

石盼盼, 谢文佳, 刘 燕, 等. 多重实时荧光 PCR 快速检测转基因大豆[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(18): 77-81.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.18.013

多重实时荧光 PCR 快速检测转基因大豆

石盼盼, 谢文佳, 刘 燕, 王 璐, 陈 蕾, 郝莉花

(河南省产品质量监督检验院, 河南郑州 450000)

摘要:采用多重实时荧光 PCR 技术, 对大豆筛选基因 35S 启动子 (cauliflower mosaic virus, CaMV 35S)、NOS 终止子 (nopaline synthase, NOS) 和内源基因 *Lectin* 设计合成了多对检测引物和探针, 在筛选各基因合适的检测引物和探针的基础上, 摸索引物组合和扩增条件, 最终确定合适的探针引物组合和试验条件, 建立转基因大豆快速初筛技术。该方法可在 1 h 内同时完成对转基因大豆 3 个基因片段的实时荧光 PCR 检测。方法特异性强, 灵敏度高, 可用于大豆转基因成分的快速检测, 大大提高检验效率, 可为消费者的食品安全及我国大豆的进出口检验提供有效的技术支持。

关键词:三重实时荧光聚合酶链式反应 PCR; 大豆; 转基因成分; 特异性; 灵敏度

中图分类号: S565.101 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)18-0077-04

大豆营养丰富, 为人类提供优质的蛋白质和油脂, 是我国重要的粮食油料兼用作物, 也是重要的饲料来源^[1-2]。我国大豆及相关产品的消费量在国际上一直名列前茅。以 2017 年为例, 我国消费大豆油 1 740 万 t, 占全球消费总量的 30.9%; 消费豆粕 7 407 万 t, 占全球消费总量的 31.7%。随着健康饮食方式的引导, 大豆消费水平不断上升, 但国内种植量增长缓慢。近几年来, 我国主要从美国、阿根廷等国家进口大豆^[3-4]。在进出口贸易中大豆及其产品转基因成分是常检项目。转基因大豆产品因其安全性备受争议, 严重影响了人们对大豆的消费热情。目前, 市场监督管理及进出口检验检疫部门着重于研究开发更为科学高效的转基因大豆检测技术, 保证非批准转基因大豆及其产品无法进入我国^[5]。

我国农业农村部已经批准美国孟山都等公司的多种转基因大豆进口到我国。我国自主研发的转基因大豆品种也已经实现产业化。我国转基因育种技术的发展进一步促使基因产品检测技术的发展升级^[6]。目前我国国家标准中对转基因大豆的检测主要以聚合酶链式反应 (PCR) 法为主。如《农业部 2630 号公告-15-2017 转基因植物及其产品成分检测耐除草剂大豆 SHZD32-1 及其衍生品种定性 PCR 方法》^[7] 和国家标准 GB/T 33526—2017《转基因植物产品 数字 PCR 检测方法》^[8]。

在研究领域多种基于分子生物学的检测技术不断涌现, 但应用性方面还有待研究推广^[9-14]。其中, 魏霜等利用多重串联式 PCR 基因芯片技术用于转基因大豆 GTS40-3-2 的检测^[15], 即利用多重 PCR 和巢式荧光定量 PCR 检测 GTS 40-3-2 的多个外源基因和内源基因, 实现了转基因的高通量检测, 但该方法技术要求高, 且检测方法主要是普通 PCR 技术, 检测结果须要进一步凝胶电泳分析, 过程相对复杂。本试验研发的三重实时荧光 PCR 法可以达到多项国家标准和进出口行业标准的基因检测限, 并且 1 次反应能同时准确检测有无转基因大豆的 CaMV 35S、NOS 和 *Lectin* 3 个基因片断, 试验时间短, 操作简单, 方便技术推广应用。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试剂

大豆转基因成分阳性质控样品、大豆转基因成分阴性质控样品, 均购自中国检验检疫科学研究院测试评价中心; 实时荧光 PCR 扩增引物和探针 (表 1), 均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 苯酚-三氯甲烷-异戊醇混合液 (体积比为 25:24:1)、2×PCR MasterMix, 均购自北京索莱宝科技有限公司; 试验用水取自笔者所在实验室 Milli-Q 超纯水系统的二级水; 其他无水乙醇等均为国产分析纯试剂。

