

多重荧光 PCR 同时检测转基因成分 35S 和 Nos 方法的建立

刘光明^{1,2}, 李庆阁¹, 王群力², 梁基选¹, 陈伟铃², 栾国彦¹, 苏文金¹

(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: 根据商品化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)的序列特点, 设计并合成了两对引物和相对应的荧光双链探针, 建立一种应用荧光双链探针的多重荧光 PCR 同时检测转基因成分 35S 启动子和 Nos 终止子的方法. 并利用该方法对马铃薯、大豆、玉米、甜椒、番茄等 11 份实物样品进行了检测, 其中有 5 份样品结果阳性. 结果表明所建立的多重荧光 PCR 方法能同时检测出 35S 和 Nos 双组分, 较常规 PCR 技术更为简便、快速、准确, 有很好的应用前景.

关键词: 转基因食品; 荧光双链探针; 荧光 PCR; 多重 PCR

中图分类号: Q 78

文献标识码: A

聚合酶链式反应(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. 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实时荧光 PCR 技术, 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, 可获得 DNA 模板的定量结果^[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避免了扩增产物交叉污染, 提高了检测的特异性, 是目前最先进的 PCR 技术.

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, 探针呈双链结构而使荧光剂和淬灭剂靠近, 二者发生荧光共振能量传递, 荧光被淬灭. PCR 反应过程中, 变性阶段的高温使探针两条链分开而发出荧光; 退火阶段若无靶序列存在, 探针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而发出荧光, 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.

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 35S)和根癌农杆菌终止子(Nos)的序列特点, 分别设计并合成了两对引物及相对应的荧光双链探针(两种探针上分别标记不同波长的荧光剂), 建立了 35S 和 Nos 双组分的多重荧光 PCR 检测方法.

1 材料与方法

1.1 材料

样品及质粒来源: 从厦门口岸入境的来自美国、加拿大、荷兰等国家的马铃薯、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 pCAMBIA1301 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.

主要仪器和试剂: iCycler iQTM 实时荧光 PCR 仪, CARY 3E 紫外分光光度计. Taq 酶, dNTP, RNase A 等购自上海普洛麦格生物产品有限公司.

引物和荧光双链探针: 35S 引物为 5.2GCT CCT ACA AAT GCC ATC A23. 及 5.2GAT AGT GGG ATT GIG CGT CA23., Nos 引物为 5.2GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG23. 及 5.2TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA23. . 35S 荧光双链探针为 HEX25.2GAG GAG CAT

收稿日期: 200206213

基金项目: 厦门市科技计划资助项目(3502Z2001109)

作者简介: 刘光明(1972-), 男, 在职博士研究生.

CGT GGA AAA AGA AG23. 及 5. 2TTT TCC ACG ATG CTC CTC23. 2DABCYL, Nos 荧光双链探针为 FAM25.2 GCA TGA CGT TAT TTA TGA GAT GGG T23. 及 5.2 TCA TAA ATA ACG TCA TGC23. 2DABCYL. 由上海生物工程技术有限公司合成.

1.2 方法

1) 样品 DNA 的提取采用改良 CTAB 法^[3], 浓度测定采用紫外分光光度法.

2) 两种荧光双链探针的变温曲线: 50 LL 变温反应液中含 10 mmol/L Tris2HCl(pH8. 0), 1. 5mmol/L MgCl₂, 0. 2 Lmol/L 荧光双链探针, 从 40 e 开始, 每隔 8 s 温度升高 1 e, 反应至 80 e 为止, 每升高 1 e 均采集荧光数据.

3) 两种荧光双链探针的杂交曲线: 50 LL 杂交反应液中含 10 mmol/L Tris2HCl(pH8. 6), 3. 5 mmol/L MgCl₂, 0. 2 Lmol/L 荧光双链探针, 对应的探针靶序列终浓度为 0. 2 Lmol/L, 94 e 预变性 1 min, 按 94 e 变性 30 s, 70 e (每循环 1 次下降 1 e)/60 s 运行 33 个循环, 每次杂交均采集荧光数据.

