

文章编号: 1003-8701(2007)05-0024-04

用实时荧光 PCR 方法定量检测 Bt176 转基因玉米

李葱葱¹, 王青山², 李飞武¹, 刘娜¹,
康岭生¹, 王晶¹, 赵宁¹, 张明^{1*}

(1. 吉林省农业科学院生物技术研究中心, 长春 130124; 2. 中国热带农业科学院)

摘要: 以实时荧光 PCR 技术鉴定商业化种植的转基因玉米 Bt176 品系。根据转基因玉米 Bt176 中内源基因 Zein 和外源基因 cry1Ab 设计引物及 TaqMan 荧光探针, 成功建立了检测转基因玉米 Bt176 品系的实时荧光 PCR 方法。结果表明, 应用实时荧光 PCR 方法检测转基因作物, 不仅可以达到品系鉴定的作用, 而且可以用于转基因成分的检测。该方法简便迅速, 降低了污染机会, 为转基因作物及产品的品系检测提供了新方法。

关键词: 实时荧光 PCR; Bt176 转基因玉米; TaqMan 荧光探针

中图分类号: S513

文献标识码: A

随着生物技术的飞速发展, 转基因产品(GMO)日益走进人们的生活, 已批准商品化的转基因作物有大豆、玉米、油菜、棉花、番茄、烟草、菊苣等。其中玉米是世界上重要的粮食作物之一。转基因玉米 Bt176 是一个在美国占相当种植面积的转基因玉米品种, 我国已允许进口加工此品种玉米。转基因玉米 Bt176 为具抗虫害特性的品系, 其转入的抗虫基因为 Bt 系列毒蛋白基因毒 Cry1Ab 抗虫基因。

由于转基因产品相继大量进入市场, 其安全性问题已引起世界各国的高度重视。欧盟、日本等国家也相继制定了法规对转基因作物进行严格管理, 我国政府对转基因安全性问题也非常重视, 制定了相应的规章制度, 因此对转基因产品的检测非常重要。

目前国际上有关转基因产品的检测方法中以 PCR 检测方法应用最广。用于实时荧光 PCR 的 TaqMan 技术是在普通 PCR 原有的一对特异性引物基础上, 增加了一条特异性的荧光双标记探针。一个标记在探针的 5' 端, 称为荧光报告基团; 另一个标记在探针的 3' 端, 称为荧光淬灭基团。两者可构成能量传递结构, 即 5' 端荧光报告基团所发出的荧光可被荧光淬灭基团吸收或抑制。当二者距离较远时, 抑制作用消失, 报告基团荧光信号增强。荧光信号随着 PCR 产物的增加而增强。实时定量 PCR 方法就是利用此原理, 在 PCR 过程中, 连续不断地检测反应体系中荧光信号的变化。当信号增强到某一阈值(PCR 反应的前 15 个循环的荧光信号作为荧光本底信号, 荧光阈值的缺省设置是 3~15 个循环的荧光信号的标准偏差的 10 倍)时, 此时的循环次数(Ct 值)就被记录下来。该循环参数(Ct 值)和 PCR 体系中起始 DNA 量的对数值之间有严格的线形关系。利用阳性梯度标准的 Ct 值, 在根据样品的 Ct 值就可以准确确定起始 DNA 的数量。

本研究先采用 SYBR Green I 荧光染料实时 PCR 检测进行定性, 然后用荧光定量 PCR 的 TaqMan 探针技术, 对玉米中 Bt176 转基因成分进行定性和定量检测, 以期达到对 Bt176 转基因玉米进行实时荧光 PCR 检测方法建立的目的。

1 材料和方法

收稿日期: 2006-12-08

作者简介: 李葱葱(1979-), 男, 研究实习生, 主要从事转基因作物及其产品成分检测。

通讯作者: 张明

1.1 试验材料

本实验所用材料为转基因玉米阳性样品 Bt176 及非转基因玉米阴性对照, 由瑞士先正达公司提供。

1.2 仪器和试剂

ABI PRISM 7700 定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司); Anke TGL-16c 离心机 (上海安亭科学仪器厂); Line- Gene 定量仪 (杭州博日公司)。