1.2 仪器与设备

Milli-Q 超纯水系统, 购自密理博中国有限公司; HFsafe 生物安全柜, 购自上海力申科学仪器有

收稿日期: 2019-11-12

基金项目: 河南省科技攻关计划 (编号: 172102310724)。

作者简介: 石盼盼 (1987—), 女, 河南洛阳人, 硕士, 工程师, 主要从事食品安全质量检测研究。E-mail: 523150920@qq.com。

表 1 大豆转基因检测引物和探针序列

基因片断	引物和探针名称及序列	扩增片段长度(bp)
CaMV 35S	35S F:5′ – GGGATTGTGCGTCATCCCTT – 3′	141
	35S R:5′ – CACGAGGAGCATCGTGGAAA – 3′	
	35S Probe:FAM – CCACTTGCTTTGAAGACGTGTTGGAACGTCT – TAMRA	
<i>Lectin</i>	<i>Lectin</i> F:5′ – CGAACCAACCGAACCCCTGAT – 3′	89
	<i>Lectin</i> R:5′ – GACCTCGCTTTTCGTCAACCT – 3′	
	<i>Lectin</i> Probe:HEX – TCAAGGAGACGCCCTTGTGACCTCATCGA – TAMRA	
NOS	NOS F:5′ – TGCGGGACTCTAATCATAAAAACCCA – 3′	102
	NOS R:5′ – CGTTAGGCCTATCTGTGCACCTG – 3′	
	NOS Probe:CY5 – ACGTCATGCACAGATAGGCCTAACGCTTGTCC – BHQ2	

限公司;LightCycle480 荧光 PCR 仪,购自罗氏诊断产品有限公司;Colibri Titertek Berthold 超微量分光光度计,购自上海科瑞生物科技有限公司;移液器,购自美国 Eppendorf 公司;高通量组织研磨器,购自宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 基因组 DNA 的提取 酚三氯甲烷抽提法:称取 50 mg 粉状样品至 1.5 mL 离心管中,加入 700 μ L DNA 提取裂解液,置 65 $^{\circ}$ C 水浴 3 h,其间不时振荡混匀;12 000 r/min 离心 5 min,转移上清至新的 1.5 mL 离心管中,加入等体积苯酚 – 三氯甲烷 – 异戊醇混合液(25 : 24 : 1),充分混匀后,12 000 r/min 离心 5 min;取上清,加入 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠溶液,混匀后加入 2 倍体积预冷的无水乙醇,– 20 $^{\circ}$ C 静置 3 h,12 000 r/min 离心 5 min 弃去上清;加 70% 乙醇洗涤 1 ~ 2 次,通风柜内室温下晾干,加 50 μ L TE 缓冲液,最终获得 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 在 1.8 ~ 2.0 之间的 DNA 溶液。

1.3.2 引物和探针的设计 在美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI)数据库查找并拷贝转基因大豆常用外源基因 CaMV 35S 启动子/NOS 终止子及内源基因 *Lectin* 的序列,使用 NCBI 的在线引物设计功能和生工生物工程(上海)股份有限公司的引物通过在线设计软件设计出针对这 3 个基因的正向引物、反向引物和荧光探针。分别使用荧光基团 FAM、Cy5 和 HEX 作为发光基团,使用 TAMRA、BHQ3 和 TAMRA 作为淬灭基团。设计的引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3.3 引物及探针特异性测试试验 分别用以转基因大豆阳性质控样品及阴性质控样品的 DNA 为模板,按照以下反应体系进行反应:灭菌蒸馏水

3.4 μ L、2 \times PCR Master Mix 10 μ L、正向引物(1 μ mol/L)1.8 μ L、反向引物(1 μ mol/L)1.8 μ L、探针(0.25 μ mol/L)2 μ L、DNA 模板(50 ng/ μ L)1 μ L,总体积 20 μ L。反应程序:50 $^{\circ}$ C 预变性 15 s,95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min;95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火延伸 1 min,变性延伸过程进行 45 个循环。退火结束时采集探针对应的单重荧光,进行单重实时荧光 PCR 试验,检测 3 个基因对应的引物及探针的特异性。每个基因扩增设置阳性样品、阴性样品、空白对照,各设 2 个重复。阳性试验以转基因大豆阳性质控样品 DNA 为模板,阴性试验以转基因大豆阴性质控样品 DNA 为模板,空白对照以无菌水作为扩增模板。

