

利用实时荧光 PCR 技术快速检测玉米籽粒中转基因成分

王颖, 任志莹, 陈芳芳 (农业部农产品质量监督检验测试中心(沈阳), 辽宁沈阳 110161)

摘要 [目的]利用 TaqMan 特异性荧光标记法快速检测玉米籽粒中转基因成分。[方法]外源基因选取具有一定代表性的 *CaMV35S* 启动子、*NOS* 终止子、*BAR*、*CryIA(b)* 基因, 数据结果由实时荧光定量 PCR 反应的 Ct 值判定。[结果]用该方法检测玉米籽粒中未含有转基因成分, 可作为结果判定。[结论]该方法在样品量大时极具优势, 高效, 准确, 对环境污染较小。

关键词 转基因玉米; 实时荧光定量 PCR; 特异性; 外源基因

中图分类号 S513 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)20-112-02

Quickly Detection of Transgenic Ingredients in Corn Grain by Real-time Fluorescent PCR Technology

WANG Ying, REN Zhi-ying, CHEN Fang-fang (Agricultural Products Quality Supervision, Inspection and Test Center (Shenyang) of the Ministry of Agriculture, Shenyang, Liaoning 110161)

Abstract [Objective] To rapidly detect the transgenic ingredients in corn grain by TaqMan specificity fluorescent tags. [Method] *CaMV35S* promoters and *NOS* terminator, *BAR*, *CryIA(b)* gene with certain representativeness were selected as exogenous genes. Data results were judged by Ct value of real-time fluorescent quantitative PCR reaction. [Result] corn grain without transgenic ingredients detected by this method could be used as the judgement result. [Conclusion] This method is of most advantage under large sample amount. It is efficient and accurate, and has less pollution to the environment.

Key words Transgenic corn; Real-time fluorescent quantitative PCR; Specificity; Exogenous gene

随着转基因技术的飞速发展以及转基因生物的大面积推广, 在关注转基因生物所带来的巨大社会、经济和生态效益的同时, 转基因生物及其产品的安全性问题也引起了世界范围内的广泛关注。农业转基因生物及其产品对人类健康和生态环境是否会带来潜在不良影响, 已引起人们的普遍关注。加强农业转基因生物及产品安全性监管, 对保护和促进我国农产品贸易和我国农业生物技术产业的发展具有重要意义^[1]。因此, 转基因标识制度相继建立, 对转基因检测技术也提出了严格的要求, 转基因检测技术也成为研究热点。PCR 检测具有高灵敏度、高特异性和高效性的特点, 是目前检测转基因农作物和食品中转基因成分最为成熟和广泛应用的方法。

PCR 仪检测方法有普通 PCR 荧光定性方法和实时荧光定量方法 2 种。前者提取待测样品 DNA 后经过 PCR 扩增、制胶、电泳, 再由凝胶像仪观察电泳后胶板中 DNA 条带情况。此法可判断待测样品中是否含有转基因成分。影响结果正常表达的因素有很多: DNA 浓度、电泳电压、跑胶时间、胶板厚度、气溶胶、人为判断误差等; 后者提取待测样品 DNA 后无需经过电泳及凝胶成像步骤, 直接扩增, 由 PCR 仪荧光检测器捕获信号。常用 2 种荧光标记方法: SYBR Green 非特异性荧光标记法和 TaqMan 特异性荧光标记法^[2]。SYBR Green 非特异性荧光标记法虽然操作方便, 但反应时易产生假阳性, 影响结果判断。笔者利用 TaqMan 特异性荧光标记法快速检测玉米籽粒中是否存在转基因成分。

1 材料与方

1.1 试验材料 选取玉米籽粒阴性对照样品一份, 转基因

玉米 Bt11 阳性样品一份, 待测玉米籽粒样品一份。

1.2 试剂及仪器 植物基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技公司; Premix EX Taq, 大连宝生物工程有限公司; *iTaq* Universal Probes Supermix, BIO-RAD 公司; 引物及探针, Invitrogen 沈阳汇佰生物科技公司合成; BIO-RAD IQ5 定量 PCR 仪, 美国伯乐公司; NanoDrop2000 型 DNA 定量仪, 美国 ThermoFisher 公司; 台式离心机, 德国 Eppendorf 公司; 生物安全柜, 苏州净化设备有限公司^[3]。

1.3 试验方法

1.3.1 DNA 提取。 将待测玉米籽粒在无菌条件下研磨, 充分混匀样品, 按四分法各取样品 0.1~0.2 mg, 分装至 3 个离心管中, 采用试剂盒提取 DNA, 制备成待测样品 DNA 溶液。将玉米阴性样品、玉米阳性样品及待测样品检测浓度后待用^[4-5]。

