

文章编号: 1009-038X(2002)04-0379-05

多重 PCR 方法检测食品中转基因成分

刘光明^{1,2}, 苏文金¹, 梁基选¹, 高榕², 宋思扬¹, 陈伟铃²

(1. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005; 2. 厦门出入境检验检疫局, 福建 厦门 361012)

摘要: 根据转基因农作物中最常用的花椰菜花叶病毒启动子(CaMV 35S)和根癌农杆菌终止子(NOS)的序列, 设计合成了两对不同的引物和相对应的两种荧光双链探针(FDCP), 分别建立了多重 PCR、应用 FDCP 的实时荧光 PCR 同时检测转基因成分 35S 启动子和 NOS 终止子的方法. 并利用该套方法对马铃薯、大豆、玉米、甜椒、番茄等实物样品进行了检测, 发现 13 份样品中有 6 份检出 35S 启动子、NOS 终止子, 其余 7 份样品的检测结果为阴性. 表明作者建立的多重 PCR 方法能有效检测出 35S 和 NOS 成分, 其中多重 PCR 法具有灵敏度高、特异性好的特点, 多重荧光 PCR 法则更为简便、快速、准确.

关键词: 转基因食品; 多重 PCR; 荧光 PCR; 荧光双链探针

中图分类号: Q 789

文献标识码: A

Multiplex PCR for Detecting Transgenic Component in Foods

LIU Guang-ming^{1,2}, SU Wen-jin¹, LIANG Ji-xuan¹, GAO Rong²,
SONG Si-yang¹, CHEN Wei-ling²

(1. School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005 China; 2. Xiamen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xiamen 361012 China)

Abstract: The article is to establish a PCR method for detecting transgenic component 35S promoter derived from Cauliflower Mosaic Virus and NOS terminator derived from *Agrobacterium tumefaciens* simultaneously. According to the specific sequence of 35S and NOS which have been used in transgenic crops frequently, two pairs of primers and two pairs of corresponding fluorophore double-chain probes (FDCP) were designed and synthesized. PCR & Fluorescence PCR (FPCR) methods were established for general screening of transgenic component 35S and NOS simultaneously with Multiplex PCR in a tube. 13 samples were tested with PCR & FPCR. The results showed that 6 samples were positive, 7 samples were negative. The methods gave a sensitive, specific, simple and accurate detection of transgenic component, and thus provided a useful tool for routine analysis of raw and processed food products.

Key words: genetically modified food; multiplex PCR; fluorescence PCR; fluorophore double-chain probe

收稿日期: 2002-02-22; 修订日期: 2002-04-20.

基金项目: 厦门市科技计划项目(3502Z2001109)资助课题.

作者简介: 刘光明(1972-), 男, 湖南株洲人, 分子生态学博士研究生, 工程师.

目前转基因食品大多来源于转基因农作物. 据全球农业生物技术应用咨询署提供的统计资料显示, 2001年美国、阿根廷、加拿大等国家开始商业化种植转基因作物^[1]. 转基因技术给人们带来了巨大的社会经济效应的同时, 相关产品的环境释放及食用安全性也受到越来越广泛的关注, 为了能够对其做出综合评价和实施有效监管, 建立合适的方法对转基因作物及食品进行检测非常重要^[2]. 当前植物性转基因食品的检测采用的技术路线有两条, 一是应用 PCR、Southern 杂交检测插入的外源基因^[3]; 二是应用 ELISA、Western 杂交检测表达的重组蛋白^[4]. PCR 技术应用于转基因食品的检测, 其敏感快速简便的特点是其它检测技术所无法比拟的^[5], 荧光 PCR 技术集 PCR 和探针杂交技术的优点为一体, 直接探测 PCR 过程中的荧光变化, 可获得 DNA 模板的准确定量结果^[6,7].

