

铁原毓, 文军琴, 田洁. 转 *As6G-FFT* 基因烟草的阳性鉴定及基因拷贝数测定 [J]. 福建农业学报, 2022, 37 (5): 592–599.

TIE Y Y, WEN J Q, TIAN J. Identification and Copy Number of *As6G-FFT* in Transgenic Tobacco Plant [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2022, 37 (5): 592–599.

转 *As6G-FFT* 基因烟草的阳性鉴定及基因拷贝数测定

铁原毓¹, 文军琴¹, 田洁^{1,2*}

(1. 青海大学农林科学院/青海省蔬菜遗传与生理重点实验室, 青海 西宁 810016;

2. 省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室, 青海 西宁 810016)

摘要:【目的】为验证转 *As6G-FFT* 烟草的基因功能, 筛选稳定遗传的阳性株系材料, 以建立基于 SYBR Green 的实时荧光定量 PCR 的转基因拷贝数检测方法。【方法】利用 PCR 检测、实时荧光定量 PCR (Real-time quantitative PCR, qRT-PCR) 技术及生理指标分析鉴定转 *As6G-FFT* 基因阳性烟草植株, 并利用基于 SYBR Green 的实时荧光定量 PCR 鉴定阳性转基因烟草中 *As6G-FFT* 基因的拷贝数。【结果】(1) 基于 PCR 检测, 14 个转基因烟草叶片均能扩增出目的片段, 表明 14 个株系中均已成功转入目的基因 *As6G-FFT*; (2) 14 个转基因株系中 *As6G-FFT* 基因表达量呈极显著 ($P < 0.01$) 或极其显著上升 ($P < 0.001$), 其中 6 个株系的表达量呈极其显著升高 ($P < 0.001$); 且其表达量与野生型相比最高提高 215.13 倍; (3) 基于生理指标, 测定转 *As6G-FFT* 基因烟草的果聚糖含量, 发现 14 个转基因株系中果聚糖含量呈极显著 ($P < 0.01$) 或极其显著上升 ($P < 0.001$), 其中 13 个株系的果聚糖含量极其显著升高 ($P < 0.001$); 且其果聚糖含量与野生型相比最高提高 10.47 倍; (4) 基于 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 构建 *As6G-FFT* 和 *NtACT* 基因的标准曲线, 分别为 $y = -0.2907x + 3.0145$ 和 $y = -0.2813x + 8.0141$, R^2 均为 1; 在检测的 14 个转基因株系中 *As6G-FFT* 基因拷贝数为 1~3, 其中 1、2 和 3 拷贝的单株数分别占总数的 35.7%、50.0% 和 14.3%。【结论】本研究从 DNA、RNA 和生理水平综合进行阳性转基因烟草的鉴定, 鉴定结果更为准确。此外, 还建立了基于 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 的转基因烟草中外源 *As6G-FFT* 基因拷贝数检测方法, 可用于快速、高效地估算转基因烟草中外源基因拷贝数, 为后续获得稳定遗传材料提供筛选依据。

关键词: *As6G-FFT* 基因; 转基因烟草; 阳性鉴定; 拷贝数

中图分类号: S 572

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2022) 05-0592-08

Identification and Copy Number of *As6G-FFT* in Transgenic Tobacco Plant

TIE Yuanyu¹, WEN Junqin¹, TIAN Jie^{1,2*}

(1. Qinghai Key Laboratory of Vegetable Genetics and Physiology/Agriculture and Forestry Sciences Institute,

Qinghai University, Xining, Qinghai 810016, China; 2. State Key Laboratory of

Plateau Ecology and Agriculture, Xining, Qinghai 810016, China)

Abstract: 【Objective】Functions, identification, and copy number of *As6G-FFT* in the transgenic tobacco plants were studied. 【Method】PCR, qRT-PCR, and physiological analysis were performed to confirm the transgenic tobacco plants being *As6G-FFT*-positive and elucidate the functions of the gene. SYBR green-based qRT-PCR was applied to determine the copy number of the gene in the transgenic plant. 【Result】(1) The target fragment was amplified on the leaves of 14 tobacco plants by PCR assuring a successful transfer of *As6G-FFT*. (2) In varying degrees, the gene expressions in the 14 transgenic lines were higher than in the wild-type. Six of the lines were extremely significantly higher than the wild-type counterpart, with an accumulation topped 215.13-fold. (3) The fructan contents were higher in the leaves of the transgenic than the wild-type plants. Thirteen of the transgenic lines contained extremely significantly more fructan than the wild-type with the highest accumulation of 10.47-fold. (4) With correlation coefficients of 1, the SYBR green-based qRT-PCR standard curves of $y = -0.2907x + 3.0145$ was obtained for *As6G-FFT* and $y = -0.2813x + 8.0141$ for *NtACT*. Of the 14 transgenic lines, 35.7% contained only one

收稿日期: 2022-01-12 初稿; 2022-03-23 修改稿

作者简介: 铁原毓 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 蔬菜分子生物学 (E-mail: healer2727@163.com)

* 通信作者: 田洁 (1986-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 蔬菜生理与分子生物技术 (E-mail: tiantian8092001@163.com)

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31960590); 青海省科技厅重点实验室项目 (2020-ZJ-Y02); 中国科学院“西部之光”项目 (2019 年)

of the gene, 50.0% had 2, and 14.3% 3 copies. 【Conclusion】 Transgenic tobacco plants with *As6G-FFT* were identified based on the DNA, RNA, and physiological aspects. The SYBR green-based qRT-PCR method rapidly and efficiently determined the number of exogenous *As6G-FFT* transferred into the plants and could be a convenient tool for screening and acquisition of stable genetic materials.

