

离子束介导甘蓝全 DNA 转化拟南芥菜的分子分析

卞 坡¹, 苏明杰², 秦广雍², 余增亮¹, 霍裕平²

(1. 中国科学院等离子体物理研究所离子束生物工程实验室, 合肥 230031; 2. 郑州大学离子束生物工程实验室, 郑州 450052)

摘要: 30 keV 的 Ar⁺ 离子束在 1.5×10¹⁷ ions/cm² 的注入剂量下介导外源甘蓝全 DNA 导入模式植物拟南芥菜, 在 94 株转化当代植株中, 有 6 株表型产生变异。以其中的一株(T-5)作为研究对象, 用 80 条 10 碱基随机引物对该株和其子代变异株基因组作随机扩增的多态性 DNA 分析, 引物 S176 在 T-5 和其变异子代 T-5-2 中扩增出了相同分子量的变异新条带 T-5S176-620。T-5S176-620 的碱基序列和拟南芥菜基因组序列进行同源比对, 结果表明该片段不属于拟南芥菜基因组, Southern 杂交实验证明该片段来自供体甘蓝基因组。但是, 根据 T-5S176-620 序列设计的引物不能从甘蓝基因组中扩增出预期长度的 DNA 片段, 结合离子束介导外源全 DNA 转化的特点和过程, 探讨了其中可能的机制。

关键词: 低能 Ar⁺ 离子介导外源全 DNA 转化; 拟南芥菜; 随机扩增的多态性 DNA; 同源比对

中图分类号: Q691.5

1 引 言

1986 年, 余增亮等^[1]首先发现了离子注入对生物的诱变效应, 开辟了低能离子与生物体作用的新领域。低能离子作为载荷重离子, 与生物有机靶的作用既有通过动量传递使表面原子离开靶面的物理溅射, 又有通过激发和电离引起有机大分子某些化学键断裂产生气体小分子逸出靶面的化学溅射^[2]。在低能离子束辐照生物组织时, 物理和化学溅射作用能对生物组织进行层层刻蚀, 由于生物组织结构本身的极度不均一性, 刻蚀作用能在生物组织和细胞中形成可供大分子通过的“通道”。此外, 低能离子辐照时所带正电荷在“通道”内的沉积以及离子辐照引起靶细胞内 DNA 的单链和双链断裂都有利于外源 DNA 进入靶细胞并整合到其基因组中^[3]。这些特点使低能离子束成为介导外源基因转化的有效手段, 葡糖醛酸酶 (β -glucuronidase, GUS)、氯霉素乙酰转移酶 (chloramphenicol acetyl transferase, CAT)、潮霉素(hygromycin phosphotransferase, HPH)等标记基因在多种生物材料上的成功转化证明了这一点^[4-7]。在此基础上发展起来的低能离子束介导外源全 DNA 转化是以外源供体的基因组片段为转化对象, 目的是实现远缘物种间 DNA 水平的分子片段杂交, 这对于扩大作物的遗传基础, 获得丰富的品质资源有着深远的意义, 并已在水稻、小麦和西瓜等作物上取得了较大的进

展^[7-10]。但是这种遗传转化方法长期以来却颇受质疑, 其中的一个主要原因是我们转化的是外源供体的基因组 DNA, 与构建的表达载体相比, 其在受体基因组中的重组缺少有效的检测手段。故到现在为止, 一直没有外源 DNA 片段整合进受体基因组的分子证据, 外源 DNA 片段进入受体细胞的方式和整合规律更是空白。本文以拟南芥菜 (*Arabidopsis thaliana*) 为研究对象, 用甘蓝作为外源 DNA 供体, 以随机扩增的多态性 DNA (randomly amplified polymorphic DNA, RAPD) 等分子生物学常用技术作为分析手段, 旨在寻找离子束介导外源全 DNA 转化的分子证据。实验结果也表明在该转化技术中外源 DNA 片段在受体基因组中的整合具有新的特点。

