

李 会,任志莹,王 颖,等. 多重 PCR 法快速检测转基因玉米多种转化体技术优势的比较分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(5):57-59.

多重 PCR 法快速检测转基因玉米多种转化体技术优势的比较分析

李 会,任志莹,王 颖,王建忠

(辽宁省农业科学院开放实验室,辽宁沈阳 110000)

摘要:以常见的转基因玉米 Bt176、MON810、MON863、NK603 这 4 种转化体为检测对象,通过对其中 MON810 引物的重新设计和评价,建立并完善了转基因玉米四重转化体的 PCR 检测体系。结果表明,建立的四重 PCR 体系能有效检测出转基因玉米 4 种转化体,与单一 PCR 检测技术相比,检测耗时缩短 63%,成本降低 75%,检测产生的废液减少 75%,说明该方法具有简便、快速、低成本、低污染等优势,适用于转基因玉米多种转化的大规模系统性检测。

关键词:多重 PCR;快速检测;转化体;技术优势

中图分类号: TS201.1;S513.01

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2014)05-0057-03

玉米是我国重要的粮食作物和饲料来源,是全世界总产量最高的粮食作物。2013—2014 年,由于玉米种植面积的增加,中国玉米产量将会增加 300 万~400 万 t,玉米需求量增加 800 万~1 700 万 t,其中饲料用量增加 600 万~1 200 万 t。从当前来看,国内玉米生产增长的速度跟不上需求增长的速度,为了满足需求,2013—2014 年中国将进口 600 万~700 万 t 玉米,并将储备量下调 400 万~500 万 t,而 2012 年中国的玉米进口量占全球玉米贸易的 5%^[1],进口的主要为美国和巴西的转基因玉米。

多重 PCR(multiplex PCR)又称多重引物 PCR 或复合 PCR,它是在同一个 PCR 反应体系中加入 2 对及以上特异性引物,针对多个 DNA 模板或同一模板的不同区域同时扩增出多个目的片段的 PCR 技术^[2],也是当前基因组检测方法的一种。由于多重 PCR 试验设计较单一 PCR 要复杂得多,技术难度大,因而在建立多重 PCR 反应体系时,必须对其中的主要成分和反应条件进行繁琐的优化^[3-4]。

玉米转基因检测所采用的方法是针对通用元件进行检测,其特异性较差,许多委托单位更趋向于特异性最高的转基因玉米转化体的检测。按照农业部有关标准或通告要求,目前对转基因玉米 Bt176、MON810、MON863、NK603 等的转化体检测方法均为单一 PCR 方法,通常采用的方法参考农业部 869 号公告-8-2007、农业部 869 号公告-9-2007、农业部 869 号公告-10-2007、农业部 869 号公告-13-2007。本研究针对单一 PCR 方法成本高、所用时间长和检测产生的废液多等弊端,利用转基因玉米的 4 种转化体作为研究材料,摸索优化转基因玉米转化体的多重 PCR 体系和扩增条件,可以快速准确地对样品进行检测,缩短检测时间,减少废液产生和试

剂的使用,降低成本,也为其他作物品种转基因转化体的多重 PCR 检测方法的推广使用打下基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

转基因玉米 Bt176、MON810、MON863、NK603,购自艾吉析科技(北京)有限公司;非转基因玉米辽单 565 由辽宁省农业科学院开放实验室保存。

1.2 使用试剂

DNA 提取试剂盒 DP305 购自天根生化科技有限公司;Taq 聚合酶、dNTPs、10 × PCR buffer(含 Mg^{2+})、DL2000 DNA Marker、6 × Loading Buffer 购自大连宝生物工程有限公司;其他试剂及耗材购自鼎国昌盛生物技术有限公司。

1.3 主要仪器

德国 Eppendorf 公司生产的 5424 型高速离心机;美国 Thermo 公司生产的 NANODROP 2000 型 DNA 定量仪;C1000 型梯度 PCR 仪、GelDoc XR+凝胶成像仪由美国 Bio-Rad 公司生产。

1.4 试验方法

1.4.1 DNA 提取 采用试剂盒法,使用天根 DP305 试剂盒提取转基因玉米 4 种转化体 Bt176、MON810、MON863、NK603 及非转基因玉米的基因组 DNA^[5],经检测后,对 DNA 进行稀释,使其浓度为 25 ng/μL,备用。

