳感受态时接受外源DNA以完成转化，但只要掌握好这些条件，此法便可适用于多种作物，也可获得高的转化频率；该方法操作的经验性很强，需要一定的技巧，操作如果不熟练，会影响到转化效率。

从现代分子水平看，两种远缘植物DNA分子间常含有同源序列部分，特别是高等植物DNA中存在着大量高度重复序列，很多基础代谢酶系的基因是一样的。

因此DNA片段之间的杂交重组是有可能的^[12]。很多实验证明,原生质体直接吸收的DNA片段可以整合到核DNA。尽管目前对其整合机理尚未清楚,但能否整合的问题通过大田的实验证据可以肯定,也就是外源DNA是可以整合到卵细胞核DNA的。花粉管导入技术有其自身明显的优点,特别是该转化系统利用植物自身的生殖系统作为载体是得天独厚的长处:

(1) 利用整体植株的卵细胞、受精卵或早期胚细胞转化DNA,无需细胞、原生质体等组织培养和诱导再生植株等一整套人工培养过程。

(2) 方法简便,可以在大田、盆栽或温室中进行。

(3) 单胚珠和多胚珠的单双子叶植物均可应用。只需针对具体植物的花器构造、开花习性和受精过程,采用合适的导入技术。

(4) 育种时间缩短。如棉花和水稻应用这一技术,筛选遗传稳定的品系只需3-4代时间。这是因为在自花授粉的基础上只有部分外源DNA片段进入受体基因组,避免了供体基因与受体基因全面重组,因而易于稳定。

(5) 可以任意选择生产上的当家品种进行外源DNA的导入,达到目的性状基因的转移。可以保留受体的优良性状,无需顾虑体细胞变异的问题。通过这一技术可以直接获得种子,对其后代的生产价值进行考察,可避免一般生物技术的实验室研究与大田要求脱节的问题。

近年来,随着人们对转基因生物安全性的关注,用花粉管通道法转化植物也要考虑安全性问题,防止对环境造成污染,发掘新的高抗基因,实现导入的外源基因高效、多用途表达。随着研究的深入,花粉管通道法的技术体系和相关理论将更加完善,一定会为植物转基因育种工作做出更大贡献。

2.7 转基因植物的检测与检验

进行转基因后,外源基因是否进入植物细胞,进入植物细胞的外源基因是否整合到植物染色体上,整合的方式如何,整合到染色体上的外源基因是否表达,这一系列的问题仍需要回答,只有获得充分的证据后才可以认定被检的材料是转基因的。

根据国内外十几年的研究,目前认为转基因植物的证据应有以下几点:(1)要有严格的对照(包括阳性和阴性对照);(2)转化当代要提供外源基因整合

方式和表达的分子生物学证据,物理数据(Southern杂交,Northern杂交,Western杂交等)与表型数据(酶活性分析或者其他);(3)提供外源基因控制的表型证据(如抗虫、抗病等);(4)根据该植物的繁殖方式(有性繁殖还是无性繁殖)提供遗传证据。有性繁殖作物需要有目的基因控制的表型性状传递给后代的证据,无性繁殖作物有繁殖一代的稳定遗传证据。

为获得真正的转基因植株,进行基因转化后的第一步工作筛选转化细胞。在含有选择压力的培养基上诱导转化细胞分化,形成转化芽,再诱导芽生长、生根,形成转化植株。第二步对转化的植株进行分子生物学鉴定,通过Southern杂交证明外源基因再植物染色体的整合,通过原位杂交可确定外源基因在植物染色体上的整合位点。通过Northern杂交可以证明外源基因在植物中是否正常转录,生成特异的mRNA。通过Western杂交可以证明外源基因在植物细胞内转录及翻译成功,生成特异的蛋白质。第三步则是进行性状鉴定及外源基因的表达调控研究。转基因植物应具有外源基因编码的特异蛋白质影响代谢而产生的该植物原不具备的经济性状,这样才能达到基因转化的目的。最后是遗传学分析,并获得转基因植物品种,应用于生产。

从检测的外源基因功能上看可分为报告基因检测及目的基因检测。外源基因是泛指转化进入植物细胞内的非内原性的基因。有的外源基因比较简单,只是一个标记基因,有的外源基因较为复杂,是由标记基因、目的基因及报告基因构成的嵌合体基因,嵌合基因的构成是为了解决转化目的基因之后的筛选问题及检测问题,当转化的目的基因无直接筛选及直接检测性质时,人们将能够提供直接筛选性质的标记基因及能提供易检测性质的报告基因与目的基因嵌合,通过检测报告基因的表达来间接了解目的基因的转化情况,所以报告基因在检测外源基因转化上,尤其是在研究基因表达调控上具有重要的作用^[12]。

一般说来,检测外源基因是否转化成功,首先对报告基因进行检测,必要时再进行目的基因的检测,检测目的基因需要采取分子杂交方法。检测报告基因可以简单的生化或免疫学方法。

近年来,生物技术发展迅速,转基因植物尤其是转基因作物日益增多,其检测方面的研究也相应取得长足进展,但仍不能满足检测和监测的需要。目前,转基因植物的检测方法主要有两大类,一是外源基因整合的检测,主要有PCR法、

Southern杂交(包括基因芯片)法;一是外源基因表达的检测,即外源基因转录的检测,主要有Northern杂交和 RT-PCR检测;以及外源基因表达蛋白的检测。主要有ELISA法(包括试纸条检测), Western杂交及生物学活性检测^[44-45]。

2.7.1 蛋白质检测

将外源结构基因表达的蛋白质制备出抗血清,根据抗原抗体特异性结合的原理,由是否产生特殊反应来判断是否含有此蛋白^[46-49]。

(1) ELISA检测

ELISA 为酶联免疫吸附法(enzyme-linked immuno sorbent assay) 的简称,是抗原抗体的免疫反应和酶的高效催化反应有机的结合,有两个特点:一是抗原抗体免疫反应在固体表面进行;二是用酶作为标记物进行蛋白质测定。转基因作物表达的蛋白的抗体与被检测样品中的转基因蛋白结合,再结合酶标抗体或酶标抗抗体,加入底物后通过酶促反应形成有色物质,根据颜色的深浅或酶联仪检测的结果判断是否为阳性。ELISA 方法有直接法、间接法和双抗夹心法, 使用较多的是双抗夹心法, 其灵敏度最高。一般地, ELISA 为定性检测,但若做出已知转基因成分浓度与OD值的标准曲线,也可根据标准曲线由未知样品的OD 值来确定此样品转基因成分的含量, 达到半定量测定。

ELISA 具备了酶反应的高灵敏度和抗原抗体反应的特异性,具有简便、快速,费用低等特点。但易出现本底过高的问题,缺乏标准化,使用同一方法,若在操作方法上出现的某些差异,如保温时间的长短,洗涤方法不同等都会引起实验效果的不同。只能检测未加工产品,而且只能检测有限种类的转基因生物。直接法和双抗夹心法都要制备特异的酶标抗体,制备方法较繁琐,且一种酶标抗体只能检测一种蛋白,而适用于间接法的酶标抗抗体已有商品出售。一种转基因蛋白的检测试剂盒是否能在表达相同外源蛋白的不同植物之间通用还要进行试验^[50]。

(2) 试纸条检测

与ELISA 相比,试纸条检测蛋白也是根据抗原抗体特异性结合的原理,不同之处之一是以硝化纤维代替聚苯乙烯反应板为固相载体。对外源蛋白特异结合的抗体上联结了显色剂,被固定在试纸条内,当试纸条一端被放入含有外源蛋白的植物组织提取液中,另一端吸水垫的毛细管作用使提取液向上流动, 当特异抗

体与外源蛋白相结合时, 呈现颜色反应。试纸条上含有2个“捕获”区域: 1 个“捕获”结合外源蛋白的抗体蛋白复合物, 另1个“捕获”显色剂。当所形成的夹心复合物及未反应的显色剂被试纸条上的相应“捕获”区捕获时, 这些捕获区显红色区带。当在试纸条上只显示1 条区带(质控线)时, 为阴性结果, 表明不含有被检测的转基因蛋白, 而当显示2条带时则为阳性结果时则表明含有被检测的转基因蛋白。

试纸条方法是一种快速简便的定性检测方法, 将试纸条放在待测样品抽提物中, 5~10min 就可得出结果, 不需要特殊仪器和熟练技能。但一种试纸条只能检测一种蛋白质, 且只能检测有无存在外源蛋白而不能区分具体的转基因品种。

在基因工程研究中, 总是要检测外源基因是否能表达, 即转录的mRNA 能否翻译出特异蛋白质, 外源基因表达产物若是酶, 可测定该酶活性, 若表达产物不具酶活性, 就要采用免疫学方法检测, 一般采用Western杂交。转化的外源基因正常表达时, 转基因植株细胞中含有一定量的目的蛋白。从植物细胞中提取总蛋白, 将蛋白质样品溶解于含去污剂和还原剂的溶液中, 经SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳使蛋白质按分子大小分离, 将分离的各蛋白质条带原位转移到固相膜(硝酸纤维素膜或尼龙膜)上, 膜在高浓度的蛋白质(如牛血清白蛋白) 溶液中温浴, 以封闭非特异性位点。随后步骤同ELISA 间接法, 即加入目的蛋白的特异性抗体(一抗), 印迹上的目的蛋白(抗原)与一抗结合后, 再加入能与一抗专一结合的酶标记二抗, 最后通过二抗上标记化合物的性质进行检出。根据检出结果, 可得知被检植物细胞内目的蛋白表达与否、浓度大小、及大致的分子量。程英豪等^[51]以黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV) 外壳蛋白(Coatprotein, CP) 单克隆抗体, 采用Western杂交检测转CMV CP基因的番茄中外源基因的表达情况, 结果表明, 在16株具有PCR扩增产物的转基因植株中有11 株表达出CMV CP。

Western 杂交是植物基因工程中检测外源基因是否表达出蛋白质的权威方法, 将蛋白质的电泳、印迹、免疫测定融为一体, 具有很高的灵敏性, 可以从植物细胞总蛋白中检出50ng 的特异蛋白质, 若是提纯的蛋白质, 可检出1- 5ng。但其操作较繁琐, 费用较高, 不适于口岸快速、大量样品的检测。植物病毒检测方法之一为斑点免疫吸附法, 与Western杂交相比所不同的只是蛋白质样品不经过凝胶电泳, 而是直接点在膜上, 此方法很适合于大量样品的检测, 是否也适用

于转基因产品蛋白质的检测有待试验^[45]。

(3) 免疫PCR

ELISA是以酶反应检测抗原抗体反应,而免疫PCR(聚合酶链式反应, Polymerase Chain Reaction)是用PCR 检测免疫学反应。PCR循环反应使极少量的DNA 的特定片断,在短短几小时内扩增上百万倍。免疫PCR是将一段已知序列的DNA 片段标记到抗原抗体复合物上,再用PCR方法将这段DNA扩增,然后用常规方法检测PCR产物,特异性PCR产物的存在表明有该DNA片段标记的抗体所针对的特异性抗原存在。因此免疫PCR即为DNA标记免疫测定技术。由于PCR 具有强大的扩增能力,因此比常规的免疫学方法,如ELISA的灵敏度提高好几个数量级。

