

利用复合 PCR 结合 DNA 芯片的方法进行快速转基因事件检测

肖一争¹, 唐咏¹, 宛煜嵩², 金芜军²

(1. 沈阳农业大学, 沈阳 110161; 2. 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

摘要:以我国批准进口用作加工原料的 6 种转基因玉米为材料, 根据其外源基因、载体构建及插入位点, 应用 6 对特异性引物及 35S、NOS 引物, 设计并优化了复合 PCR 反应体系, 对其进行转基因成分检测。同时尝试利用复合 PCR 与 DNA 芯片相结合, 对不同转基因玉米混合样品进行检测, 探索建立转基因事件快速检测和确认方法。

关键词:转基因玉米; 复合 PCR; DNA 芯片

中图分类号: Q813

文献标识码: A

文章编号: 1008-0864(2007)04-0101-07

Coupling Multiplex PCR with DNA Chips to Rapidly Detect and Identify Genetically Modified Events

XIAO Yi-zheng¹, TANG Yong¹, WAN Yu-song², JIN Wu-jun²

(1. Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161; 2. Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: A multiplex PCR system was designed and optimized with 35S and Nos primer and other 6 special primers which are designed according to inserted genes, plasmid constructions and inserted sites to detect 6 transgenic maize events which are permitted to import as product material by China. A primarily designed DNA chip coupled with the multiplex PCR system was also used to detect mixed GM maize samples. We attempted to construct a rapid GM maize events detection and confirmation method.

Key words: GM maize; multiplex PCR; DNA chips

自 1983 年世界首例转基因植物问世、1994 年首次商业化种植转基因作物以来, 转基因作物研发及商业化应用日趋活跃, 近 10 年来更呈迅猛增长之势, 1996—2007 年全球累计种植转基因作物面积已达 4.75 亿 hm^2 ^[1]。同时, 国际社会关于转基因作物环境和食品安全性问题也发生了激烈争论^[2]。世界上许多国家和地区一方面大力加强转基因技术研发, 以期充分利用转基因技术在解决人类所面临的粮食安全、环境恶化、资源匮乏、效益衰减等问题上的巨大潜力; 另一方面又对转基因作物环境释放和市场销售采取严格的管理措施, 以保障本国利益和生物安全, 促进生物技术产业健康发展。实施转基因产品标识管理是转基因生物安全管理中的一项重要内容, 我国也制订

了相应的转基因产品的标识管理法规, 转基因玉米被列入农业部发布的第一批标识管理目录^[3]。

转基因检测是转基因产品标识的技术前提。目前, 转基因作物的检测通常采用聚合酶链式反应 (PCR) 来对转基因成分进行检测。根据检测水平的不同可分为筛选检测、基因特异性检测、构建特异性检测和转化事件特异性检测^[4]。筛选检测通常是检测 35S 启动子和 NOS 终止子, 这两种 DNA 元件广泛应用于不同转基因作物中, 但在自然界中也广泛存在, 筛选检测方法常常会出现假阳性结果, 因此通常仅用于初步筛选鉴定。基因特异性检测方法通常检测外源基因目的片段, 如利用 *epsps* 基因来检测抗草甘膦除草剂的转基因大豆^[5]。构建特异性检测是对以外源基因和调

收稿日期: 2007-06-05; 修回日期: 2007-07-16

基金项目: 国家“863”计划项目转基因食品安全性评价与转基因农产品检测方法研究 (2004AA212222) 资助。

作者简介: 肖一争, 硕士研究生, 研究方向为转基因植物检测。通讯作者: 金芜军, 副研究员, 博士, 主要从事转基因生物安全研究。

Tel: 010-68919852; E-mail: jinwujun1218@hotmail.com

控元件连接处进行检测,如转基因玉米 T25、NK603、BT176 等的构建特异性检测^[6]。由于同一基因或同一载体可能用于多次不同的遗传转化操作,甚至用于不同作物的转化,因此,基因特异性检测和构建特异性检测不能充分说明转基因作物的转化事件来源。转化事件特异性检测是通过对外源基因与作物基因组 DNA 连接处设计引物进行检测,可以追溯到植物遗传转化操作中特定的外源 DNA 插入事件,确认转基因作物的最终来源,如 MON810 的转化事件特异性检测^[7]。

