

转基因小鼠的多重 PCR 快速检测技术

王趁芳,李新云,王志伟,敖红,崔文涛,李奎*

(中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 中国农业科学院家养动物
遗传资源与种质创新重点开放实验室,农业部转基因动物与
饲料安全鉴定检验检测中心,北京 100193)

摘要: 转基因检测技术的标准化可以为转基因法规的制定和转基因产品的标识提供技术支持。采用碱裂解法快速提取鼠尾基因组 DNA,用 PCR 方法检测其中的外源基因结构如 cytomegalovirus (CMV) 启动子、hGH polyA 终止子及目的基因跨膜蛋白 66 (Transmembrane protein 66, *Tmem66*),筛选到阳性样品。优化了多重 PCR 引物退火温度及缓冲液浓度,并探讨了扩增速率对多重 PCR 的影响。结果表明,此多重 PCR 方法可得到很好的扩增效果,可用于转基因小鼠外源基因的检测,同时为哺乳动物检测标准的建立提供参考。

关键词: 转基因小鼠;多重 PCR;检测

中图分类号:Q789

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2009)02-0185-06

Multiplex PCR Detection of Exogenous Gene in Transgenic Mice

WANG Chen-fang, LI Xin-yun, WANG Zhi-wei, AO Hong, CUI Wen-tao, LI Kui*

(The Key Laboratory of Domestic Animal Genetic Resources and Germplasm
Innovation of CAAS, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural
Sciences, Center for Identification and Detection of Transgenic Animal and
Feed Safety of Department of Agriculture, Beijing 100193, China)

Abstract: Focused on detection method for transgenic animals and its standardizations abroad in this article. It is essential to administrative regulations of transgenic animal and label of transgenic animal food. Extracting genomic DNA from mice tails by alkaline lysis method. The positive mice were screened by detecting of several transgenic elements such as cytomegalovirus (CMV) promoter, hGH polyA terminator, transmembrane protein 66 (*Tmem66*) target gene with multiplex PCR method, as detecting mice endogenous *GAPDH* gene. The process of the multiplex PCR reaction was optimized, such as the optimal annealing temperature and the concentration of the PCR buffer, simultaneously studying the effect of reaction rate on multiplex PCR. The results showed that the multiplex PCR method was simple and accurate to detect transgenic elements of transgenic mice, which offered us useful experience for developing the typical testing standard of transgenic mammals and its derived food.

Key words: transgenic mice; multiplex PCR; detection

1982 年超级小鼠的问世,掀起了遗传学研究的新浪潮。很多哺乳动物、禽类及鱼类转基因动物相继产生,经济效益、社会效益诱人,应用前景广阔。

但是这把双刃剑引起的安全问题也日渐引起世界的广泛关注;如食用安全、环境安全、伦理安全等。

国际及国内都制定了转基因生物安全的管理法

收稿日期:2008-01-18

基金项目:国家自然科学基金(30571300);国家 863 计划(2006AA10Z135);国家 973 计划(2004BA717B)

作者简介:王趁芳(1980-),女,硕士生,主要从事转基因动物安全评价研究,E-mail:wangchenfang5@163.com

* 通讯作者:李奎,研究员,E-mail:kuli@iascaas.net.cn; likuihau@yahoo.com

规^[1-2],尤其是转基因植物和转基因微生物方面,而转基因动物的检测发展缓慢,现在还没有标准化的检测方法。另外,以欧盟、日本等为代表的很多国家对转基因管理比较严谨,加上世界各国对转基因生物及含有转基因成分进行标识的呼声越来越高^[3-4],这些都需要有技术做支撑。

目前,转基因检测方法很多,主要是基于2个方面^[5]:外源基因表达蛋白的检测和外源核酸的检测。Southern Blotting 和 PCR 均是核酸检测的经典技术,Southern Blotting 检测灵敏度更高,但操作繁琐。而随着高通量技术的出现,单一 PCR 只能作为一个基本技术,而多重 PCR 因其系统、高效、简便快捷的特点突显出来,其在转基因玉米、大豆等的检测方面应用很多^[6],而转基因动物的检测方面还未见报道。多重 PCR 一个反应即可检测一个转基因事