1.3.2 扩增体系制备^[2]。 扩增体系见表 1。对玉米样品中转基因成分的检测, 参数可选择 *CaMV35S* 启动子、*NOS* 终止子、*BAR*、*CryIA(b)* 基因。结果为阳性时进一步对转基因品系进行鉴定。

表 1 实时荧光定量 PCR 扩增体系

Table 1 Amplification system of real-time fluorescent quantitative PCR

| 试剂名称 Reagent name | 终浓度 Final concentration | 体积 Reaction// μ L |
|---|----------------------------|--------------------------|
| <i>iTaq</i> TM Universal Probes Supermix | 1 \times | 25.00 |
| 引物 R Primer R (10 μ mol/L) | 150 nmol/L | 0.75 |
| 引物 F Primer F (10 μ mol/L) | 150 nmol/L | 0.75 |
| 探针 Probe (5 μ mol/L) | 50 nmol/L | 0.50 |
| DNA 模板 DNA template (40~50 ng/ μ L) | — | 4.00 |
| 补水至 Water supplement | — | 50.00 |

1.3.3 实时荧光 PCR 反应参数。 实时荧光定量 PCR 反应

基金项目 农业部科技发展中心项目。

作者简介 王颖(1974-), 女, 辽宁沈阳人, 助理研究员, 从事农产品转基因成分检测方法比较研究。

收稿日期 2016-05-26

程序:95 ℃,10 min;95 ℃,15 s;60 ℃,60 s,40 个循环^[6]。实时荧光定量 PCR 扩增所用引物和探针见表 2。

表 2 实时荧光定量 PCR 扩增所用引物和探针

Table 2 Primers and probes for real-time fluorescent quantitative PCR amplification

| 待测基因 Detected gene | 引物、探针序列 Sequences of primers and probes | 扩增片段长度 Length of amplified fragments//bp |
|--------------------------|--|--|
| <i>ZEIN</i> | 5'-TGAACCCATGCATGCAGT-3' 5'-GGCAAGACCATTGTGTA-3' 5'-FAM-TGGCGTGTCCCTGCCTGATGC-3' | — |
| <i>CaMV35S</i> | 5'-CGACAGTGGTCCCAAAGA-3' 5'-AAGACCTGGTTGGAACGTCTTC-3' 5'-FAM-TGGACCCCAACCCAGGAGGCATC-3' | 74 |
| <i>NOS</i> | 5'-ATCGTTCAAACATTTGGCA-3' 5'-ATTGCGGACTCTAATCATA-3' 5'-FAM-CATCGCAAGACCGCAACAGG-3' | 165 |
| <i>BAR</i> | 5'-ACAAGCACGGTCAACACC-3' 5'-ACTCGGCCGTCCAGTCTCTA-3' 5'-FAM-CCGAGCCGCAAGAACCCGAGGAG-3' | — |
| <i>CryIA(b)</i> | 5'-GGAAATGCGTATTCAATTCAC-3' 5'-TTCTGGACTGCCAACAATGG-3' 5'-FAM-ACATGAACACGCCCTTGACCACAGC-3' | 73 |

2 结果与分析

2.1 DNA 提取质量 DNA 溶液经 DNA 定量仪测定,提取的 DNA 完整性很好, OD_{260}/OD_{280} 均在 1.8~1.9,符合定量 PCR 检测要求。

2.2 实时荧光定量 PCR 结果 待测样品、玉米阴性对照样品和玉米阳性对照样品每个参数共 2 个平行反应,同时做空白对照,即 03~04 空白对照,05~06 阴性对照,07~08 待测样品,09~10 阳性对照。共选取内标基因及外源基因 5 组参数:B 行筛选 *CaMV35S* 基因,C 行筛选 *NOS* 基因,D 行筛选 *BAR* 基因,E 行筛选 *CryIA(b)* 基因,F 行内标基因。由每组参数 *Ct* 值可以判定,该试验结果有效;外源基因组 *Ct* 值大于或等于 40,内源基因检测 *Ct* 值小于或等于 24,判定此样本未检出该外源基因。外源基因组 *Ct* 值小于或等于 36,内源基因检测 *Ct* 值小于或等于 24,判定此样本检出该外源基因。

由表 3 可知,阴性对照样品、阳性对照样品及待测样品内标基因 *Ct* 值均小于或等于 24,为玉米样品;待测样品检测其余筛选的外源基因均未检测到。由此可知,该玉米籽粒中未含有转基因成分,可作为结果判定。