复合 PCR(multiplex PCR)可以高效地在一个反应体系内同时扩增两个或两个以上的外源目的基因,因此可以用于多个转基因事件的同时检测。复合 PCR 需注意引物之间的竞争作用,以及样品的纯度和含量,只有适当的引物及反应条件才能使所有的外源目的基因得到有效的扩增。Knut 等利用复合 PCR 同时检测了 7 种转基因玉米^[8]; Peanoa 等利用复合 PCR 检测了 Roundup Ready 大豆和 4 种转基因玉米的 7 种元件^[9]。因此,一旦建成合适的体系,复合 PCR 相较常规 PCR 更为便捷、高效。PCR 产物常用采用琼脂糖凝胶电泳检测产物大小,凝胶的浓度、PCR 产物的量等因素都会影响电泳结果,特别是当产物量很少时,往往观察不到结果,可能会造成了假阴性的结果;而只检测产物大小又不能排除假阳性的产生。DNA 芯片利用固定在玻璃片上的一系列寡核苷酸作为探针,与特异的 PCR 产物进行杂交来检测阳性信号,是一种高通量、灵敏的检测方法^[10, 11]。

本研究以我国批准进口用作加工原料的转基因玉米 MON810、BT11、BT176、T25、GA21 和 NK603 为实验材料,用玉米 *zein* 基因作为玉米的内参照基因,用 35S 和 NOS 引物对 6 种转基因玉米进行筛选检测,同时根据 6 种转基因玉米中插入的外源基因的结构设计了 6 对引物,利用复合 PCR 进行特异性检测。我们还探索性地根据检测的目的片段设计了 8 个探针的 DNA 芯片,以期建立快速、准确和灵敏的转基因玉米事件检测方法。

1 材料和方法

1.1 供试材料

以通过我国生物安全性评价允许作为加工原料进口的转基因玉米 MON810、BT11、BT176、

T25、GA21、NK603 为材料(表 1),非转基因玉米鲁玉 10 用做阴性对照。

1.2 试剂

DNA 提取采用本实验室研制的 DNA 提取试剂盒;Taq DNA 聚合酶购自 Takara 公司;DNA 分子量标记(100bp DNA Ladder)购自 TIANGEN 公司;Biotin-dUTP 标记混合物购自深圳依诺金生物科技有限公司;PCR 产物纯化试剂盒购自全式基因公司。检测芯片于上海百傲科技有限公司定制;DNA 芯片检测试剂盒购自上海百傲科技有限公司。

1.3 检测的引物和探针

35S、NOS、转基因玉米 MON810、BT11、BT176 和 T25 引物序列来源于 Knut 等^[8],由上海生工公司合成,转基因玉米 GA21 和 NK603 检测引物由本实验室设计并由上海生工公司合成。35S、NOS、转基因玉米 MON810、BT11、BT176、T25、和 GA21 capture 探针序列来源于 Knut 等^[8],由上海生工公司合成,转基因玉米 GA21 和 NK603 检测探针由本实验室设计,并由上海生工公司合成(表 2)。

1.4 DNA 提取及制备

用本实验室研制的 DNA 提取试剂盒,从 6 种转基因玉米 MON810、BT11、BT176、T25、GA21、NK603 和非转基因玉米的种子中提取 DNA。紫外分光光度计测定 DNA 纯度和浓度。将 DNA 溶液稀释到 $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,用于 PCR 扩增。

