

TaqMan MGB 实时荧光 PCR 对转基因大豆定量检测的研究*

黄东东, 翁少萍, 吕 玲, 常 迪, 何建国
(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 利用实时荧光定量 PCR 技术, 根据转基因大豆 (Roundup Ready™) 的外源基因 35S 启动子序列设计引物和 TaqMan MGB 探针, 对大豆粉中 Roundup Ready™ 大豆含量进行了定量检测, 根据这个检测体系建立了 35S 启动子 Ct 值与样品中转基因成分数量之间的标准曲线和线性回归方程 (相关系数 r^2 : 0.9942)。本研究设计的方法还可以应用到多组分的食品、饲料等加工产品, 检测转基因成分的含量, 并可作为转基因食品常规 PCR 定性检测方法。

关键词: 转基因大豆; 实时定量 PCR; TaqMan MGB 探针; 基因; 生物技术; 食品技术

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2008) 03-0140-03

随着基因工程技术的迅速发展, 全球转基因作物的种植面积成倍增长, 取得显著的经济效益世人瞩目, 但转基因作物潜在的生态风险, 可能带来的环境问题、伦理问题和国际贸易问题等, 促使国际上许多国家如欧盟、日本、韩国等都制订了相应的法规对转基因食品实行标签制度^[1-3]。

实时荧光定量 PCR 技术是在 PCR 反应体系中加入特异性 TaqMan MGB 荧光标记探针, 使 PCR 扩增与杂交反应同时进行, 利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量的方法。本研究使用 ABI PRISM 7000 实时荧光定量 PCR 仪, 对大豆粉中转基因成分的含量进行了定量检测研究, 确立了适宜于推广的转基因定量检测技术和方法^[4-9]。

1 材料和方法

1.1 材料

(1) 转基因大豆粉末: 转基因大豆 (Roundup Ready) 抗除草剂大豆参照样品从 Fluka 公司购买, 其中转基因成分含量分别占 0%、1.0%、2.0%、5.0% 等标准品。

(2) 仪器: ABI PRISM 7000 定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司); 5415D 型离心机 (德国 Eppendorf 公司); DU-530 紫外分光光度计 (美国 Beckman 公司)。

(3) 试剂: TaqMan™ Universal PCR Master Mix 检测试剂盒购自美国 ABI 公司 (ABI - Roche

Molecular Systems Inc., Branch - burg, NJ, USA); CTAB 购自华美生物有限公司; 蛋白酶 K 购自 Merck 公司。

1.2 方法

(1) 大豆基因组 DNA 提取: 大豆基因组 DNA 的提取采用 CTAB 法^[10], 得到样品 DNA。

(2) 引物和探针设计: 利用 Primer Express 生物软件, 根据在 GenBank 中转基因大豆 (Roundup Ready) 的外源基因 35S 启动子基因序列 (GenBank accession No. AJ007626), 设计引物和 TaqMan MGB 探针: 上游引物为 5' -GAGGAGCATC GTGGAAAAAGAA - 3', 下游引物为 5' -GGATAT CACATCAATCCACTTGCTT-3', 扩增片段长度为 68 bp; TaqMan MGB 探针为 5' -FAM - ACGTTCCAACACGTCT - MGB-3', 其中 5' 用 FAM 报告荧光基团标记, 3' 标记 MGB 基团。以上引物和探针由上海基康公司合成。

(3) PCR 反应体系: 用 Beckman 紫外分光光度计测定大豆基因组 DNA 浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$, 然后将其换算为拷贝数量。即根据公式: 待扩增 DNA 浓度 (拷贝数/mL) = $[\text{DNA 浓度} \times 10^{-6} / (\text{平均相对分子质量} \times \text{待扩增 DNA 的长度})] \times 6.02 \times 10^{23}$, 换算出待扩增大豆基因组 DNA 浓度为 2.534×10^7 拷贝数/mL, 把所有转基因大豆样品稀释为 4×10^6 拷贝数/mL, 每个 PCR 样品管中加入 2000 拷贝大豆 DNA, 则转基因成分含量分别占 0%、

* 收稿日期: 2007-10-19

基金项目: 广东省科技计划资助项目 (2004A20508001)

作者简介: 黄东东 (1971 年生), 男, 博士后; 通讯联系人: 何建国; E-mail: lsshjg@mail.sysu.edu.cn

1.0%、2.0%、5.0% 等样品的外源基因拷贝数分别为 0, 20, 40, 100, 作为绝对定量的标准品。

荧光定量 PCR 反应体系为: 12.5 μL TaqManTM Universal PCR Master Mix, 50 $\mu\text{mol/L}$ 引物各 0.75 μL , 25 $\mu\text{mol/L}$ 探针 0.5 μL , DNA 模板 0.5 μL , 灭菌水 10 μL , 总反应体积为 25 μL 。每个样品设置 2 个重复。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$, 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$, 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$, 1 min, 40 个循环, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2 结果与讨论