2 材料与方 法

2.1 实验材料

转化受体为拟南芥菜 (*A. thaliana*, Columbia 生态型), 由英国 Nottingham 大学拟南芥菜储存中心

收稿日期: 2003-01-13

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目资助课题
(2001BA302B-03)

通讯作者: 卞坡, 电话: (0551) 5591382,

E-mail: luckybian@163.com

(NASC)提供, 编号 N1092, Col-1 的直系后代, 种植一代后收获足量种子, 干燥后储藏备用, 种子的含水量约为 9.6%。外源 DNA 供体为中甘 8 号甘蓝。

2.2 实验仪器和试剂

离子注入机为俄罗斯产的 TITAN 源低能离子注入机, PCR 扩增仪型号为 GeneAmpPCR System 2400, DNA 测序仪器为 ABI PRISM 377-96, 测序试剂为 BigDye terminator v2.0。非同位素 (Digoxigenin-dUTP) Southern 杂交标记和检测试剂盒购自 PRMEGO 公司。杂交炉型号: Hybaid™ (英国)。基因组 DNA 小量制备试剂盒 (No. SK252)、UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒 (No. SK131, NaI version)、T-载体 PCR 产物克隆试剂盒 (D0211, pUCm-T vector)、RAPD 引物、Taq plus DNA Polymerase、dNTP 以及相关试剂购自上海生物工程公司。PCR 引物由上海生物工程公司合成。预杂交液成分: 6×SSC, 5×Dehardt 溶液, 0.5%SDS, 100 μg/ml 变性鲑精 DNA 片段。杂交液成分: 6×SSC, 5×Dehardt 溶液, 0.01 mol/L EDTA (pH8.0), 0.5% SDS, 100 μg/ml 变性鲑精 DNA 片段。

2.3 离子束介导外源甘蓝全 DNA 转化拟南芥菜种子

供体甘蓝基因组的提取采取 CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide, 非离子型去污剂十六烷基三甲基溴化铵) 方法^[11], 所得基因组片段长度 30~50 kb, 集中于 40 kb, 溶解于 pH8.0 的 TE 缓冲液, $OD_{260}/OD_{280}=1.9$, 调整浓度为 800 μg/ml。注入离子为 Ar⁺, 能量 30 keV, 剂量 1.5×10^{17} ions/cm², 脉冲注入, 25 Hz, 400 μs/plus, 该脉冲条件下, 完成注入大约需 2.5 h。注入机的工作真空为 $2 \times 10^{-2} \sim 6 \times 10^{-2}$ Pa, 靶室中样品台通水冷却, 温度可保持在 60℃ 以下。注入完成后立即浸入 800 μg/ml 的甘蓝全 DNA 溶液, 室温浸泡 12 h 后, 用 TE 溶液冲洗种子 3 遍, 蒸馏水冲洗一遍, 置 4℃ 冰箱春化 48 h。种植于光照培养间, 种植数目 100 粒。设置同样数量的原种对照(CK)、离子注入对照、原种、离子注入浸泡 TE 对照。培养间条件: 土壤为花卉营养土, pH 值 4.5~5.0, 光强 5000~6000 lux, 光照时间 16 h, 温度 20~22℃, 昼夜温差 2℃。

2.4 转化材料的 RAPD-PCR 扩增

剪取拟南芥菜营养生长中期的鲜嫩叶片约

100 mg, 用酒精擦净叶面, 蒸馏水冲洗三遍, -20℃ 保存。模板 DNA 抽提时, 对抽提试剂盒 GENOMIC DNA MINPREPS KIT 的抽提步骤稍加改动 (加入 cell lysis solution 后 65℃ 温浴 1 h, 加入 precipitation solution 后 65℃ 温浴 30 min), 提取的模板 DNA 溶于 pH9.0 的 TE 缓冲液。选择 80 条 10 碱基随机引物, 引物编号为 S41-80, S161-200, 25 μl 反应体系, taq plus 10×buffer 2.5 μl, taq plus DNA polymerase 1 μl, 25 ng 的模板 DNA, dNTP(dATP:dTTP:dCTP:dGTP=1:1:1:1) 400 μmol/L, primer 0.4 μmol/L。RAPD-PCR 的反应条件: 94℃ 预变性 30 s, 46 个扩增循环为 95℃ 变性 30 s, 36℃ 复性 15 s, 72℃ 延伸反应 1 min, 46 个循环完成后, 72℃ 补平 8 min^[12]。1.2%的琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察照像。

