



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112592995 B

(45) 授权公告日 2023.04.21

(21) 申请号 202011470910.8

(22) 申请日 2018.06.20

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112592995 A

(43) 申请公布日 2021.04.02

(62) 分案原申请数据
201810636371.7 2018.06.20

(73) 专利权人 中国农业大学
地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

(72) 发明人 王喜庆 刘芳 庄军红

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256
专利代理师 孟凡宏

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6895 (2018.01)

C12Q 1/6851 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1470642 A, 2004.01.28

CN 104894280 A, 2015.09.09

CN 106521018 A, 2017.03.22

CN 103060460 A, 2013.04.24

US 6222104 B1, 2001.04.24

审查员 安玉苹

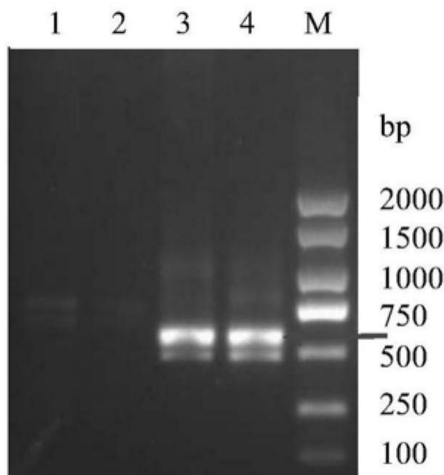
权利要求书2页 说明书17页
序列表1页 附图6页

(54) 发明名称

一种检测转基因植物中目的基因表达的通用引物及检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检测转基因植物中目的基因表达的通用引物及检测方法。本发明提供了一种检测转基因植物中导入的外源目的基因表达的物质,为如下:1) 序列1或序列1第1-93位所示的DNA片段;2) 用于扩增1) 所示DNA片段的引物对;3) 含有2) 所示引物对的PCR试剂或试剂盒。发明人通过对转基因材料cDNA进行3' RACE,首次证明外源基因转录后紧密相连有一小段载体序列(该序列见序列表1),即NOS终止子部分序列。由于NOS终止子是转基因研究中常用的终止子,基于此研究结果,本发明针对该载体序列片段设计了通用引物,根据该载体序列表达量预测外源基因表达量,可以快速从大量转基因个体中筛选出高效表达外源基因的转基因个体或品种。



1. 一种通用的对含有不同外源目的基因的多种转基因材料进行高通量检测的方法,为检测所述转基因植物的cDNA中是否含有序列1第1-93位所示的DNA片段,若含有,则该转基因植物表达或候选表达目的基因;若不含有,则该转基因植物不表达或候选不表达目的基因;

所述检测所述转基因植物的cDNA中是否含有序列1或序列1第1-93位所示的DNA片段的方法为以所述转基因植物的cDNA为模板,用引物对进行荧光定量PCR扩增,得到待测转基因植物PCR扩增产物;检测所述待测转基因植物PCR扩增产物,若有S曲线或S扩增曲线或 $2^{-\Delta Ct}$ 值大于0,则该转基因植物的cDNA中含有序列1或序列1第1-93位所示的DNA片段;若无S扩增曲线或 $2^{-\Delta Ct}$ 值小于等于0,则该转基因植物不含序列1或序列1第1-93位所示的DNA片段;

所述引物对由序列2所示的单链DNA分子和序列3所示的单链DNA分子组成;

所述转基因植物为将所述外源目的基因导入野生型植物中得到的植物,且所述外源目的基因的终止子为NOS终止子或至少含有序列1所示核苷酸的NOS终止子部分序列。

2. 一种检测转基因植物中导入的外源目的基因是否表达并排除植物本身同一基因表达的方法,为检测所述转基因植物的cDNA中是否含有序列1第1-93位所示的DNA片段,若含有,则该转基因植物表达或候选表达目的基因;若不含有,则该转基因植物不表达或候选不表达目的基因所述检测所述转基因植物的cDNA中是否含有序列1或序列1第1-93位所示的DNA片段的方法为以所述转基因植物的cDNA为模板,用引物对进行荧光定量PCR扩增,得到待测转基因植物PCR扩增产物;检测所述待测转基因植物PCR扩增产物,若有S曲线或S扩增曲线或 $2^{-\Delta Ct}$ 值大于0,则该转基因植物的cDNA中含有序列1或序列1第1-93位所示的DNA片段;若无S扩增曲线或 $2^{-\Delta Ct}$ 值小于等于0,则该转基因植物不含序列1或序列1第1-93位所示的DNA片段;

所述引物对由序列2所示的单链DNA分子和序列3所示的单链DNA分子组成

所述转基因植物为将所述外源目的基因导入野生型植物中得到的植物,且所述外源目的基因的终止子为NOS终止子或至少含有序列1所示核苷酸的NOS终止子部分序列。

3. 一种检测转基因植物中导入的外源目的基因的表达量的方法,其中所述外源目的基因的终止子是NOS终止子,该方法包括如下步骤:

1) 提取待测转基因植物的RNA,再反转录得到cDNA;

2) 以所述cDNA为模板,用针对NOS终止子的引物对进行荧光定量PCR扩增,得到待测转基因植物PCR扩增产物;

检测待测转基因植物PCR扩增产物和野生型植物PCR扩增产物,采用 $2^{-\Delta Ct}$ 方法计算待测转基因植物中外源目的基因的相对表达量;

待测转基因植物中外源目的基因的相对表达量 = $2^{-\Delta Ct}$ ($\Delta Ct = Ct_{(目的基因, 样品)} - Ct_{(内参基因, 样品)}$);

其中NOS终止子含有序列1或序列1第1-93位所示的DNA片段序列;

其中所述针对NOS终止子的引物对由序列2所示的单链DNA分子和序列3所示的单链DNA分子组成。

4. 一种筛选导入外源目的基因表达量高的转基因植物植株的方法,其中所述外源目的基因的终止子是NOS终止子,该方法包括如下步骤:

1) 提取待测转基因植物的RNA,再反转录得到cDNA;

2) 以所述cDNA为模板,用针对NOS终止子的引物对进行荧光定量PCR扩增,得到待测转基因植物PCR扩增产物;

检测待测转基因植物PCR扩增产物和野生型植物PCR扩增产物,采用 $2^{-\Delta Ct}$ 方法计算待测转基因植物中外源目的基因的相对表达量;

待测转基因植物中外源目的基因的相对表达量 = $2^{-\Delta Ct}$ ($\Delta Ct = Ct_{(目的基因, 样品)} - Ct_{(内参基因, 样品)}$);

从中选取表达量最高的单株培育,得到导入外源目的基因表达量高的转基因植物植株;其中NOS终止子含有序列1或序列1第1-93位所示的DNA片段序列;

其中所述针对NOS终止子的引物对由序列2所示的单链DNA分子和序列3所示的单链DNA分子组成。

一种检测转基因植物中目的基因表达的通用引物及检测方法

[0001] 本申请是申请日为2018年6月20日,发明名称为“一种检测转基因植物中目的基因表达的通用引物及检测方法”,申请号为201810636371.7的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及分子生物学领域,尤其涉及一种检测转基因植物中目的基因表达的通用引物及检测方法。

背景技术

[0003] 自1996年首例转基因农作物产业化应用以来,全球转基因技术研究与产业应用已进入一个规模化集成应用的新阶段。随着转基因产业化进程的推进,相应的转基因检测方法也从原来检测单个目标基因发展到多物种多基因同时检测的程度并继续向着高通量检测的方向发展。

[0004] 大多数情况下,外源基因一般都是随机插入宿主基因组中,而不同插入位点的外源基因表达量会存在差异。因此,转基因研究中必须对大量的转基因个体进行基因表达量检测,以筛选、获得外源基因大量表达的转基因生物。常规基因表达量分析方法是采用针对外源基因设计的特异引物,而这种方法存在以下问题,严重制约了转基因生物的开发和利用:1) 针对每个外源基因都要设计基因特异引物并优化反应条件,难以实现高通量检测;2) 若外源基因在该宿主基因组中有同源基因,通常很难设计基因特异引物进行特异扩增;3) 若外源基因是宿主基因组中本身含有的基因,则基因特异引物无法区分转入的目的基因表达量与宿主本底的基因表达量;4) 若外源基因是宿主基因组中本身含有的基因,而且宿主基因组中该基因本底表达水平已很高,这样就会造成检测结果显示该转入基因没有过量表达,从而对转入基因是否表达造成误判。

[0005] 虽然DNA水平上已有通过CaMV35S启动子和NOS终止子的序列检测转基因是否转入宿主基因组的专利,但未有RNA水平上通过CaMV35S启动子和NOS终止子的序列检测转基因表达量的专利。浙江大学钟伯雄等人发明了一种用标记基因预测外源基因表达量及筛选转基因生物的方法(申请号:201410678673.2,公布号:CN104404072A),但标记基因与外源基因有时会分别插入到宿主基因组的非连锁位点上,这就会导致误判;最重要的是,由于标记基因可能带来某些潜在威胁,无选择标记转基因已成为转基因技术研究的重点。

发明内容

[0006] 本发明一个目的是提供一种检测转基因植物中导入的外源目的基因表达的物质。

[0007] 本发明提供的物质,为如下:

[0008] 1) 序列1或序列1第1-93位所示的DNA片段;

[0009] 2) 用于扩增1)所示DNA片段的引物对;

[0010] 3) 含有2)所示引物对的PCR试剂或试剂盒。

[0011] 上述物质中,所述引物对由序列2所示的单链DNA分子和序列3所示的单链DNA分子

组成。

[0012] 上述的物质在检测转基因植物中导入的外源目的基因是否表达中的应用也是本发明保护的范围；

[0013] 或上述的物质在制备检测转基因植物中导入的外源目的基因是否表达产品中的应用也是本发明保护的范围。

[0014] 上述的物质在检测转基因植物中导入的外源目的基因的表达量中的应用也是本发明保护的范围；

[0015] 或上述的物质在制备检测转基因植物中导入的外源目的基因的表达量产品中的应用也是本发明保护的范围。

[0016] 上述的物质在筛选转基因植物中导入的目的基因的表达量高的植株中的应用也是本发明保护的范围；

[0017] 或上述的物质在制备筛选转基因植物中导入的目的基因的表达量高的植株产品中的应用也是本发明保护的范围。

[0018] 另一方面,本发明提供一种检测转基因植物中导入的外源目的基因是否表达的方法,其中所述外源目的基因的终止子是NOS,所述检测为检测所述转基因植物的cDNA中是否含有NOS终止子的部分或全部DNA片段,若含有,则该转基因植物表达或候选表达目的基因;若不含有,则该转基因植物不表达或候选不表达目的基因。

