

转基因大麦*B-hordein*基因荧光定量PCR方法的建立

李静雯¹, 张正英², 王立光¹, 陈 军¹, 朱天地¹

(1. 甘肃省农业科学院生物技术研究所, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃省农业科学院作物研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 为快速定量大麦贮藏蛋白基因 *B-hordein* 差异表达, 利用 SYBR Green I 染料法测定转基因大麦和对照花后 10 d 籽粒 *B-hordein* 表达量, 通过 RT-PCR 扩增 *B-hordein* 和内参基因 *actin* 片段, 对 PCR 退火温度、引物浓度等进行优化, 结合扩增曲线和熔解曲线分析。结果表明, 转基因大麦 *B-hordein* 基因表达量较对照品种 Golden Promise 显著降低 ($P < 0.05$), *B-hordein* 和 *actin* 扩增片段分别在 $(84.51 \pm 0.01) ^\circ\text{C}$ 和 $(80 \pm 0.01) ^\circ\text{C}$ 处显示特异性单峰, 可成功建立转基因大麦 *B-hordein* SYBR Green I 实时定量 PCR 法。

关键词: SYBR Green I; 荧光定量 PCR; 转基因大麦; *B-hordein*

中图分类号: S512.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2020)11-0011-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2020.11.003

Establishment of Real-time Fluorescence Quantitative RT-PCR for *B-hordein* Gene of Transgenic Barley

LI Jingwen¹, ZHANG Zhenying², WANG Liguang¹, CHEN Jun¹, ZHU Tiandi¹

(1. Institute of Biotechnology, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China; 2. Institute of Crops, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: In this study, a qRT-PCR system with SYBR Green I was established to characterise the variation in the expression of *B-hordein* gene in barley. The target gene *B-hordein* and the reference gene *actin* were amplified with RT-PCR in the grain of 10 DAP (day after pollination) of transgenic barley and control. PCR annealing temperature, primers concentration and other reaction factors was optimized, and also the amplification curve and melt curve was analyzed. The results showed that the expression level of *B-hordein* of transgenic barley was significantly lower than that of control ($P < 0.05$). Peak of *B-hordein* and *actin* were $(84.51 \pm 0.01) ^\circ\text{C}$ and $(80 \pm 0.01) ^\circ\text{C}$, respectively, and the real-time quantitative PCR method of *B-hordein*

收稿日期: 2020-10-09

基金项目: 国家自然科学基金(31660391、31460350)。

作者简介: 李静雯(1979—), 女, 甘肃榆中人, 副研究员, 主要从事植物分子生物学研究工作。

Email: lj-lg614@163.com。

- [7] 翟西均. 藜麦品种区域试验记载项目与标准[J]. 中国种业, 2016(5): 25-26.
- [8] 温日宇, 刘建霞, 李 顺, 等. 低温胁迫对不同藜麦幼苗生理生化特性的影响[J]. 种子, 2019(5): 53-56.
- [9] BOIS J F, WINKEL T, LHOMME J P, et al. Response of some Andean cultivars of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) to temperature; effects on germination, phenology, growth and freezing[J]. European Journal of Agronomy, 2006, 25, 299-308.
- [10] JACLBSEN S E, MONTEROS C, CHRIS-TIANSEN J L, et al. Plant responses of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) to frost at various phenological stages[J]. Eur. J. Agron., 2005; 22(2): 131-139.
- [11] 杨发荣, 刘文瑜, 黄 杰, 等. 甘肃省藜麦产业发展现状及对策[J]. 甘肃农业科技, 2019(1): 76-79.

(本文责编: 杨 杰)

SYBR Green I in transgenic barley could be successfully established.

