

学术争鸣

农杆菌 LBA4404 不含内源 GUS 基因*

徐增富 李宝健

(中山大学生物工程研究中心, 广州 510275)

摘要 用长度为 21 bp 的一对 β -葡萄糖苷酸酶 (GUS) 基因的 PCR 引物, 从根癌农杆菌 LBA4404 细胞总 DNA 中扩增不出任何片段, 但从含 pBI121 的 LBA4404 细胞总 DNA 中可扩增出一条预期大小 (1.2 kb) 的 GUS 基因片段, 这表明根癌农杆菌 LBA4404 不含内源 GUS 基因。

关键词 根癌农杆菌, 内源 β -葡萄糖苷酸酶基因, PCR 检测

刘颖等^[1] (1995 年) 根据其 PCR 扩增结果认为根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 含有内源 β -葡萄糖苷酸酶 (β -glucuronidase, GUS) 基因。我们对这篇论文进行认真推敲, 根据已有的有关文献资料^[2~6]以及我们的实验结果, 我们认为这一结论是不正确的。

首先, 刘颖等进行 PCR 扩增时所用的模板是“根癌农杆菌 LBA4404 的 Ti 质粒 DNA”, 但其得出的结论是“根癌农杆菌 LBA4404 染色体中含有 GUS 基因”^[1]。显然, 这样的推论是不正确的。

建立 GUS 基因融合系统的 Jefferson^[2,3]指出: 只有导入了含 GUS 基因质粒的农杆菌才表现有一定的 GUS 活性, 但农杆菌本身并没有内源 GUS 活性。Wilson 等^[4] (1992 年) 在一本关于 GUS 的专著中也提到农杆菌中没有发现 GUS 活性。两项直接的实验结果^[5,6]也表明农杆菌中检测不到 GUS 活性。其中 Janssen 等^[5] (1989 年) 所用的农杆菌菌株中就有根癌农杆菌 LBA4404。但这些文献中大多只是指出农杆菌中没有内源 GUS 活性, 并无直接实验表明农杆菌中没有内源 GUS 基因 (Janssen 等^[5]在文章中曾提到农杆菌缺乏 GUS 基因)。

为了明确根癌农杆菌 LBA4404 中有无内源 GUS 基因, 我们分别提取了 LBA4404 的细胞总 DNA (按文献 [7] 的方法), 并用纯化的 pBI121 作对照, 参考 Hamill 等^[8]的方法进行 PCR 扩增。所用的引物是: 5'GGTGGGA-AAGCGCGTTACAAG 3'和 5'GTTTACGCGT-TGCTTCCGCCA 3', 各 21 bp, 分别位于 GUS 基因序列的 400→420 和 1599→1579 处^[9]。反应体积为 50 μ l; 含 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3 (25℃), 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.001% 明胶, 200 μ mol/L dNTP, 1.25U Taq DNA 聚合酶 (Perkin-Elmer Centus), 5 ng 质粒 DNA 或 50 ng 农杆菌总 DNA 模板, 1 μ mol/L 的引物。混合物用 50 μ l 矿物油 (Sigma M5904) 覆盖。PCR 反应在 Perkin-Elmer Centus 的 DNA Thermal Cycler 480 上进行, 循环参数如下: 95℃ 处理 5 min; 94℃ 变性 30 s, 61℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 20 个循环; 94℃ 变性 30 s, 61℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 10 个循环; 72℃ 延伸 5 min。取 10 μ l 反应产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 用溴化乙锭染色, 在紫外灯下观察、照相。PCR 扩增结果如图 1 所示, 只有以含

* 广东省青年科学基金资助项目 (920012)。

收稿日期: 1996-01-10, 修回日期: 1996-04-06

pBI121 质粒的 LBA4404 细胞总 DNA 为模板可扩增出一条与纯化的 pBI121 扩增产物大小一致 (1.2kb) 的 GUS 基因片段, 而以不含 pBI121 的 LBA4404 细胞总 DNA 为模板扩增不出任何产物, 这表明 LBA4404 不含内源 GUS 基因。