免疫PCR 技术尚处于科研阶段,目前还没有商品试剂盒供应。但免疫PCR 在信号测定上无需特殊的仪器设备,且检测灵敏度高,随着基因扩增技术的发展和标准化,免疫PCR技术在各领域的应用将成为现实。

2.7.2 DNA检测

蛋白质检测对于含不表达的、或表达量低得不可测的目的基因的转基因产品以及深加工产品无法检测,而DNA 检测适用的范围要相对广得多,其准确性也高些,故口岸的实际检测中经常采用DNA 检测,包括定性检测和定量检测PCR 是一种DNA 体外扩增技术,其特异性是有人工合成的引物决定的。利用PCR 检测整合在植株基因组中的外源基因时要以被检植株DNA为模板,以外源基因5' 序列及3' 端互补序列为引物进行扩增,然后用琼脂糖凝胶电泳分离扩增产物,若可得到特异性的扩增条带,则表明被检植株基因组DNA 中含有外源基因,否则即为阴性结果。植物基因工程中多以PCR检测外源目的基因来判断被转化的基因是否整合到植物基因组中,而口岸检测一般是用PCR 检测转基因产品中普遍存在的启动子、终止子、标记基因等。

PCR是一种快速、灵敏的检测方法,用于转基因的检测时,要求引物特异性高,必要时应设计一对分析内源性基因组DNA 的引物作阳性对照,以监测体系的可靠性。定性PCR 能检测所有种类GMO,且能检测深加工产品。但成本高,要求待分析的基因组DNA 样品尽可能纯化,否则会干扰本反应,降低检测的灵敏度和重复性。用于大批量检测时,费用较昂贵,需要昂贵的仪器,易受实验环境人员素质、试剂质量等影响,从而影响了该方法的特异性、灵敏性。

(1) 复合PCR

近年来, 复合PCR (Multiplex PCR, MPCR) 技术得到了较广泛的应用, 在细菌检测、病毒检测中应用已有报道。MPCR 即是在同一反应管中含有一对以上引物, 可以同时针对几个靶序列进行检测的PCR技术, 模板可以为单一的也可以是几种不同的。各类PCR 成功的关键在于设计出合适的引物。引物长度相同, GC 碱基含量相同, 而且G和C碱基在引物序列中分布相近, 最适退火温度就会非常接近, 它们的反应条件应该是相近的。引物浓度也是M PCR 成功的关键参数, 只有调整好各引物的浓度, 才能使各扩增片段能同时得到均一的扩增。在进行M PCR 时, 各片段的扩增条件不一样时, 根据MPCR反应总是以较小片段优先扩增的原则进行, 因此在选择扩增条件时尽量选择有利于较大片段的扩增条件。在优化MPCR 反应条件时, 如果要优化的因素较多, 可考虑采用正交设计法筛选出最佳组合。正交设计法在农业上已较常用, 当完全组合的数目众多时, 按一套编好的正交表, 选出代表性很强的少数几个条件做试验, 找出较好的条件。这种方法与按常规组合来安排试验的方法相比, 大大减少试验组数, 缩短试验时间。

MPCR是针对多个靶位点进行同时检测, 其检测结果较之普通PCR 更为可信。MPCR在一个反应体系中同时检测多个片段, 简化了手续, 节约了昂贵的试剂。在口岸检测中, 应加强开展MPCR在转基因产品检测中的应用研究, 并实现方法的标准化^[52]。

(2) PCR-ELISA

传统的PCR 产物分析手段为琼脂糖凝胶电泳法, 它只能粗略判断产物的大小, 并不能鉴别产物特异性, 因此造成了传统PCR检测易产生非特异性, 假阳性多等缺点。新近发展起来的PCR-ELISA是用免疫学方法检测PCR产物, 将PCR的高效性和ELISA 的高特异性结合在一起的方法, 比常规用电泳方法检测PCR 产物要准确、简便、省时, 可同时处理大量样品, 便于自动化。

PCR-ELISA和传统PCR相比, 增加了一个杂交检测步骤, 通过特异寡核苷酸探针和PCR 产物杂交来检测PCR 产物的特异性, 用酶联反应来放大信号, 从而提高了检测的准确性和灵敏度及可机械操作程度, 和传统的PCR、ELISA 相比灵敏度大大提高了。PCR-ELISA 所需仪器简单, 易于操作, 杂交检测可自动化, 适于大批样品检测。包被管可长时间保存, 用时不需临时包被, 是适合推广的一种转基

因产品检测方法^[53]。

(3) PCR-GeneScan

GeneScan是一种用途广泛的DNA 片段分析技术,是将荧光标记的DNA 片段,如PCR 产物,在DNA遗传分析仪上进行大小、数量分析检测的过程,也即PCR 扩增反应后,用GeneScan扫描替代琼脂糖凝胶电泳来检测PCR产物。PCR- GeneScan和传统的PCR 相比,是在正常PCR反应体系中加入荧光标记的单核苷酸进行扩增,扩增产物带有了荧光标记。覃文等^[26]用此方法检测转基因大豆和转基因玉米中的CaMV 35S 启动子、NOS 终止子和抗除草剂(草甘磷) 和抗虫(*Bt*) 4种转基因成分。结果显示,本方法比传统的PCR-琼脂糖凝胶电泳法灵敏度高,重现性好,结果易判断,为分析检测转基因产品提供了一个实用、灵敏的方法^[54]。

(4) 荧光定量PCR

荧光定量PCR 用产生荧光信号的指示剂显示扩增产物的量,通过荧光燃料嵌入双链DNA,或双重标记的序列特异性荧光探针或能量信号转移探针等方法获得荧光信号,大大地提高了检测的灵敏度、特异性和精确性,动态实时连续荧光检测免除了标本和产物的污染,且无复杂的产物后续处理过程,高效、快速,对未加工、加工和混合的样品都可检测。缺点是需要购买价格昂贵的专门仪器,较难推广。

ELISA、PCR-ELISA等方法只能达到半定量的目的,但许多国家对转基因产品实行的标识制度都规定了转基因成分含量的上限,如欧盟是1%,日本和韩国为5%,就必须对转基因产品进行定量测定。定量PCR按其出现先后可分为以下几种:① 终点稀释法,属非竞争性外参照定量PCR方法;② 竞争性定量PCR;③ 荧光定量PCR^[55]。

(5) Southern 杂交

核酸杂交技术是用一已知DNA 或RNA 片段(探针) 来检测样品中未知核苷酸顺序,外源基因同探针同源,凡含有外源基因序列的片段都可以发生杂交,形成带标记的特异性杂交体,最后根据探针的标记性质进行检测。Southern杂交具有灵敏性高(可检出10—12g,即1pgDNA样品),特异性强(可鉴别出20个碱基对左右的同源序列) 特点,是当前鉴定外源基因整合的权威方法。

核酸分子杂交的具体方法有多种。印迹杂交是一种将核酸凝胶电泳、印迹技术、分子杂交融为一体的方法。被检的DNA分子用特定的限制内切酶消化成若干片段,经琼脂糖凝胶电泳分离后原位转移到固相膜(硝酸纤维素膜或尼龙膜)上,后与探针杂交。当外源基因与内源基因组DNA有较高同源性时,仍可选用此方法,但此方法对样品的质量和纯度要求较高,操作烦琐,费用也较高。未经纯化的样品杂交效果不理想,另外需要的样品量较大(5-15LgDNA)。在待测样品比较少或样品中转基因成分含量低时可利用PCR-Southern 杂交。Southern 杂交有时也用来验证PCR 产物的非假阳性。斑点杂交是将核酸样品直接点到膜上,而不经酶消化、电泳及印迹过程。若把被检样品稀释成不同浓度,点在同一张膜上,同时杂交,通过比较杂交斑点的大小和深浅,可以获得半定量的结果。当目的基因与内源基因组DNA 无同源性时可用斑点杂交。Southern 点杂交对样品纯度要求低,快速、简便、经济,尤其对于大批样品的粗筛颇具优越性,应作为首选方法,缺点是易出现假阳性。

(6) 基因芯片

基因芯片原理最初是由核酸的分子杂交衍生而来的,即应用已知序列的核酸探针对未知序列的核酸序列进行杂交检测。DNA 芯片是利用原位合成法或将已合成好的一系列寡核苷酸以预先设定的排列方式固定在固相支持介质表面(硅片、玻片、尼龙膜等),形成高密度的寡核苷酸(ODNs)的阵列,样品与探针杂交后,由特殊的装置检出信号,并由计算机进行分析、综合。国内外一些公司(如百奥生物信息科技有限公司)已生产了转基因产品检测基因芯片,用于检测转基因工程中常用的启动子、终止子、筛选基因、报告基因以及常见的目标基因(如抗虫、耐除草剂基因)。利用芯片技术,具有所需样品的用量极少,自动化程度高,被测目标DNA 密度高的优点,但目前基因芯片在实际检测中应用并不普遍,主要受一些因素的限制,如需要昂贵的检测杂交微弱信号的装置,芯片的制作成本高则使用的成本也较高,需要具有对杂交信号及相关信息、数据的大规模处理和分析的能力^[44]。

3 材料和方法

3.1 供试材料及来源

(1) 红麻材料：福建农林大学育成的高产、优质、抗逆红麻优良新品种福红2号，福红951，福红952，福红952-2，991，992等品种为受体材料。

(2) *Bt*质粒：带有*Bt*基因的pCambia3300质粒由复旦大学生命科学学院遗传工程重点实验室构建并提供。

(3) 酶和PCR引物：购自上海生工生物工程技术有限公司。

PCR引物：BTF: 5'-ATG GAC AAC AAC CCA AAC ATC-3'

BTR: 5'-TAG AAT CAG GAC CCC AGA CAC-3'

地高辛试剂盒 DIG DNA Labeling Kit (Roche)进行 DIG-dUTP标记

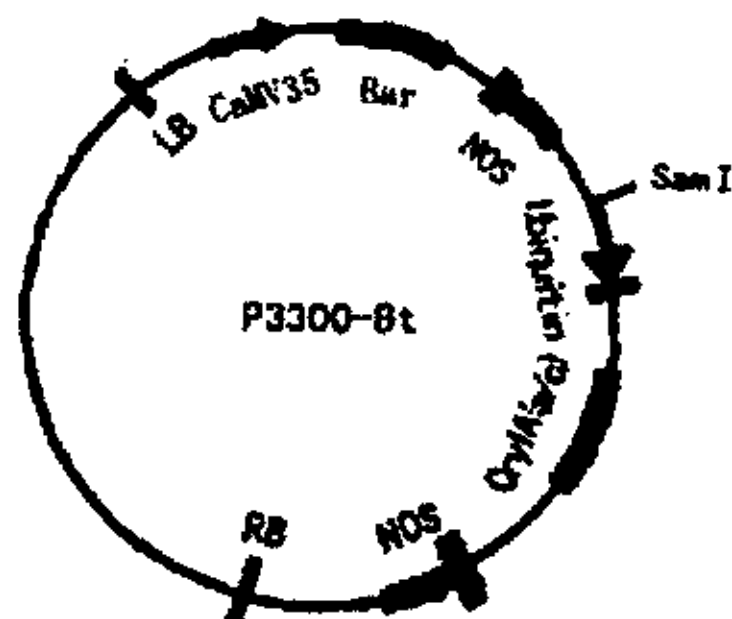


图 1 供试质粒图谱

Fig 1 p3300-Bt plasmid

3.2 方法

3.2.1 质粒提取所需药品

LB培养基(1L)