TaqMan MGB 荧光定量聚合酶链式反应^[11-14]是在常规 PCR 基础上, 添加了一条 TaqMan MGB 杂交探针。这个探针与 PCR 两个引物之间的靶序列互补配对, 其 5' 端标记了一个荧光报告基团 (FAM 或 VIC), 3' 端标记了一个 MGB 荧光淬灭基团。进行 PCR 反应时, Taq 聚合酶利用其 5' $\rightarrow$ 3' 外切酶活性从探针上切下荧光报告基团, 荧光淬灭基团抑制作用消失, 报告基团荧光信号增强。以 PCR 反应的第 3-15 个循环的荧光值作为荧光本底信号, 以第 3-15 个循环的荧光值增加量 ΔRn 的标准偏差的 10 倍被设定为荧光阈值, 信号达到该荧光阈值时的循环次数 (C_t 值) 和 PCR 体系中起始 DNA 量的对数值之间有严格的线性关系。根据所测得的转基因作物阳性梯度标准品 C_t 值, 制成标准曲线, 由于标准品和待测样品 PCR 管中模板加入量一致, 从而可以计算出产品中的转基因成分含量。

本实验根据转基因大豆含有 35S 启动子, 设计上游引物、下游引物和探针, 对 Roundup ReadyTM 大豆含量分别为 0%、1%、2% 和 5% 的标准品进行 35S 实时荧光 PCR 检测, 得到的扩增曲线见图 1。

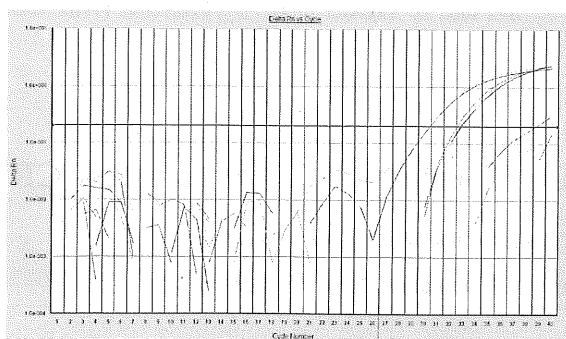


图1 转基因大豆 35S 启动子的定量扩增曲线

Fig. 1 Quantitative amplification curve of genetically modified soybean 35S promoter

各参照样品外源基因 35S 启动子的 C_t 值见表 1。Roundup ReadyTM 转基因大豆含量分别为 1%、2% 和 5% 的标准品, 其 C_t 平均值分别为: 32.80, 32.57, 30.23, 变异系数均在 1% 内, 该结果表明

外源基因 35S 启动子的 C_t 值结果稳定, 重复性好。

表 1 不同含量转基因大豆样品检测的 C_t 值

Tab. 1 C_t value of different genetically modified soybean amount

转基因大豆含量	1%	2%	5%
C_t	32.79 32.58 32.18 32.14 30.48 30.52		
C_t 平均值	32.68	32.16	30.50

本实验中各 PCR 管中模板总量一致, PCR 反应管内总 DNA 为 2000 个拷贝, 由此 1%、2% 和 5% 的标准品的拷贝数分别为 20、40 和 100, 在此基础上, 绘制外源基因 35S 启动子的 C_t 值与 Roundup ReadyTM 转基因大豆量之间的标准曲线 (见图 2), 该标准曲线的回归方程为: $C_t = -3.0533 \lg X + 36.7949$ $r^2: 0.9942$

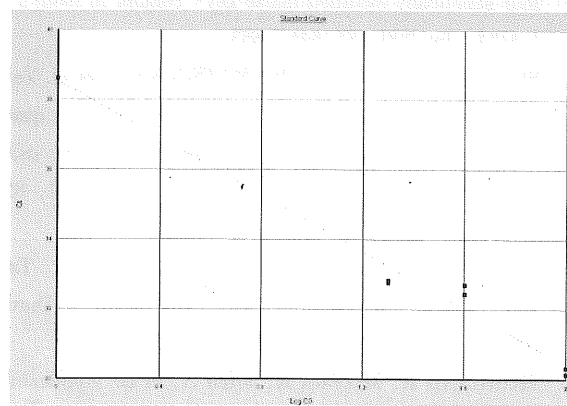


图2 C_t 值与不同转基因大豆含量之间的 TaqMan MGB 检测标准曲线

Fig. 2 TaqMan MGB detection standard curve between C_t value and different genetically modified soybean amount

本方法不仅克服了常规定量 PCR 技术基因高效扩增时可能产生假阳性结果和难以进行起始 DNA 模板的拷贝数检测的局限性^[15]; 而且与普通 TaqMan 荧光探针相比^[16], MGB 荧光探针是在其 5' 或 3' 端连接二氢环化吡啶嘧啶 - 三肽 (DPI3) 与探针末端核苷酸形成小型凹槽结合物 (minor groove binder, MGB), 提高探针杂交稳定性。

