

利用引物探针序列构建转基因马铃薯检测阳性重组质粒及其验证

杨杰, 李兰, 戴莉, 张江国*, 莫善明, 徐新龙 (阿拉山口海关技术中心, 新疆阿拉山口 833418)

摘要 [目的] 通过将特定转基因检测方法引物和探针序列重组拼接, 并将重组序列连接至质粒中, 验证其作为转基因检测阳性对照的可行性。[方法] 通过搭桥 PCR 和全基因合成的方法制备阳性重组序列, 验证阳性重组序列作为阳性对照品的可行性与阳性重组质粒的均一性、稳定性。[结果] 通过将引物探针序列顺序拼接构建得到的阳性重组质粒的性状均一, 在 4 和 -20 °C 条件下均能稳定产生阳性结果。[结论] 该种阳性重组质粒的构建方法能够满足转基因成分检测方法中阳性对照品的要求。

关键词 引物; 探针序列; 转基因检测; 搭桥 PCR; 阳性重组质粒

中图分类号 Q943.2 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)23-0213-06

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.23.062

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Construction of Transgenic Potato Detection Positive Recombinant Plasmid by Primer Probe Sequence and Its Validation

YANG Jie, LI Lan, DAI Li et al (Technical Center of Alashankou Customs, Alashankou, Xinjiang 833418)

Abstract [Objective] The primers and probe sequences of specific GMO detection method were recombined and spliced, and the recombinant sequences were linked to the plasmid. To verify its feasibility as a positive control for GMO detection. [Method] Positive recombinant sequences were prepared by overlap PCR and whole gene synthesis to verify the feasibility of using positive recombinant sequences as positive reference materials and the homogeneity and stability of positive recombinant plasmid. [Result] The positive recombinant plasmids constructed by sequential splicing of primer probe sequences were uniform in character and could produce stable positive results at 4 °C and -20 °C. [Conclusion] The construction method of the positive recombinant plasmid can meet the requirements of the positive control in the detection of GMO.

Key words Primer; Probe sequence; GMO detection; Overlap PCR; Positive recombinant plasmid

随着 PCR 技术的发展, 基因检测技术现已广泛应用于医疗卫生、食品安全等各个领域。但由于 PCR 检测过程中对检测目标的不能直观可见, 为了保证检测结果的准确可靠, 在检测环节中阴性、阳性及空白对照组的设立直接关系到检测的判定。对一个检测实验室来说, 阳性对照物的获得往往是一个检测工作能否顺利开展的关键因素。

在一个定性 PCR 检测工作中, 一般采用标准物质作为检测的阳性对照组。用作 PCR 检测的标准物质根据来源一般可分为 3 类^[1]: 第 1 类是基体标准物质, 通常是以含有目标检测物的植物组织或植物产品经粉碎加工制成的粉末, 使用时一般在检测过程中与测试样品一同处理进行核酸提取并进行 PCR 检测; 第 2 类是含有目标检测物基因组 DNA/RNA 溶液, 使用时可以作为某检测样品全部内外源检测片段的阳性对照模板; 第 3 类是含有目标检测物某个检测片段基因序列的标准质粒分子, 使用时需要根据所检测的基因片段选择所需的标准质粒分子^[2]。

根据 Taqman 探针实时荧光 PCR 检测的原理, 检测方法的特异性是由其引物探针的序列特征决定的^[3], 而引物探针区域之间的序列对扩增和检测结果并不会造成明显影响。据此, 该研究通过将特定检测方法引物探针序列重组拼接合成, 即可获得一段能用作该检测方法阳性对照的 DNA 序列; 再通过搭桥 PCR 和全基因合成技术^[4], 将具体检测标准中全部被测基因阳性重组序列顺序拼接并进行连接至克隆载体上复制克隆, 可得到一个适用于具体检测方法中全部检测

片段的阳性重组质粒, 从而形成一套不依靠阳性样品获得同时既方便易得又通用可靠的阳性质粒的制备方法。

1 材料与方法

1.1 阳性物质 试验使用转基因阳性玉米样品为 2016 年由检验检疫科学研究院测试评价中心组织的粮食转基因检测能力验证计划(计划编号: ACAS-PT215)中检出的阳性转基因玉米粉, 转基因阳性马铃薯样品为 2015 年辽宁出入境检验检疫局组织的能力验证项目(计划编号 PTC-T112)中阳性转基因品系 EH92-527-1 马铃薯淀粉。

1.2 试剂设备 植物基因组 DNA 提取试剂盒 DP305、2×Taq PCR MasterMix PCR 预混液, 天根生物技术有限公司; 高效 DNA 凝胶回收试剂盒, GeneView 公司; D-5 琼脂糖凝胶、LM SIEVE 低熔点琼脂糖凝胶及荧光标记探针, 宝生物工程(大连)有限公司; LightCycler 480 Probes Master PCR 预混液, 罗氏诊断产品(上海)有限公司; 序列合成及序列测定为北京鼎国生物技术有限公司。荧光定量 PCR 仪为罗氏 LightCycler 96。