1.3.4 三重荧光 PCR 反应体系及程序 在各基因单重 PCR 检测对应引物探针特异性良好的基础上,摸索合适的引物配比和试验条件,进行三重实时荧光 PCR 试验,最终三重荧光 PCR 检测体系见表 2,扩增程序优化结果如下:95 $^{\circ}$ C 预变性 15 s;95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火延伸 1 min,变性延伸过程进行 45 个循环。退火结束时采集探针对应的三重荧光即 FAM、HEX 和 CY5 采集信号,每个基因扩增设置阳性样品、阴性样品、空白对照,各设 2 个重复。阳性试验以转基因大豆阳性质控样品 DNA 为模板,阴性试验以转基因大豆阴性质控样品 DNA 为模板,空白对照以无菌水为扩增模板。

1.3.5 三重荧光 PCR 检测体系的灵敏度试验 将转基因大豆阳性质控样品和转基因阴性玉米样品以质量 1 : 9 混合均匀,以“1.3.1”节的方法提取 DNA,再 10 倍逐级稀释使阳性 DNA 占 1%、0.1%。然后以大豆转基因阳性质控样品 DNA 和阳性占比为 10%、1%、0.1% 的质控样品 DNA 为模板,按“1.3.5”节三重荧光 PCR 反应体系及程序进行 PCR 扩增,每个模板设置 2 个重复,观察扩增情况,记录

表 2 三重荧光 PCR 扩增体系

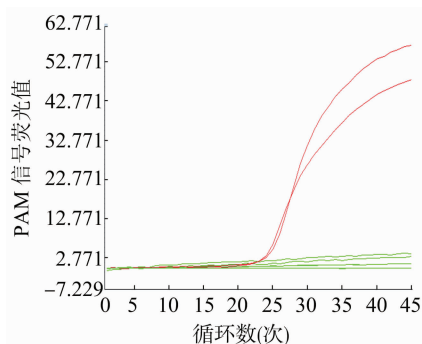
试剂及浓度	体积 (μL)	终浓度 ($\mu\text{mol/L}$)
ddH ₂ O	14.6	—
2 × PCR Master Mix	25.0	1 ×
35S F(5 $\mu\text{mol/L}$)	0.9	0.09
35S R(5 $\mu\text{mol/L}$)	0.9	0.09
35S Probe(1 $\mu\text{mol/L}$)	1.0	0.02
<i>Lectin</i> F(5 $\mu\text{mol/L}$)	0.9	0.09
<i>Lectin</i> R(5 $\mu\text{mol/L}$)	0.9	0.09
<i>Lectin</i> Probe(1 $\mu\text{mol/L}$)	1.0	0.02
NOS F(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.9	0.18
NOS R(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.9	0.18
NOS Probe(2.5 $\mu\text{mol/L}$)	1.0	0.05
DNA(50 ng/ μL)	2.0	—

各 DNA 的扩增循环数(C_T)。

2 结果与分析

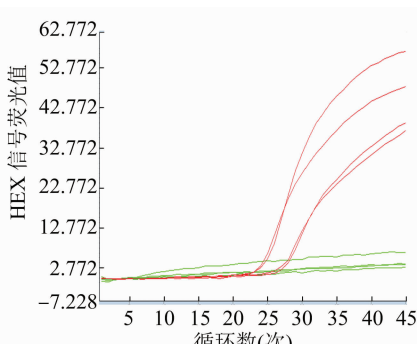
2.1 引物探针特异性检测结果

2.1.1 CaMV 35S 基因扩增用引物和探针特异性检测结果 如图 1 所示,只有以转基因大豆阳性质控样品 DNA 为模板时才有特异性扩增,2 个平行样品的 C_T 值为分别为 23.61、24.55,而其他样品 DNA 没有



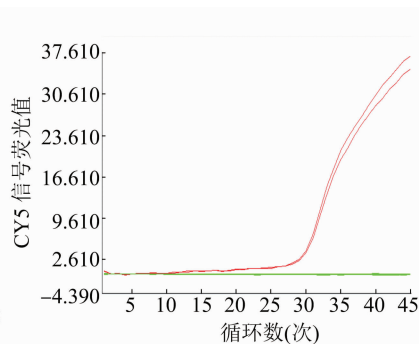
红色线—转基因大豆阳性质控样 DNA 扩增结果;绿色线—转基因大豆阴性质控样 DNA 及空白对照扩增结果

