

# 应用多重 PCR 技术快速筛查食品中的转基因成分

董立明, 邢珍娟, 李葱葱, 夏蔚, 闫伟, 李飞武\*

(吉林省农业科学院, 吉林 长春 130033)

**摘要:** 以转基因植物中常见的 3 种筛选调控元件、2 种标记基因和 1 种目的基因为检测靶标, 建立了能在一次 PCR 扩增中同时检测 6 种转基因成分的多重 PCR 检测方法。结果表明, 当多重 PCR 体系中 *CaMV35S* 启动子、*FaMV35S* 启动子、*NOS* 终止子、*bar* 基因、*NPTII* 基因、*CP4-EPSPS* 基因的检测引物浓度分别为 0.2、0.2、0.3、0.3、0.2、0.2  $\mu\text{mol/L}$ , 退火温度为 60  $^{\circ}\text{C}$  时扩增效果最佳, 利用优化后的六重 PCR 方法可从转基因玉米、大豆、棉花、油菜等各类样品中精准检测出相应的转基因成分, 方法的检测灵敏度可达到 0.1%。该方法为食品中常见转基因成分的筛查提供了一种高效的手段, 在转基因产品的检测工作中具有较高的应用价值。

**关键词:** 转基因生物; 调控元件; 标记基因; 目的基因; 多重 PCR; 筛查

**中图分类号:** TS 207.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2017)01-0056-06

## A Multiplex PCR Assay for the Rapid Screening of Genetically Modified Components in Food

DONG Liming, XING Zhenjuan, LI Congcong, XIA Wei, YAN Wei, LI Feiwu\*

(Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

**Abstract:** Based on the DNA sequences of *CaMV35S* promoter, *FaMV35S* promoter, *NOS* terminator, *bar* gene, *NPTII* gene and *CP4-EPSPS* gene, a multiplex PCR assay for simultaneously screening the above six exogenous elements widely introduced into genetically modified organisms was established. The result showed that the highly efficient multiplex PCR system was obtained when the final primer concentrations were 0.2, 0.2, 0.3, 0.3, 0.2 and 0.2  $\mu\text{mol/L}$  separately for them. The method could allow an accurate detection of six target elements from genetically modified maize, soybean, cotton and rapeseed, with the limit of detection of 0.1%. In conclusion, this multiplex PCR assay provides a highly effective approach to the screening of common transgenic components in foods and has high application value in the GMO detection.

**Keywords:** genetically modified organisms, regulatory element, marker gene, target gene, multiplex PCR, screening

收稿日期: 2015-03-17

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项课题(2014ZX08012-001); 吉林省农业科技创新工程项目(2013-2016)。

作者简介: 董立明(1980—), 男, 吉林九台人, 农学硕士, 助理研究员, 主要从事农业转基因生物安全研究。E-mail: dlm\_510@sina.com

\* 通信作者: 李飞武(1982—), 男, 湖北江陵人, 农学硕士, 副研究员, 主要从事农业转基因生物安全研究。E-mail: lifeiwu3394@sina.com

引用本文: 董立明, 邢珍娟, 李葱葱, 等. 应用多重 PCR 技术快速筛查食品中的转基因成分[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(01): 56-61.

随着转基因技术在农业领域的推广应用速度不断加快,转基因植物的品种日益丰富,1994~2014年间,全球65个国家和地区共批准了27种转基因作物的357个转化体的商业化应用,仅2014年全球就种植了1.81亿公顷转基因玉米、大豆、棉花、油菜等作物,越来越多的转基因产品进入人们的生活<sup>[1]</sup>。转基因技术作为一项新兴技术,在农业、医药、能源、环保、材料等多个领域发挥了非常重要的作用,但其打破物种基因隔离的优势也令公众对其产品的安全性产生了质疑<sup>[2]</sup>,为此世界许多国家和地区相继建立了转基因产品标识制度,农产品中的转基因成分已纳入国内外检验检疫部门的检验项目<sup>[3]</sup>。