Key words: SYBR Green I ; Fluorescent quantitative PCR; Transgenic barley; *B-hordein*

醇溶蛋白为大麦胚乳中主要的贮藏蛋白,兼具经济和健康价值。人类直接使用大麦时或将其作为食品原料,或用于啤酒酿造^[1]。大麦醇溶蛋白分为四类,即由 *hor-2* 编码的 B 醇溶蛋白。*hor-1* 编码的 C 醇溶蛋白、*hor-3* 编码的 D 醇溶蛋白、*hor-5* 编码的 γ 醇溶蛋白^[2]。B 醇溶蛋白在大麦醇溶蛋白中含量最高,为 70%~80%;其次是 C 醇溶蛋白,其含量为总蛋白的 10%~20%^[2-3]。研究认为,醇溶蛋白对啤酒酿造加工具有负面影响^[4],采用基因工程育种技术可创制醇溶蛋白相关亚基缺失的专用大麦品种^[1]。近年应用 RNAi 抑制大麦 *C-hordein* 或小麦 *ω -gliadin* 成功改变禾谷类作物贮藏蛋白组成^[5-6]。我们的前期研究以大麦模式品种 Golden Promise 幼胚为受体材料,利用 RNAi 抑制大麦 *B-hordein* 合成,获得的转基因大麦醇溶蛋白含量降低,总蛋白含量降低 1%~2%^[7],现已获得纯系材料,但转基因大麦 *B-hordein* 表达量相对于对照如何变化,其在转录水平的表达是否有遗传稳定性尚不明确。Kaczmarczyk 等^[3]建立实时荧光定量 PCR 平台来定量大麦发育进程中高度同源的醇溶蛋白多基因家族,但国内尚未见大麦贮藏蛋白功能标记研究相关报道。

实时荧光定量 PCR 技术因其特异性、稳定性、自动化程度高等优点已被广泛应用于转基因检测、作物育种、医疗等领域^[8-10]。为研究转基因大麦醇溶蛋白基因的表达模

式,我们建立了大麦发育阶段籽粒主要贮藏蛋白 *B-hordein* 表达的定量方法,以期明确大麦贮藏蛋白基因对于不同环境的响应变化和该基因功能标记开发提供方法参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试材料 供试材料为甘肃农业科学院生物技术研究所创制的 RNAi *B-hordein* 的转基因大麦及对照 Golden Promise。

1.1.2 主要试剂和仪器 SYBR Premix x TaqTM II 购自宝生物工程(大连)有限公司,植物总 RNA 提取试剂盒(DP441)购自北京天根生化有限公司,反转录试剂盒(c81401190)购自上海英骏生物技术有限公司。主要仪器设备为 ABI QuantStudio5 Q5 荧光定量 PCR 仪, NanoDrop one。

1.1.3 引物设计与合成 用于荧光定量 PCR 的大麦内参基因 *actin* (AY145451)引物用 Primer Premier 5.0 软件设计(表1),目的基因 *B-hordein* 引物同 Kaczmarczyk 等^[3]。

1.2 试验方法

试验于 2016 年 3—7 月种植于甘肃省农业科学院生物技术研究所转基因专用温室,人工条播,行长 1 m,行距为 20 cm,小区面积为 4 m²,3 次重复,随机区组排列。

1.2.1 籽粒胚乳总 RNA 的提取及反转录 花后对 RNAi 株系挂牌标记。转基因株系和对照均选取 3 个生物学样本。花后 10 d 9:00~10:00 时从每个单株穗中部选取发育

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

引物	引物序列(5'-3')	PCR 产物长度 /bp
actinF	CCTATATACGTGGCGGCTCC	103
actinR	CAAGCCAACCCAAGTTTGACA	
Common BF	TTTCCAACAACCTCAACCACA	119
Common BR	GTAGGGTACGCAGCGCAAT	

籽粒 2 粒，迅速置于液氮中冷冻保存，之后于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮存备用。

采用 TIANGEN RNAprep Pure 多糖多酚总 RNA 提取试剂盒提取大麦籽粒 RNA。每样本取 $2\text{ }\mu\text{L}$ RNA 用 NanoDrop one 测定 260、280 nm 处的吸光值(以无 RNase 水为空白液调零)。计算 A260/280 的值，估算总 RNA 的纯度，采用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

取各样本 RNA $0.02\text{ }\mu\text{g}$ ，按照 Invitrogen GoldScript cDNA 合成试剂盒进行操作，合成 cDNA 第 1 链。以 cDNA 及 RNA 为模板，进行内参基因 actin PCR 扩增。用于 PCR 的 actin 引物序列与反应程序同李静雯等^[7]。

1.2.2 *B-hordein* 的普通 PCR 以反转录 cDNA 为模板，Common BF/BR 扩增目的基因 *B-hordein*，在其他条件不变的情况下，分别对引物浓度和退火温度进行优化，引物浓度为 $0.1\sim 0.5\text{ }\mu\text{mol/L}$ ，退火温度为 $56\sim 62\text{ }^{\circ}\text{C}$ 内进行优化。

