

应用单管巢式和半巢式 PCR 检测 转基因玉米 MON89034

闫伟, 李葱葱, 夏蔚, 邵改革, 李飞武

(吉林省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 长春 130033)

摘要: 根据 MON89034 玉米的 5' 端和 3' 端边界序列分别设计 1 组转化体特异性的巢式 PCR 引物, 采用中途进退式 PCR 策略建立 MON89034 玉米的转化体特异性检测方法, 扩增产物分别为 491 bp 和 188 bp。以转基因玉米 MON89034 及 8 种其他转基因作物为材料, 证明此方法对 MON89034 玉米具有高度特异性。灵敏度测试结果表明, 此方法的相对检出限达到 0.01%, 绝对检出限为 4 个单倍体基因组拷贝数, 比普通 PCR 提高了 5 倍。建立的单管巢式和半巢式 PCR 方法可准确、高效地检测转基因玉米 MON89034 及其产品。

关键词: 转基因玉米; 巢式 PCR; 中途进退式 PCR; 转化体特异性检测

中图分类号: S513.037

文献标识码: A

Event-specific Detection of Genetically Modified Maize MON89034 Based on the Single Tube Nested and Semi-nested PCR

YAN Wei, LI Cong-cong, XIA Wei, SHAO Gai-ge, LI Fei-wu

(Institute of Agricultural Quality Standard and Testing Technology,

Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

Abstract: The two sets of event-specific nested PCR primers were designed based on the 5' - and 3' - flanking sequence of the exogenous integrant of GM maize MON89034 respectively, with the aim of developing a drop-in drop-out PCR assay for the event-specific detection of GM maize MON89034, resulting in two amplification fragment of 491 bp and 188 bp in length respectively. This assay has been successfully applied to distinguish GM maize MON89034 from GM maize MON810, MON863, Bt11, Bt176, MON88017, GM roundup ready soybean and GM canola GT73 with high specificity. Sensitivity test results showed that the relative limit of detection of this method reaches 0.01%, equivalent to the absolute sensitivity of 4 copies of haploid genome, which was 5 times more than conventional PCR. Consequently, the single tube nested and semi-nested PCR assay established in this study can be used to accurately and efficiently detect GM maize MON89034 and its processed products.

Key words: Genetically modified maize; Nested PCR; Drop-in drop-out PCR; Event-specific detection

随着转基因技术的快速发展及商业化应用的稳步推进,越来越多的转基因食品进入人们的日常生活,已商业化的转基因食品有转基因玉米、大豆、油菜、番木瓜、茄子、南瓜等^[1]。与此同时,人们围绕转

基因食品安全性的争论广泛存在。为使社会公众的知情权和选择权得到保障,我国于 2002 年颁布了《农业转基因生物标识管理办法》,要求列入标识目录的转基因生物及其产品必须予以标识^[2]。

转基因成分精准检测技术是标识管理制度得以顺利实施的技术支撑。依据检测靶标分子的不同,转基因成分检测方法可分为核酸检测方法和蛋白质检测方法。其中,以外源 DNA 为检测靶标的 PCR 方法具有适用性广、特异性强、灵敏度高等特点,在实际检测中应用最为广泛,几乎每一种商业化的转基因作物均有相应的转化体特异性 PCR 检测方法^[3]。新技术和新设备的涌现促成了转基因成分检测技术

收稿日期: 2016-04-07

基金项目: 国家转基因生物新品种培育科技重大专项课题(2016ZX08012-001)、吉林省农业科技创新工程项目(2013)

作者简介: 闫伟(1984-),女,吉林四平人,助理研究员,硕士,主要从事转基因植物检测工作。Tel:0431-87063122

E-mail: jlydyanwei@126.com

李飞武为本文通讯作者。E-mail: lifeiwu3394@sina.com

的不断发展,从早期的普通PCR、实时荧光PCR到数字PCR,精确度越来越高^[4]。巢式PCR是在普通PCR基础上发展起来的一种PCR技术,该技术利用1对外引物和1对内引物,通过2轮扩增可实现对靶标DNA序列的高效扩增^[5]。通常情况下,内引物位于靶核苷酸序列上的外引物结合位点的内侧,也有1条引物同时用于2轮PCR的情况,称为半巢式PCR。巢式和半巢式PCR均可显著提高检测灵敏度,已应用于转基因作物的检测方法研究^[6]。