日益增加的转基因产品种类给转基因产品检测技术提出了更高的要求,精准、快速、高通量成为转基因检测技术发展的趋势<sup>[4-5]</sup>。在经典的检测技术中,PCR因其高特异性和高灵敏度一直是转基因产品检测方法研究的首选,以PCR技术为核心研制更快速、更高效的检测方法是本领域近年来的研究热点,将多对引物加入一个PCR反应体系中实现在单个反应管中一次性检测多种转基因成分的多重PCR方法已有诸多报道,Guo Jin-chao等利用简并引物结合多重PCR建立了8种抗虫和耐除草剂基因的四重PCR方法<sup>[6]</sup>,李飞武等建立了能同时检测转基因作物中的8种常见Bt基因的多重PCR方法<sup>[7]</sup>,魏霜等建立了检测转基因水稻中*Cry1Ab*基因、*Gus*基因、*CaMV35S*启动子、*NOS*终止子等转基因成分的七重PCR方法<sup>[8]</sup>。

在未知产品的转基因成分检测中,一般是先选择最具代表性的少数几个转基因筛选元件进行筛

查,若确认含有某种转基因成分后,再进行进一步的身份鉴定<sup>[9]</sup>。因此,作者选择转基因植物中常见的6种转基因成分(*CaMV35S*启动子、*FMV35S*启动子、*NOS*终止子、*bar*基因、*CP4-EPSPS*基因、*NPTII*基因)为检测靶标,通过多重PCR扩增体系优化、反应程序优化、特异性检测、灵敏度测试等试验,建立了能同时检测上述6种转基因成分的六重PCR方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

转基因玉米Bt11(ERM-BF412f)、Bt176(ERM-BF411f)、MON810(ERM-BF413gk)、MON863(ERM-BF416d)、转基因大豆GTS40-3-2(ERM-BF410gk)等5种标准物质:购自欧洲标准物质与测量研究所;转基因玉米MON89034(AOCS 0906-E)、转基因大豆MON89788(AOCS 0906-B)、A2704-12(AOCS 0707-B6)、转基因棉花LLCOTTON25(AOCS 0306-E2)、MON531(AOCS 0804-C)、MON1445(AOCS 0804-B)、MON15985(AOCS 0804-D)、转基因油菜GT73(AOCS 0304-B)等8种标准物质:购自美国油脂化学家协会;非转基因玉米、大豆、棉花、油菜样品:作者所在实验室保存样品。每种样品中含有的转基因检测靶标信息详见表1。

除了表1所列的试验材料,作者还制备了一份含有全部6种检测靶标的阳性对照样品,包含转基因玉米MON863、转基因大豆MON89788和转基因棉花LLCOTTON25等3个转化体,每个转化体的质量分数为5%,以非转基因玉米、大豆、棉花、油菜的等量混合物作为填充物。

表1 试验材料及含有的靶标转基因成分信息

Table 1 Description of the genetically modified components in the test materials

| 试验材料       | 检测靶标               |                |                   |               |                     |                 |
|------------|--------------------|----------------|-------------------|---------------|---------------------|-----------------|
|            | <i>CaMV35S</i> 启动子 | <i>NOS</i> 终止子 | <i>FMV35S</i> 启动子 | <i>bar</i> 基因 | <i>CP4-EPSPS</i> 基因 | <i>NPTII</i> 基因 |
| Bt11       | +                  | +              |                   |               |                     |                 |
| Bt176      | +                  |                |                   | +             |                     |                 |
| MON810     | +                  |                |                   |               |                     |                 |
| MON863     | +                  | +              |                   |               |                     | +               |
| MON89034   | +                  | +              | +                 |               |                     |                 |
| GTS40-3-2  | +                  | +              |                   |               | +                   |                 |
| MON89788   |                    |                | +                 |               | +                   |                 |
| A2704-12   | +                  |                |                   |               |                     |                 |
| MON1445    | +                  | +              | +                 |               | +                   | +               |
| MON531     | +                  | +              |                   |               |                     | +               |
| MON15985   | +                  | +              |                   |               |                     | +               |
| LLCOTTON25 | +                  | +              |                   | +             |                     |                 |
| GT73       |                    |                | +                 |               | +                   |                 |