1.2.3 SYBR Green I qRT-PCR 反应程序 采用 SYBR Green I 染料法，在 Q5 定量 PCR 仪上进行目的基因 *B-hordein* 和内参基因 *actin* 检测。按照 TB GreenTM Ex TaqTM II 说明建立反应体系， $1\text{ }\mu\text{L}$ $100\text{ ng}/\mu\text{L}$ cDNA，每个模板 3 个重复。反应程序为： $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 3 min， $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s， $57\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s， $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s，进行 35 个循环。在 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸阶段进行末点荧光检测，每上升 $0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 收集 1 次荧光基因表达相对量，采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算^[9]。

1.3 数据处理

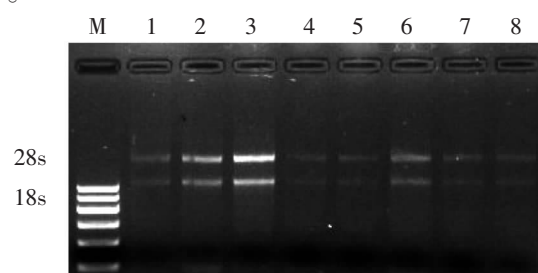
分别用 Microsoft Excel 2010 和 SPSS 20.0 进行数据处理和方差分析。

2 结果与分析

2.1 RNA 的纯度和完整性

采用 TIANGEN RNAprep Pure 多糖多酚总 RNA 提取试剂盒(DP441)提取转基因大麦和对照花后 10 d 的籽粒 RNA。所提总

RNA 中 28S rRNA 和 18S rRNA 条带清晰可见清晰，二者比例接近 $2:1$ ，电泳条带无拖尾，表明 RNA 无降解，蛋白质和多糖等杂质去除较干净，且加样孔内无任何基因组 DNA 残留，质量相对较好(图1)。RNA 样品的 A260/A280 值为 $1.88\sim 2.11$ ，说明样品具有较高的纯度，可满足下一步反转录实验要求。

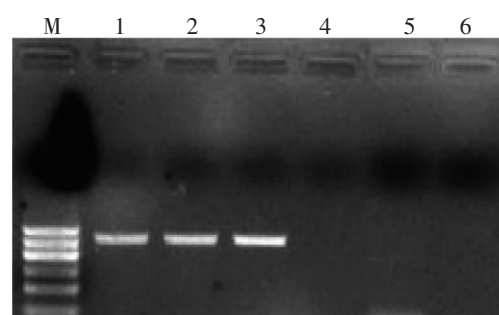


M 为 Marker I；1~8 为提取的 RNA。

图 1 大麦籽粒总 RNA

2.2 cDNA 的合成及检测

采用内参引物同时扩增所提取 RNA 及反转录获得的 cDNA。结果表明(图 2)，所提取 RNA 样本未扩增出内参基因目的条带，相应的 cDNA 均扩增出 540 bp 大小的目的条带，表明所提取的 RNA 无基因组 DNA 污染，并且 cDNA 反转录成功，可用于荧光定量 PCR 实验。

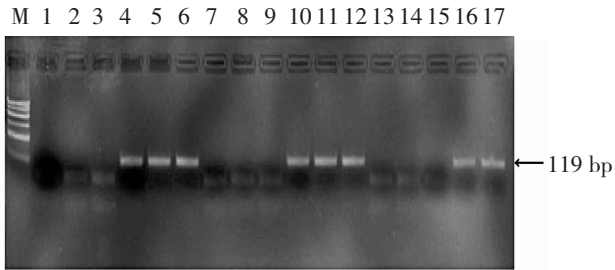


M 为 Marker I。1~3 为 cDNA，4~6 为相应样本 RNA。

图 2 大麦籽粒总 RNA 及 cDNA PCR 扩增

2.3 *B-hordein* 的普通 PCR

以反转录的 cDNA 为模板，分别在引物浓度为 $0.1\sim 0.5\text{ }\mu\text{mol/L}$ 、退火温度在 $56\sim 62\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下进行优化。最终引物浓度为 $0.3\text{ }\mu\text{mol/L}$ ，退火温度为 $57\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。得到约 119 bp 的目的片段，与预期结果一致(图3)。