根据商品化转基因作物中常用的花椰菜花叶病毒启动子 (CaMV 35 S) 和根癌农杆菌终止子 (NOS) 的序列特点, 设计并合成了两对引物及相对应的荧光双链探针, 分别建立了 35 S 启动子和 NOS 终止子双组分的多重 PCR、荧光 PCR 检测方法. 其中多重 PCR 检测方法适用于转基因食品定性筛选试验, 具有快速灵敏、特异性高的特点; 实时荧光 PCR 检测方法可用于转基因食品的进一步定量分析和鉴定试验, 具有技术先进、结果准确的特点.

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 样品 从厦门口岸入境的来自美国、加拿大、荷兰等国的马铃薯、大豆、玉米的随机样, 番茄、甜椒样品由厦门北大之路生物工程有限公司提供, 质粒 pCAM BIA1301 和非转基因样品由厦门大学生命科学学院夏宁邵副研究员提供.

1.1.2 仪器与试剂 GeneAmp9600 型 PCR 仪、iCycler iQ™ 实时荧光 PCR 仪、LG9712-042UVP 凝胶成像系统等. Taq 酶、dNTP、RNaseA、100 bp DNA Ladder 等购自上海 Promega 公司.

1.1.3 引物和荧光双链探针 35S 引物为 5'-GCT CCT ACA AAT GCC ATC A-3' 及 5'-GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA-3', NOS 引物为 5'-GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG-3' 及 5'-TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA-3'. 35S 荧光探针为 HEX-5'-GAG GAG CAT CGT GGA AAA AGA AG-3' 及 5'-TTT TCC ACG ATG CTC CTC-3'-DABCYL.

NOS 荧光探针为 FAM-5'-GCA TGA CGT TAT TTA TGA GAT GGG T-3' 及 5'-TCA TAA ATA ACG TCA TGC-3'-DABCYL. 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成.

1.2 实验方法

1.2.1 样品 DNA 的提取 采用改良 CTAB 法^[8], 浓度测定采用紫外分光光度法.

1.2.2 多重 PCR 检测

1) 扩增反应体系: 10× PCR buffer 5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 5 μL, 2.5 mmol/L dNTP 2 μL, 10 μmol/L 35S 引物 2 μL, 10 μmol/L NOS 引物 2 μL, 1 U/μL Taq 酶 1 μL, 10~50 ng/μL DNA 模板 2 μL, 双蒸水 31 μL.

2) 扩增反应条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 维持 30 s, 54 °C 维持 30 s, 72 °C 维持 45 s, 共运行 40 个循环. 72 °C 延伸 3 min; 于 4 °C 下保存.

3) 扩增反应结果: Agrose 凝胶电泳检测及 UVP 凝胶成像系统分析结果.

1.2.3 荧光 PCR 检测

1) 两种 FDCCP 的变温曲线: 50 μL 反应液中含 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 μmol/L FDCCP, 从 40 °C 开始, 每隔 8 s 温度升高 1 °C, 反应至 80 °C, 每升高 1 °C 于 520 nm 采集荧光数据.

2) 两种 FDCCP 的杂交曲线: 50 μL 反应液中含 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.6), 3.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 μmol/L FDCCP, 对应的探针靶序列终浓度为 0.2 μmol/L, 94 °C 预变性 1 min 后, 按 94 °C 变性 30 s、70 °C (每循环 1 次下降 1 °C) 杂交 60 s, 运行 33 个循环, 每次杂交后于 520 nm 采集荧光数据.

3) 扩增反应体系: 50 μL 反应液中含 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.6), 4.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTP, 2 U Taq 酶, 35S 引物和 NOS 引物各 0.4 μmol/L, 35S 探针和 NOS 探针各 0.2 μmol/L, DNA 模板 3 μL.

4) 扩增反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 维持 30 s, 50 °C 维持 60 s, 72 °C 维持 40 s, 运行 40 个循环; 72 °C 延伸 5 min. 荧光值的采集时间为退火后 30 s.