Key words: *As6G-FFT*; transgenic tobacco; positive identification; copy number

0 引言

【研究意义】果聚糖 (Fructan) 为水溶性非还原性多糖, 是由蔗糖与 1 个或多个果糖基连接而成的聚合物^[1]。果聚糖作为 15% 被子植物中主要的贮藏性碳水化合物, 其代谢与渗透调节、源库关系调节、抗逆性等生理活动密切相关。目前已发现植物中的果聚糖主要有 5 种类型, 其中大蒜果聚糖属于菊糖型果聚糖新生系列。果聚糖: 果聚糖 6G-果糖基转移酶 (6G-FFT) 是其合成过程所必需的酶, 能够发生特异性反应, 催化 1-蔗果三糖生成新蔗果三糖^[2]。植物转基因技术已广泛应用于基因工程育种, 以改善作物品质、提高作物产量、培育植物新品种等。目前转基因技术最为广泛和成熟的方法主要是农杆菌介导法, 但农杆菌所携带含有目的基因的 T-DNA 区域是随机插入受体植物基因组中, 因而得到的转基因植株通常含有一个或多个拷贝的外源基因^[3]。而转基因植物中外源基因的拷贝数是影响其表达水平及稳定遗传的关键因素, 多拷贝的外源基因会直接导致基因沉默或不能稳定表达^[4], 因此, 筛选单拷贝外源基因的转基因植株对后续遗传稳定性起关键性作用。【前人研究进展】近年来, 对果聚糖代谢调控基因的功能研究已成为热点。在菊苣中转化洋葱 6G-FFT 基因后, 发现菊苣中含有菊糖型果聚糖新生系列^[5]。Gadegaard 等^[6]将洋葱中的 6G-FFT 转入黑麦草中, 发现果聚糖积累量比对照高 3 倍。何娜等^[7]克隆芦笋 *Ao6G-FFT* 基因, 对其序列特征进行分析, 发现其启动子区域存在响应非生物胁迫的元件。此外, 前人研究检测外源基因拷贝数常采用 Southern blot 技术, 但其价格昂贵、耗时较长、灵敏度较低^[8]。近年来, 研究人员开始利用实时荧光定量 PCR 技术检测外源基因拷贝数, 如王育花等^[9]通过实时荧光定量 PCR 检测了转基因水稻中外源基因拷贝数, 在 8 株检测植株中, 得到 1 株单拷贝的植株。裘劫人等^[10]利用 SYBR Green 实时定量 PCR 法检测转基因拟南芥中外源基因拷贝数, 发现该法计算所得拷贝数与传统高准确性的 Southern blot 法结果相符。苏慧慧等^[11]利用实时荧光定量 PCR 技术检测

转基因樱桃番茄中外源基因拷贝数, 发现 12 株转基因植株内整合的拷贝数为 0~20 不等, 且其中 4 株在普通 PCR 中存在假阳性。【本研究切入点】目前, 方便快捷、灵敏性强、成本低的实时荧光定量 PCR 检测外源基因拷贝数的技术逐渐被广泛应用。但鲜见有关大蒜 *As6G-FFT* 基因转入烟草的研究报道。【拟解决的关键问题】本研究将从大蒜中克隆的 *As6G-FFT* 基因转入烟草中, 获得转 *As6G-FFT* 基因烟草, 然后分别提取测定 14 株转基因烟草叶片的 DNA、RNA 及果聚糖含量, 以从 DNA、RNA 及生理水平鉴定阳性单拷贝 *As6G-FFT* 转基因烟草, 以期筛选单拷贝的转 *As6G-FFT* 基因烟草提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试剂

以组培苗移栽后生长 30 d 的野生型烟草 K326 和转 *As6G-FFT* 基因烟草为试验材料, 取二者的幼嫩叶片速冻于液氮中, 置于 -80 ℃ 超低温冰箱中保存, 用于基因组 DNA 和 RNA 的提取以及果聚糖含量测定。转 *As6G-FFT* 基因烟草和野生型烟草 K326 均为青海省蔬菜遗传与生理重点实验室保存。

利用新型植物基因组 DNA 提取试剂盒和 TRNzol Universal 试剂 (北京天根生化科技有限公司) 进行总 DNA 和 RNA 的提取, 采用 Honor™ II 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix 和 Unique Aptamer™ qPCR SYBR® Green Master Mix (北京诺禾致源科技股份有限公司) 进行 qRT-PCR 分析。

1.2 引物设计与合成

阳性转基因烟草鉴定和荧光定量分析所用引物均使用 Primer 5 软件设计, 引物由上海生工生物工程有限公司合成, 引物序列见表 1。

1.3 转 *As6G-FFT* 基因烟草 PCR 检测

采用新型植物基因组 DNA 提取试剂盒提取 1 株野生型烟草 K326 和 14 株转 *As6G-FFT* 基因烟草叶片的基因组 DNA, 以其为模板, 以 *As6G-FFT*-clone 为引物 (表 1), 通过 PCR 扩增鉴定 *As6G-FFT* 基因是否导入烟草基因组。扩增产物长度约为 1 839 bp,

