

实时荧光 PCR 方法检测转基因豆粕的研究*

白卫滨^{1,2,3}, 孙建霞^{1,2}, 罗云波¹, 姜桂传², 黄亚东³

1 (中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京, 100083)

2 (山东省农业管理干部学院, 山东 济南, 250100) 3 (暨南大学生物医药开发中心, 广东 广州, 510630)

摘 要 以美国、阿根廷和转基因大豆标准品为材料, 利用设计的特异性引物和探针, 建立了实时荧光定量 PCR 技术检测抗草甘膦转基因豆粕的方法, 成功检测出美国 and 阿根廷抗草甘膦转基因豆粕的内源参照基因 lectin、CaMV35S/CTP of EPSPS 边界序列和 NOS 终止子, 确定了实时荧光 PCR 方法检测抗草甘膦转基因豆粕的灵敏度为 0.1%。

关键词 转基因豆粕, 实时荧光 PCR, 检测

豆粕是大豆经压榨之后剩余的大豆制品, 是畜禽饲养的主要原料。随着养殖业的增长, 所需豆粕大量依赖进口, 而作为豆粕主要出口国的美国、阿根廷等以种植抗草甘膦转基因大豆为主^[1], 因此对抗草甘膦转基因豆粕进行精准检测尤为重要。

黄亚东等建立了一套普通 PCR 检测抗草甘膦转基因豆粕的方法, 由于普通 PCR 对产物采用琼脂糖凝胶电泳根据条带亮度进行判断, 存在灵敏度不高的缺点^[2]。实时荧光 PCR 方法是一种快速、精准的检测技术^[3], 由于其具有实时追踪、过程监控等优点被应用于转基因产品的检测^[4,5]。本研究旨在前期研究基础上通过对豆粕的分离提取, 并用内源参照大豆凝集素基因(lectin)、花椰菜花叶病毒的 35S 启动子和 5-莽草酸-3-磷酸合成酶基因的边界序列(CaMV35S/CTP of EPSPS)和胭脂碱合成酶(NOS)终止子特异性引物和探针对所豆粕提取的 DNA 进行荧光 PCR 扩增, 阳性结果进行确证, 从而建立豆粕中转基因成分的荧光 PCR 检测方法。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 样 品

转基因成分质量分数分别为 5%、2%、1%、0.5%、0.1%的转基因大豆标准品, 转基因豆粕阳性对照, 美国、阿根廷进口豆粕(广东出入境检验检疫局提供)。

1.1.2 试 剂

DNA 提取试剂盒 Wizard Genomic DNA Purification Kit 购自美国 Promega 公司, DNA 聚合酶、10 倍 PCR 反应液、dNTP 溶液、Marker 均购自 Takara 大连宝生物公司, TaqMan® Universal PCR Master Mix(4304437)购自 Applied Biosystems 公司。

1.2 仪 器

核酸蛋白分析仪(BECKMAN DU640), 实时荧光 PCR 仪(ABI PRISM 7700), 离心机(MIKRO12-24), 电热恒温水槽(DK-80), 电子天平(Sartorius BP210S), 生物安全柜(NUAIRE)。

1.3 PCR 引物

内源基因 lectin 和外源基因 CaMV35S/EPSPS 边界基因引用已报道的相应引物和探针^[6]; NOS 终止子引物和探针以 NCBI GeneBank 序列为基础, 用 Primer express 引物探针软件设计而成。所有引物探针均由大连宝生物公司合成, 引物探针序列及扩增长度见表 1。

表 1 引物、探针序列及扩增产物长度

检测基因	引物探针名称	引物探针序列	扩增产物长度
lectin 基因	Lectin-F	5-CCTCCTCGGCAAAGTTACAA-3'	162 bp
	Lectin-R	5-GGGCATAGAAGGTGAAGTTA-3'	
	Lectin-P	5-FAM-CCCTCGTCTCTTGGTCGCGCCCTCT-TAMRA-3'	
CaMV35S/EPSPS 边界基因	35S/EPSPS-F	5-TGATGTGATATCTCCACTGACG-3'	172 bp
	35S/EPSPS-R	5-TGTATCCCTTGAGCCATGTTGT-3'	
	35S/EPSPS-P	5-FAM-AACTGAGCGCATGATCGCCA-TAMRA-3'	
NOS 终止子	NOS-F	5-AATTCGTCCTGCTGGTTTGC-3'	151 bp
	NOS-R	5-TTCGGACGTGGGTTTTCG-3'	
	NOS-P	5-FAM-TGAAATGAAGTCTGACTGCCCCC-TAMRA-3'	

第一作者: 博士研究生, 讲师(黄亚东副教授为通讯作者)。

* 山东省教育厅资助项目(021155)

收稿日期: 2008-03-08, 改回日期: 2008-06-13

1.4 PCR 反应体系及条件

1.4.1 PCR 反应体系

无菌水 12.3 μL 、TaqMan® Universal PCR Master Mix 15 μL 、上下游引物(20 pmol/ μL)均 0.3 μL 、探针(10 pmol/ μL)0.3 μL ，DNA 模板(100 ng/ μL)1.8 μL ，总体积 30 μL 。样品做平行试验。