1.4.2 引物设计 各农业部公告中对应转基因玉米 4 种转化体的单一 PCR 引物设计见表 1。针对多重 PCR 检测试验的特点、原则和要求,对引物大小差未超过 30 bp 的,借助软件进行重新设计,利用 Oligo V6.22 对设计引物进行评估,筛选出引物之间相互干扰最小的引物组合,保证 PCR 产物片段大小在 200 bp 以内时间间隔大于 30 bp。因此,针对 MON810,利用 Primer 5.0 软件进行引物设计并借助 Oligo V6.22 软件进行引物评价,具体的引物序列见表 2,由大连宝生物工程有限公司合成。

1.4.3 4 种转化体的单一 PCR 扩增 分别以转基因玉米 Bt176、MON810、MON863、NK603 这 4 种转化体 DNA 为模板,

收稿日期:2014-01-10

基金项目:辽宁省科技攻关项目(编号:2011215004)。

作者简介:李 会(1976—),女,辽宁沈阳人,硕士,助理研究员,主要从事转基因产品成分检测研究。Tel:(024)31021049;E-mail:hui760@yahoo.com.cn。

通信作者:王建忠,硕士,研究员,主要从事农产品质量安全检测研究。Tel:(024)31023348;E-mail:wjz721125@sina.com。

表 1 各转化体单一 PCR 引物序列及扩增片段

扩增基因	引物名称	引物序列	目的片段长度 (bp)
<i>BtI76</i>	<i>BtI76</i> - F	5' - AAGCACGGTCAACTTCCGTAC - 3'	570
	<i>BtI76</i> - R	5' - TCGACTTTATAGGAAGGGAGAGC - 3'	570
<i>MON810</i>	<i>MON810</i> - F	5' - CAAGTGTGCCACACACAGC - 3'	106
	<i>MON810</i> - R	5' - GCAAGCAAATTGCGAAATGAA - 3'	106
<i>MON863</i>	<i>MON863</i> - F	5' - GCACTCAAAGACCTGGCGAATGA - 3'	411
	<i>MON863</i> - R	5' - CCATCTTTGGGACCACTGTTCG - 3'	411
<i>NK603</i>	<i>NK603</i> - F	5' - ATGAATGACCTCGAGTAATCTTGTAA - 3'	108
	<i>NK603</i> - R	5' - AAGAGATAACAGGATCCACTCAAACACT - 3'	108

表 2 引物序列及扩增片段

扩增基因	引物名称	引物序列	目的片段长度 (bp)
<i>MON810</i>	35S - F	5' - TCGAAGGACGAAGGACTCTAACG - 3'	170
	35S - R	5' - TCCATCTTTGGGACCACTGTTCG - 3'	170

根据对应的农业部公告的具体要求,配好对应的反应体系,按照不同的反应程序进行 PCR 扩增,具体要求见表 3。反应结束后在 PCR 产物中加入 6 × loading buffer 5 μL 混匀后,取

10 μL 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,待指示剂迁移至凝胶中部时,将凝胶取出,在凝胶成像仪中观察结果。

表 3 各农业部公告中使用的转化体的 PCR 方法

转化体	使用标准	扩增条件
<i>BtI76</i>	农业部 869 号公告 - 8 - 2007	94 ℃ 变性 30s, 58 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 40 s
<i>MON810</i>	农业部 869 号公告 - 9 - 2007	94 ℃ 变性 30s, 56 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s
<i>MON863</i>	农业部 869 号公告 - 10 - 2007	94 ℃ 变性 30s, 58 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s
<i>NK603</i>	农业部 869 号公告 - 13 - 2007	94 ℃ 变性 30s, 58 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s