[0019] 优选地,为检测所述转基因植物的cDNA中是否含有序列1或序列1第1-93位所示的DNA片段,若含有,则该转基因植物表达或候选表达目的基因;若不含有,则该转基因植物不表达或候选不表达目的基因。

[0020] 优选地,所述检测所述转基因植物的cDNA中是否含有序列1或序列1第1-93位所示的DNA片段的方法为以所述转基因植物的cDNA为模板,用权利要求1或2所述的物质中的引物对进行荧光定量PCR扩增,得到待测转基因植物PCR扩增产物;检测所述待测转基因植物PCR扩增产物,若有S曲线或S扩增曲线或 $2^{-\Delta Ct}$ 值大于0,则该转基因玉米的cDNA中含有序列1或序列1第1-93位所示的DNA片段;若无S扩增曲线或 $2^{-\Delta Ct}$ 值小于等于0,则该转基因玉米不含序列1或序列1第1-93位所示的DNA片段。

[0021] 另一方面,本发明提供一种通用的对含有不同外源目的基因的多种转基因材料进行高通量检测的方法,其中所述不同外源目的基因的终止子是NOS终止子,所述检测为检测所述转基因植物的cDNA中是否含有NOS终止子的部分或全部DNA片段,若含有,则该转基因植物表达或候选表达目的基因;若不含有,则该转基因植物不表达或候选不表达目的基因。

[0022] 优选地,为检测所述转基因植物的cDNA中是否含有序列1或序列1第1-93位所示的DNA片段,若含有,则该转基因植物表达或候选表达目的基因;若不含有,则该转基因植物不表达或候选不表达目的基因。

[0023] 优选地,所述检测所述转基因植物的cDNA中是否含有序列1或序列1第1-93位所示的DNA片段的方法为以所述转基因植物的cDNA为模板,用权利要求1或2所述的物质中的引物对进行荧光定量PCR扩增,得到待测转基因植物PCR扩增产物;检测所述待测转基因植物PCR扩增产物,若有S曲线或S扩增曲线或 $2^{-\Delta Ct}$ 值大于0,则该转基因玉米的cDNA中含有序列1或序列1第1-93位所示的DNA片段;若无S扩增曲线或 $2^{-\Delta Ct}$ 值小于等于0,则该转基因玉米不含序列1或序列1第1-93位所示的DNA片段。

[0024] 另一方面,本发明提供一种检测转基因植物中导入的外源目的基因是否表达并排除植物本身同一基因表达的方法,其中所述外源目的基因的终止子是NOS终止子,所述检测为检测所述转基因植物的cDNA中是否含有NOS终止子的部分或全部DNA片段,若含有,则该转基因植物表达或候选表达目的基因;若不含有,则该转基因植物不表达或候选不表达目的基因。

[0025] 优选地,为检测所述转基因植物的cDNA中是否含有序列1或序列1第1-93位所示的DNA片段,若含有,则该转基因植物表达或候选表达目的基因;若不含有,则该转基因植物不表达或候选不表达目的基因。

[0026] 优选地,所述检测所述转基因植物的cDNA中是否含有序列1或序列1第1-93位所示的DNA片段的方法为以所述转基因植物的cDNA为模板,用权利要求1或2所述的物质中的引物对进行荧光定量PCR扩增,得到待测转基因植物PCR扩增产物;检测所述待测转基因植物PCR扩增产物,若有S曲线或S扩增曲线或 $2^{-\Delta Ct}$ 值大于0,则该转基因玉米的cDNA中含有序列1或序列1第1-93位所示的DNA片段;若无S扩增曲线或 $2^{-\Delta Ct}$ 值小于等于0,则该转基因玉米不含序列1或序列1第1-93位所示的DNA片段。

[0027] 另一方面,本发明提供一种检测转基因植物中导入的外源目的基因是否表达的方法,包括如下步骤:

[0028] 1) 提取待测转基因植物的RNA,再反转录得到cDNA;

[0029] 2) 以所述cDNA为模板,用权利要求1或2所述的物质中的引物对进行荧光定量PCR扩增,得到待测转基因植物PCR扩增产物;

[0030] 检测所述待测转基因植物PCR扩增产物,若该扩增产物具有S曲线或S扩增曲线或 $2^{-\Delta Ct}$ 值大于0,则该转基因植物表达或候选表达该外源目的基因;若该扩增产物不具有S曲线或 $2^{-\Delta Ct}$ 值小于等于0,则该转基因植物不表达或候选不表达该外源目的基因。

[0031] 另一方面,本发明提供一种检测转基因植物中导入的外源目的基因的表达量的方法,其中所述外源目的基因的终止子是NOS终止子,该方法包括如下步骤:

[0032] 1) 提取待测转基因植物的RNA,再反转录得到cDNA;

[0033] 2) 以所述cDNA为模板,用针对NOS终止子的引物对进行荧光定量PCR扩增,得到待测转基因植物PCR扩增产物;

[0034] 检测待测转基因植物PCR扩增产物和野生型植物PCR扩增产物,采用 $2^{-\Delta Ct}$ 方法计算待测转基因植物中外源目的基因的相对表达量;

[0035] 待测转基因植物中外源目的基因的相对表达量 = $2^{-\Delta Ct}$ ($\Delta Ct = Ct_{(目的基因,样品)} - Ct_{(内参基因,样品)}$)。

[0036] 优选地,其中NOS终止子含有序列1或序列1第1-93位所示的DNA片段序列。

[0037] 优选地,其中所述针对NOS终止子的引物对由序列2所示的单链DNA分子和序列3所示的单链DNA分子组成。

[0038] 另一方面,本发明提供一种筛选导入外源目的基因表达量高的转基因植物植株的方法,其中所述外源目的基因的终止子是NOS终止子,该方法包括如下步骤:

[0039] 1) 提取待测转基因植物的RNA,再反转录得到cDNA;

[0040] 2) 以所述cDNA为模板,用针对NOS终止子的引物对进行荧光定量PCR扩增,得到待测转基因植物PCR扩增产物;

[0041] 检测待测转基因植物PCR扩增产物和野生型植物PCR扩增产物,采用 $2^{-\Delta Ct}$ 方法计算待测转基因植物中外源目的基因的相对表达量;

[0042] 待测转基因植物中外源目的基因的相对表达量 $=2^{-\Delta Ct}$ ($\Delta Ct = Ct_{(目的基因,样品)} - Ct_{(内参基因,样品)}$);

[0043] 从中选取表达量最高的单株培育,得到导入外源目的基因表达量高的转基因植物植株。

[0044] 优选地,其中NOS终止子含有序列1或序列1第1-93位所示的DNA片段序列。

[0045] 优选地,其中所述针对NOS终止子的引物对由序列2所示的单链DNA分子和序列3所示的单链DNA分子组成。

[0046] 另一方面,本发明提供了一种用于PCR扩增NOS终止子的引物对,其中所述引物对由序列2所示的单链DNA分子和序列3所示的单链DNA分子组成。

[0047] 本发明的另一个目的是提供一种检测转基因植物中导入的外源目的基因是否表达的方法。

[0048] 本发明提供的方法,为检测所述转基因植物的cDNA中是否含有序列1或序列1第1-93位所示的DNA片段,若含有,则该转基因植物表达或候选表达目的基因;若不含有,则该转基因植物不表达或候选不表达目的基因。

[0049] 上述方法中,所述检测所述转基因植物的cDNA中是否含有序列1或序列1第1-93位所示的DNA片段的方法为以所述转基因植物的cDNA为模板,用权利要求1或2所述的物质中的引物对进行荧光定量PCR扩增,得到待测转基因植物PCR扩增产物;检测所述待测转基因植物PCR扩增产物,若有S曲线或S扩增曲线或 $2^{-\Delta Ct}$ 值大于0,则该转基因玉米的cDNA中含有序列1或序列1第1-93位所示的DNA片段;若无S扩增曲线或 $2^{-\Delta Ct}$ 值小于等于0,则该转基因玉米不含序列1或序列1第1-93位所示的DNA片段。

[0050] 本发明再一个目的是提供一种检测转基因植物中导入的外源目的基因是否表达的方法。

[0051] 本发明提供的方法,包括如下步骤:

[0052] 1) 提取待测转基因植物的RNA,再反转录得到cDNA;

[0053] 2) 以所述cDNA为模板,用上述的物质中的引物对进行荧光定量PCR扩增,得到待测转基因植物PCR扩增产物;

[0054] 检测所述待测转基因植物PCR扩增产物,若该扩增产物具有S曲线或S扩增曲线或 $2^{-\Delta Ct}$ 值大于0,则该转基因植物表达或候选表达该外源目的基因;若该扩增产物不具有S曲线或 $2^{-\Delta Ct}$ 值小于等于0,则该转基因植物不表达或候选不表达该外源目的基因。

[0055] 上述中,所述转基因植物为将所述外源目的基因导入野生型植物中得到的植物,且所述外源目的基因的终止子为NOS终止子或至少含有序列1所示核苷酸的NOS终止子部分序列。

[0056] 上述中,所述植物为双子叶植物或单子叶植物。

[0057] 本发明还提供一种检测转基因植物中导入的外源目的基因的表达量的方法,该方法包括如下步骤:

[0058] 1) 提取待测转基因植物的RNA,再反转录得到cDNA;

[0059] 2) 以所述cDNA为模板,用上述的物质中的引物进行荧光定量PCR扩增,得到待测转

基因植物PCR扩增产物；

[0060] 检测待测转基因植物PCR扩增产物和野生型植物PCR扩增产物,采用 $2^{-\Delta Ct}$ 方法计算待测转基因植物中外源目的基因的相对表达量；

[0061] 待测转基因植物中外源目的基因的相对表达量 $=2^{-\Delta Ct}$ ($\Delta Ct = Ct_{(目的基因,样品)} - Ct_{(内参基因,样品)}$)。

[0062] 本发明还提供一种筛选导入外源目的基因表达量高的转基因植物植株的方法,为包括如下步骤:先按照上述的方法计算各个转基因植物单株的外源目的基因表达量;再从中选取表达量最高的单株培育,得到导入外源目的基因表达量高的转基因植物植株。

[0063] 所述野生型植物中表达与所述外源目的基因同源性大于等于70%的基因。

[0064] 所述外源目的基因通过表达外源目的基因载体导入野生型植物；

[0065] 所述表达外源目的基因载体中终止所述外源目的基因表达的终止子为NOS终止子。

[0066] 另一方面,本发明提供了一种检测转基因植物中导入的外源目的基因是否表达的方法,该方法包括如下步骤:对转基因植物cDNA进行3' RACE方法,检测所述cDNA的3'末端紧密连接的载体序列;根据该载体序列设计相应的通用引物对;检测待测转基因植物的cDNA中是否含有与该外源基因紧密相连的序列或其部分序列;若含有,则该转基因植物表达或候选表达外源目的基因;若不含有,则该转基因植物不表达或候选不表达目的基因。