1.4.2 PCR 反应条件

根据仪器及试剂的特性对 PCR 反应^[7]参数进行优化,内源基因 Lectin,外源基因 CaMV35S/EPSPS 和 NOS 终止子采用相同的荧光 PCR 扩增条件: 50℃/2min;95℃/10 min;95℃/15s,60℃/30s,共 40 个循环。

1.5 荧光 PCR 检测转基因豆粕

采用 ABI PRISM 7700 荧光 PCR 仪扩增转基因豆粕的内源基因 lectin,外源基因 CaMV35S/EPSPS 和 NOS 终止子,进行荧光 PCR 检测和筛选,每个样品设置 2 个平行试验,提取空白对照(以 Master Mix 代替样品),PCR 反应试剂空白对照(双蒸水)、阴性对照、阳性对照。反应结束后,打开分析软件(SDS1.9),仪器自动以第 3~15 个循环的荧光信号的标准偏差的 10 倍作为荧光阈值,并给出每个样品反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数(Ct 值),记录循环阈值 Ct。同时将 Fluka 公司的转基因大豆 Roundup Ready 标准品按上述方法扩增内源基因和外源基因,根据 Ct 值确定实时荧光 PCR 的检测灵敏度和稳定性。

1.6 荧光定量 PCR 产物 DNA 测序确证试验

PCR 扩增产物送大连宝生物公司测序。

2 结果与分析

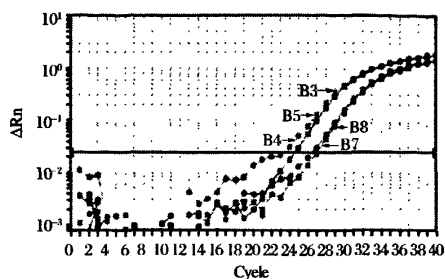
2.1 DNA 的提取

按照 Promega 试剂盒操作提取豆粕基因组 DNA 后,适度稀释(一般为 20 倍)至经核酸蛋白分析仪检测 OD_{260} 在 0.4~0.8, OD_{260}/OD_{280} 在 1.6~2.0^[8],根据核酸蛋白检测仪所测值调整浓度至 100 ng/ μL 。

2.2 荧光 PCR 检测转基因豆粕样品结果

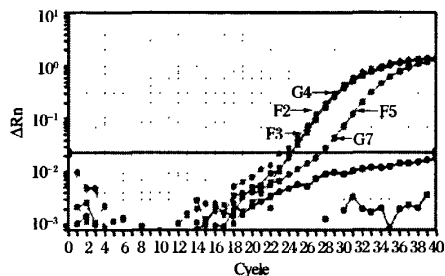
对美国、阿根廷转基因豆粕各设置了 2 个平行试验,并设立提取空白对照(Master Mix)、反应试剂空白对照(双蒸水)、阴性对照和阳性对照。内源基因 lectin、外源基因 35S/EPSPS 和 NOS 终止子,经荧光 PCR 检测分析扩增曲线如图 1~图 3 所示。

结果表明,美国、阿根廷转基因豆粕内源基因 lectin 和外源基因 CaMV35S/EPSPS 和 NOS 的空白对照检测 Ct 值均等于 40,样品内源基因 lectin 和外



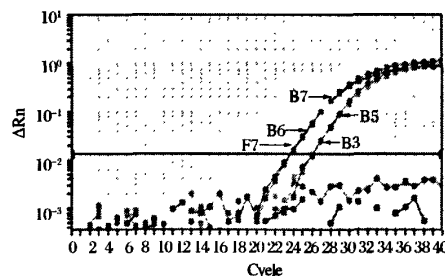
B4, B5—美国转基因豆粕; B7, B8—阿根廷转基因豆粕; B3—阳性对照(阳性大豆)

图 1 转基因豆粕内源基因 lectin 的扩增曲线



F2, F4—美国转基因豆粕; F5, F7—阿根廷转基因豆粕; F3—阳性对照(阳性豆粕)

图 2 转基因豆粕 CaMV35S/EPSPS 的扩增曲线



B6, B7—美国转基因豆粕; B3, B5—阿根廷转基因豆粕; F7—阳性对照(阳性豆粕)

图 3 转基因豆粕 NOS 终止子的扩增曲线

源基 CaMV35S/EPSPS 和 NOS 的阴性对照检测 Ct 值等于 40,内源基因 lectin 的阳性对照 Ct 值为 24.62、在 20~30,外源基因 CaMV35S/EPSPS 的阳性对照 Ct 值为 23.15,小于 34,外源基因 NOS 的阳性对照 Ct 值为 23.54,小于 34。美国、阿根廷转基因豆粕内源基因 lectin 检测 Ct 值在 20~30,外源基因 35S/EPSPS 和 NOS 终止子检测 Ct 值均小于 40,因此美国、阿根廷转基因豆粕检出外源基因 35S/EPSPS 和 NOS。