1.5 PCR 检测

PCR 扩增:上、下游引物各 $0.2 \mu\text{L}$ (引物浓度 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),1U Taq DNA 聚合酶, $1 \times \text{PCR}$ 反应缓冲液, dNTPs $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,模板 DNA $0.5 \mu\text{L}$ (50 ng),去离子水补足体积至 $10 \mu\text{L}$ 。zein、35S、NOS 引物的扩增和转基因玉米 BT11、BT176、T25、GA21、NK603 的特异性扩增按照上述反应体系进行,转基因玉米 MON810 的特异性扩增在反应体系中加入 MgCl_2 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,其余成分保持不变。PCR 反应程序:预变性 94°C 10 min;35 次扩增循环(94°C 30 s; 55°C 30 s; 72°C 30 s); 72°C 延伸 7 min。zein、35S、NOS 引物的扩增和转基因玉米 MON810、BT11、BT176、T25、GA21 按照上述循环进行,转基因玉米 NK603 在扩增循环中延伸时间为 45 s,其余参数保持不变。

表 1 转基因玉米及其插入序列

Table 1 Transgenic maize and inserted sequences.

转基因玉米 Transgenic maize	导入性状 Traits	插入序列 Inserted sequences		
		启动子 Promoter	目的基因 Target gene	终止子 Terminator
MON810 (Monsanto)	欧洲玉米螟抗性 Resistant to European corn borer, ECB	带 hsp70 内含子 1 的 35S 启动子 P-35S with hsp70-intron	人工合成 <i>cry1Ab</i> 基因 Synthetic <i>cry1Ab</i>	
Bt11 (Novartis)	欧洲玉米螟抗性 Resistant to European corn borer	带玉米乙醇脱氢酶 <i>adh 1-IS</i> 基因第 6 内含子的 35S 启动子 P-35S with 6th intron of maize <i>adh 1-IS</i> gene	人工合成 <i>cry1Ab</i> 基因 Synthetic <i>cry1Ab</i>	Nos 终止子 T-Nos
	草胺磷抗性 Phosphinothricin tolerance	带玉米乙醇脱氢酶 <i>adh 1-IS</i> 基因第 2 内含子的 35S 启动子 P-35S with 2nd intron of maize <i>adh 1-IS</i> gene	人工合成 <i>bar</i> 基因 Synthetic <i>bar</i>	Nos 终止子 T-Nos
Bt176 (Novartis)	欧洲玉米螟抗性 Resistant to European corn borer	玉米绿色组织特异性磷酸烯醇式丙 酮酸羧化酶 PEPC 基因启动子 Green tissue-specific promoter of phosphoenolpyruvate carboxylase gene from maize, P-PEPC	人工合成 <i>cry1Ab</i> 基因片段 Synthetic <i>cry1Ab</i> , truncated	35S 终止子 T-35S
		玉米花粉特异性钙调蛋白激酶 CD- PK 基因启动子 Pollen-specific promoter of calcium- dependent protein kinase from maize, P-CDPK	人工合成 <i>cry1Ab</i> 基因片段 Synthetic <i>cry1Ab</i> , truncated	
	草胺磷抗性 Phosphinothricin tolerance	35S 启动子 P-35S	<i>bar</i> 基因 <i>bar</i> gene	
T25 (AgrEvo)	草胺磷抗性 Phosphinothricin (PPT) tolerance	35S 启动子 P-35S	人工合成 <i>bar</i> 基因 Synthetic <i>bar</i>	35S 终止子 T-35S
GA21 (Monsanto)	GA21 (Monsanto)	带 OTP 转运肽的 <i>Ract1</i> 启动子 P- <i>Ract1</i> with optimized transit peptide OTP	玉米点突变 <i>epsps</i> 基因 Point mutated <i>epsps</i> gene derived from maize	Nos 终止子 T-Nos
NK603 (Monsanto)	草甘膦抗性 Glyphosate tolerance	带转运肽 CTP2 的 <i>Ract1</i> 启动子 CTP2 带玉米热激蛋白 hsp70 内含 子 1 的 35S 启动子 P-35S P- <i>Ract1</i> with chloroplast transit peptide with heat shock protein hsp70-intron 1	<i>EPSPS</i> 基因 5-enolpyruvylshiki- mate-3-phosphate synthase gene	Nos 终止子 T-nos

