

应用地高辛标记的 PCR-ELISA 技术快速检测转基因水稻*

陈 茹, 林志雄, 刘琳琳, 朱道中, 鱼海琼
(广州出入境检验检疫局动物检疫实验室, 广东 广州 510623)

摘 要: 应用地高辛标记的 PCR-ELISA (Dig-PCR-ELISA) 技术进行转基因水稻检测研究。针对转基因水稻中普遍存在的花椰菜花叶病毒 (CaMV) 35S 启动子 (*p35S*)、胭脂碱合成酶 (NOS) 终止子 (*Tnos*), 筛选标记潮霉素磷酸转移酶基因 (*hpt*, *hph*)、 β -葡萄糖苷酸酶基因 (*gus*)、抗草丁膦除草剂基因 (*bar*), 建立 Dig-PCR-ELISA 检测方法; 能进行半定量检测, 敏感性试验表明, Dig-ELISA 检测比常规电泳检测可提高敏感性达 1 000 倍, 可检测含量达 0.1% 的 GMO 样品。全过程可在 24 h 内完成。

关键词: Dig-PCR-ELISA; 转基因水稻; GMO

中图分类号: Q819 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2003) 02-0078-04

近年来, 随着转基因生物及其产品 (GMOs) 的广泛影响, 许多国家纷纷出台了针对 GMOs 的管理措施^[1], 为配合这些措施的有效实施, 急需建立规范的检测技术。目前, GMOs 检测技术的建立和商品化检测试剂盒的开发已在国内外相关领域形成一个热点。

为满足中国出入境检验检疫系统等部门对进出口 GMOs 的检测和管理需要, 本文以转基因水稻为检测材料, 开展转基因检测研究。

转基因水稻的研制过程中也应用各种检测技术以有效筛选阳性植株, 常见的有 PCR、核酸杂交、选择性培养基等^[2,3], 但通常只针对某种转基因 (通常是目的基因) 或其产物, 只能满足一种或少数几个品种的检测需要, 检测方法没有实现标准化; 同时, GMOs 的检测需进行半定量甚至定量检测^[1], 传统方法已不能满足要求。

地高辛标记的 PCR-ELISA 技术 (Dig-PCR-ELISA) 近年来被应用于动植物病毒的检测研

究^[4,5], 但应用于 GMOs 检测则鲜有报道。本文针对转基因水稻中普遍存在的花椰菜花叶病毒 (CaMV) 35S 启动子 (*p35S*)、胭脂碱合成酶 (NOS) 终止子 (*Tnos*), 筛选标记潮霉素磷酸转移酶基因 (*hpt*, *hph*)、 β -葡萄糖苷酸酶基因 (*gus*)、抗草丁膦除草剂基因 (*bar*), 建立 Dig-PCR-ELISA 检测方法, 检测效果理想。

1 材料和方法

1.1 转基因水稻

分别来源于中山大学 (2 个品种, 均含 *p35S*, *Tnos*, *hpt*), 中国科学院遗传研究所 (2 个品种, 1 种含 *p35S* 和 *Tnos*, 另 1 种含 *hpt*), 中国科学院上海植物生理研究所 (SH 品种, 含 *p35S*, *Tnos*, *hpt*, *gus*)、中国水稻研究所 (含 *p35S*, *bar*)。

1.2 引物及生物素标记的探针

引物采用发表序列^[6], 探针序列自行设计, 委托上海生工公司合成, PAGE 纯化 (表 1)。

表 1 引物及探针序列

Tab.1 Primers and probes sequence

基因	正向引物	逆向引物	PCR 产物 bp	生物素标记探针
<i>p35S</i>	5'gctcctacaaatgccatca	5'gatagtgggattgtgcgtca	195	5'biotin-gctttgaagacgtggttggaacgtc
<i>Tnos</i>	5'gaatcctgttgccggtcttg	5'ttattctagtttgcgcgcta	180	5'biotin-tgtatagcgggactctaatac
<i>hpt</i>	5'agctgcgcgatggtttctacaa	5'atcgccctcgctccagtcaatg	509	5'biotin-cgcaaggaatcggtcaatacac
<i>bar</i>	5'accatcgtvcaaccactacatcg	5'gctgccagaaacccacggttcac	420	5'biotin-aaggcagcgaacgcctacgactg
<i>gus</i>	5'ctgcgacgctcacaccgatacc	5'tcaccgaagttcatgccagtcac	441	5'biotin-gaatacggcgtggatacgttagcc

