

抗草甘膦转基因大豆 PCR 定量检测研究

朱元招 尹靖东 李德发 王凤来

(中国农业大学 农业部饲料工业中心,北京 100094)

摘要 试验建立大豆中转基因成分的定量测定方法。采用双链 DNA SYBR Green I 结合染料实时荧光定量 PCR 技术,扩增编码大豆凝集素的内参照基因 *lec* 和抗草甘膦转基因大豆中的外源花椰菜花叶病毒 *CaMV35s* 基因,绘制 2 种基因扩增的循环数-拷贝数标准曲线图,根据标准曲线方程计算样品中的转基因含量;并作重现性和熔解曲线分析。结果表明,*lec* 和 *CaMV35s* 基因标准曲线方程线性好, R^2 值分别达到 0.999 7 和 0.999 2。不同转基因含量的标准及模拟大豆样品定量显示,实测值与实际值接近,相对偏差 5%~11%。SYBR Green I 实时定量 PCR 方法可用于定量测定大豆中转基因品种的含量。

关键词 实时定量 PCR; SYBR Green I 荧光染料; 抗草甘膦大豆; 转基因标识

中图分类号 S 816.17; S 816.35

文章编号 1007-4333(2005)03-0025-05

文献标识码 A

Quantitative PCR method for detecting glyphosate-tolerant gene transfer in soybeans

Zhu Yuanzhao, Yin Jingdong, Li Defa, Wang Fenglai

(China Agricultural University, Ministry of Agricultural Feed Industry Center, Beijing 100094, China)

Abstract Quantitative determination of the transgenic component in soybeans was developed in this study. Based on real-time quantitative PCR technique with SYBR Green I as fluorescent dye combined to double-strand DNA, the endogenous *lec* gene (encoding soybean lectin) and exotic *CaMV35s* gene (encoding 35S promoter of CaMV inserted in glyphosate-tolerant soybeans) were amplified. The transgenic ratio was then calculated according to the standard Ct-copies linear graphs of these two genes. The reproducibility and melting curves of the genes were also analyzed. The results showed that the standard equations of *lec* and *CaMV35s* genes had higher R^2 value of 0.999 7 and 0.999 2 respectively. The difference between the determined and the known transgenic levels of standard and simulated soybeans was only 5% - 11%. It was thus suggested that the PCR method with fluorescent dye SYBR Green I was suitable for quantifying the weight ratio of transgenic soybeans in soybean products.

Key words real-time quantitative PCR; fluorescence dye SYBR Green I; glyphosate-tolerant soybeans; transgenic labeling

为维护消费者对转基因食品的知情权和选择权,2000年1月,135个国家对加贴标签说明达成协议;欧盟(EC)49/2000号条例规定食品中含有超过

1%的转基因成分时,必须在标签上做出标示(European Commission);我国于2001年发布了《农业转基因生物标识管理办法》,规定凡是在中国境内销

收稿日期:2004-11-15

基金项目:农业部专项基金资助项目(农技函[2001]184号);饲料工业应用 HACCP 体系的关键技术研究(6031002)

作者简介:朱元招,博士,副教授;尹靖东,博士后,副研究员,通讯作者,主要从事分子营养学方面的研究,yinj@mafic.ac.cn,010-62733590-1401

European Commission. Commission Regulation (EC) No 49/2000 of 10 Jan. 2000 amending Council Regulation No 1139/98 concerning the compulsory indication of the labeling of certain foodstuffs produced from genetically modified organisms of particular other than those provided for in Directive 79/112/EEC.

中华人民共和国农业部令 第 10 号. 农业转基因生物标识管理办法. 2001, 附件

售的大豆及其制品若属转基因生物,就必须进行标识。转基因标识管理的关键是进行有效的定量检测。现已发展多种定量 PCR 技术^[1-4],其中,竞争 PCR 是一种比较常用的定量方法^[5],但只是“终点法”定量,不能对扩增过程进行动态检测。目前较多应用 TagMan 实时荧光定量技术^[6-7],由于反应体系中荧光探针能与靶序列特异性杂交,所以检测特异性高,但同时存在淬灭不彻底、合成和标记复杂、成本高等缺陷。本研究旨在探讨使用一种成本较低的 SYBR Green I 结合染料 PCR 方法,来确定大豆中转基因成分的比例。