1.3 NOS 终止子基因阳性重组序列的搭桥 PCR 连接及验证 将 SNT 1198—2013《转基因成分检测 马铃薯检测方法》^[5]中 NOS 终止子基因检测引物探针序列拼接为 84 bp 的阳性重组序列 (GTCTGCGATGATTATCATATAATTTCTGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAAACCGGATAGAAACAAAATATAGCG), 由于片段过长, 不易直接合成, 拆分为 NU 片段 (GTCTGCGATGATTATCATATAATTTCTGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCA)、ND 片段 (CGC-TATATTTTGTCTATCGCGTTTGGGGACTCTAATCATAAA AAC) 两段序列进行搭桥 PCR 连接。

将合成好的 NU 和 ND 片段稀释为 10^{-6} μmol/L, 以

基金项目 新疆维吾尔自治区国际合作项目(20166012)。

作者简介 杨杰(1986—), 男, 新疆乌鲁木齐人, 助理工程师, 从事转基因及微生物检测工作。* 通信作者, 高级农艺师, 从事实验室管理及出入境植物检疫工作。

收稿日期 2019-06-12

10 $\mu\text{mol/L}$ SN/T 1198—2013《转基因成分检测 马铃薯检测方法》中 NOS 终止子基因检测引物为上下游引物 PCR 反应体系按照 20 μL 体系: ddH₂O 6 μL 、MasterMix 10 μL 、上下游引物各 1 μL 、模板各 1 μL 进行配制, 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 35 个循环。配制 2% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 并回收 80 bp 左右电泳条带。

将回收的 PCR 产物进行稀释后作为模板对 NOS 终止子基因进行检测, 以 SN/T 1198—2013《转基因成分检测 马铃薯检测方法》中规定进行 PCR 体系配制, 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 40 个循环。

1.4 CaMV35S 启动子基因与 NOS 终止子基因二元阳性重组序列的连接及验证 设计 CaMV35S 与 NOS 连接接头引物 C-N: 5'-TGACGCACAATCCCCTACTATCGTCTTGGGATGATTATCATATAATTTCTG-3', 以梯度稀释为 10^{-6} 的 NU、ND 连接产物为模板, 以 10 $\mu\text{mol/L}$ 接头引物 C-N 作为上游引物, SN/T 1198—2013《转基因成分检测 马铃薯检测方法》中 NOS 终止子基因检测下游引物为下游引物进行 PCR 扩增, PCR 反应体系按照 20 μL 体系: ddH₂O 6 μL 、MasterMix 10 μL 、上下游引物各 1 μL 、模板 2 μL 进行配制, 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 35 个循环。配制 2% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 并回收 90 bp 左右电泳条带。

设计合成 CaMV35S 阳性重组序列 C0: 5'-GCTCCTACA AATGCCATCATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCATGACG CACAATCCCCTACTATC-3', 以 NU、ND 拼接后带接头产物和

C0 为模板, 以 10 $\mu\text{mol/L}$ SN/T 1198—2013《转基因成分检测 马铃薯检测方法》中 CaMV35S 启动子基因上游引物、NOS 终止子基因下游引物为上下游引物进行搭桥 PCR 连接。PCR 反应体系按照 20 μL 体系: ddH₂O 6 μL 、MasterMix 10 μL 、上下游引物各 1 μL 、模板各 1 μL 进行配制, 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 35 个循环。配制 2% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 并回收 140 bp 左右电泳条带。

将回收的 PCR 产物进行稀释作为模板对 CaMV35S 启动子基因和 NOS 终止子基因进行检测, 以 SN/T 1198—2013《转基因成分检测 马铃薯检测方法》中规定进行 PCR 体系配制, 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 40 个循环。

1.5 转基因马铃薯外源基因引物探针序列重组阳性质粒的构建及验证

1.5.1 基因马铃薯外源基因阳性重组序列的设计。 根据 SNT 1198—2013《转基因成分检测 马铃薯检测方法》中表 A.2 中实时荧光 PCR 定性检测转基因马铃薯成分引物和探针序列, 将 CaMV35S、FMV35s、NOS、NPTII、CP4 EPSPS、PLRVrep、PVYep、Cry3A、EH92-527-1 全部 9 个外源基因拼接为完整的阳性重组序列。为区别检测阳性结果中是否发生阳性重组序列的污染, 因此在 CaMV35S 探针序列和下游引物序列间插入一段外源序列 5'-TATGAGCCTGGAGCGCA-3' 作为标记探针 LLI, 利用以该序列设计的探针进行检测, 可以将阳性重组序列与阳性转基因产品区分开。序列信息见表 1。

