

PCR—ELISA 法对大豆品种的转基因定性检测研究^{*}

雷勃钧¹ 单红¹ 吕晓波¹ 朱水方² 陈红运² 赵文军²

(1. 黑龙江省农业科学院, 哈尔滨 150086; 2. 国家出入境检验检疫局动植物检疫实验所, 北京 100029)

摘要 以共价交联在 PCR 管壁上的寡核苷酸作为固相引物进行 PCR 扩增, 对 PCR 扩增的固相和液相产物分别进行杂交和凝胶电泳检测的 PCR—ELISA 法, 对黑龙江省常规选育品种合丰 35 和黑农 37、外源 DNA 直接导入大豆的分子育种所获品种黑生 101、及大连进口的美国 2 号等大豆, 进行转基因定性检测。结果表明: 该方法高效可靠, 可作为一种快速定性检测转基因产品的方法; 检测结果: 美国 2 号为转基因大豆, 黑生 101、合丰 35 和黑农 37 为非转基因大豆。上述结果对分子育种、生态保护、安全监测及对建立黑龙江省非转基因大豆生产保护区等具有重要意义。

关键词 大豆; 转基因; 外源 DNA 直接导入; 定性检测

中图分类号 S 565.1 文献标识码 A 文章编号 1000—9841(2004)01—0055—04

在我们进行转基因研究中对所获转基因后代的分子鉴定, 主要采取的是利用同位素等标记的探针进行 Southern 等分子杂交技术(技术较复杂有的对人体也不利), 以及针对已知目的基因序列合成引物进行 PCR 检测等技术。但无论哪种技术均要清楚所转的是何种目的基因及基因序列, 这样就给监督检测带来一定难度或者根本无法进行检测。例如, 对国外引进用于研究的材料、进口的原料等, 明知可能是转基因材料由于不知是转的何种基因而无法用上述方法去鉴定。

国外较早开展此项研究, 已把转基因检测定位于国际基本通用的, 广泛存在于转基因植物中的如 CaMV35S 启动子和 NOS 终止子等^[1]。主要采用的技术是 PCR 和 Southern 杂交分析法、ELISA 法和 RFLP、核酸序列分析等方法。如日本的 Takeami—S 等(1999)通过 RT—PCR 法检测转基因烟草及小麦; 英国的 Curtis 等(1998)使用 ELISA 法检测转基因番茄等。我国由于转基因作物应用落后于国外(美国等)的发展, 大部分仍处于实验室研究阶段。因此, 对预测的转基因作物的某些风险问题、尤其是对食品的安全问题等不如国外反映的那么强烈, 所以有关对其检测技术的研究起步也稍晚于国外。但近年, 由于在全球转基因四大作物(大豆、玉米、棉花、油菜)中, 推广最早面积最大的大豆, 至 2000 年

种植已占转基因作物总面积的 60%, 占全球大豆种植面积的 36%^[2]。已由美国不断迅速扩大扩散到阿根廷、加拿大等国。目前美国转基因大豆年产量已达 5500 万吨, 接近其总产量的 70%^[3], 并已其高产、价廉、质优等特点不断占据国际大豆市场。随着我国加入 WTO 后的市场开放, 特别是 2001 年我国又公布了《农业转基因生物安全管理条例》, 研究建立对农作物特别是大豆转基因品种及其制品的检测技术, 已势在必行发展很快且方法层出不穷。

目前所研究的检测方法无论是以 PCR 为主的检测技术还是其它如 RFLP、核酸序列分析及 ELISA 法检测基因表达蛋白的技术, 均各自存在其局限性和不足之处, 有的虽然高效快速但易出现假阳性, 灵敏性和可靠性均有待提高。有的不适于批量和自动化检测, 有的仪器昂贵无法进入应用和短期内的普及。因此, 本项研究将高效性 PCR 法和特异性强的 ELISA 法结合, 建立简便易于应用、快速准确检测的技术方法, 应用于大豆转基因定性检测, 包括对我国自主创新的“外源 DNA 直接导入技术的分子育种”育成品种为非转基因的确认、进口大豆及主栽品种的检测和监测等, 这对于黑龙江省大豆生产、大豆食品加工、生态保护、分子育种及非转基因大豆生产保护区的实施意义尤为重要。