1 材料与方法

1.1 样品制备

将 100% (质量分数,下同) 标准阳性和阴性 Roundup Ready (RR) 转基因大豆 (EnviroLogix, USA) 混合成含转基因大豆 5%、2%、1%、0.5% 和 0.1% 的大豆混合物,按照用于 GMO 检测的 DNA 抽提试剂盒 (大连宝生物工程有限公司生产) 中的操作规程提取其基因组 DNA。另取 100% 标准阳性 RR 转基因大豆 DNA 按 10 倍逐级稀释模拟配制含有 10%、1% 和 0.1% 的 RR 大豆样品。采用定量 PCR 扩增花椰菜花叶病毒启动子 *CaMV35s*; 并同步扩大大豆凝集素 *lec* 基因,作为内对照。

1.2 标准曲线制作

内对照基因 *lec* 标准曲线:用提取的 100% 标准阳性 RR 转基因大豆 DNA,以超纯水按 5 倍逐级稀释至 20%、4%、0.8% 和 0.16%,进行 PCR 反应。以拷贝数的自然对数值为横坐标,以 C_t 值 (荧光值达到指定阈值时的循环次数) 为纵坐标,绘制标准曲线图,并求解回归方程。

外源 *CaMV35s* 基因标准曲线:与 *lec* 基因的标准曲线制作方法相似,以超纯水按 20 倍逐级稀释至 4%、0.8%、0.16% 和 0.032% 4 个梯度进行 PCR 扩增。

1.3 定量 PCR 扩增反应

LEF/LER 引物序列:5'-GCC CTC TAC TCC ACC CCC ATC C-3',5'-GCC CAT CTG CAA GCC TTT TTG TG-3';预期扩增长 118 bp 的 *lec* 基因。

35SF/35SR 引物序列:5'-GCT CCT ACA AAT GCC ATC A-3',5'-GAT AGT GGG ATT GTG CGT

CA-3';预期扩增长 195 bp 的 *aMV35s* 启动子。

20 μ L PCR 反应体系:10 μ L PE (含有 UNG 酶、PCR 反应缓冲液、 $MgCl_2$ 、dNTPs、DNA 聚合酶和 SYBR Green I 荧光染料的混合液,美国 MG 公司生产),引物 1.0 μ mol/L,一定量模板 DNA,用灭菌超纯水补齐至 20 μ L。空白对照以超纯水代替模板 DNA。

PCR 反应条件:开始保温 50 $^{\circ}C$ 2 min;预变性 95 $^{\circ}C$ 8 min;变性 94 $^{\circ}C$ 20 s,退火 20 s,延伸 72 $^{\circ}C$ 20 s,其中 *lec* 和 *CaMV35s* 基因的退火温度分别为 60 和 54 $^{\circ}C$;熔解 81.5 $^{\circ}C$ 1 s,熔解后读板;循环 31~40;最后于 72 $^{\circ}C$ 延伸 5 min;熔解曲线温度范围设置为 65.0~95.0 $^{\circ}C$,每间隔 0.5 $^{\circ}C$ 读数 1 次,每次 1 s。反应在实时荧光定量 PCR 仪 (DNA engine Option 2, MJ Research, USA) 中进行。

同时进行 *lec* 基因的重现性测定和定量 PCR 扩增的熔解曲线分析。

1.4 转基因含量的计算方法

计算实验结果大豆中转基因成分:大豆转基因成分含量 = (外源 *CaMV35s* 基因拷贝数/对照 *lec* 基因拷贝数) \times 100%。

2 结果与分析

2.1 标准曲线绘制

在 *lec* 和 *CaMV35s* 基因 PCR 扩增的荧光曲线图中 (图 1),高含量 DNA 模板达到相同的荧光强度所对应的 C_t 值较低含量 DNA 模板的小,或者达到相同荧光强度时高含量 DNA 模板的 C_t 值比低含量 DNA 模板的小,即 C_t 值与 DNA 模板含量呈反比关系;未加 DNA 模板的阴性对照则没有检测到荧光。在转换后的标准曲线图中 (图 2), C_t 值与 DNA 模板扩增拷贝数的对数呈反比,即 C_t 值越低,拷贝数就越大。*lec* 和 *CaMV35s* 基因标准曲线方程的系数、截距均相接近, R^2 值高,分别达到 0.999 7 和 0.999 2。

2.2 重现性测定和熔解曲线分析

检测结果显示,*lec* 基因的平行测定结果重现性好,变异系数小,为 0.96% (图 3)。*lec* 和 *CaMV35s* 基因熔解曲线中的解链温度 T_m 值一致,均为 81.5 $^{\circ}C$ (图 4)。