胰蛋白胨 10 g

酵母提取液 5 g

NaCl 10g

注：配制1L培养基需加950ml蒸馏水，加上述3种药品，摇动容器至溶质完全溶解。

用5 mol / L NaOH调pH到7.0，加入蒸馏水至1L，121.3℃高压蒸汽灭菌20min。

STE:

0.1 mol/L NaCl

10 mmol/L Tris·HCl(pH 8.0)

1 mmol/L EDTA

溶液 I:

50mmol/L 葡萄糖

50mmol/L Tris·HCl (pH 8.0)

10mmol/L EDTA

溶液 II:

0.2 mol/L NaOH

1% SDS

注: 溶液 II 需新鲜配置

溶液 III:

5 mol/L KAc 60ml

冰醋酸 11.5ml

水 28.5ml

TE: (pH 8.0)

10 mmol/L Tris·HCl(pH 8.0)

1 mmol/L EDTA

氯仿/异戊醇: 24: 1

无水乙醇

RNaseA

3.2.2 质粒 DNA 的小量制备操作步骤^[58-59]

- 1) 将细菌沉淀悬浮于 100 冰预冷的溶液 I 中, 强烈振荡混匀;
- 2) 加入 200 μ l 溶液 II, 盖紧管盖颠倒 1.5ml 离心管 5 次以混合内容物, 轻轻振荡, 放置冰上 4min (根据不同菌株可适当缩短);
- 3) 加入 150 μ l 溶液 III, 可以将管盖朝下温和振荡 10min, 于冰上放置 3~5min;
- 4) 12000r/min, 4℃下离心 5min, 取上清液移至另一个 1.5ml 离心管中;

- 5) 加入等体积的氯仿/异戊醇 (24:1), 振荡混匀, 12000r/min, 4℃下离心 2min, 取上清液移至另一个 1.5ml 离心管中;
- 6) 加入 2 倍体积的乙醇室温 (18-20℃) 振荡混匀, 室温下放置 5min, 不要在 -20℃ 沉淀, 否则有过多的盐析出;
- 7) 12000r/min, 4℃下离心 5min;
- 8) 弃上清液, 加入 1 ml 70% 4℃乙醇振荡漂洗沉淀, 12000r/min, 4℃下离心 3min;
- 9) 弃上清液, 用消毒的滤纸条小心吸净管壁上的乙醇, 将管倒置放在滤纸上, 室温蒸发痕量的乙醇 10-15min, 或者真空抽干乙醇 2min;
- 10) 加入 50μl 的 TE (pH 8.0) (含无 DNA 酶的 RNaseA 20μg/ml), 65℃水浴 1h 溶解 DNA, 短暂振荡后可进行内切酶酶切实验或者 -20℃贮存。

3.2.3 质粒 DNA 的大量制备操作步骤^[56-59]

取单菌落接种到适当的抗生素的 25ml LB 培养基中, 37℃振荡 (220r/min) 培养过夜, 直到 OD₆₀₀ 为 0.6 以上, 在取 5ml 至 10ml LB 培养基中培养至 OD₆₀₀ ≈ 0.6, 取 24ml 对数后期培养物 (OD₆₀₀ = 0.6) 接种到 500ml LB 培养基 (含抗生素卡那霉素) 中, 37℃振荡培养 2.5h 左右, 至 OD₆₀₀ ≈ 0.4, 容器最好选用 2L 的三角瓶。剩下的 1ml 细菌培养物可以快速提取质粒, 以确定菌落中质粒是否正确。

- 1) 将细菌培养物倒入 50ml 离心管中, 4000r/min, 4℃下离心 15min;
- 2) 弃上清液, 倒置离心管在滤纸上, 让培养基流净, 或者再次轻微离心后用移液枪吸出培养基;
- 3) 将细菌培养物悬浮于 100ml 冰预冷的 STE 中, 是菌体散开悬浮, 4000r/min, 4℃下离心 15min;
- 4) 将收集的菌液用 10ml 的溶液 I 中悬浮, 再移至 50ml 离心管中;
- 5) 加入 1ml 用 10 mmol/L Tris · HCl (pH 8.0) 新鲜配置的溶菌酶溶液 (10 mg/ml) 混匀;
- 6) 加入新鲜配置的溶液 II 20 ml, 盖紧管盖颠倒 1.5ml 离心管 5-7 次以混合内容物, 不要强烈振荡, 放置冰上 5min (根据不同菌株可适当缩短);
- 7) 加入 15ml 溶液 III, 可以将管盖朝下温和振荡 10min, 冰上放置 10min; 在此步中可以看到白色的沉淀物为细菌染色体 DNA、大分子量的 RNA、钾盐。

蛋白质, 细胞膜等混合物;

- 8) 12000r/min, 4℃下离心 5min, 取上清液移至另一个 1.5ml 离心管中;
- 9) 将上清液通过四层纱布过滤到另一个 50ml 的离心管中, 加入 0.6 倍体积的异丙醇混匀, 室温放置 10min;
- 10) 12000r/min, 室温下离心 10min, 4℃离心将导致大部分的盐析出混入沉淀;
- 11) 弃上清液, 加入 10ml 70%(4℃) 乙醇振荡漂洗沉淀, 12000r/min, 4℃下离心 5min;
- 12) 弃上清液, 用消毒的滤纸条小心吸净管壁上的乙醇, 将管倒置放在滤纸上, 室温蒸发痕量的乙醇 10~15min, 或者真空抽干乙醇 2min;
- 13) 加入 50 μ l 的 TE (pH 8.0) (含无 DNA 酶的 RNaseA 20 μ g/ml), 65℃水浴 1h 溶解 DNA, 短暂振荡 5min 后可进行内切酶酶切试验或者-20℃贮存备用。

3.2.4 田间实验设计

(1) *Bt* 抗虫基因导入红麻子房实验

2001年春季分别采用子房注射法和柱头滴加法进行 *Bt* 基因 (p3300-*Bt*质粒) 导入的研究。

子房注射法: 参考周光宇的方法, 子房注射法是在开花 (即授粉24小时后), 用微量注射器从幼铃顶部纵轴向下插入胎座0.5cm处, 将外源DNA注入。

柱头滴加法: 即选择受体花朵去雄套袋, 待开花时用自身株的花粉授粉, 30min后, 在每一处理的柱头滴加DNA溶液5 μ l和10 μ l, 然后套袋, 挂牌。

上述实验设定了不同的技术参数, 注入浓度分别为50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 150 μ g/ml, 200 μ g/ml; 注射剂量分别为: 5 μ l, 10 μ l, 15 μ l, 20 μ l, 同时设对照处理, 以0.1×SSC注入红麻子房和滴加到红麻柱头。

(2) 田间抗虫性鉴定

2002年在海南冬季种植红麻六个品种的外源基因导入受体, 即福红952(红), 福红951, 福红2号, 福红952(绿), 991, 992, 规划好种植用地, 同时设对照品种。2003年春季, 利用花粉管通道法将已提取制备好的含抗虫基因 (*Bt*) 导入红麻受体, 收获其 T_0 代的种子, 共有470个红麻果 (见表4)。2003年5月, 将这些 T_0

代的种子带回福建农林大学育种基地种植观察抗虫性状表现, 2003年11月选择表现抗虫特性的97份植株到海南加代繁殖, 2004年4月经海南的田间高密度虫自然鉴定和筛选, 并观察虫为害的程度, 选择了三个田间抗虫特性的红麻株系, 做好统计和记录; 将在海南抗虫性田间选择的抗性植株在福建农林大学育种基地进一步种植, 2004年6-10月, 进一步观察田间抗虫性状的表现, 以表现抗虫特性的植株进行总DNA提取作为分子鉴定。

(3) 室内虫口喂养鉴定

2004年春季对97份株系中选明显具有抗虫特性的三个株系在福建农林大学校内进行虫口喂养鉴定, 作为对田间抗虫性的验证, 即取田间叶片上的低龄幼虫, 分别以在田间表现抗虫特性的转基因品系叶片和未做抗虫转基因处理的红麻对照品种叶片做对照实验, 连续两周观察害虫喂养后产生的生理变化。

3.3 红麻总DNA提取及PCR检测

3.3.1 提取缓冲液

100mM Tris·HCl (50ml 1M Tris (PH=8.0))

1.4M NaCl (40.908g NaCl)

20mM EDTA (20ml 0.5M EDTA(PH=8.0))

加蒸馏水至 500 ml, 高压灭菌

15% CTAB

CTAB 粉末 15g

加蒸馏水至 100 ml, 高压灭菌

TE

10mM Tris·HCl(PH=8.0)

1mM EDTA (PH=8.0)

氯仿/异戊醇: 24: 1

75%乙醇

10mg/ml RNaseA

3.3.2 用 CTAB 法提取红麻总 DNA 步骤^[9, 11, 65-70]

- 1) 采集红麻苗期幼嫩叶片, 称取 6~7g; 注意叶片不能有水珠, 否则影响研磨效果;
- 2) 倒入足量的液氮一次性研磨成粉末, 迅速装入 50ml 离心管, 先加入 150~300 μ l β -巯基乙醇, 再加入 15ml 提取缓冲液混匀, 可先放入 4℃ 冰箱中, 直到研磨完所有的样品, 此步要保证研磨的叶片粉末不要融化;
- 3) 加入 2.5 ml 在 65℃ 下预热的 15%CTAB, 轻轻混匀, 在 65℃ 水浴 30min, 冷却至室温;
- 4) 加入等体积的氯仿/异戊醇 (24: 1), 温和上下颠倒离心管 20-30 次, 8000rpm 离心 10min 或者 4000rpm 离心 20min, 此步要充分离心, 否则杂质太多;
- 5) 取上清液, 转入新的离心管, 并加等体积的氯仿/异戊醇 (24: 1), 重抽提 1 次, 取上清液, 加等体积的冰冷无水乙醇, 温和颠倒 3-5 次, 直至絮状沉淀集结, 在冰上或者室温静置 0.5-1h (或在 -20℃ 冰箱中 20min, 或在 -80℃ 冰箱中 10min);
- 6) 钩出 DNA 沉淀, 转入 1.5ml 离心管中, 用 70%乙醇漂洗 2 次;
- 7) 在超净工作台吹干后加 500 μ l $T_{50}E_{10}$ (含 10mg/ml *Rasa*), 65℃ 水浴溶解 20min(或过夜);
- 8) 加等体积的氯仿/异戊醇 (24: 1), 温和上下颠倒离心管 30-50 次, 4℃, 12000rpm, 10min, 取上清液, 加 2 倍体积的冰冷无水乙醇, 静置 5min, 沉淀 DNA; 4℃, 8000rpm, 5min, 弃上清液;