TaqManTMPCR Bt176 定量检测试剂盒购自香港基因晶片公司 SYBR Green I 荧光染料, DNA 提取试剂盒, Taq 酶鼎国生物生产, dNTPs(10mM, pH 7.5): genview 生产。

1.3 试验方法

1.3.1 基因组 DNA 的提取

采用北京鼎国有限公司生产的 GMO 基因组 DNA 提取试剂盒并按照操作说明进行, 浓度测定采用紫外分光光度法。

1.3.2 Taq Man 探针与引物的设计和合成

转基因玉米 Bt176 外源 *cry1Ab* 基因和内源 *Zein* 基因的 PCR 引物及 Taq Man 探针均含于 Taq-ManTMPCR Bt176 定量检测试剂盒(香港基因晶片公司)。

1.3.3 定性 PCR 检测:

反应体系: 25 μ L 体系中含 1 $\times$ PCR 缓冲液(含 Mg^{2+}), dATP、dUTP、dCTP、dGTP 各 100 μ M/L, 每条引物 100 nM/L, Taq 酶 2.5 U, 1 $\times$ SyBr 染料, 约 500 ng 模板 DNA。每个样品设置两个重复, 同时设空白对照。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C, 2 min; 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 58 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 40 s; 35 个循环。

1.3.4 实时荧光 PCR 定量检测

①反应体系: 使用香港基因晶片公司生产的 Bt176 定量检测试剂盒, 20 μ L 体系中含 real-time masternix 11.2 μ L, 模板 DNA 4 μ L(约 200 ng)。试剂盒含 4 个浓度标准, 同时有内源参照。

②样品检测: 将样品放入 ABI7700 96 孔反应板上, 打开 Sequence Detection 1.91, 设置 PCR 反应条件, 第一个循环为 50 $^{\circ}$ C, 2 min; 95 $^{\circ}$ C, 10 min; 后 40 个循环为 94 $^{\circ}$ C, 15 s; 60 $^{\circ}$ C, 1 min, 点击运行。PCR 反应结束后保存文件, 打开分析软件进行分析。给出 ΔR_n 与循环数图像。

③以灭菌重蒸水作为模板进行空白对照实验。

1.4 计算方法

根据已知标准样品 ΔC_t 值与转基因含量的对数值(Log %GM)得出标准曲线及回归方程, 把未知样品 ΔC_t 值代入回归方程, 得到未知样品的转基因含量。

2 结果与分析

2.1 转基因玉米 Bt176 品系的定性 PCR 检测

SYBR Green 是一种结合于双链 DNA 小沟中的染料, 与双链 DNA 结合后, 其荧光信号大大增强。使用它的这个性质检测扩增产物非常理想。在 PCR 反应体系中, 加入过量 SYBR 荧光染料, SYBR 荧光染料特异性地掺入 DNA 双链后, 发射强荧光信号, 而不掺入链中的 SYBR 染料分子仅有微弱荧光信号背景, 从而保证荧光信号的增加与 PCR 产物的增加同步。图 1 是使用 SYBR Green I 荧光染料定性检测转基因玉米 Bt176 的扩增曲线, 其中曲线 A 和 B 为转基因阳性样品, 曲线 C、D、E 为非转基因样品, 曲线 F 为空白对照。结果显示, A 和 B 检测到很强的荧光信号, 而 C、D、E、F 只有微弱的本底信号, 表明 Bt176 样品中含有转基因成分。

图 1 是使用 SYBR Green I 荧光染料定性检测转基因玉米 Bt176 的扩增曲线, 其中曲线 A 和 B 为转基因阳性样品, 曲线 C、D、E 为非转基因样品, 曲线 F 为空白对照。结果显示, A 和 B 检测到很强的荧光信号, 而 C、D、E、F 只有微弱的本底信号, 表明 Bt176 样品中含有转基因成分。