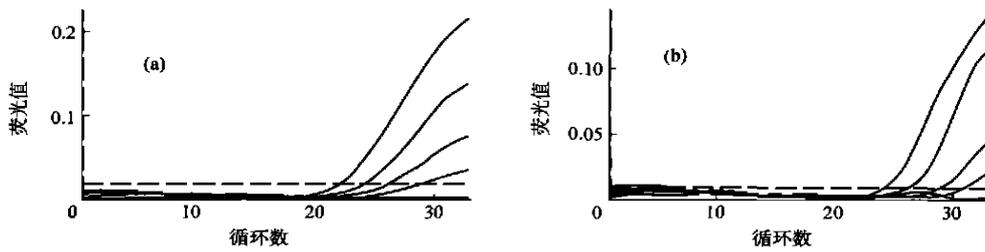


图 1 *lec*(a) 和 *CaMV35s*(b) 基因定量 PCR 荧光检测

Fig. 1 Fluorescence of *lec*(a) and *CaMV35s*(b) genes detected by quantitative PCR

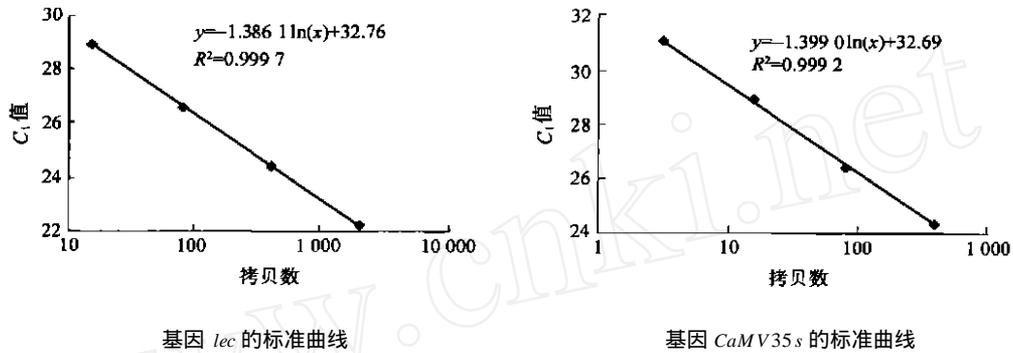


图 2 转基因大豆定量 PCR 检测标准曲线

Fig. 2 Standard curve of quantitative PCR analysis in transgenic soybeans

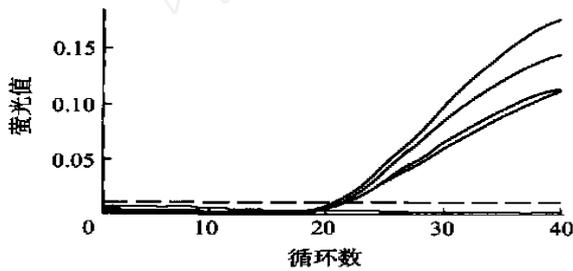


图 3 *lec* 基因定量 PCR 重现性扩增

Fig. 3 Reproducibility of *lec* gene with quantitative PCR

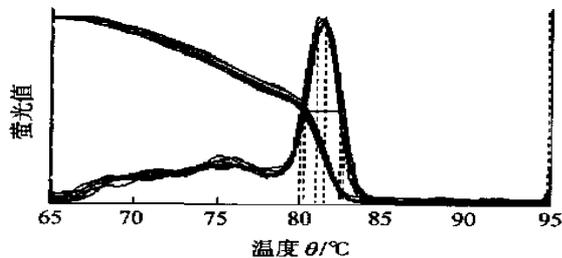


图 4 基因 *lec* 和 *CaMV35s* 的定量 PCR 扩增熔解曲线

Fig. 4 Melting curve of *lec* and *CaMV35s* with quantitative PCR

2.3 标准和模拟大豆样品的检测

通过 PCR 定量扩增,根据 2 次平行测定 C_t 值

的平均数,由标准曲线推算出 *lec* 和 *CaMV35s* 基因所对应的 DNA 拷贝数。结果显示,已知含量的 5%、2%、1%、0.5% 和 0.1% RR 转基因大豆的测定值分别为 5.43%、2.22%、1.05%、0.47% 和 0.11%(表 1),测定值与实际值较为接近,相对偏差各为 8.6%、11.0%、5.0%、6.0% 和 10.0%。