用 70%乙醇漂洗 DNA 沉淀 2-3 次, 超净工作台风干, 溶于 TE 中, 于 -20℃ 冰箱中保存。

3.3.3 转基因红麻 PCR 检测^[71]

以四个世代的基因组 DNA 为模板, 将带有 *Bt* 基因的 pCambia3300 质粒为对照, 基因的引物 PCR 引物: BTF: 5' -ATG GAC AAC AAC CCA AAC ATC-3'

BTR: 5' -TAG AAT CAG GAC CCC AGA CAC-3'

PCR 扩增目的条带反应条件: 95℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 1min, 55℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 2min30s, 循环 35 次; 72℃ 继续延伸 10 分钟。扩增结果用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 于凝胶成像系统拍照。

3.3.4 转基因红麻 ISSR 检测^[61-64]

(1) 药品配置

PCR 扩增 10×PCR Buffer(Mg²⁺):

100mM Tris•HCl(PH=8.0)	10ml	1M Tris•HCl(PH8.0)
500mM KCl	3.7275g	KCl
15mM MgCl	0.30495g	MgCl
0.8% NonidetP40	0.8ml	NonidetP40

加双蒸水至 100 ml, 高压灭菌

(2) **ISSR 实验程序:** 由于 ISSR 引物长度一般在 15-24bp, 反应退火温度高, 引物-模板复合物比较稳定, 扩增时很少出现由于随机因素造成反应不稳定的情况。

(3) ISSR 反应体系

在冰上建立 PCR 反应体系:

10×Buffer(Mg ²⁺)	2.5μl
Dntp	0.375μl
ISSR 引物	3μl
Taq 酶	0.3μl
模板 DNA	4μl
ddH ₂ O	14.825μl

反应体积为 25μl, 反应混合物加 30μl 石蜡油覆盖, 以防止反应过程中液体蒸发。其中 ISSR 引物为 825: 5', -ACA CAC ACA CAC ACA CT-3'。

(4) ISSR 反应程序

反应程序为: 94℃预变性 5min; 94℃变性 45s, 54℃退火 1 min30 s, 72℃延伸 1 min30 s, 41 个循环; 72℃延伸 7 min。

(5) 聚丙烯酰胺电泳检测

30% 聚丙烯酰胺 5.4ml (290 克丙烯酰胺+15 克双丙烯酰胺, 695ml 水)

1×TBE 21.4ml

10%过硫酸铵 200 μl

TEMED 14-20μl

总体积 27ml

(6) 操作步骤

可采用玻璃棒引流, 插入梳子, 用夹子夹紧。大约 1 小时后可以上样, 采用的是 40%蔗糖的上样缓冲液。电泳缓冲液为 $1\times$ TBE, 电泳电压 300V, 时间 2.5 小时。电泳结束后, 取下胶筐, 去掉琼脂糖, 从底部缝隙处敲开玻璃板, 用刀片沿打磨玻璃条划一次, 反转后, 在底角处将凝胶剥离, 利用自身重力从玻板上分离。同时注意保留记号, 以便区分。

银染: (一次可 3-4 块胶)

固定: 在小盘中 (略微大于胶的面积), 加 10%的酒精 100ml, 再加 $500\mu\text{l}$ 的冰醋酸。摇匀, 加入凝胶, 摇动, 3-5min;

染色: 加入 1ml 的 20%硝酸银, 摇动, 5-8min

洗涤: 倒去废液, 蒸馏水清洗 2-3 次, 约 1min (时间过长, 带淡而不清晰, 过短, 可能背景深)

显影: 加入 100ml 3%的氢氧化钠和 $500\mu\text{l}$ 甲醛, 震荡, 平行摇动至条带清晰。洗涤: 自来水冲洗。

注意事项:

(1) 丙烯酰胺为粉剂, 具有神经性毒性, 称量时要防止吸入, 同时可通过皮肤吸收。(2) 硝酸银和皮肤接触后会形成黑点, 使用时要注意防止污染天平, 工作台, 衣服, 皮肤等。(3) 过硫酸铵最好为新鲜的, 不宜超过两星期, 否则条带分散, 不清晰。

3.4 转基因红麻的 Southern 杂交

提取并纯化经 PCR 检测为阳性的转基因红麻的基因组, 经 *EcoR* I 酶切后琼脂糖电泳, 用 DNA 变性条件处理后固定于膜上, 按 J. 萨姆布鲁克等 ([73-77]) 的方法进行预杂交、杂交、漂洗。酶切产物以电压 5V/cm 经 1.0%琼脂糖凝胶电泳分离, 溴酚蓝到达琼脂糖凝胶前沿 1cm 处停止电泳。然后用常规方法在摇床上处理电泳胶: 变性液 (1.5mol/L NaCl , 0.5mol/L NaOH) 变性 40min, 去离子水冲洗两遍, 中和液 (1.5mol/L NaCl , 0.5mol/L Tris-HCl) pH7.5) 中和 40min, 去离子水冲洗两遍, 最后毛细管转膜法利用 $20\times$ SSC 将 DNA 印迹到 HybondN+尼龙膜上, 转膜 10-12h 后将膜在 $6\times$ SSC 中浸泡 5min, 超净工作台吹干, 80°C 胶联 2h^[73-77]。

杂交与检测按DIG Luminescent Detection Kit (Roche) 进行。Bt探针取自引物组合: BTF: 5' -ATG GAC AAC AAC CCA AAC ATC-3' , BTR: 5-TAG AAT CAG GAC CCC AGA CAC-3。检测转基因红麻, 获得680bp片段回收, 按照DIG DNA Labeling Kit (Roche) 进行DIG-dUTP标记。

4 结果与分析

4.1 质粒提取结果与分析

4.1.1 紫外检测

少量提取的质粒经过纯化后纯度可达到 OD_{260}/OD_{280} 为 1.80~1.85, 如图 2, 获得的高纯度的超螺旋质粒 DNA, 在大量抽提的质粒中可以获得大量的高纯度的质粒 DNA。

4.1.2 琼脂糖电泳检测

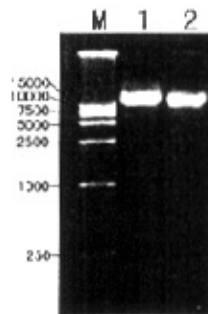


图 2 质粒 DNA 琼脂糖检测图片

Fig 2 Plasmid DNA detection in agarose

从图 2 可以看出, 所提取的质粒 DNA 条带清晰, 可以很好的去除杂质 RNA, 而没有造成闭环双螺旋 DNA 的破坏。

采用碱裂解法制备质粒应注意的以下几个问题

- (1) 为了保证提取质粒的质量和数量, 在加入溶液 II 后, 严格控制细菌的裂解时间, 裂解时间过短大部分质粒 DNA 不能从细胞中释放出来; 如果裂解时间过长, 会导致超螺旋质粒 DNA 完全变性, 形成开环, 或形成线性形式;
- (2) 在裂解过程中搅拌条件也会影响质粒的产量和纯度, 搅拌促使细胞裂解液混合均匀, 同时又有助 NaOH 扩散, 这样可以阻止缠绕超螺旋 DNA 聚合, 但是过度搅拌则可以导致超螺旋 DNA 断裂为开环或线性形式^[6];
- (3) 在无菌条件下挑取琼脂培养基上的单菌落, 移至 2~5ml, 含适当抗生素的 LB 培养液中, 37℃培养 8~10h 为最合适;
- (4) 取 1.5ml 培养液至离心管 12000r/min 离心 30s, 离心机启动时间不应计算在

- 此 30s 内；大量提取的时候在第 4)， 8)， 10)， 11) 中可以将转速降低到 10000r/min，这样可以减少离心力对质粒超螺旋的破坏；
- (5) 弃上清液，要使菌体和管壁上不残留液体。旨在去除细菌生长过程中代谢废物和脱落的细胞壁，否则会影响质粒的质量和内切酶酶切效果；可以采用轻微再次离心（如 2000r/min，1min）后用吸管吸出上清液；
- (6) 溶液 I、III 在使用前要预冷；溶液 II 现用现配，加溶液 II 后，上下颠倒 4~6 次混匀。不要震荡，以溶液清亮、不混浊为最好，若溶液混浊，则说明菌体裂解不充分；
- (7) 溶液 III 最好现用现配，以防止冰乙酸挥发；
- (8) 加溶液 III 后，冰上放置 10~15 min，4℃离心，上清液用等体积的酚 / 氯仿抽提，注意吸上清液时要留一定的界面，如不经此步抽提，残留的 SDS 等杂质影响电泳及酶切效果；
- (9) 无水乙醇沉淀 DNA 及 70%乙醇洗涤 DNA 后，都要将管壁上的液体除净。使乙醇挥发完全，特别要待到 DNA 沉淀表面干燥后才可溶于 TE 中。

4.2 DNA 提取结果与鉴定

4.2.1 紫外线检测

采用 DNA 紫外分光光度计对 6 个红麻供试样品进行检测，结果见表 1。

表 1 红麻总 DNA 紫外分光光度检测

样品编号	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	浓度 (ng/μl)	产率 (μg)
1	1.96	160	80.0
2	1.93	211	105.5
3	2.09	185	93.5
4	1.95	123	61.5
5	2.03	176	88.0
6	1.82	185	92.5
平均	1.96	173	86.5

4.2.2 凝胶电泳检测

用 1%琼脂糖凝胶电泳检测所提取的红麻总 DNA，其电泳检测结果见图 3。

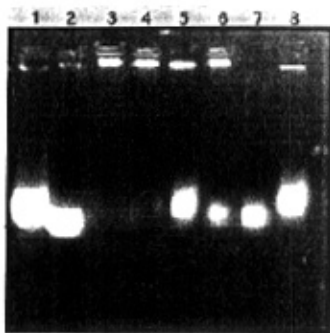


图 3 红麻总 DNA 琼脂糖电泳检测图

Fig 3 Kenaf DNA abstraction detected by agarose electrophoresis

注：1~2：1.5% CTAB；3~4：2.5%CTAB（经 RNaseA 消化）；5~6：2.5%CTAB；7~8：4%CTAB；

植物细胞具有细胞壁，植物总DNA 提取时如何使植物细胞壁有效破碎的同时尽量保持DNA 的完整性，是提取的重要一环。许多细胞破碎的方法都会引起DNA 严重的机械断裂，因而植物DNA提取时很难在质量(长度) 及产量之间都达到满意的结果。在加入蛋白酶的同时加入 β -巯基乙醇可使细胞壁破裂的效果更好^[70]。为达到理想的结果，还需要注意以下几个操作环节的控制：

- ① 样品研磨成粉后，在加入提取缓冲液前必须保持其冷冻状态，如果融化，内源DNase 会引起DNA 的降解，严重影响提取效果。防止DNA 降解要从两个方面努力，因DNA 降解主要来自提取过程中的物理因素及DNase 活性。
- ② 物理因素主要是机械剪切力，溶液在震荡、搅拌、转移、反复冻融、渗透压骤变及细胞急剧破裂内容物外泄时都会产生强的机械剪切力，因而提取时的各种操作均应温和地进行，避免剧烈震荡。
- ③ 转移DNA 溶液的枪头要剪去尖部，扩宽管口，吸取过程中避免产生气泡，不可用反复吸打的方法助溶DNA 沉淀等。应避免重复的冻融步骤。
- ④ 为防止DNase 的降解作用，提取时使用的器具、研钵、离心管、溶液乃至植物材料等都要清洁，溶液及用品要经过高温高压灭菌。由于DNase 以 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 二价离子为激活剂，所以在提取液中需加入二价离子螯合剂EDTA来消除外源及内源的酶活性^[15, 66]。