表 1 转基因马铃薯外源基因检测重组阳性序列信息

Table 1 Information of recombinant positive sequence for foreign genes in transgenic potato detection

| 外源基因 Exogenous gene | 上游引物序列 Upstream primer sequence | 探针序列 Probe sequence | 标记探针序列 Labeled probe sequence | 下游引物反向互补序列 Downstream primer reverse complement |
|---------------------------|---|--------------------------------|-------------------------------------|---|
| CaMV35S | GCTCCTACAAATGCCATCA | TCTCCACTGACGTAAGGGAT-GACGCA | TATGAGCCTGGAGCGCA | TGACGCACAATCCCCTACTATC |
| FMV35S | AAGACATCCACCGAAGACT-TA | TGGTCCCCACAAGCCAGCT-GCTCGA | — | AACGTGGAAAAGAGCTGTC-CT |
| NOS | GTCTTGGGATGATTAT-CATATAATTTCTG | AGATGGGTTTTATGATT-AGAGTCCCGCAA | — | ACGCGATAGAAAA-CAAAATATAGCG |
| NPTII | AAGATGGATTGCACGCAG-GTT | CCAGTCATAGCCGAATAGC-CTCTCCACC | — | CAACAGACAATCGGCTGCTCT |
| PLRVrep | TCGTCAATAACTTGACGAC | CAACCACCGCGCTGCTTAC | — | CTGGAAGTCCGTGAAAAGAAAG |
| PVYep | GAATCAAGGCTATCACGTCC | CCACAAGCAAGGGAGCAAC-CGTG | — | GGTATGAGGCAGTCCGGATG |
| EH92-527-1 | GTGTCAAAAACAAATTTA-CAGCA | AGATTGTCGTTTCCCGCCT-TCAGTT | — | TCATGAGCGGAGAATTAAGG-GA |
| Cry3A | CCGAGTTTACTCAGGCGTC | CGATCAGACGATGAGGCCA | — | ACGTTGGCCAGTCTCTTG |
| CP4 EPSPS | CCGACGCCGATCACCTA | CCGCGTCCGATGGCCTCCGCA | — | CTCAACACGCCCGGCATC |
| 阳性重组序列 全长 | GCTCCTACAAATGCCATCATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCATATGAGCCTGGAGCGCATGACGCACAATCCCCTACTATCAAGACA TCCACCGAAGACTTATGTTCCCAAGCCAGCTGCTCGAAAACGTTGAAAAGAGCTGCTCTTGGGATGATTATCATATAATTTCT GAGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCCGCAAACCGCATAGAAAACAAAATATAGCGAAGATGGATTGCACGCAGGTTCCAGTCATAGC CGAATAGCCTCTCCACCCAACAGACAATCGGCTGCTCTTCGTCATTAATACTTACGACCAACCACCGCGCTGCTTACCTGGAAGTCCG TGAAAGAAGGAATCAAGGCTATCACGTCGCCACAAGCAAGGGAGCAACCGTGGGTATGAGGCAGTCCGGATGGTGTCAAAAACAAAT TACAGCAAGATTTGCTGTTTCCCGCCTTCACTTTTCATGAGCGGAGAATTAAGGGACCGCAGTTTACTCAGGCGTCCGATCAGACGATGAG GCCATATGACCGCTGAGCGCAACGTTGGCGCAGTCTCTTGCAGCGCCGATCACCTACCGCGTCCCGATGGCCCTCCGCACTCAACACGC CCGGCATC | | | |

注: “—”表示该段被测基因序列中不包含标记探针序列

Note: “—” indicates that the labeled gene sequence does not contain the labeled probe sequence in the segment

1.5.2 转基因马铃薯外源基因阳性重组质粒的正确性验证。将重组序列送交北京鼎国生物技术有限公司进行全基因序列合成,并连接至 pES 载体,转化至受体菌 DH5 α 中进行克隆并测序验证。

1.5.3 转基因马铃薯外源基因阳性重组质粒的均匀性验证。将验证正确的转化体进行摇培,提取阳性重组质粒。将提取得到的阳性重组质粒稀释到 10 ng,分装为 100 份的管中,随机挑选其中重组质粒 15 份,按照 SNT 1198—2013《转基因成分检测 马铃薯检测方法》规定体系和程序对外源基因进行检测,分析检测结果 Ct 值的平均值标准偏差和相对标准偏差是否符合使用要求。

1.5.4 转基因马铃薯外源基因阳性重组质粒的稳定性验证。将标准物质放置在 4、-20 $^{\circ}$ C 条件下进行保存,分别在 7、15、30、90 d 时,按照 SNT 1198—2013《转基因成分检测 马铃薯检测方法》规定体系和程序对外源基因进行检测。