注:“+”表示含有相应的转基因成分。

1.2 主要试剂和仪器

植物基因组 DNA 提取试剂盒: 购自北京天根生物技术有限公司; 多重 PCR 试剂盒 (2×Multiplex PCR Assay Kit)、HS-Taq DNA 聚合酶、DNA 分子量标准: 购自宝生物工程(大连)有限公司; GeneFinder 核酸染料、琼脂糖等购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司; 检测引物委托上海生工生物公司进行合成和纯化。

紫外/可见光分光光度计 (ND1000): 美国 Thermo Fisher 公司产品; 梯度 PCR 仪 (C1000)、凝胶成像系统 (GelDOC XR<sup>+</sup>): 美国 Bio-Rad 公司产品; 高速离心机 (5424): 德国 Eppendorf 公司产品。

1.3 实验方法

**1.3.1 样品基因组 DNA 提取** 按照 DNA 提取试剂盒的说明书提取全部试验材料的基因组 DNA, 用紫外/可见光分光光度计检测 DNA 样品的质量和浓度, 用灭菌超纯水将样品 DNA 稀释至 25 ng/μL, 4℃备用。

**1.3.2 引物设计与筛选** 通过查阅国内外数据库、论文、标准等文献, 并结合多重 PCR 检测引物设计与筛选的一般原则, 使用 Primer Premier 5.0 软件设计和分析确定 6 个检测靶标的特异性 PCR 引物, 引物信息详见表 2。所有引物用灭菌超纯水稀释至 10 μmol/L 备用。

表 2 检测引物信息

Table 2 Information of the primers in this study

| 检测靶标                | 引物名称                                   | 引物序列 (5'-3')                                        | 产物大小/bp             |
|---------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------------------|---------------------|
| <i>CaMV35S</i> 启动子  | <i>pCa35S</i> -F<br><i>pCa35S</i> -R   | GCTCCTACAAATGCCATCATTGC<br>GATAGTGGGATTGTGCGTCATCCC | 195 <sup>[10]</sup> |
| <i>NOS</i> 终止子      | <i>tNOS</i> -F<br><i>tNOS</i> -R       | GAATCCTGTTGCCGCTCTTG<br>GCGGGACTCTAATCATAAAAAACC    | 125 <sup>[11]</sup> |
| <i>FMV35S</i> 启动子   | <i>pFMV35S</i> -F<br><i>pFMV35S</i> -R | ATTCTCAGTCCAAAGCCTCA<br>TTTTGTGGTCGTCACCTGCGT       | 401                 |
| <i>bar</i> 基因       | <i>bar</i> -F<br><i>bar</i> -R         | GAAGGCACGCAACGCCTACGA<br>CCAGAAACCCACGTCATGCCA      | 262 <sup>[6]</sup>  |
| <i>CP4-EPSPS</i> 基因 | <i>epsps</i> -F<br><i>epsps</i> -R     | ACGGTGAYCGTCTTCCMGTTAC<br>GAACAAGCARGGCMGCAACCA     | 333 <sup>[9]</sup>  |
| <i>NPTII</i> 基因     | <i>NPTII</i> -F<br><i>NPTII</i> -R     | CTGGGCACAACAGACAATCG<br>GCCATGACTCACGACGAGAT        | 499                 |

**1.3.3 PCR 扩增体系及程序** 单一 PCR 检测, 总反应体系为 25 μL, 包括: 2.5 μL 10×PCR buffer, 2 μL dNTPs 混合物 (10 mmol/L), 0.5 μL 正向引物 (10 μmol/L), 0.5 μL 反向引物 (10 μmol/L), 0.125 μL HS-Taq DNA 聚合酶 (5 U/μL), 2 μL DNA 样品 (25 ng/μL), 17.375 μL 灭菌超纯水。