[0067] 优选地,该方法包括如下步骤:

[0068] 1) 对转基因植物cDNA进行3' RACE方法,检测所述cDNA的3'末端紧密连接的载体序列;

[0069] 2) 根据该载体序列设计相应的通用引物对;

[0070] 3) 提取待测转基因植物的RNA,反转录得到cDNA;

[0071] 4) 以该cDNA为模板,用所述通用引物对进行荧光定量PCR扩增,得到待测转基因植物PCR扩增产物;

[0072] 检测所述待测转基因植物PCR扩增产物,若有S曲线或S扩增曲线或 $2^{-\Delta Ct}$ 值大于0,则该转基因植物表达或候选表达该外源目的基因;若该扩增产物不具有S扩增曲线或 $2^{-\Delta Ct}$ 值小于等于0,则该转基因植物不表达或候选不表达该外源目的基因。

[0073] 另一方面,本发明还提供一种检测转基因植物中导入的外源目的基因的表达量的方法,该方法包括如下步骤:

[0074] 1) 对转基因植物cDNA进行3' RACE方法,检测所述cDNA的3'末端紧密连接的载体序列;

[0075] 2) 根据该载体序列设计相应的通用引物对;

[0076] 3) 提取待测转基因植物的RNA,反转录得到cDNA;

[0077] 4) 以所述cDNA为模板,用所述通用引物对进行荧光定量PCR扩增,得到待测转基因植物PCR扩增产物;

[0078] 检测待测转基因植物PCR扩增产物和野生型植物PCR扩增产物,采用 $2^{-\Delta Ct}$ 方法计算待测转基因植物中外源目的基因的相对表达量;

[0079] 待测转基因植物中外源目的基因的相对表达量 $=2^{-\Delta Ct}$ ($\Delta Ct = Ct_{(目的基因,样品)} - Ct_{(内参基因,样品)}$)。

[0080] 另一方面,本发明还提供了一种筛选导入外源目的基因表达量高的转基因植物植株的方法,该方法包括如下步骤:先按照上述方法计算各个转基因植物单株的外源目的基因的表达式;再从中选取表达式最高的单株培育,得到导入外源目的基因表达量高的转基因植物植株。

[0081] 所述转基因植物为将所述外源目的基因导入野生型植物中得到的植物。

[0082] 所述野生型植物中表达与所述外源目的基因同源性大于等于70%的基因。

[0083] 所述外源目的基因通过表达外源目的基因载体导入野生型植物。

[0084] 所述外源目的基因的终止子为NOS终止子(nopaline synthase gene terminator)、CaMV 35S终止子(CAMV 35S terminator)、OCS终止子(octopine synthase gene terminator)、E9终止子(small subunit of rbcS E9 gene terminator)、TR7终止子(T-DNA transcript 7gene terminator)等。

[0085] 另一方面,本发明提供了一种检测转基因植物中导入的外源目的基因是否表达的方法,为检测所述转基因植物的cDNA中是否含有该外源基因的终止子序列或终止子部分序列,若含有,则该转基因植物表达或候选表达外源目的基因;若不含有,则该转基因植物不表达或候选不表达目的基因。

[0086] 优选地,该方法为:提取待测转基因植物的RNA,反转录得到cDNA;

[0087] 以所述转基因植物的cDNA为模板,用针对所述终止子序列或部分序列的引物对进行荧光定量PCR扩增,得到待测转基因植物PCR扩增产物;

[0088] 检测所述待测转基因植物PCR扩增产物,若有S曲线或S扩增曲线或 $2^{-\Delta Ct}$ 值大于0,则该转基因植物表达或候选表达该外源目的基因;若该扩增产物不具有S扩增曲线或 $2^{-\Delta Ct}$ 值小于等于0,则该转基因植物不表达或候选不表达该外源目的基因。

[0089] 另一方面,本发明还提供一种检测转基因植物中导入的外源目的基因的表达式的方法,该方法包括如下步骤:

[0090] 1) 提取待测转基因植物的RNA,再反转录得到cDNA;

[0091] 2) 以所述cDNA为模板,用针对所述外源目的基因的终止子序列或部分序列的引物对进行荧光定量PCR扩增,得到待测转基因植物PCR扩增产物;

[0092] 检测待测转基因植物PCR扩增产物和野生型植物PCR扩增产物,采用 $2^{-\Delta Ct}$ 方法计算待测转基因植物中外源目的基因的相对表达式;

[0093] 待测转基因植物中外源目的基因的相对表达式 $= 2^{-\Delta Ct}$ ($\Delta Ct = Ct_{(目的基因,样品)} - Ct_{(内参基因,样品)}$)。

[0094] 另一方面,本发明还提供了一种筛选导入外源目的基因表达量高的转基因植物植株的方法,该方法包括如下步骤:先按照上述方法计算各个转基因植物单株的外源目的基因的表达式;再从中选取表达式最高的单株培育,得到导入外源目的基因表达量高的转基因植物植株。

[0095] 所述转基因植物为将所述外源目的基因导入野生型植物中得到的植物。

[0096] 所述野生型植物中表达与所述外源目的基因同源性大于等于70%的基因。

[0097] 所述外源目的基因通过表达外源目的基因载体导入野生型植物。

[0098] 所述外源目的基因的终止子为NOS终止子(nopaline synthase gene terminator)、CaMV 35S终止子(CAMV 35S terminator)、OCS终止子(octopine synthase

gene terminator)、E9终止子(small subunit of rbcS E9 gene terminator)、TR7终止子(T-DNA transcript 7gene terminator)等。

[0099] 发明人通过对转基因材料cDNA进行3' RACE,首次证明外源基因转录后紧密相连有一小段载体序列(该序列见序列表1),即NOS终止子部分序列。由于NOS终止子是转基因研究中常用的终止子,基于此研究结果,本发明针对该载体序列片段设计了通用引物,根据该载体序列表达量预测外源基因表达量,可以快速从大量转基因个体中筛选出高效表达外源基因的转基因个体或品种。因此,本发明提供的用于高通量检测转基因表达量及筛选转基因生物的引物及检测方法,可有效解决现有技术中的检测效率不高、准确性不好的问题:1)本发明中采用的通用引物及方法特异性非常好,可以有效解决基因特异引物设计时遇到的非特异问题;2)本发明中采用的通用引物及方法可以明确转入的基因片段是否表达,与植株本身含有的同一基因表达相区别,避免对转入基因是否表达造成误判;3)最重要的是,采用本发明中的通用引物及方法可以实现对含不同目的基因的多种转基因材料进行准确、快速、高效的高通量检测,同时节省成本、时间和人工。

[0100] 因此,本发明首次建立了采用通用引物进行转基因表达量的高通量检测方法,该方法可作为一种应用广泛的检测方法,对转基因产业的发展具有重要意义。

附图说明

[0101] 图1为3' RACE PCR结果。

[0102] 图2为CAUB0084玉米转基因样品实时荧光定量PCR基因特异引物扩增曲线。

[0103] 图3为CAUB0084玉米转基因样品实时荧光定量PCR基因特异引物熔解曲线。

[0104] 图4为CAUB0084玉米转基因样品实时荧光定量PCR通用引物扩增曲线。

[0105] 图5为CAUB0084玉米转基因样品实时荧光定量PCR通用引物熔解曲线。

[0106] 图6为GRMZM2G041175与GRMZM2G059397cDNA序列比对。

[0107] 图7为CAUD0439基因特异引物实时荧光定量PCR熔解曲线。

[0108] 图8为CAUD0439基因通用引物实时荧光定量PCR熔解曲线。

[0109] 图9为CAUB0315基因特异引物实时荧光定量PCR扩增曲线。

[0110] 图10为CAUB0315基因通用引物实时荧光定量PCR扩增曲线。

具体实施方式

[0111] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0112] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0113] 下面结合具体实施例对本发明进行进一步描述,但本发明的保护范围并不仅限于此。

[0114] 下面实施例中的转基因植物以转基因玉米为例,但不限于此,为将目的基因表达盒导入玉米,得到的转基因玉米;其中目的基因表达盒包括启动子、目的基因和NOS终止子。

[0115] Bar基因,NCBI GenBank:KF780168.1,提交日2013.10.24;

[0116] 载体pCXUN:NCBI GenBank:FJ905215;记载在如下文献中Plant Physiol.150(3), 1111-1121(2009)。

[0117] 实施例1、转基因样品cDNA 3'末端连接一小段载体序列的发现及扩增引物与检测

方法的建立

[0118] 一、转基因样品cDNA 3'末端连接一小段载体序列的发现

[0119] 1、提取转基因植株的RNA

[0120] 该专利中采用的所有玉米转基因植株均由中国农业大学作物功能基因组与分子育种研究中心创制。

[0121] 1) 制备转基因玉米

[0122] 首先将目的基因通过TA克隆方法连接到pBCXUN载体,得到过表达载体,将构建好的质粒用热激法转入农杆菌EHA105菌株中,然后通过农杆菌介导法导入玉米B73-329品种中,最终鉴定得到转基因T2纯合株系。

[0123] pBCXUN载体为将Bar抗性基因替换载体pCXUN2个XhoI位点间的HYG基因,pCXUN载体中启动目的基因表达的启动子为玉米Ubiquitin-1,终止子为NOS终止子。

[0124] 2) 转基因玉米植株的RNA提取

[0125] 玉米转基因植株RNA提取采用磁珠法植物总RNA提取试剂盒(购自北京百泰克生物技术有限公司,货号AU3402),具体操作如下:

[0126] 1) 玉米叶片取样放于96孔板中,液氮速冻(每次液氮冻30sec),研磨两次,加入750 μ l裂解液RL,剧烈震荡混匀;

[0127] 2) 37 $^{\circ}$ C孵育12min以使核蛋白体完全分解,期间震荡混匀两次;

[0128] 3) 加入150 μ l氯仿,排枪吸打混匀,之后室温孵育3min;

[0129] 4) 4 $^{\circ}$ C 4000rpm离心20min,小心取上清400 μ l转移到新的RNase free 96深孔板中;

[0130] 5) 加入20 μ l磁珠和400 μ l无水乙醇,震荡混匀,室温孵育10min,期间震荡混匀两次;

[0131] 6) 磁吸2min,弃上清;

[0132] 7) 加入600 μ l去蛋白液RE,混匀孵育5min,磁吸1min,弃上清;