^{*} 收稿日期: 2003—12—03

作者简介: 雷勃钧(1944—), 女, 研究员, 研究方向农业生物技术。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为黑龙江省主栽大豆品种合丰 35、黑农 37、外源 DNA 直接导入大豆的分子育种品种黑生 101 和大连进口的美国 2 号大豆(黑龙江省粮油食品进出口公司提供)。

1.2 方法

1.2.1 待测大豆样品 DNA 的抽提采取欧盟提供的 CTAB 法。

1.2.2 固相引物的包被:利用处理过的 PCR 管壁充当附着物,将用特殊试剂处理过的引物在一定条件下,以等价交联方式特异性地固定在附着物上完成包被^[4]。

本实验采用的寡核苷酸引物序列:

35S—1 5'—GCT CCT ACA AAT GCC ATC A—3'

35S—2 5'—GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA—3'

NOS1 5'—GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG—3'

NOS2 5'—TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA—3'

探针序列:

35S: 5'—DIA—ATC GTT GAA GAT GCC TCT GCC GAC A—3'

NOS: 5'—DIG—gAA TCC TgTTgCCg—gTCTTgC—3'

1.2.3 PCR 扩增

在已包被寡核苷酸的管内进行 PCR 扩增,对 35S 启动子和 NOS 终止子,PCR 反映体系均为: 10 × buffer 5ul, 25mMMg²⁺ 4ul, 10mMdNTP 1ul, 25uM 引物 1(液相引物)1ul, 25/8uM 引物 2(固相引物)1 ul, Taq 酶 2U, 加水至 50ul。液相引物与固相引物的浓度比值 8 :1。35S 启动子和 NOS 终止子的扩增条件如下: 94℃ 5min, 54℃ 55sec, 72℃ 1min, 1 个循环; 94℃ 30sec, 54℃ 50sec, 72℃ 30sec, 35 个循环; 72℃ 延伸 8min。取液相产物 8ul, 80v 电压, 2% 琼脂糖凝胶电泳 40min, EB 染色 30min。

1.2.4 ELISA 检测

固相产物在 5×SSC(含 0.5%BR)中 45℃—50℃杂交 1 小时, 杂交后用 0.5×SSC, 0.1%Tween—20 洗掉非特异性结合的探针, 加入 100 ul AP(1 : 2500)使之与探针上的地高辛结合, 10mg/ml 的 PNPP 显色 30 分后, 呈现黄绿色的为阳性。通过酶标仪读数(波长为 405nm)。去掉空白对照, 高于 1.0 为阳性, 低于 0.1 为阴性。

2 实验结果

2.1 液相产物 PCR 琼脂糖凝胶电泳结果

对待测 4 个大豆样品的 DNA 进行的 PCR 扩增的液相产物琼脂糖凝胶电泳结果, 阳性 CK 和美国 2 号大豆样品在 250—100bp 间出现阳性带, 见图 1、图 2。

1. Marker 分子量从上至下为 2000bp, 1000bp, 750bp, 500bp, 250bp, 100bpM, 2000bp—1000bp DNA step ladder

1. 阳性对照; 2 美国 2 号; 3. 阴性对照(水); 4. 合丰 35; 5. 黑生 101; 6 黑农 37; 7. 阴性对照(缓冲液)

M, 2000bp—1000bp DNA step ladder

1. Plus control; 2 American 2; 3. Negative control(water); 4. He Feng 35; 5Hei Sheng 101; 6. Hei Nong 37; 7Negative control (Buffer)

为阳性。

2.2.2 酶标仪读数结果 A、B、G、H 均高于 1.0 为阳性(+), 其余为阴性(—)详见下表。

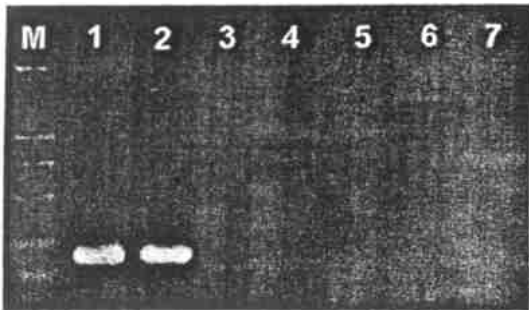


图 1 CaMV 35S 启动子特异性扩增液相产物凝胶电泳结果

Fig. 1 Electrophotrtpe of the liquid—phase products from PCR amplification of template DNA from soybeam with CaMV 35S promoter specific primers