2.2 转基因玉米 Bt176 品系的定量 PCR 检测

确认样品中含有转基因成分后, 接下来对其进行定量检测。本研究使用试剂盒对样品中转基因 Bt176 玉米 DNA 的初始模板量进行定量检测。对 Bt176 玉米含量分别为 0.1%、0.5%、2.0% 和 5.0% 的

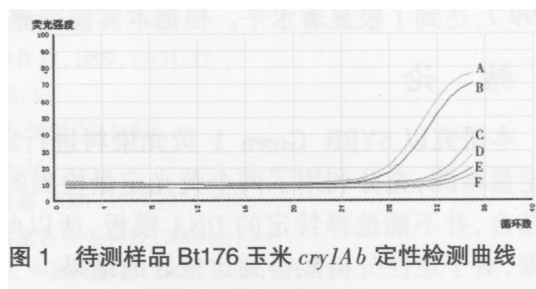


图 1 待测样品 Bt176 玉米 *cry1Ab* 定性检测曲线

标准样品和待测样进行 *cry1Ab* 和 *Zein* 实时荧光 PCR, 扩增曲线见图 2 和图 3。图 2 中 A 为待测样品的 3 次重复实验结果, B、C、D、E 分别为含 0.1%、0.5%、2.0%和 5.0% Bt176 的标准样品的 3 次重复实验结果, F 为空白对照。图 2 中 A、B、C、E 分别为含 5.0%、2.0%、0.5%和 0.1% Bt176 的标准样品的 3 次重复实验结果, D 为待测样品的 3 次重复实验结果, F 为空白对照曲线。具体数值见表 1。

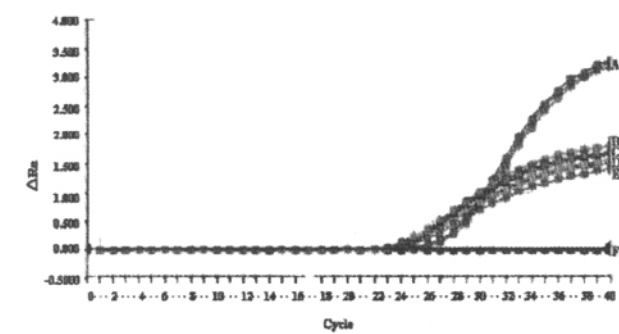


图2 Bt176 玉米内源基因 *Zein* 的实时 PCR 扩增曲线

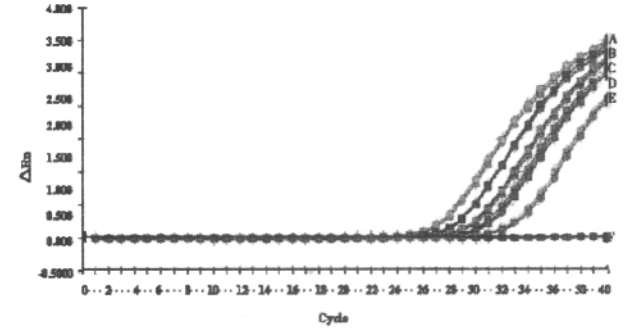


图3 Bt176 玉米外源基因 *cry1Ab* 的实时 PCR 扩增曲线

表 1 样品定量 PCR 的 Ct 值

Bt176 玉米标准物质(%)	外源基因 <i>cry1Ab</i>				内源基因 <i>Zein</i>			
	Ct				Ct			
	1	2	3	Ct	1	2	3	Ct
0.1	29.39	29.61	28.41	29.14	22.94	23.16	22.84	22.98
0.5	26.40	26.96	26.56	26.64	22.16	22.60	22.01	22.26
2.0	25.38	25.57	25.37	25.44	22.48	22.66	22.67	22.60
5.0	24.11	24.36	24.50	24.32	23.05	22.42	22.28	22.58
待测样品	27.73	28.06	28.17	27.99	25.19	23.86	24.76	24.60

从扩增曲线可以看出, 标准样品及待测样品的实时定量 PCR 检测重复性强, 内源基因的 Ct 值都比较接近, 误差极小。外源基因扩增曲线中不同含量样品曲线间呈现明显梯度, 转基因含量越高, 其 Ct 值越小, 平行样品重复性高。空白对照均无扩增。

