

张文志, 鲁 绯, 闫 红. 酱油中抗草甘膦大豆转基因多种成分的检测: 实时荧光定量 PCR 和传统 PCR 的比较[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(6): 372–376. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.110

酱油中抗草甘膦大豆转基因多种成分的检测: 实时荧光定量 PCR 和传统 PCR 的比较

张文志, 鲁 绯, 闫 红

(北京工业大学生命科学与生物工程学院, 北京 100124)

摘要:采用基于 SYBR Green 探针的实时荧光定量 PCR 方法和传统 PCR 方法对酱油中的大豆转基因靶基因 CaMv35S 启动子、NOS 终止子、EPSPS、18S 进行了高通量检测, 同时检测了内源参照 *Lectin* 基因。研究发现, 酱油样品中同时存在 CaMv35S、NOS、18S 靶基因, 而不存在靶基因 EPSPS, 表明转基因成分 EPSPS 在食品加工过程中已被降解; 熔解曲线分析表明, 实时荧光 PCR 对转基因的检测获得了很好的特异性, 与传统 PCR 相比, 具有快速、高通量、高选择性、高灵敏度的优势。本研究建立的对酱油中多种抗草甘膦大豆转基因成分的快速、高通量、高灵敏的定量检测方法将在转基因食品的检测领域具有很大的应用前景。

关键词:PCR RT-PCR; 检测

中图分类号:TS264.2⁺1

文献标志码:A

文章编号:1002-1302(2016)06-0372-05

大豆已经成为人们生活中不可或缺的食物及食品原料, 在我国用途非常广泛, 消费市场上大豆制品种类繁多。我国是大豆进口大国, 根据资料统计, 从开放大豆进口以来, 我国每年大豆进口量逐年增加, 到 2014 年我国大豆进口量已超过 7 000 万 t, 且进口大豆中有超过 90% 为转基因大豆^[1-2]。

我国对于转基因食品的监管工作非常重视。2001 年, 国务院颁布了《农业转基因生物安全管理条例》, 对大豆、玉米等国内流通的转基因产品, 规定了统一的标志制度, 即确定了食品中转基因成分的最低限值标准^[3]。然而, 在转基因食品饱受争议的今天, 我国的转基因产品监控技术体系依然缺乏。较为落后的检测设备和相关技术, 使得安全评价及审批许可制度缺乏技术保障^[4], 严重制约了我国对于转基因产品的安全监管, 也严重妨碍了广大消费者对转基因食品安全性的深入了解^[5]。因此, 建立可靠、准确、快速、高通量的食品转基因成分检测方法迫在眉睫。

传统的转基因成分检测方法主要分为 2 类: 酶联免疫法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)^[6] 和聚合酶链式反应法 (polymerase chain reaction, PCR)^[7]。分别以蛋白质和核酸为检测对象。ELISA 目前已有商业化试剂盒, 它通过间接地检测转基因成分表达出的蛋白来推测转基因成分, 虽然其具备很好的选择性, 但缺乏定量准确性, 且价格较为昂贵, 样品前处理复杂。传统的 PCR 方法直接以提取的基因片段为检测对象, 灵敏度好, 但定量能力较差, 且非目标片段容易引起信号的假阳性和假阴性。在传统 PCR 原理的基础上, 巢式 PCR^[8]、多重 PCR^[9] 等方法也发展起来, 其选择性和准确性得到很大提高, 但仍然是半定量的方法。

实时荧光定量 PCR^[10] 是一种可以特异性靶标样品中的目标 DNA 片段, 并输出该目标 DNA 定量信息新方法, 相对于上述方法, 这种方法的定量信息更准确, 方法更加灵敏, 因此在大豆转基因制品的检测上得到广泛应用^[11-13]。SYBR Green 是一种常用的结合双链 DNA 的染料, 本身在激发光下只发出微弱的荧光, 结合双链 DNA 后, 荧光增强 1 000 倍, 因此常用来对双链 DNA 进行定量分析^[14]。本研究建立了基于 SYBR Green 染料的实时荧光定量 PCR, 用于高通量分析多种酱油中的大豆转基因成分, 希望为转基因生物标志的监管体系提供更可靠的技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要材料 试验所用含抗草甘膦转基因大豆成分的酱油由北京市食品及酿酒产品质量监督检验一站提供。