[0133] 8) 加入600 μ l漂洗液RW,混匀孵育3min,磁吸1min,弃上清;

[0134] 9) 重复步骤8一次;

[0135] 10) 晾干,加入RNase-free dH₂O 50 μ l洗脱,混匀孵育5min,磁吸1min,抽取RNA于新的RNase free 96孔板中。

[0136] 2、通过3'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 扩增得到目的基因3'末端的cDNA片段

[0137] 采用SMARTer RACE 5' /3' Kit(购自北京六合通经贸有限公司,货号634858)进行3'-RACE实验,具体操作如下:

[0138] 1) 按下列体积配制Buffer Mix用于cDNA合成反应,在微型离心机上短暂旋转,室温放置,用于第3步实验。

4.0 μ l 5 \times First-Strand Buffer

0.5 μ l DTT (100 mM)

[0139]

1.0 μ l dNTPs (20 mM)

5.5 μ l Total Volume

[0140] 2) 在单独的微量离心管中加入下列试剂,在微型离心机上短暂旋转。72 $^{\circ}$ C孵育3min,42 $^{\circ}$ C冷却2min。冷却后,14,000 \times g下离心10sec,把试剂收集在管底。

- 1.0-11 μl RNA
- [0141] 1.0 μl 3'-CDS Primer A (试剂盒内提供)
- 0-10 μl Sterile H₂O
- 12 μl Total Volume**
- [0142] 3) 室温下按下列体积配制3' -RACE cDNA合成反应液:
- 5.5 μl Buffer Mix from Step 1
- [0143] 0.5 μl RNase Inhibitor (40 U/ μl)
- 2.0 μl SMARTScribe Reverse Transcriptase (100 U)

8.0 μl Total Volume

- [0144] 4) 取第3步的Master Mix 8 μl ,加入到第2步的变性RNA (3' -RACE cDNA) 中。每个cDNA合成反应的总体积为20 μl 。轻柔吸打混匀,短暂离心收集组分于管底。
- [0145] 5) 42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育90min,70 $^{\circ}\text{C}$ 加热10min。
- [0146] 6) 在第一链cDNA合成反应产物中加入Tricine-EDTA Buffer 10 μl 进行稀释,得到3' -RACE-ready cDNA。
- [0147] 7) 以第6步得到的3' -RACE-ready cDNA第一链为模板,进行PCR扩增,把目的基因3' 末端的cDNA片段扩增出来。采用两套PCR引物(巢式引物,见表1)进行两轮PCR扩增反应,在第一轮PCR结束之后,将PCR产物用Tricine-EDTA Buffer稀释50倍作为第二轮PCR的模板。两轮PCR反应液按表2、表3分别配制,两轮PCR的反应程序见表4。

[0148] 表1 3' -RACE扩增所用引物

引物名称	引物序列	备注
3' GSP1	GAGCCTACAGGGTCCCACAG	RACE 第一轮扩增引物, 作为上游引物
3' GSP2	CACCTAGTTTGCTGGAAGACG	RACE 第二轮扩增引物, 作为上游引物
UPM (Universal Primer A Mix)	Long primer: CTAATACGACTCACTATAG GGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT Short primer: CTAATACGACTCACTATAGGGC	试剂盒内提供的含有部分接头序列的通用引物, 作为下游引物

[0150] 表2 3' -RACE第一轮PCR反应体系

试剂	体积
3' -RACE-Ready cDNA	1.0 μl
10 \times UPM (Universal Primer A Mix)	2.0 μl
3' GSP1 (10 μM)	0.4 μl
Nuclease-free dH ₂ O	6.2 μl
2 \times SeqAmp Buffer	10.0 μl
SeqAmp DNA Polymerase	0.4 μl
Total Volume	20.0 μl

[0152] 表3 3' -RACE第二轮PCR反应体系

试剂	体积
DNA (1:50dilution 1 st product)	5.0 μl

10×UPM(Universal Primer A Mix)	1.0μl
3' GSP2 (10μM)	1.0μl
Nuclease-free dH ₂ O	16.5μl
2×SeqAmp Buffer	25.0μl
SeqAmp DNA Polymerase	1.0μl
Total Volume	50.0μl

[0154] 表4 3' -RACE两轮PCR反应程序

PCR反应	温度	时间	循环数
第一轮	94℃	30 sec	25 cycles
	65℃	30 sec	
	72℃	2 min	
第二轮	94℃	30 sec	20 cycles
	65℃	30 sec	
	72℃	2 min	

[0157] 3、RACE产物的确认和鉴定

[0158] 两轮PCR反应结束后,将第一和第二轮PCR产物进行凝胶电泳分析。如图1所示,1、2,3' GSP1/UPM引物对的扩增结果;3、4,3' GSP2/UPM引物对的扩增结果;M,2kb DNA Marker;第二轮PCR产物条带与第二轮产物的条带略小,且与两个GSP引物之间的距离(151bp)相对应,则该条带为特异片段。使用AxyPrep DNA凝胶回收试剂盒(购自康宁生命科学(吴江)有限公司,货号AP-GX-50)回收该片段并进行直接测序,具体步骤如下:

[0159] 1) 在紫外灯下切下含有目的DNA的琼脂糖凝胶,用纸巾吸尽凝胶表面液体并切碎。计算凝胶重量(提前记录1.5ml离心管重量),该重量作为一个凝胶体积(如100mg=100μl体积)。

[0160] 2) 加入3个凝胶体积的Buffer DE-A,混合均匀后于75℃加热,间断混合(每2-3min),直至凝胶块完全熔化(约6-8min)。

[0161] 3) 加0.5个Buffer DE-A体积的Buffer DE-B,混合均匀;当分离的DNA片段小于400bp时,加入1个凝胶体积的异丙醇。

[0162] 4) 吸取步骤3中的混合液,转移到DNA制备管(置于2ml(试剂盒内提供)离心管)中,12,000×g离心1min。弃滤液。

[0163] 5) 将制备管置回2ml离心管,加500μl Buffer W1,12,000×g离心30sec,弃滤液。

[0164] 6) 将制备管置回2ml离心管,加700μl Buffer W2,12,000×g离心30sec,弃滤液。以同样的方法再用700μl Buffer W2洗涤一次12,000×g离心1min。

[0165] *确认在Buffer W2 concentrate中已按试剂瓶上的指定体积加入无水乙醇。

[0166] 7) 将制备管置回2ml离心管中,12,000×g离心1min。

[0167] 8) 将制备管置于洁净的1.5ml离心管(试剂盒内提供)中,在制备膜中央加25-30μl去离子水,室温静置1min。12,000×g离心1min洗脱DNA。

[0168] 将测序结果与构建的载体序列进行比对,首次证明外源基因转录后紧密相连有一小段载体序列,即NOS终止子部分序列,其核苷酸序列为序列1。

[0169] 因此可以通过检测转基因植物的cDNA中是否含有序列1所示的NOS终止子部分序

列去判断该转基因植物是否表达目的基因,若转基因植物的cDNA中含有序列1所示的NOS终止子部分序列,则该转基因植物表达目的基因;若转基因植物的cDNA中不含有序列1所示的NOS终止子部分序列,则该转基因植物不表达目的基因。

[0170] 二、用于检测序列1所示的NOS终止子部分序列的通用引物的设计

[0171] 由于NOS终止子是转基因研究中常用的终止子,基于此研究结果,针对序列1所示的NOS终止子部分序列设计了通用引物GTY-rF和GTY-rR,由于该部分序列与外源基因转录后紧密相连,所以可以根据 $2^{-\Delta Ct}$ 方法计算该部分序列表达量预测外源基因表达,可以快速从大量转基因个体中筛选出高效表达外源基因的转基因个体或品种。

[0172] 通用引物如表5所示:

[0173] 表5实时荧光定量PCR扩增所用引物

[0174]

引物名称	引物序列(5' → 3')	备注
GTY-rF	AGTATTGGGGATCCGAATTTTC(序列2)	通用正向引物
GTY-rR	GATAATCATCGCAAGACCG(序列3)	通用反向引物
ZmActin-rF	GAGCTCCGTGTTTCGCCTGA	玉米内参基因正向引物
ZmActin-rR	CAGTTGTTTCGCCACTAGCG	玉米内参基因反向引物
B0030-rF	TGGAGTGTAATAATGACCCAAAGC	GRMZM2G046021基因正向引物
B0030-rR	TCTTCTGGCTTTATCAGTCTTCTTGG	GRMZM2G046021基因反向引物
B0084-rF	GGAGGAGAATGTGGCTACAGAGACC	GRMZM2G117633基因正向引物
B0084-rR	TCTTATAGAGAACTTCCCCTCGGG	GRMZM2G117633基因反向引物
B0086-rF	CATGCCGCCTAAATCCGATAGCG	GRMZM2G177942基因正向引物
B0086-rR	TGAAGGAAATCTGTCCACTGTACGCC	GRMZM2G177942基因反向引物
B0109-rF	CCATTGAGTACCAAAGGCTCGTGAG	GRMZM2G409658基因正向引物
B0109-rR	TGGTGCAGTGACTACTGCTGC	GRMZM2G409658基因反向引物
B0118-rF	GTTTAGCAGGATGAGCGAGCGAG	GRMZM2G151639基因正向引物
B0118-rR	CTAGAGGGCGGATGAACGGCAG	GRMZM2G151639基因反向引物
B0133-rF	AAGAGCCGTACGTTTACGAGGGT	GRMZM2G072089基因正向引物
B0133-rR	TTAGGTTGCTGGCCCTGGC	GRMZM2G072089基因反向引物
B0243-rF	GAGGTGGAACATGCTCTGGACG	GRMZM2G049538基因正向引物
B0243-rR	CAACTTCTGTGCGCAAATTGTAGC	GRMZM2G049538基因反向引物
B0315-rF	AGGACCCGCTCCGTGATA	GRMZM2G165755基因正向引物
B0315-rR	CCTGCTCTGCTTGTGCTGGA	GRMZM2G165755基因反向引物
B0406-rF	GGATGTCCGAAGGGAGGTT	GRMZM2G109843基因正向引物
B0406-rR	CACCTTCGCACAGCTCCAT	GRMZM2G109843基因反向引物
B0476-rF	CGGTCGTGGTGGACTACTTCT	GRMZM2G063550基因正向引物
B0476-rR	GGCAGATCGACCGTTCCTT	GRMZM2G063550基因反向引物
B0634-rF	GGTGGAGCCATTGGAAGCC	GRMZM2G008425基因正向引物
B0634-rR	TGGACCCACCCACCTGCTT	GRMZM2G008425基因反向引物
B0706-rF	CTTCAAGCACGGGGAGACG	GRMZM2G025387基因正向引物
B0706-rR	CAAATCCTTTGCACCATTGGAT	GRMZM2G025387基因反向引物