4) PCR 扩增反应:

(1) 35S 启动子的 50 LL 扩增反应液中含 10 mmol/L Tris2HCl (pH8. 6), 5. 5 mmol/L MgCl₂, 0. 2 mmol/L dNTP, 2. 0U Taq 酶, 0. 4 Lmol/L 35S 引物, 0. 2 Lmol/L 35S 荧光双链探针, 5 LL 模板 DNA;

(2) Nos 终止子的 50 LL 反应液中除含 4. 5 mmol/L MgCl₂, 0. 4 Lmol/L Nos 引物, 0. 2 Lmol/L Nos 荧光双链探针外, 其余各成分同 35S 启动子的扩增反应液;

(3) 35S 和 Nos 双组分同时扩增的 50 LL 反应液中除含 4. 5 mmol/L MgCl₂, 35S 引物和 Nos 引物各 0. 4 Lmol/L, 35S 荧光双链探针和 Nos 荧光双链探针各 0. 2 Lmol/L, 10 LL 模板 DNA 外, 其余各成分同 35S 启动子的扩增反应液;

(4) 以上反应条件均为 94 e 预变性 5 min, 按 94 e / 30 s, 50 e / 60 s, 72 e / 40 s 运行 40 个循环, 72 e 延伸 5 min. 荧光值的采集时间为退火后 30 s.

5) 样品检测

按 PCR 扩增方法的反应液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)、非转基因样品 DNA(阴性对照)和质粒 pCAMBIA1301(阳性对

照).

2 结果

2.1 样品 DNA 提取结果

经紫外分光光度法测定, 采用改良 CTAB 法提取的样品 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1. 6~ 1. 8, DNA 浓度为 10~ 50 ng/LL.

2.2 两种荧光双链探针的变温曲线

作温度变性曲线的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 e 时均为双链配对(荧光值 < 5), 其中 35S 探针在 59 e 开始解链, 荧光值随温度升高逐渐上升, 在 62~ 69 e 之间荧光值直线上升(10~ 34), 之后变化趋缓, 72 e 时达到最大值(36)后开始下降; Nos 探针则从 50 e 开始解链, 在 53~ 60 e 之间荧光值直线上升(13~ 56), 63 e 达到最大值(60). 结果表明, 两种探针从开始变性到完全解链均在一个较窄的温度范围内完成, 为保持退火阶段采集荧光值时探针的双链配对, 因而选择 50 e 作为多重荧光 PCR 同时检测双组分的退火温度.

2.3 两种荧光双链探针的杂交曲线

将两种探针与对应靶序列分别做杂交曲线, 结果显示在 70~ 58 e 的高温下探针的双链分离, 系统具有高而稳定的荧光值(35S 探针为 19, Nos 探针为 34). 在 58~ 48 e 之间双链开始退火, 当系统中加有靶序列时, 荧光标记链与靶序列结合, 使系统仍保持高荧光值(35S 探针为 15, Nos 探针为 37); 当系统中不含靶序列时, 则探针的双链结合, 使系统荧光值剧减(35S 探针为 4, Nos 探针为 5).

2.4 多重荧光 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 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, 由此得到荧光 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显著差别. 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(Ct)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 Ct 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, 在同一

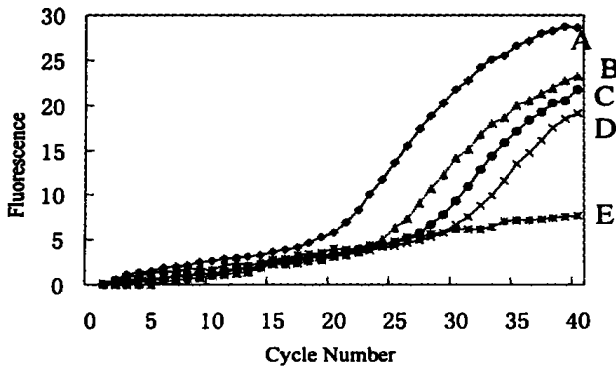


图 1 荧光 PCR 检测 35S 启动子结果
A: 10^{-1} 稀释; B: 10^{-2} 稀释; C: 10^{-3} 稀释; D: 10^{-4} 稀释; E: 空白