1.1.2 主要试剂 无水乙醇, 异丙醇, 70% 乙醇 (均为分析纯)。深加工产品 DNA 提取试剂盒 DP326 (天根生化科技有限公司, 其中包括 GMO1、GMO2、Proteinase K、TE 缓冲液); Carrier RNA (天根生化科技有限公司)。0.1 mol/L Tris-Cl (pH 值 8.0); 乙酸; EDTA-Na₂; ABI 荧光染料; 2 × PCR Reagent (天根生化科技有限公司); 琼脂糖。

1.1.3 主要仪器 BIO-RAD CF × 96 荧光 PCR 仪; METTLER TOLEDO 电子天平 (十万分之一, 瑞士梅特勒公司); Eppendorf 移液枪 (1 000、100、10、2.5 μL); 湘仪 TG16-WS 台式高速离心机; 恒温水浴锅 (恒发); 涡旋振荡器; 磁力搅拌器; BIO-RAD MJ Mini PCR 仪。

1.2 试验方法

1.2.1 凝胶缓冲液及凝胶的制备 凝胶缓冲液: 50 × TAE 溶液: 取 Tris-HCl 242 g, 乙酸 57.1 mL, EDTA-Na₂ 37.2 g 加蒸馏水溶解后定容到 1 000 mL。

凝胶: 取 1.5 g 琼脂糖加入到三角瓶中, 加入 100 mL 稀

收稿日期: 2015-05-12

作者简介: 张文志 (1990—), 男, 硕士研究生, 研究方向为化学生物学分析。E-mail: 170850483@qq.com。

通信作者: 鲁 绯, 博士, 研究员。E-mail: lufeilufei515@sina.com。

释 50 倍的 50 × TAE 缓冲液,加热,充分溶解。进行琼脂糖凝胶电泳之前,将凝胶加热熔解后使用。

1.2.2 DNA 的提取 采用试剂盒法,按照深加工产品 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司)说明步骤操作。

1.2.2.1 酱油样品预处理 取酱油 30 mL,加入 60 mL 无水乙醇混匀,置冰箱(−20 ℃)放置 10 min 后,10 000 r/min 离心 10 min。弃上清。在沉淀中加入 30 mL 0.1 mol/L Tris-Cl (pH 值 8.0)溶液,用力摇匀,全部转移到 100 mL 烧杯中,于磁力搅拌器上搅拌 2 h。分装至 1.5 mL 离心管中,12 000 r/min 离心 10 min。弃上清。沉淀中焦糖色素及盐等小分子已全部去除,可用于 DNA 提取(注:弃上清之后要将分装后所有沉淀取到 1 个 1.5 mL 离心管中,用于后续 DNA 的提取)。

表 1 PCR 引物

目标基因	引物碱基序列(5′→3′)
<i>Lectin</i>	F:CCTCCTCGGAAAGTTACAA;R:GGGCATAGAAGGTGAAGT
<i>CaMv35S</i>	F:TCATCCCTTACGTCAGTGGAG;R:CCATCATTGCGATAAAGGAAA
<i>NOS</i>	F:GAATCCTGTTGCCGGCTTGT;R:CGCTATATTTTGTCTTCTATCGCGT
<i>EPSPS</i>	F:CGACATCGAAGAAGTCATCAACC;R:TTCTTCCAGACCGTTCATCA
18S	来自全式金公司

1.2.4 PCR 反应体系和反应条件

1.2.4.1 普通 PCR 反应体系和反应条件 在 96 孔板上同时分别对酱油 DNA 提取液中凝集素(*Lectin*)基因、*CaMv35S* 启动子、*NOS* 终止子、18S 基因和 *EPSPS* 外源基因进行 PCR 扩增,另外,对 *Lectin* 基因、*CaMv35S* 启动子、*NOS* 终止子、18S 基因标准样品以同样条件进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 25 μL。其中含 2 × PCR Reagent 12.5 μL;上、下游引物分别 0.5 μL;模板 DNA 4 μL,用灭菌双蒸水定容至 25 μL。阴性对照不含样品。

PCR 扩增条件:退火 94 ℃ 3 min;退火及延伸 94 ℃ 30 s, 60 ℃ 30 s,70 ℃ 1 min,37 个循环;循环结束后 70 ℃ 5 min。