六重 PCR 检测, 总反应体系为 50 μL, 包括: 25 μL 2×Multiplex PCR Assay Kit (含缓冲液、dNTPs、Mg<sup>2+</sup>等), 14 μL 引物预混液 (*CaMV35S* 启动子、*FMV35S* 启动子、*NPTII* 基因、*CP4-EPSPS* 基因的正反向引物各 1 μL, *NOS* 终止子、*bar* 基因的正反引物各 1.5 μL), 4 μL DNA 样品, 7 μL 灭菌超纯水。

单一和六重 PCR 扩增程序: 95℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 60℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 共进行 35 个循环; 72℃延伸 5 min。

PCR 结束后, 取 7.5 μL 的 PCR 扩增产物用 3%

的琼脂糖凝胶进行电泳检测, 利用凝胶成像系统照相观察。

2 结果与讨论

2.1 检测引物适用性测试

作者选择的 6 种检测靶标的单一 PCR 方法均已建立了相应的国家标准, 但由于扩增产物大小集中于 180~333 bp, 将这些方法的引物直接应用到多重 PCR 体系中难以区分每一种靶标转基因成分。为此, 在系统分析各个检测靶标的序列信息及现有方法基础上, 针对 *FMV35S* 启动子和 *NPTII* 基因重新设计了 PCR 检测引物, 并对新设计的这 2 对 PCR 引物的特异性进行了验证。验证样品包括阳性对照样品和转基因玉米 Bt176、MON810、MON863、MON89034、转基因大豆 GTS40-3-2、MON89788、A2704-12、转基因棉花 MON531、MON1445、

MON15985、LLCOTTON25、转基因油菜 GT73、非转基因植物混合物等 13 种植物样品。结果显示,利用设计的 *FMV35S* 启动子引物能够从阳性对照样品、MON89034 玉米、MON89788 大豆、MON1445 棉花和 GT73 油菜样品中扩增出 401 bp 的特异性片段,利用 *NPTII* 基因引物则能从阳性对照样品、

MON863 玉米、MON531 棉花、MON1445 棉花和 MON15985 棉花样品中获得 499 bp 的特异性扩增产物,均与预期结果一致(见图 1 和表 1)。由此确定了 6 个检测靶标的扩增引物,不同扩增产物之间至少相差 60 bp,从理论上确保多重 PCR 产物可通过 3%的琼脂糖凝胶电泳进行区分。

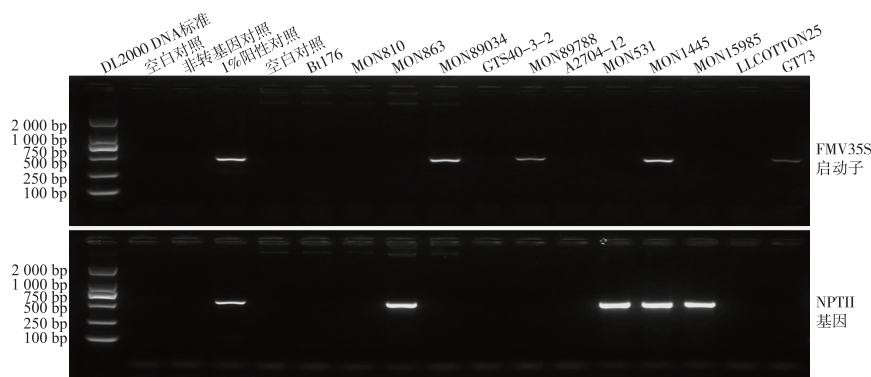


图 1 *FMV35S* 启动子和 *NPTII* 基因检测引物的特异性测试

Fig. 1 Specificity of the primers for *FMV35S* promoter and *NPTII* gene

为进一步验证筛选出的 6 对检测引物(表 2)在单一 PCR 和多重 PCR 中的适用性,以非转基因植物混合物的 DNA 样品为稀释剂,将阳性对照样品 DNA 溶液稀释至每个转化体组分质量分数均为 1%,进行单一 PCR 和多重 PCR 测试。结果如图 2 所示,以 6 对引物分别进行单一 PCR 扩增时,均能从阳性对照样品中特异性地扩增出对应的转基因成分,而将 6 对引物放在同一 PCR 管中进行六重 PCR 扩增时,可从阳性对照样品中扩增到 6 种预期的转基因成分,且在电泳图谱中能够清晰识别出每一种检测靶标的特异性条带,表明这 6 对引物适用于构建多重 PCR 检测体系。