2.5 变异条带的 DNA 测序和同源比对

对 RAPD-PCR 扩增结果中的新增变异条带用胶回收试剂盒回收, 克隆到 pUCm-T 载体后转化到预先制备的 DH-5α 感受态宿主菌, 平板培养, 蓝白斑选择, 挑取阳性克隆, 摇瓶培养过夜, 提取质粒, 电泳验证目的片段是否插入到载体中, 确证后测序。测序结果和 TIGR (The Institute of Genome Research) 数据库中拟南芥菜基因组序列进行同源比对, 比对软件是由 Gish 等开发的 BLASTN (Basic Local Align Search Tool Nucleotide)^[13]。比对算法矩阵 blosum62, 期望值 $E=10$, 数据库 ATH1_chr_all.5con, 其它比对参数均为缺省值。

2.6 PCR 扩增

根据新增变异条带的碱基序列, 设计两套 PCR 引物:

Primer1: 5' GGCAACATCAACCTTATC3'
(+93 ~ +110),

Primer1': 5' GTGCTATTCGCAATTACTTTT3'
(+381 ~ +400 的互补链)

Primer2: 5' TTGGCATGTGAATCGAGTTTTGT3'
(+58 ~ +80)

Primer2': 5' ACCGCTTCATAATTTGTTGTA3'
(+460 ~ +480 的互补链)

Primer1/1' 的复性温度 45.5℃, Primer2/2' 的复性温度 48.8℃。分别以拟南芥菜对照(CK)、扩增出变异新条带(RAPD)的表型变异株和甘蓝的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增条件为 94℃ 变性 10 min, 30 个循环内 94℃ 变性 45 s, 每套引

物的复性温度复性 30 s, 72°C 连接 2 min, 循环结束后 72°C 保持 10 min。

2.7 Southern 杂交

对甘蓝基因组 DNA 进行 Southern 杂交, 分别以对照 (CK) 基因组为阴性对照, 回收新增变异片段 (克隆在 pUCm-T 测序载体中) 为阳性对照。Primer2/2' 对新增变异片段的扩增产物胶回收后标记为 Southern 杂交探针。非同位素 (Digoxigenin-dUTP) 的标记与检测均根据非放射性标记及检测试剂盒的产品说明书。对照 (CK) 和甘蓝的基因组经内切酶 E.coRI 37°C 酶切过夜, 琼脂糖凝胶电泳后, 在碱性条件下, 向尼龙膜进行毛细吸附转移。杂交在杂交炉中进行, 杂交温度为 45°C。

3 结果

3.1 转化当代和 2 代的表型变异

在 100 粒经离子束介导甘蓝全 DNA 转化的拟南芥菜种子中, 出芽 94 个, 成苗 90 株, 其中黄化苗 3 株, 表型变异两株, 变异率为 5.6%。选择其中表型变异较大的一株 (编号为 T-5) 作为本实验的研究对象, 如图 1A。T-5 植株在营养生长阶段从第四片叶原基发育开始异常, 第 5 片叶原基位置