1.2.4.2 RT-PCR 反应体系和反应条件 在 96 孔板上同时分别对酱油 DNA 提取液中 *Lectin* 基因、*CaMv35S* 启动子、*NOS* 终止子、18S 基因和 *EPSPS* 外源基因进行实时荧光定量 PCR 扩增。PCR 反应体系为 25 μL。其中含 2 × PCR Reagent 12.5 μL;上、下游引物各 0.5 μL;模板 DNA 4 μL,用灭菌双蒸水定容至 25 μL。阴性对照不含样品。

RT-PCR 扩增条件:退火 94 ℃ 30 s;退火及延伸 94 ℃ 5 s,60 ℃ 80 s,40 个循环。循环结束后开始熔解阶段,温度从 65 ℃ 升至 95 ℃,每升高 0.5 ℃ 仪器自动收集荧光信号。

按照以上反应条件和反应体系进行 PCR 和 RT-PCR 反应,普通 PCR 反应结束后,取 5 μL 反应产物与 1 μL loading buffer 混匀,加入到进样孔中在 180 V/0.1 A 下进行凝胶电泳,38 min 后取出凝胶,在凝胶成像系统下观察结果。

2 结果与分析

2.1 基因组的提取结果

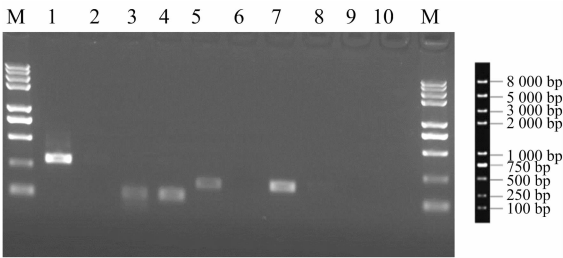
要成功进行 PCR 扩增,首先需保证 DNA 样品的纯度。经分光光度计测量,试剂盒提取的样品 DNA 的浓度为 100 ~ 500 ng/μL,DNA 纯度较好,适合进行 PCR 扩增。

2.2 酱油中转基因成分定性 PCR 和凝胶电泳分析

1.2.2.2 DNA 提取 取上述预处理所得样品,加 500 μL 缓冲液 GMO1 和 20 μL Proteinase K(20 g/mL),涡旋振荡 1 min。56 ℃ 孵育 1 h,孵育过程中每 15 min 振荡 1 次。加入 200 μL 缓冲液 GMO2,充分混匀,涡旋振荡 1 min,室温静置 10 min。12 000 r/min 离心 5 min,将上清液转移至新的离心管中。向上清液中加入 1 μL Carrier RNA,再加入 0.7 倍体积的异丙醇,充分混匀。12 000 r/min 离心 3 min,弃上清,保留沉淀。加入 700 μL 70% 乙醇,涡旋振荡 5 s,12 000 r/min 离心 2 min,弃上清。重复 2 次。开盖倒置,室温 5 ~ 10 min,彻底晾干残余的乙醇。加入 20 ~ 50 μL 洗脱缓冲液 TE,涡旋振荡 1 min,最终得到 DNA 缓冲液。

1.2.3 PCR 引物设计 引物参照王媛等的设计^[15],由三博远志公司合成(表 1)。

Lectin 基因作为内源性的大豆看家基因,在大豆细胞中基因组的表达量基本恒定,很少受外部环境影响,因此,本研究选取了 *Lectin* 基因作为内部参照^[16],考察 *Lectin* 基因的扩增,也可以判断提取的 DNA 的量和纯度是否合适进行 PCR 分析,排除假阴性结果的存在。根据图 1 的 3、4 条带可以看出,酱油中提取的 DNA 中含有足够的 *Lectin* 基因用于 PCR 扩增,扩增效果良好。扩增产物约 100 bp。然而 *Lectin* 的阴性对照组出现模糊的亮带,可能来自于外部基因污染。



M—Trans2K Plus II DNA marker; 1—18S; 2—18S阴性对照; 3—*Lectin*阴性对照; 4—*Lectin*; 5—*CaMv35S*; 6—*CaMv35S*阴性对照; 7—*NOS*; 8—*NOS*阴性对照; 9—*EPSPS*; 10—*EPSPS*阴性对照