B0712-rF	TAGTCCGCCAAATGCTCAAAGT	GRMZM2G053868基因正向引物
B0712-rR	CCCTGGCTTAATGAAATCTGACA	GRMZM2G053868基因反向引物
B0750-rF	GACCCGCACCCTCAACATC	GRMZM2G019119基因正向引物
B0750-rR	CCTCAAGCCACCTAGCCACAT	GRMZM2G019119基因反向引物
D0439-rF	CTAAACTTCGTACCTTCCTGC	GRMZM2G041175基因正向引物
D0439-rR	TCGTTGCTCCAGGTCTTG	GRMZM2G041175基因反向引物

[0175] 三、检测转基因植物中目的基因表达的方法的建立

[0176] 1、提取转基因植物的RNA

[0177] 待测转基因玉米为通过pBCXUN载体骨架将目的基因导入玉米B73-329品种得到的转基因玉米。

[0178] 待测转基因玉米采用磁珠法植物总RNA提取试剂盒(购自北京百泰克生物技术有限公司,货号AU3402)提取RNA,具体操作同实施例1。

[0179] 以上述1得到的RNA为模板,使用High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits(购自Thermo Scientific公司,货号4368814)将总RNA转化为cDNA。反转录(RT)操作按照试剂盒说明书进行,反转录体系如表6所示,反转录的反应程序见表7。

[0180] 表6反转录(RT)反应体系

试剂	体积	终浓度
10× RT buffer (反转录缓冲液)	2.0 μl	1×
25× dNTP Mix (脱氧核苷三磷酸), 100 mM	0.8 μl	1×
10× RT Random Primers (随机引物)	2.0 μl	-
MultiScribe™ Reverse Transcriptase (MultiScribe™ 反转录酶), 50 U/μl	1.0 μl	-
RNase Inhibitor (RNA 酶抑制剂)	1.0 μl	-
RNA Template (RNA 样本)	X μl	1.5 μg-2 μg
Nuclease-free dH ₂ O (无核酸酶水)	Up to 20μl	-

[0182] 表7反转录(RT)反应程序

设置	温度	时间
Step 1	25°C	10min
Step 2	37°C	120min
Step 3	85°C	5min
Step 4	4°C	∞

[0184] 2、实时荧光定量PCR扩增

[0185] 以上述1得到的cDNA为模板,用上述二设计的通用引物GTY-rF和GTY-rR进行实时荧光定量PCR。

[0186] 以未转入目的基因的野生型玉米为对照,以表5所示的玉米内源基因引物为内参引物。

[0187] 上述实时荧光定量PCR采用SYBR Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (购自

Takara公司,货号RR820A)进行扩增,反应体系如表8所示,反应程序见表9。

[0188] 表8荧光定量PCR反应体系

	试剂	体积	终浓度
	SYBR Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus), Bulk	7.50 μ l	1 \times
	正向引物 (10 μ M)	0.60 μ l	0.4 μ M
[0189]	反向引物 (10 μ M)	0.60 μ l	0.4 μ M
	50 \times ROX Reference Dye (ROX 参比染料)	0.06 μ l	0.2 \times
	cDNA (cDNA 样本)	1.20 μ l	100 ng
	Nuclease-free dH ₂ O (无核酸酶水)	5.04 μ l	
	总计	15.00 μ l	

[0190] 表9荧光定量PCR反应程序(两步法PCR)

	步骤	温度	时间	循环数
	Stage 1: 预变性	95 $^{\circ}$ C	30 sec	1 cycles
	Stage 2: PCR反应	95 $^{\circ}$ C	5 sec	40 cycles
[0191]		60 $^{\circ}$ C	34 sec	
	Stage 3: Melt Curve	95 $^{\circ}$ C	15 sec	1 cycles
		60 $^{\circ}$ C	1 min	
		95 $^{\circ}$ C	15 sec	

[0192] 检测荧光定量PCR结果,

[0193] 若待测转基因玉米的荧光定量PCR得到S扩增曲线或 $2^{-\Delta Ct}$ 值大于0,则该待测转基因玉米表达或候选表达目的基因;

[0194] 若待测转基因玉米的荧光定量PCR未得到S扩增曲线或 $2^{-\Delta Ct}$ 值小于等于0,则该待测转基因玉米不表达或候选不表达目的基因。

[0195] 上述 $2^{-\Delta Ct}$ 值按照如下方法获得:

[0196] 通用引物只在转基因样品中有扩增,而野生型对照WT没有扩增,采用 $2^{-\Delta Ct}$ 方法($\Delta Ct = Ct_{(目的基因,样品)} - Ct_{(内参基因,样品)}$)计算待检测样品中该载体片段表达量,进而预测目的基因的表达量。

[0197] 基因特异引物在野生型对照WT与转基因样品中均有扩增,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法($\Delta\Delta Ct = (Ct_{(目的基因,样品)} - Ct_{(内参基因,样品)}) - (Ct_{(目的基因,WT)} - Ct_{(内参基因,WT)})$)计算转基因样品中相对于野生型对照目的基因表达的倍数差异。

[0198] 实施例2、检测转基因植物中目的基因的表达

[0199] 下面实施例中均以目的基因设计的特异引物对作为对照,以实施例1得到的通用引物对作为实验组。

[0200] 一、检测转基因植物中目的基因表达,且该转基因植物的宿主目的植物本身表达该目的基因

[0201] 待测转基因玉米为CAUB0084转基因玉米,其为通过pBCXUN载体骨架将目的基因(GRMZM2G117633;http://ensembl.gramene.org/Zea_mays/Info/Index)导入玉米B73-329

品种得到的转基因玉米。

[0202] 实验组：

[0203] 采用实施例1的三方法提取CAUB0084转基因玉米4个株系和未转基因的野生型玉米B73-329的RNA,反转录得到cDNA。以上述cDNA为模板,用实施例1的三方法的通用引物GTY-rF和GTY-rR进行实时荧光定量PCR。

[0204] 对照组：

[0205] 采用实施例1的三方法提取CAUB0084转基因玉米4个株系和未转基因的野生型玉米B73-329的RNA,反转录得到cDNA。以上述cDNA为模板,用表5所示的特异引物B0084-rF和B0084-rR进行实时荧光定量PCR。

[0206] 每个株系取3个单株,每个单株3个技术重复。

[0207] 对照组的基因特异引物的熔解曲线分析结果如图3所示,CAUB0084转基因样品与野生型植株WT中特异引物熔解曲线呈单峰型,表明该特异引物具有极高的特异性;对扩增曲线图谱分析如图2所示,特异引物在野生型植株WT和4个CAUB0084转基因株系中均得到S扩增曲线;无法直接由扩增图谱鉴定转基因玉米中目的基因是否表达,需要通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算鉴定目的基因相对于野生型对照的表达倍数(表10),计算结果表明4个转基因株系中GRMZM2G117633的表达量相对于野生型对照都有较大提高。

[0208] 实验组的通用引物的熔解曲线分析结果如图5所示,CAUB0084转基因样品中通用引物的熔解曲线呈单峰型,表明通用引物具有极高的特异性,而野生型植株WT中没有出现峰;对扩增曲线图谱分析如图4所示,通用引物在野生型植株WT中没有扩增,通用引物在4个CAUB0084转基因株系中均能得到S扩增曲线,直接由扩增图谱即可判定转基因植株中目的基因均有表达;且具体表达量可采用 $2^{-\Delta CT}$ 计算(表10),计算结果表明4个转基因株系中导入的外源GRMZM2G117633均实现了表达。

[0209] 表10 CAUB0084转基因植株目的基因表达结果

	样品编号	特异引物 ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	通用引物 ($2^{-\Delta CT}$)
[0210]	野生型对照 (WT)	1	-
	CAUB0084-1	97.4	51.5
	CAUB0084-2	21.0	4.0
[0211]	CAUB0084-3	13.7	5.4
	CAUB0084-4	9.3	4.4

[0212] 上述结果表明,本发明的通用引物和方法可以用于检测宿主本身表达目的基因的转基因植物中转入的外源目的基因是否表达,并可以计算其相对表达量。且检测结果与特异引物一致,表明本发明的方法正确。

[0213] 二、检测转基因植物中目的基因表达,且该转基因植物的宿主目的植物本身表达该目的基因同源基因

[0214] 待测转基因玉米为CAUD0439转基因玉米,其为通过pBCXUN载体骨架将目的基因(GRMZM2G041175;序列可从如下网站获得http://ensembl.gramene.org/Zea_mays/Info/Index)导入玉米B73-329品种得到的转基因玉米。

[0215] 实验组：

[0216] 采用实施例1的三方法提取CAUD0439转基因玉米6个株系和未转基因的野生型玉

米B73-329的RNA,反转录得到cDNA。以上述cDNA为模板,用实施例1的三方法的通用引物GTY-rF和GTY-rR进行实时荧光定量PCR。

[0217] 对照组:

[0218] 采用实施例1的三方法提取CAUD0439转基因玉米6个株系和未转基因的野生型玉米B73-329的RNA,反转录得到cDNA。以上述cDNA为模板,用表5所示的特异引物D0439-rF和D0439-rR进行实时荧光定量PCR。

[0219] 每个株系取3个单株,每个单株3个技术重复。

[0220] 使用DNAMAN软件分析,目的基因 (GRMZM2G041175) cDNA序列与玉米基因组中GRMZM2G059397cDNA序列同源性高达75% (图6)。

[0221] 对照组特异引物的熔解曲线分析如图7所示,CAUD0439转基因样品与野生型植株WT中特异引物熔解曲线均出现双峰或多峰现象,表明该特异引物特异性差,无法用于基因表达量的分析。

[0222] 实验组通用引物的熔解曲线分析如图8所示,野生型植株WT中没有出现峰,而6个CAUD0439转基因样品中通用引物的熔解曲线均呈单峰型,表明通用引物具有极高的特异性,可以进行基因表达量分析。

[0223] 具体表达量采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算 (表11),结果表明6个转基因株系中导入的外源GRMZM2G041175均实现了表达。

[0224] 表11 CAUD0439转基因植株目的基因表达结果

样品编号	特异引物 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	通用引物 ($2^{-\Delta Ct}$)
[0225] 野生型对照 (WT)	-	-
[0226] CAUD0439-1	-	1.9
CAUD0439-2	-	3.1
CAUD0439-3	-	1.2
CAUD0439-4	-	0.4
CAUD0439-5	-	2.2
CAUD0439-6	-	145.5