用 100% 转基因阳性大豆 DNA 按 10 倍递级稀释,模拟含量为 10%、1% 和 0.1%,通过定量,其测定值分别为 9.29%、0.89% 和 0.09%(表 1),与实际含量的相对偏差分别为 7.1%、11.0% 和 10.0%。

3 讨论

1) 影响实验结果的重要因素之一是如何确定 C_t 值。 C_t 值定义为在基线上方荧光信号由本底进入指数增长阶段的拐点所对应的 PCR 循环次数。“基线上方”即阈值高度的量化,阈值所在的横线与 PCR 扩增曲线的交点所指的循环次数就是 C_t 值,正常范围为 18~30。基线范围一般取第 3~15 个循环,早于第 3 个循环时,荧光信号很弱,扣除背景后的校正信号波动较大。基线则取决于实验的质量。本实验的阈值和 C_t 值均在正常范围内,不致影响实验的精度。定量实验中的误差是不可避免

的。设立重复实验将误差尽可能降低到最小。阴性

表1 RR转基因大豆 PCR定量检测结果

Table 1 Quantification of RR transgenic soybeans by PCR method

种类	w(样品)/%	基因	C _t 值	C _t 平均值	拷贝数	转基因成分百分比/%
标准 RR 大豆	5.0	<i>CaMV35s</i>	24.19			5.43
		<i>CaMV35s</i>	23.89	24.04	486	
		<i>lec</i>	20.08			
		<i>lec</i>	20.22	20.15	8 951	
	2.0	<i>CaMV35s</i>	25.41			2.22
		<i>CaMV35s</i>	25.23	25.32	194	
		<i>lec</i>	20.11			
		<i>lec</i>	20.25	20.18	8 747	
	1.0	<i>CaMV35s</i>	26.29			1.05
		<i>CaMV35s</i>	26.03	26.16	106	
		<i>lec</i>	19.89			
		<i>lec</i>	20.07	19.98	10 090	
	0.5	<i>CaMV35s</i>	27.11			0.47
		<i>CaMV35s</i>	27.38	27.25	49	
		<i>lec</i>	20.05			
		<i>lec</i>	19.81	19.93	10 514	
	0.1	<i>CaMV35s</i>	29.35			0.11
		<i>CaMV35s</i>	29.03	29.19	12	
		<i>lec</i>	20.07			
		<i>lec</i>	19.81	19.94	10 401	
	空白	<i>CaMV35s</i>	A/N			0.00
		<i>CaMV35s</i>	A/N	A/N	0	
		<i>lec</i>	A/N			
		<i>lec</i>	A/N	A/N	0	
10	<i>CaMV35s</i>	22.79			9.29	
	<i>CaMV35s</i>	22.52	22.66	1 299		
	<i>lec</i>	19.62				
	<i>lec</i>	19.44	19.53	13 981		
RR 大豆	1	<i>CaMV35s</i>	25.72			0.89
		<i>CaMV35s</i>	25.89	25.81	137	
		<i>lec</i>	19.26			
		<i>lec</i>	19.51	19.39	15 467	
0.1	<i>CaMV35s</i>	28.89			0.09	
	<i>CaMV35s</i>	29.17	29.03	17		
	<i>lec</i>	19.43				
	<i>lec</i>	19.21	19.32	16 035		

对照未检测到荧光,证实 PCR 过程未受到污染。在 PCR 操作中,无论以体积或重量为单位取样,由于同样体积或重量的样本细胞数目并不一样,因此拷贝/ μL 或拷贝/ ng 的定量数据之间实际并不可比,需要通过设置阳性对照将这些数据归一到以拷贝/细胞或拷贝/基因组为单位。大豆持家基因 *lec* 在细胞中的表达量或在基因组中的拷贝数是恒定的,受环境因素影响较小,其定量结果代表了样品中所含细胞或基因组的数量,作为阳性对照又称阳性内对照(internal positive control, IPC)对外源基因模板的定量进行校正。为减少误差,通常利用定量 PCR 仪的多色检测特性,将目标基因和阳性内对照基因在同一管内进行定量测定,当这 2 种基因的 PCR 反应条件基本一致时,可在同一反应板上同时定量。本实验中,*CaMV35s* 和 *lec* 基因 PCR 反应除退火温度不同外,其他条件相同,并且溶解曲线图显示 T_m 值一致,因此,实验中目的基因和阳性内对照基因虽分两管定量,仍然是较为严格意义上的比较。

