

荧光 PCR 同时检测转基因成分 35S 和 NOS

刘光明* 王群力 陈伟玲 栾国彦 苏文金 梁基选
(厦门检验检疫局) (厦门大学生命科学学院)

摘要 根据转基因作物中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)基因序列,设计并合成了两对不同的引物和相对应的两种荧光双链探针,建立一种应用荧光双链探针的实时 PCR 定量检测转基因成分 35S 启动子和 NOS 终止子的方法。并利用该方法对马铃薯、大豆、玉米、甜椒、番茄等实物样品进行了检测,发现 11 份样品中有 5 份检出 35S 和 NOS 基因成分,其余 6 份样品结果为阴性。结果表明本文建立的荧光 PCR 方法能有效检测出 35S 和 NOS 两种转基因成分,较常规 PCR 技术更为简便、快速、准确,有很好的应用前景和研究价值。

关键词 转基因 荧光双链探针 荧光 PCR

1 前言

聚合酶链反应(PCR)技术应用于转基因产品的检测,其敏感快速简便的特点是其它检测技术所无法比拟的。但存在的首要问题是基因高效扩增易造成 PCR 产物的交叉污染,从而可能导致假阳性结果;其次是不能进行基因定量检测^[1]。1995 年出现的以标记特异性荧光探针为特点的荧光定量 PCR 技术(Fluorescence Quantitative PCR, FQ-PCR),集 PCR 和探针杂交技术为一体,直接探测 PCR 过程中的荧光变化,获得 DNA 模板的准确定量结果^[2]。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,提高了检测的特异性,是目前最先进的 PCR 技术。

本研究采用荧光双链探针技术实现转基因产品的实时定量 PCR 检测。荧光双链探针是由两条反向互补的寡核苷酸链构成,两条链碱基分别与扩增的靶序列互补,在探针的一条链上标记荧光剂,另一条链上标记淬灭剂,因为探针呈双链结构而使荧光剂和淬灭剂靠近,二者发生荧光能量传递(fluorescence resonance energy transfer, FRET),荧光被淬灭^[3]。PCR 反应过程中,变性阶段的高温使探针两条链分开而破坏了 FRET,标记在探针上的荧光剂发出荧光;退火阶段若无靶序列存在,探针将重新形成双链结构而不发荧光,此时若有扩增的靶序列产生,探针与靶序列特异性结合并发出荧光,没有结合的多余探针仍然恢复双链状态;延伸阶段温度的升高使探针从靶序列上解离,引物继续延伸,PCR 反应顺利进行。因此,通过测定 PCR 反应过程中荧光强度的变化,就可判定是否存在靶序列以及靶序列的含量。

本研究根据转基因作物中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)基因序列,分别设计并

合成了两对不同的引物及相对应的两种荧光双链探针,建立了 35S 和 NOS 基因的实时定量 PCR 检测方法,同时利用在两种探针上标记不同波长的荧光剂,在同一反应管内同时进行 35S 和 NOS 双组分检测。这种应用荧光双链探针同时检测转基因成分 35S 启动子和 NOS 终止子的实时 PCR 方法,国内尚未见同类报道,可望为快速、准确地定量检测食品中转基因成分奠定基础。

2 材料与方 法

2.1 材料

2.1.1 样品及质粒来源: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、玉米样品中随机抽取,番茄、甜椒样品由厦门北大之路生物工程有限公司提供,以及市场上购买的马铃薯样品。质粒 pCAMBIA1301 和非转基因马铃薯由厦门大学生命科学学院夏宁邵副研究员提供。

2.1.2 主要仪器试剂: iCycler iQTM 荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司), CARY 3E 紫外分光光度计(澳大利亚 VARIAN 公司)。Taq 酶、dNTP、10XPCR 缓冲液、Mg²⁺ 贮液及 RNase A 购自上海生工生物工程有限公司。

2.1.3 引物:35S 引物 1 为 5'-GCT CCF ACA AAT GCC ATC A-3',引物 2 为 5'-GAT AGT GGGATT GTG CGT CA-3';NOS 引物 1 为 5'-GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG-3',引物 2 为 5'-TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA-3'。由上海生工生物工程有限公司合成。