* 收稿日期: 2002-05-08

基金项目: 广东出入境检验检疫局科研项目 (GDK16-2000)

作者简介: 陈茹 (1968 年生), 女, 硕士, 高级工程师; E-mail: ychenrui@sina.com

1.3 试剂

Dig-PCR-ELISA 试剂, Roche 产品。100 bp DNA: Gibco 产品。

1.4 方法

1.4.1 水稻样品 DNA 的提取 采用 Qiagen 植物 DNA 纯化试剂盒, 从 1.1 所列 6 种转基因水稻的米粒或叶片中提取 DNA 进行本研究。

1.4.2 Dig-PCR 标记 采用 100 μ L 反应体积, 含 10 $\times$ PCR 缓冲液 10 μ L, 25 mmol/L $MgCl_2$ 8 μ L, 10 mmol/L dNTP 2 μ L, 50 μ mol/L 上、下游引物各 2 μ L, 模板 DNA 0.5 μ g, *Taq* 酶 1 unit, 设阴性模板对照和空白 (以双蒸水为模板) 对照。

1.4.3 Dig-PCR 反应条件 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 循环采用 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, *hpt*、*bar* 基因采用 55 $^{\circ}$ C、*gus* 基因 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, *p35S*、*Tnos* 基因采用 56 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 延伸条件: *hpt*、*bar*、*gus* 基因均采用 72 $^{\circ}$ C 1 min, *p35S*、*Tnos* 基因采用 72 $^{\circ}$ C 20 s, 进行 30~35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

1.4.4 Dig-PCR 电泳检测 采用 $\rho = 2\%$ 琼脂糖, TBE 电泳缓冲液, 60 V 电泳。

1.4.5 Dig-ELISA 检测 检测程序如下: 取 1~10 μ L Dig-PCR 产物, 与 20~40 μ L 变性缓冲液混匀, 室温放置 10 min, 加 200 μ L 生物素标记的寡核苷酸探针 (10 pm/mL), 混匀, 按每孔 200 μ L 加到链霉亲和素包被的微孔板, 55 $^{\circ}$ C 反应 1.5 h, 倾去反应液, 用洗涤缓冲液洗 6 次, 每次浸泡 2~3 min; 每孔加入 200 μ L 100 倍稀释的酶标物, 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min, 同上洗涤 6 次, 每孔加入 200 μ L ABTS 底物液, 室温, 避光放置 20~30 min, 肉眼观察显色反应, 测 A_{405} , 拍照记录。

2 结果

2.1 Dig-PCR 标记反应

对含上述 5 种基因的转基因水稻样品 (各样品分别含 1~3 种基因) 分别进行 Dig-PCR 标记反应, 其中, 对 *p35S* 基因标记了 5 种样品, 对 *Tnos* 和 *hpt* 基因分别标记了 4 种样品, 对 *bar*、*gus* 基因各标记了 1 种样品; 各组基因的标记反应均同时设阴性、空白对照。

分别取 10 μ L 标记产物进行电泳检测, 结果显示, 各基因对应的转基因样品均有特异的标记扩增产物, 各组阴性、空白对照均无扩增产物 (图 1)。

2.2 Dig-ELISA 检测

分别取各标记产物 1 μ L, 进行上述 5 种基因的 Dig-ELISA 检测试验。检测结果, 所有转基因样品均呈典型的阳性反应, 反应孔呈绿色或墨绿色, 而



图 1 标记产物的电泳检测图

Fig.1 Agarose gel electrophoretic analysis of Dig-PCR products

I: *Tnos* 基因产物; II: *hpt* 基因产物

1: 100 bp DNA 标准相对分子质量;

2~5: GMOs 水稻样品;