复合 PCR 扩增: 每条引物 0.25 μL (引物浓度 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 1U Taq DNA 聚合酶, 1 \times PCR 反应缓冲液, dNTPs 0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Mg^{2+} 2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 每个模板 0.5 μL (50 ng), 去离子水补足体积至 25 μL 。PCR 反应程序: 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 10 次扩增循环 (95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$

40 s); 10 次扩增循环 (95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s); 10 次扩增循环 (95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s); 10 次扩增循环 (95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 54 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s); 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳。用于 DNA 芯片检测时, 上述 dNTPs 用 Biotin-dUTPs 代替, 产物用 PCR 产物纯化试剂盒纯化。

表2 转基因玉米检测用引物和探针

Table 2 Primers and probes used in detection of transgenic maize.

模板 Template	引物/探针名 Name	类型 Type	引物/探针序列 Sequence	对应序列 Specific sequence
MON810	MONF1101	Forward	5'-AATAAAGTGACAGATAGCTGGGCA-3'	Maize DNA
	MONR1101	Reverse	5'-CCTTCATAACCTTCGCCCG-3'	P-35S
	ProMON810	Probe	5'-ACGAAGGACTCTAACGTTTAAACATCCTTTGC-3'	
BT11	BT11FAHJ	Forward	5'-CGCACAATCCCACTATCCTT-3'	P-35SV
	BT11RB	Reverse	5'-GCCTCCCAGAAAGTAGACGTC-3'	IVS2
	ProBt11	Probe	5'-AAGAAACCCCTTACTCTAGCAGAGATCCT-3'	
BT176	BT176FPepC-20	Forward	5'-ATCTCGCTTCCGTGCTTAGC-3'	PEPC
	BT176RCry04	Reverse	5'-GGTCAGGCTCAGGCTGATGT-3'	Cry1Ab
	ProBT176	Probe	5'-TGAGCAACCCCGAGGTGGACGTG-3'	
T25	T25FMHB	Forward	5'-CCAGTTAGGCCAGTTACCCAGA-3'	PAT
	T25RMHB	Reverse	5'-TGGGAACTACTCACACATTATTATAGAGAG-3'	T-35S
	ProT25	Probe	5'-AGACTGGTGATTTTCAGCGGCATG-3'	
GA21	GA21F	Forward	5'-TCCGAGGGGACAACAGTGG-3'	M-EPSPS
	GA21R	Reverse	5'-GCAGTTCAGCATTCCC-3'	M-EPSPS
	ProGA21	Probe	5'-AAGGATCCGGTGCATGGCCGG-3'	
	GA21capture	Probe	5'-GCCGGCCATGCACCGGATCCTT-3'	
NK603	NK603Fhsp	Forward	5'-GTATCTTGCTCGATGCCTTC-3'	hsp70
	NK603Rctp2	Reverse	5'-AAGACGCAGCAGCATCCA-3'	ctp2
	ProNK603	Probe	5'-ATGCAGATACCAAGCGGCCTC-3'	
35S	35SFH	Forward	5'-GCTCCTACAAATGCCATCA-3'	35S
	35SRMHH	Reverse	5'-CTTGCTTTGAAGACGTGGTTGG-3'	35S
	Pro35S	Probe	5'-TGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGA-3'	
NOS	NosFMH	Forward	5'-GAATCCTGTTGCCGGTCTTG-3'	NOS
	NosRMH	Reverse	5'-AATTTATCCTAGTTTGC GCGCTA-3'	NOS
	ProNos	Probe	5'-TTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGACTCCCG-3'	
zein	zeinF	Forward	5'-CCTCAGTCGCACATATCTACTATACT-3'	zein
	zeinR	Reverse	5'-CTAGAATGCAGCACCAACAAA-3'	zein

1.6 DNA 芯片微矩阵的构建

DNA 芯片在上海百傲科技有限公司定制,使用 Affymetrix 公司的 Arrayer417 点样仪点样。样点的尺寸为直径 150 μm ,样点圆心间距约 200 μm