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

引物 Primer	引物序列 (5'-3') Primer sequence	目的 Purpose
As6G-FFT-clone	F: ATGGATGCTCAAGACATTGAG TC	阳性PCR检测 Positive PCR detection
	R: TTAAAAATGATAAAAAATCATTG TAAGTGGAGTTC	
As6G-FFT	F: TGGCTCTTTACGCACTCA	实时荧光定量 PCR分析 qRT-PCR
	R: TCGCACTCGTCCTACCTC	
NtACT	F: AATGATCGGAATGGAAGCTG	analysis
	R: TGGTACCACCACTGAGGACA	

PCR 反应体系为 2×*Taq* PCR Mix 12.5 μL, cDNA 模板 1 μL, 上下游引物各 1 μL, ddH₂O 9.5 μL; 反应程序为 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 56 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 2 min, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min, 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.4 转 *As6G-FFT* 基因烟草表达量分析

为了分析 *As6G-FFT* 基因在 RNA 水平的表达情况, 对经 PCR 鉴定呈阳性的转基因植株进行 *As6G-FFT* 转录水平分析。利用 TRNzol Universal 提取总 RNA, 检测 RNA 的质量和浓度后, 检测合格的 RNA 样品利用 Honor™ II 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR 反转录为 cDNA。以测试烟草的 cDNA 为模板, 以烟草 *Actin* 基因特异引物 NtACT 和大蒜 *6G-FFT* 基因特异引物 As6G-FFT 对各样本一起进行扩增, 引物序列详见表 1。反应体系为 Unique Aptamer Green Matser Mix 10 μL, cDNA 模板 1 μL, 上下游引物各 0.6 μL, ddH₂O 7.8 μL; 反应程序为 94 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃ 30 s, 56 ℃ 1 min, 72 ℃ 2 min, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min, 重复 3 次。

1.5 转 *As6G-FFT* 基因烟草果聚糖含量测定

果聚糖的提取及含量测定参考田洁等^[12]的方法进行。利用高效液相色谱仪(日本岛津 RID-10A)进行测定, 采用 Shodex SUGAR KS-801 串 KS-802 色谱柱, 示差检测器, 以超纯水作为流动相, 流速为 1 mL·min⁻¹, 柱温箱温度为 80 ℃, 进样量为 5 μL。通过碳水化合物组分的标准品及外标法进行定量分析, 各组分含量单位以 mg·g⁻¹ DW 表示。

1.6 *As6G-FFT* 和 *NtACT* 基因标准曲线制作

选择烟草 *Actin* 基因^[13]作为内源参照基因进行拷贝数估算, 参照王盛等^[14]的方法, 利用 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 法检测转基因烟草植株中外源 *As6G-FFT* 基因的拷贝数。以野生型烟草 K326 的基

因组 DNA 为内参基因标准品, 紫外分光光度计测得质量浓度为 0.040 6 μg·μL⁻¹, 将其进行 5 倍梯度稀释, 稀释倍数分别为 5⁰、5¹、5²、5³ 和 5⁴, 使用 NtACT 引物进行 PCR 扩增。同时以含有 *As6G-FFT* 基因的质粒为外源基因标准品, 紫外分光光度计测得质量浓度为 0.035 6 μg·μL⁻¹, 将其进行 5 倍梯度稀释, 稀释倍数同上, 后使用 As6G-FFT 引物进行 PCR 扩增。反应体系与程序同 1.4, 最后制作内参基因和外源基因实时荧光定量 PCR 的标准曲线。

1.7 转基因烟草中内参基因和外源基因的定量分析

以 1 株野生型烟草和 14 株 PCR 检测为阳性的转 *As6G-FFT* 基因烟草植株基因组 DNA 为模板, 对转基因烟草中 *As6G-FFT* 基因表达进行定量分析。使用 As6G-FFT 引物进行 PCR 扩增, 设 1 个空白对照, 每个样品 3 次技术重复, 同时, 分别以 14 株转 *As6G-FFT* 基因烟草植株和 1 株 WT 烟草植株的基因组 DNA 为模板, 对转基因烟草中内参基因表达进行定量分析。使用 NtACT 引物进行 PCR 扩增, 设 1 个空白对照, 每个样品 3 次技术重复。反应体系与程序同 1.4。

2 结果与分析

2.1 转 *As6G-FFT* 基因烟草 PCR 检测

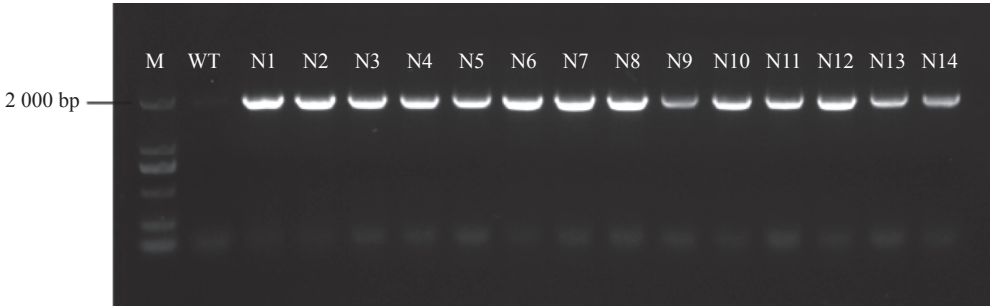
选取转基因烟草幼嫩叶片进行基因组 DNA 的提取, 经质检合格后, 使用 *As6G-FFT* 基因克隆引物(表 1)对其进行 PCR 扩增。结果显示 14 个转基因烟草叶片均能扩增出目的片段, 而野生型烟草中未检测到目的条带(图 1), 说明 14 个转基因烟草株系中已成功转入目的基因 *As6G-FFT*。