图 1 酱油中提取的不同基因成分定性 PCR 扩增结果

此外,由图 1 可以看出,在酱油所提取的 DNA 的 PCR 扩增结果中,抗草甘膦转基因大豆中的调控元件 *CaMv35S* 启动子、*NOS* 终止子和 18S 基因均得到明显的扩增产物,其对照组均为阴性。而外源基因 *EPSPS* 没有扩增产物。结果表示酱油样品中的转基因成分含有 *CaMv35s* 启动子、*Nos* 终止子和 18S 基因,而抗草甘膦基因中的 *EPSPS* 成分可能已被降解。

各种基因标准样品 PCR 扩增后的结果与图 1 的条带结果一致,进一步证明了在酱油基因组提取中,无需进一步分离就能够得到纯度较高的转基因成分进行 PCR 扩增分析,其结果较为准确(图 2)。值得特别注意的是,之前 *Lectin* 基因阴性对照中的条带已经基本消失不见,进一步证明在图 1 的试

验中,PCR 反应或凝胶电泳过程中对 *Lectin* 基因阴性对照组造成了外部污染。同时,图2 - B中的NOS阴性对照中出现

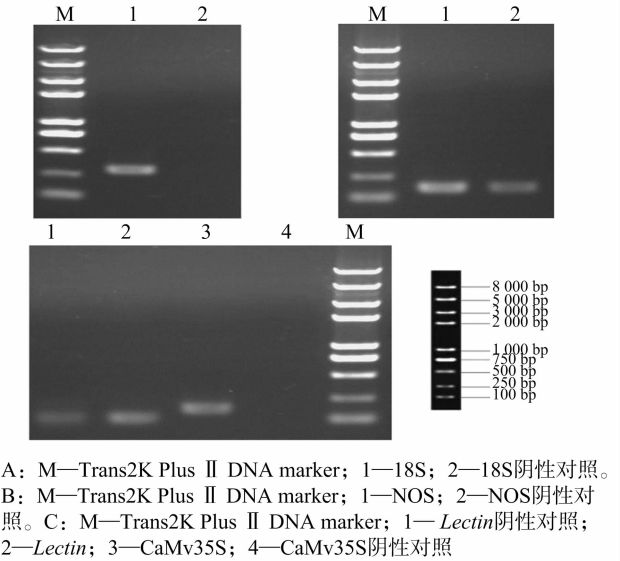


图2 不同基因标准样品定性 PCR 扩增结果

了模糊的亮带,而图 1 中 NOS 阴性对照组并未出现条带。这个现象也进一步说明了阴性对照存在着假阳性外部污染。

2.3 实时荧光定量 PCR 扩增结果分析

目前,定性 PCR 和凝胶电泳分析仅能够对酱油中的转基因成分完成初步的定性和筛选,实验发现其结果容易因外部污染造成假阳性,因此准确性较差。而实时荧光定量 PCR 可对酱油样品中提取出的转基因成分进行进一步定性确认和定量标定。

实时荧光定量 PCR 对酱油样品 DNA 提取物中的 *Lectin* 基因、CaMv35S 启动子、NOS 终止子、18S 基因、*EPSPS* 外源基因进行了研究(图 3)。上述前 4 种基因都存在扩增产物, *EPSPS* 外源基因不存在扩增产物,根据软件分析结果,其中 *Lectin*、CaMv35S、NOS、18S、*EPSPS* 的 CT 平均值分别为 33.46、33.15、30.16、35.45、0.00,该结果与定性 PCR 结果一致。同时所有 5 组阴性对照试验均没有扩增产物,进一步证明了试验结果的准确性,与定性 PCR 相比,避免了外部污染引起的假阳性。因为该酱油样品来源于抗草甘膦转基因大豆,而 *EPSPS* 基因是抗草甘膦基因的重要序列。因此,该检测结果也准确地说明了 *EPSPS* 基因在食品中存在着降解和损耗。

