

文章编号:1009-038X(2003)02-0001-04

## 转基因产品的 PCR-ELISA 液相杂交检测条件的研究

刘光明<sup>1,2</sup>, 龙敏南<sup>1</sup>, 宋思扬<sup>1</sup>, 苏文金<sup>1,3</sup>

(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;  
3. 集美大学生物工程学院,福建 厦门 361021)

**摘要:** 确定杂交液成分,选择探针浓度,将5'端标记生物素的PCR扩增产物与5'端标记地高辛的探针呈液相混合,在PCR管中按优化后的条件(92℃,5min;55℃,5min)进行液相杂交.杂交产物通过链霉亲和素被固定在微孔表面,同时在含高浓度二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)的杂交液中将非特异结合的探针解离,然后对被固定的特异杂交产物进行ELISA检测.PCR-ELISA液相杂交检测方法操作简便,特异性高,避免了繁琐的杂交程序和对人体有害的溴化乙锭,适用于转基因产品及其加工食品的快速检测.

**关键词:** 转基因产品;PCR-ELISA;液相杂交

**中图分类号:** Q 503

**文献标识码:** A

### Study on Liquid-Phase Hybridization in PCR-ELISA for the Detection of Genetically Modified Organisms

LIU Guang-ming<sup>1,2</sup>, LONG Ming-nan<sup>1</sup>, SONG Si-yang<sup>1</sup>, SU Wen-jin<sup>1,3</sup>

(1. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Xiamen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xiamen 361012, China; 3. School of Biotechnology, Jimei University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** Optimizing ingredient of hybridization solution and concentration of probes was conducted. 5'-biotinylated PCR product was automatically hybridized to a digoxigenin-labeled probe presented in the PCR reaction. The hybridization is performed as part of the PCR program. Streptavidin bound to the wall of tube were used to capture the biotin-digoxigenin-labeled fragments, meanwhile the non-specifically hybridized probes were removed in the solution of high concentration dimethyl sulfoxide (DMSO). The biotin-digoxigenin hybrids were served in ELISA detection. Liquid-phase hybridization in PCR-enzyme linked immunosorbent assay (PCR-ELISA) method enabled a fast, specific and accurate detection of GMOs and thus appeared to be a useful tool for routine analysis of raw and processed food products. Laborious blotting procedures and hazardous ethidium bromide in gel staining could be avoided.

**Key words:** GMOs; PCR-ELISA; Liquid-phase hybridization

国际农业生物技术应用署最新公布的统计数 据表明,2001年全球转基因作物种植面积达到

收稿日期:2002-08-30; 修回日期:2002-12-19.

基金项目:福建省财政厅资助项目(1401-621601);厦门市科技计划资助项目(3502Z2001109).

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

5 260万  $\text{hm}^2$ , 仅美国市场上销售的转基因食品多达 4 000多种<sup>[1]</sup>. 随着转基因农产品的不断开发和利用, 转基因产品对人类健康和生态环境的影响也引起了全世界的广泛关注. 目前世界上一些国际组织和国家如欧盟、俄罗斯、日本、韩国、澳大利亚、新西兰等主张对转基因产品加贴限量标签, 即规定转基因产品的含量超过一定阈值(如 1%, 即 100 粒中有 1 粒为转基因大豆)则需加贴强制性标识. 我国于 2001 年 5 月 23 日颁布了《农业转基因生物安全管理条例》, 强调了对转基因生物及其产品的管理与控制.

无论是对转基因产品进行标注管理, 或是对转基因与非转基因原料的分别输送, 转基因原料和食品的检测技术是必不可少的, 这是对转基因产品进行安全性评价和实施监管的基础. 目前转基因产品的检测方法分为以表达蛋白为目标和以外源 DNA 为目标两类<sup>[2]</sup>. 检测表达蛋白质的方法(如 ELISA 法)具有灵敏度较高、特异性强、可准确定量的优点, 但存在覆盖率低、难以检测深加工和外源基因不表达的产品等缺点; 检测外源 DNA 方法(如 PCR 法)以其高灵敏性、特异性较好和快速简便的优点被广泛采用, 但常规 PCR 技术存在的问题是基因高效扩增可能产生假阳性结果和难以进行定量检测. PCR-ELISA 是一种将 PCR 的高效性、高灵敏度与 ELISA 的高准确度相结合的方法, 既适合于定性筛选又可进行定量分析, 但杂交操作繁琐, 不利于推广应用<sup>[3]</sup>. 为此, 作者对 PCR-ELISA 液相杂交检测条件进行了改进, 简化了实验操作, 缩短了时间.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 试验材料 厦门口岸入境的进口大豆、玉米随机样品; 抗除草剂大豆粉标准样品、Bt1 玉米粉标准样品购自美国 SDI 公司.