经典的巢式和半巢式PCR均需进行2轮扩增,涉及2次加样操作,既不方便,也增加了交叉污染风险。Erich提出了一种称为“中途进退式PCR”的策略,通过引物的特殊设计和退火温度的不对称设置,将外引物和内引物同时放入同一管PCR体系中,最初若干个循环使用较高的温度退火,仅外引物引发靶核苷酸序列的扩增,随后通过降低退火温度,内引物开始以外引物的扩增产物为模板进行靶序列扩增,从而在单管中实现靶序列的高灵敏度扩增,因此也称作单管巢式PCR。该技术主要应用于医学和食品检验,在转基因检测中鲜有报道^[7-8]。

转基因玉米MON89034是美国孟山都公司研发的抗虫转基因玉米新品种,已获得包括我国在内的多个国家和地区的许可,是转基因食品标识管理对象。本研究以MON89034玉米为研究对象,依据其5'端和3'端边界序列各设计1组巢式PCR引物,并采用中途进退式PCR策略,建立一种能特异性检测

MON89034玉米转化体且比普通PCR灵敏度更高的单管巢式和半巢式PCR检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

供试材料为转基因玉米MON89034、MON810、MON863和MON88017,转基因大豆GTS40-3-2,转基因棉花MON531,转基因油菜GT73(由孟山都公司研发);转基因玉米Bt11、Bt176(由瑞士先正达公司研发);非转基因玉米郑单958购自本地市场。植物基因组DNA提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;HS Taq DNA聚合酶、DNA分子量Marker等购自大连宝生物工程有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA提取与纯化

按植物基因组DNA提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司,货号为DP305)的使用说明书提取所有样品的基因组DNA。使用ND1000分光光度计(Thermo Fisher公司)检测样品DNA的浓度和质量,用TE缓冲液将DNA稀释至50 mg/L,备用。

1.2.2 引物设计

以转基因玉米MON89034的5'端和3'端边界序列(外源插入片段与玉米基因组的连接区序列)为靶标序列,利用Primer premier 5.0软件分别设计5'端和3'端的巢式PCR检测引物,并由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物信息详见表1。

表1 转基因玉米MON89034特异性PCR检测引物

Table 1 Primers of event-specific PCR for genetically modified maize MON89034

检测对象 Target	名称 Name	序列(5'-3') Sequence
5'端边界序列	5-FW	AAACAGCAGAGCCGATCTCCGCACGGAAACCC
	5-RW	GGGACCACTGTCGGCAGAGGCATCTTCAACGA
	5-FN	GGCCATTCAAATTCAGGTGC
	5-RN	TGACAGGTAGGATCGGAAAAGCT
3'端边界序列	3-FW	TTATTGCTTTCGCCTATAAATACGACGGATCG
	3-RW	GTATTAGGCAAAAGCTAGATGTCCATGAAGA
	3-FN	ATAATAACGCTGCGGACATCTA
	3-RN	GAAGAACTTTGGGTTGAAATG

1.2.3 单管巢式和半巢式PCR

5'端采用半巢式PCR体系,25 μL反应体系包括:1×PCR缓冲液(含Mg²⁺),0.2 mmol/L dNTP,2 nmol/L正向外引物(5-FW),0.2 μmol/L反向外引物(5-RW),0.2 μmol/L正向内引物(5-FN),1.5U HS Taq DNA聚合酶,100 ng样品DNA。

3'端采用巢式PCR体系,25 μL反应体系包括:1×PCR缓冲液(含Mg²⁺),0.2 mmol/L dNTP,2 nmol/L正向外引物(3-FW)和反向外引物(3-RW),0.2 μmol/L正向内引物(3-FN)和反向内引物(3-RN),1.5U HS Taq DNA聚合酶,100 ng样品DNA。

PCR反应程序为94℃预变性5 min,94℃变性

30 s, 72°C延伸40 s, 共进行15个循环; 94°C变性30 s, 56°C退火30 s, 72°C延伸30 s, 共进行30个循环; 72°C延伸7 min。PCR结束后, 用20 g/L的琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物。