1.4.4 4 种转化体的多重 PCR 扩增 以转基因玉米 *BtI76*、*MON810*、*MON863*、*NK603* 这 4 种转化体 DNA 为模板,转化体 *BtI76*、*MON863*、*NK603* 引物按照表 1 设计,转化体 *MON810* 引物按照表 2 设计,对 4 种转化体采取同一反应体系和同一反应条件进行多重 PCR 扩增。确定的具体反应体系为: 10 × PCR buffer 2.5 μL, dNTP mixture(含 Mg²⁺) 4 μL, 上下游引物转化体 *BtI76* 和 *MON863* 为 1 μL (终浓度各 0.4 μmol/L), 转化体 *MON810* 和 *NK603* 的引物为 0.5 μL (终浓度各 0.2 μmol/L), 模板 DNA 各 2 μL, *Taq* 聚合酶 0.5 μL, 用 ddH₂O 将体积调整为 25 μL。PCR 反应条件为: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 60 s, 60 ℃ 退火 90 s, 72 ℃ 延伸 90 s, 进行 35 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。反应结束后在 PCR 产物中加入 6 × loading buffer 5 μL 混匀后,取 10 μL 进行 4% 琼脂糖凝胶电泳,待指示剂迁移至凝胶中部时,将凝胶取出,在凝胶成像仪中观察结果。

2 结果与分析

2.1 DNA 模板

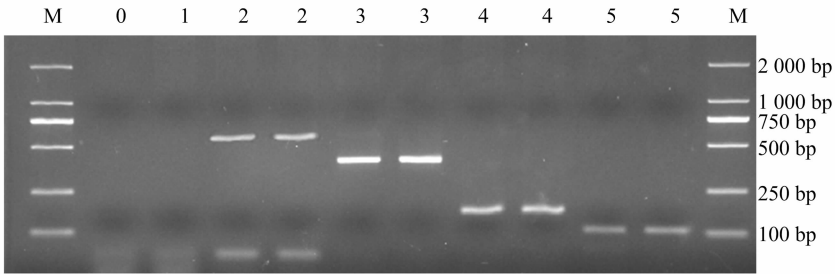
经 DNA 定量仪检测,所提取的样品基因组 DNA 浓度分别为 92.3、76.5、86.9、56.7 ng/μL, *D*_{260 nm}/*D*_{280 nm} 的比值分别为 1.82、1.86、1.85、1.83,符合要求(在 1.7 ~ 1.9 之间)。

2.2 4 种转化体的单一 PCR 扩增结果

4 种转化体的 PCR 扩增结果见图 1。从结果来看,转化体 *MON810* 和 *NK603* 按照农业部公告中所给出的引物设计,因其大小相近,2 条谱带非常接近;要进行 4 种转化体的多重 PCR 检测,必须对其中的某一转化体的引物进行重新设计,以满足 PCR 产物片段大小在 200 bp 以内时间隔大于 30 bp、500 bp 以上时间隔大于 70 bp 的原则。

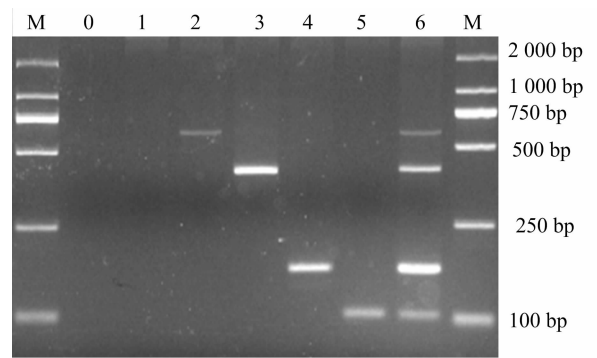
2.3 4 种转化体的多重 PCR 扩增结果

4 种转化体的多重 PCR 扩增结果见图 2。通过对



M—DL2000; 0~5—水、阴性玉米、*BtI76*玉米、*MON863*玉米、*MON810*玉米、*NK603*玉米

图1 4种转化体的单一PCR扩增结果



M—DL2000; 0—6—水、阴性玉米、*Bt176*玉米、*MON863*玉米、*MON810*玉米、*NK603*玉米、多重PCR结果

图2 4种转化体的多重PCR扩增结果

表 4 4 种转化体单一 PCR 及四重 PCR 检测情况比较

检测方法	扩增基因	检测依据	耗时 (min)	成本 (元)	产生废液量 (mL)
单一 PCR	<i>Bt176</i>	农业部 869 号公告 - 8 - 2007	120	30	0.3
	<i>MON810</i>	农业部 869 号公告 - 9 - 2007	120	30	0.3
	<i>MON863</i>	农业部 869 号公告 - 10 - 2007	120	30	0.3
	<i>NK603</i>	农业部 869 号公告 - 13 - 2007	120	30	0.3
	合计		480	120	1.2
多重 PCR	<i>Bt176</i> 、 <i>MON810</i> 、 <i>MON863</i> 、 <i>NK603</i>	优化确定的检测条件及方法	180	30	0.3