的距离。以玻片作为固定相,每个玻片上的微矩阵是 1 个,微矩阵中含有 10 种探针,控制探针重复 15 次,每个特异性探针重复 3 次,探针的分布如图 1。

控制 探针	□ □ □	Bt176	□ □ □	NK603	□ □ □
	□ □ □	Bt11	□ □ □	GA21capture	□ □ □
	□ □ □	GA21	□ □ □	35S	□ □ □
	□ □ □	T25	□ □ □	Nos	□ □ □
	□ □ □	Mon810	□ □ □		

图1 DNA 芯片中探针的分布

Fig. 1 Distribution of probes in DNA chip.

1.7 DNA 芯片杂交

杂交前样品的处理:将 25 μL PCR 产物 98 $^{\circ}\text{C}$ 热变性 5 min,取出后立即放入冰盒中, -20 $^{\circ}\text{C}$ 放置备用。

杂交:取出 DNA 芯片,做好样品编号,在杂交舱中加入预杂交液 200 μL ,44 $^{\circ}\text{C}$ 静置 5 min,吸除缓冲液;吸出 150 μL 杂交缓冲液放入无菌的 1.5 mL 离心管中,加入已变性的 PCR 产物混合物,混匀,将液体全部加入到杂交舱中(加液时应注意不要产生气泡);将 DNA 芯片放入 44 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中,保温 30 min,同时取 1.5 mL 离心管,从洗液 1 瓶中吸 700 μL ,于 44 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中预热;从恒温箱中取出 DNA 芯片,吸除杂交舱中的溶液;在杂交舱中加入 200 μL 已预热的洗液 1,44 $^{\circ}\text{C}$ 保温 5 min,然后吸除,再重复此步骤 2 次。

显色:在杂交舱中加入洗液 2 溶液 200 μL ,室温放置 2 min;吸除杂交舱中溶液,向杂交舱中加入抗体液 200 μL ,室温放置 20 min;吸除杂交舱中溶液,向杂交舱中加入洗液 2 溶液 200 μL ,室温放置 5 min,再重复此步骤 1 次;吸除杂交舱中溶液,向杂交舱中加入洗液 3 溶液 200 μL ,室温放置 2 min;吸除杂交舱中溶液,向杂交舱中加入显色液 200 μL ,44 $^{\circ}\text{C}$ 避光放置 40 min。

信号检测:吸除杂交舱中溶液,小心揭除杂交舱,将显色载玻片显色区小心用蒸馏水冲洗一下,置 44 $^{\circ}\text{C}$ 烘干;将显色载玻片面朝下扣在 Bio 生物芯片识读仪上检测。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取

利用实验室的植物 DNA 提取试剂盒,对 6 种转基因玉米和非转基因玉米进行 DNA 提取和纯化,从 100 mg 样品中可提取出约 11.4 μg 总 DNA,片段大小约 23 ~ 24 kb,OD(260/280) 为 1.82 ~ 1.96。对其利用玉米内源参照基因 *zein* 进行扩增,在所有玉米材料中均能扩增出 508 bp 的目标片段(图 2)。这些结果表明,利用本试剂盒提取的 DNA,可以应用于转基因植物 PCR 检测要求。

2.2 引物、探针的设计及特异性扩增和复合 PCR 检测

根据 6 种转基因玉米的外源基因的结构特点

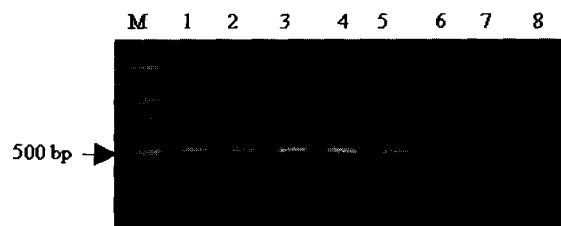


图 2 玉米内源参照基因 *zein* 的扩增

Fig. 2 Amplification of maize endogenous reference gene *zein*.