本研究设计的 TaqMan MGB 探针对 Roundup ReadyTM 转基因大豆含量检测研究方法, 检测最低限度为每个反应 20 个 DNA 拷贝量, 标准曲线的相关系数 r^2 为 0.9942, 测定结果准确可靠。本方法还可以应用到多组分的食品、饲料等加工产品, 检测转基因成分的含量, 并可作为转基因食品常规 PCR 定性检测方法。

参考文献:

- [1] HOEF A M, KOK E J, BOUW E, et al. Development and application of a selective detection method for genetically modified soy and soy - derived products[J]. Food Addit Contam, 1998, 15: 767 - 774.
- [2] LIPP M, BRODMANN P, PIETSCH K, et al. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder[J]. J AOAC Int, 1999, 82: 923 - 928.
- [3] VOLLENHOFER S, BURG K, SCHMIDT J, et al. Genetically modified organisms in food - screening and specific detection by polymerase chain reaction[J]. J Agric Food Chem, 1999, 47: 5038 - 5043.
- [4] BRODMANN P D, ILG E C, BERTHOUD H, et al. Real - time quantitative polymerase chain reaction methods for four genetically modified maize DNA content in food[J]. J AOAC Int, 2002, 85: 646 - 653.
- [5] SHINDO Y, KURIBARA H, MATSUOKA T, et al. Validation of real - time PCR analysis for line - specific quantitation of genetically modified maize and soybean using new reference molecules[J]. J AOAC Int, 2002, 85: 1119 - 1126.
- [6] TERZI V, FERRARI B, FINOCCHIARO F, et al. Taqman PCR for Detection of Genetically Modified Durum Wheat[J]. J Cereal Sci, 2003, 37: 157 - 163.
- [7] MORIUCHI R, MONMA K, SAGI N, et al. Applicability of quantitative PCR to Soy processed foods containing Roundup Ready Soy[J]. Food Control, 2007, 18: 191 - 195.
- [8] DEISINGH A K, BADRIE N. Detection approaches for genetically modified organisms in foods[J]. Food Res Int, 2005, 38: 639 - 649.
- [9] ENGEL K H, MOREANO F, EHLERT A, et al. Quantification of DNA from genetically modified organisms in composite and processed foods[J]. Trends Food Sci Tech, 2006, 17: 490 - 497.
- [10] 黄东东, 王庆华, 吕振岳, 等. PCR 方法对转基因食品定性检测的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(1): 99 - 101.
- [11] HUANG Dongdong, WANG Qinghua, LV Zhengyue, et al. Study on qualitative detection of genetically modified food[J]. Food Science, 2002, 23(1): 99 - 101.
- [12] KRAUS G, CLEARY T, MILLER N S, et al. Rapid and specific detection of the Mycobacterium tuberculosis complex using fluorogenic probes and real - time PCR[J]. Mol Cell Probes, 2001, 15(6): 375 - 383.
- [13] HOLCK A, VAITILINGOM M, DIDIERJEAN L, et al. 5' - Nuclease PCR for quantitative event - specific detection of the genetically modified Mon810 MZis Gard maize[J]. Eur Food Res Technol., 2002, 214: 449 - 453.
- [14] KESSLER H H, MLBAUER G, RINNER B, et al. Detection of herpes simplex virus DNA by real - time PCR[J]. J Clin Microbio, 2000, 38(7): 2638 - 2642.
- [15] PERMINGEAT H R, REGGIARDO M I, VALLEJOS R H. Detection and quantification of transgenes in grains by multiplex and real - time PCR[J]. J Agric Food Chem, 2002, 50: 4431 - 4436.
- [16] OLESEN L H, NORGAARD J M, PALLISGAARD N, et al. Validation and clinical implication of a quantitative real - time PCR determination of MDR1 gene expression: comparison with semi - quantitative PCR in 101 patients with acute myeloid leukemia[J]. Eur J Haematol, 2003, 70: 296 - 303.
- [17] 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: 1 - 7.
- [18] CAI Huinong, LIU Guangming, SU Wenjing, et al. Fluorescence quantitative PCR detection of genetically modified food by TagMan probe[J]. Food and Fermentation Industries, 2003, 29: 1 - 7.

Detection of Genetically Modified Soybean by TaqMan MGB Real-time PCR

HUANG Dong-dong, WENG Shao-ping, LV Ling, CHANG Di, HE Jian-guo

(School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: According to the PCR primers and TaqMan MGB probe of exogenous 35S promotor, the quantitative detection of genetically modified soybean (Roundup ReadyTM) was established by real-time PCR technology. According to this detection system, the standard curve of Ct vs genetically modified organism quantity was generated and a linear regression equation was obtained ($r^2: 0.9942$). The results demonstrated that this method could be used in quantificational detection of multiple organism food.

Key words: genetically modified soybean; real-time quantitative PCR; TaqMan MGB probe; gene; biotechnology; food technology