1.5.5 重组质粒进行转基因样品检测效果的验证。分别提

取 50 mg 含有转基因马铃薯 EH92-527-1 品系成分的淀粉样品、转基因玉米阳性样品、非转基因马铃薯样品的基因组 DNA 各一份,按照 SNT 1198—2013《转基因成分检测 马铃薯检测方法》规定体系和程序对其内外源基因进行筛查检测。使用非转基因马铃薯基因组 DNA 作为阴性对照组模板,阳性重组质粒作为阳性对照组模板。同时对样品和对照组进行标记探针的检测,检测使用 SNT 1198—2013《转基因成分检测 马铃薯检测方法》中 CaMV35S 上下游引物和标记探针 LLI,反应程序:95 $^{\circ}$ C 10 min;95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 60 s,40 个循环。

2 结果与分析

2.1 NOS 终止子基因阳性重组序列的搭桥 PCR 连接 NU、ND 片段搭桥 PCR 产物电泳结果见图 1。回收连接产物进行 NOS 终止子基因检测结果见图 2。结果表明,搭桥 PCR 成功将 NU、ND 片段连接为完整的 NOS 基因阳性重组序列,序列能够对 NOS 终止子基因的实时荧光 PCR 检测方法产生阳性结果。

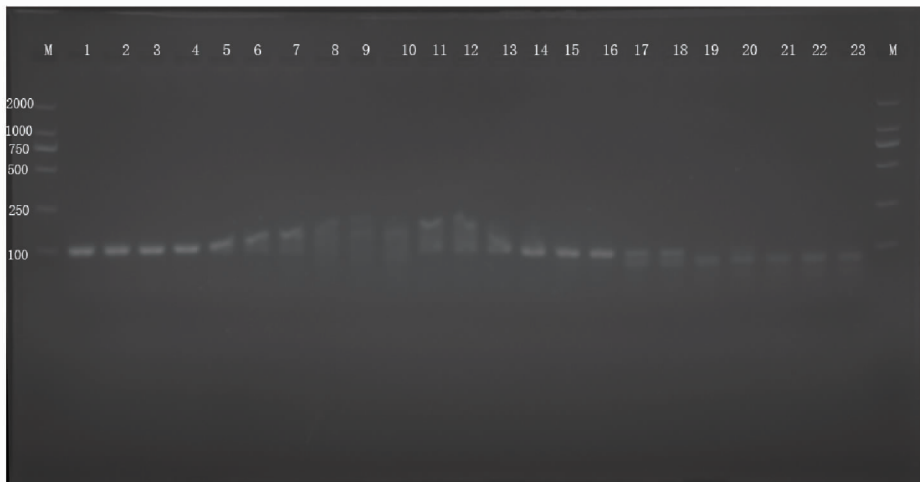


图 1 NOS 终止子基因阳性重组序列搭桥 PCR 连接产物电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of NOS terminator gene recombinant positive sequence by overlap PCR products

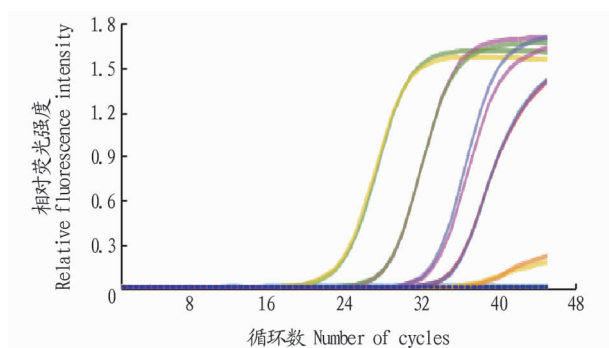


图 2 重组序列 NOS 终止子基因检测实时荧光曲线

Fig. 2 Real-time fluorescence curve for detection of NOS terminator gene by recombinant sequence

2.2 二元阳性重组序列的连接 NOS 终止子基因阳性重组序列通过 PCR 加 C-N 接头后与 C0 搭桥 PCR 连接合成 CaMV35S 启动子-NOS 终止子二元阳性重组序列,电泳结果见图 3。对连接产物进行 CaMV35S 启动子、NOS 终止子基因检测结果见图 4。结果表明,二次搭桥 PCR 成功将连接得到



图 3 CaMV35S 启动子-NOS 终止子二元重组阳性序列搭桥 PCR 连接产物电泳图

Fig. 3 Electrophoresis of CaMV35S Promoter-NOS terminator dual recombinant positive sequence by overlap PCR products

的 NOS 阳性重组序列与 CaMV35S 阳性重组序列连接产物能够有效对 CaMV35S 启动子、NOS 终止子基因的实时荧光 PCR 检测方法产生阳性结果。

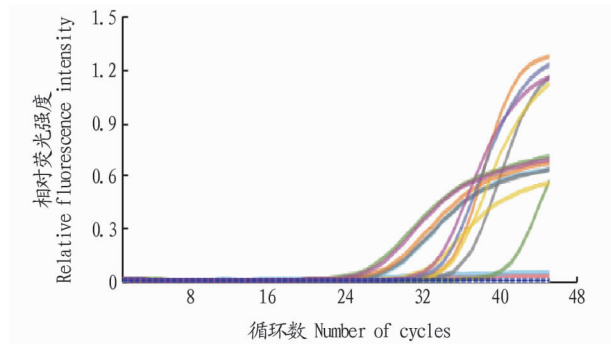


图4 二元重组阳性序列对 CaMV35S 启动子和 NOS 终止子检测的实时荧光曲线

Fig.4 Real-time fluorescence curve for detection of CaMV35S promoter and NOS terminator by dual recombinant positive sequence