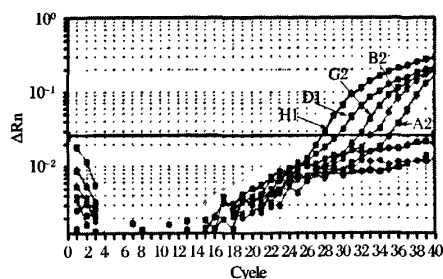
2.3 PCR 产物 DNA 测序确证结果

美国、阿根廷抗草甘膦转基因豆粕荧光 PCR 扩增

产物送大连宝生物公司测序,内源参照基因 lectin、CaMV35S/CTP of EPSPS 边界序列和 NOS 终止子均与已知序列一致,证明了此 PCR 方法检测的准确性。

2.4 荧光 PCR 检测的灵敏度结果。

Fluka 公司的转基因大豆 Roundup Ready 标准品设立提取空白对照(PCR 的 Buffer)、反应试剂空白对照(双蒸水)。外源基因 NOS 经荧光 PCR 检测分析扩增曲线如图 4 所示。



H1—5%含量;D1—2%含量;G2—1%含量;
B2—0.5%含量;A2—0.1%含量

图4 转基因大豆标准品 NOS 终止子的扩增曲线

结果表明,转基因大豆标准品内源基因 lectin 和外源基因 NOS 均呈阳性扩增,且转基因百分比含量与转基因大豆 Roundup Ready 标准品中 NOS 基因的检测 Ct 值成反比。

3 结论

(1)Promega 试剂盒成功提取出豆粕样品的基因组 DNA, OD_{260} 在 0.4~0.8, OD_{260}/OD_{280} 在 1.7~1.8,经适度稀释后,实时荧光 PCR 扩增效果良好。

(2)通过设计扩增大豆凝集素 lectin 基因,CaMV35S/CTP of EPSPS 边界基因和 NOS 终止子的特殊引物和探针、采用小反应荧光 PCR 体系

(30 μ L)、优化反应条件,使扩增效果良好,减少了试验步骤,缩短了操作时间。

(3)成功检测出美国抗草甘膦转基因豆粕、阿根廷抗草甘膦转基因豆粕的内源基因 lectin、CaMV35S/CTP of EPSPS 边界基因、NOS 终止子基因。

(4)荧光 PCR 检测转基因豆粕的灵敏度以外源基因 NOS 终止子为例扩增可以达到 0.1%,低于国际最低检测量 0.9%的要求。

(5)PCR 检测所有基因均设置 2 次平行对照,平行曲线重叠,CT 值相近,结果表明检测稳定性良好。

参考文献

- James C. Global review of commercialized transgenic crops [J]. ISAAA Briefs, 2006, (35):1~12
- 黄亚东,白卫滨,孙建霞,等. 抗草甘膦转基因豆粕 PCR 检测研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(7): 98~101
- 白卫滨,黄亚东,柳忠玉,等. 利用荧光定量 PCR 技术快速检测转基因产品的研究[J]. 食品工业科技, 2006, 27(1): 193~195
- Terzi V, Ferreri B, Finocchiaro F, et al. TaqMan PCR for detection of genetically modified durum wheat [J]. Journal of Cereal Science. 2003, 37: 157~163
- Alexander T W, Sharma R, Deng M Y, Whetsell A J, et al. Use of quantitative real-time and conventional PCR to assess the stability of the cp4 epsps transgene from Roundup Ready(r) canola in the intestinal, ruminal, and fecal contents of sheep [J]. Journal of Biotechnology, 2004, 112: 255~266
- 朱水芳,覃文,曹际娟. 转基因植物产品检测技术[M]. 广州: 广东科技出版社, 2003. 121~132
- SN/T 1204-2003, 植物及其加工产品中转基因成分实时荧光 PCR 定性检验方法
- Meyer R, Chardonens F, Hubner P, et al. Polymerase chain reaction in the quality and safety assurance of food: Detection of soya in processed meat products [J]. Z Lebensm Unters Forsch, 1996, 203: 339~344

Study on the Detection of Genetically Modified Soybean Meal by Real Time Fluorescence PCR Method

Bai Weibin^{1,2,3}, Sun Jianxia^{1,2}, Luo Yunbo¹, Jiang Guichuan², Huang Yadong³

1(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

2 (Shandong Agricultural Administrators College, Jinan 250100, China)

3 (Biopharmaceutic R&D Center of Jinan University; Guangzhou 510630, China)

ABSTRACT Using the American and Argentine Soybean Meal and standard samples of genetically modified soybean as baseline materials and utilizing specially designed primers and probes, the research established the qualitative detection method of glyphosate-resistant Genetically Modified Soybean Meal by Real Time Fluorescence PCR method. The method successfully detected the endogenesis gene Lectin, CaMV35S/CTP of EPSPS boundary sequence and NOS terminator in the glyphosate-resistant Genetically Modified Soybean Meal imported from the USA and Argentina. However, no other gene but the endogenesis gene Lectin is found in Chinese Soybean Meal. The sensitivity of the detection of glyphosate-resistant Genetically Modified Soybean Meal by Real Time Fluorescence PCR method is 0.1%.

Key words Genetically Modified Soybean Meal, Real Time Fluorescence PCR, detection