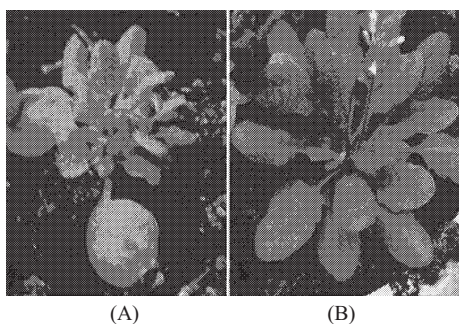


Fig.1 The phenotypic variation of T-5 plant. (A) T-5; (B) Control

错位, 其后叶原基发育不再为螺旋状, 叶子短小, 形状极不规整, 成簇状生长。进入生殖生长期的时间较对照(CK)晚 12 天。II、III 型体节均正常, 第一茎生叶有明显的缺刻, 整个株型较弱小。T-5 植株 2 代播种 100 粒, 成苗 96 株, 子代大部分个体表型正常, 有两株基本保持其亲本的变异性状 (记为 T-5-1 和 T-5-2), 一株主轴次生枝对生 (记为 T-5-3), 一株主轴无次生枝 (记为 T-5-4)。

3.2 RAPD-PCR 反应

提取的拟南芥菜基因组 DNA 样品经紫外分光

光度计检测, $A_{260} / A_{280} > 1.8$, 经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, DNA 片段整齐, 片段大小 30 kb, 符合 RAPD 实验的要求。RAPD-PCR 扩增中共选择了 80 条随机引物对 2 个对照 (CK)、T-5 株和其子代变异株的基因组做 RAPD-PCR 分析, 其中 72 条引物对对照 (CK) 的 RAPD-PCR 扩增产生 184 条清晰条带。对于 S176 引物, T-5 与对照 (CK) 相比有 1 个我们感兴趣的新增条带, 如图 2, 该条带长度为 620 bp, 记为 T-5S176-620, 重

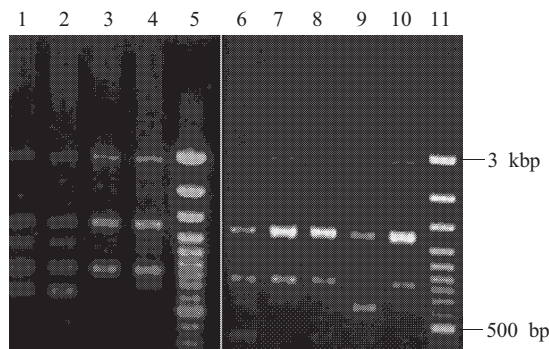


Fig.2 The result of RAPD amplification to T-5 and its 2nd generations with random primer S176.

1,2: T-5; 3,4,6: Control; 5,11: Marker; 7: T-5-4; 8: T-5-3; 9: T-5-2; 10: T-5-1

复三次, 结果稳定。随机引物 S176 对 T-5 子代变异株 T-5-1、T-5-2、T-5-3、T-5-4 基因组的扩增结果见图 2, 变异株 T-5-2 扩增出与其亲本相同的变异新条带。随机引物 S176 的序列组成为 5'-TCTC-CGCCCT-3'。

3.3 测序结果

对 T-5S176-620 进行回收测序, 测序引物 M13(+)和 M13(-), 正反两个反应, 在测序精度保证的情况下可以覆盖 620 个碱基长度的目的片段。

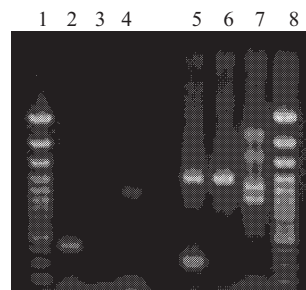


Fig.3 PCR amplification of genomes of the control, T-5, cabbage with primer1/1' and primer2/2'. 1,8: Marker; 2,3,4: T-5, control and cabbage for Primer2/2'; 5,6,7: T-5, control and cabbage for Primer1/1'