2) 与 TagMan 探针法比较,双链 DNA SYBR Green I 结合染料实时 PCR 技术也能较为准确地定量转基因成分。TagMan 探针法是一种高度特异性的定量 PCR 技术,探针只与模板特异性结合,其 5 端标记的报告基团产生的荧光信号和目的片段一样,在 PCR 过程中呈同步增长,信号强度就代表了模板 DNA 的拷贝数(Berdal 和 Holst-Jensen; Terry 和 Harris)^[10-11],对模拟 1%水平转基因大豆的检测结果为 0.93%,相对偏差为 7%^[12]。本实验应用 DNA SYBR Green I 结合染料法,定量检测标准和模拟转基因大豆的相对偏差较为接近 TagMan 法,并且由于成本较低,可作为大豆转基因成分定量测定的供选方法。

参 考 文 献

- [1] Eun A, Wong S. Molecular beacons: A new approach to plant virus detection [J]. *Phytopathology*, 2000, 90: 269~275
- [2] Immink R, Gadella T, Ferrario S, et al. Analysis of MADS box protein-protein interactions in living plant cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 2416~2421
- [3] Tyagi S, Kramer F R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization[J]. *Nat Biotechnol*, 1996, 14(3): 303~308

- [4] Weghofer M, Karlic H, Haslberger A. Quantitative analysis of immune-mediated stimulation of tumor necrosis factor- α in macrophages measured at the level of mRNA and protein synthesis[J]. *Ann Hematol*, 2001, 80: 733-736
- [5] St ¨uler E, Rhyner C, L ¨uhj J, et al. Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified soybean and maize [J]. *Z Lebensm Unters Forsch*, 1998, 207: 207-213
- [6] Knut G, Berdal K, Holst-Jensen A. Roundup Ready soybean event-specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analyses [J]. *Eur Food Res Technol*, 2001, 213: 432-438
- [7] V ¨aitilom M, Pijnenberg H, Gendre F, et al. Real-time quantitative PCR detection of genetically modified Maximizer maize and Roundup Ready soybean in some representative foods[J]. *J Agric Food Chem*, 1999, 47: 5261-5266
- [8] Berdal K G, Holst-Jensen A. Roundup Ready soybean event-specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analyses [J]. *Eur Food Res Technol*, 2001, 213: 432-438
- [9] Terry C F, Harris N. Event-specific detection of Roundup Ready soya using two different real time PCR detection chemistries[J]. *Eur Food Res Technol*, 2001, 213: 425-431
- [10] Wurz A, Bluth A, Zeltz P, et al. Quantitative analysis of genetically modified organisms (GMO) in processed food by PCR-based methods [J]. *Food Contr*, 1999, 10: 385-389

科研简讯

“饲料中 -兴奋剂等 13 种违禁药物检测技术研究”成果通过鉴定

该项目由我校张丽英研究员主持,2005 年 3 月 26 日通过农业部组织的专家鉴定。该项研究针对我国饲料安全管理的需要,采用固相萃取(SPE)和液质联用(LC-MS)技术,建立了沙丁胺醇、盐酸克伦特罗等 13 种违禁药物分类同步测定和饲料中碘化酪蛋白水解物的检测方法,简化了分析程序。该检测方法的综合水平达到国际先进水平,会议建议有关部门将其列入农业行业标准制定计划。

“鸡肉质、腹脂及色素性状的分子遗传学基础研究”成果通过验收

该项目由我校吴常信院士主持完成,2005 年 4 月 12 日通过北京市自然科学基金重点项目验收,认为达到国际领先水平。该项研究建立了丝羽乌骨鸡基因组细菌人工染色体(BAC)文库,覆盖 10 倍以上基因组,是世界上惟一的丝羽乌骨鸡全基因组资源;建立了国内首张鸡全基因组标记连锁图谱,为鸡重要经济性状基因定位打下了良好的基础;筛选到了影响鸡肉质、腹脂及色素性状的基因座位和候选基因,在国内外首例报道了黑皮质素受体 1(MC1R)基因、酪氨酸酶相关蛋白 1(TYRP-1)基因、Agouti 相关蛋白(Agrp)基因对乌骨鸡黑色素性状的影响;发现了 1 个对外周脂肪沉积有显著影响的基因——鸡细胞外脂肪酸结合蛋白(EX-FABP)基因。目前对北京油鸡和海南文昌鸡群体检测发现,该基因座位与腹脂含量及腹脂率性状相关显著。

(科学技术处供稿)