⑤ 离心时间和速度：一般4000r/min，室温离心20min，如果转速不够或者时间过短，将会产生过多的杂质，如叶绿素，杂蛋白质等其他大分子，如果离心温度过低会导致CTAB沉淀。

⑥ 乙醇沉淀DNA。最好用预冷的无水乙醇沉淀，用乙醇沉淀DNA时，室温下只能有选择地沉淀大分子量DNA，因此如果DNA得率足够的情况下，可以用预冷的乙醇在室温下沉淀。另外，异丙醇不易挥发，因而最好用70%的乙醇多洗几次^[9, 12, 65]。有些盐由于在异丙醇中的溶解度较低而同DNA一起沉淀下来，这时应用70%乙醇多洗几遍。如果可能，尽量用玻棒把DNA沉淀搅出来。实验中我们发现，用玻棒钩出的DNA比用离心的方法沉淀出的DNA，无论是在纯度还是在DNA得率方面都具有明显的优势。

⑦ 在磨的过程中不要加PVP，因为以 β -巯基乙醇作为抗氧化剂，加入的PVP会影响研磨效果。

⑧ 将DNA-CTAB沉淀及DNA用离心的方法分离出来时，注意离心强度不要太强，否则沉淀过分压缩，这种沉淀极难重新溶解。最后干燥除去乙醇时，时间不要太长，否则DNA难溶于TE。

4.3 田间实验结果与分析

4.3.1 不同浓度抗虫基因质粒导入六个红麻受体品种的效果统计

用4种不同浓度、3种不同剂量分别处理6个红麻品种，其处理花数、结实率，种子数量、出苗率及所获得的少虫口数比率如表2、表3、表4所示。

从表2、表3、表4可以看出（见下页），采用柱头滴加法和子房注射法两种不同的转基因方法进行转基因的效果有差异。其中少虫口是指转基因后代田间观察虫口很少或没有虫口的植株。总共处理了470朵花，获得295个红麻蒴果，采用柱头滴加法和子房注射法得到的处理当代结实率分别是68.8%和51.7%，后代少虫口分别为7.2%和24.5%，从中可以看出，虽然柱头滴加法对红麻的结实影响较小，但是后代的少虫口却明显比子房注射法少。其中Bt-Z-50-10、Bt-Z-50-15、Bt-D-100-10、Bt-D-150-15四种处理方法和剂量获得较好的红麻后代少虫口率。除了自然的因素外，可以初步判断采用子房注射法进行花粉管通道法转化比柱头滴加法效果更好。

表 2 用柱头滴加法将不同浓度抗虫基因质粒导入红麻受体效果统计表

Table 2 The statistical table of adding different concentrations of plasmid DNA to kenaf by stigma addition

处理	处理花数 (个)	结实数 (个)	结实率 (%)	种子数 (粒)	出苗数 (株)	出苗率 (%)	少虫口 (%)
Bt-D-50-5	20	12	80	207	76	37	2.63
Bt-D-50-10	20	18	90	282	81	29	3.0
Bt-D-50-15	20	9	45	214	18	8	0
Bt-D-100-5	20	15	75	158	3	2	3.33
Bt-D-100-10	20	11	55	212	28	13	17.86
Bt-D-100-15	20	12	60	254	87	34	1.15
Bt-D-150-5	30	17	57	219	26	12	3.85
Bt-D-150-10	25	21	84	364	69	20	1.30
Bt-D-150-15	25	20	80	260	88	34	22.73
Bt-D-200-5	20	18	90	223	4	2	0
Bt-D-200-10	20	15	75	244	29	12	20.69
Bt-D-200-15	20	17	35	112	19	17	10.53
总计	260	185	68.8	2749	1198	18.3	7.2

注：表中 Bt-D-50-15：表示柱头滴加法，Bt 质粒浓度为 50 μ g/ml，注射剂量为：15 μ l

表 3 用子房注射法将不同浓度抗虫基因质粒导入红麻受体效果统计表

Table 3 The statistical table of adding different concentrations of plasmid DNA to kenaf by ovary injection

处理	处理花数 (个)	结实数 (个)	结实率 (%)	种子数 (粒)	出苗数 (株)	出苗率 (%)	少虫口 (%)
Bt-Z-50-10	20	8	40	151	31	20	29.03
Bt-Z-50-15	15	7	47	64	22	34	36.36
Bt-Z-50-20	15	7	48	102	24	23	20.83
Bt-Z-50-25	15	6	40	92	33	36	18.18
Bt-Z-100-5	20	11	55	180	10	6	10
Bt-Z-100-10	20	9	45	141	34	24	0
Bt-Z-100-15	20	0	0	0	0	0	0
Bt-Z-150-5	20	15	75	225	19	8	10.53
Bt-Z-150-10	25	16	64	259	50	19	20
Bt-Z-200-5	20	17	85	236	3	1	100
Bt-Z-200-10	20	14	70	256	40	16	25
总计	210	110	51.7	1706	266	17%	24.5

注：表中 Bt-Z-50-15：表示子房注射法，质粒浓度为 50 μ g/ml，注射剂量为：15 μ l

表 4 两种处理方法综合统计表

Fig 4 The statistical table of two dealing methods

处理 Bt	处理花数 (个)	结实数 (个)	结实率 (%)	种子数 (粒)	出苗数 (株)	出苗率 (%)	少虫口 (%)
总计	470	295	66.6	4452	1464	17.7	15.9

在所转化的六个受体红麻品种的 T_1 群体中,筛选较少虫口的红麻单株收获种子,共选育了 97 较为抗虫的株系(不同处理方法和六个不同品种的单株后代的种子),即 T_2 代带到海南加代繁育,种植成株系,选择到具有明显抗性的三个株系(都为红麻品种福红 952),自然选择效率约为 3% (97 个株系后代有 3 个抗性株系),经过 PCR 分子检测得知,这三个株系含有目的基因的后代,转化效率约为 0.48% (如表 4 中少虫口率乘以 3% 可得转化率约为 0.48%)。

4.3.2 抗虫转基因室内鉴定

进一步确定转基因后代抗虫效率及其遗传稳定性,将海南加代繁育的 T_2 代三个株系带到福建继续加代种植。采用室内虫口喂养鉴定,即在虫害高峰期的 7-9 月份由田里抓虫喂养,害虫主要是松毛虫和造桥虫两种,进行抗虫转基因材料和未转基因对照组的红麻叶片喂养实验,进一步鉴定抗虫效果。获得的结果如表 5 所示。

表 5 抗虫转基因株系室内喂养鉴定统计表

Fig 5 The statistical table of insect-resistant transgenic kenaf feeding insects on leaves on the culture plate

抗 虫	成 虫		幼 虫		若 虫		对 照	成 虫		幼 虫		若 虫	
	存 活	死 亡	存 活	死 亡	成 活	死 亡		存 活	死 亡	存 活	死 亡	存 活	死 亡
第 1 天	10	0	10	0	10	0	第 1 天	10	0	10	0	10	0
第 2 天	10	0	10	0	10	0	第 2 天	10	0	10	0	10	0
第 3 天	10	0	10	0	10	0	第 3 天	10	0	10	0	10	0
第 4 天	6	4	3	7	9	1	第 4 天	8	2	10	0	10	0
第 5 天	0	10	2	8	5	5	第 5 天	5	5	7	3	9	1
第 6 天	—	—	2	8	5	5	第 6 天	4	6	5	5	9	1
第 7 天	—	—	0	10	3	7	第 7 天	2	8	5	5	8	2
第 8 天	—	—	—	—	3	7	第 8 天	0	10	3	7	7	3
第 9 天	—	—	—	—	0	10	第 9 天	—	—	0	10	7	3
第 10 天	—	—	—	—	0	10	第 10 天	—	—	—	—	5	5

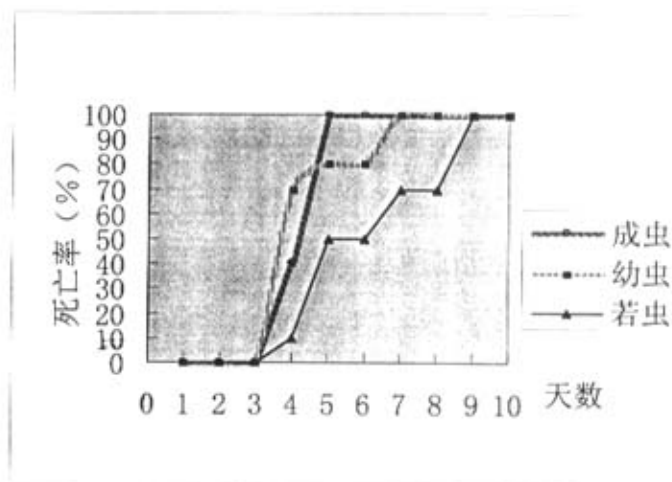


图 4-A 抗虫转基因红麻叶片室内喂养统计图

Fig 4-A Feed the insects on transgenic kenaf leaves on the culture plate

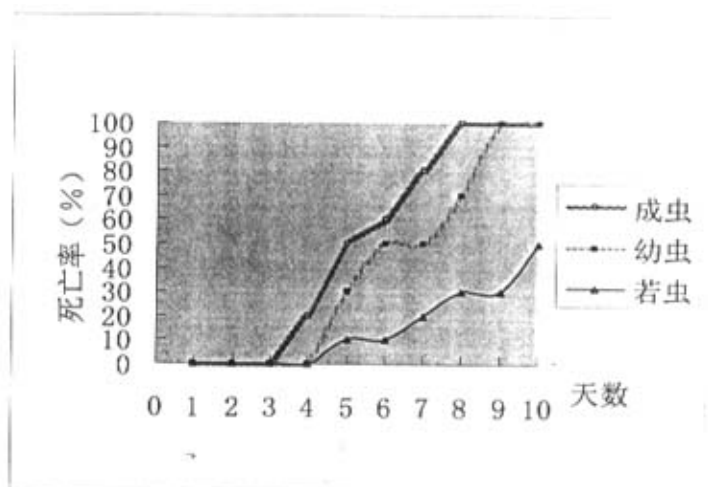


图 4-B 非抗虫转基因红麻叶片室内虫口喂养统计图

Fig 4-B Feed the insects on non transgenic kenaf leaves on the culture plate

图 4-A 和图 4-B 是对将表 5 转化为曲线图, 由这两张图可以更直观的看出抗虫转基因红麻叶片与对照在室内虫口喂养时效果比较, 害虫在吃完含有转基因的叶片后的死亡率比对照组有明显的变化。即前面三天都相同, 从第四天到第十天就有明显的变化。