1.1.2 主要仪器 9600 型 PCR 仪; 美国 PE 公司; 450 型酶标仪; 美国 Bio-Rad 公司; 2K15 型离心机; 美国 Sigma 公司等.

1.1.3 主要试剂 Taq DNA 聚合酶、RNase A、dNTPs、Wizard Genomic DNA Purification kit 和琼脂糖(Promega); 亲和素包被的微孔板、DNA 杂交分子试剂盒、DMSO(Roche).

1.1.4 引物及探针 由上海生工生物工程技术有限公司合成, 35s 引物 1 为 5' Biotin-GCT CCT ACA AAT GCC ATC A 3', 35s 引物 2 为 5' GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA 3', 35s 探针为 5'

DIG-CAA CCA CGT CTT CAA AGC AA -3'; nos 引物 1 为 5' Biotin-GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG 3', nos 引物 2 为 5' TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA 3', nos 探针为 5' DIG-TGC CGG TCT TGC GAT GAT TAT CAT A-3'.

### 1.2 方 法

1.2.1 样品总 DNA 提取 称取 0.1 g 粉末样品, 以 Wizard 试剂盒提取样品总 DNA.

1.2.2 PCR 扩增 按反应体系(10×PCR Buffer 5  $\mu\text{L}$ , 25 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  4  $\mu\text{L}$ , 10 mmol/L dNTPs 1  $\mu\text{L}$ , 25  $\mu\text{mol/L}$  引物 1 和 2, 各 1  $\mu\text{L}$ , Taq 酶 1U, DNA 模板 2  $\mu\text{L}$ , 加水至 50  $\mu\text{L}$ )和条件(94  $^{\circ}\text{C}$ , 3 min; 94  $^{\circ}\text{C}$ , 20 s, 54  $^{\circ}\text{C}$ , 40 s, 72  $^{\circ}\text{C}$ , 60 s, 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$ , 3 min)进行 PCR 扩增.

1.2.3 液相杂交 取扩增产物 10  $\mu\text{L}$ , 加入 100  $\mu\text{L}$  杂交液(含 1  $\mu\text{mol/L}$  地高辛标记探针), 按 92  $^{\circ}\text{C}$ , 5 min, 55  $^{\circ}\text{C}$ , 5 min 行杂交反应; 室温放置 15 min.

1.2.4 ELISA 检测<sup>[4]</sup> 取 50  $\mu\text{L}$  杂交产物和 50  $\mu\text{L}$  杂交液(其中 DMSO 体积分数为 50%) 在微孔板内混合, 55  $^{\circ}\text{C}$  温育 30 min; 弃溶液, 300  $\mu\text{L}$  洗涤液洗 3 次; 加入 50  $\mu\text{L}$  抗地高辛抗体-过氧化物酶酶联物(100 U/mL), 37  $^{\circ}\text{C}$  温育 30 min; 弃溶液, 300  $\mu\text{L}$  洗涤液洗 3 次; 加入 50  $\mu\text{L}$  显色液 A 和 50  $\mu\text{L}$  显色液 B, 混匀后室温避光放置 10 min; 加入终止液 1 滴, 酶标仪测定  $\text{OD}_{405}$  值.

1.2.5 样品检测 应用建立的 PCR-ELISA 液相杂交方法对实物样品进行检测, 每个样品重复 3 次, 并设立无菌双蒸水(空白)、非转基因样品(阴性)和转基因标准样品(阳性)3 份对照.

## 2 结果与分析

### 2.1 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)体积分数的确定

配制二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)杂交液(含 1  $\mu\text{mol/L}$  探针); 100, 200, 300, 400, 500 mL/L. 分别对阳性对照和阴性对照的 PCR 产物进行液相杂交检测. 结果显示, DMSO 为 300 mL/L 时, 阴性与阳性对照之间的 OD 差值为最大(见图 1).