2.2 转 *As6G-FFT* 基因烟草表达量分析

为了分析转基因烟草中 *As6G-FFT* 基因的表达水平, 以组培苗移栽后 30 d 烟草叶片为材料, 提取 14 个转基因烟草株系和野生型烟草叶片的 RNA 并反转录为 cDNA, 然后利用 qRT-PCR 技术分析 *As6G-FFT* 基因的表达量(图 2)。结果显示, 与 WT 相比, 14 个转基因株系中有 7 个株系(N3、N4、N5、N9、N10、N11、N14)表达量极其显著上升($P<0.001$), 其余 7 个株系均达到极显著上升水平($P<0.01$)。总体而言, 转基因株系中的 *As6G-FFT* 基因表达量比野生型高 1.17~215.13 倍。表明将大蒜 *As6G-FFT* 基因过表达转入烟草后转基因烟草株系中 *As6G-FFT* 基因表达量呈极显著水平上升。

2.3 转 *As6G-FFT* 基因烟草果聚糖含量测定

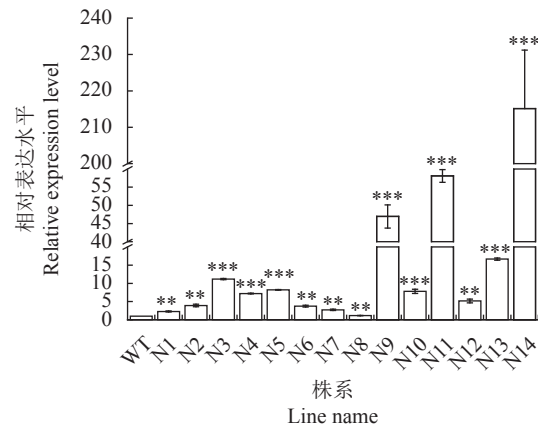
进一步测定 14 个转 *As6G-FFT* 基因烟草株系的



M: DNA 分子量标准 (2 000 bp); WT: 野生型烟草; N1~N14: 转基因烟草株系。下同。
M: DNA marker (2 000 bp); WT: wild-type tobacco; N1-N14: transgenic tobacco lines. Same for the following.

图 1 转 *As6G-FFT* 基因烟草 PCR 检测

Fig. 1 PCR detection of *As6G-FFT* in transgenic tobacco plants



：差异极显著 ($P < 0.01$)；*：差异极其显著 ($P < 0.001$)。图 3 同。
：extremely significant difference ($P < 0.01$), *：extremely significant difference ($P < 0.001$)；The same as Fig.3.

图 2 转 *As6G-FFT* 基因烟草的基因表达量

Fig.2 *As6G-FFT* expressions in transgenic and wild-type tobacco plants

果聚糖含量 (图 3)。结果发现，14 个转基因株系的果聚糖含量都高于野生型烟草，其中有 13 个转基因株系的果聚糖含量呈极其显著升高 ($P < 0.001$)，1 个转基因株系 (N7) 的果聚糖含量显著升高 ($P < 0.01$)，而野生型烟草中几乎没有果聚糖。转基因株系的果聚糖含量比野生型显著提高了 1.51~10.47 倍。以上结果表明转基因烟草中 *As6G-FFT* 催化了果聚糖的合成。

2.4 转基因烟草中 *As6G-FFT* 基因拷贝数测定

2.4.1 *As6G-FFT* 和 *NtACT* 基因实时荧光定量 PCR 的标准曲线 转基因植物中外源基因的拷贝数是影响其表达水平及稳定遗传的关键。因此，本研究利用实时荧光定量 PCR 技术，以烟草 *Actin* 基因为内参，建立 *As6G-FFT* 基因拷贝数鉴定方程。根据 C_t 值与对应模板拷贝数对数值间的线性关系，以 C_t 值为横坐标、起始模板拷贝数的对数为纵坐标，分别获得

