

应用 MPCR-DHPLC 技术检测转基因大豆及其食品

陶 然, 郭顺堂

(中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要: 利用多重 PCR 结合 DHPLC 技术, 建立了高通量快速筛选检测转基因大豆及其食品的方法, 确立了转基因大豆品系鉴定方法。该筛选方法的检测灵敏度为 $0.078 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 质粒检测灵敏度为 1×10^3 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。利用该方法对转基因大豆 GT-40-3-2、Mon89788、A5704-12 和大豆食品曲奇饼干、含大豆的调味粉、干豆腐及非转基因黑大豆进行验证, 效果良好。所建立的 PCR-DHPLC 检测方法能同时快速准确的检测大豆及加工食品中转基因成分。

关键词: 多重 PCR; DHPLC; 转基因大豆

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2012)06-0976-04

Detection of Transgenic Soybean and Its Food by MPCR-DHPLC Method

TAO Ran, GUO Shun-tang

(College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083)

Abstract: The aim of this work was to develop a method for simultaneous detection of a variety of genetically modified (GM) soybean ingredients in foods and to identify the lines of transgenic soybean by using multiplex polymerase chain reaction (PCR) coupled with denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) assay. Results showed that the multiplex PCR-DHPLC method was highly specific for the target genes with $0.078 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ of high sensitivity. Detection sensitivity of standard plasmid was $1 \times 10^3 \text{ copy} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Identification and detection of genetically modified soybean ingredients in GT-40-3-2, Mon89788, A5704-12, cookies, seasoning powder containing soybean, dried tofu and non-genetically modified black soybean were effective. Multiplex PCR-DHPLC method developed in this work will be a better alternative for the rapid and high-throughput detection of many genetic modification events in soybean and its processed food simultaneously.

Key words: Multiplex PCR; Denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC); Genetically modified soybean

自 1988 年 Hinchee^[1] 等首次利用农杆菌介导法将 *NPTII* 基因和草甘膦抗性基因导入了大豆获得第一例转基因大豆以来, 转基因大豆发展迅速。目前, 国际市场上转基因大豆主要是抗除草剂转基因大豆^[2] 和抗虫转基因大豆。应用面积较大的是抗草甘膦转基因大豆。另有改良性状的新转基因大豆品种也相继问世, 如杜邦公司培育出的油酸含量达 70% 以上的大豆品种; 在美国, 低亚麻酸、低棕榈酸、高硬脂酸、高棕榈酸等转基因大豆品种也培育成功。由此可见, 转基因大豆在转基因作物及未来食品中占有重要地位。但是转基因大豆在给人类带来巨大利益的同时也可能对人体健康及生态环境带来潜在的风险, 所以建立一套能够准确、快速、高通量的筛选检测转基因大豆的检测方法特别重要。

多重 PCR 是指在一个 PCR 反应体系中加入多对特异性引物, 然后针对多个 DNA 模板或同一模板的不同区域扩增多个目的片段的 PCR 技术^[3]。相关学者^[4-7] 利用多重 PCR 技术分别建立了三重或五重 PCR 检测方法, 使转基因大豆成分的最低检出

限达 0.1%。Oefner 等^[8] 1995 年研究并开发了变性高效液相色谱 (又称核酸片段分析仪, DHPLC) 技术, 它是一种快速、自动和高通量检测核酸的技术平台。

本研究以多种转基因大豆品系为材料, 应用多重 PCR 结合 DHPLC 技术对转基因大豆进行检测。拟建立高通量快速筛选检测转基因大豆的方法, 同时构建了标准分子质粒, 确定该检测方法的灵敏度, 为转基因大豆及其加工食品的检测和市场标签标识及监管提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 转基因大豆: GT-40-3-2 (*Epsps*、*Nos*、*Camu35S*)、Mon89788 (*Epsps*、*Fmv35S*)、A2704-12 (*Pat*、*CaMV35*)、A5504-127 (*Pat*、*CaMV35*) 品系 (来自东北农业大学农业部转基因重点实验室); 非转基因大豆: 黑大豆; 大豆加工产品: 曲奇饼干、含大豆的调味粉、干豆腐 (来自上海出入境检验检疫局技术中心)。