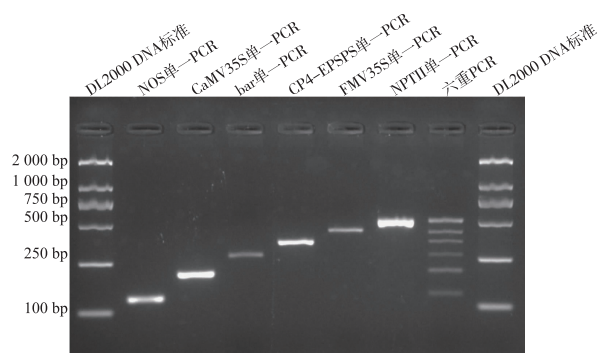


图 2 引物适用性测试

Fig. 2 Applicability of the primers for singlet and multiplex PCR assays

## 2.2 六重 PCR 的扩增体系和反应程序优化

由于每种转基因成分检测引物的扩增效率和退火温度不尽相同,为保证每对引物在多重 PCR 体系中均能正常工作,尽可能降低引物间的交互抑制,并确保建立的多重 PCR 方法满足一定的检测灵敏度,需对每种检测靶标的引物用量和退火温度进行梯度测试<sup>[12]</sup>。为此,将阳性对照样品 DNA 用非转基因植物混合物的 DNA 稀释成每个转化体组分分别为质量分数 1% 和 0.1% 的测试样品,设置 *CaMV35S* 启动子、*FMV35S* 启动子、*NOS* 终止子、*bar* 基因、*NPTII* 基因、*CP4-EPSPS* 基因的引物终浓度比为 0.2:0.2:0.2:0.2:0.2:0.2、0.2:0.2:0.25:0.25:0.2:0.2、0.2:0.2:0.3:0.3:0.2:0.2 等 3 种组合,退火温度为 58、60、62℃ 等 3 个梯度。结果显示,当引物浓度比为 0.2:0.2:0.3:0.3:0.2:0.2,退火温度为 60℃ 时,6 个基因都能得到很好的扩增,且电泳条带清晰可辨,优于其他组合(图 3),由此确定了如 1.3.3 所述的六重 PCR 的最适反应体系和程序,用于进一步的测试。

## 2.3 六重 PCR 方法的特异性测试

用非转基因植物混合物的 DNA 样品作为稀释剂,分别将 13 种转基因植物的 DNA 样品稀释至转化体质量分数均为 1%。以稀释后的 DNA 样品作为模板,用优化后的六重 PCR 扩增体系和反应程序进行扩增。结果表明,应用六重 PCR 方法能够从 13 种