图1 CaMV 35S 启动子基因扩增用引物探针特异性检测结果



红色线—转基因大豆阳性质控样及阴性质控样 DNA 扩增结果;绿色线—非大豆样品及空白对照扩增结果

图2 大豆内源基因 *Lectin* 扩增用引物和探针特异性检测结果



红色线—转基因大豆阳性质控样 DNA 扩增结果;绿色线—转基因大豆阴性质控样 DNA 及空白对照扩增结果

图3 NOS 终止子基因扩增用引物探针特异性检测结果

2.3 多重 PCR 体系的灵敏度测定

由图 7、图 8、图 9、表 3 可知,构建的三重扩增体系中 CaMV 35S 基因、*Lectin* 基因和 NOS 的检测灵敏度均可以达到样品质量浓度的 0.1%。

3 结论

本研究利用多重荧光 PCR 的优势,建立了可同时检测转基因大豆启动子 35S、终止子 NOS 和内源基因 *Lectin* 的三重实时荧光 PCR 方法,可以通过 1

扩增。说明设计合成的大豆转基因 *CaMV35S* 启动子检测用引物和探针特异性良好,没有交叉反应。

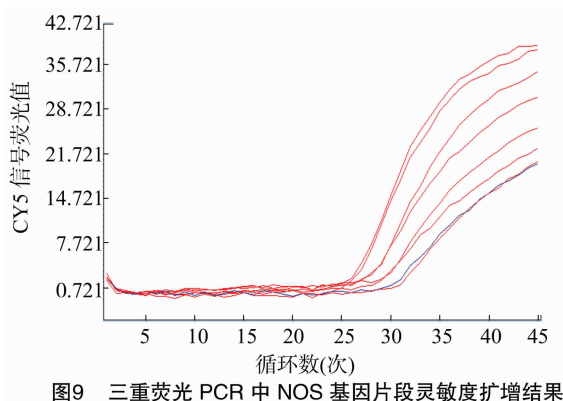
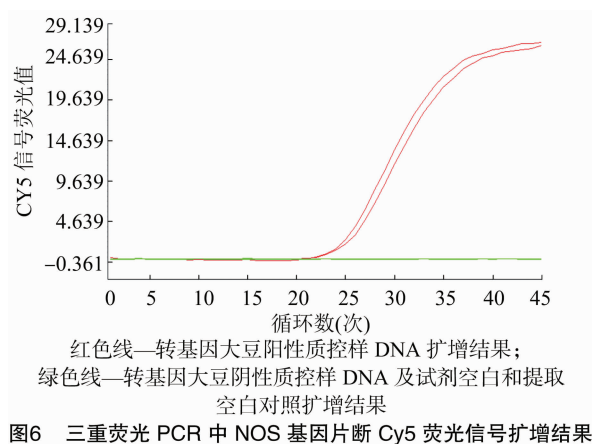
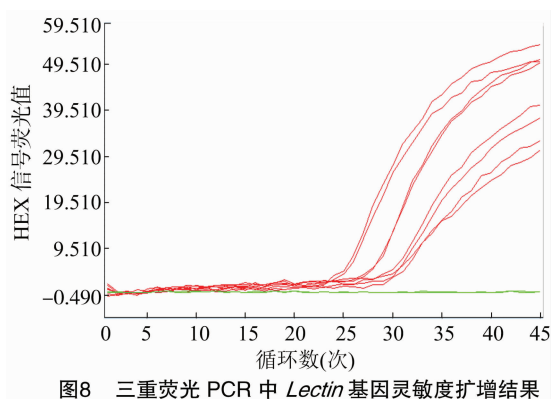
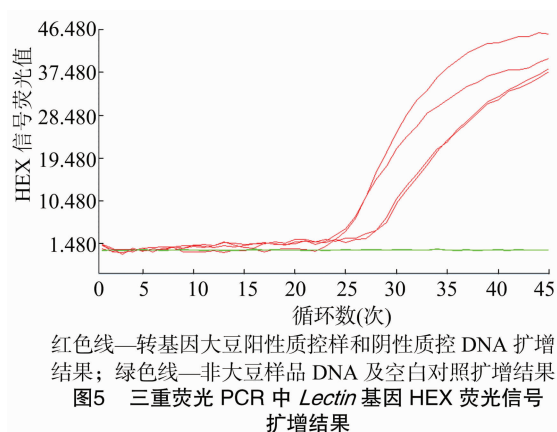
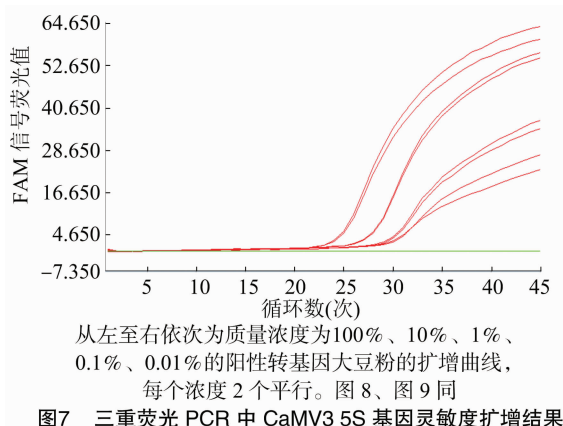
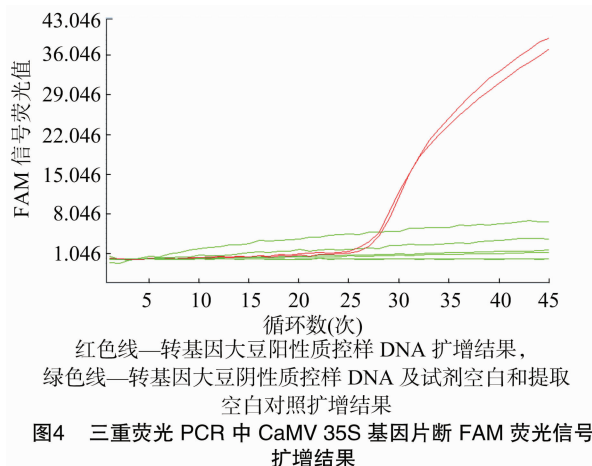
2.1.2 大豆内源 *Lectin* 基因扩增用引物和探针特异性检测结果 如图 2 所示,当以转基因大豆阳性质控样品和阴性质控样 DNA 为模板时才有特异性扩增,2 个平行样品的 C_T 值分别为 23.61、24.55 和 27.03、26.69。而非大豆样品 DNA 和空白对照 DNA 均没有扩增。说明设计合成的大豆内源基因 *Lectin* 检测用引物和探针特异性良好,没有交叉反应。