1.2.4 普通PCR

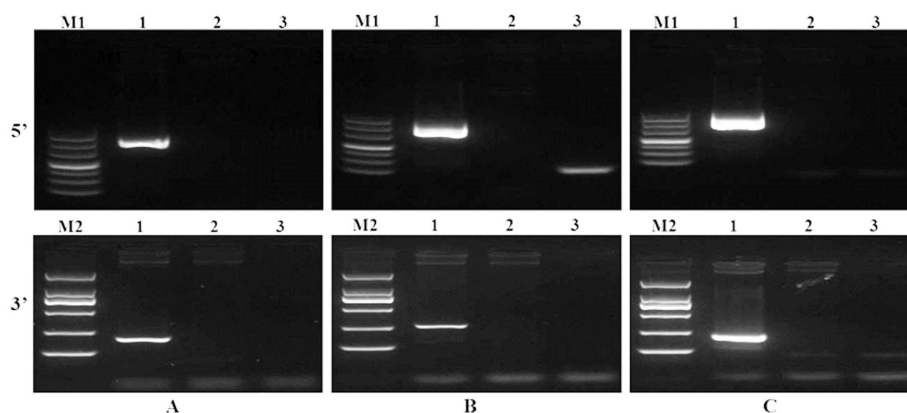
采用25 μ L反应体系, 包括: 1 \times PCR缓冲液(含 Mg^{2+}), 0.2 mmol/L dNTP, 0.2 μ mol/L正向内引物(FN)和反向内引物(RN), 1 U HS Taq DNA聚合酶, 100 ng样品DNA。

PCR反应程序为94°C预变性5 min, 94°C变性30 s, 56°C退火30 s, 72°C延伸30 s, 共进行35个循环; 72°C延伸7 min。PCR结束后, 用20 g/L的琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物。

2 结果与分析

2.1 检测引物体系筛选

中途进退式PCR策略既可采用巢式引物(2条外引物和2条内引物), 也可采用半巢式引物(2条外引物和1条内引物)。本研究对这两种方式均进行测试, 结果表明, 对于5'端和3'端边界序列, 无论是使用巢式引物(FW/RW/FN/RN)还是半巢式引物(FW/RW/FN或FW/RW/RN), 均能获得良好的扩增结果(图1)。根据筛选结果, 5'端和3'端分别选择半巢式检测体系(FW/RW/FN)和巢式检测体系(FW/RW/FN/RN), 用于后续分析。



注: A为巢式引物体系(FW/RW/FN/RN); B为半巢式引物体系(FW/RW/RN); C为半巢式引物体系(FW/RW/FN)。M1为DL500 DNA分子量标准; M2为DL2000 DNA分子量标准; 1~3分别为MON89034、非转基因玉米郑单958、空白对照。

Note: A, nested primers(FW/RW/FN/RN); B, semi-nested primers(FW/RW/RN); C, semi-nested primers(FW/RW/FN). M1, DL500 DNA marker; M2, DL2000 DNA marker; 1, MON89034; 2, non-GM maize Zhengdan958; 3, blank control.

图1 检测引物体系筛选

Fig.1 Primers testing for the single tube nested and semi-nested PCR

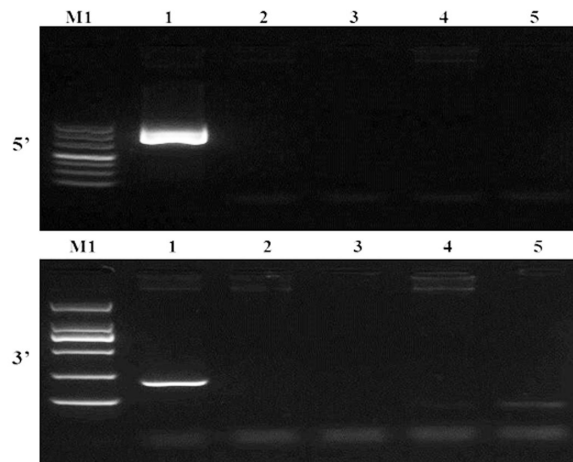
2.2 检测方法特异性测试

以转基因玉米 MON810、MON863、Bt11、Bt176、MON88017, 转基因大豆 GTS40-3-2, 转基因棉花 MON531 和转基因油菜 GT73 等转化体作为试验对象, 测试 MON89034 玉米的单管巢式和半巢式 PCR 方法的特异性。采用试剂盒方法提取上述样品的基因组 DNA, 将5种转基因玉米的DNA等量混合成1个样品, 将其他3种转基因作物的DNA等量混合成1个样品, 混合样品中每种转化体的DNA含量为10 ng/ μ L。