件中的所有外源基因结构,尽可能排除假阳性或假阴性,使检测结果更可靠。

本研究以通过显微注射生产的转跨膜蛋白 66 (*Tmem66*)基因小鼠为试验动物检测外源基因,优化多重 PCR 扩增体系及条件,旨在为转基因动物外源基因检测标准的制定提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

本试验原受体小鼠为近交系小鼠 C57BL/6R,转基因小鼠为本实验室 2006 年制作的转 *Tmem66* 基因小鼠后代 F1 和 F2 代^[7],经 PCR 和 Southern 检测为转基因阳性小鼠。阴性小鼠有 2 种,一种为转基因阴性小鼠,另一种为未经转基因操作的同品系小鼠。

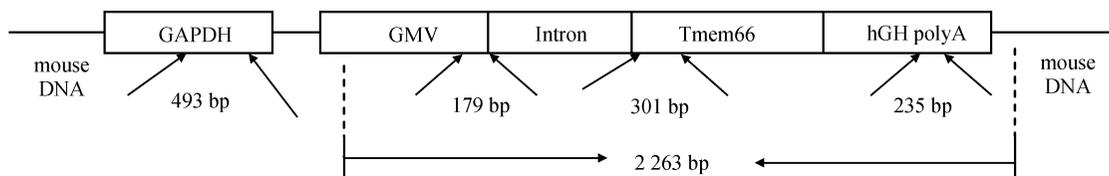


图 1 转基因元件

Fig. 1 Transgenic elements

1.2 试剂

rTaq DNA 聚合酶、dNTP 为 TaKaRa 产品;普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、DH5a 感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司;pGEM-T Easy vector 为 Promega 公司产品。

1.3 引物

根据小鼠基因组(NC_00072)设计内参基因

GAPDH 的引物,Betm 引物设计时跨 β -globin 内含子和 *Tmem66* 基因,CMV 启动子和 PolyA 终止子引物根据生产父本转基因小鼠时构建的载体设计。用 Primer Premier 5.0 设计引物。设计时除依据一般引物原则外,还要考虑各引物退火温度应比较接近,互补碱基尽量少,以避免产生大量引物二聚体而减少目标产物的扩增效率^[8]。所有引物(表 1)由北京

表 1 引物序列

Table 1 List of primer sequences

靶基因 Gene	引物名称 Primer	引物序列(5'-3') Sequence	退火温度/°C Annealing temperature	产物大小/bp Products size
<i>GAPDH</i> 基因	GAPDH-F	GCCAAACGGGTCATCATCTC	60	493
	GAPDH-R	GGTCCTCAGTGTAGCCAAG		
CMV 启动子	CMV-F	TACATCTGCGTATTAGTCATCG	60	179
	CMV-R	GGCGGAGTTGTTACGACATTTT		
hGH polyA 终止子	PolyA-F	TGGCACAATCTTGGCTCACT	60	235
	PolyA-R	GCAGTGGTTCACGCCTGTAAT		
β -globin 内含子 / <i>Tmem66</i> 基因	Betm-F	CTTCTGAGTCCAAGCTAGGC	60	301
	Betm-R	GAGTGCTCTGAGTATGGCGG		

英骏生物公司合成。

1.4 DNA 的提取

将小鼠尾尖约 0.5 cm 置于 1.5 mL Ependorf 管中,每管加入 500 μL SDS 裂解液(10 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl pH8; 0.5 mmol \cdot L⁻¹ EDTA pH8, 0.75 mmol \cdot L⁻¹ NaCl, 5 g \cdot L⁻¹ SDS), 10 μL 蛋白酶 K (20 mg \cdot mL⁻¹)。55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中震荡消化过夜。将消化好的组织剧烈摇晃混匀,每管各加 250 μL 苯酚/氯仿(1:1, 体积比),缓慢上下颠倒混匀 6 min 左右,12 000 r \cdot min⁻¹ 离心 8 min,乙醇洗涤沉淀,自然干燥,TE 溶解。用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测小鼠基因组 DNA 的质量,凝胶成像系统成像。核酸测定仪测定 DNA 浓度及纯度,于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.5 内源基因和转基因成分的单一 PCR 检测