M 为 Marker 1。1~3, 7~9, 13~15 为 actin 扩增产物; 4~6, 10~12, 16~17 为 B-hordein 扩增产物。

图 3 B-hordein 和 actin PCR 扩增结果

2.4 实时荧光定量 PCR 的优化条件

在普通 PCR 的基础上, 获得了 *B-hordein* 基因实时荧光定量 PCR 的最佳反应体系和条件。优化后的反应体系为 10 uL: SYBR Premix ex Taq 5 uL, 上下游引物(10 μmol/L)各 0.4 uL, 100 ng/μL cDNA 1 uL; 去离子水 3.2 uL; 反应条件为 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 15 s, 进行 35 个循环。最佳退火温度为 57 °C, 最佳引物终浓度为 0.4 μmol/L。

2.5 扩增曲线和溶解曲线分析

以优化好的条件进行荧光定量 qRT-PCR 扩增, 扩增样品同一引物的扩增曲线平滑, 且同一样品的 3 次扩增曲线位置相近(图 4), 表明不同样品中相同引物的扩增效率一致, 重复性好。*B-hordein* 和 *actin* 扩增片段分别在溶解温度(84.51 ± 0.01) °C 和(80 ± 0.01) °C 处显示特异性单峰(图 5), 说明实时荧光定量 PCR 引物特异性较好, 实验数据准确。

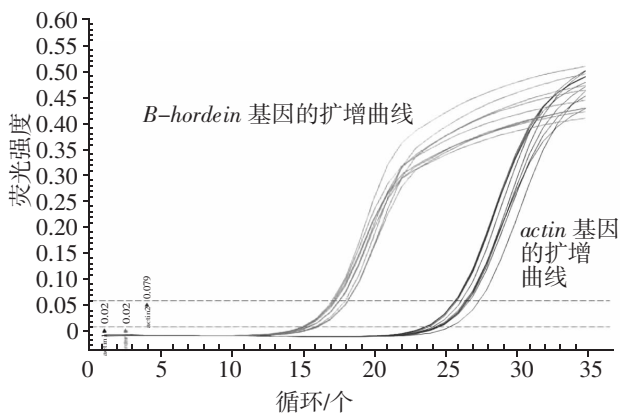


图 4 B-hordein 和 actin 的扩增曲线

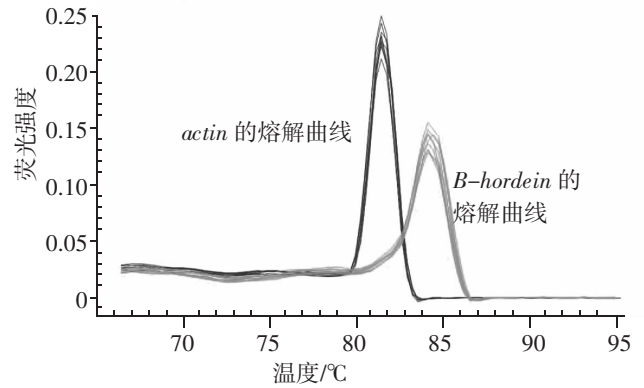


图 5 B-hordein 和 actin 的溶解曲线

2.6 转基因大麦花后 10 d 的籽粒 B-hordein 基因表达分析

采用已建立的 SYBR Green I qRT-PCR 方法, 对转基因大麦及对照花后 10 d *B-hordein* 基因表达进行定量分析。结果(图 6)表明, 相对于对照, RNAi 转基因大麦 *B-hordein* 表达量显著降低($P < 0.05$)。

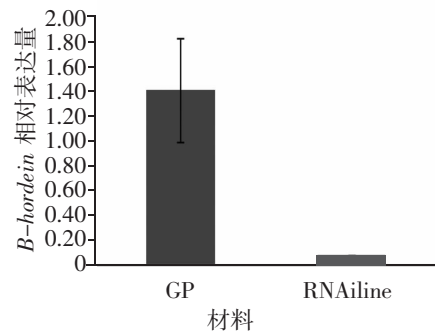


图 6 B-hordein 相对表达量

3 小结与讨论

本研究采用 SYBR Green I 双链嵌合染料法检测 *B-hordein* 表达, 结果显示转基因大麦 *B-hordein* 基因表达量较对照显著降低 0.9 倍, 这与我们前期采用半定量 RT-PCR 定性分析的结果一致^[7], 验证了本实验所建立的 qRT-PCR 方法能够有效区分不同大麦材料发育阶段籽粒 *B-hordein* 表达量, 而且用时短、通量高、扩增效率高、重复性强。