根据标准样品的 ΔCt 平均值和转基因含量对数值(Log %GM)制作标准曲线, 如图4所示, 线性回归方程为 $y = -2.5914x + 3.5841$, 相关系数 R^2 为 0.9997, 达到了极显著水平。根据本实验待测样品的 ΔCt 平均值, 计算出待测样品的含量约为 1.19%。

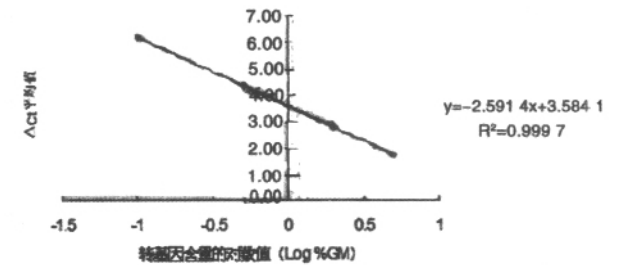


图4 转基因玉米 Bt176 标准样品定量检测的标准曲线

3 结 论

本研究以 SYBR Green I 荧光染料进行定性检测反映程序的准确性。以 TaqMan 探针进行实时荧光定量检测, 充分利用了两个荧光定量检测的优点。因 SYBR Green I 荧光染料能与所有的 DNA 双链相结合, 并不能选择特定的 DNA 模板, 所以此种方法的特异性不如 TaqMan 探针方法, 但本方法成本低廉, 对于定性分析能得到比较好的结果。

实时荧光 PCR 技术是 DNA 定量技术的一次飞跃, 它有效地解决了传统定量只能终点检测的局限, 实现了每一轮循环检测一次荧光信号的强度, 并记录在电脑软件中, 实现对整个过程的实时监测。其他的转基因产品检测方法, 均依赖于不同程度的 PCR 后处理, 容易因污染而产生假阳性。此外, 凝胶电泳染色剂溴化乙啶(EB)为强致癌物质, 若操作不当, 会危害试验人员的健康。而 TaqMan 等荧光检测方法整个过程采用闭管检测, 无需 PCR 后处理, 避免了交叉污染和假阳性, 也不会对操作人员的健康产生不良影响。

因此, 利用实时定量荧光 PCR 技术检测转基因植物及产品是一种快速、灵敏、可靠的检测手段。

参考文献:

- [1] Huang J, Rozelle S, Pray C, et al. 2002. Plant biotechnology in China. Science, 295: 674~677 .
- [2] 樊龙江, 周雪平 . 转基因作物安全性争论与事实[M] . 北京: 中国农业出版社, 2001 .
- [3] Kraus G, Cleary T, Miller NS, et al. Rapid and specific detection of the Mycobacterium tuberculosis complex using fluorogenic probes and real-time PCR. Mol Cell Probes, 2001, 15(6): 375- 383 .
- [4] 覃文, 曹际娟, 朱永芳 . 加工产品中转基因玉米 B+11 成分实时荧光 PCR 定量(性)检测[J] . 生物技术通报, 2003(6): 45- 50
- [5] 曹际娟, 朱永芳, 曹远银 . GA21 转基因玉米实时荧光 PCR 检测方法的建立[J] . 中国生物工程杂志, 2003, 23(8): 87- 91 .
- [6] 朱永芳 . 实时荧光聚合酶链式反应(PCR)检测技术[M] . 北京: 中国计量出版社, 2003 .
- [7] Christian A Heid and Junko Stevens. Real Time Quantitative PCR. Genome Research, 1996, 6: 986- 994 .
- [8] Ursula E M Gibson and Christian A Heid. A Novel Method for Real Time Quantitative RT- PCR. Genome Research, 1996, 6: 995- 1001
- [9] 马荣群, 陈红运, 黄文胜, 等 . 实时定量 PCR 方法检测转基因产品[J] . 植物检疫, 2002, 16(1): 61- 64 .
- [10] 朱文斯, 朱永芳, 黄茜华, 等 . 实时荧光 PCR 技术在快速检测植物及加工产品中转基因成分中的应用[J] . 中国医药导刊, 2003, 1 (5): 31- 34 .