M, 100bp DNA ladder; 1, NK603; 2, GA21; 3, T25; 4, BT176; 5, BT11; 6, MON810; 7, Non-GM maize; 8, H₂O

设计,在不同序列的连接区域设计特异性引物和探针进行转基因玉米的特异性检测。其中 GA21 为外源基因特异性检测,MON810 为转化事件特异性检测,其余均为构建特异性检测(表 2,图 3)。

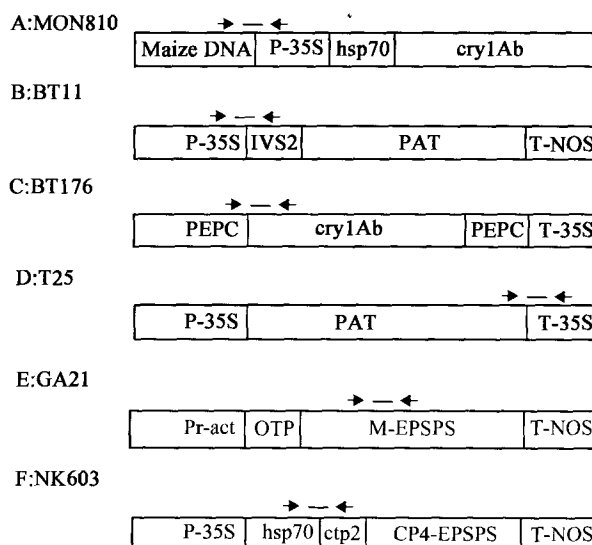


图 3 转基因玉米中外源 DNA 载体部分结构及特异性引物、探针的设计

Fig. 3 Diagram of partial vector structures and specific primers and probes designed for detection of alien DNA.

箭头为引物位置;水平线为探针位置。
Arrows show primers positions. Horizontal bars show probe positions.

MON810 转基因玉米对应玉米基因组序列设计上游引物,对应 35S 启动子序列设计下游引物,在玉米基因组与 35S 启动子连接位置设计探针(图 3A)。以 MON810 玉米种子 DNA 为模板可扩增出 237bp 的目标片段(图 4)。

BT11 转基因玉米对应于 35S 启动子序列设计上游引物,对应 *ivs2* 序列设计下游引物,在 35S 启动子和 *ivs2* 连接位置设计探针(图 3B)。以 BT11 玉米种子 DNA 为模板可扩增出 256 bp 的目标片段(图 4)。

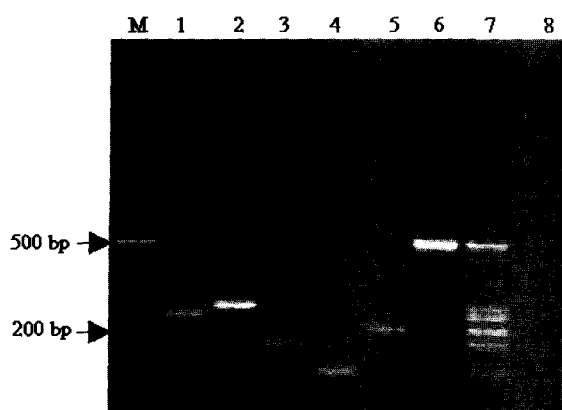


图 4 常规 PCR 和复合 PCR 特异性检测 6 种转基因玉米

Fig. 4 PCR & multiple PCR detection of six lines of transgenic maize.

M, 100bp DNA ladder; 1, MON810; 2, BT11; 3, BT176; 4, T25; 5, GA21; 6, NK603; 7, multiple PCR; 8, 空白对照 blank

BT176 转基因玉米对应于 *pepc* 基因序列设计上游引物,对应 *cry1Ab* 序列设计下游引物和探针(图 3C)。以 BT176 玉米种子 DNA 为模板可扩增出 170bp 的目标片段(图 4)。

T25 转基因玉米对应于 *pat* 基因序列设计上

游引物,对应 35S 终止子序列设计下游引物和探针(图 3D)。从 T25 玉米种子 DNA 中可扩增出 112bp 的目标片段(图 4)。

GA21 转基因玉米对应于 *m-epsps* 基因序列设计上、下游引物和探针(图 3E)。以 GA21 玉米种子 DNA 为模板可扩增出 199bp 的目标片段(图 4)。