[0227] 上述结果表明,本发明的通用引物和方法特异性非常好,可以有效解决基因特异引物设计时遇到的非特异问题。

[0228] 用常规方法如RT-PCR,可以检测6个转基因株系均表达,证明本发明方法正确。

[0229] 三、检测转基因植物中目的基因表达,且与该转基因植物的宿主目的植物本身基因表达相区别

[0230] 待测转基因玉米为CAUB0315转基因玉米,其为通过pBCXUN载体骨架将目的基因 (GRMZM2G165755;序列可从如下网站http://ensembl.gramene.org/Zea_mays/Info/Index) 导入玉米B73-329品种得到的转基因玉米。

[0231] 实验组:

[0232] 采用实施例1的三方法提取CAUB0315转基因玉米6个株系和未转基因的野生型玉米B73-329的RNA,反转录得到cDNA。以上述cDNA为模板,用实施例1的三方法的通用引物GTY-rF和GTY-rR进行实时荧光定量PCR。

[0233] 对照组:

[0234] 采用实施例1的三方法提取CAUB0315转基因玉米5个株系和未转基因的野生型玉

米B73-329的RNA,反转录得到cDNA。以上述cDNA为模板,用表5所示的特异引物B0315-rF和B0315-rR进行实时荧光定量PCR。

[0235] 每个株系取3个单株,每个单株3个技术重复。

[0236] 对照组:

[0237] 采用实施例2的方法提取CAUB0315转基因玉米和未转基因的野生型玉米的RNA,反转录得到cDNA作为模板,用基因特异引物进行荧光定量PCR扩增。每个株系取3个单株,每个单株3个技术重复。

[0238] 对照组基因特异引物的熔解曲线分析,CAUB0315转基因样品与野生型植株WT中特异引物熔解曲线呈单峰型,表明该特异引物具有极高的特异性;对扩增曲线图谱分析如图9所示,野生型植株WT和5个CAUB0315转基因样品的Ct值接近, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算结果表明5个转基因株系中GRMZM2G165755的表达量相对于野生型对照都没有提高,甚至有些降低(表12)。

[0239] 实验组通用引物的熔解曲线分析发现,CAUB0315转基因样品中通用引物的熔解曲线呈单峰型,表明通用引物具有极高的特异性,而野生型植株WT中没有出现峰。对扩增曲线图谱分析发现(图10),通用引物在野生型植株WT中没有扩增,在5个CAUB0315转基因株系中均能得到S扩增曲线,直接由扩增图谱即可判定转基因植株中导入的目的基因均有表达;且具体表达量可采用 $2^{-\Delta Ct}$ 计算(表12)。

[0240] 表12 CAUB0315转基因植株目的基因表达结果

[0241]

样品编号	特异引物 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	通用引物 ($2^{-\Delta Ct}$)
野生型对照 (WT)	1	-
CAUB0315-1	0.051	0.333
CAUB0315-2	0.003	0.0483
CAUB0315-3	0.017	0.162
CAUB0315-4	0.519	3038.162
CAUB0315-5	0.052	0.063

[0242] 上述结果表明,本发明中采用的通用引物及方法可以明确转入的基因片段是否表达,与植株本身含有的同一基因表达相区别,避免对转入基因是否表达造成误判。

[0243] 四、本发明通用引物和现有特异引物的分析比较

[0244] 按照前面一的方法分别将如下GRMZM2G046021基因、GRMZM2G177942基因、GRMZM2G409658基因、GRMZM2G151639基因、GRMZM2G072089基因、GRMZM2G049538基因、GRMZM2G109843基因、GRMZM2G063550基因、GRMZM2G008425基因、GRMZM2G025387基因、GRMZM2G053868基因、GRMZM2G019119基因通过pBCXUN载体骨架导入玉米B73-329品种得到的转基因玉米;共得到56个转基因株系。

[0245] 按照前面一的方法用相应的基因特异引物和通用引物进行基因表达量分析,检测结果表明通用引物分析结果与基因引物分析结果基本一致。这些结果表明本检测中采用的通用引物及方法特异性好,准确性好,重复性好。

[0246] 从检测成本考虑,以每种转基因植株检测3个株系,每个株系检测3个单株,每个单株每个基因做3次技术重复计算,若采用基因特异引物分析,则1个384孔板只能检测15个株系,而采用本检测中的通用引物可以检测42个株系(表13)。采用本检测中的通用引物及方法,可以实现对含不同目的基因的多种转基因材料进行准确、快速、高效的高通量检测,同

时节省成本、时间和人工。

[0247] 表13基因特异引物和通用引物检测通量对比

	引物 (对)	技术重复 (次)	取样单株 (个)/株系	分析株系(个)/384孔板
[0248]	特异引物	2	3	15(含WT)
	通用引物	1	3	42

[0249] 上述具体实施方式仅仅是对本发明的优选实施方式进行描述,并非对本发明的范围进行限定,在本发明的精神和权利要求的保护范围内,对本发明作出的任何修改和改变,均应落入本发明的保护范围。

序列表

<110> 中国农业大学

<120> 一种检测转基因植物中目的基因表达的通用引物及检测方法

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 178

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

agtattgggg atccgaattt ccccgatcgt tcaaacattt ggcaataaag tttcttaaga	60
ttgaatcctg ttgccgtct tgcgatgatt atcatataat ttctgttgaa ttacgttaag	120
catgtaataa ttaacatgta atgcatgacg ttatttatga gatgggtttt tatgatta	178

[0001]