Quantitative Detection of the Genetically Modified Bt176 Maize Using Real- time Fluorescent PCR Method

LI Cong- cong¹, WANG Qing- shan², LI Fei- wu¹, et al.

- (1. Bio- Tech Research Center, Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, Changchun 130124;
2. China Academy of Agricultural Sciences of Tropical Crops)

Abstract: The PCR primer and TaqMan fluorescence probe was designed according to the sequences of endogenous Zein gene and exogenous cryIAb gene, and a real- time fluorescent PCR method was performed for detection of the genetically modified Bt176 maize strains. The results showed that the real- time fluorescent PCR method was more convenient and quickly, less contamination than common PCR. The new method for detection of genetically modified organism was established.

Keywords: Real- time PCR; Bt176 maize; TaqMan fluorescence probe

=====

(上接第 19 页)

参考文献:

- [1] 孙慧生 . 马铃薯生产技术百问百答[M] . 北京: 中国农业出版社, 2006 .
- [2] 吴国林 . 黑龙江省马铃薯高产栽培技术[J] . 黑龙江农业科学, 2005(4): 51- 54 .
- [3] 魏延安 . 陕西百万亩马铃薯三项高产栽培技术[J] . 作物杂志, 2001(1): 21- 23 .
- [4] 刘海亮, 苗文明 . 地膜马铃薯栽培技术[J] . 内蒙古农业科技, 1999(12): 6 .
- [5] 姚学竹 . 地膜马铃薯套种玉米高产栽培技术要点[J] . 甘肃农业科技, 2000(1): 44 .
- [6] 徐兆林, 张晓惠 . 马铃薯复种大豆高产栽培技术[J] . 国外农学 - 杂粮作物, 1999, 19(3): 37 .
- [7] 刘传珍 . 马铃薯 - 鲜食玉米 - 大白菜栽培技术[J] . 北京农业, 2006(3): 5 .
- [8] 陈耀福, 黎保存 . 马铃薯免耕稻草覆盖栽培试验研究[J] . 广西农学报, 2005(1): 1- 5 .
- [9] 李后波 . 稻草覆盖栽培马铃薯烂种原因与防治[J] . 长江蔬菜 2006(5): 14 .
- [10] 张永成, 纳添仓, 阮建平, 等 . 马铃薯高产施肥措施研究[J] . 中国马铃薯, 2001, 15(5): 274- 277 .
- [11] 段玉, 王砚田, 刘富俊, 等 . 马铃薯吸肥特点及平衡施肥研究[J] . 内蒙古农业科技, 2003(6): 5- 6 .
- [12] 张宝林, 高聚林, 刘克礼, 等 . 马铃薯氮素的吸收、积累和分配规律[J] . 中国马铃薯, 2003, 17(4): 191- 198 .
- [13] 王海泉, 朱继强, 汪建学, 等 . 微量元素与植物生长调节剂配合对马铃薯生理指标及产量的影响[J] . 黑龙江农业科学, 2005(5): 19- 20 .
- [14] 于洪涛 . 壮而丰应用于马铃薯增产效果的研究[J] . 中国马铃薯, 2003, 17(2): 88- 89 .
- [15] 杨祁峰 . 稀土肥料对马铃薯增产效果的对比试验[J] . 中国马铃薯, 2005, 19(6): 354- 356 .
- [16] 程天庆 . 马铃薯栽培技术[M] . 北京: 金盾出版社, 2004 .
- [17] 吴炳芝, 段文学, 孙颜民 . 马铃薯晚疫病防治方法的研究[J] . 植物保护, 2000, 26(3): 31- 32 .
- [18] 杨孝楫, 黄鹏祥, 史文卫, 等 . 马铃薯晚疫病的农业防治[J] . 中国种业, 2001(4): 22 .
- [19] 周后江 . 毕节市马铃薯病虫害综合防治技术[J] . 植物医生, 2006, 19(1): 38- 39 .