PCR 反应体系:10 \times PCR 缓冲液 1 μL , dNTP 0.2 μL , 引物浓度为 0.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 模板 DNA 约 50 ng, rTaq DNA 聚合酶 0.1 μL , 加 ddH₂O 至终体积为 10 μL 。

PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 56~60 $^{\circ}\text{C}$ 温度梯度退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。取 3 μL PCR 产物,用 1.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 PCR 产物克隆测序

将 100 μL PCR 反应液与上样缓冲液混合后, 2.0% 琼脂糖凝胶电泳。其余步骤按普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒说明进行。回收片段经 T/A 克隆连接(参照 pGEM-T Easy vector 克隆试剂盒说明书操作), 转化涂板, 蓝白斑筛选挑取单克隆, 液体培养基扩大培养 4 h, 菌液 PCR 检测, 阳性菌液送北京英骏生物公司测序, 分析结果。

1.7 多重 PCR 检测体系及扩增条件优化

多重 PCR 采用 20 μL 反应体系: 10 \times PCR 缓冲液(1.0 \times 、1.1 \times 、1.2 \times 、1.3 \times 、1.4 \times 、1.5 \times) 分别加 2、2.2、2.4、2.6、2.8、3.0 μL , dNTP 1.0 μL , GAPDH、Betm、PolyA、CMV 体系中引物终浓度均为 3 pmol \cdot μL^{-1} , 即 0.5 μL (引物贮存浓度为 10 pmol \cdot μL^{-1}), 模板 DNA 约 100 ng, rTaq DNA 聚合酶 0.2 μL (1 U), 加 ddH₂O 至终体积为 20 μL 。

PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 56~60 $^{\circ}\text{C}$ 温度梯度退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。取 3 μL PCR 产物, 2% 琼脂糖凝胶 120 V 电泳 30 min 检测。

2 结果与分析

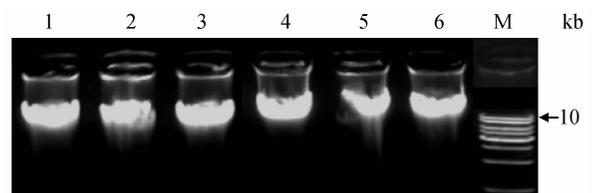
2.1 DNA 提取

DNA 提取步骤简单, 只需苯酚氯仿一步抽提即可, 省时省力, 且鼠尾无需剪碎, 减少了交叉污染的机会。消化完毕剧烈震荡, 使消化下来的组蛋白与 DNA 充分游离, 利于抽提。

提取的总 DNA 经核酸测定仪检测, DNA 含量在 300~1 100 ng \cdot μL^{-1} , OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.8~2.0 之间, 符合 PCR 反应的要求(图 2)。

2.2 转基因成分单一 PCR 检测结果

内参基因条带特异证明模板质量良好, 无抑制 PCR 反应的物质, 2 种阴性对照均无目的条带扩增, 阳性检测样品各基因均可扩增出目的条带。为了保证扩增结果的准确性, 5 个基因序列都克隆测序, CMV、Betm 和 PolyA 测序结果与生产此转基因小鼠的质粒序列比对, 100% 同源; GAPDH 与 GenBank 中小鼠 GAPDH 基因序列 100% 同源。研究表明, 在 56~62 $^{\circ}\text{C}$ 温度梯度范围内各引物均能得到良好的 PCR 扩增结果(图 3)。



1,2. 转基因阳性小鼠 DNA; 3,4. 转基因阴性小鼠 DNA; 5,6. 野生型小鼠 DNA; M. 100 bp marker
1,2. DNA of transgenic positive mice; 3,4. DNA of transgenic negative mice; 5,6. DNA of wide-type mice; M. 100 bp marker