为验证该方法的重现性和准确性,开展了 4 次实时荧光

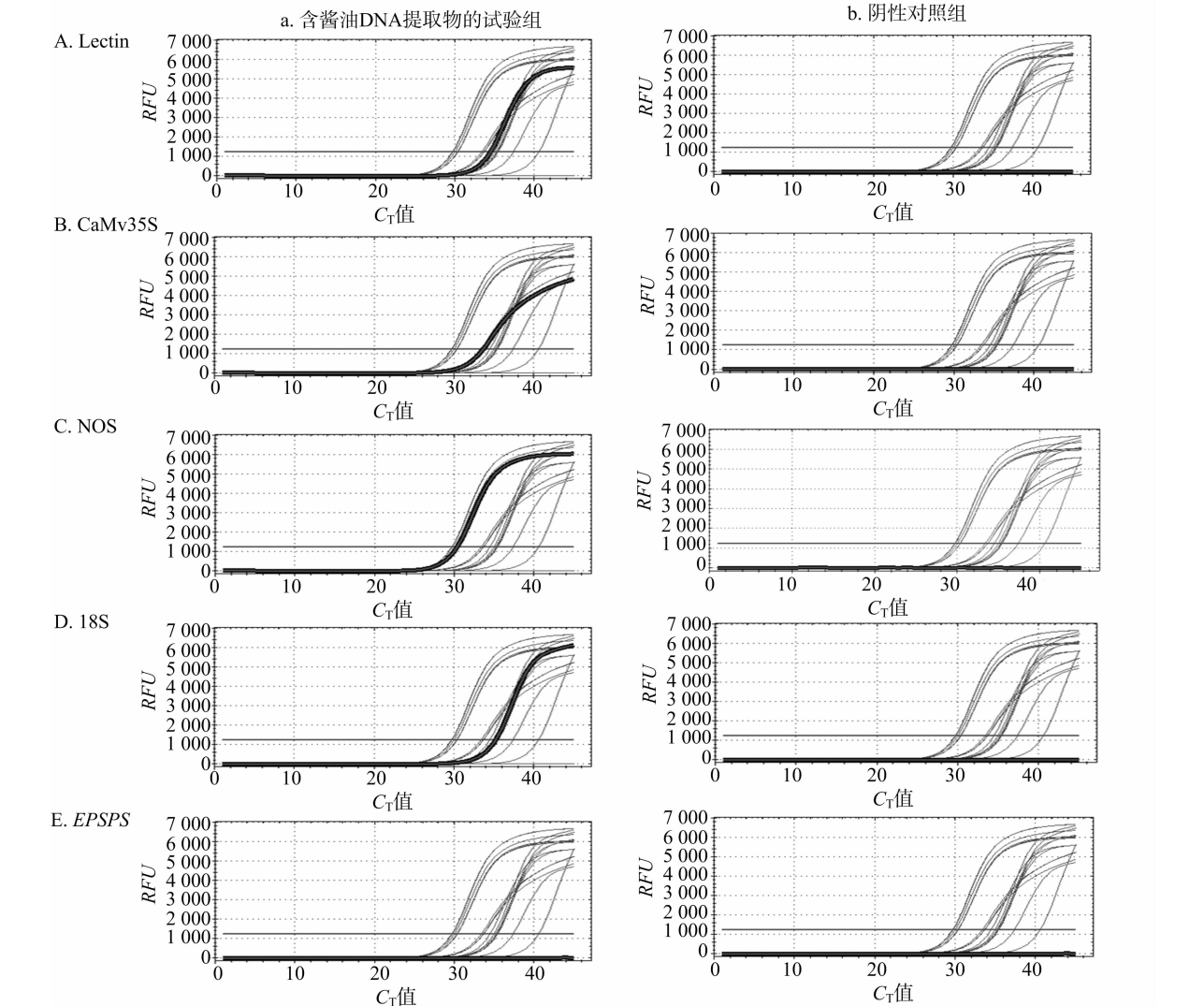


图3 酱油提取物中的*Lectin* 基因、CaMv35S 启动子、NOS终止子、18S基因和*EPSPS* 外源基因的实时荧光 PCR 扩增曲线

定量 PCR 的重复试验(图 4)。结果表明,对于相同批次的酱油样品,PCR 扩增结果重现性较好,*Lectin*、*CaMv35S*、*NOS*、*18S*

这 4 种基因都产生了扩增产物,其相对丰度基本一致,*EPSPS* 基因均没有扩增产物。

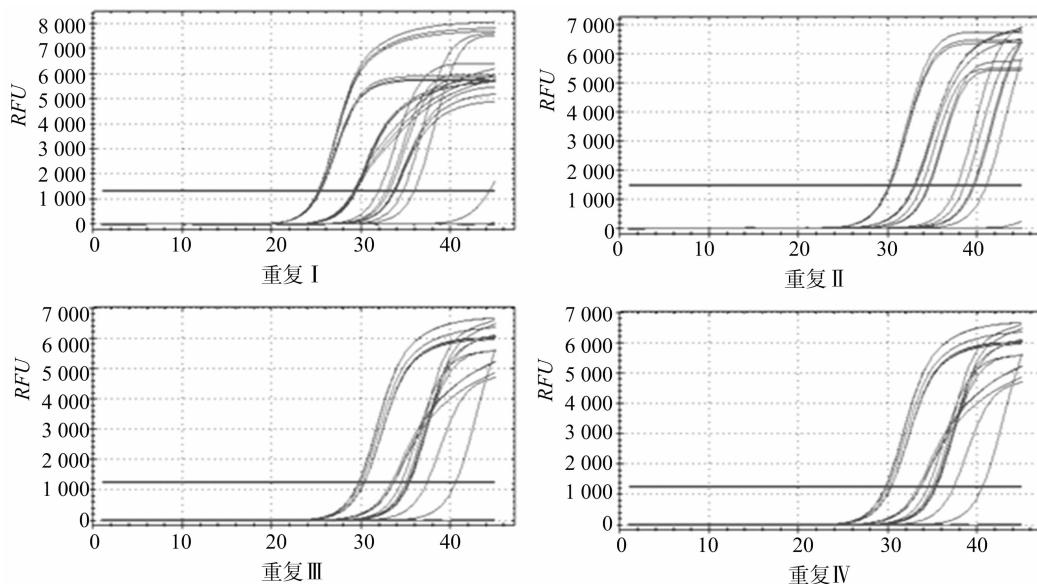


图4 4次重复试验:酱油提取物中的*Lectin*基因、*CaMv35S*启动子、*NOS*终止子、*18S*基因和*EPSPS*外源基因的实时荧光 PCR 扩增曲线

2.4 熔解曲线分析

本研究中使用的是 SYBR Green 染料,能与双链 DNA 发生非特异性结合,引发其荧光增强,由于这种结合的非特异性,所以假阳性扩增产物也可能引发荧光信号的增强,影响检测的准确度^[14]。因此,需要结合熔解曲线来分析 PCR 扩增反应的特异性。