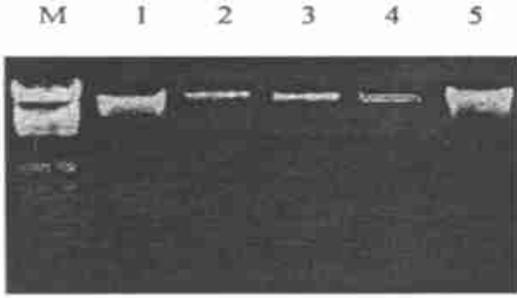
1.2.4 样品检测 按上述反应体系及条件对马铃薯、大豆、玉米等样品进行检测. 并设立非转基因样品 DNA (阴性) 和质粒 (阳性) 对照.

2 实验结果

2.1 CTAB 法提取样品 DNA 的结果

DNA 提取是进行 PCR 检测的关键环节, 应用

CTAB 法提取样品基因组 DNA, 经紫外分光光度法测定, 提取的样品 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 为 1.6 ~ 1.8, DNA 质量浓度为 10 ~ 50 $ng/\mu L$, 见图 1.



M—分子量标记; 1—马铃薯; 2—大豆; 3—甜椒; 4—番茄; 5—玉米

图 1 CTAB 法提取样品 DNA 结果

Fig. 1 Extraction of samples DNA with CTAB method

2.2 多重 PCR 检测样品 DNA 的凝胶电泳结果

检测结果见图 2. 样品扩增出与阳性对照相一致的约 200 bp 片段 (针对 35S 启动子) 和 150 bp 片段 (针对 NOS 终止子), 而阴性对照在对应位置无明显条带, 则判定为阳性结果.



M—100 bp DNA Ladder; 1—阴性对照; 2—马铃薯; 3—大豆; 4—玉米; 5—阳性对照

图 2 多重 PCR 检测样品 35S 和 NOS 结果

Fig. 2 Detection of 35S & NOS in samples multiplex PCR

2.3 荧光 PCR 检测结果

2.3.1 两种 FDCP 的变温曲线¹ 对 35S 和 NOS 探针作温度变性曲线, 目的在于了解探针的热稳定性及 T_m 值. 结果表明 (见图 3, 4), 两种探针从开始变性到完全解链均在一个相当窄的范围内完成, 在用于荧光 PCR 同时检测 35S 和 NOS 两组分的反应中, 为保持退火阶段荧光值采集时探针的双链配对, 选择 50 $^{\circ}C$ 作为 PCR 扩增的退火温度.

2.3.2 两种 FDCP 的杂交曲线¹ 分别将两种探针与对应靶序列做杂交曲线, 结果显示 (见图 5, 6) 高温下探针双链分离, 系统具有高而稳定的荧光值. 在退火阶段, 当系统中存在靶序列时, 荧光标记链与靶序列结合, 使系统也保持高而稳定的荧光值 (见曲线 A); 当系统中不含靶序列时, 则探针双链结合, 使系统荧

光值剧减 (见曲线 B).