Fig. 1 Detection of 35S promoter in fluorescence PCR

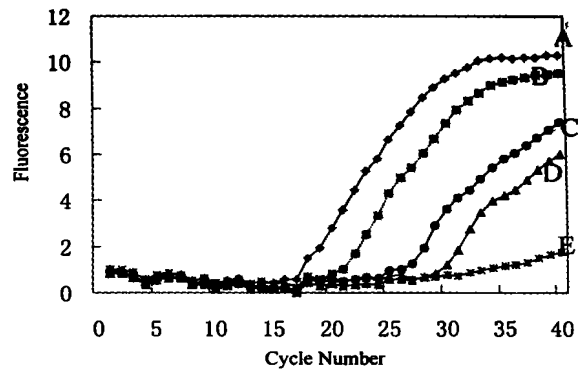


图 2 荧光 PCR 检测 Nos 终止子结果
A: 10^{-1} 稀释; B: 10^{-2} 稀释; C: 10^{-3} 稀释; D: 10^{-4} 稀释; E: 空白

Fig. 2 Detection of Nos terminator in fluorescence PCR

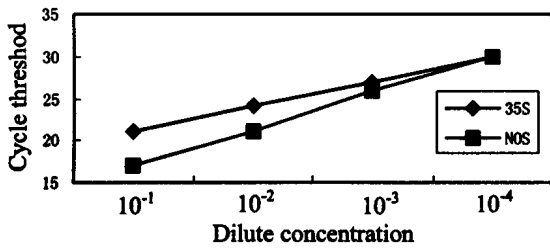


图 3 35S 及 Nos 的荧光 PCR 定量标准曲线
Fig. 3 Quantitative standard curve of 35S & Nos in fluorescence PCR

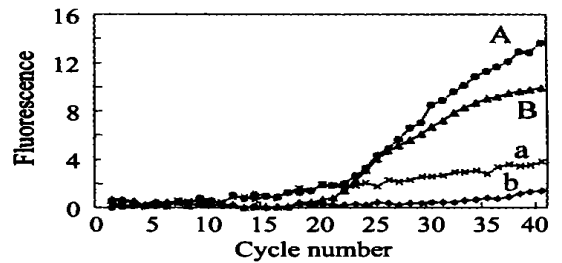


图 4 多重荧光 PCR 同时检测 35S 及 Nos 双组分
A: 检测 35S 启动子阳性结果(a 为空白对照); B: 检测 Nos 终止子阳性结果(b 为空白对照)

Fig. 4 Detecting 35S & Nos simultaneously with multiplex fluorescence PCR

管扩增反应中,能以 35S 引物、Nos 引物及其荧光双链探针的多重荧光 PCR 同时检测样品中的 35S 启动子和 Nos 终止子(图 4)。

2.5 样品检测结果

应用建立的多重荧光 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,结果显示马铃薯样品 2 份及大豆、玉米、甜椒样品各 1 份中检出 35S 和 Nos 双组分,另 6 份样品均未检出(图 5, 6)。

3 讨论

针对目前商品化转基因作物中大多数含有 35S 启动子和 Nos 终止子的特点,以及通常所用的荧光探针技术如 Taqman、分子信标(Molecular beacon)等存在着制备复杂及荧光本底高的不足^[4-6],分别设计了两对引物及其荧光双链探针,并将荧光双链探

针技术应用用于转基因成分 35S 和 Nos 的快速检测中,这种新的探针技术设计及制备均较为简便,并具有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。

为保证 PCR 检测的顺利进行,提取纯化 DNA 是整个研究的关键。目前转基因食品 DNA 的提取主要有 CTAB 法和 SDS 法。实验表明应用改良 CTAB 法提取样品基因组 DNA 具有简便、快速,所获取的 DNA 纯度优、得率高、完整性好,适用于大批量样品检验等特点。

应用多重 PCR 技术同时对 35S 和 Nos 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,在转基因食品的定量检测中一般选用样品的内源基因(如