NK603 转基因玉米对应于 *hsp70* 序列设计上游引物和探针,对应 *ctp2* 序列设计下游引物(图 3F)。以 NK603 玉米种子 DNA 为模板可扩增出 506bp 的目标片段(图 4)。

为了提高检测效率及应对多个事件同时检测的情况,在一个 PCR 反应中加入多对引物,进行复合 PCR 扩增,以达到通过一次 PCR 扩增,同时对多种转基因玉米进行检测的目的。经过对退火温度、延伸时间、引物浓度、模板量等 PCR 扩增反应条件的优化,可以在一个反应中同时扩增 6 种转基因玉米,扩增片段的大小与预期结果一致(图 4)。

2.3 DNA 芯片检测转基因玉米

本研究初步探索性地应用了 DNA 芯片的方法对转基因玉米混合样品进行检测。反应 1 (MPCR1) 可成功地检测出包括 BT176、BT11、T25、MON810、NK603 的 5 种转基因玉米(图 5a)。反应 2 (MPCR2) 可成功地检测出包括 BT176、BT11、MON810、NK603、GA21 的 5 种转基因玉米(图 5b)。

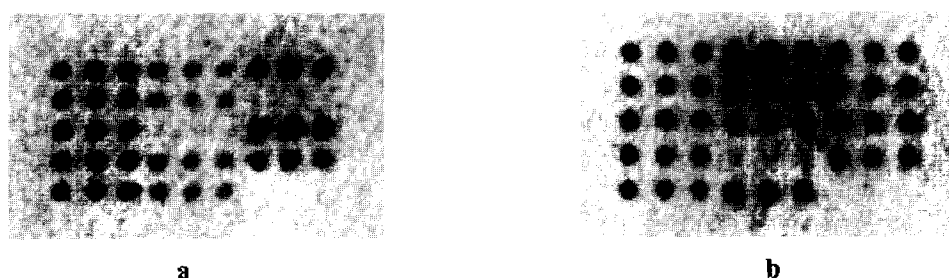


图 5 转基因玉米两个复合 PCR 扩增体系 DNA 芯片杂交结果

Fig. 5 DNA chip hybridization results of two sets of multilex PCR amplification of GM maize.

左边 3 列的控制探针信号良好,表明杂交反应良好,同时控制探针的信号也标明其他探针的相对位置。MPCR1 的 PCR 产物经变性与芯片杂交,杂交结果显示 BT176、BT11、T25、MON810、

NK603、35S 和 NOS 探针能产生有效的信号。NK603、35S 和 NOS 的探针信号相对较强。BT176、BT11、T25 和 MON810 的探针信号相对较弱。MPCR2 的 PCR 产物经变性与芯片杂交,杂

交结果显示 BT176、BT11、GA21、MON810、NK603、GA21capture、35S 和 NOS 探针能产生有效的信号。BT176、BT11、GA21、MON810、NK603、GA21capture、35S 和 NOS 的探针信号和对照的信号相当,T25 的探针未检出有效信号。

3 讨论

转基因作物及其产品的检测技术是转基因产品标识管理政策得以贯彻实施的技术保障。随着转基因作物种类的增多,转基因作物产品以及含有不同转基因作物成分的混合产品也逐渐增多,对 PCR 检测提出了新的要求。目前,我国尚未进行同时对多种转基因成分进行检测的相关标准的制定,但检测工作者未雨绸缪,提前进行技术方面的研究储备有着积极的意义。