收稿日期: 2012-09-18

第一作者简介: 陶然 (1990-), 女, 学士, 食品科学与工程专业。E-mail: 512342691@qq.com。

通讯作者: 郭顺堂 (1962-), 男, 教授, 从事食品科学与大豆加工技术研究。E-mail: shuntang@cau.edu.cn。

1.1.2 主要试剂 DNA 提取试剂盒 High Pure GMO Sample Preparation Kit (Roche 公司)。单一 PCR 反应试剂盒 Go Taq Flexi DNA Polymerase (TaKaRa 公司)。多重 PCR 反应试剂盒 Multiplex PCR Kit (Qiagen 公司)。DNA 凝胶回收试剂盒、质粒 DNA 小量试剂盒 (TaKaRa 公司)。DNA Marker (TaKaRa 公司)。IPTG 和 X-gal (天根生化科技有限公司)。三乙胺乙酸盐 TEAA (Transgenomic 公司)。乙腈 (FISHER 公司)。DHPLC 缓冲液, A 液: $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三乙胺乙酸盐, B 液: $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三乙胺乙酸盐, 25% 乙腈。

1.1.3 仪器与设备 PCR (PE 9700, ABI 公司),

DHPLC (WAVE, Transgenomic 公司), 核酸蛋白分析仪 (DU640, Beckman 公司), 凝胶成像系统 (Image Quant 300, 美国安玛西亚公司), 天平 (PB303, Mettler-Toledo), 离心机 (X-22R, Beckman 公司)。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取与纯化 称取 0.2 g 碾碎成粉末状的样品, 应用 DNA 提取试剂盒提取样品的 DNA。采用紫外分光光度法测定 DNA 浓度和纯度。

1.2.2 多重 PCR 引物序列 转基因大豆内源基因、外源筛选基因和品系特异性转化事件的引物序列见表 1。

表 1 多重 PCR 引物序列
Table 1 Sequence of multiplex PCR primers

引物和品系名称 Primer and line name	引物序列 Primer sequence	扩增产物长度 Production length/bp
<i>lectin</i> -F	5'-GCCCTCTACTCCACCCCATCC-3'	118
<i>lectin</i> -R	5'-TGGTTTTCCACTTTCCTACT-3'	
<i>Epsps</i> -F	5'-YGTGTTGAACCCRCCTKCGCGAAA-3'	101
<i>Epsps</i> -R	5'-TGATYGGCGTYGGMCTCTTYGGY-3'	
<i>Pat</i> -F	5'-GCCACAAACACCACAAGAGTG-3'	137
<i>Pat</i> -R	5'-AATCGTAAGCGTTCCTAGCCT-3'	
<i>NOS</i> -F	5'-ATCGTTCAAACATTTGGCA-3'	165
<i>NOS</i> -R	5'-ATTGCGGGACTCTAATCATA-3'	
35S-F	5'-GCTCCTACAAATGCCATC-3'	195
35S-R	5'-GATAGTGGGATTGTGCGTCA-3'	
<i>Fmv</i> 35S-F	5'-GAGTCTCCAACCATTAGCCA-3'	357
<i>Fmv</i> 35S-R	5'-CGTCACTGCGTTTCGTCATAC-3'	
Mon 89788	5'-TGTAGACACGTCGAAATAA-3'	170
	5'-GAGGCTGAAATGCTTGA-3'	
GT-40-3-2	5'-TTCATTCAAAATAAGATCATACATACAGGTT-3'	84
	5'-GGCATTTGTAGGAGCCACCTT-3'	
A2704-12	5'-GCAAAAAAGCGTTAGCTCCT-3'	64
	5'-ATTCAGGCTGCGCAACTGTT-3'	