2.1.4 荧光双链探针:35S 荧光双链探针(荧光标记链为 HEX-5'-GAG GAG CAT CGT GGA AAA AGA AG-3',淬灭标记链为 5'-TIT TCC ACG ATG CTC CTC-3'-DABCYL);NOS 荧光双链探针(荧光标记链为 FAM-5'-GCA TGA CGT TAT TTA TGA GAT GGG T-3',淬灭标记链为 5'-TCA TAA ATA ACG TCA TGC-3'-DABCYL)。由上海生工生物工程有限公司合成。

2.2 方法

2.2.1 改良 CTAB 法提取样品 DNA:用液氮处理后将样品磨碎成粉状,取磨碎后的细粉 100mg 至 Eppendorf 管;加入 500μl 2% CTAB 溶液(β-巯基乙醇临用时添加)和 10μl RNase A (100mg/ml),混匀后于 65℃ 孵育 30min;用等体积的氯仿/异戊醇(24:1)抽提匀浆液,颠倒使之充分混合,10000rpm 离心 5min,吸取水相;在回收的水相中加入 1.5 倍体积的 CTAB 沉淀缓冲液,颠倒混匀,室温放置 10min,6000rpm 离心 5min,弃上清;500μl 高盐的 TE 缓冲液重悬沉淀;加入 2/3 体积异丙醇

* 刘光明:男,1972 年生,工程师,厦门大学 00 级博士研究生,已发表论文 13 篇。

沉淀核酸,充分混匀,10000rpm 离心 5min,弃上清;70% 乙醇洗涤沉淀,干燥,溶于 50ul 的 TE 缓冲液。样品 DNA 浓度测定采用紫外分光光度法。

2.2.2 两种荧光双链探针的变温曲线:配制的 50μl 变温反应体系中含 10mmol/L Tris- HCl(pH8.0), 1.5mmol/L MgCl₂, 0.2μmol/L 荧光双链探针(每管只含 1 种探针),上覆 50μl 石蜡油;从 40℃ 开始,每 8 秒升高 1℃,反应至 80℃,每升高 1℃ 均采集荧光数据。

2.2.3 两种荧光双链探针的杂交曲线:配制的 50μl 杂交反应体系中含 10mmol/L Tris- HCl(pH8.6), 3.5mmol/L MgCl₂, 0.2μmol/L 荧光双链探针(每管只含 1 种探针),对应的探针靶序列终浓度为 0.2μmol/L,上覆 50μl 石蜡油;94℃ 预变性 1 min,按 94℃ 变性 30S、70℃(每循环 1 次下降 1℃) 杂交 60S 运行 33 个循环,每次杂交均采集荧光数据。

2.2.4 PCR 扩增反应

2.2.4.1 对 35S 启动子的 50μl 扩增反应体系中含 10mmol/L Tris- HCl(pH8.6), 5.5mmol/L MgCl₂, 0.2mmol/L dNTP, 2.0U Taq 酶, 0.4μmol/L 35S 引物, 0.2μmol/L 35S 荧光双链探针, 5μl 模板 DNA, 上覆 50μl 石蜡油。

2.2.4.2 对 NOS 终止子的 50μl 扩增反应体系中除含 4.5mmol/L MgCl₂, 0.4μmol/L NOS 引物, 0.2μmol/L NOS 荧光双链探针外,其余各成分同 2.2.4.1。

2.2.4.3 对 35S 和 NOS 双组分同时扩增的 50μl 扩增反应体系中除含 4.5mmol/L MgCl₂, 35S 引物和 NOS 引物各 0.4μmol/L, 35S 荧光双链探针和 NOS 荧光双链探针各 0.2μmol/L, 10μl 模板 DNA 外,其余各成分同 2.2.4.1。

2.2.4.4 以上扩增反应条件均为 94℃ 预变性 5min 后,按 94℃ 30S、50℃ 60S、72℃ 40S 运行 40 个循环,72℃ 延伸 5min。

(注:荧光值的采集时间为退火的后 30 秒。)