3 结论与讨论

DNA 提取采取的是试剂盒的方法,在提取时还发现,使用试剂盒的植物干粉提取法比植物组织法所提取的样品基因组 DNA 纯度更高,浓度增加,提取效果更好。

在多重 PCR 反应中,引物的设计至关重要,它是影响 PCR 反应成败的关键^[6-7],除按照 PCR 引物设计通用准则外,还要具备与目的基因高特异性及引物间无同源性的特点,这样才能保证无错配合引物二聚体的出现^[8]。在研究多重 PCR 选取引物时,各引物之间还遵循 PCR 产物片段大小在 200 bp 以内时间间隔大于 30 bp,500 bp 以上时间间隔大于 70 bp 的原则^[9],因此依靠 Primer 5.0 和 OligoV6.22 软件对 *MON810* 的引物重新进行设计和评价。

在对 4 种转化体进行多重 PCR 反应体系和反应条件的摸索过程中,结合农业部公告中单一 PCR 的相关要求,调整各转化体所对应引物浓度、DNA 模板浓度、 Mg^{2+} 浓度和退火温度等条件,在保证谱带清晰的基础上避免了引物二聚体的出现。

在转基因玉米 4 种转化体的检测过程中,所采取的多重 PCR 检测技术比按照标准或公告进行的单一 PCR 检测技术时间缩短 63%,成本降低 75%,所产生的废液减少 75%,因此,利用多重 PCR 检测技术对转基因玉米进行检测有着效率高、成本低、速度快污染小等优点。

MON810 转化体的引物重新设计,同时优化多重 PCR 反应体系和反应条件,4 种转基因玉米的转化体完全能够在同一反应体系和相同反应条件下进行检测,所建立的多重 PCR 方法简单、快速、特异性较高,可作为转基因玉米安全监管中成分检测的科学依据。

2.4 4 种转化体的单一 PCR 和多重 PCR 检测情况比较

从表 4 中可以看出,在转基因玉米的筛选检测过程中,从检测耗时、所用成本和产生废液的角度来比较,单一 PCR 的耗时为 480 min,而多重 PCR 的耗时仅为 180 min;单一 PCR 所花费的成本也较高,达 120 元/样品,而多重 PCR 仅为 30 元/样品;单一 PCR 所产生的废液也较多,是多重 PCR 的 4 倍。

参考文献:

[1] Lohmar B. 中国玉米供需矛盾加剧进口将有更多选择[J]. 中国猪业,2013(6):13-14.

[2] 武文艳,易红梅,王风格,等. 玉米 SSR 分子标记的荧光多重 PCR 体系的构建及优化[J]. 作物杂志,2012(5):59-60.

[3] Liu Zh B, Gan Q R, Wang R X, et al. Application of multiplex PCR to studies on plant biology[J]. Molecular Plant Breeding, 2005, 3(2): 261-268.

[4] 黄银花,胡晓湘,徐慰倬,等. 影响多重 PCR 扩增效果的因素[J]. 遗传,2003,25(1):65-68.

[5] 李会,任志莹,王颖,等. 不同 DNA 提取试剂盒提取作物种子基因组 DNA 效果的比较[J]. 湖北农业科学,2013,52(8): 1956-1958.

[6] 郭容利,何孔旺,倪艳秀,等. PEDV、TGEV、PARV 多重 RT-PCR 检测方法的建立及其应用[J]. 江苏农业学报,2013,29(5): 1065-1069.

[7] 曹洪志,颜其贵,郭万柱,等. 多重 PCR 技术在动物疫病诊断中的应用[J]. 中国动物检疫,2007,24(1):45-47.

[8] 张耀川,许亮,张洁,等. 利用多重 PCR 方法检测 7 种转基因卡诺拉油菜品种(系)研究[J]. 粮食与油脂,2012(9): 30-32.

[9] 陈贞. 转基因作物的多重 PCR 检测体系的研究[D]. 广州:暨南大学,2011.