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

agtattgggg atccgaattt c	21
-------------------------	----

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

[0002] gataatcatc gcaagaccg	19
-----------------------------	----

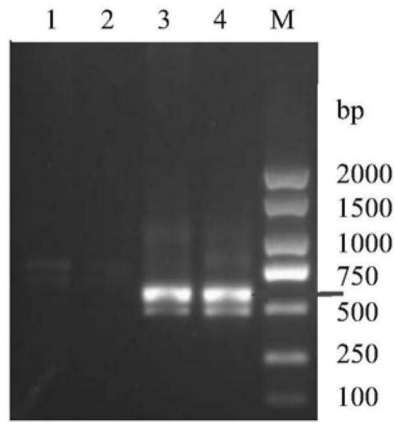


图1

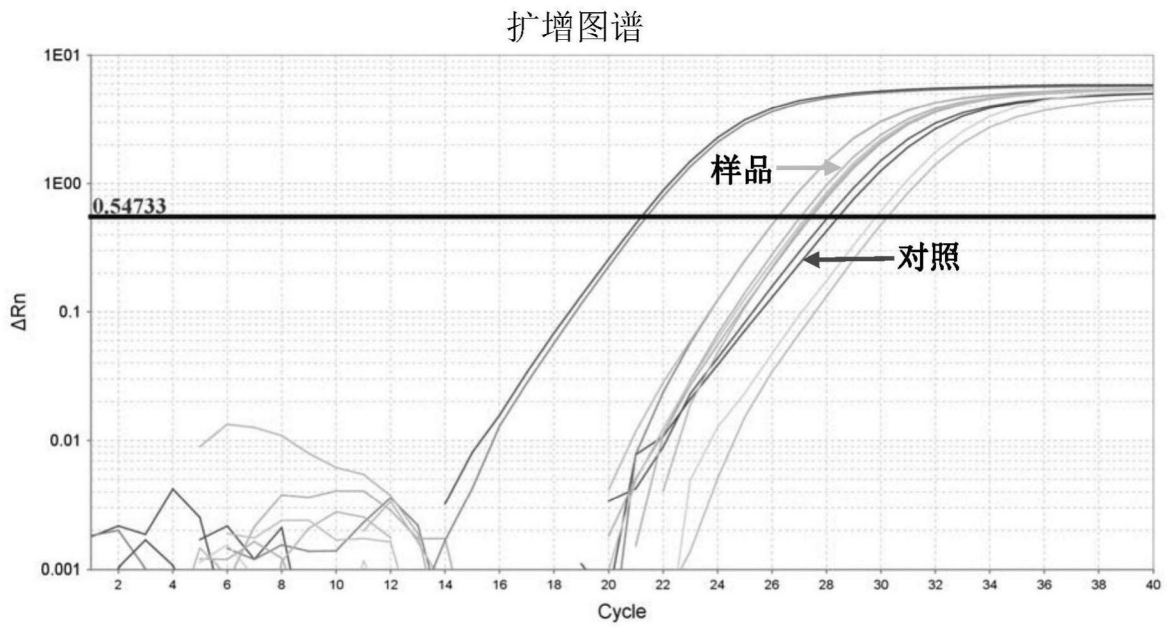


图2

熔解曲线图谱

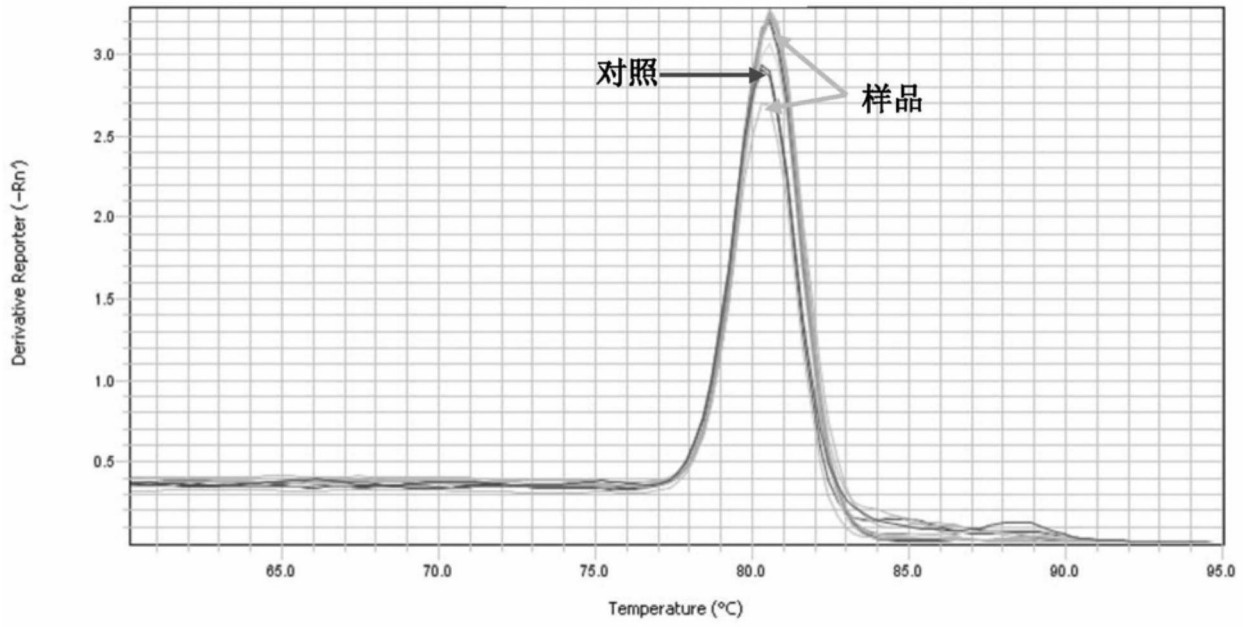


图3

扩增图谱

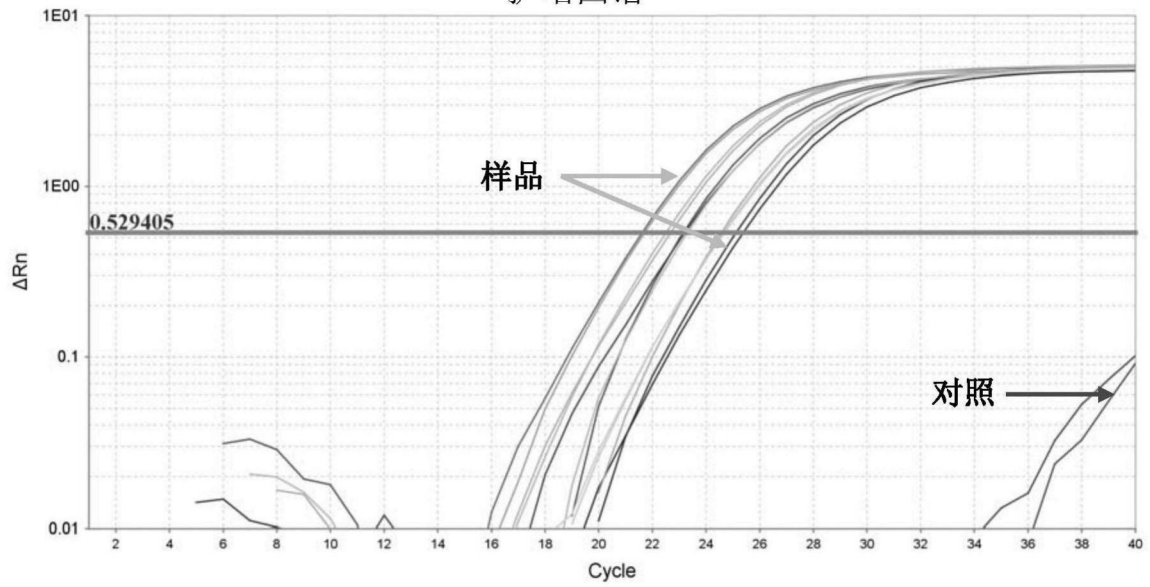


图4

熔解曲线图谱

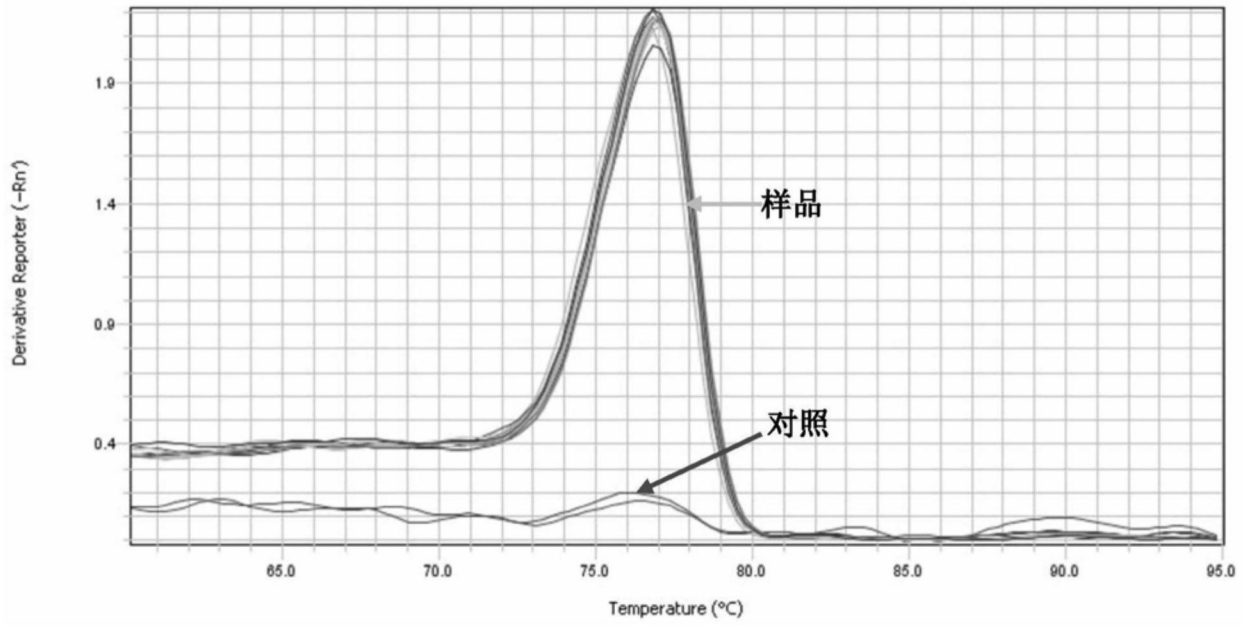


图5

GRMZM2G041175.se	ATGGCCTCCGGCTGAGCAACAACCTGATCGGGGCTCTAACTTCGTCACTTCCTGCTC	60
GRMZM2G059397.se	ATGGCGATCCGGATGAGCAACAACGTGATCGGCGCGCTGAACCTGGTGACACTCCTGCTC	60
Consensus	atggc tccgg tgagcaacaac tgatcgg g ct aac t gt ac tcctgctc	
GRMZM2G041175.se	TCGGTCCCATCCTGGGCGCGGCATCTGGCTGGCCACCGCGCCGACGGCACCAGTGC	120
GRMZM2G059397.se	TCGGTCCCATCCTCGTCTCGGAATCTGGCTGGGTCGCGCGCCGACGGCACCAGTGC	120
Consensus	tc gtccc atcct g c cggg atctggtg g cgcgccgacggcaccgagtgc	
GRMZM2G041175.se	GAGCGTACCTTCGGCGCCGTCATCGCGCTGGGCGCTTCCTCCTCGCCGTCTCCCTG	180
GRMZM2G059397.se	GACCACCTCCTGTCACCCCGGCATCGCGCTGGGCGGCTGCTCATGGCCGTCTGCTG	180
Consensus	ga c c cct tc c cc g catcgcgctggg gc t ctc t gccgtc c t	
GRMZM2G041175.se	GCGGGCCTCGTCGGCGCCTGCTGCCGCTCACCTGGCTGCTTGGGCTACCTCCTCGCC	240
GRMZM2G059397.se	GCGGGCCTCGTCGGCGCCTGCTGCCGCTCACCTGGCTGCTTGGGCTACCTCCTCGCC	240
Consensus	gcgggcctcg cggcgctgct ccgcg cacctggtgct tgg ctacctctcgcc	
GRMZM2G041175.se	ATGTCGTCTCATCT	300
GRMZM2G059397.se	ATGTCGTCTCATCT	300
Consensus	atg tcgt tcate tgc ct tctgcttaccgtcttgccttcg cgtcaccac	
GRMZM2G041175.se	AGGGGCGCCGGGAGGCGCTTCGCGCCGGATACAGGAGTACCGCCTCGGGGACTAC	360
GRMZM2G059397.se	AGGGGCGCCGGGAGGCGCTTCGCGCCGGATACAGGAGTACCGCCTCGGGGACTAC	360
Consensus	aggggcgccgg gaggcct tc gg gg taca ggagtaccgcctcggggactac	
GRMZM2G041175.se	TCCAACCTGGTGCAGAAAGCGCTCGAGAACACAGGAAGTGGGACCGGATCAGGAGCTGC	420
GRMZM2G059397.se	TCCAACCTGGTGCAGAAAGCGCTCGAGAACACAGGAAGTGGGACCGGATCAGGAGCTGC	420
Consensus	tcca ctggctgc g c cgtcga a c ca g actggg ccggtc ggagctgc	
GRMZM2G041175.se	CTCCAGGACTTCAAGGTCTGCAAGAGCCTCAGGACA.....AGAACGAGACCGTCT	471
GRMZM2G059397.se	CTCCAGGACTTCAAGGTCTGCAAGAGCCTCAGGACA.....AGAACGAGACCGTCT	480
Consensus	ctc gac c a gtctgca g gcctg agga a aga c ag cg	
GRMZM2G041175.se	GCCAGTTCATGAGTTCCAGCTTCCCCATCGAGTCTGGCTGCTGCAAGCCGCCACG	531
GRMZM2G059397.se	GCGGGTCTGCTCGGCTCGCCCTGTCGCCGTCGAGTCCGGTGCTGCAAGCCGCCACG	540
Consensus	gc t t g c gcct tccc tgcagtc gg tgctgcaagcc cccac	
GRMZM2G041175.se	AGCTGCGGCTACACCTACGTGGCGGCACGGAATGGACGCGGTGACCAACTCGAGG	591
GRMZM2G059397.se	AGCTGCAACTTACAGTACACCGCGGCACGAGTGGACGAGACAGCGGGGCTCCGCG	600
Consensus	agctgc ct cac tac cggcggcacgga tggac g c c ctc cg	
GRMZM2G041175.seGACCGGACTGCAAGACTGGAGCAACGACGCTCGCGCTCTGCTACAATGC	645
GRMZM2G059397.se	CCCGCCGGCGGACTGCAAGACTGGAGCAACGACGCTCGCGCTCTGCTACAATGC	660
Consensus	g cc ggactgca c tgg gcaacgacg g ctctgctac tgc	
GRMZM2G041175.se	CAGTCGTGCAAGGCCGGCGTGGTGGCAAGCTTCCAGCGGAAGTGAAGCGGTCGCGGTC	705
GRMZM2G059397.se	CAGTCGTGCAAGGCCGGCGTGGTGGCAAGCTTCCAGCGGAAGTGAAGCGGTCGCGGTC	720
Consensus	cagtcgtgcaaggccggcgtggtgg c cg tc agcgg actggaagcg g cgcc tc	
GRMZM2G041175.se	GTCTGATCGTCTTCCTCTCTTCATCATCATCTGCTTACTCCGTCGGCTGCTGCGCCTTC	765
GRMZM2G059397.se	GTCAACGTCGTCTTCCTCTCTTCATCATCATCTGCTTACTCCGTCGGCTGCTGCGCCTTC	780
Consensus	gtc c tcgtc tctc cttcatc tc tcgt tactccgtcggctgctgcgcccttc	
GRMZM2G041175.se	AGGAACAACCGCAGAGACAAC...GCCTACCGCGCGG.....GTGGAAG...GGCGGG	813
GRMZM2G059397.se	AAGAACAACCGCAGAGACAAC...GCCTACCGCAGCGCGCGGATGGAACGAGGCGGT	840
Consensus	a gaaca ccgc g gacaac gcctacc c gcgg tggaa ggccg	
GRMZM2G041175.se	TACGCTTG	821
GRMZM2G059397.se	GACGCTTA	848
Consensus	acgctt	