2.1.3 NOS 终止子基因扩增用引物和探针特异性检测结果 如图 3 所示,只有以转基因大豆阳性质控样品 DNA 为模板时才有特异性扩增, C_T 值分别为 28.14、28.02,而其他样品 DNA 没有扩增。说明设计合成的大豆转基因 NOS 终止子检测用引物和探针特异性良好,没有交叉反应。

2.2 三重实时荧光 PCR 体系扩增图结果

如图 4、图 5、图 6 所示,三重体系中阳性样品各基因均有典型的“S”形扩增,阴性样品除 *Lectin* 基因外其余都没有扩增,试剂空白和提取过程空白均没有扩增。说明建立的三重 PCR 体系扩增特异性良好,体系成立。

次 PCR 实现对大豆样品的转基因初级筛查。特异性和灵敏度检测证明该方法可用于大豆样品的转基因检测,大大提高了检测效率,操作过程简单易于推广,对进一步促进分子生物学技术在检验检测领域的应用有一定的推动作用。但该方法中 NOS 在三重体系中显示检测荧光值偏低,可能与 CY5 荧光值较弱有关,该体系也有待进一步优化,在不同品牌 PCR 仪间的适用性问题也有待进一步验证。



参考文献:

[1] 郝景波. 大豆微量成分的特殊营养价值[J]. 黑龙江粮食, 2015 (9): 51-53.

表3 三重实时荧光PCR体系中各基因扩增循环数

[illegible]

常 晨,张道华,唐 波,等. 猪乙型脑炎病毒 SYBR - Green I 实时荧光定量 PCR 方法的建立[J]. 江苏农业科学,2020,48(18):81-85.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.18.014

猪乙型脑炎病毒 SYBR - Green I 实时荧光定量 PCR 方法的建立

常 晨,张道华,唐 波,刘国阳,华 涛,王海燕

(1. 江苏省农业科学院动物免疫工程研究所/国家兽用生物制品工程技术研究中心/江苏省食品质量安全重点实验室 - 省部共建国家重点实验室培育基地,江苏南京 210095; 2. 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心,江苏扬州 225009)