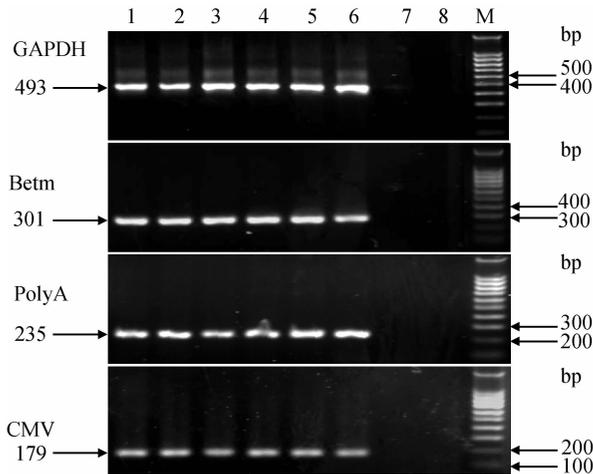
图 2 基因组 DNA

Fig. 2 Genomic DNA

2.3 转基因成分多重 PCR 检测结果

试验中以经 Southern 杂交检测为阳性的小鼠的基因组为检测样品(DIG High Prime DNA and Detection Starter Kit I, Roche), Southern 杂交结果见图 4。

以制作此转基因小鼠的质粒为阳性对照, 分别以转基因阴性小鼠和野生型同品系小鼠为阴性对照, 空白对照加 ddH₂O。转基因阳性小鼠的多重 PCR 扩增条带大小与阳性对照扩增序列基本一致, 经测序验证 100% 同源, 2 个阴性对照均只有 GAPDH 基因扩增(图 5)。



1~6. T_m 分别为 56、56.6、57.2、57.9、59.3、60.1 $^{\circ}C$ ；
7. 阴性对照；8. 空白对照；M. 100 bp marker
1-6. Gradient annealing temperature of each line are
56、56.6、57.2、57.9、59.3、60.1 $^{\circ}C$ ；7. Negative control；
8. Blank control；M. 100 bp marker

图 3 各引物温度梯度 PCR 扩增

Fig. 3 PCR products amplified from gradient annealing temperature with each primer pairs

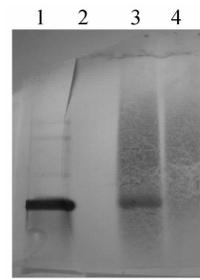
2.3.1 不同退火温度的多重 PCR 结果 因为单一 PCR 扩增时各引物的退火温度均较宽,扩增效果明显,且多重 PCR 扩增时一般将引物的退火温度降低 4~6 $^{\circ}C$ ^[9],综合考虑确定在 56~60 $^{\circ}C$ 范围内进行多重 PCR 扩增。由图 6 可见,在设定的温度范围内 4 种产物均可稳定扩增。

2.3.2 不同缓冲液浓度对多重 PCR 的影响 试验中将 PCR 缓冲液的浓度梯度设置为 1.0 \times 、1.1 \times 、1.2 \times 、1.3 \times 、1.4 \times 、1.5 \times ,即 20 μL 体系中分别加缓冲液 2、2.2、2.4、2.6、2.8、3.0 μL 。结果显示在设定的缓冲液浓度范围内扩增结果都很理想,见图 7。

2.3.3 不同反应速度对多重 PCR 的影响 试验中用 2 台 PCR 仪分别扩增,为了减少误差,加样时先配成混合液,再分装,每管 20 μL ,设定相同的反应程序,PCR 仪 A 历时 1 h 27 min 38 s 完成扩增,PCR 仪 B 需 1 h 12 min 7 s,相差 15 min 31 s。扩增结果可看出 PCR 仪 A 的扩增效率比 PCR 仪 B 的低,稳定性也稍差(图 8)。

3 讨论

多重 PCR 是在单一反应中同时扩增多个序列,有省时、省力、高效的特点,也正因为多序列同时扩

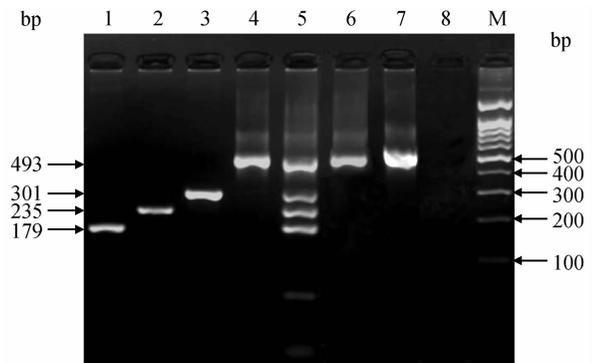


1. 质粒；2. 空白；3. F1 代转基因小鼠；4. 阴性对照

1. Plasmid；2. Blank；3. F1 generation of transgenic mouse；4. Negative control

图 4 Southern 杂交结果

Fig. 4 Southern blotting



1~3. 以生产转基因小鼠的质粒为模板分别扩增 CMV 启动子、hGH polyA 终止子和 Tmem66 基因,作为阳性对照；4. 以含有 GAPDH 基因的质粒为模板作为阳性对照；5. 转基因阳性小鼠的多重 PCR 扩增；6. 转基因阴性小鼠的多重 PCR 扩增；7. 野生型小鼠的多重 PCR 扩增；8. 空白对照；M. 100 bp marker