4.3.3 转基因红麻的抗造桥虫室内鉴定实验

表 6 抗虫转基因室内鉴定统计表

Fig 6 The statistical table of insect-resistant kenaf detection in laboratory

抗虫组	存活数	死亡数	对照组	存活数	成虫数
第 1 天	20	0	第 1 天	20	0
第 2 天	7	13	第 2 天	18	2
第 3 天	3	17	第 3 天	15	5
第 4 天	0	20	第 4 天	13	7
第 5 天	—	—	第 5 天	10	10
第 6 天	—	—	第 6 天	10	10
第 7 天	—	—	第 7 天	9	11

(1) *Bt* 抗虫基因的作用机理：苏云金杆菌属于革兰氏阴性的孢子细菌。在芽孢形成过程中，可产生伴胞晶体，它由一种或多种蛋白组成，具有高度的特异性杀虫活性，这种蛋白通常被称为 δ -内毒素 (δ -endotoxins) 或杀虫结晶蛋白 (insecticidal crystal protein, ICP)。

ICP 通常以原毒素(protoxin)形式存在，当昆虫取食 ICP 后，在昆虫的消化道内，原毒素被活化，转型为毒性多态分子。ICP 的活化是多步骤的过程。首先，ICP 必须溶解在昆虫的肠道里。ICP 在中性条件下不溶，而在碱性条件下可溶。ICP 一经溶解在蛋白酶的作用下通过专一性蛋白酶水解切割，ICP 被活化。活化的 ICP 不被胰蛋白酶或其它蛋白酶所破坏，它能与昆虫肠道上皮细胞上面的特异性蛋白结合。大多数情况下，ICP 的毒性都来源于这种结合。结合以后的 ICP 全部或部分嵌合于细胞膜中，使细胞膜产生一些孔道，从而导致细胞由于渗透平衡被破坏而破裂。伴随着上述的过程，昆虫幼虫将停止进食，最终死亡^[12]。

(2) 实验结果分析：表 5 中实验分别设置若虫、幼虫、成虫三组，观察供试虫口死亡率，将田间具有明显抗性的福红 952 转基因红麻叶片和未转基因的红麻叶片分别喂养松毛虫等鳞翅目害虫作为比较实验，从统计数字可以看出，用转基因叶片喂养田间的害虫，在其进食后第 4 天出现中毒症状，成虫死亡率达 70%，若虫死亡率达 30%，至第 5 天，成虫死亡率达 100%，幼虫死亡率达 80%，若虫死亡率达 50%，至第 7 天，幼虫死亡率达 100%，幼虫至第 9 天，全部死亡，其死亡率可能与害虫的生长发育的不同阶段进食量有关。而对照组成虫在第 8 天全部结蛹，幼虫至第 10 天结蛹达 95%，该实验说明了害虫进食含有 *Bt* 基因的红麻叶片后，出现中毒现象，这证明了植物叶片体内表达的杀虫结晶蛋白起了作

用。

表 6 是对抗虫红麻喂养造桥虫的结果, 成虫进食后第 2 天就出现 65% 死亡率, 第 4 天成虫 100% 死亡; 而对照组则到第 7 天结蛹率达 55%, 仍有 45% 继续进食。上述两个室内喂养实验 (表 5 和表 6) 表明, 抗虫转基因红麻可明显减少田间害虫的为害, 第 4—7 天即可达到防治的效果。

4.3.4 抗虫红麻的田间观察

选择海南虫害较为严重的田间进行红麻抗虫性的自然筛选, 获得以下 *Bt* 抗虫性鉴定的证据。以下的图片来自海南和福建育种基地的田间观察。



图 5-A 抗虫红麻田间表现 (海南)
Fig 5-A Insect-resistant kenaf in the field



图 5-B 不抗虫红麻田间表现 (海南)
Fig 5 Noninsect-resistant kenaf in the field



图 5-C 抗虫红麻田间表现 (福州)
Fig5-C nsect-resistant kenaf in the field



图 5-D 不抗虫红麻田间表现 (海南)
Fig 5-D Noninsect-resistant kenaf in the field



图 5-E 抗虫红麻花田间表现 (福州)
Fig 5-E Insect-resistant kenaf flower in the field



图 5-F 不抗虫红麻花田间表现 (海南)
Fig 5-F Noninsect-resistant kenaf flower in the field



图 5-G 红麻田间虫害 (海南)
Fig 5-G The insects on the kenaf fruits



图 5-H 田间抗虫植株筛选 (海南)
Fig 5-H The experimental workers in the field

田间获得的抗虫与对照红麻的抗虫效果, 从图 5-A, 5-C, 5-E, 5-G 和图 5-B, 5-D, 5-F 可以看出, 转基因后代在田间表现良好的抗虫效果。其中图 A 和图 B 为田间单株抗虫的表现, 图 C 和图 D 为群体虫害对照, 图 E 和图 F 为红麻花的虫害对照。

4.3.5 红麻对照与抗虫转基因的考种数据比较

为了使红麻抗虫转基因育种与生产实践相结合, 在选择抗虫转基因后代的同时结合常规的田间选种要求, 对 T_5 世代的红麻单株后代选种, 群体中 23 个优良株系、具有抗虫特性的单株分别进行考种, 分别考查株高、鲜重、干皮重、茎粗、皮厚与对照品种进行比较。结果如表 7 所示。

表 7 田间考种数据对照表

Table 7 The comparison table of 5 kenaf quantitative charaters

编号	鲜重/kg	干皮重/kg	株高/cm	皮厚/ μ m	茎粗/mm
CK	1.330	0.108	4.94	1.992	2.720
04	1.650	0.150	5.18	2.988	2.130
05	1.654	0.144	5.49	3.076	1.900
06	1.422	0.130	5.41	2.938	1.796
07	1.540	0.136	5.50	2.972	1.964
25	1.450	0.126	4.98	1.908	2.972
26	1.530	0.136	5.33	2.028	2.896
32	1.202	0.092	5.35	1.696	2.756
33	1.887	0.110	5.05	1.480	2.703
35	1.138	0.098	5.25	1.790	2.865
38	1.886	0.160	5.59	1.996	3.342
41	1.516	0.130	5.32	1.936	2.982
42	1.738	0.160	5.68	3.160	1.868
47	1.936	0.176	5.48	2.060	3.186
64	2.050	0.180	5.26	1.904	3.424
68	1.266	0.116	5.35	1.710	2.992
69	1.240	0.116	5.22	1.696	3.014
74	1.530	0.132	5.18	1.812	2.984
75	1.336	0.114	5.28	2.784	1.668
105	1.425	0.133	5.24	1.705	3.043
110	1.700	0.120	5.40	2.107	3.570
132	1.804	0.168	5.78	1.888	3.332
141	1.244	0.110	5.20	1.644	2.784
平均值	1.552	0.133477	5.34	2.149	2.735
增 产	16%	18%	8%	8%	0.5%

从表 7 可以看出, 经过三个世代的选育, 对红麻品种福红 952 优良性状人工选育后代获得了一批比对照品种具有更优异的性状, 分别对红麻的鲜重, 干皮重, 茎粗, 株高, 皮厚等各个性状进行考种, 从上面的数据中可以看出, 鲜重比对照增加 16%, 干皮重增加 18%, 株高增高 8%, 皮厚增加 8%, 茎粗增加 8%。

4.4 转基因后代的 PCR 检测

为获得实验室内的分子证据, 需要对四个世代的红麻单株进行 PCR 鉴定, 鉴定的结果如图 6、图 7:

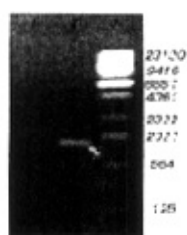


图 6 含有目的基因的质粒检测图谱

Fig6 target gene detection

1 为空质粒对照, 2 为质粒扩增 PCR 条带, 3 为 marker

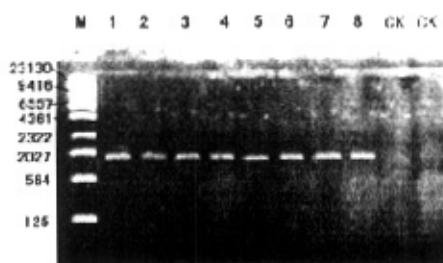


图 7 抗虫转基因 PCR 检测图

Fig 7 detection of insect-resistant transgenic kenaf with agarose electrophoresis

表现抗虫特性的植株总 DNA PCR 检测结果: M 为 marker 1-2 为 T1 代, 3-4 为 T2 代, 5-6 为 T3 代, 7-8 为 T4 代。

由图 6、图 7 可以看出: 质粒和转基因红麻 PCR 扩增的条带一样, 在 8 份表现抗性的红麻总 DNA 中, 都检测到目的基因。说明基因已经整合到红麻基因组中。

4.5 转基因后代的 ISSR 检测结果

为探索 ISSR 标记是否可以检测出抗虫转基因红麻的特异谱带或指纹特点, 我们对抗虫转基因红麻进行 ISSR 分子标记, 结果如图 8 所示。

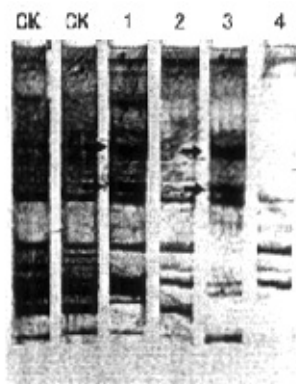


图 8 红麻转基因后代 ISSR 检测结果

Fig 8 ISSR molecular detection result of transgenic kenaf inheritance

注: CK 未转基因的福红 952 品种对照; 1, 2, 3, 4 分别随机取自福红 952 不同世代的转基因红麻后代

由图 8 可以看出, 用 ISSR 分子标记的方法检测同一个红麻品种福红 952, 检测结果表明, 转基因的红麻与对照红麻两者之间的出现多态性条带, 1 号和 3

号样品的条带比对照多出两条特异带（图中箭头所示），而 2 号和 4 号则没有这样的特异条带，但都与对照品种有所差异，从中可以看出，利用 ISSR 分子标记的方法可以检测到红麻品种的纯度，在已利用特异引物检验后有目的条带的情况下，ISSR 分子标记可以作为一种辅助的检测红麻品种纯度的方法。

4.6 Southern 杂交结果

为进一步确定外源的 *Bt* 基因整合到红麻的基因组中，采用地高辛的 Southern 杂交实验，实验结果如图 9 所示。

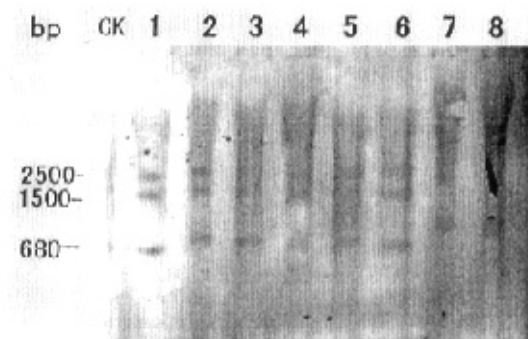


图 9 四个世代转基因红麻的 Southern 分子杂交图片

Fig 9 Southern molecular hybridization detection of four generations of transgenic kenaf