2.3 转基因马铃薯外源基因引物探针序列重组阳性质粒的构建及验证 根据北京鼎国昌盛生物技术有限公司全基因合成试验服务结题报告(报告编号:KT17227),试验成功构建含有目的基因全序列 628 bp 的 pES 质粒载体,并成功转化克隆至受体菌 DH5 α 中,插入片段经 PCR 扩增和测序检验与目标序列一致。

经检测,全部 15 份阳性重组质粒均能够稳定呈现阳性检测结果且 C_q 值稳定(表 2),阳性重组质粒在 4、-20 ℃ 条件下均稳定呈现阳性结果(表 3),符合检测均匀性和稳定性的要求。通过将重组阳性质粒作为阳性对照品对转基因样品进行检验,结果发现(图 5 和表 4),EH92-527-1 阳性样品内源基因、外源 NOS 终止子、NPTII、EH92-527-1 基因呈阳性,其余外源基因呈阴性;转基因阳性玉米样品 CaMV35S 启动子、NOS 终止子、CP4-EPSPS、Cry3A 基因呈阳性,其余外源基因呈阴性;阳性重组质粒外源基因均呈阳性,内源基因呈阴性,结果正常;并且标记探针 LLI 检测仅阳性重组质粒

结果呈阳性。

表 2 15 个转基因马铃薯阳性重组质粒 9 个基因的均匀性检测结果
Table 2 Uniformity of 9 genes in 15 positive recombinant plasmids of transgenic potatoes

| 被测基因 Tested gene | 平均 C _q 值 Average C _q value | 标准偏差 Standard deviation | 相对标准偏差 Relative standard deviation//% |
|------------------------|--|-------------------------------|--|
| CaMV35S | 28.243 | 0.075 | 0.266 |
| FMV | 29.253 | 0.353 | 1.207 |
| NOS | 28.751 | 0.089 | 0.310 |
| NPTII | 29.392 | 0.076 | 0.260 |
| CP4 EPSPS | 29.223 | 0.171 | 0.585 |
| Cry3A | 29.355 | 0.204 | 0.693 |
| PVYcp | 28.325 | 0.088 | 0.310 |
| PLRVep | 29.027 | 0.176 | 0.607 |
| EH92-527-1 | 27.794 | 0.090 | 0.322 |

3 讨论

3.1 通过引物探针序列重组阳性质粒的应用 随着分子生物学技术的普及,实时荧光 PCR 检测方法已经逐渐扩展到生物科学、医学、农业科学、食品科学等各个领域^[6],其高灵敏度、高分辨率、快速便捷、规范性操作等优势在对检验检测标准化需求日渐严格的今天更加凸显出来。但由于 PCR 检测过程中的检测目标的不能直观可见,需要对在全过程中可能影响检测结果因素逐一进行验证排除,因此在各个检测环节中合理设置阴性、阳性及空白对照组直接关系到检测结果的可靠性与否则。根据现行有效的国家标准^[7-8],在转基因检测过程中需要设立阳性目标 DNA 对照、阴性目标 DNA 对照、PCR 抑制对照、扩增试剂对照、提取空白对照、阳性提取对照、环境对照这七大类对照组试验。其中阳性目标 DNA 对照、PCR 抑制对照、阳性提取对照 3 类对照组均需要使用对应每个检测目标基因的阳性对照品来开展试验。可以说如果一个实验室想要建立一个实时荧光 PCR 检测能力,阳性对照品的获得是其能否成功的关键因素。

表 3 转基因马铃薯阳性重组质粒在 4 和 -20 ℃ 的条件下 90 d 以内的稳定性结果

Table 3 Stability of the positive recombinant plasmid of transgenic potato within 90 days at 4 ℃ and -20 ℃