### 2.2 探针浓度的确定

配制不同浓度的地高辛标记探针溶液: 50, 5.0, 0.5 和 0.05  $\mu\text{mol/L}$ , 分别对阳性对照和阴性对照的 PCR 产物进行液相杂交检测. 结果显示, 探针浓度为 0.5  $\mu\text{mol/L}$  时, 阴性与阳性对照之间的 OD 值差别最为明显(见图 2).

### 2.3 杂交时间的确定

杂交时间选择 1~10 min, 分别对阳性对照和阴性对照的 PCR 产物进行液相杂交检测. 结果显示, 杂交时间延长至 5 min 时, 阴、阳性对照的 OD 差值最大, 之后二者差值变化不明显(见图 3).

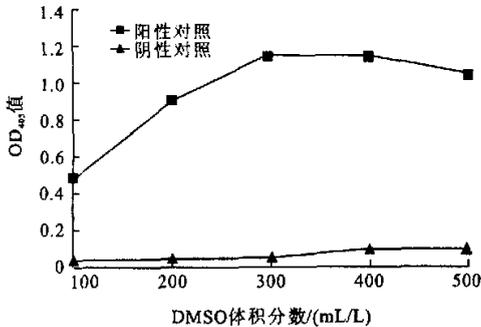


图 1 DMSO 对液相杂交的影响

Fig. 1 Effect of DMSO concentration on liquid-phase hybridization

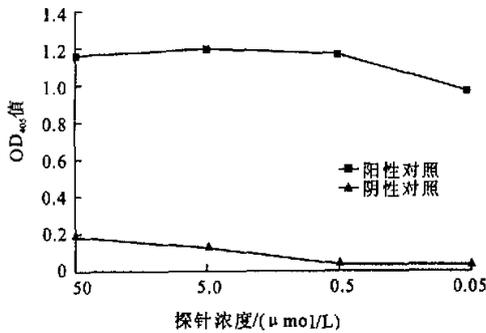


图 2 探针浓度对液相杂交的影响

Fig. 2 Effect of probe concentration on liquid-phase hybridization

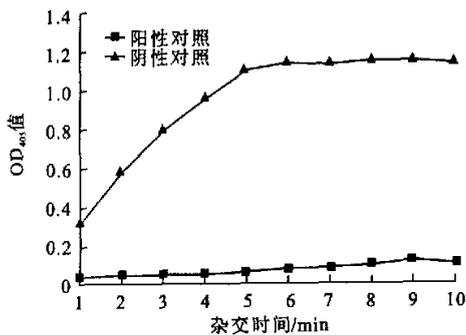


图 3 杂交时间对液相杂交的影响

Fig. 3 Influence of hybridized time on liquid-phase hybridization

### 2.4 杂交温度的确定

选择 45, 50, 55, 60, 65 °C 5 个不同温度进行液相杂交检测, 结果显示, 阴性、阳性对照的 OD 差值变化不明显, 表明核酸杂交的温度要求不严格, 在 45~65 °C 之间均能得到良好的杂交效果.

### 2.5 杂交检测的灵敏度

将阳性对照 DNA 溶液按 10 倍梯度稀释, PCR 扩增后进行液相杂交检测, 结果见图 4. 当阳性 DNA 稀释 1 000 倍时(相当于 0.1 ng/μL), 仍能得到明显的杂交信号(OD<sub>405</sub> 值大于 0.2).

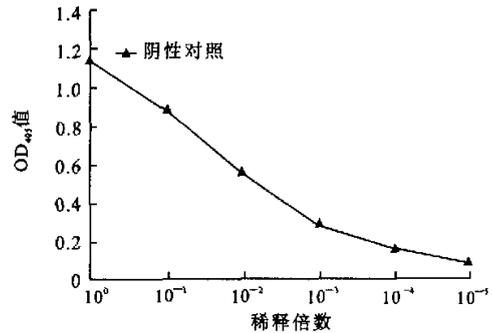


图 4 杂交检测的灵敏度

Fig. 4 Sensitivity of liquid-phase hybridization

### 2.6 实物样品的检测

将实物样品的 PCR-ELISA 结果列于表 1, 可以看出, 大豆 1, 2 号和玉米 1 号的 OD<sub>405</sub> 值大于阴性对照 OD<sub>405</sub> 值(0.042)的 2 倍, 均判定为检测结果阳性; 大豆 3 号和玉米 2 号的 OD<sub>405</sub> 值小于 0.2, 且低于或接近阴性对照 OD<sub>405</sub> 值(0.042), 均判定为检测结果阴性.