图中 CK 为空白对照，M 为 marker 1-2 为 T_1 代，3-4 为 T_2 代，5-6 为 T_3 代，7-8 为 T_4 代

从图 9 可以看出，PCR 结果和 Southern 分子杂交结果相同，从而可以确定，外源基因已经整合到红麻基因组中，并且获得了稳定遗传。从中我们也可以看出，外源基因是以三个拷贝整合在红麻基因中，三个片段大小分别是 2500bp、1500bp 和 680bp。

5 讨论

5.1 花粉管通道法对红麻进行转基因方法

目前对花粉管通道法的转化机理尚存在疑点,其操作过程还具有一定的盲目性,因此针对不同作物采用合适的转化条件很重要。大量研究表明,有众多因素会影响花粉管通道法的转化效果^[76-79]。首先是外源 DNA 的导入时期,如水稻一般在授粉后 1-3 小时用外源 DNA 处理柱头;棉花一般在授粉 24 小时后注入外源 DNA。红麻一般也是 24 小时;其次应根据受体植物的花器结构和受精时间采取合适的方法,如棉花为多胚珠大子房,可采用注射 DNA 或切断授粉后的花柱滴加 DNA 的方法;而小麦、水稻为单胚珠小子房,采用授粉后切断花柱滴加 DNA 的方法也许比较合适。此外,外源 DNA 的片段大小、纯度、状态和外源 DNA 溶液浓度等也会影响花粉管通道法的转化效果。一般情况下,外源 DNA 片段大小应保证带有完整的基因又不影响进入受体细胞;应该采用天然状态和纯化处理的外源 DNA;在配制外源 DNA 溶液时应设法降低核酸酶的活力,如利用 TE 缓冲液等^[78],就本实验而言,用常规的方法进行大量提取质粒 DNA,后期经过氯仿/异戊醇纯化,检测纯度在 1.9—2.0 之间后用于实验,获得了预期的效果。

5.2 花粉管通道法转基因成活率、成株率、转化率提高的对策

本试验采用柱头滴加法和子房注射法进行转化,两种方法获得的后代结实率有很大的不同,采用柱头滴加法和子房注射法得到的处理当代结实率分别是 68.8%和 51.7%,后代少虫口分别为 7.2%和 24.5%,从中可以看出,虽然柱头滴加法对红麻的结实影响较小,但是后代的少虫口却明显比子房注射法少。除了自然的因素外,可以初步判断采用子房注射法进行花粉管通道法转化效果较好。此外,由于子房注射时,人员的操作技能很关键,虽然在注射是盲目性很大,但操作时把握好注射部位和用力程度,要尽量不破坏子房,否则很容易导致果实脱落。

转化率的提高是转基因工作者的目的。对于红麻来说用花粉管通道法转基因转化率的原因众多,如花朵的选择、技术的操作等。在花朵选择上建议选自花

授粉后 24 小时左右的花,柱头滴加法转基因时是在人工授粉后 30min 左右进行,在涂抹外源质粒时注意不要滑落。同时还要注意除去进行转基因操作的植株两侧的非转基因植株。给转化的转基因植株适当的保护以免影响后代的结实率。

5.3 关于利用分子标记 ISSR 分析外源基因的整合原理

ISSR 和 RAPD 分子标记是以 PCR 为基础,核心是 DNA 片断的扩增,其与常规 PCR 不同之处在于引物。常规 PCR 需要两个引物,每个引物分子 15-30 个核苷酸,引物序列需要根据待扩增的基因两端的序列设计,因此要进行 PCR 时,必须知道待扩增基因两端的序列。而 RAPD 或 ISSR 分析时,只需要一个引物,长度 10bp 左右,引物序列是随机的,因而可在被检对象无任何分子生物学资料的情况下对其基因组进行分析。

外源基因转化后转基因植株基因组 DNA 与非转化植株基因组 DNA 在外源基因的插入部位有明显的不同,当引物适宜时,扩增的条带长短就会不同,所以利用 RAPD 或 ISSR 分析可以快速对导入的外源基因进行鉴定。如果转化植株有外源基因插入,则可能会引起植物基因组的重排,这样在一定条件下,用 RAPD 或 ISSR 技术可以检测出对照植株和转化植株 PCR 产物带型的区别,还可以检测后代植株间基因组的稳定性及在后代间的分离。

王秀玲^[82] 等将野生大豆 DNA 导入小麦,然后用 RAPD 分析转化的植株,结果证明了外源总 DNA 片段可以通过花粉管通道导入受体,引起基因组变异,从分子水平上直接验证了用花粉管通道导入技术获得了含有大豆基因的小麦株株。

我们的研究结果也发现,抗虫基因的导入导致了红麻基因组的变异,用 ISSR 分析表明(见图 8),在四个世代的红麻植株中,红麻的基因组发生了变异,从而导致特异条带的出现。

5.4 关于导入的外源基因稳定性问题

外源基因在受体植株中高频整合和高效表达是转基因运用于植物种质创新的关键。目前水稻作为模式生物而受到广泛研究,在转基因方面,多数报告指出^[80-81],转基因不管是多拷贝还是单拷贝,都以单位点形式整合,在后代中形成 3:1 单基因孟德尔方式分离。我们通过 PCR 和 PCR-Southern 分析,证明外源基因

是以多拷贝整合到红麻基因组中。

外源基因能否在转基因后代中稳定遗传和表达是基因工程技术实用化研究中人们普遍关注的问题。基因沉默现象的发现使很多人对转基因技术实用化研究产生了迷惑，总怀疑外源基因在后代中得不到稳定的遗传和表达。一般说来，如果外源基因是单拷贝的容易稳定遗传；然而，将 *Bt* 外源基因导入红麻是以三个拷贝整合并且能够稳定遗传，但田间的抗虫效果有所变化，即抗虫效果有所减弱，这可能是由于三个拷贝引起的后代分离现象，ISSR 分析结果也似乎说明了这一点，如图 8 所示，四个样品中，同一个品种的 ISSR 标记结果表现出不同的条带，当然，由于红麻常异交植物，也有可能是由于异交导致条带的差异。

如果要培育一个新品种，还需要进行 Northern 和 Western Blotting 实验，检测外源基因是否沉默和抗虫毒蛋白的表达量等。本实验根据理论与应用相结合的原则，在田间观察抗虫性的同时选育优良单株，选育的后代不仅具有优良的性状，同时也获得转基因植株。

参考文献

- [1] 程舟, 蛟岛一彦等. 日本的红麻研究加工和利用. 中国麻业, 2001, 23 (3), 16-24
- [2] 陈安国, 李德芳等. 红麻需求分析与育种技术发展趋势. 中国麻业, 2001, 23 (4): 26-31
- [3] 吴延军, 何伟等. 植物基因工程在农业上的应用. 中国农学通报, 2002, 18 (4): 71-74
- [4] 杨崇良, 张君亭等. 农业转基因生物研究现状及安全性管理. 山东农业科学, 2002, (5): 50-52
- [5] 王玉富等. 亚麻外源 DNA 导入后代的氧化物同工酶分析. 中国麻作, 1996, (3): 6-8
- [6] 刘燕等. 亚麻外源 DNA 导入后代的适宜时机与方法的研究. 中国麻作, 1997, (3): 13-15
- [7] 祁建民, 李维明等. 红麻种质资源创新的理论与实践. 中国麻作, 1999, 21 (1): 43-44
- [8] 林黎辉, 祁建民, 方平平等. 红麻无刺新型品种金光 1 号的选育. 中国麻作, 2004, 26 (4): 157-161
- [9] 曹德菊, 程备久等. 红麻基因组提纯方法研究. 中国麻作, 1999, 21: (1), 9-12
- [10] 曹德菊, 李爱青等. 花粉管法将外源抗除草剂基因导入红麻的有效方法及参数研究. 中国麻作, 2000, 22: (1) 1-5
- [11] 周东新, 祁建民, 吴为人等. 黄麻 DNA 提取与 RAPD 反应体系的建立. 福建农业大学学报, 30 (3): 334-339
- [12] 王关琳, 方宏筠. 植物基因工程 (第二版), 科学出版社: 北京, 2002: 360-494
- [13] 向阳, 朱冬雪, 夏雨等. 植物基因工程中 Ti 质粒的研究与应用进展. 生物学通报, 2003, 38 (2): 7-9
- [14] McCabe D E, Swain W F, Martinell B J. Stable transformation of soybean by particle acceleration. *BiolTechnol*, 1988, 6: 923-926
- [15] 于娅, 刘传亮, 马峙英, 李付广. 适于基因枪转化的棉花茎尖培养及筛选体系初探. 棉花学报, 2003, 15 (5): 274-278
- [16] 董云洲, 贾仕荣. 基因枪在植物遗传转化上的应用. 生物工程进展, 1993, 14 (2): 15-19
- [17] Zhou G Y, Weng J, Zeng Y *et al.* Introduction of Exogenous DNA into cotton embryos [J]. *Meth Enzymol*, 1983, 101: 433-481
- [18] Derolles S C, Gardner R C. Expression and inheritance of Kanamycin resistance in a large number of transgenic petunias generated by *Agrobacterium*-mediated transformation [J]. *Plant Mol Bio*, 1988, 11: 334-364
- [19] Linn F, Heidann I, Saedler H. Epigenetic changes in the expression of the maize *Al* gene in *Petunia* hybrid: role of numbers of integrated gene copies and state of methylation [J]. *Mol Gen Genet*, 1990, 222: 329-336
- [20] Shaun L, Hobbs A, Kpodar P. The effect of T-DNA copy numbers position and methylation reporter gene expression in tobacco transformants [J]. *Plant Mol Bio*, 1990, 15: 851-864
- [21] 黄骏麒, 钱思颖, 周光宇等. 外源抗枯萎病棉 DNA 导入感病棉的抗性转移 [J]. 中国农业科学, 1986, 19 (3): 32-36
- [22] 曾君祉, 吴有强, 王东江等. 花粉管通道 (或运载) 法转化的植株后代遗传表现及转化机理的探讨 [J]. 科学通报, 1998, 43 (6): 561-566
- [23] 罗宏发, 钟秉强, 杨正林等. 水稻花粉管通道法导入高粱 DNA 的 SSR 分子验证. 分子植物育种, 2004, 2 (4): 501-505
- [24] 罗宏发, 钟秉强, 杨正林等. 水稻花粉管通道法导入高粱 DNA 的 SSR 分子验证. 分子植物育种, 2004, 2 (4): 501-505
- [25] 罗明, 罗忠讯, 朱彩章, 周勇. *PIN II* 基因通过花粉管通道法转化水稻的研究. 湖北