在完成 PCR 扩增后,逐渐增加反应体系的温度,同时监测每一步的荧光值(RFU),随着反应产物中双链 DNA 在高温下逐步解链,荧光强度随时间逐渐降低。做 $-d(RFU)/dT$ 与温度的关系图,则得到 PCR 产物的熔解曲线,这里 T 为时间。一般的,特异性扩增产物解链温度的峰值(T_m 值,即双链 DNA 解链 50% 的温度)比非特异性扩增产物的 T_m 值高,因此可区别出特异性信号和非特异性信号。

由图 5 可见,酱油样品中提取的转基因成分里,*CaMv35S*、*NOS*、*18S* 基因的 PCR 扩增产物的熔解曲线均为单峰,为典型的特异性扩增,解链温度分别为 83.1、75.8、84.5℃。*Lectin* 基因扩增产物的熔解曲线在 82.8℃ 有 1 个明显的特异性扩增峰,另外,在 77.5℃ 处还有 1 个非特异性扩增产生的小峰,这个结果也一定程度说明了定性 PCR 阴性对照中的凝胶电泳亮带的来源(图 1 条带 3),为非特异性扩增产生。同时,与前面的结果一致,因为 *EPSPS* 基因没有产生扩增产物,所有其熔解曲线没有任何特征峰。

3 结论与讨论

PCR 技术已经被广泛应用于基因组 DNA 的检测中,具有特异性高、灵敏度高等特点。实时荧光定量 PCR 通过在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用信号的采集和积累来实时检测 PCR 反应进度,根据反应 CT 值做到对基因的定量检测。这种方法的定量信息更准确,方法更加灵敏,因此可以用于大豆转基因制品的检测。