1.2.3 单重 PCR 扩增 单一 PCR 反应总体积为 25 μL , 5 \times PCR 缓冲液 5.0 μL , MgCl_2 (25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 2.5 μL , dNTPs (2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 2.0 μL , 引物 (10 pmol) 0.8 μL , 模板 DNA 为 2 μL (约 50 ng), Taq 酶 (5 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.2 μL , 加 dd H_2O 至总体积 25 μL 。

单一 PCR 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 35 次循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。1.5% 琼脂糖凝胶检测。

1.2.4 多重 PCR 扩增 多重 PCR 反应总体积为 25 μL , 2 \times Qiagen mix 缓冲液 12.5 μL , Q-Solution 2.5 μL , 多重 PCR 引物量 5.5 μL (*Lectin* 0.8 μL , *Epsps* 0.8 μL , *Pat* 0.4 μL , *Nos* 1.5 μL , *Camv*35S 0.8 μL , *Fmv*35S 0.8 μL), 转基因大豆阳性品系混合 DNA 模板为 4 μL (GT-40-3-2, Mon89788, A2704-12 或 A5504-127, 混合比例为 4:3:2), 加 dd H_2O 至总体积 25 μL 。

多重 PCR 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 90 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s, 40 次循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。3% 琼脂糖凝胶检测。

1.2.5 DHPLC 检测条件 色谱柱: PS-DVB & C18 DNASep 色谱柱 (4.6 mm \times 50 mm, 粒度 3 μm); 柱温: 50 $^{\circ}\text{C}$; 流速: 0.9 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 紫外检测器波长范围: 260 nm; 上样量: PCR 产物 5 μL ; 片段大小: 50 ~ 460 bp。

1.2.6 标准分子质粒构建 将 *Lectin*、*Epsps*、*Pat*、*Nos*、*Camv*35S 和 *Fmv*35S 目的基因 PCR 产物纯化、切胶回收、与载体连接克隆成质粒, 作为阳性对照标准品, 测定 OD₂₆₀ 值, 计算初始基因拷贝数, 然后将其统一稀释成 1.0×10^9 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$, 等体积混合质粒。

1.2.7 检测灵敏度试验 将混合阳性模板 DNA 进行梯度稀释为 0.312、0.156、0.078、0.039、0.019 ng $\cdot \mu\text{L}^{-1}$, 并将混合质粒梯度稀释 1×10^4 、 1×10^3 、

1×10^2 、 1×10^1 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$, 确定检测灵敏度。

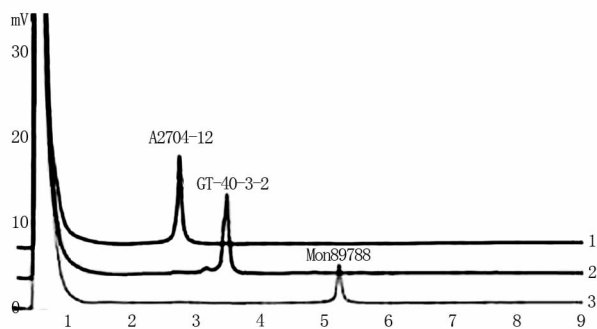
1.2.8 验证试验 利用上述建立的检测方法验证转基因大豆及加工产品。

2 结果与分析

2.1 转基因大豆 DHPLC 检测结果

2.1.1 转基因大豆品系特异性事件 DHPLC 鉴定

将转基因大豆 A2704-12、GT-40-3-2、Mon89788 PCR 产物经过 DHPLC 分离, 图 1 中从上到下依次出现的峰为转基因大豆品系 A2704-12/64 bp、GT-40-3-2/84 bp、Mon89788/170 bp, 得到正常峰谱图, 说明转基因大豆 3 个品系 DHPLC 分离鉴定结果准确。