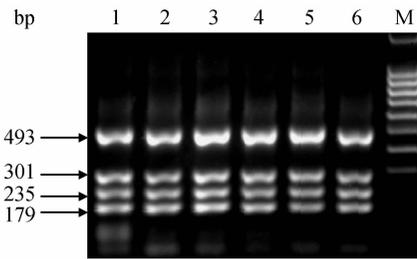
1-3. Three fragments were obtained from the transgenic plasmid by PCR amplification, such as CMV promoter fragment, hGH polyA terminator fragment, Tmem66 gene fragment；4. GAPDH endogenous gene fragment was obtained from the plasmid by PCR amplification；5. Multiplex PCR amplification of transgenic positive mouse；6. Multiplex PCR amplification of transgenic negative mouse；7. Multiplex PCR amplification of wide-type mouse；8. Blank control；M. 100 bp marker

图 5 多重 PCR 扩增结果

Fig. 5 Multiplex PCR amplification

增,也就使反应的特异性受到很多因素的影响,如不同引物对之间的相对浓度、PCR 缓冲液的浓度、循环参数、退火温度等^[10]。

引物的特异性是多重 PCR 扩增成功的关键,本试验中引物浓度无需调整,4 种产物扩增效果均理想,说明本试验设计的引物特异性很好,同时也有很

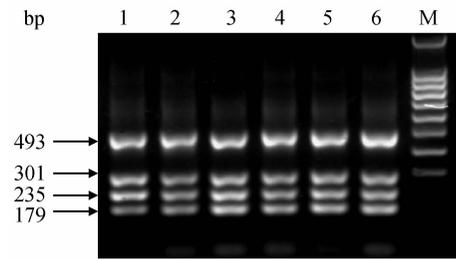


1~6. T_m 分别为 56、56.6、57.2、57.9、59.3、60.1 $^{\circ}\text{C}$; M. 100 bp marker

1-6. Gradient annealing temperature of each line are 56、56.6、57.2、57.9、59.3、60.1 $^{\circ}\text{C}$; M. 100 bp marker

图 6 温度梯度多重 PCR 扩增

Fig. 6 Multiplex PCR products amplified from gradient annealing temperature

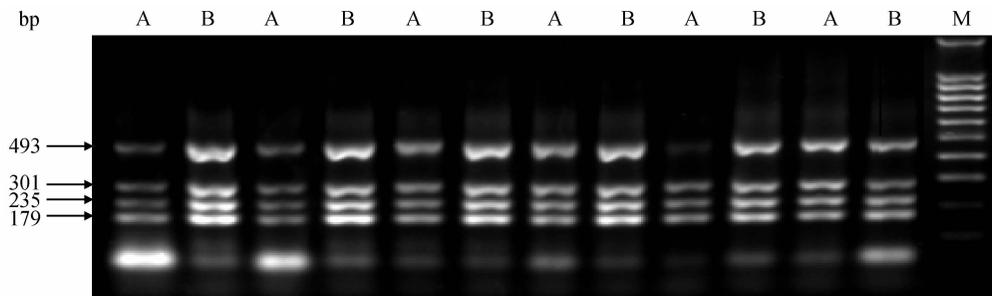


1~6. 缓冲液浓度 1.0 \times 、1.1 \times 、1.2 \times 、1.3 \times 、1.4 \times 、1.5 \times ; M. 100 bp marker

1-6. Gradient buffer concentration of each line are 1.0 \times 、1.1 \times 、1.2 \times 、1.3 \times 、1.4 \times 、1.5 \times ; M. 100 bp marker