本研究完成了对酱油这样的实际样品中所含的多种大豆抗草甘膦转基因成分的快速、高通量检测。首先,采用试剂盒成功从酱油样品中提取出了基因组 DNA,并设计 5 组探针,针对样品中大豆的抗草甘膦转基因成分进行了定性 PCR 和实时荧光 PCR 扩增,对比标准样品,对定性 PCR 的结果进行了凝胶电泳分析。试验结果显示,利用抗草甘膦转基因大豆(或豆粕)为原料产出的酱油中含有抗草甘膦转基因大豆的调控元件 *CaMv35s* 启动子、*Nos* 终止子、以及 *18S* 基因,并同时可以检测到内源基因 *Lectin*。然而,*EPSPS* 外源基因并没有检测到。说明 *EPSPS* 外源基因在食品加工中可能被降解。

本研究利用实时荧光定量 PCR 技术同时成功检出了多种酱油中所含的抗草甘膦转基因大豆成分,内源参照基因 *Lectin* 的 CT 值和目的基因的 CT 值相近,说明结果可靠有效,达到了极高的检测灵敏度。试验仪器采用的 BIO-RAD MJ Mini PCR 为 96 孔,可同时测定 32 个样本,每个样本为 3 个平行,可以进行高通量实时分析,与传统 PCR 相比节约了大量的时间。

与传统 PCR 相比,RT-PCR 方法具有更好的分析特异性^[17]。凝胶电泳分析结果显示,定性 PCR 反应结果 *Lectin* 基因阴性对照组中有 1 条模糊的条带,即造成了外界污染;而在相应的 RT-PCR 中,*Lectin* 基因阴性对照组并没有扩增产物。该现象表明传统 PCR 容易在定性分析中因外界污染造成假阳性,具有技术上的缺陷,而实时荧光定量 PCR 克服了这一缺陷。熔解曲线的分析能够很好地区分特异性扩增产物和非特异性扩增产物,进一步证实了 *Lectin* 基因扩增中产生了非特异性产物,有效地提高了分析的准确性。

本研究建立的 RT-PCR 方法作为一种更直观、更准确和更快速的转基因成分高通量检测方法可以为食品质量监管机构提供更好的技术支持,有利于管理市场上转基因产品和规范转基因原料的流通。