近年来,很多实验室尝试通过复合 PCR 来检测不同转基因作物或不同转基因作物的混合物^[12, 13]。在复合 PCR 检测中,需在同一反应管中加入多对引物,反应中易产生二级结构和引物竞争,因而结果不够稳定,可同时检测的目标产物数量也会受到限制,且其中产物片段较大的,往往扩增受到抑止。Matsuoka 等^[12]通过对反应程序的优化,最多可在同一反应管中扩增 6 个目标片段,对 5 种转基因玉米进行检测。通过对 PCR 引物、反应条件进行反复优化,本实验室也已建立了在一个 PCR 反应管中,同时扩增 7 个不同长度目标片段,对 6 种转基因玉米进行检测的复合 PCR 方法^[5]。本研究通过使用不同的引物,再次对 6 种转基因玉米进行复合 PCR 方法的检测,使得本实验室关于复合 PCR 技术更加成熟。

本研究还进一步探索性地利用 DNA 芯片技术对转基因玉米进行检测。通过使用生物素标记,使得检测成本相较于通常的芯片检测大大降低。DNA 芯片是通过核酸杂交检测阳性信号,因此,可以大大提高检测的准确率;另外,DNA 芯片的高通量应用可以在大规模检测时节约成本,提高检测效率。本研究利用复合 PCR 结合 DNA 芯片检测转基因混合样品对该技术进行了初步的验证,研究结果表明,结合 DNA 芯片检测是简便高效的转基因检测方法。然而 DNA 芯片检测技术

成熟应用还需不断完善,如利用 DNA 芯片可检测的最低极限值等技术指标问题还需进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] 陈洁君,王 劲,宛煜嵩,等.转基因作物安全性评价与商品化前景分析[J].中国农业科技导报,2007,9(3):38-43.
- [2] 贾士荣,金芫军.国际转基因作物的安全性争论——几个事件的剖析[J].农业生物技术学报,2003,11(1):1-5.
- [3] 金芫军,贾士荣,彭于发.不同国家和地区转基因产品标识管理政策的比较[J].农业生物技术学报,2004,12(1):1-7.
- [4] Yang L T, Xu S C, Pan A H, *et al.*. Event specific qualitative and quantitative polymerase chain reaction detection of genetically modified MON863 maize based on the 5'-transgene intergration sequence[J]. Journal of Agricultural and food chemistry, 2005, 53(24): 9312-9318.
- [5] 吕山花,常汝镇,陶 波,等.抗草甘膦转基因大豆 PCR 检测方法的建立与应用[J].中国农业科学,2003,36(8):883-887.
- [6] 金芫军,郝 畅,程红梅,等.用复合 PCR 方法对 6 种转基因玉米中的外源 DNA 进行特异性检测[J].农业生物技术,2005,13(5):562-567.
- [7] Askild H, Marc V, Luc D, *et al.*. 5'-Nuclease PCR for quantitative event-specific detection of the genetically modified Mon810 Maisgard maize[J]. European Food Research Technology, 2002, 214: 449-453.
- [8] Knut R, Ida R, Askild H. A novel multiplex quantitative DNA array based PCR (MQDA) for quantification of transgenic maize in food and feed[J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(11):62.
- [9] Peanoa R C, Bordoni M, Gulli A, *et al.*. Multiplex polymerase chain reaction and ligation detection reaction/universal array technology for the traceability of genetically modified organisms in foods [J]. Analytical Biochemistry, 2005, 346(1):90-100.
- [10] Xu J, Miao H, Wu H, *et al.*. Screening genetically modified organisms using multiplex-PCR coupled with oligonucleotide microarray[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2006, 22(1):71-7.
- [11] Xu X, Li Y, Zhao H, *et al.*. Rapid and reliable detection and identification of GM events using multiplex PCR coupled with oligonucleotide microarray[J]. Journal of Agricultural and food chemistry, 2005, 53(10):3789-94.
- [12] Matsuoka T, Kuribara H, Akiyama H, *et al.*. A multiplex PCR method of detecting recombinant DNAs from five lines of genetically modified maize[J]. Journal of Food and Hygiene Society of Japan, 2001, 42: 24-32.
- [13] 潘爱虎,张大兵,潘良文,等.转基因抗草甘膦油菜的实用 PCR 检测方法[J].中国农业科学,2003,36(7):856-860.