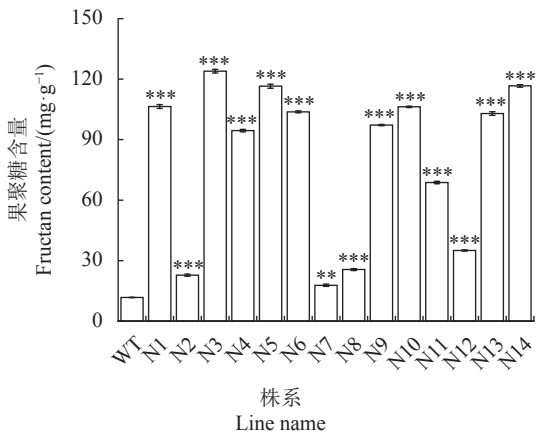


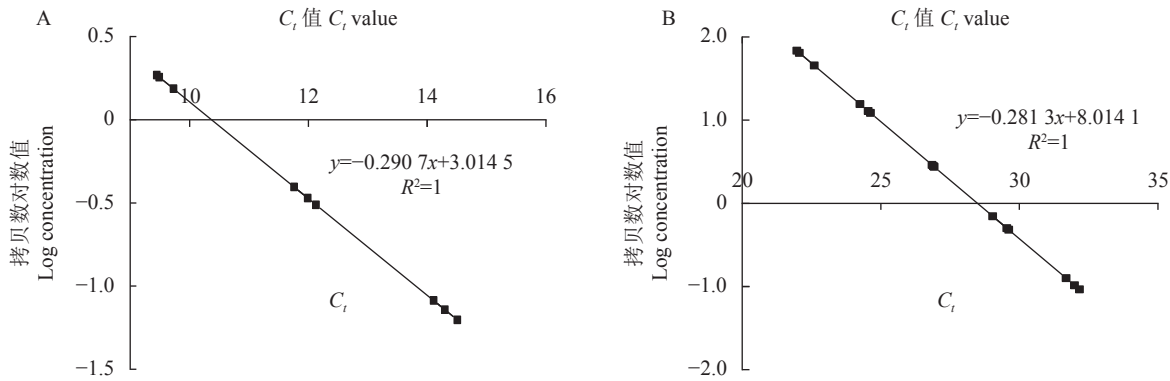
图 3 转 *As6G-FFT* 基因烟草的果聚糖含量

Fig. 3 Fructan contents in transgenic and wild-type tobacco plants

内参基因和外源基因标准品实时荧光定量 PCR 的标准曲线 (图 4)。*As6G-FFT* 基因实时荧光定量 PCR 的标准曲线为 $y = -0.2907x + 3.0145$ ($R^2 = 1$)，*NtACT* 基因实时荧光定量 PCR 的标准曲线为 $y = -0.2813x + 8.0141$ ($R^2 = 1$)。两个基因标准曲线相关系数均接近于 1，表明检测样品所得的结果准确可信。

2.4.2 *As6G-FFT* 和 *NtACT* 基因实时荧光定量 PCR 熔解曲线 *As6G-FFT* 和 *NtACT* 基因实时荧光定量 PCR 熔解曲线如图 5 所示，*As6G-FFT* 和 *NtACT* 基因熔点分别为 83.70 和 80.17，熔解曲线均为单峰，说明引物特异性强，在反应中无引物二聚体等非特异性扩增，即测得的试验数据准确可信。

2.4.3 *As6G-FFT* 和 *NtACT* 基因实时荧光定量 PCR 扩增曲线 外源基因 *As6G-FFT* 的扩增结果如图 6-A 所示，除空白对照未扩增出荧光曲线外，其余被测的烟草植株样品均扩增出荧光曲线，表明样品未被污染，检测结果可信。内参基因 *NtACT* 的扩增结果如图 6-B 所示，转基因烟草植株样品均扩增出荧光曲线，而野生型烟草植株和空白对照均未扩增出荧光曲线。



A: *As6G-FFT* 基因; B: *NtACT* 基因。图 5、6 同。

A: *As6G-FFT*; B: *NtACT*. Same for Fig. 5, 6.

图 4 *As6G-FFT* 和 *NtACT* 基因实时荧光定量 PCR 的标准曲线

Fig. 4 Real-time fluorescent quantitative PCR standard curves of *As6G-FFT* and *NtACT*

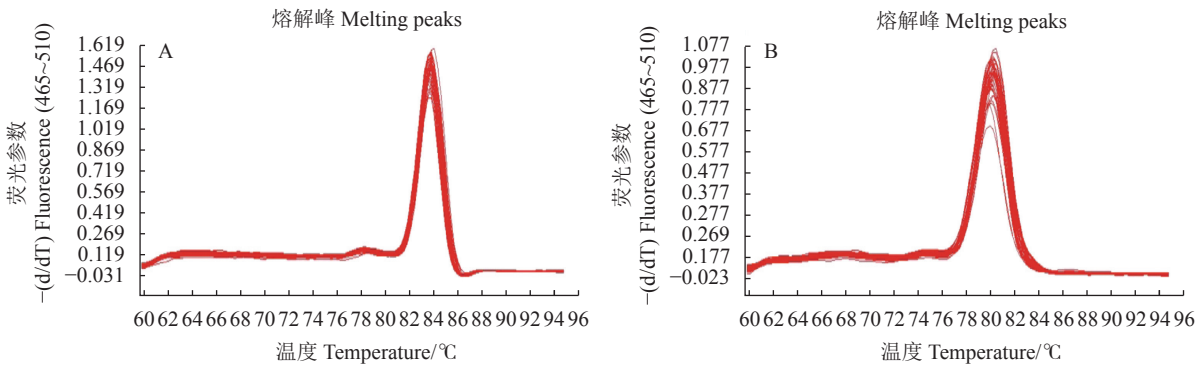


图 5 *As6G-FFT* 和 *NtACT* 基因实时荧光定量 PCR 的熔解曲线

Fig. 5 Real-time fluorescent quantitative PCR melting curves of *As6G-FFT* and *NtACT*

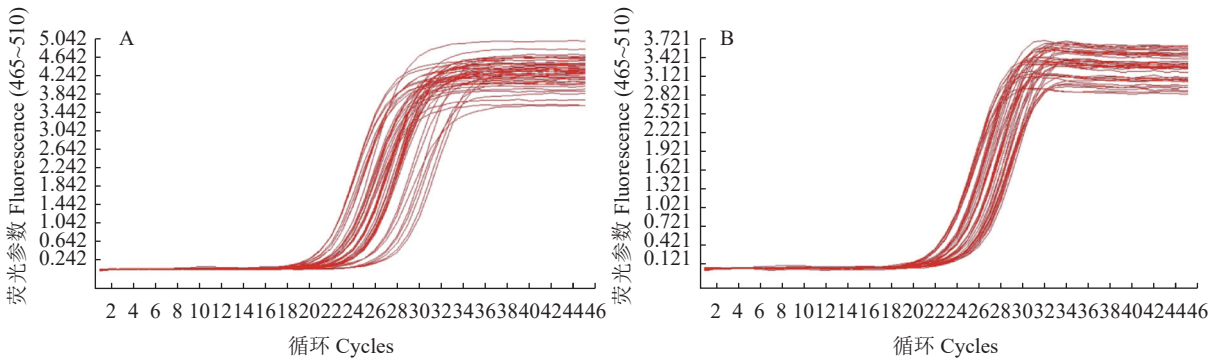


图 6 *As6G-FFT* 和 *NtACT* 基因实时荧光定量 PCR 的扩增曲线

Fig. 6 Real-time fluorescent quantitative PCR amplification curves of *As6G-FFT* and *NtACTs*