表 3 PCR 定量检测结果

Table 3 Results of PCR quantitative detection

| 反应孔位 Reaction well | 染料 Dye | 染料类型 Dye type | 平行测定编号 Replicate code | 荧光域值循环数 Threshold cycles (Ct) | <i>Ct</i> 均值 <i>Ct</i> mean | <i>Ct</i> 标准偏差 <i>Ct</i> Std. Dev | 设定点 Set point |
|--------------------------|-----------|------------------|-----------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|------------------|
| B03 | FAM | NTC | 1 | N/A | 00.00 | N/A | N/A |
| B04 | FAM | NTC | 1 | N/A | 00.00 | N/A | N/A |
| B05 | FAM | Unkn | 1 | N/A | 00.00 | N/A | N/A |
| B06 | FAM | Unkn | 1 | N/A | 00.00 | N/A | N/A |
| B07 | FAM | Neg Ctrl | 1 | N/A | 00.00 | N/A | N/A |
| B08 | FAM | Neg Ctrl | 1 | N/A | 00.00 | N/A | N/A |
| B09 | FAM | Pos Ctrl | 1 | 30.65 | 30.92 | 0.382 | N/A |
| B10 | FAM | Pos Ctrl | 1 | 31.19 | 30.92 | 0.382 | N/A |
| C03 | FAM | NTC | 2 | N/A | 00.00 | N/A | N/A |
| C04 | FAM | NTC | 2 | N/A | 00.00 | N/A | N/A |
| C05 | FAM | Unkn | 2 | N/A | 00.00 | N/A | N/A |
| C06 | FAM | Unkn | 2 | N/A | 00.00 | N/A | N/A |
| C07 | FAM | Neg Ctrl | 2 | N/A | 00.00 | N/A | N/A |
| C08 | FAM | Neg Ctrl | 2 | N/A | 00.00 | N/A | N/A |
| C09 | FAM | Pos Ctrl | 2 | 30.66 | 30.75 | 0.132 | N/A |
| C10 | FAM | Pos Ctrl | 2 | 30.85 | 30.75 | 0.132 | N/A |
| D03 | FAM | NTC | 3 | N/A | 00.00 | N/A | N/A |
| D04 | FAM | NTC | 3 | N/A | 00.00 | N/A | N/A |
| D05 | FAM | Unkn | 3 | N/A | 00.00 | N/A | N/A |
| D06 | FAM | Unkn | 3 | N/A | 00.00 | N/A | N/A |
| D07 | FAM | Neg Ctrl | 3 | N/A | 00.00 | N/A | N/A |
| D08 | FAM | Neg Ctrl | 3 | N/A | 00.00 | N/A | N/A |
| D09 | FAM | Pos Ctrl | 3 | 30.74 | 30.81 | 0.094 | N/A |
| D10 | FAM | Pos Ctrl | 3 | 30.88 | 30.81 | 0.094 | N/A |
| E03 | FAM | NTC | 4 | N/A | 00.00 | N/A | N/A |
| E04 | FAM | NTC | 4 | N/A | 00.00 | N/A | N/A |
| E05 | FAM | Unkn | 4 | N/A | 00.00 | N/A | N/A |
| E06 | FAM | Unkn | 4 | N/A | 00.00 | N/A | N/A |
| E07 | FAM | Neg Ctrl | 4 | N/A | 00.00 | N/A | N/A |
| E08 | FAM | Neg Ctrl | 4 | N/A | 00.00 | N/A | N/A |
| E09 | FAM | Pos Ctrl | 4 | 30.11 | 30.07 | 0.062 | N/A |
| E10 | FAM | Pos Ctrl | 4 | 30.02 | 30.07 | 0.062 | N/A |
| F03 | FAM | NTC | 5 | N/A | 00.00 | N/A | N/A |
| F04 | FAM | NTC | 5 | N/A | 00.00 | N/A | N/A |
| F05 | FAM | Unkn | 5 | 22.88 | 22.91 | 0.040 | N/A |
| F06 | FAM | Unkn | 5 | 22.94 | 22.91 | 0.040 | N/A |
| F07 | FAM | Neg Ctrl | 5 | 21.15 | 21.12 | 0.046 | N/A |
| F08 | FAM | Neg Ctrl | 5 | 21.09 | 21.12 | 0.046 | N/A |
| F09 | FAM | Pos Ctrl | 5 | 21.74 | 22.06 | 0.443 | N/A |
| F10 | FAM | Pos Ctrl | 5 | 22.37 | 22.06 | 0.443 | N/A |