由图2所示, 基于两端边界序列建立的单管巢式和半巢式PCR检测方法均能特异性地从MON89034玉米中获得预期的扩增片段, 而在其他测试样品中未得到任何扩增, 表明本研究建立的检测方法对MON89034玉米具有高度特异性。

2.3 检测方法灵敏度测试

以非转基因玉米郑单958作为填充物, 制备MON89034玉米质量分数分别为5%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、0.01%的测试样品, 用于单管巢式和半巢式PCR方法的灵敏度测试。图3结果显示, 使用基于两端边界序列的单管巢式和半巢式PCR检测方法, 均可从MON89034玉米质量分数为0.01%的样品中检测到预期产物, 表明该方法的检测灵敏度可达0.01%, 根据玉米单个基因组拷贝的质量约2.7 pg计算^[9], 绝对检出限为4个单倍体基因组拷贝数。比较单管巢式和半巢式PCR与普通PCR方法的灵敏度, 本研究还利用5'端和3'端的内引物, 对上述样品进行普通PCR检测, 结果表明, 前者的灵敏度显著优于后者(普通PCR方法检测灵敏度为0.05%)。

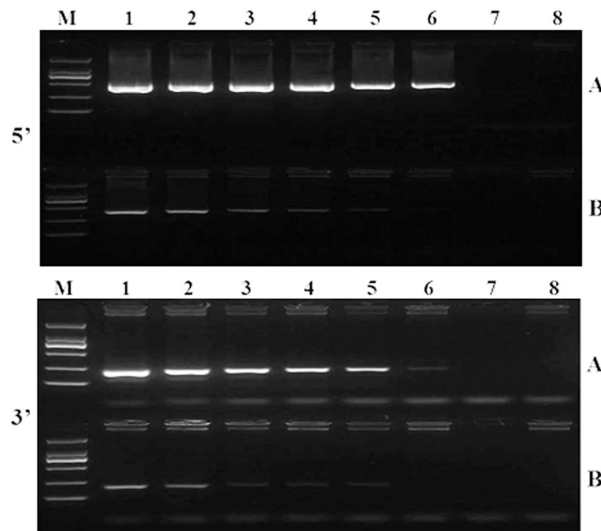


注: M1为DL500 DNA分子量标准; M2为DL2000 DNA分子量标准; 1~5分别为MON89034、其他转基因玉米混合物、其他转基因作物混合物、非转基因玉米郑单958、空白对照。

Note: M1, DL500 DNA marker; M2, DL2000 DNA marker; 1, MON89034; 2, GM maize mixture with MON810, MON863, Bt11, Bt176 and MON88017; 3, GM crop mixture with GTS40-3-2, MON531, GT73; 4, non-GM maize Zhengdan958; 5, blank control.

图2 检测方法的特异性测试

Fig.2 Specificity of the single tube nested and semi-nested PCR



注: A为单管巢式和半巢式PCR; B为普通PCR; M为DL 2000 DNA分子量标准; 1为5% MON89034; 2为1% MON89034; 3为0.5% MON89034; 4为0.1% MON89034; 5为0.05% MON89034; 6为0.01% MON89034; 7为非转基因玉米郑单958; 8为空白对照。

Note: A, single tube nested and semi-nested PCR; B, conventional PCR. M, DL2000 DNA marker; 1, 5% MON89034; 2, 1% MON89034; 3, 0.5% MON89034; 4, 0.1% MON89034; 5, 0.05% MON89034; 6, 0.01% MON89034; 7, non-GM maize Zhengdan958; 8, blank control.