测试样品中获得 1~5 条特异性扩增产物片段(见图 4), 且与表 1 所列的预期结果完全一致, 未出现假阳性或假阴性情况, 表明建立的六重 PCR 方法对转

基因玉米、大豆、棉花、油菜等不同类型的样品均具有很好的特异性, 具有广泛的适用性。

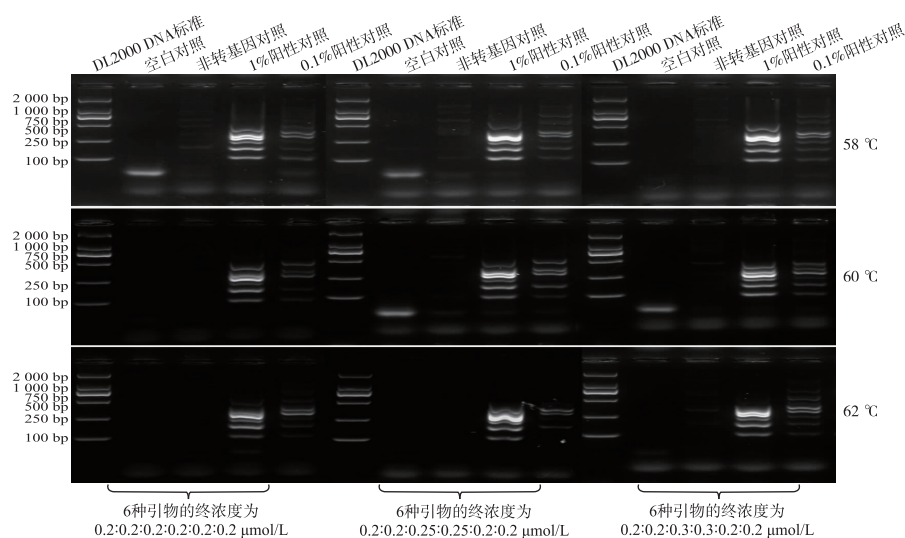


图 3 多重 PCR 扩增体系和反应程序优化

Fig. 3 Optimization of reaction system and program for the multiplex PCR assay

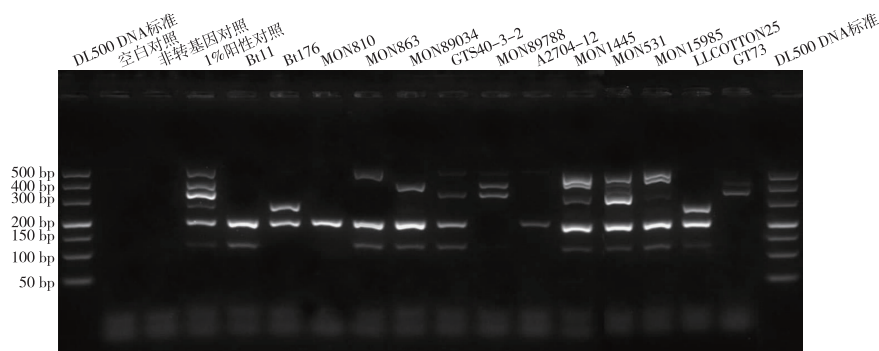


图 4 多重 PCR 方法的特异性测试

Fig. 4 Specificity of the multiplex PCR assay

#### 2.4 六重 PCR 方法的灵敏度测试

用缓冲液对阳性对照样品的 DNA 进行梯度稀释, 获得每个转化体组分的质量分数分别为 5%、1%、0.5%、0.2%、0.1%、0.05% 的 6 个梯度的 DNA 样品, 用优化后的六重 PCR 扩增体系和反应程序对上述 DNA 测试样品进行 PCR 扩增检测。测试结果如图 5 所示, 应用本研究建立的六重 PCR 方法能够从质量分数  $\geq 0.1\%$  的阳性对照样品中清晰检测到全部 6 种转基因成分, 表明本方法的检出限为 0.1%, 能够满足现阶段转基因成分筛选检测的需求。

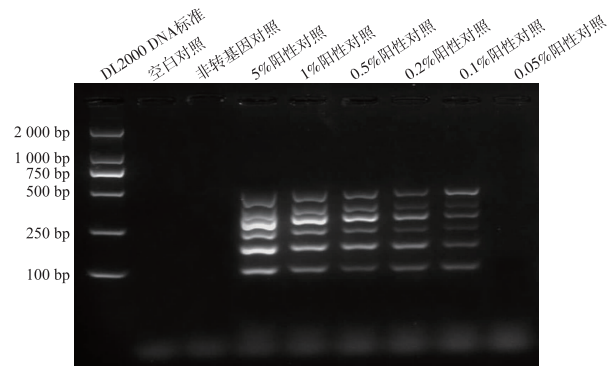


图 5 多重 PCR 方法的灵敏度测试

Fig. 5 Sensitivity of the multiplex PCR assay

### 3 结 语

应用多重PCR技术,以目前商品化应用的转基因作物中最具代表性的 *CaMV35S* 启动子、*FMV35S* 启动子、*NOS* 终止子、*bar* 基因、*CP4-EPSPS* 基因和 *NPTII* 基因等6种转基因成分为研究对象,通过特异性引物设计与筛选、反应体系和反应程序优化等