## 3 讨论

PCR-ELISA 技术集 PCR 的高效性、高灵敏度与 ELISA 高特异性、高准确度于一体, 已成为医学分子诊断的基本方法之一<sup>[5]</sup>, 但应用于转基因产品检测的报道较为少见. PCR-ELISA 的杂交方式主要有固相杂交法和液相杂交法两种. 其中固相杂交法是将地高辛标记的特异性探针包被于专用管中, 然后按常规 PCR 直接在管内进行扩增, 扩增完毕后采用化学法开链, 探针与扩增产物杂交结合. 固相杂交法具有包被管可长时间保存和减少实验批次间误差等优点, 但由于包被亲和素的管壁可与 PCR 产物发生非特异性结合, 因而存在阴性及空白对照的本底较高, 以及杂交步骤复杂、耗时长等不足<sup>[5, 6]</sup>. 液相杂交法是直接将标记生物素的 PCR 扩增产物与标记地高辛的探针呈液相充分混合, 采用加热法

开链,复性时探针与开链的 DNA 竞争结合,反应体系中的探针过量就可减少靶 DNA 的自身复性.液

相杂交过程相当于一次 PCR 扩增循环,从而使实验操作步骤简化,杂交时间缩短,均相杂交完全<sup>[5, 7]</sup>.

表 1 PCR-ELISA 法检测实物样品的结果

Tab.1 The results of practicality samples detected by PCR-ELISA method

| 样品编号 | 35s               | nos               | 判定结果 |
|------|-------------------|-------------------|------|
| 大豆-1 | 0.945/0.941/0.932 | 1.092/1.114/1.105 | 阳性   |
| 大豆-2 | 0.858/0.863/0.852 | 0.954/0.966/0.975 | 阳性   |
| 大豆-3 | 0.042/0.037/0.036 | 0.044/0.035/0.041 | 阴性   |
| 玉米-1 | 0.527/0.528/0.528 | 0.591/0.589/0.606 | 阳性   |
| 玉米-2 | 0.037/0.033/0.027 | 0.041/0.039/0.046 | 阴性   |

为了使 PCR 扩增产物和检测探针进行快速特异地杂交,本实验采用 PCR-ELISA 液相杂交方法,通过调整杂交液的成分,选择合适的探针浓度,优化了杂交时间与温度等实验参数,使 PCR 扩增与液相杂交在同一管中完成;采用 DMSO 体积分数为 50% 的杂交液,以促使非特异结合的探针解离,并保留特异结合的杂交子.结果表明,PCR-ELISA 液相杂交方法具有操作简便、杂交速度快、阴性本底

低和特异性高等特点,有望成为今后转基因产品检测研究与应用中不可缺少的方法.但目前 PCR-ELISA 定量检测转基因产品可能受到 DNA 产量与纯度、DNA 的固定、对数期内终止扩增、杂交是否完全以及批次间差异等因素的影响<sup>[3]</sup>,优化 PCR-ELISA 技术体系,使之成为稳定、易操作、规范化的转基因检测标准方法将是今后研究的主要内容.

## 参考文献:

- [1] 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.
- [2] 刘光明, 苏文金. 转基因产品的检测方法[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2001, 6(1): 87-92.
- [3] Hans-Josef Brnert, Friedrich Spener. PCR-ELISA for the CaMV-35S promoter as a screening method for genetically modified roundup ready soybeans[J]. *Eur Food Technol*, 2001, 213: 366-371.
- [4] Zerbini M, Venturoli S, Cricca M, *et al.* Distribution and viral load of type specific HPVs in different cervical lesions as detected by PCR-ELISA[J]. *J Clin Pathol*, 2001, 54: 377-381.
- [5] 李稻, 程建新, 罗伟, 等. 液相杂交技术在聚合酶链反应酶联免疫检测的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2001, (1): 34-36.
- [6] Jurg Luthy. Detection strategies for food authenticity and genetically modified foods[J]. *Food Control*, 1999, 10: 359-361.
- [7] Rolf Meyer. Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food[J]. *Food Control*, 1999, 10: 395-397.

(责任编辑:杨勇)