图3 检测方法的灵敏度测试

Fig.3 Sensitivity of the single tube nested and semi-nested PCR

3 结论与讨论

根据靶核苷酸序列的来源不同,转基因成分PCR检测方法的特异性分为筛选、基因、构建、转化体4个层次,其中,转化体特异性检测方法以插入片段与受体植物基因组的连接区序列为靶标,特异性最强,已成为转基因产品特异性检测方法研究的首选^[10]。本研究建立的MON89034玉米的单管巢式和

半巢式PCR检测方法同样采用了转化体特异性的检测策略,可实现对MON89034玉米的精准检测。

利用巢式和半巢式PCR可显著提高检测灵敏度,多数研究者应用该技术时采用两步法^[11],即在第1轮PCR结束后,取第1轮的产物作为第2轮PCR的模板,这样不仅操作较为复杂,而且会增加污染风险,从而产生假阳性结果。本研究借鉴前人研究思路^[12],通过设计退火温度较高的外引物和正常退火

温度的内引物,提高热不对称PCR反应程序的退火温度,实现在同一个反应体系中完成2轮PCR,有效降低污染风险。在灵敏度方面,单管巢式和半巢式PCR方法的灵敏度均显著优于普通PCR方法^[13],表明前者在低含量转基因样品的检测中具有更大的优势。

参考文献:

- [1] Clive James. Global status of commercialized biotech/GM Crops: 2014[R]. Ithaca, NY: ISAAA, 2014.
- [2] Zhang D B, Guo J C. The development and standardization of testing methods for genetically modified organisms and their derived products[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2011, 53(7): 539–551.
- [3] JCR Gmmethods[OB]. <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmo-methods/>.
- [4] Marie A F, Philippe H, Isabel T, et al. Current and new approaches in GMO detection: challenges and solutions[J]. *Bio Med Research International*, 2015, 392872.
- [5] Erlich H A, Gelfand D, Sninsky J J. Recent advances in the polymerase chain reaction[J]. *Science*, 1991, 252: 1643–1651.
- [6] 敖金霞, 高学军, 于艳波, 等. 转基因大豆、玉米、水稻深加工产品的五重巢式PCR技术检测[J]. *中国农业大学学报*, 2010, 15(2): 93–99.
Ao J X, Gao X J, Yu Y B, et al. Detection of transgenic soybean, maize and rice in highly processed products by multiple nested PCR [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2010, 15(2): 93–99. (in Chinese)
- [7] Xia H Y, Gravelsina S, Öhrmalm C, et al. Development of single-tube nested real-time PCR assays with long internally quenched probes for detection of norovirusgenogroup II[J]. *Biotechniques*, 2016, 60(1): 28–34.
- [8] 闫伟, 徐桢惠, 龙丽坤, 等. 应用单管巢式PCR技术筛查转基因食品[J]. *食品科学*, 2015, 36(2): 194–197.
Yan W, Xu Z H, Long L K, et al. Screening of genetically modified foods by single-tube semi-nested PCR[J]. *Food Science*, 2015, 36(2): 194–197. (in Chinese)
- [9] Arumuganathan, Earle E D. Nuclear DNA content of some important plant species[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1991, 9(3): 208–218.
- [10] Wang W X, Zhu T H, Lai F X, et al. Event-specific qualitative and quantitative detection of transgenic rice Kefeng-8 by characterization of the transgene flanking sequence[J]. *European Food Research and Technology*, 2012, 234(3): 477–484.
- [11] 闻伟刚, 盛蕾, 张吉红, 等. 痕量及微量转基因大米成分半巢式PCR检测方法的建立[J]. *食品科学*, 2008, 29(12): 622–626.
Wen W G, Sheng L, Zhang J H, et al. Establishment of semi-nested PCR detection method for trace transgenic rice materials[J]. *Food Science*, 2008, 29(12): 622–626. (in Chinese)
- [12] 姚芹, 宋浩, 陈枫. 食用精炼大豆油DNA提取及单管巢式PCR检测[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(21): 183–186.
Yao Q, Song H, Chen F. DNA extraction from soybean oil and detection of genetically modified components by single-tube nested PCR[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 34(21): 183–186. (in Chinese)
- [13] 李飞武, 李葱葱, 刘娜, 等. 抗虫玉米MON89034转化体特异性PCR检测技术研究[J]. *玉米科学*, 2010, 18(4): 40–44.
Li F W, Li C C, Liu N, et al. Event-specific qualitative PCR method for detection of maize line MON89034[J]. *Journal of Maize Sciences*, 2010, 18(4): 40–44. (in Chinese)

(责任编辑: 朴红梅)