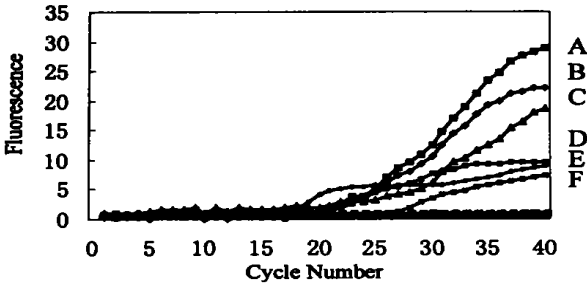


图 5 多重荧光 PCR 检测样品 35S 启动子结果

A 甜椒 G1; B 玉米 J1; C 薯条 J2; D 大豆 J1; E 阳性对照; F 薯条 J3; 其余依次为番茄 G1 和 G2、马铃薯 G1、甜椒 G2、玉米 J2、薯条 J1、阴性对照、空白对照

Fig. 5 Detection of samples with 35S promoter in multiplex fluorescence PCR

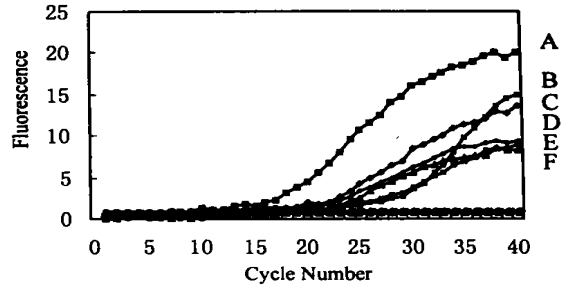


图 6 多重荧光 PCR 检测样品 Nos 终止子结果

A 阳性对照; B 薯条 J3; C 大豆 J1; D 玉米 J1; E 薯条 J2; F 甜椒 G1; 其余依次为番茄 G1 和 G2、马铃薯 G1、甜椒 G2、玉米 J2、薯条 J1、阴性对照、空白对照

Fig. 6 Detection of samples with Nos terminator in multiplex fluorescence PCR

大豆的 Lectin 基因、玉米的 Zein 基因) 作为内标^[7], 既可对结果进行定量分析又可避免假阴性结果. 为此, 将在目前的基础上进一步应用荧光双链探针技术同时扩增 rbcL 内标基因和 35S/ Nos 双组分, 建立多重荧光 PCR 定量检测转基因食品的新方法(另文发表).

应用建立的多重荧光 PCR 方法同时检测了 11 份实物样品, 结果显示其中 5 份样品检出了 35S 启动子和 Nos 终止子, 其余 6 份样品均未检出(图 5, 6). 该套方法整个过程仅需 4~ 6 h, 操作简便, 结果准确, 适用于大豆、马铃薯、玉米等多种作物及其食品的检测与验证. 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] 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.

[2] Livak K J, Flood S J A, Mararo J, et al. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR products and nucleic acid hybridization [J]. PCR Methods Applic, 1995, 4: 357- 362.

[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] Ke L D, Chen Z, Yung W K. A reliability test of standard based quantitative PCR: exogenous vs endogenous standards [J]. Mol. Cell Probes, 2000, 14(2): 127- 135.

[5] Becker K, Pan D, Whitely C B. Real time quantitative polymerase chain reaction to assess gene transfer [J]. Hum. Gene Ther, 1999, 10: 2559- 2566.

[6] 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.

[7] 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.

Multiplex Fluorescence PCR Method for Detecting Transgenic Component 35S and Nos Simultaneously

LIU Guangming^{1,2}, LI Qingge¹, WANG Qunli², LIANG Jixuan¹,
CHEN Weiling², LUAN Guoyan¹, SU Wenjin¹

(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 Multiplex Fluorescence PCR (MF2PCR) 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 were designed and synthesized for detection of 35S & Nos simultaneously with MF2PCR in a tube. 11 samples were tested with this method. The results showed that 5 samples were positive, 6 samples were negative. The described methods enabled a sensitive, specific, simple and accurate detection of genetically modified food and thus provide a useful tool for routine analysis of raw and processed food products.

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