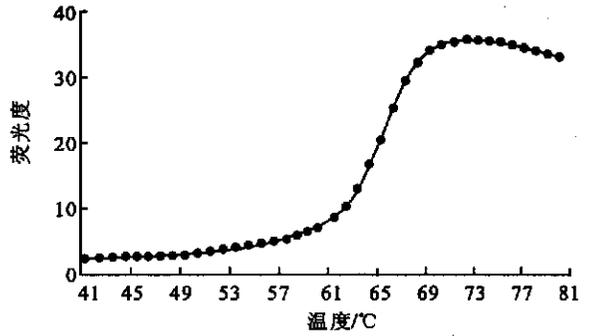


图 3 35S 探针温度变性曲线

Fig. 3 Temperature denaturalization curve of 35S probe

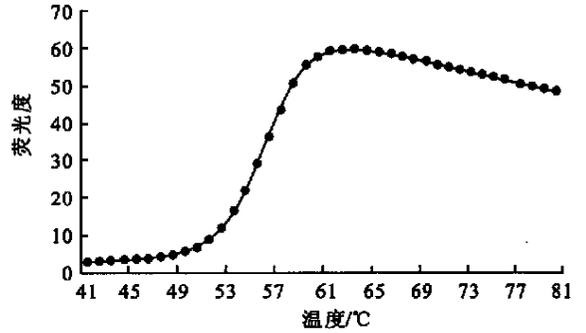


图 4 NOS 探针温度变性曲线

Fig. 4 Temperature denaturalization curve of NOS probe

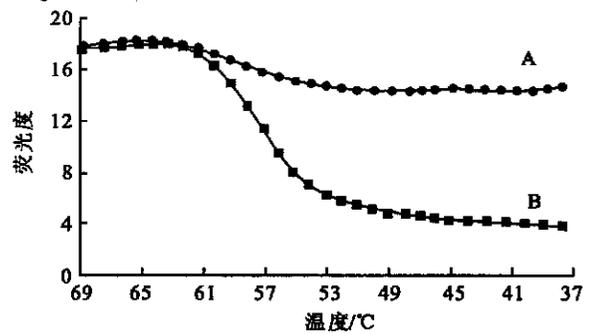


图 5 35S 探针杂交曲线

Fig. 5 Hybridization curve of 35S probe

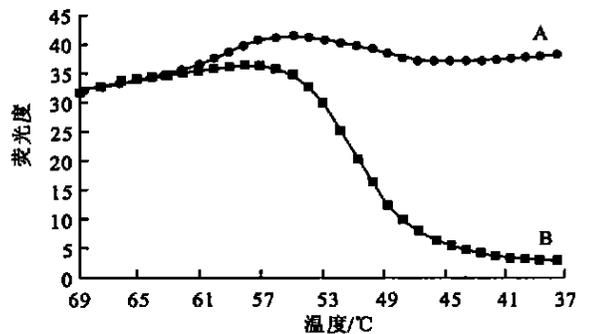
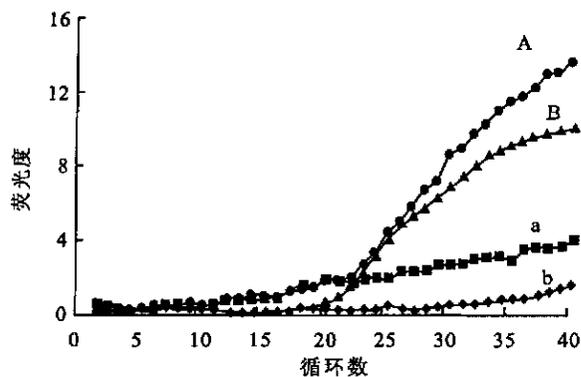


图 6 NOS 探针杂交曲线

Fig. 6 Hybridization curve of NOS probe

2.3.3 FPCR 检测方法的建立 混和两对引物和两种探针, 对质粒进行双组分同时检测. 结果表明, 在同

一管扩增反应中,能以 35S 引物、NOS 引物及其 FD-CP 的荧光 PCR 同时检测样品中的 35S 启动子和 NOS 终止子(见图 7)。



A 为检测 35S 启动子阳性结果(a 为空白对照);

B 为检测 NOS 终止子阳性结果(b 为空白对照)。

图 7 多重荧光 PCR 同时检测 35S 及 NOS 双组分

Fig. 7 Detecting 35S & NOS simultaneously with multiplex fluorescence PCR

2.4 样品的检测结果

应用作者建立的多重 PCR 及荧光 PCR 方法对马铃薯、大豆、玉米、甜椒、番茄共 13 份实物样品进行检测,多重 PCR 检测结果显示:马铃薯、大豆样品各 2 份及玉米、甜椒样品各 1 份的扩增反应呈阳性,其余 7 份样品均未扩增出特异性条带;多重荧光 PCR 检测结果进一步证实了 6 份样品中检出 35S 和 NOS,另 7 份样品均未检出。