| 保存时间 Hold time d | 保存温度 Storage temperature//℃ | C _q 值 C _q value | | | | | | | | |
|------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|-------|-------|-------|-----------|-------|-------|--------|------------|
| | | CaMV35S | FMV | NOS | NPTII | CP4 EPSPS | Cry3A | PVYcp | PLRVep | EH92-527-1 |
| 7 | 4 | 28.28 | 29.04 | 28.71 | 29.54 | 29.24 | 28.92 | 28.49 | 28.80 | 27.83 |
| | -20 | 28.36 | 28.76 | 29.27 | 29.43 | 29.28 | 29.11 | 28.58 | 29.30 | 28.03 |
| 15 | 4 | 28.33 | 28.84 | 29.05 | 29.52 | 29.31 | 29.11 | 28.33 | 29.19 | 27.98 |
| | -20 | 28.37 | 29.03 | 29.24 | 29.46 | 29.44 | 29.30 | 28.49 | 29.22 | 28.03 |
| 30 | 4 | 28.45 | 28.94 | 29.42 | 29.65 | 29.26 | 29.13 | 28.56 | 29.16 | 27.98 |
| | -20 | 28.47 | 29.04 | 29.17 | 29.57 | 29.48 | 29.42 | 28.71 | 29.49 | 28.12 |
| 90 | 4 | 28.46 | 29.03 | 29.35 | 29.92 | 29.44 | 29.26 | 28.57 | 29.36 | 27.85 |
| | -20 | 28.45 | 28.90 | 29.25 | 29.67 | 29.23 | 29.28 | 28.20 | 29.35 | 27.95 |

以往检测过程中所使用的阳性物质一般为各类标准物质或经权威机构确认鉴定的阳性样品,这些阳性样品能够满足不同情况的使用需求。但从实际工作出发,检测机构的检测需求千变万化,受不同时间空间等因素的影响很大,而各类标准物质获得本质上都基于阳性样品的获得。对于没有

市售途径、收到贸易制约、上市时间久远或生物安全风险较高的阳性样品往往难于获得。在有检测需求时却不能及时获得合适的阳性对照品很有可能会成为制约一个检测机构检测能力发展的重要因素。