两个反应的测序结果经拼接整理, T-5S176-620 的完整序列如下:

```

1   TCTCCGCCCT  TGCATATATA  CACACTTAGT  ACTTACGCAC  TTAGAGCTCC
51  ACCGCCCTTG  GCATGTGAAT  CGAGTTTTGT  AATTATAACC  GAGGCAACAT
101 CAACCTTATC  TTTAAACGCC  TTGGCCTATA  ACAGTCACAG  TTACAGTAGA
151 TTGTTATTAG  CAATAGATTG  CCACGATCAG  CAGAAAGCTG  TTATTTAATT
201 TTATATTTTT  TACCTTCATT  TTTTAAATTA  TTACTTGCTC  TCTATTTTAG
251 AAATAGAAGC  AATGAATAAA  AATCATAATC  AATGCAAATA  TGGAGAACAC
301 AACACAAAGA  ATATAAATAT  TATAATACGG  TGGGTATCAA  TGTGTAATAA
351 CTATAATATG  TTGGGTTACC  ACGTACAAAC  AAAAGTAATG  CGAATAGCAC
401 GTACAAACCA  GAATAAATAT  ATAACTCATG  GCACCTCATG  TTAAATGATT
451 ATAGCCTAAT  ACAACAAATT  ATGAAGCGGT  AGCAATAACC  ATACCGAAGT
501 TAAATAGACA  CAGCTATATA  CATGTATGCC  TACTTACTAA  TTGTAATAGC
551 AGATTGTAGG  TACATGTATA  TACCTGAATA  TCAACGTGTG  TGTCTGTATA
601 CTGTATATTA  GGGCGGAGA

```

该序列 AT 的含量较高, 占 66.56%, 序列分析表明, 该序列和其互补链的 6 个读框中都包含多个终止编码, 但也有完整的 ORF, 最长的 ORF 长 180 bp。

3.4 T-5S176-620 与拟南芥菜基因组的同源比对

以 T-5S176-620 的序列作为 query sequence, 在 TIGR 的拟南芥菜基因组序列库中进行比对查询。比对结果中高分值序列有五条, 分值较低的序列有 15 条。和提交序列 30~180 范围匹配度较高的序列有 3 个搜索击中, 3 个击中中 2 个位于拟南芥菜第一条染色体, 1 个位于第五染色体。相似性均为 64%, 和提交序列 230~619 范围有较高匹配度的有 12 个搜索击中, 相似性在 55%~60% 之间。在 E=10 的 BLAST 搜索条件下, 提交序列 180~230 范围内没有分值较高的搜索击中。

3.5 PCR 扩增结果

用 Primer1/1' 和 Primer2/2' 引物分别扩增对照 (CK)、T-5 植株和甘蓝的基因组 DNA, 扩增结果如图 3。Primer1/1' 的扩增产物长度为 308 bp, 这套引物在 T-5 基因组中扩增出了该长度的 DNA 片段, 但在对照 (CK) 和甘蓝基因组中没能扩增出 308 bp 的片段。Primer2/2' 的扩增产物长度为 423 bp, 扩增结果和 Primer1/1' 的情形相似。

3.6 Southern 杂交结果

杂交结果如图 4。在甘蓝基因组的泳道 4.7 kb 处出现一条阳性杂交带, 对照 (CK) 基因组上没有阳性杂交条带。

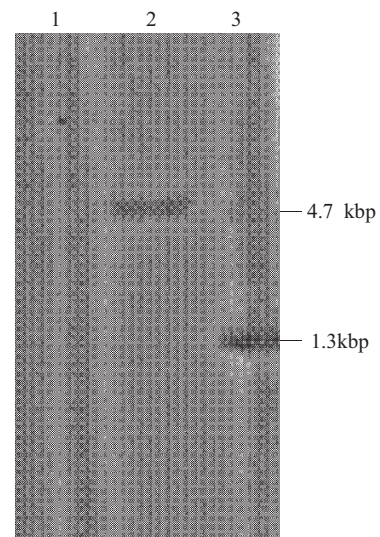


Fig.4 The southern blot of genomes of *A.thaliana* and cabbage digested by E.coRI with T-5S176-62 as probe.