图 7 缓冲液浓度梯度多重 PCR 扩增

Fig. 7 Multiplex PCR products amplified from gradient buffer concentration



A. PCR 仪 A 扩增结果; B. PCR 仪 B 扩增结果; M. 100 bp marker

A. PCR amplification by PCR instrument A; B. PCR amplification by PCR instrument B; M. 100 bp marker

图 8 不同反应速度多重 PCR 扩增

Fig. 8 Multiplex PCR products amplified from different rates of reaction

宽的退火温度范围。

不同的反应速度对多重 PCR 扩增结果有影响,分析认为扩增反应速率快的 PCR 仪升降温速率均较快,从而减少了引物的非特异结合,所以扩增产物也有所增加。但是对扩增速率快的反应,扩增体积只有不太大,在快速升降温时液体才反应均匀。同时因为本试验中的扩增产物均较小,所以节省时间更明显。

多重 PCR 中 GAPDH + Betm + PolyA + CMV 的扩增片段分别为 493、301、235、179 bp,碱基之间相差最小的为 57 bp。Henegariu 等认为多重 PCR 因为扩增对数增多,需要延长延伸时间,同时延长延伸时间又可增加 PCR 产物的量,但是对于转基因检测中,各基因结构相邻的情况,如图 1 所示,如果延长延伸时间,就可能产生过渡延伸的产

物,产生更长的包含 2 个或 3 个目的片段的非目的片段,从而影响结果的判断。为了避免产生这种非特异性条带,本试验中延伸时间选择 30 s,结果表明,并不影响 PCR 扩增效率。

Henegariu 等认为 PCR 缓冲液的浓度对提高多重 PCR 扩增效率的作用比甘油、DMSO 或 BSA 等佐剂更重要^[9],Markoulatos 等认为缓冲液浓度对产物的特异性影响更大^[11],所以试验中设置了缓冲液浓度梯度,但是试验结果表明缓冲液浓度对本试验的引物组合没有影响,也说明引物特异性好。

多重 PCR 中,只有 Betm 引物的扩增序列为本试验转基因小鼠的特有序列,其他 3 个均为含有这些结构的载体所共有,根据所述多重 PCR 程序可根据目的基因的不同做适当的调整^[12],所以本试验的 3 对引物与其他目的基因组合,条件优化好可能也

会得到很好的结果,这还需要试验进一步证实。本试验灵敏、省时、稳定性好,可以为转基因动物及其产品的检测提供参考价值,加快转基因动物安全管理和标识的速度。

参考文献:

- [1] 农业转基因生物安全评价指南[M]. 农业部农业转基因生物安全管理办公室,农业部科技发展中心,2006:2-5.
- [2] 边永民. 欧盟转基因生物安全法评析[J]. 河北法学,2007,25(5):157-163.
- [3] 陈超,展进涛,廖西元. 国外转基因生物安全管理分析及其启示[J]. 中国科技论坛,2007,9:112-115.
- [4] 金茺军,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.
- [5] AHMED F E. Detection of genetically modified organisms in foods [J]. *Trends in Biotechnology*, 2002, 20(5): 215-223.
- [6] JAMES D, SCHMIDT A M, WALL E, et al. Reliable detection and identification of genetically modified maize, soybean and canola by multiplex PCR analysis [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(20): 5829-5834.
- [7] 李新云. TMEM66 基因功能初步研究[D]. 武汉:华中农业大学,2007.
- [8] 王媛,葛毅强,陈颖,等. 大豆加工食品中转基因成分多重 PCR 检测体系的建立[J]. 食品与发酵工业,2004,30(10):118-121.
- [9] HENEGARIU O, HEEREMA N A, DLOUHY S R, et al. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol[J]. *Bio Techniques*, 1997, 23(3): 504-511.
- [10] 黄银花,胡晓湘,徐慰倬,等. 影响多重 PCR 扩增效果的因素[J]. 遗传,2003,25(10):65-68.
- [11] MARKOULATOS P, SIAFAKAS N, MONCANY M J. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach [J]. *J Clin Lab Anal*, 2002, 16: 47-51.
- [12] LENEUVE P, ZAOU I R, MONGET P, et al. Genotyping of Cre-lox mice and detection of tissue-specific recombination by multiplex PCR[J]. *Biotechniques*, 2001,31(5):1156-1160, 1162.