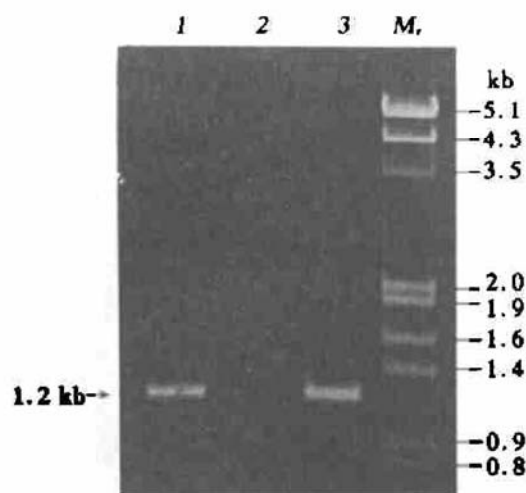


图 1 根癌农杆菌 LBA4404 中 GUS 基因的 PCR 检测

1: LBA4404 (pBI121); 2: LBA4404;
3: pBI121; M: λ-DNA EcoRI/HindIII
分子量标准。

至于刘颖等^[1]的实验结果, 我们分析主要可能有两方面(或其中之一)原因: a. 可能是 PCR 反应过程中的退火温度(55℃)偏低, 而出现假带。Hamill 等^[8]用 21 bp 的引物(本实验所用引物与之相同)扩增转基因植物中的 GUS 片段时, 发现退火温度低于 61℃ 就会出现假带或不清晰的成片电泳条带。他们认为经验公式 $T_m = 69.3 + 0.41(G+C)\% - 650/N$ (N 为引物的长度) 估计退火温度较为合适。根据这一公式推算, 用刘颖等人设计的引物, 退火温度为 61℃。b. 所用的根癌农杆菌 LBA4404 被污染。

致谢 本研究所用 PCR 引物由本中心尹中朝博士提供, 谨致谢意。

参 考 文 献

- 1 刘颖, 金振华, 林忠平. 生物工程进展, 1995; 15 (2): 46
- 2 Jefferson R A. Plant Mol Biol Reporter, 1987; 5 (4): 387
- 3 Jefferson R A. In: Setlow J K ed. Genetic engineering, principles and methods. New York: Plenum Press, 1988; 10: 247
- 4 Wilson K J, Hughes S G, Jefferson R A. In: Gallagher S R ed. GUS protocols: using the GUS gene as a reporter of gene expression. San Diego: Academic Press Inc. 1992; 7~22
- 5 Janssen B, Gardner R C. Plant Molecular Biology, 1989; 14: 61
- 6 Vancanneyt G, Schmidt R, O'Connor-Sanchez A *et al.* Mol Gen Genet, 1990; 220: 245
- 7 Keller G H, Manak M M. 孙士勇等译. DNA 探针技术. 北京: 科学出版社, 1992: 29~30
- 8 Hamill J D, Rounsley S, Spencer A *et al.* Plant Cell Reports, 1991; 10: 221
- 9 Jefferson R A, Burgess S M, Hirsh D. Proc Natl Acad Sci USA, 1986; 83: 8447

***Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 Lacks Intrinsic β -Glucuronidase (GUS) Gene.**
Xu Zengfu, Li Baojian (Biotechnology Research Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China).

Abstract Direct evidence for the lack of intrinsic β -glucuronidase (GUS) gene in *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 was presented using PCR technique. No amplified fragment was obtained with a 21 bp primer pair, which is specific for the sequence of the GUS gene, from total cell DNA of the *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, whereas a single 1.2 kb fragment, which is identical in size to that predicted for the internal GUS gene fragment, was amplified with the same primer pair from total cell DNA of the LBA4404 containing the plasmid pBI121 and from purified pBI121 respectively.

Key words *Agrobacterium tumefaciens*, Intrinsic β -glucuronidase gene, PCR detection