6: 阴性对照; 7: 空白对照

阴性对照及空白对照反应孔均呈无色 (图 2); 用酶标仪检测 A_{405} 值, 阳性样品的 A_{405} 值为 1.5~3.0, 而阴性对照和空白对照的数值为 0.13~0.2。

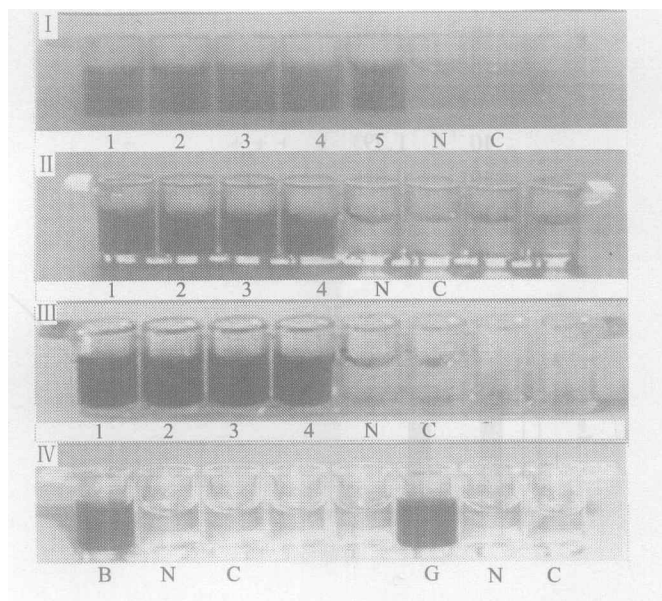


图 2 5 种基因的 Dig-ELISA 检测试验结果

Fig.2 Dig-ELISA detection results of the 5 genes

I: *p35S*; II: *Tnos*; III: *hpt*; IV: *bar* and *gus*

1~6: GMOs 水稻样品;

B: GMOs 水稻样品 (*bar* 基因);

G: GMOs 水稻样品 (*gus* 基因);

N: 阴性对照; C: 空白对照

2.3 Dig-PCR-ELISA 检测敏感性试验

2.3.1 倍比稀释标记产物检测试验 取 SH 品种的转基因水稻样品, 分别对 *p35S*、*Tnos* 基因进行检测敏感性试验。将标记产物做 10 倍倍比稀释, 取原液 (100) 5 μ L, 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 稀释样品各 10 μ L 进行 Dig-ELISA 检测, 同时设阴

性模板对照和空白对照 (10 μ L); 同时做 3 组平行试验; 最终检测结果, 以空白对照样品的 A 平均值做为本底值, 各样品所对应的 A 均为 3 组试验的平均值减去本底值 (图 3)。

检测结果, $p35S$ 、 $Tnos$ 检测敏感性均可达 10^{-3} , 2 个基因的 10^{-3} 稀释样品所对应的反应孔呈现很淡的绿色; 取 10 μ L 10^{-1} 标记产物进行电泳检测, 结果显示, 样品未能在凝胶中呈现清晰条带; 对比试验表明, Dig-ELISA 检测比电泳检测可提高敏感性达 1 000 倍 (表 2)。

表 2 倍比稀释标记产物的
PCR-ELISA 及电泳检测结果

Tab.2 PCR-ELISA and electrophoresis detection results of
serial diluted dig labeling products

样品		A_{405}	PCR-ELISA	电泳
$P35S$	10^0	2.858	++++	+
	10^{-1}	0.567	++	-
	10^{-2}	0.273	+	-
	10^{-3}	0.022	+	-
	10^{-4}	0.002	-	-
$Tnos$	10^0	2.846	++++	+
	10^{-1}	1.793	+++	-
	10^{-2}	0.315	++	-
	10^{-3}	0.042	+	-
	10^{-4}	0.001	-	-

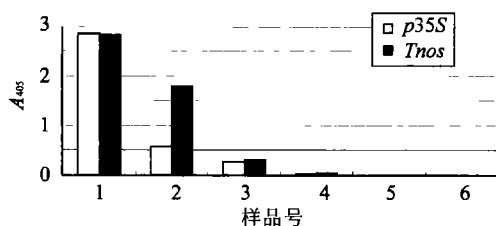


图 3 倍比稀释标记产物检测敏感性试验

Fig.3 Dig-ELISA sensitive detection results of $p35S$,
 $Tnos$ gene serial diluted dig-products