- 大学学报(自然科学版), 2002, 2(3): 259-262
- [26] 王才林, 赵凌, 宗寿余等. 用花粉管通道法将 *bar* 基因导入水稻获得可遗传的转基因植株. 江苏农业学报, 2002, 18(3): 129-133
- [27] 王才林, 朱镇, 赵凌, 张亚东, 林静等. 用花粉管通道法将慈菇蛋白酶抑制剂基因(AP I) 导入水稻获得转基因植株. 江苏农业学报, 2005, 21(4): 245-248
- [28] 朴铁大, 栗长兰, 韩玉珠等. 外源 DNA 导入番茄方法的研究. 农业与技术, 2002, 22(1): 37-38
- [29] 裴新梧, 崔凯荣, 孔英珍等. 导入高粱 DNA 选育丰产、抗逆小麦新品系及其 RAPD 分子验证. 兰州大学学报(自然科学版), 1999, 35(2): 130-136
- [30] 王长海, 蓝海燕. 利用花粉管通道法将外源质粒 DNA 注入棉花的改良方法. 棉花学报, 1999, 11(4): 220-221
- [31] 李付广, 崔金杰, 刘传亮等. 双价基因抗虫棉及其抗虫性研究. 中国农业科学, 2000, 33(1): 46-52
- [32] 李静, 韩秀兰, 沈法富, 等. 提高棉花花粉管通道技术转化率的研究. 棉花学报, 2005, 17(2): 67-71
- [33] 牟红梅, 刘树俊, 周文娟等. 慈菇蛋白酶抑制剂通过花粉管途径对小麦的导入及转基因植株分析. 棉花学报, 1999, 26(6): 634-642
- [34] 贾力, 吴茂森, 张文蔚等. 大麦黄矮病毒单双价外壳蛋白基因植物表达载体构建及小麦遗传转化. 农业生物技术学报, 2001, 9(1): 23-27
- [35] 陈国庆, 王武源, 李忠超等. 花粉管通道法转基因改良小麦品质的初步研究. 广西植物, 2005, 25(3): 245-248
- [36] 邓明军, 崔红. 烟草花粉管通道导入外源 DNA 研究初探. 河南农业科学, 2005, 1(1): 22-24
- [37] 关淑艳, 张健华, 柴晓杰等. 花粉管通道法将淀粉分支酶基因反义表达载体转入玉米自交系的研究. 玉米科学, 2005, 13(4): 13-15, 23
- [38] 关淑艳, 张健华, 柴晓杰等. 花粉管通道法将淀粉分支酶基因反义表达载体转入玉米自交系的研究. 玉米科学, 2005, 13(4): 13-15, 23
- [39] Fearing P L, Brown D, Vlachos D, Meghji M, Privalle L. quantitative analysis of CryIA(b) expression in *Bt* maize plants, tissue, and silage and stability of expression over successive generations. *Molecular Breeding*, 1997, 3: 169-176
- [40] Webb K J, Humphreys M O, Skot L, Gibbs M, Gatehouse J. inheritance expression of transgenes in T2 and T3 generation of *Loutus corniculatus* transformed using *Agrobacterium tumefaciens*. *Euphytica*, 1999, 108: 169-179
- [41] Maqbool S B, Riazuddin S, Loc N T, Gatehouse A M R, Gatehouse J A, Christou P. Expression of multiple insecticidal genes confers broad resistance against a range of different rice pests. *Molecular Breeding*, 2001 (7): 85-93
- [42] 曹德菊, 程备久等. 抗除草剂转基因红麻的分子验证. 中国麻业, 2001, 23(3): 1-4
- [43] 万文举, 张福泉, 董延瑜. 玉米 DNA 导入水稻获得种质变异. 湖南农业科学, 1992, 3
- [44] 邵碧英, 陈义炳, 李寿藕等. 转基因产品检测方法建立的基础及应用[J]. 检验检疫科学, 2002, 12(3): 14-19
- [45] 阙贵珍, 喻德跃. 试纸条法和 PCR 法检测抗草甘膦转基因大豆的外源基因. 中国油料作物学报, 2005, 27(4): 18-21
- [46] 李成云. 植物基因的克隆与转化(3)转基因植物中报告基因的检测方法[J]. 云南农业科技, 2000(6): 35-37

- [47]王忠华, 夏英武. 转基因植物中报告基因 *gus* 的表达及其安全性评价. 生命科学, 2000, 12 (5): 207-209, 198
- [48]李颖, 金振华, 林忠平. 抑制移植免疫排斥反应的研究进展. 生物工程进展. 1995, 15 (2): 46-47
- [49]王保民, 何钟佩, 赵继勋. 抗虫棉 *Bt* 杀虫晶体蛋白免疫检测方法的研究. 棉花学报, 1998, 10 (4): 220-221
- [50]陈松, 吴敬音, 程德荣. 转 *Bt* 基因棉 *Bt* 毒蛋白的 ELISA 检测方法的研究(英文). 棉花学报, 1999, 11 (5): 259-267
- [51]程英豪, 吴光, 王继伟. 表达黄瓜花叶病毒外壳蛋白的转基因番茄抗黄瓜花叶病毒侵染. 植物学报, 1997, 36 (1): 16-21
- [52]谢芝勋, 谢志勤, 庞耀珊等. 应用三重聚合酶链反应同时检测鉴别鸡 3 种病毒性呼吸道传染病的研究[J]. 中国兽医科技, 2001, (1): 11-14
- [53]赵文军, 陈红运, 黄文胜. PCR-ELISA 在转基因产品检测中的应用. 植物检疫, 2001, 15 (5): 297-299
- [54]覃文, 董洁, 高东微等. PCR-GeneScan 法检测转基因产品[J]. 生物技术, 2001, 11 (5): 36-39
- [55]刘光明, 王群力, 陈伟玲等. 荧光 PCR 同时检测转基因成分 35S 和 NOS[J]. 检验检疫科学, 2001, (6)
- [56]萨姆布鲁克等. 分子克隆实验指南(第二版)[M]. 金冬雁等译. 北京: 科学出版社. 1998, 19-27
- [57]卢圣栋主编. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社. 1999, 19-116, 236-237
- [58]彭秀玲, 袁汉英. 基因工程实验技术[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社
- [59]朱玉贤, 李毅. 现代分子生物学(第二版). 北京: 高等教育出版社. 2002, 170
- [60]刘佳等. 大规模生产制备质粒 DNA 技术进展. 生物技术通讯, 2004, 15 (4): 409-410
- [61]王水琦, 林彦铨, 汤浩等. 果蔗种质资源的 RAPD 和 ISSR 分析. 江西农业大学学报, 2003, 25 (3): 413-417
- [62]王心宇, 陈佩度, 元增军等. ISSR 标记在小麦指纹图谱分析中的应用研究初探. 农业生物技术学报, 2001, 9 (3): 261-263
- [63]祁建民, 周东新, 吴为人等. 用 ISSR 标记检测黄麻野生种与栽培种遗传多样性. 应用生态学报, 2003, 14 (9): 1473-1477
- [64]葛永奇, 邱英雄, 丁炳扬等. 孑遗植物银杏群体遗传多样性的 ISSR 分析. 生物多样性, 2003, 11 (4): 276-287
- [65]顾红雅, 翟礼嘉等主编. 植物基因与分子操作[M]. 北京大学出版社, 1998, 19-25
- [66]F. 奥斯伯等编. 颜子颖等译. 精编分子生物学实验指南[M]. 科学出版社, 1998, 29-38, 100-103
- [67]Clark M S 主编. 顾红雅, 翟礼嘉主译. 植物分子生物学——实验手册[M]. 高等教育出版社, 1998, 3-13
- [68]Paglia, *et al.* PCR-based multiplex DNA fingerprinting techniques for the analysis of conifer genomes [J]. 1998. Molecular Breeding 4 (2) April: 173-177
- [69]Honeycutt. R. J, P keim and J. E Irvine. A Rapid DNA extraction method of sugarcane and its relatives. Plant Mol. Biol. Rep. 1992, 10(1): 60-67
- [70]Guillemaut P, Drouard L. M. Isolation of plant DNA: A fast, inexpensive, and reliable method [J]. Plant Mol Bio Rep. , 1992, 10(1): 60-65

- [71] 范媛媛等. 双价抗虫植物表达载体 *p3300-Bt-pta* 的构建及转基因烟草的初步检测. 上海交通大学学报, 2004, 22 (1): 1-6
- [72] 刘志, 郭旺珍, 朱协民等. 转 *Bt+GNA* 双价基因抗虫棉花中抗虫基因及其抗虫性的遗传稳定性. 作物学报, 2004, 30 (1): 6-10
- [73] 倪万潮, 张震林, 郭三堆等. 转基因抗虫棉的培育[J]. 中国农业科学, 1998, 131 (2): 8-13
- [74] 苗保河. 外源 DNA 直接导入大豆遗传变异研究[J]. 作物品种资源, 1998, (2): 21-33
- [75] 王亚馥, 陈克明, 焦成瑾等. 外源 DNA 导入小麦后变异系生物学特征及胚乳蛋白研究[J]. 作物学报, 1995, 24 (4) 404-411
- [76] 张庆祝, 韩天富. 植物非组织遗传转化方法研究的进展. 分子植物育种, 2004, 2 (1): 85-91
- [77] 张新梅, 徐惠君, 杜丽璞, 叶兴国等. 共转化法剔除转基因小麦中的 *bar* 基因. 作物学报, 2004, 30 (1): 26-30
- [78] 牟红梅, 刘树俊, 周文娟等. 慈菇蛋白酶抑制剂通过花粉管通道途径对小麦的导入及转基因植株分析. 遗传学报, 1999, 26: 634-642
- [79] 曾君祉, 吴有强, 王东江等. 花粉管通道(或运载)法转化的植株后代遗传表现及转化机理的探讨. 科学通报, 1998, 43: 561-566
- [80] Sivamani E, Shen P Opalka N, et al. Selection of large quantities of embryogenic calli from indica rice seeds for production of fertile transgenic plants using the biolistic method. Plant Cell Rep, 1996, 15: 322-327
- [81] Zhang S, Chen L, Qu R, et al. Regeneration of fertile transgenic indica(group 1) rice plants following microprojectile transformation of embryogenic suspension culture cells. Plant Cell Rep, 1996, 15: 465-469
- [82] 王秀玲, 卢茜, 刘君, 刘桂琴等. 野生大豆 DNA 导入小麦及 RAPD 分子验证. 南开大学学报(自然科学版), 2003, 36 (2): 37-40

致 谢

本文是在导师祁建民研究员的悉心指导下完成的,导师严谨的治学态度、科学的创新精神和勤奋的创业精神,以及三年来给予我工作上、学习和生活上的关心和鼓励,令我终生受益,在此谨向我的导师致以最崇高的敬意和诚挚的感谢。

感谢唐克轩教授和吴为人教授提供质粒载体。

特别感谢本课题组的吴为人教授,他们给予我许多宝贵的建议、关心和支持,使试验得以如期圆满完成;感谢遗传所常规组全体工作人员在学习与生活上的支持及同级研究生在实验室的互谅互让、互帮互助。

在实验过程中,得到周元昌教授,林荔辉副教授、方平平副教授、兰涛博士、黄碧光博士、林光霖老师、赖金文老师、陶爱芬老师,师兄王涛、孙志强、何小娜等同学的帮助,特此致谢。感谢同学王小飞、梁景霞、阮奇城、张丽丽、刘中华、郑鹭、张广庆、胡新韬等,帮助完成红麻的种植和部分论文的数据处理工作,感谢本科生黄舒静同学在田间抗虫观察的友情帮助。

再次感谢支持本实验的老师、朋友、亲人们和三年朝夕相处的同学,感谢所有关心和帮助过我的人,正是他们的真诚和关爱,使得本实验得以如期完成。祝他们永远幸福。