图6

熔解曲线图谱

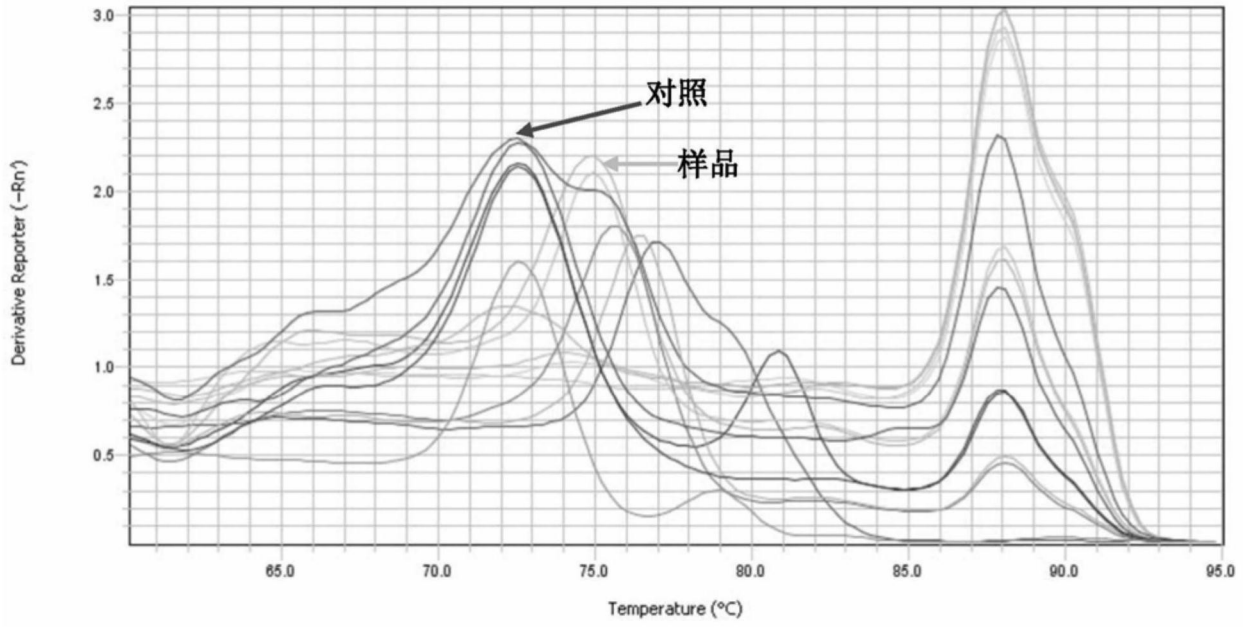


图7

熔解曲线图谱

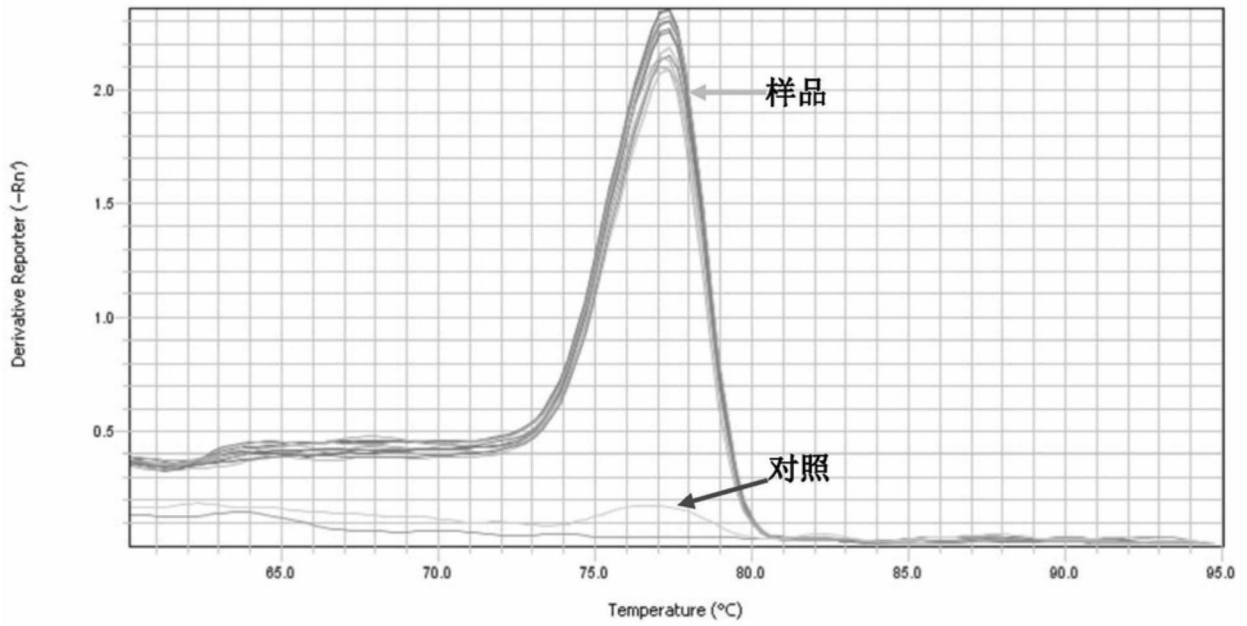


图8

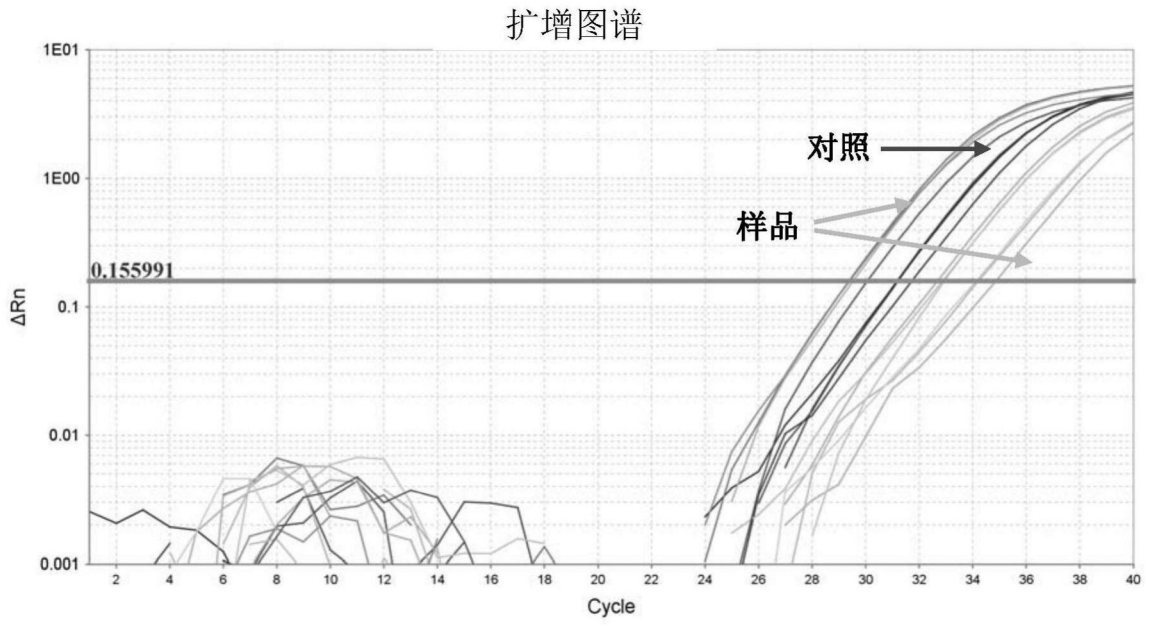


图9

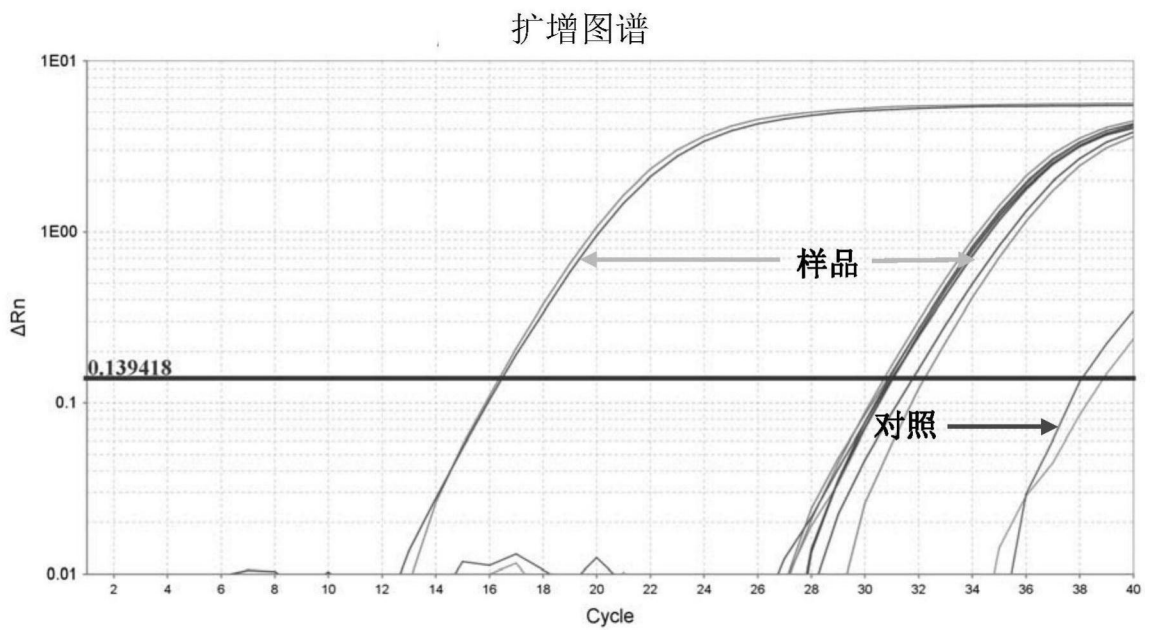


图10