荧光定量 PCR 能够快速和准确地分析出植物在不同处理条件下基因表达量差异, 已在大豆、玉米、油菜、水稻等多种农作物转基因检测和育种研究得以应用^[8]。SYBR

Green I 作为一种常用的核酸染料可用于 PCR 产物的检测, 主要是因为其选择性的结合于双链 DNA 的小沟, 使得荧光强度显著增强。本研究基于大麦 cDNA 进行 *B-hordein* 基因实时定量 PCR 分析, 对体系中引物浓度、退火温度进行优化, 建立了检测转基因大麦发育籽粒 *B-hordein* mRNA 表达量的方法。

前人研究表明, 不同醇溶蛋白组分含量在籽粒发育阶段略有变化, 总的醇溶蛋白转录从花后 10 d 持续升高, 其中 *B-*醇溶蛋白基因比例高于其他醇溶蛋白基因比例(高达 80%)^[3]。*B-hordein* 是一个有近 34 个成员的多基因家族^[11], 研究者针对该基因已知序列设计 PCR 引物, 鉴定了大量的 *B-hordein* 序列^[3,12-13]。醇溶蛋白在发育早期的瞬时表达是由于每一个基因家族受到不同的转录调控。Hansen 等^[14]通过基因芯片数据可区分大麦品种 Barke 贮藏蛋白家族成员的瞬时表达变异。我们主要针对 *B-hordein* 基因总体表达趋势进行了定量分析, 明确 RNAi 转基因大麦纯合株系中该基因表达量显著降低, *B-hordein* 和 actin 扩增片段分别在(84.51 ± 0.01) °C 和(80 ± 0.01) °C 处显示特异性单峰, 可成功建立转基因大麦 *B-hordein* SYBR Green I 实时定量 PCR 法, 为创制对氮素不敏感的低醇溶蛋白大麦新种质及定量醇溶蛋白各亚基基因表达提供支持。

参考文献:

- [1] ANDERSON O D. The *B-hordein* prolamin family of barley[J]. *Genome*, 2013, 56(3): 179-185.
- [2] SHEWRY P R. Barley seed proteins. In *Barley: chemistry and technology*[M]. St. Paul: American Association of Cereal Chemists, Minnesota. 1993: 131-197.
- [3] KACZMARCZYK A, BOWRA S, ELEK Z, et al. Quantitative RT-PCR based platform for rapid quantification of the transcripts of highly homologous multigene families and their members during grain development[J]. *BMC Plant Biology*, 2012, 12: 184.
- [4] JIN B, LIN L, FENG Z C, et al. Investigation of hordeins during brewing and their influence on beer haze by proteome analysis[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2011, 35: 1522-1527.
- [5] SIKDAR M S I, BOWRA S, SCHMIDT D, et al. Targeted modification of storage protein content resulting in improved amino acid composition of barley grain[J]. *Transgenic Research*, 2016, 25(1): 19-31.
- [6] ALTENBACH SB, TANAKA CK, ALLEN PV. Quantitative proteomic analysis of wheat grain proteins reveals differential effects of silencing of omega-5 gliadin genes in transgenic lines [J]. *Journal of cereal science*, 2014, 59 (2): 118-125.
- [7] 李静雯, 张正英, 令利军, 等. 利用 RNAi 抑制 *B-hordein* 合成降低大麦籽粒蛋白质含量 [J]. *中国农业科学*, 2014, 47 (19): 3746-3756.
- [8] MBELLA E G M, LIEVENS A, BARBAU-PIEDNOIR E, et al. SYBR Green qPCR methods for detection of endogenous reference genes in commodity crops: a step ahead in combinatory screening of genetically modified crops in food and feed products[J]. *European Food Research and Technology*, 2011, 232(3): 485-496.
- [9] 冯丹妮, 伍 钧, 杨虎德. 连续施用沼液水稻油菜轮作耕层土壤的细菌多样性 PCR-DGGE 分析[J]. *甘肃农业科技*, 2019(8): 41-49.
- [10] 赵 玮, 党占海, 张建平, 等. 胡麻 EST-SSRs 标记分布特征及 PCR 反应体系的优化 [J]. *甘肃农业科技*, 2016(10): 1-5.
- [11] SHEWRY P, BUNCE NAC, KREIS M, et al. Polymorphism at the *Hor 1* locus of barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. *Biochemical Genetics*, 1985, 23(5): 391-404.
- [12] PISTÓN F, MARTÍN A, DORADO G, et al. Cloning and molecular characterization of *B-hordeins* from *Hordeum chilense* (Roem. et Schult.) [J]. *Theoretical and Applied Genet-*