1: 未稀释产物;
2-5: 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 不同比例稀释产物;
6: 阴性对照

2.3.2 GMOs 含量敏感性检测试验 取 SH 品种转基因水稻样品适量, 与非转基因水稻样品按不同比例相混合, 制成 5%, 2%, 1%, 0.1%, 0 (GMO/非 GMO) 样品, 分别提取核酸后, 同时进行 hpt 基因 Dig-PCR-ELISA 检测, 并设空白对照; 每一样品均同时做 2 组平行 Dig-ELISA 检测, 以空白对照样品的 A_{405} 值平均值做为本底值, 各样品的最终检测

数值均取其各自的平均值减去本底值。结果表明, 检测敏感性可达 0.1%, 对应的反应孔呈现淡绿色, 如图 4, 检测数值见图 5。

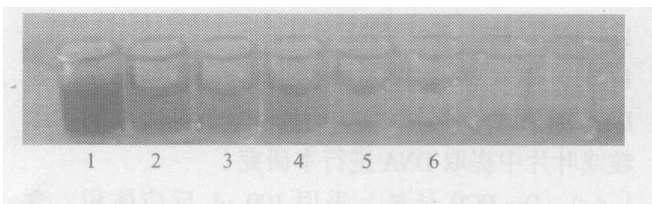


图 4 GMOs 含量敏感性检测试验图

Fig.4 Dig-PCR-ELISA sensitive detection picture
of different percentage of GMOs samples

1-5: GMOs/非 GMOs = 5%, 2%, 1%, 0.1%, 0;
6: 空白对照

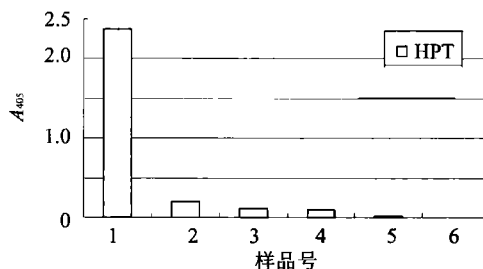


图 5 吸光度值矩形图

Fig.5 Absorbance values & histogram of Fig 4

1-5: GMOs/非 GMOs = 5%, 2%, 1%, 0.1%, 0

3 讨论和小结

本研究建立了快速检测植物转基因背景的 Dig-PCR-ELISA 方法。

Dig-PCR-ELISA 技术包括 PCR 及对 PCR 产物的杂交检测, 并通过引入酶促显色系统结合了 ELISA 技术的特点, 特异性和敏感性均比常规 PCR 结合电泳检测有明显提高; 检测结果可数值化表达, 能实现半定量检测; 国际上已认可应用 PCR 技术进行转基因定性检测, 但强调需应用酶切、杂交或测序等方法对 PCR 产物做进一步确证^[7], Dig-PCR-ELISA 检测包含核酸杂交, 但不需分离纯化 PCR 产物, 操作简化, 且所需的全套试剂及生物素包被的酶标板均已商品化, 检测技术更易实现标准化。以上特点使 Dig-PCR-ELISA 应用于转基因检测比定性 PCR 法更能满足国际需求。

本研究进行比较检测试验, 结果表明, Dig-PCR-ELISA 检测比常规电泳检测可提高敏感性达 1 000 倍; 根据本研究小组进行的检测试验, 在样品制备条件完全一致的前提下, Dig-PCR-ELISA 可检测含量达 0.1% 的转基因样品, 而常规 PCR 的检测极限为 1% ~ 2%。为验证 Dig-PCR 引物及反应条

件的特异性,本研究在同样条件下对上述4种基因均进行常规PCR检测,并对PCR产物进行序列分析,结果表明,所测得的序列与Genebank中各基因的相应序列相吻合。说明本研究所采用的Dig-PCR条件特异可靠。