2.4.4 转基因烟草中 *As6G-FFT* 基因拷贝数计算 对 14 株 PCR 检测为阳性的转 *As6G-FFT* 基因烟草植株和 1 株野生型烟草植株的 *As6G-FFT* 和 *NtACT* 基因进行实时荧光定量 PCR 分析, 所得 C_t 值和 T_m 值如表 2 所示。通过标准曲线计算 C_t 值对应模板浓度的对数值, 再根据外源基因和内参基因模板浓度对数值的比值绝对值估算出外源基因的拷贝数, 计算结果如

表 2 所示, 检测的 14 株转 *As6G-FFT* 基因烟草植株的最低拷贝数为 1, 最高拷贝数达到 3 个, 其中 1 拷贝单株数 5 株, 占总转基因株数的 35.7%; 2 拷贝单株数 7 株, 占总转基因株数的 50%; 3 拷贝单株数 2 株, 占总转基因株数的 14.3%; 而野生型烟草植株的 *As6G-FFT* 基因拷贝数为 0。

表 2 转基因烟草中 *As6G-FFT* 基因拷贝数
Table 2 Copy number of *As6G-FFT* in transgenic tobacco plants

转基因烟草 Transgenic tobacco	<i>As6G-FFT</i> 基因 <i>As6G-FFT</i> gene			<i>NtACT</i> 基因 <i>NtACT</i> gene			浓度对数值的比值 Log value ratio of concentration	拷贝数 Copy number
	C_t	熔解温度	浓度对数值	C_t	熔解温度	浓度对数值		
		T_m	Log value of concentration		T_m	Log value of concentration		
N1	19.14	83.81	2.55	20.60	80.13	2.22	1.15	1
N2	20.44	83.67	2.93	23.40	80.12	1.43	2.04	2
N3	20.81	83.70	3.03	20.78	80.10	2.17	1.40	1
N4	21.08	83.79	3.11	20.62	80.25	2.21	1.41	1
N5	21.66	83.73	3.28	23.57	80.23	1.38	2.37	2
N6	20.62	83.60	2.98	21.76	80.04	1.89	1.57	2
N7	19.72	83.61	2.72	21.53	80.23	1.96	1.39	1
N8	18.98	83.78	2.50	21.33	80.38	2.01	1.24	1
N9	23.51	83.75	3.82	23.82	80.19	1.31	2.91	3
N10	22.48	83.66	3.52	22.39	80.08	1.71	2.05	2
N11	22.46	83.79	3.51	21.78	80.21	1.89	1.86	2
N12	21.80	83.84	3.32	22.60	80.29	1.66	2.01	2
N13	22.76	83.69	3.60	22.75	80.12	1.61	2.23	2
N14	22.72	83.66	3.59	23.42	80.03	1.43	2.52	3

3 讨论与结论

植物遗传转化是农作物改良和基因功能研究的常用试验方法。本研究在课题组前期工作基础上，对转 *As6G-FFT* 基因烟草 T0 代进行了筛选与阳性鉴定，共获得 14 个阳性转基因烟草株系。研究表明过表达植株后代中外源基因拷贝数是影响目的基因表达水平和遗传稳定性的主要因素，拷贝数越低，遗传稳定性越高。因此，获得阳性转基因植株后，对其外源基因拷贝数进行检测分析具有重要意义。

实时荧光定量 PCR 检测外源基因拷贝数是近几年迅速发展起来的外源基因拷贝数检测新方法，目前已在柑橘、烟草、玉米、水稻等多种作物中应用^[15-18]，其中 SYBR Green 荧光染料由于成本低、简单易用、灵敏度高，而被广泛采用^[10,19-20]。本研究利用 SYBR Green 法成功对 14 个转 *As6G-FFT* 基因烟草株系的 *As6G-FFT* 拷贝数进行了实时荧光定量 PCR 检测，得出了 *As6G-FFT* 基因的整合特点，其中具有 1、2 和 3 个拷贝的单株数分别占植株总数的 35.7%、50.0%和 14.3%，且 1~2 个拷贝的单株数占整个转基因植株的 85.7%，这与文献报道中提到的，农杆菌介导转化，一般外源基因以低拷贝（1~2）整合为主（占 70% 以上）的结果一致。Tan 等^[21] 检