3 讨论

在植物性转基因食品的检测研究中,相对检测表达重组蛋白的 ELISA 法而言,以外源基因为目标的 PCR 法具有灵敏度与覆盖率高、不受基因表达与否及食品加工工艺影响等优势^[2]。不同的作物、不同的改良目标则重组 DNA 不同,转基因作物的种类及性状相当繁多,但其基本序列结构相似,即含启动子、目的基因、终止子和标记基因或抗生素抗性基因^[3]。目前商品化生产的转基因作物中绝大多数含有 35S 启动子和 NOS 终止子,因而作者针对其序列特点设计了两对引物分别用于检测转基因成分 35S 和 NOS。

为保证 PCR 检测的顺利进行,提取纯化 DNA 是整个研究的关键。目前植物性转基因食品 DNA 的提

取主要有 CTAB 法和 SDS 法^[2]。作者应用改良 CTAB 法提取样品基因组 DNA,实验表明该法简便快速,提取的 DNA 纯度优、得率高、完整性好,适用于大批量样品的检验。

PCR 技术非常灵敏,容易出现假阳性、假阴性结果,因而设计了针对 35S 和 NOS 基因的两对引物,并将它们应用于同一扩增体系,通过多次摸索,获得了包括反应浓度、温度和时间等最适条件,建立了多重 PCR 方法以提高转基因检测的特异性,同时设立了阴性和阳性对照,防止了假阴性检测结果的发生。

常规 PCR 技术可快速检测转基因产品,但也存在着假阳性污染及定量的难题,荧光 PCR 技术则巧妙地利用了 PCR 技术的 DNA 高效扩增、核酸杂交的高特异性和光谱技术的精确定量功能的优点,整个过程实行闭管式实时测定,扩增与检测同时完成,既简化了操作步骤,又使扩增产物交叉污染得以杜绝,克服了常规 PCR 检测的一些不足^[9~11]。但目前通常所用的 Taqman 技术、分子信标技术尚存在着制备复杂及荧光本底高等不足^[10]。

作者将荧光双链探针应用于转基因产品的快速检测中,这种新型探针设计及制备均较为简便,并具有本底低及稳定性好的特点,在 35S 和 NOS 探针上分别标记不同波长的荧光剂,在同一反应管内同时进行双组分检测,该技术不仅提高了效率,检测结果也更可信。与此同时,根据欧盟转基因食品的阈值规定,转基因食品的百分比是每一种转基因成分和同一物种的相对含量,因而在转基因产品的定量检测中,多重 PCR 方法的应用与样品内标基因的设置(如大豆的 Lectin 基因、玉米的 Zein 基因)就显得十分重要。因此,本研究结果还为应用多重 PCR 法同时扩增样品内源基因和 35S/NOS,建立荧光 PCR 定量检测转基因食品的方法奠定了基础。

应用建立的两种 PCR 方法检测了 13 份实物样品,结果显示其中 6 份样品检出了 35S 启动子和 NOS 终止子,其余 7 份样品均未检出。结果表明,所建立的方法具有灵敏直观、操作简便、结果准确的特点,适用于大豆、马铃薯、玉米、甜椒、番茄等多种作物及其食品的检测。结果还提示从厦门口岸进境的马铃薯、大豆、玉米中含有转基因产品,今后应加强该类产品的检验与管理。

参考文献:

[1] CLIVE JAMES. Global review of commercialized transgenic crops[J]. *ISAAA Briefs* 2001, (14): 1-8.