1: Control; 2: Cabbage; 3: Positive control

4 分 析

本实验设计了严格的对照体系, 包括空白对照 (CK)、离子注入对照、离子注入浸水、TE 对照。在以上的一系列对照中, 均无黄花苗和表型变异, 可以说明 T-5 和其子代的表型变异与外源全 DNA 转化有着直接的联系。拟南芥菜幼苗的主体组织结构是顶-基轴模式, 种子萌发后, 植物地上部分的所有组织器官的形态发生都与成熟胚的茎分生组织

密不可分^[4]。拟南芥菜成熟胚的茎分生组织是由多个细胞组成的,在离子束介导外源全 DNA 的转化过程中,被转化的分生组织细胞(部分细胞是未经转化的)极有可能被导入的是不同的外源 DNA 片段,这些不同的外源 DNA 片段在受体细胞中的作用也是不同的,因此 T-5 最有可能是嵌合体。T-5 子代大部分个体表型恢复正常,少数变异株中又存在较严重的性状分离,造成这种遗传现象的原因除了生殖过程中基因的重组合外,T-5 为嵌合体也可能是一个重要的因素。

在对 T-5 及其子代的 RAPD-PCR 分析中,S176 引物在 T-5 和其一个子代变异株 T-5-2 中扩增出相同的变异新条带 T-5S176-620,说明了该变异是可以遗传的。T-5S176-620 和拟南芥菜基因组相应片段的匹配度较低,TIGR 的拟南芥菜基因组序列也是来自 Columbia 生态型,个体的差异在基因组的局部区域不可能达到如此显著性的水平。Primer1/1' 和 Primer2/2' 两套引物均不能从对照(CK)中扩增出期望长度的 DNA 片段。以 T-5S176-620 部分序列作探针和对照(CK)基因组没有阳性杂交条带,这都说明 T-5S176-620 不是拟南芥菜基因组本身的序列。T-5 是离子束介导的外源甘蓝全 DNA 转化体,T-5S176-620 应该来自甘蓝基因组,T-5S176-620 作探针与甘蓝基因组的 Southern 杂交结果证明了这一点。

然而,根据 T-5S176-620 设计的两套 PCR 引物 Primer1/1' 和 Primer2/2' 却不能从甘蓝基因组中扩增出对应大小的 DNA 片段,我们结合离子束介导外源全 DNA 转化的特点对这一现象进行了如下的分析推测。离子束介导外源全 DNA 转化的目的是实现物种间分子水平的片段杂交,该方法的原理起始于周光宇^[5]的分子水平的片段杂交理论。离子束介导的外源全 DNA 转化的结果证明分子水平的片段杂交确实能引起受体的变异,甚至能产生一些供体的性状,但是其机理的研究远没有目的基因转化深入、详细,我们对目的基因作转化操作时,完善、简洁的筛选体系保证了转化载体的完整性。在离子束介导的外源全 DNA 转化技术中,我们操作的是外源基因组的全 DNA 片段,具体到哪些遗传信息进入受体细胞,以什么方式整合到受体基因组,缺少有效的筛选和验证手段,因此不能保证我们检测到的外源片段在受体细胞中保持原来的结构,因为受体细胞对外源 DNA 有一个“修饰”的过程,如酶切等。本实验中分别以 Primer1/1' 和

Primer2/2' 为引物的 PCR 扩增结果就可能受到了这种“修饰”的干扰。其实,这种“修饰”在目的基因的遗传转化中也是存在的,但是这种“修饰”同时也可能导致转化载体中报告基因丧失功能,而使转化体不能通过对应的筛选体系(如抗生素抗性),因此在目的基因的转化过程中经常忽视这一问题。而离子束介导的外源全 DNA 转化过程中没有类似的方法屏蔽掉这种经过“修饰”的外源 DNA 片段,因此我们在对受体的变异性状进行评估时,要考虑到引起该性状变异的外源片段可能和外源供体中对应片段在序列组成上已经有所不同。

参考文献:

- [1] 余增亮. 离子注入水稻诱变机理初探. 安徽农业科学, 1989, 39(1):12~16
- [2] Foti AM, Milano F, Torrisi L. Amino acid decompositions induced by keV ions irradiation. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, 1990,B46:361~363
- [3] 周光明, 卫增泉, 李文建, 何静, 李强, 王菊芳. 碳离子诱导的双链断裂. 生物物理学报, 1998,14(1):145~149
- [4] Yu ZL, Yang JB, Wu YJ, Cheng BJ, He JJ, Huo YP. Transferring GUS gene into intact rice cells. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, 1993,B80/81:1328~1331
- [5] 吴丽芳, 李红, 冯慧云, 吴李君, 余增亮. 用低能氦离子束介导将水稻几丁质酶基因导入小麦. 科学通报, 2000,44(22): 2316~2321
- [6] Anuntalabhochai S, Chandej R, Phanchaisri B, Yu LD, Vilaithong T, Brown IG. Ion-beam-induced deoxyribose nucleic acid transfer. *Applied Physics Letters*, 2001,78(16): 2393~2396
- [7] 尹若春, 吴丽芳, 吴李君, 余增亮. 低能离子束介导的遗传转化研究进展. 生物技术通报, 2001,17(3):32~35
- [8] 余增亮. 离子束生物技术引论. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1999. 264~267
- [9] 吴丽芳, 余增亮. 离子注入法获得大豆-小麦分子远缘杂种及后代的变异分析. 核农学报, 2000,14(4):206~211
- [10] 宋道军, 王浩波, 杨坤, 尹若春, 吴李君, 余增亮. 离子束处理将外源基因导入西瓜研究初报. 中国西瓜甜瓜, 2001,(2): 2~3
- [11] Ausubel F, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl k. 颜子颖, 王海林, 译. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 1998. 37~38
- [12] Reiter RS, Williams JG, Feldmann KA, Rafalski JA, Tingey SV, Scolnik PA. Global and local genome mapping in ara-

- bidopsis thaliana by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992,89(2):1477~1481
- [13] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 1990,215:403~410
- [14] 刘良式. 植物分子遗传学. 北京:科学出版社, 1998. 331~339.
- [15] 周光宇. 从生物化学角度探讨远缘杂交的理论. 中国农业科学, 1978,11(2):16~20

THE MOLECULAR ANALYSIS OF CABBAGE TOTAL DNA TRANSFORMATION INTO *A.thaliana* MEDIATED BY keV ION BEAM

BIAN Po¹, SU Ming-jie², QIN Guang-yong², YU Zeng-liang¹, HUO Yu-ping²

(1. Ion Beam Bioengineering Laboratory Institute of Plasma Physics, Academia Sinica, Hefei 230031, China;

2. Ion Beam Bioengineering Laboratory, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: The total DNA of cabbage was transferred into *A. thaliana* mediated by Ar⁺ ion beam with the energy of 30 keV and influence of 1.5×10^{17} ions/cm². Among the 94 transferred plants, there were 6 phenotypic variation plants. One of them, marked as T-5, was studied. The genomes of T-5 and its offspring were analyzed by RAPD-PCR with 80 10-base random primers. The result showed that by contrast to the control, a new band, T-5S176-620, was amplified from T-5 and its offspring T-5-2 with random primer S176. Its sequence was aligned with genome of *A. thaliana* by means of program of homologous alignment. A Southern blot to cabbage genome with T-5S176-620 as probe was carried out. Both of their results indicated that T-5S176-620 was not in *A. thaliana* but from cabbage. However, the desired length DNA segments could not be amplified from cabbage genome with primers designed with reference to T-5S176-620. In terms of the specialties of total DNA transformation mediated by keV ion beam, the possible reason was analyzed.

Key Words: Total DNA transformation mediated by keV Ar⁺ ion beam; *Arabidopsis thaliana*; Randomly amplified polymorphic DNA; Homologous alignment