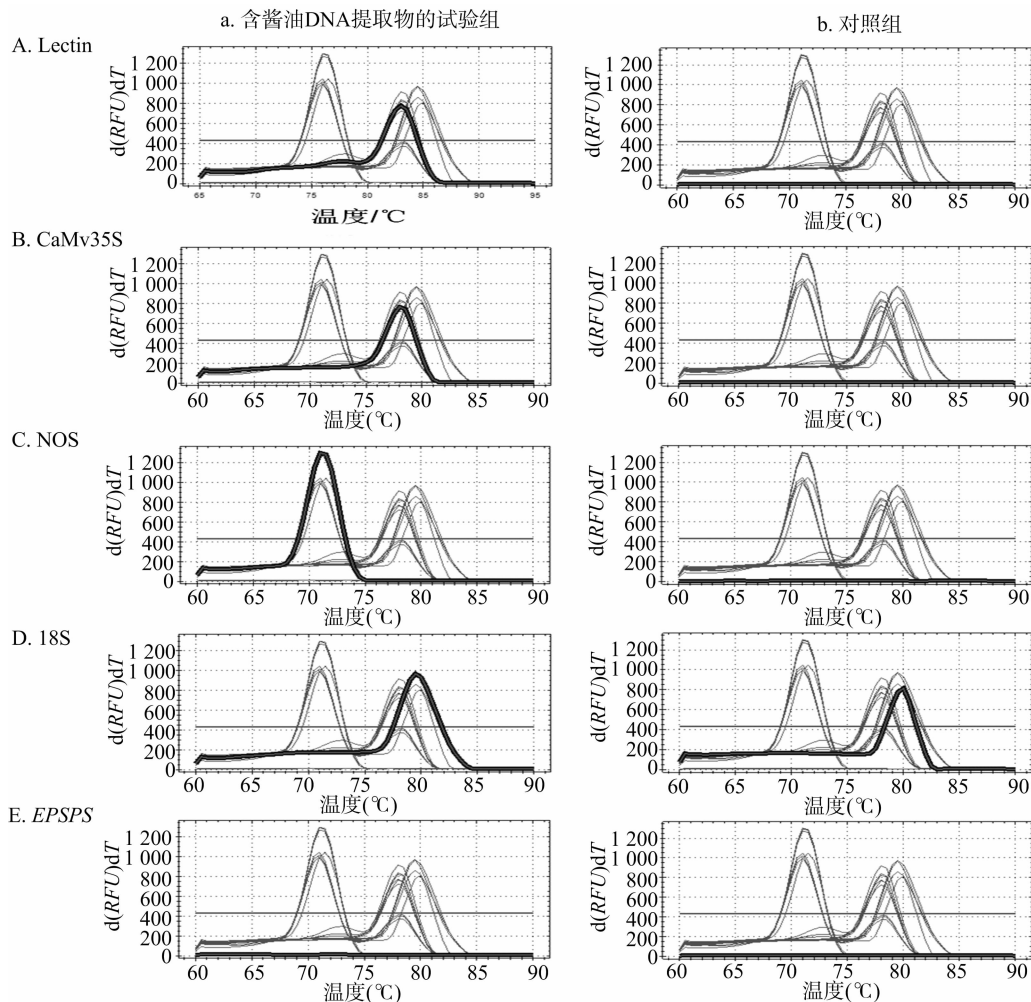


图5 酱油提取物中的*Lectin*基因、*CaMv35S*启动子、*NOS*终止子、*18S*基因和*EPSPS*外源基因的熔解曲线

参考文献:

- [1] 张文银, 安永平, 王彩芬, 等. 主要转基因作物研究现状及其产业化进展[J]. 生物技术通报, 2008(5): 1-4, 9.
- [2] 张成, 刘定富, 易先达. 全球转基因作物商业化进展及现状分析[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(14): 2819-2823.
- [3] 侯守礼. 转基因食品是否加贴标签对消费者福利的影响[J]. 数量经济技术经济研究, 2005, 22(2): 64-73, 94.
- [4] 仇焕广, 黄季焜, 杨军. 关于消费者对转基因技术和食品态度研究的讨论[J]. 中国科技论坛, 2007(3): 105-108, 51.
- [5] 齐振宏, 周慧. 消费者对转基因食品认知的实证分析——以武汉市为例[J]. 中国农村观察, 2010(6): 35-43.
- [6] Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): quantitative assay of immunoglobulin G [J]. Immunochemistry, 1971, 8(9): 871-874.
- [7] Köppel R, Zimmerli F, Breitenmoser A. Multiplex real-time PCR for the simultaneous detection and quantification of DNA from three transgenic rice species and construction and application of an artificial oligonucleotide as reference molecule[J]. European Food Research and Technology, 2010, 230(5): 731-736.
- [8] 黄昆仑, 罗云波. 用巢式和半巢式PCR检测转基因大豆 Roundup Ready 及其深加工食品[J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(5): 461-466.
- [9] 白月, 才华, 栾凤侠, 等. 多重PCR结合DHPLC方法检测番茄中转基因成分[J]. 作物杂志, 2011(2): 28-31.
- [10] Christian A H, Junko S. Real-time quantitative PCR[J]. Genome Research, 1996, 6: 986-994.
- [11] 刘光明, 苏文金, 蔡慧农, 等. 基于分子信标探针的荧光定量PCR方法检测转基因食品[J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(2): 273-277.
- [12] 蔡慧农, 刘光明, 苏文金, 等. TaqMan探针用于转基因食品的荧光定量PCR检测[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(12): 1-7.
- [13] 陈颖, 徐宝梁, 苏宁, 等. 实时荧光定量PCR技术检测转基因大豆方法的建立[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(8): 65-69.
- [14] 王小花, 李建祥, 王国卿, 等. SYBR Green实时荧光定量PCR检测大豆转基因成分[J]. 食品科学, 2009, 30(8): 171-176.
- [15] 王媛, 葛毅强, 陈颖, 等. 大豆加工食品中转基因成分多重PCR检测体系的建立[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(10): 118-121.
- [16] 柯纳德·J·海勒. 基因工程食品——生产方法与检测技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 137-138.
- [17] 任春梅, 程兆榜, 杨柳, 等. 江苏省葫芦科作物6种病毒的多重RT-PCR方法及应用[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(4): 756-763.