- [2] ANKLAM E, GADANI F, HEINZE P, *et al.* Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products[J]. **Eur Food Res Technol**. 2002, 214: 3—26.
- [3] MARKUS L, PETER B, KLAUS P, *et al.* IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder[J]. **Journal of AOAC International**. 1999, 82(4): 923—928.
- [4] STAVE J W, MAGIN K, SCHIMMEL H, *et al.* AACC collaborative study of a protein method for detection of genetically modified corn[J]. **Cereal Foods World** 2000, 45(11): 497—501.
- [5] HARDEGGER M, BRODMANN P, HERRMANN A. Quantitative detection of the 35S promoter and the NOS terminator using quantitative competitive PCR[J]. **Eur Food Res Technol**. 1999, 209: 83—87.
- [6] LIVAK K J, FLOOD SJA, MARARO J, *et al.* Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization[J]. **PCR Methods Applic** 1995, 4: 357—362.
- [7] KE LD, CHEN Z, YUNG WK. A reliability test of standard-based quantitative PCR: exogenous vs endogenous standards[J]. **Mol Cell Probes** 2000, 14(2): 127—135.
- [8] BECKER K, D PAN, C B WHITELEY. Real-time quantitative polymerase chain reaction to assess gene transfer[J]. **Hum Gene Ther** 1999, 10: 2559—2566.
- [9] WHITCOMBE D, BROWIE J, GILLARD H L, *et al.* A homogeneous fluorescence assay for PCR amplicons: its application to real-time, single-tube genotyping[J]. **Clin Chem** 1998, 44: 918—923.
- [10] CARDULLO R A, AGRAWAL S, FLORES C, *et al.* Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer[J]. **Proc Natl Acad Sci USA** 1998, 85: 8790—8794.
- [11] NAZARENKO I A, BHATHNAGAR S K, HOHMAN R J. A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer[J]. **Nucleic Acids Res** 1997, 25(2): 2515—2521.

(责任编辑:李春丽)

(上接第 378 页)

从相对湿度来看,当相对湿度在 68%左右时,产品的风味值达到最大.这主要是相对湿度在 68%以下时,随着相对湿度的提高,有利于风味产生菌的生长繁殖,有利于风味的产生和提高;但当相对湿度过高时,不利于风干,易引起腐败变质,产生不良风味,从而对产品风味产生不良影响.

从风干时间和风干温度来看,当风干时间和风干温度分别在 75 h 和 16 °C 以内时,随着温度的提高和时间的延长,产品风味和游离氨基酸含量也随之提高;但当风干时间和风干温度分别在 75 h 和 16 °C 以上时,随着温度的提高和时间的延长,产品风味和游离氨基酸含量却随之降低,这与组织蛋白酶的活性和

作用时间及腐败菌的生长繁殖有关.在风干过程中,组织蛋白酶和脂肪酶分解蛋白质和脂肪产生氨基酸、挥发性脂肪酸等风味物质,在一定范围内,温度越高,酶的活性就越高,作用效果就越好;作用时间越长,产生的风味物质和游离氨基酸也就越多.但当温度高于 16 °C 时,易引起腐败菌的生长繁殖,产生不良风味,且腐败菌能分解氨基酸产生组织胺并利用游离氨基酸合成菌体蛋白,故对游离氨基酸含量也有影响;当温度过高,风干时间过长时,产品易产生氧化味,故风干时间对产品的风味也有影响,且风干时间过长也易引起腐败菌的生长^[7,8].因此,须选择合适的风干时间和风干温度.

参考文献:

- [1] 宁正祥. 食品成分分析手册[M]. 北京:中国轻工业出版社,1998.121—122.
- [2] 施正学. 肉品发酵[J]. 食品与发酵工业,1996,167:50—53.
- [3] 张勤. 微生物在发酵肉制品中的应用[J]. 中国畜产与食品,1999,6(3):126—127.
- [4] LIESKE B. Protein hydrolysis—the key to meat flavoring systems[J]. **Food Reviews International** 1994, 3: 287—312.
- [5] BACUS. Fermenting Meat, I[J]. **Meat Processing** 1985, 24(2): 26—31.
- [6] BACUS. Fermenting Meat, II[J]. **Meat Processing** 1985, 24(3): 32—36.
- [7] 文一得. 风鸡加工技术[J]. 农村新技术, 1999, (4): 10—12.
- [8] 严伟民. 金华火腿的加工工艺技术[J]. 肉类工业, 1998, (4): 10—12.

(责任编辑:杨萌,朱明)