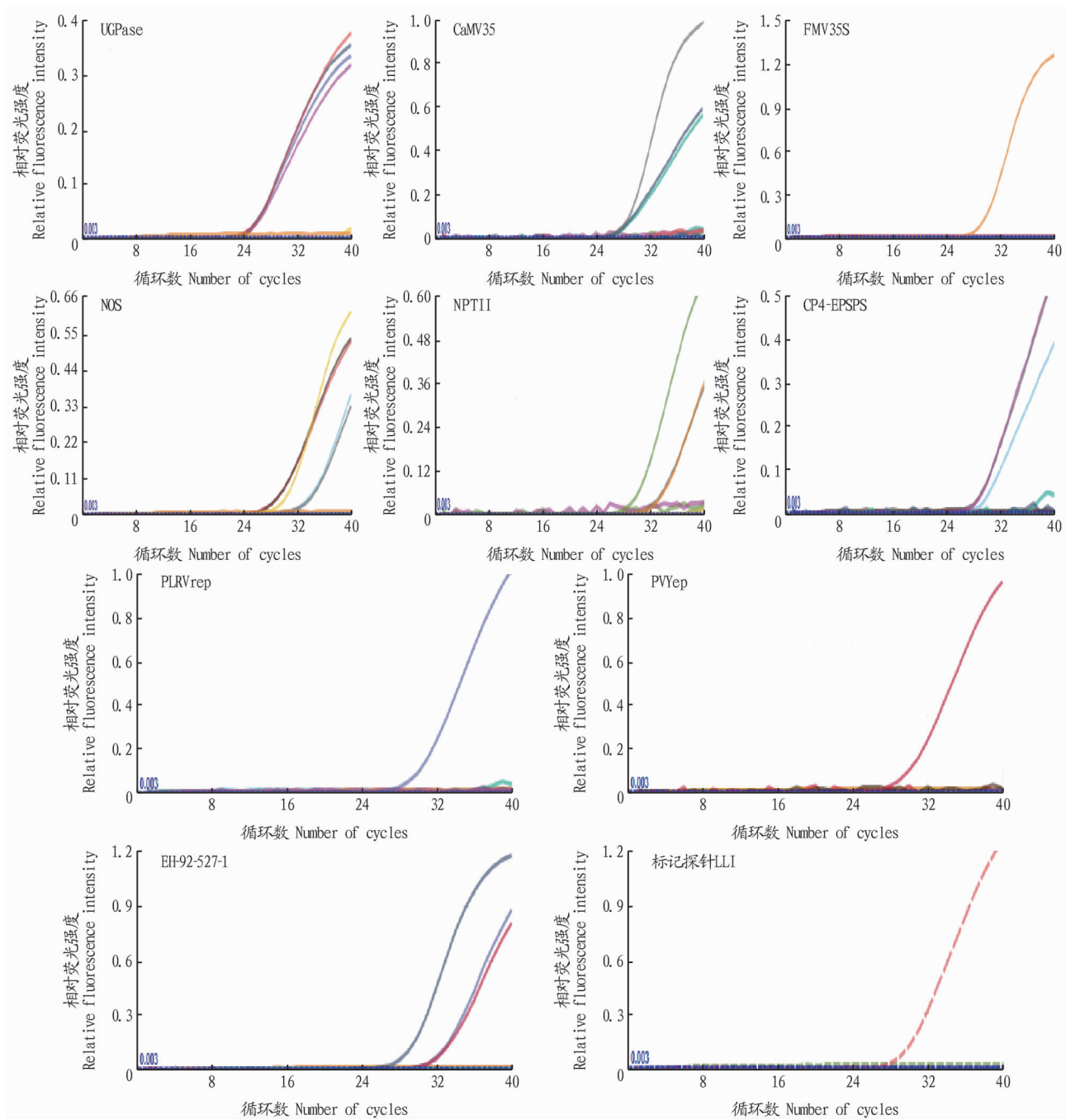


图 5 将重组阳性质粒作为阳性对照品对转基因样品进行检测的荧光曲线

Fig. 5 Fluorescence curve of genetically transgenic samples using recombinant positive plasmid as positive control

表 4 对转基因样品按照 SNT 1198—2013 内源基因、9 个筛查基因及标记探针 LLI 进行检测的结果

Table 4 Detection results of transgenic samples according to SN/T 1198—2013 endogenous gene, 9 screened genes and labeled probes LLI

| 样品名称 Sample name | UGPase | CaMV35S | FMV35S | NOS | NPTII | CP4-EPSPS | PLRVrep | PVYep | Cry3A | EH-92-527-1 | 标记探针 LLI 序列 Labeled probe LLI sequence |
|---------------------------------|--------|---------|--------|-------|-------|-----------|---------|-------|-------|-------------|---|
| 阳性质粒对照 Positive plasmid control | — | 27.89 | 28.21 | 30.28 | 29.92 | 29.35 | 28.96 | 28.92 | 29.57 | 27.94 | 28.49 |
| 空白对照 Blank control | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| EH92-527-1 | 26.94 | — | — | 33.95 | 33.57 | — | — | — | — | 31.69 | — |
| EH92-527-1 | 26.89 | — | — | 33.79 | 33.44 | — | — | — | — | 31.49 | — |
| 转基因玉米 GMO corn | — | 28.14 | — | 29.02 | — | 29.30 | — | — | 37.02 | — | — |
| 转基因玉米 GMO corn | — | 28.33 | — | 29.02 | — | 30.41 | — | — | 36.87 | — | — |
| 非转基因马铃薯 Non-GM potato | 27.04 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 非转基因马铃薯 Non-GM potato | 26.98 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |

注：“—”表示该基因未产生扩增曲线

Note: “—” indicates that the gene does not produce an amplification curve

基于水解探针法的实时荧光 PCR 原理,通过将具体检测方法中所使用的引物探针序列进行顺序拼接重组而构成的阳性重组质粒能够以几十至数百元的成本,在十几天的周期内就获得任一检测方法所需要的阳性物质。且这种阳性物质具有高度的方法专一性,对于不同检测方法间不会产生污染,并且能够通过序列设计在每种阳性质粒中插入独立标记序列,实现阳性结果的可识别可追溯。此外,通过对特定检测标准方法建立对应的阳性质粒,可以有效帮助标准方法的实施,促进检测工作标准化的进行。

3.2 存在的问题及改进方向 首先,实际工作应用中,应当先进行重组序列的构造设计,每一个阳性序列可以按照上游引物序列、探针序列、下游引物反向互补序列的顺序拼接在一起。当需要设计多个序列时可以直接拼接,还可以对不同重组序列片段进行比较,将序列末端相同的若干基因序列进行压缩碱基拼接,以达到减小片段长度的目的。

其次,在序列合成时,可以根据检测的需求,对于阳性序列的获得采用不同的方式:对于 70 bp 以下可以考虑直接化学合成,对于 70~200 bp 可以考虑通过搭桥 PCR 的方式多次拼接,对于 200 bp 以上的多元阳性重组可以采用全基因合成的方式。但由于 100 bp 以下的 oligoDNA 片段在试验操作中较容易产生气溶胶,对于试验空间、试验条件、试验操作较为有限的实验室会有较大的风险形成阳性气溶胶污染^[9],通过将阳性序列分解为不具备完整扩增产物的片段进行搭桥 PCR 连接能够更好地避免污染。如果出于操作流程和防污染的角度出发,将 5~12 个阳性重组序列进行拼接构建一个长片段进行全基因合成能够更加方便快捷,成本也更低。

第三,在 3 类阳性对照组中,阳性对照的主要功能是确保扩增体系溶液配制正确,溶液中不含抑制扩增反应的成分,重组阳性质粒能完全胜任阳性目标 DNA 对照、PCR 抑制对照组的功能。但是阳性提取对照仅能使用阳性样品或阳性基体标准物质作为阳性对照品。设立阳性提取对照的目的是确保在 DNA 提取过程中保障模板 DNA 提取的质量,确

保被测目标基因序列不因提取方法的不当导致假阴性结果的产生。但一般的实时荧光 PCR 检测方法中都会加入内源基因的检测组,通过内源基因 Ct 值的大小限制确保样品 DNA 模板提取的浓度满足检测需求,这在很大程度上就足以代替阳性提取对照组的功能。