Dig-ELISA非常敏感,必须严格控制检测条件,否则易出现假阳性。本研究通过以下方法提高检测特异性:①探针设计尽可能采用高GC比序列,并将杂交温度设置在55℃高温(试剂盒要求设置的温度为37~55℃);②洗涤步骤,每轮均洗6次,每次均振荡浸泡2~3 min,第1、2轮洗涤,分别采用55℃、37℃预温洗涤液。检测结果,阴性样品的A均与空白对照非常接近,而与阳性样品有明显差异,说明非特异性杂交造成的本底干扰基本去除。

本研究针对的4种转基因具有普遍意义。主要的转基因水稻品种及绝大多数商品化的转基因植物中,含有35S启动子和NOS终止子^[6,8]; *hpt* 做为选择标记在禾谷类作物中最常使用,来源于吸水链霉菌的 *bar* 基因是最有价值的选择标记,而 *gus* 做为报告基因在水稻等作物的遗传转化中亦被广泛采用^[8]。因此,本研究所建立的检测方法在GMOs检测方面有较广泛的应用前景。

致谢 中国水稻研究所黄大年教授、中国科学院遗传研究所朱祯教授、陈受宜教授、中山大学李宝健教授、许新萍教授、上海出入境检验检疫局潘良文高工,在百忙中提供珍贵转基因样品和研究材料,在此衷心感谢!

参考文献:

- [1] 黄冠胜,林伟,王力舟,等.从WTO通报看各国对转基因食品的管理[J].中国检验检疫,2001(9):45.
- [2] 田文忠,丁力,曹守云,等.植物抗毒素转化水稻和转基因植株的生物鉴定[J].植物学报,1998,40(9):803-808.
- [3] 黄大年,李敬阳,章善庆,等.用抗除草剂基因快速检测和提高杂交稻纯度的新技术[J].科学通报,1998,43(1):67-69.
- [4] MUNCH M, NIELSEN L P, HANDBERG K J. Detection and subtyping(H5 and H7) of avian type A influenza virus by reverse transcription-PCR and PCR-ELISA[J]. Arch Virol, 2001,146:87-97.
- [5] SHAMLOOL A M, HADIDI A. Sensitive detection of potato spindle tuber and temperate fruit tree viroids by reverse transcription polymerase chain reaction-probe capture hybridization[J]. J Virol Methods, 1999,80:145-155.
- [6] PIETSCH K, WAIBLINGER H U, BRODMANN P, et al. Screeningverfahren zur identifizierung gentechnisch veränderter Lebensmittel[J]. Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 1997,93:35-39.
- [7] KUIPER H A. Summary report of the ILST Europe workshop on detection methods for novel foods derived from genetically modified organisms[J]. Food Control, 1999,10:339-349.
- [8] 徐子勤.重要禾谷类植物转基因研究[J].生物工程进展,2001,21(1):59-74.

Rapid and Sensitive Detection of Transgenic Rice Gene by Digoxigenin Labeled PCR-ELISA

CHEN Ru, LIN Zhi-xiong, LIU Lin-lin, ZHU Dao-zhong, YU Hai-qiong

(The Animal Quarantine Laboratory, Guangzhou Entry-exit Inspection & Quarantine of
the People's Republic of China, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Digoxigenin labeled PCR-ELISA (Dig-PCR-ELISA) methods were developed for detection of ³⁵S-promoter gene (*p35S*), NOS-terminator gene (*Tnos*), hygromycin B phosphotransferase gene (*hpt*), *Streptomyces hygrosopicus bar* gene (*bar*), and beta-glucuronidase gene (*gus*) that commonly existed in transgenic rice (GMOs Rice). Several strains of GMOs Rice were successfully detected. The Dig-labeled PCR products were detected via ELISA by using specific probe capture hybridization. The methods were about 1 000 times more sensitive than detection of PCR products by agarose gel electrophoresis. The specificity of the PCR-ELISA were strengthened by applying high GC content probe sequences thus high hybridization temperature, as well as strict washing condition. Samples containing 0.1% GMOs products could be detected. The whole procedure could be finished within one day.

Key words: Dig-PCR-ELISA; transgenic rice; GMOs