步骤,建立了能同时检测上述6种转基因成分的六重PCR方法。特异性和灵敏度测试结果表明,本研究建立的六重PCR方法能够准确检测出转基因玉米、大豆、棉花、油菜等不同类型样品中的预期转基因成分,方法检出限为0.1%,非常适用于转基因成分检测中对未知样品的初步筛选。

### 参考文献:

- [1] CLIVE JAMES. Global status of commercialized biotech/GM crops:2014[R]. Ithaca, NY:ISAAA,2014.
- [2] MATIN Qaim, SHAHZAD Kouser. Genetically modified crops and food security[J]. *PLoS One*,20138(6):e64879.
- [3] LING Xingyuan, ZHANG Guiming, PAN Guang, et al. Event-specific detection of imported GM corn [J]. *Plant Quarantine*, 2011,25(5):40-44.
- [4] SHAO Ning, JIANG Shimeng, ZHANG Miao, et al. MACRO: A combined microchip-PCR and microarray system for high-throughput monitoring of genetically modified organisms[J]. *Analytical Chemistry*, 2014,86(2):1269-1276.
- [5] CHEN Zhaobo. Molecular detection of the quality and safety of agricultural produces: advances and trends [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2009,28(4):444-450.
- [6] GUO Jinchao, CHEN Lili, LIU Xin, et al. A multiplex degenerate PCR analytical approach targeting to eight genes for screening GMOs[J]. *Food Chemistry*, 2012,132(3):1566-1573.
- [7] LI Feiwu, YAN Wei, LONG Likun, et al. Screening detection of Bt genes in genetically modified crops using a multiplex PCR assay[J]. *Modern Food Science & Technology*, 2014,30(5):262-266.
- [8] WEI Shuang, CHEN Zhen, LU Chunbin, et al. Multiplex PCR detection of transgenic components of genetically modified rice[J]. *Food Science*, 2012,33(12):159-162.
- [9] ZHANG Dabing, GUO Jinchao. The development and standardization of testing approaches for genetically modified organisms and their derived products[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2011,23(2):195-204.
- [10] GUO Longhua, YANG Huanghao, QIU Bin, et al. Capillary eletrophoresis with electrochemiluminescent detection for highly sensitive assay of genetically modified organisms[J]. *Analytical Chemistry*, 2009,81(23):9578-9584.
- [11] XU Wentao, ZHAI Zhifang, HUANG Kunlun, et al. A novel universal primer-multiplex-PCR method with sequencing gel electrophoresis analysis[J]. *PLoS One*, 2012,7(1):e22900.q

## 科 技 信 息

加拿大批准明串珠菌(*Leuconostoc carnosum*)4010作为防腐剂用于香肠

2016年12月14日,据加拿大卫生部消息,加拿大卫生部发布消息,批准明串珠菌(*Leuconostoc carnosum*)4010作为防腐剂用于部分肉禽类香肠。

加拿大卫生部曾于4月12日发布相关提案,并就此征求意见。然而截止目前,尚未有最新的科学性信息提交,因此加拿大卫生部决定更新许可防腐剂列表,批准明串珠菌(*Leuconostoc carnosum*)4010作为防腐剂,用于部分货架不稳定的真空包装肉禽类香肠。这些香肠为:真空包装博洛尼亚香肠、真空包装熏香肠、真空包装法兰克福香肠、真空包装意大利香肠、真空包装维也纳小香肠。明串珠菌4010在应用时的最大使用限量参照良好操作规范要求。

[信息来源]厦门WTO工作站. 加拿大批准明串珠菌(*Leuconostoc carnosum*)4010作为防腐剂用于香肠 [EB/OL]. (2016-12-16). <http://www.xmtbt-sps.gov.cn/detail.asp?id=53148>