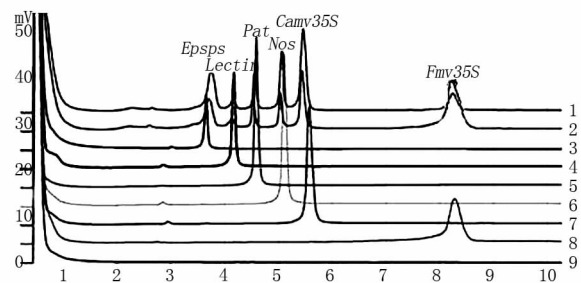


1. A2704-12/64 bp; 2. GT-40-3-2/84 bp; 3. Mon89788/170 bp

图 1 转基因大豆特异性转化事件 PCR 产物 DHPLC 分析结果

Fig. 1 The analysis results of transgenic soybean event-specific PCR products by DHPLC

2.1.2 转基因大豆 DHPLC 检测结果 将设计并筛选出的适合转基因大豆的 6 对多重 PCR 的引物 (*Lectin*、*Epsps*、*Pat*、*Nos*、*Camv35S* 和 *Fmv35S*), 分别与转基因大豆或质粒的混合模板进行单一 PCR 和多重 PCR 扩增, 并将 PCR 扩增产物分别进行 DH-



从上到下曲线依次为: 1. 转基因大豆多重 PCR 产物; 2. 质粒多重 PCR 产物; 3. *Epsps*/101 bp; 4. *Lectin*/118 bp; 5. *Pat*/137 bp; 6. *Nos*/165 bp; 7. *Camv35S*/195 bp; 8. *Fmv35S*/357 bp; 9. 空白

Curves from top to bottom were: 1. Multiple PCR products of GM soybean; 2. Multiple PCR products of plasmid; 3. *Epsps*/101 bp; 4. *Lectin*/118 bp; 5. *Pat*/137 bp; 6. *Nos*/165 bp; 7. *Camv35S*/195 bp; 8. *Fmv35S*/357 bp; 9. CK

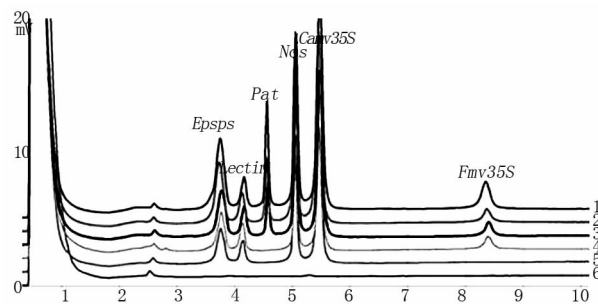
图 2 单一 PCR 和多重 PCR 产物 DHPLC 分析结果

Fig. 2 The test results of A single PCR and multiplex PCR by DHPLC

PLC 分析, 结果见图 2。可以看出, 图中曲线从 1 到 9 依次为转基因大豆多重 PCR 产物; 质粒多重 PCR 产物; *Lectin*、*Epsps*、*Pat*、*Nos*、*Camv35S*、*Fmv35S* 基因单峰和空白对照; 曲线从左到右出峰顺序依次为核酸片段从小到大为: *Epsps*/101 bp、*Lectin*/118 bp、*Pat*/137 bp、*Nos*/165 bp、*Camv35S*/195 bp、*Fmv35S*/357 bp, 并且多重 PCR 与单重 PCR 对应基因扩增产物的出峰位置一致, 重现性很好, 检测结果准确, 说明 DHPLC 分离 PCR 产物出现的峰谱图正确。

2.2 检测灵敏度试验

2.2.1 用转基因大豆混合 DNA 作模板进行 DHPLC 的灵敏度 将转基因大豆混合 DNA 模板进行梯度稀释为 0.312、0.156、0.078、0.039、0.019 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 分别对转基因大豆 DNA 模版进行多重 PCR 扩增, 并将 PCR 产物进行 DHPLC 分离检测, 结果 6 个基因同时被分离出来的最小 DNA 浓度是 0.078 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 结果表明新建立的转基因大豆多重 PCR-DHPLC 检测方法的灵敏度为 0.078 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (图 3)。



1、2、3、4、5、6 号曲线的 DNA 模板浓度分别为 0.312、0.156、0.078、0.0390、0.019 和 0 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$

The concentration of DNA template for curve 1, 2, 3, 4, 5, 6 is 0.312, 0.156, 0.078, 0.0390, 0.019 and 0 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, respectively.