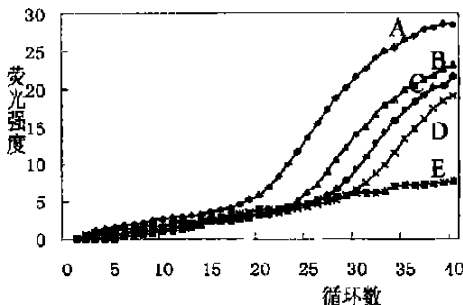


图1 35S 探针的荧光 PCR 检测结果

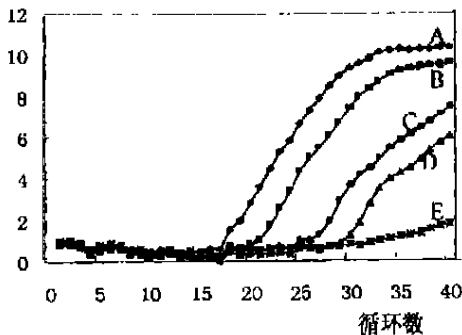


图2 NOS 探针的荧光 PCR 检测结果

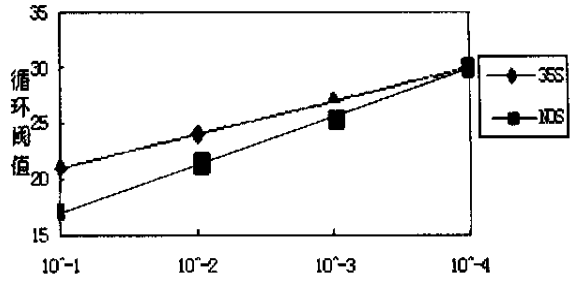


图3 35S 及 NOS 的荧光 PCR 定量标准曲线

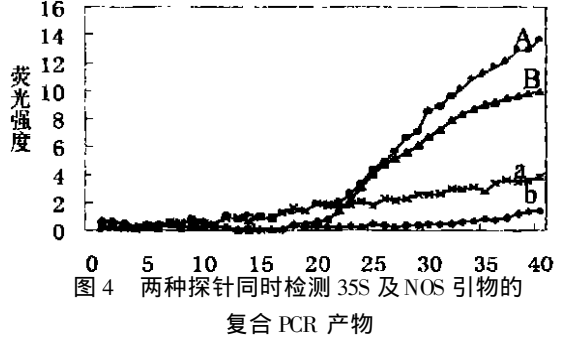


图4 两种探针同时检测 35S 及 NOS 引物的复合 PCR 产物
A 为 35S 探针检测阳性结果(a 为空白对照);
B 为 NOS 探针检测阳性结果(b 为空白对照)

2.2.5 样品检测:按方法 2.2.4 的反应体系及反应条件分别对马铃薯、大豆、玉米、甜椒、番茄等样品进行检测。检测设立 3 份对照: 无菌双蒸水(空白对照)、非转基因马铃薯 DNA(阴性对照)和质粒 pCAM BIA1301(阳性对照,稀释度为 10⁻³)。

3 结果

3.1 样品 DNA 提取结果:经紫外分光光度法测定,本文采用 CTAB 法提取的样品 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 约为 1.71, DNA 浓度约为 20ng/μl。

3.2 两种荧光双链探针的变温曲线: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。结果显示两种探针在低于 50℃ 时均为双链配对(荧光值 < 5),其中 35S 探针于 59℃ 开始解链,随温度升高荧光值逐渐上升,在 62℃-69℃ 之间荧光值(10~ 34)直线上升,之后变化又趋缓慢,72℃ 时达到最大荧光值(36)后开始下降;NOS 探针则在 50℃ 开始解链,并在 53℃~ 60℃ 之间荧光值(13~ 56)直线上升,63℃ 达到最大荧光值(60)后开始下降。结果表明,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,为保持退火阶段荧光值采集时探针的双链配对,因而选择 50℃ 作为 PCR 扩增的退火温度。

3.3 两种荧光双链探针的杂交曲线:分别将两种探针与对应靶序列做杂交曲线,结果显示在 70℃~ 58℃ 的高温下由于探针的荧光标记链和淬灭标记链分离,系统具有高而稳定的荧光值(其中 35S 探针为 19, NOS 探针为 34)。在 58℃~ 48℃ 之间双链开始退火,当系统中含有靶序列时,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(其中 35S 探针为 15, NOS 探针为 37);当系统中不含靶序列时,则荧光标记链与淬灭标记链结合,使系统荧光值(其中 35S 探针为 4, NOS 探针为 5)剧减。