良好。

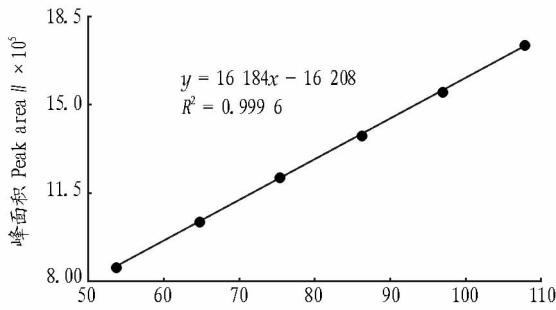


图2 异噁唑草酮线性关系

Fig.2 Linear relationship of isoxaflutole

2.2 检测波长的选择 经过全波长扫描仪扫描,由图3可知,在269 nm附近的吸收最大。

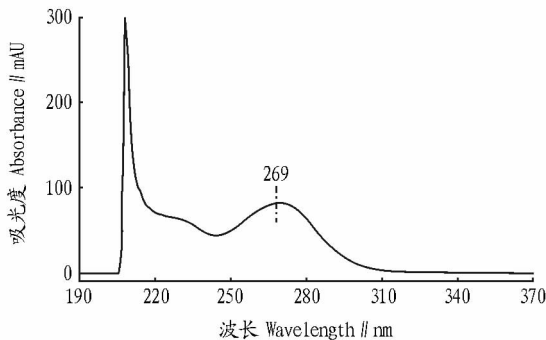


图3 异噁唑草酮紫外扫描图谱

Fig.3 UV scanning spectrum of isoxaflutole

2.3 方法的精密度 分别称取异噁唑草酮原药样品7份,进行7次平行测定,测得异噁唑草酮标准偏差为0.008,变异系数为0.09%,说明该方法精密度较高(表1)。

2.4 方法的准确度 采用标准添加法,在已知含量的样品中加入不同量的异噁唑草酮标准溶液,按照“1.2”色谱条件测定其含量,计算回收率,平均回收率为104%(表2)。

表1 分析方法的精密度试验结果

Table 1 Results of precision test of analysis method

| 编号 Code | 保留时间 Retention time//min | 峰面积 Peak area//mAU |
|---------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| 1 | 8.748 | 1 210 387 |
| 2 | 8.743 | 1 209 047 |
| 3 | 8.724 | 1 207 800 |
| 4 | 8.735 | 1 206 091 |
| 5 | 8.745 | 1 206 447 |
| 6 | 8.734 | 1 206 214 |
| 7 | 8.736 | 1 205 123 |
| 平均值 Mean | 8.738 | 1 207 301 |
| 标准偏差 Standard deviation | 0.008 | 1 868 |
| 变异系数 Variable coefficient | 0.09 | 0.15 |

表2 分析方法的准确度试验结果

Table 2 Accuracy test results of analysis method

| 编号 Code | 实际值 Actual value mg/L | 理论值 Theoretical value//mg/L | 回收率 Recovery rate//% |
|------------|-----------------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| 1 | 0.036 | 0.034 | 106 |
| 2 | 0.052 | 0.050 | 104 |
| 3 | 0.069 | 0.067 | 103 |
| 平均值 Mean | | | 104 |

3 结论

试验结果表明,采用高效液相色谱法分析异噁唑草酮原药,具有准确性和精密度较高、线性关系良好、操作简单、快速、分离效果好的优点,是定性、定量分析异噁唑草酮原药较为理想的方法。

参考文献

- [1] LEE P W, AIZAWA H, BAREFOOT A C. Handbook of residue analytical methods for agrochemicals [M]. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2003: 509-518.
- [2] LIN C H, LERCH R N, THURMAN E M, et al. Determination of isoxaflutole (balance) and its metabolites in water using solid phase extraction followed by high-performance liquid chromatography with ultraviolet or mass spectrometry [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2002, 50 (21): 5816-5824.

(上接第113页)

3 讨论

该研究利用 TaqMan 特异性荧光标记法快速检测玉米籽粒中转基因成分,可达到快速、准确检测大量样品的目的,无需配制标准曲线,可做定性分析。目前实时荧光定量 PCR 均采用外标定量,需要已知浓度的检测物作为参照样品,参照标准品的制备费时、费力、成本高。当无需被测样品转基因成分含量只需定性分析时,用普通 PCR 仪后期工作量大,在环境中易形成气溶胶,造成二次污染,影响结果正常分析。实时荧光 PCR 反应可避免对环境及人体造成危害,环保高

效,为人所用。

参考文献

- [1] 郭金超,付仲文,于晴,等. 对我国农业转基因作物研发及安全管理的思考 [J]. 安徽农业科学, 2015(25): 333-336.
- [2] 宋君,雷绍荣,刘勇,等. 转基因玉米 MON863 品系特异定量 PCR 方法的建立 [J]. 湖北农业科学, 2011, 50(24): 5250-5253.
- [3] 袁磊,红伟,李凡. 以实时荧光定量 PCR 技术检测转基因玉米 MON88017 [J]. 作物学报, 2011, 37(11): 2117-2121.
- [4] 中华人民共和国上海出入境检验检疫总局. 转基因产品检测 核酸定性 PCR 检测方法: GB/T19495.4-2004 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [5] 中华人民共和国山东出入境检验检疫总局. 转基因产品检测核酸定量 PCR 检测方法: GB/T19495.5-2004 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [6] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 转基因成分检测 玉米检测方法: SN/T 1196-2012 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.