

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 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.

1.1.2 仪器与试剂 GeneAmp9600 型 PCR 仪、iCycler iQ™ 实时荧光 PCR 仪、LG9712-042 UVP 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.

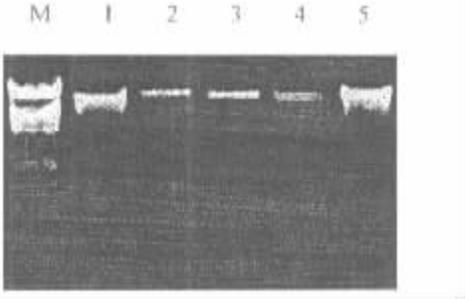
1.2.4 样品检测 按上述反应体系及条件对马铃薯、大豆、玉米等样品进行检测.并设立非转基因样品 DNA (阴性) 和质粒 (阳性) 对照.

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.



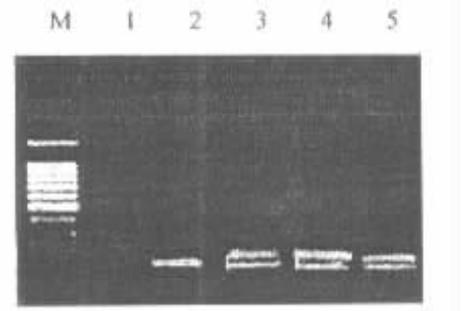
M - 分子量标记 ; 1 - 马铃薯 ; 2 - 大豆 ; 3 - 甜椒 ; 4 - 番茄 ; 5 - 玉米

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 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 A),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 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).

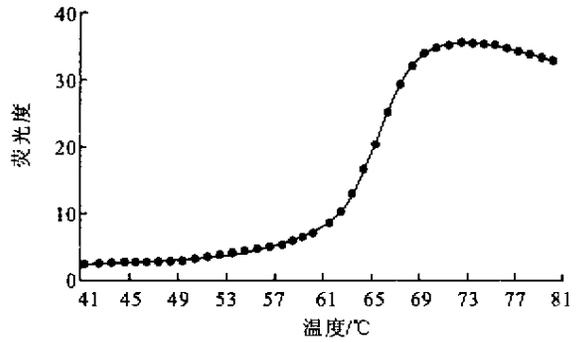


图 3 35S 探针温度变性曲线

Fig.3 Temperature denaturation curve of 35S probe

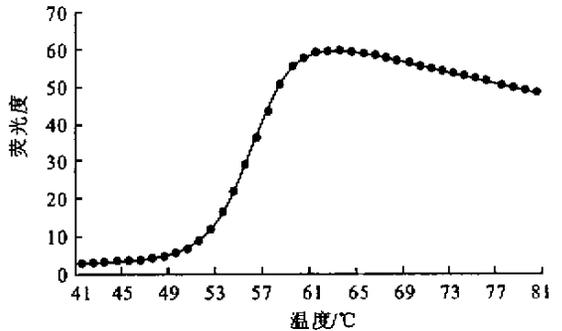


图 4 NOS 探针温度变性曲线

Fig.4 Temperature denaturation curve of NOS probe

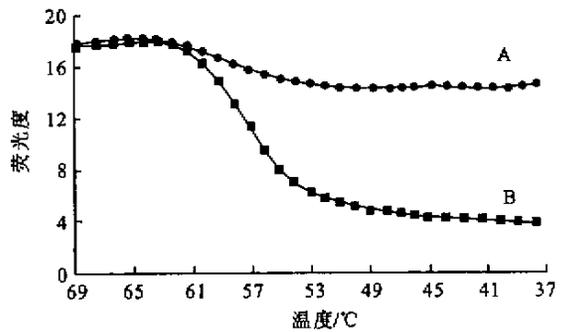


图 5 35S 探针杂交曲线

Fig.5 Hybridization curve of 35S probe

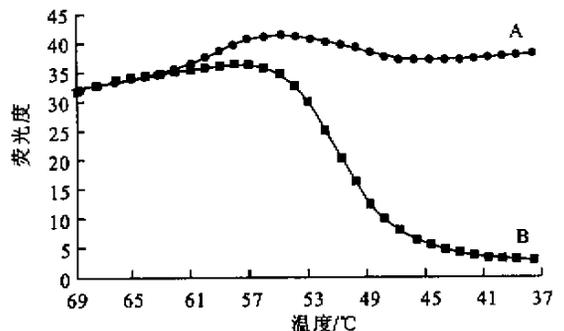
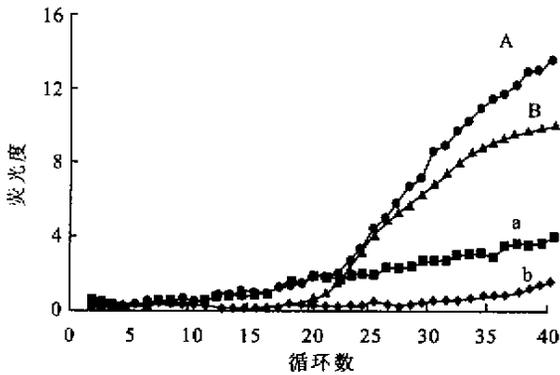


图 6 NOS 探针杂交曲线

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 J. 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 powde[J]. **Journal of AOAC International** , 1999 , 82 (4) : 923 - 928 .
- [4] STAVE J W , MAGIN K , SCHIMMEL H , *et al.* AACCC 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 standard[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 transfe[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 transfe[J]. **Proc Natl Acad Sci USA** , 1998 , 85 : 8790 - 8794 .
- [11] NAZARENKO I A , BHATNAGAR S K , HOHMAN R J . A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfe[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 ℃ 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 ℃ 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 ℃ 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 . 肉品发醃 [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 (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 .

万方数据

(责任编辑 杨萌 朱明)