摘要:为建立猪乙型脑炎病毒(JEV)的定量检测方法,根据 E 基因序列,设计 1 对特异性引物,建立检测 JEV 的荧光定量 PCR 方法。结果显示,该方法灵敏度达到 10^3 拷贝/ μ L,对猪圆环病毒 2 型(PCV2)、猪细小病毒(PPV)、猪瘟病毒(CSFV)、猪伪狂犬病毒(PRV)均无交叉反应,具有良好的特异性和重复性;采用 JEV 攻毒小鼠,荧光定量 PCR 比普通 PCR 更能灵敏地检出组织带毒量。该方法可用于组织样品中乙脑病毒的定量检测以及临床乙脑病毒感染的早期检测和定量分析猪乙脑病毒感染程度。

关键词:猪乙脑病毒;SYBR - Green I;荧光定量 PCR;检测

中图分类号:S852.65 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)18-0081-05

日本流行性乙型脑炎(乙脑,Japanese encephalitis, JE)是由乙型脑炎病毒(Japanese

encephalitis virus, JEV)引起的一种人畜共患传染病。乙型脑炎病毒主要通过携带病毒的蚊虫叮咬传播,库蚊、伊蚊和按蚊是 JEV 的主要传播媒介,猪是主要贮存宿主及扩散宿主,JE 主要发生于夏秋季。猪乙脑病常引起妊娠母猪流产、产死胎或弱胎,公猪睾丸炎,育肥猪持续高热,新生仔猪神经症状,对养殖业安全生产带来严重威胁^[1-2]。对猪进行疫苗免疫能有效减少 JEV 对养猪业造成的危害,进行及时正确的诊断是预防和控制该病的关键^[3]。

收稿日期:2019-12-04

基金项目:国家重点研发计划(编号:2018YFD0500800);公益性行业(农业)科研专项(编号:201403051);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(17)3049]。

作者简介:常 晨(1987—),女,江苏南京人,硕士,助理研究员,主要从事动物疫苗产品研究工作。E-mail:346283525@qq.com。

通信作者:张道华,硕士,研究员,主要从事动物分子病原学及免疫学研究。E-mail:zhangdh2005@163.com。

[2]荆常亮,周金辉,张成省,等. 野生大豆营养成分及生物活性因子的研究进展[J]. 大豆科学,2019,38(4):644-649.

[3]王雪琴. 中国大豆进口依存度影响因素及对策研究[D]. 武汉:武汉轻工大学,2018.

[4]郑金英,翁 欣. 国际转基因大豆对中国大豆产业及其期货市场的影响[J]. 亚太经济,2015(5):39-46.

[5]王宇红. 我国转基因食品安全政府规制研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2012.

[6]康宇立,朱 涛,麻晓春. 中美转基因生物安全监管体系对比[J]. 生命世界,2018(9):6-7.

[7]中华人民共和国农业部. 农业部 2630 号公告-15-2017 转基因植物及其产品成分检测 耐除草剂大豆 SHZD32-1 及其衍生品种定性 PCR 方法[S]. 北京:中国标准出版社,2017.

[8]中华人民共和国国家质量监督检验检疫局. 转基因植物产品数字 PCR 检测方法:GB/T 33526—2017[S]. 北京:中国标准出版社,2017.

[9]孟 静,孙满慧,钟立霞,等. 豆制品中转基因成分检测的研究进

展[J]. 大豆科学,2019,38(1):148-152.

[10]闫 伟,龙丽坤,李葱葱,等. 三种转基因大豆品系的多重荧光 PCR 检测体系建立[J]. 大豆科学,2019,38(5):712-718.

[11]窦 雯,李 尤,逯欣宇,等. 转基因大豆 RPA 检测技术的建立及应用[J]. 生物技术通报,2019,35(5):170-175.

[12]Kamle M, Kumar P, Patra J K, et al. Current perspectives on genetically modified crops and detection methods[J]. 3 Biotech, 2017,7(3):219.

[13]Xu C, Li L, Jin W J, et al. Recombinase polymerase amplification (RPA) of CaMV-35S promoter and nos terminator for rapid detection of genetically modified crops[J]. International Journal of Molecular Science, 2014,15(10):18197-18205.

[14]祖 新,徐轶飞,李羽翥,等. 可视化膜芯片检测转基因大豆的研究[J]. 食品安全质量检测学报,2019,10(11):3488-3492.

[15]魏 霜,周广彪,刘 津,等. 多重串联式 PCR 基因芯片技术检测转基因大豆 GTS 40-3-2[J]. 中国食品学报,2018,18(2):244-249.