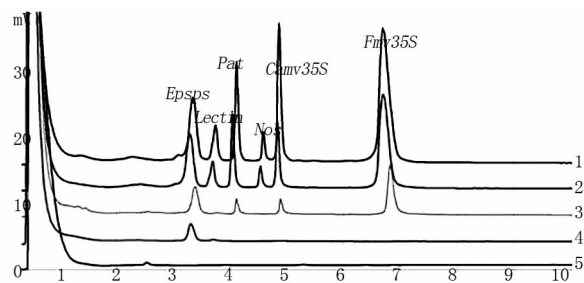
图 3 转基因大豆混合模板多重 PCR-DHPLC 灵敏度分析结果

Fig. 3 Sensitivity analysis results of hybrid template of GM soybean multiple by DHPLC

2.2.2 转基因大豆含盖基因的质粒作模板进行 PCR-DHPLC 的灵敏度 将混合质粒模板进行梯度稀释, 并对质粒为模版扩增的多重 PCR 产物进行 DHPLC 分析 (图 4)。结果转基因含量在 1×10^3 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 时, 6 个基因同时被分离出来, 说明新建立的转基因大豆多重 PCR-DHPLC 方法的质粒检测灵敏度为 1×10^3 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

2.3 验证实验

以质粒为阳性对照, 非转基因黑大豆为阴性对照, 水为空白对照, 分别对 3 份转基因大豆品系、3 份大豆加工产品进行多重 PCR 扩增, 并对 PCR 产物进行 DHPLC 检测 (图 5)。结果显示, 在 GT-40-3-2、含大豆的调味粉、曲奇饼干中检测出 *Epsps*、*Lectin*、*Nos*、*Camv35S* 基因; Mon89788 中检测出 *Epsps*、



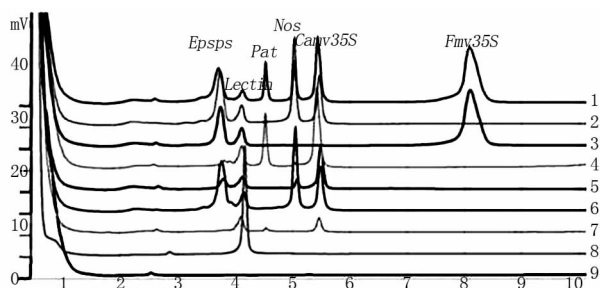
1~5号曲线的质粒模板浓度分别为 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 和 1×10 copy $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

The concentration of plasmid template for curve 1-5 is 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 and 1×10 copy $\cdot \mu\text{L}^{-1}$, respectively.

图4 转基因大豆混合质粒多重 PCR-DHPLC 灵敏度分析结果

Fig. 4 Sensitivity analysis results of hybrid plasmid of GM soybean multiple by DHPLC

Lectin、*Fmv35S*；A2704-12 和干豆腐中检测出 *Lectin*、*Pat*、*CaMV35S*；质粒阳性对照正常检出上述 6 个基因，非转基因大豆中只检测出内源基因 *Lectin*，空白对照中未检出任何基因。说明本研究建立的 PCR-DHPLC 检测方法能够准确的检测出转基因大豆成分，适用于食品中转基因大豆成分筛选检测。



从上到下依次为：1. 质粒多重 PCR 产物；2. GT-40-3-2；3. Mon89788；4. A2704-12；5. 含大豆的调味料；6. 曲奇饼干；7. 干豆腐；8. 非转基因黑大豆；9. 空白