分蘖去留对玉米产量及其构成因素的影响

卢秉林^{1,2}, 车宗贤^{1,2}, 包兴国^{1,2}, 张久东^{1,2}, 吴科生^{1,2}, 杨蕊菊^{1,2}, 崔恒^{1,2}
(1. 甘肃省农业科学院土壤肥料与节水农业研究所, 甘肃 兰州 730070; 2. 农业部甘肃耕地保育与农业环境科学观测实验站, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 通过田间试验, 研究了河西绿洲灌区玉米分蘖去留对产量及其构成因素的影响。结果表明, 保留分蘖的玉米籽粒、秸秆、株高、穗位、径粗、穗长、穗粗、穗粒数、百粒重和收获指数分别高于去除处理 6.71%、5.09%、5.20%、7.45%、5.82%、3.01%、2.88%、4.89%、3.48%和 2.04%, 但差异均未达到显著水平。可见, 在河西绿洲灌区进行先玉 335 玉米生产时, 分蘖不会造成显著减产, 不需要去除。

关键词: 河西绿洲灌区; 玉米; 分蘖; 产量

中图分类号: S513 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2020)11-0016-03

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2020.11.004

Effects of Tiller Removing or Remaining on Yield and Yield Components of Corn in Hexi Oasis Irrigational Area

LU Binglin^{1,2}, CHE Zongxian^{1,2}, BAO Xingguo^{1,2}, ZHANG Jiudong^{1,2}, WU Kesheng^{1,2}, YANG Ruiju^{1,2}, CUI Heng^{1,2}

(1. Institute of Soil, Fertilizer and Water-saving Agricultural, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China; 2. Gansu Scientific Observing and Experiment Station of Ageo-Environment and Arable Land Conservation, Ministry of Agriculture, P.R. China, Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: Effects of tiller removing or remaining on yield and yield components of corn cultivar Xianyu 335 were studied by field experiment in Hexi Oasis Irrigational Area. The results showed that corn grain yield, straw yield, plant height, ear height, stem diameter, spike length, spike thickness, grain number per spike, 100-grain weight and harvest index of tiller remaining treatments were higher than those under removal treatment, respectively 6.71%, 5.09%, 5.20%, 7.45%, 5.82%, 3.01%, 2.88%, 4.89%, 3.48% and 2.04%. However, the differences did not reach the significant level. It can be seen that tillering will not reduce production and does not need to be removed when Xianyu 335 corn is produced in Hexi Oasis Irrigation Area.

Key words: Hexi Oasis Irrigational Area; Corn; Tiller; Yield

分蘖是玉米生长过程中的常见现象, 其产生受品种、环境条件、种植密度、田间施

收稿日期: 2020-05-11

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1903700)。

作者简介: 卢秉林(1979—), 男, 甘肃民勤人, 副研究员, 主要从事秸秆还田和保护性耕作方面的研究工作。Email: lblhappy@163.com。

ics, 2005. 111: 551-560.

[13] HAN Z X, QIAN G, WU F, et al. Sequences variation and classification of *B-hordein* genes in hull-less barley from Qinghai-Tibet Plateau [J]. *Molekuliarnaia Biologiya*, 2008, 42: 63-70.

[14] HANSEN M, FRIIS C, BOWRA S, et al. A

pathway-specific microarray analysis highlights the complex and co-ordinated transcriptional networks of the developing grain of field-grown barley [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(1): 153-167.

(本文责编: 陈伟)