第四,由于引物探针序列重组阳性质粒本身并不是目标扩增的全长片段,通常情况下会略短于全长片段,因此与标准物质相比可能存在影响扩增效率的潜在因素。但出于常规实时荧光 PCR 引物探针设计原则^[10],其扩增片段长度与引物探针区间序列不应影响扩增结果产生较大影响,因此重组序列应当能满足大多数定性检测方法的需求。

第五,对于实时荧光定量 PCR 而言,重组质粒与目标扩增的全长片段在扩增效率上的影响需要更进一步的定量分析,未经验证的重组质粒可能不应直接用于定量检测结果的分析,以避免重组序列构建对定量结果的不确定性影响。

参考文献

- [1] 董莲华,赵正宜,李亮,等.转基因植物标准物质研究进展[J].农业生物技术学报,2012,20(2):203-210.
 - [2] 苏长青.适合转基因抗虫水稻和棉花 PCR 检测标准质粒的构建及试用[D].北京:中国农业科学院,2011.
 - [3] MACKAY I M, ARDEN K E, NITSCHKE A. Real-time PCR in virology[J]. Nucleic acids research, 2002, 30(6): 1292-1305.
 - [4] 杨宇,吴元华,郑雅楠.利用重叠延伸 PCR 技术进行 DNA 的人工合成[J].安徽农业科学,2006,34(9):1810-1811.
 - [5] 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 马铃薯检测方法:SN/T 1198-2013[S].北京:中国标准出版社,2013.
 - [6] 欧阳松应,杨冬,欧阳红生,等.实时荧光定量 PCR 技术及其应用[J].生命的化学,2004,24(1):74-76.
 - [7] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.转基因产品检测 通用要求和定义:GB/T 19495.1—2004[S].北京:中国标准出版社,2007.
 - [8] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.转基因产品检测 实验室技术要求:GB/T 19495.2—2004[S].北京:中国标准出版社,2007.
 - [9] 彭志领,王建华. RT-PCR 技术常见问题的分析[J].河南畜牧兽医,2002(1):38.
 - [10] GIULIETTI A, OVERBERGH L, VALCKX D, et al. An overview of real-time quantitative PCR: Applications to quantify cytokine gene expression [J]. Methods, 2001, 25(4): 386-401.
- (上接第 198 页)
- 孔树脂以及用于洗脱的乙醇溶液可重复利用,既节约了成本,也减少了对环境的污染,可用于工业化生产。
- 参考文献**
- [1] 熊何健,庞杰,林琳.荔枝核中活性成分的提取及抗氧化活力研究[J].西南大学学报(自然科学版),2010,32(3):134-139.
 - [2] 黄玉影,李常青,陈斯泰,等.荔枝核有效部位群对实验性非酒精性脂肪肝的治疗作用及机制[J].广州中医药大学学报,2016,33(3):346-352.
 - [3] 葛如意.荔枝核抗肿瘤有效成分的筛选及机制初步研究[D].广州:广东药学院,2014.
 - [4] 刘森,潘志,南征,等.荔枝核总黄酮对高糖联合肿瘤坏死因子诱导大鼠肾小球系膜细胞纤维黏连蛋白、IV型胶原蛋白表达的影响[J].吉林中医药,2016,36(2):181-183.
 - [5] 黄晓兵,李积华,彭芍丹,等.五个产地荔枝核中药饮片抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2014,35(22):91-94.
 - [6] 王娟,任冬冬,贾合磊,等.荔枝核黄酮类化合物对小鼠 I 型单纯疱疹病毒性脑炎的作用及机制[J].广东医学,2017,38(19):2934-2939.
 - [7] 徐婷,吴青,高骏伟.荔枝核提取物及其阳离子树脂分离物体外降血糖作用[J].食品与机械,2012,28(4):113-116.
 - [8] 程文辉,张宏,肖柳英.荔枝核颗粒对治疗乳腺增生病的临床观察[J].临床医学工程,2013,20(1):25-26.
 - [9] 叶红梅,钟春燕,吕俊华.荔枝核皂苷对小鼠学习记忆障碍的改善[J].广州医科大学学报,2015,43(2):10-14.
 - [10] 刘春憬.大孔吸附树脂在中药分离纯化中的研究进展[J].农产品加工,2015(2):54-57.
 - [11] 李建新,张晓宇. D280 大孔树脂对苹果多酚的动态解吸工艺优化[J].北方园艺,2015(11):116-118.
 - [12] 季红,贾荣,郭鑫.大孔树脂对山葡萄籽多酚提取物的纯化工艺优选[J].吉林大学学报(医学版),2017,43(6):1272-1277.
 - [13] 王雅,樊明涛,赵萍,等.大孔树脂对沙枣多酚的动态吸附解吸性能研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2010,38(12):215-220.