Curves from top to bottom were: 1. Multiple PCR products of plasmid; 2. GT-40-3-2; 3. Mon89788; 4. A2704-12; 5. Seasoning powder of contained soybean; 6. Cookies; 7. Dried tofu; 8. Non-genetically Modified Black Soybeans; 9. CK

图5 DHPLC 检测大豆加工产品中转基因成分结果
Fig. 5 The results of GMO detect in soybean processing products by DHPLC

3 结论与讨论

3.1 DHPLC 在大豆转基因成分检测上的应用

本研究所建立的 DHPLC 检测方法，能够快速检测出食品中转基因大豆成分，可以大大提高对转基因大豆成分的检测速度和准确性。利用 DHPLC 能够区分不同长度 DNA 片段的特点，将多重 PCR 技术与 DHPLC 技术相结合，首先设计多重 PCR 引物在同管中同时扩增多个外显子特异的基因序列，然后将 PCR 产物用 DHPLC 技术在非变性条件下分离，最后用紫外检测或荧光检测技术进行荧光检

测，一次最多可以分析数百个样本，可以同时检测多组分多基因的转基因食品样品，达到高通量、快速、准确检测转基因食品的目的。这是多重 PCR 结合 DHPLC 技术的优势所在。与凝胶电泳方法相比，DHPLC 技术的分离时间由 50 min 缩短为 10 ~ 15 min，分辨率提高 2 ~ 4 倍，一次可以分析数百样品，且不用接触溴化乙锭等有毒试剂，因此，研究和开发 DHPLC 在转基因作物系鉴定和多基因同时筛选检测的方法更有实际意义。

3.2 影响 DHPLC 峰漂移和峰大小的因素

应用 DHPLC 技术相对于琼脂糖凝胶电泳方法具有灵敏度高、避免接触 EB 有毒试剂等优点，但也受仪器自身的限制存在不足。如色谱柱柱效会随着柱子的使用次数（8 000 次左右）而降低，柱子的洗脱能力下降，出峰时间会漂移。所以在利用 DHPLC 分离核酸片段时，每做几百个样品（注意峰型不对称或出峰不正常时），就应及时应用标准物质进行校正；每次做完样品应及时清洗色谱柱；每隔一段时间就用 50% 的丙酮清洗整个系统，以延长色谱柱使用寿命，减少峰漂移现象。研究还发现缓冲液配制浓度对 DHPLC 检测结果有一定的影响，因此配置缓冲液时尽量配置准确，避免影响试验结果。

参考文献

- [1] Hinchey M A W, Conner-Ward D V, Newell C A, et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium* mediated DNA transfer[J]. *Nature Biotechnology*, 1988, 6:915-922.
- [2] 曹际娟. 建立转基因作物及产品外源抗性基因检测技术体系的研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2004. (Cao J J. The research on establishing the detect technique system on the transgenic crop and exogenous resistance gene of the products[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2004.)
- [3] Chamberian J S, Gibbs R A, Ranier J E, et al. Detection screening of the Duchene muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification[J]. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16:1141-1156.
- [4] Hurst C D, Knight A, Bruce I J. PCR detection of genetically modified soya and maize in foodstuffs[J]. *Molecular Breeding*, 1999, 5: 579-586.
- [5] James D, Schmidt A, Wall E, et al. Reliable detection and identification of genetically modified maize, soybean, and canola by multiplex PCR analysis[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51:5829-5834.
- [6] 张秀丰, 苏旭东. 五重 PCR 检测转基因大豆[J]. *中国粮油学报*, 2008, 23(3): 194-198. (Zhang X F, Su X D. Detection of transgenic soybean by five-plex PCR[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2008, 23(3): 194-198.)
- [7] Lu I J, Lin C H, Pan T M. Establishment of a system based on universal multiplex-PCR for screening genetically modified crops[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 396:2055-2064.
- [8] Oefner P J, Underhill P A. Comparative DNA sequencing by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) [J]. *American Journal of Human Genetics*, 1995, 57(suppl): A266.