测 15 份转基因植株拷贝数，其中 1~2 拷贝的单株数占总数的 86.6%；Wen 等^[22] 对 26 株转基因柑橘进行拷贝数分析，结果表明 1~2 拷贝整合数量占整个转基因植株的 73%；魏毅东等^[23] 对 9 个 *OsPMT1* 转基因水稻 T0 代植株进行拷贝数检测，其中 6 个为单拷贝，3 个为双拷贝；杜京尧等^[24] 采用实时荧光定量 PCR 技术检测 *OsRhoGDI2* 转基因水稻中的外源基因拷贝数，结果显示 *OsRhoGDI2* 在过表达转基因水稻中均为单拷贝。由此说明采用实时荧光定量 PCR 检测转基因拷贝数具有简单、高效、方便、准确等优点。此外，烟草是植物基因功能研究的模式植物，应用该方法检测并筛选单拷贝数的转基因烟草，可为今后转基因拷贝数研究提供一种新的检测技术。

本研究首先采用基因组 DNA 扩增的方法，检测 *As6G-FFT* 基因是否均已稳定整合到烟草基因组中，进而采用定量 PCR 技术在转录水平检测 *As6G-FFT* 在转基因烟草中的表达水平。结果显示 *As6G-FFT* 基因表达量水平显著高于野生型；此外，分别提取了野生型和转基因烟草中的果聚糖含量，发现果聚糖含量在转基因烟草中的积累要显著高于野生型。以上对转基因烟草在基因水平、转录水平及生理水平的分析结果均一致表明，*As6G-FFT* 过表达载体已整合到烟草基因组。最后通过实时荧光定量 PCR 法检

测阳性转基因烟草中 *As6G-FFT* 的拷贝数, 发现外源 *As6G-FFT* 基因整合到烟草中的低拷贝 (1~2) 单株数占整个转基因植株的 85.7%。本研究分析鉴定了 14 个转 *As6G-FFT* 基因烟草株系, 获得了低拷贝 (1~2) 的阳性转 *As6G-FFT* 基因烟草株系, 为后续 *As6G-FFT* 基因功能分析提供稳定遗传材料, 同时也为植物外源基因拷贝数分析提供技术支撑。

参考文献:

- [1] 陈真真, 周国勤, 陈新宏, 等. 转华山新麦草果聚糖合成酶基因对烟草相关生理指标的影响 [J]. 湖北农业科学, 2020, 59 (9): 95-98.
- CHEN Z Z, ZHOU G Q, CHEN X H, et al. Effects of transfer of fructan synthase gene of *Psathyrostachys huashanensis* on physiological indexes of tobacco [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2020, 59 (9): 95-98. (in Chinese)
- [2] 许欢欢, 康健, 梁明祥. 植物果聚糖的代谢途径及其在植物抗逆中的功能研究进展 [J]. 植物学报, 2014, 49 (2): 209-220.
- XU H H, KANG J, LIANG M X. Research advances in the metabolism of fructan in plant stress resistance [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2014, 49 (2): 209-220. (in Chinese)
- [3] FILIPENKO E A, FILIPENKO M L, DEINEKO E V, et al. Analysis of integration sites of T-DNA insertions in transgenic tobacco plants [J]. *Cytology and Genetics*, 2007, 41 (4): 199-203.
- [4] GORDANA M, MANSOUR K, MIRANDE N, et al. Gene silencing induced by hairpin or inverted repeated sense transgenes varies among promoters and cell types [J]. *The New Phytologist*, 2009, 184 (4): 851-864.
- [5] LASSEUR B, LOTHIER J, DJOUMAD A, et al. Molecular and functional characterization of a cDNA encoding fructan: Fructan 6G-fructosyltransferase (6G-FFT)/fructan: Fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT) from perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57 (11): 2719-2734.
- [6] GITTE G, THOMAS D, MARIANNE F, et al. Improved fructan accumulation in perennial ryegrass transformed with the onion fructosyltransferase genes 1-SST and 6G-FFT [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2008, 165 (11): 1214-1225.
- [7] 何娜, 张园, 林春, 等. 芦笋果聚糖: 果聚糖 6-果糖基转移酶基因 *Ao6G-FFT* 序列特征及表达模式研究 [J]. 植物生理学报, 2021, 57 (4): 929-938.
- HE N, ZHANG Y, LIN C, et al. Sequence characteristics and expression pattern of fructose 6G-fructose transferase gene *Ao6G-FFT* in *Asparagus officinalis* [J]. *Plant Physiology Journal*, 2021, 57 (4): 929-938. (in Chinese)
- [8] 罗滨, 陈永康, 王莹. 植物外源基因拷贝数及插入位点的检测方法与技术 [J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2012, 40 (6): 111-116.
- LUO B, CHEN Y K, WANG Y. Methods and techniques for estimating the copy number and flanking sequences of exogenous gene in transgenic plants [J]. *Journal of Henan Normal University(Natural Science Edition)*, 2012, 40 (6): 111-116. (in Chinese)
- [9] 王育花, 赵森, 陈芬, 等. 利用实时荧光定量PCR法检测转基因水稻外源基因拷贝数的研究 [J]. 生命科学研究, 2007, 11 (4): 301-305.
- WANG Y H, ZHAO S, CHEN F, et al. Estimation of the copy number of exogenous gene in transgenic rice by real-time fluorescence quantitative PCR [J]. *Life Science Research*, 2007, 11 (4): 301-305. (in Chinese)
- [10] 袁助人, 许颖, 喻富根. 利用SYBR Green实时定量PCR法检测转基因植物外源基因的拷贝数 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39 (21): 12655-12657.
- QIU J R, XU Y, YU F G. Estimating the copy number of transgenes in transformed *Arabidopsis* by SYBR green real-time quantitative PCR [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39 (21): 12655-12657. (in Chinese)
- [11] 苏慧慧, 李涛, 谢雯琦, 等. 基于实时荧光定量PCR对转基因樱桃番茄外源基因拷贝数的检测 [J]. 分子植物育种, 2015, 13 (2): 345-354.
- SU H H, LI T, XIE W Q, et al. Detecting exogenous gene copy numbers of exogenous gene in transgenic tomato based on fluorescent quantitative real-time PCR [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2015, 13 (2): 345-354. (in Chinese)
- [12] 田洁, 钟启文, 田萌, 等. 一种强酸水解-HPLC法检测大蒜果聚糖含量的方法: CN107941952A[P]. 2018-04-20.
- [13] 高铭铭. 菊芋块茎表皮花青素生物合成分子机理研究[D]. 西宁: 青海大学, 2020.
- GAO J M. Molecular mechanism of anthocyanin biosynthesis in tuber epidermis of *Jerusalem artichoke*[D]. Xining: Qinghai University, 2020. (in Chinese)
- [14] 王盛, 谢芝勋, 谢丽基, 等. 转基因烟草中外源基因实时荧光定量PCR检测方法的建立 [J]. 南方农业学报, 2015, 46 (5): 745-749.
- WANG S, XIE Z X, XIE L J, et al. Detection method of exogenous gene in transgenic tobacco by real-time fluorescence quantitative PCR [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2015, 46 (5): 745-749. (in Chinese)
- [15] 许兰珍, 何永睿, 雷天刚, 等. 转基因柑橘外源基因拷贝数的实时荧光定量PCR检测 [J]. 园艺学报, 2016, 43 (6): 1186-1194.
- XU L Z, HE Y R, LEI T G, et al. Identification of the copy number of exogenous gene in transgenic *Citrus* by quantitative real-time PCR [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2016, 43 (6): 1186-1194. (in Chinese)
- [16] 余婧, 邹颖, 付强, 等. 多重实时荧光定量PCR分析转基因烟草外源基因拷贝数 [J]. 中国烟草学报, 2017, 23 (4): 92-97.
- YU J, ZOU J, FU Q, et al. Detecting copy number of exogenous genes in transgenic tobacco by multiplex RT-PCR [J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2017, 23 (4): 92-97. (in Chinese)
- [17] 余桂容, 张维, 杜文平, 等. 抗草甘膦转基因玉米外源基因ddPCR拷贝数分析 [J]. 西南农业学报, 2017, 30 (8): 1707-1712.
- YU G R, ZHANG W, DU W P, et al. Estimation of exogenous genes copy number of genetically modified glyphosate-resistant maize by droplet digital PCR [J]. *Southwest China Journal of Agricultural*