3.4 荧光定量 PCR 检测方法的建立:将阳性质粒模板稀释成

10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 四个浓度梯度,分别用两种探针及其相应的引物对质粒进行扩增反应,由此得到 FQ-PCR 的动力学曲线(图1、2)。由图可见随模板的稀释,其荧光值上升呈梯度滞后,至反应后平台期产物量无明显差别。以起始模板浓度为横坐标,以刚进入指数增长期的起始点位置—循环阈值(C_t)为纵坐标,可以得到一条定量标准曲线(图3),结果显示起始模板浓度与 C_t 值之间呈良好的线性关系。然后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(图4),在同一管扩增反应中,能以 35S 引物、NOS 引物及其荧光双链探针的复合 FQ-PCR 同时检测产品中的 35S 和 NOS 基因成分。

3.5 样品的检测结果:应用本文建立的荧光 PCR 方法对马铃薯、大豆、玉米、甜椒、番茄共 11 份实物样品进行检测,发现有马铃薯样品 2 份及大豆、玉米、甜椒样品各 1 份结果检出 35S 和 NOS 基因成分,其余 6 份样品均未检出(图略)。

4 讨论

目前,转基因食品中大多来源于转基因农作物^[4],根据全球农业生物技术应用咨询署(ISAAA)提供的统计资料,2000年 全球已有大豆、玉米、棉花、油菜、马铃薯等转基因作物商业化种植,种植总面积达 4420 万公顷,转基因作物的总销售额超过 30 亿美元^[5]。转基因产品给人们带来了巨大的社会效益的同时,转基因作物及其食品的环境释放安全性及食用安全性也受到越来越广泛的关注,为了能够对转基因产品作出综合评价,既需要专门的政府机构或国际组织制定科学的评价体系以及相应的法律法规进行管理,还需要建立转基因产品的实验室检测方法^[6]。

常规 PCR 技术可快速检测转基因产品,但不可避免地存在着假阳性污染及定量的难题。荧光定量 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,克服了常规 PCR 检测的一些不足^[7-9]。目前通常所用的荧光 PCR 技术如 Taqman 技术、分子信标(Molecular beacon)技术以及应用于 Lightcycler 的双探针技术,尚存在着制备复杂及荧光本底高等不足^[9]。本文首次将荧光双链探针技术应用于转基因产品的快速检测中,这种新的探针设计及制备均较为简便,并具有荧光本底低及稳定性好的特点,它在保证灵敏度的同时,实现了对转基因成分的特异性检测。

本研究还尝试应用复合 PCR 技术同时对 35S 和 NOS 基因进行检测,该技术不仅提高了效率,而且由于是对双组分同时检测,其检测结果也更为可信。此外,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,因此,在转基因产品的定量 PCR 检测中,内标基因的设置很重要,一般选用样品的内源基因(如大豆的 Lectin 基因、玉米的 Zein 基因)。同时,在检测过程中设置内标可避免假阴性结果。本文已经建立了同时扩增两种基因成分的复合 PCR 方法,为接下来进行荧光 PCR 结果的定量工作积累了一定的经验。

在上述基础上,本研究初步建立了应用荧光双链探针的复合荧光 PCR 技术同时检测转基因成分 35S 和 NOS 的方法,并利用该方法检测了 11 份实物样品,结果从马铃薯、大豆、玉米、甜椒等 5 份样品检出了 35S 和 NOS 基因成分,其余 6 份样品均未检出。该套方法整个过程仅需 4h,操作简便,PCR 后的数据分析由连接荧光测定仪的计算机完成,检测结果较为客观、灵敏。

参考文献

- 1 Hardegger M, Brodmann P, Hermann A. Eur Food Res Technol, 1999, 209: 838-7
- 2 Livak K J, Flood SJA, Marao J, et al. PCR Methods Applic, 1995, 4: 357362
- 3 Ke LD, Chen Z, Yung WK. Mol. Cell Probes, 2000, 14(2): 127-135.
- 4 Genetically Modified Plants for Food Use. The royal society report, 1998, <http://www.royalsoc.ac.uk/html>
- 5 Clive James. Global Review of Commercialized Transgenic Crops: 2000. ISAAA Briefs. NO.12. ISAAA: Ithaca, NY.
- 6 Markus L, Peter B, Klaus P, et al. Journal of AOAC International, 1999, 82(4): 923928
- 7 Becker K., D. Pan and C. B. Whitely. Hum. Gene Ther, 1999, 10: 2559-2566.
- 8 Whitcombe D, Browie J, Gillard H L, et al.
- 9 Cardullo R A, Agrawal S, Flores C, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 85: 87908794