- Sciences*, 2017, 30 (8) : 1707–1712. (in Chinese)
- [18] 王永, 兰青阔, 赵新, 等. 数字PCR在转基因水稻拷贝数鉴定中的应用 [J]. *生物技术通报*, 2018, 34 (3) : 53–58.
- WANG Y, LAN Q K, ZHAO X, et al. Estimation of the copy number of exogenous genes in genetically modified rice by droplet digital PCR [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2018, 34 (3) : 53–58. (in Chinese)
- [19] 冀志庚, 高学军, 敖金霞, 等. SYBR Green实时定量PCR检测转基因大豆中外源基因拷贝数 [J]. *东北农业大学学报*, 2011, 42 (10) : 11–15.
- JI Z G, GAO X J, AO J X, et al. Establishment of SYBR Green-base quantitative real-time PCR assay for determining transgene copy number in transgenic soybean [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2011, 42 (10) : 11–15. (in Chinese)
- [20] 庄强, 钱程, 刘立. SYBR Green实时定量PCR检测外源基因拷贝数 [J]. *浙江理工大学学报*, 2010, 27 (1) : 125–129.
- ZHUANG Q, QIAN C, LIU L. Establishment of SYBR green-base quantitative real-time PCR assay for determining transgene copy number in genome [J]. *Journal of Zhejiang Sci-Tech University*, 2010, 27 (1) : 125–129. (in Chinese)
- [21] TAN B, LI D L, XU S X, et al. Highly efficient transformation of the GFP and MAC12.2 genes into precocious trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* [L. Raf]), a potential model genotype for functional genomics studies in *Citrus* [J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2009, 5 (3) : 529–537.
- [22] WEN L, TAN B, GUO W W. Estimating transgene copy number in precocious trifoliate orange by TaqMan real-time PCR [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2012, 109 (2) : 363–371.
- [23] 魏毅东, 罗曦, 吴方喜, 等. 利用qPCR法检测OsPMT1转基因水稻中的外源片段拷贝数 [J]. *福建稻麦科技*, 2017, 35 (4) : 39–42.
- WEI Y D, LUO X, WU F X, et al. Determination of the copy number of exogenous fragment in Os PMT1 transgenic rice by quantitative real-time PCR [J]. *Fujian Science and Technology of Rice and Wheat*, 2017, 35 (4) : 39–42. (in Chinese)
- [24] 杜京尧, 尚飞, 王高华, 等. *OsRhoGDI2*过表达转基因水稻的筛选鉴定及外源基因拷贝数的初步分析 [J]. *江苏农业科学*, 2019, 47 (14) : 50–54.
- DU J Y, SHANG F, WANG G H, et al. Screening and identification of *OsRhoGDI2* overexpression transgenic rice and preliminary analysis of foreign gene copy number [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2019, 47 (14) : 50–54. (in Chinese)

(责任编辑：林海清)