2.2 固相产物 ELISA 检测结果

2.2.1 杂交显色结果见图 3

从图 3 中可看到 A、B 和 G、H 显示特异的黄色

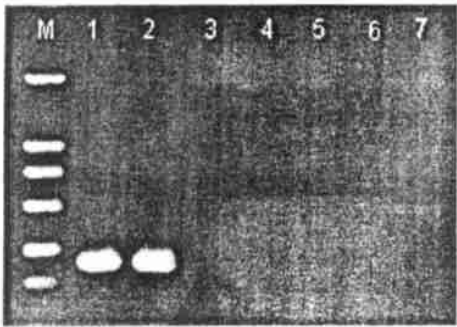


图 2 NOS 终止子特异性扩增
液相产物凝胶电泳图谱

Fig. 2 Electrophoertype of the liquid—phase products from
PCR amplification of template DNA from soybeam
with NOS terminator specific primers

Marker 分子量从上至下为 200bp、100bp、750bp、500bp、
250bp、100bp M、2000bp—1000bp DNA step ladder
1. 阳性对照; 2. 美国 2 号; 3. 阴性对照(水); 4. 合丰 35; 5.
黑生 101; 6. 黑农 37; 7. 阴性对照; (缓冲液)
M, 2000bp—1000bp DNA step ladder
1. Plus control; 2. American 2; 3. Negative contro(water) 4. He
Feng 35; 5. Hei Sheng 101; 6. Hei Nong 37; 7. Negative control
(Buffer)

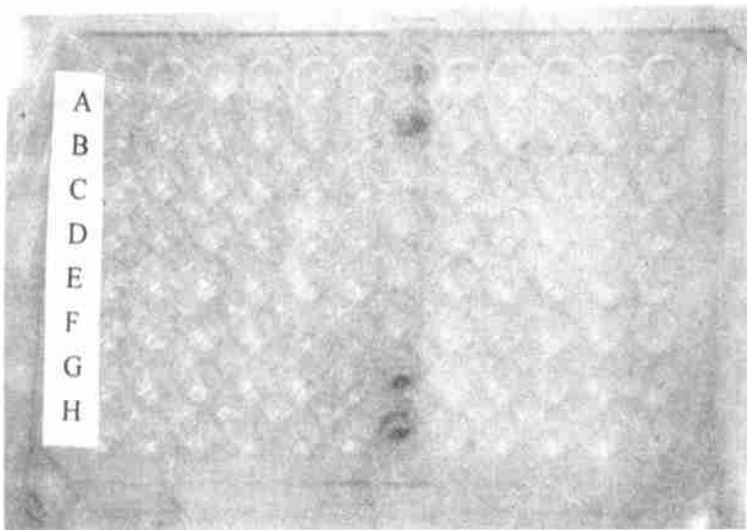


图 3 固相产物 ELISA 检测结果

Fig. 3 The result ELISA solid—phase products

表 1 酶标仪读数

Table 1 The data of Microplate Reader

| | 阳性 Plus | 美国 2 号 American 2 | 阴性样品 Hegative sample | 空白对照 Negative control |
|-----------|-------------|----------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 读数 Data | 1. 97—1. 59 | 2. 15—1. 64 | 0. 027—0. 086 | 0. 00 |
| 结果 Result | + | + | — | — |

A. 阳性 CK B. 美国 2 号 C. 合丰 35
D. 黑农 37 E. 黑生 101 F. 阴性 CK
G. 阳性 CK H. 美国 2 号
A. Puls control B. American 2 C.
Hefeng35
D. Heinong 37 E. Heisheng 101
F. Negative control G. Plus control
H. Amerian 2

进行分析。PCR—ELISA 法将 PCR 扩增的高效性和 ELISA 的高特异性结合, 建立起了一种检测 35S 启动子等的竞争性 PCR, 灵敏度高达 0. 1%, 足以达到欧盟的要求(转基因检测阈值为 1%)。欧盟利用 PCR 技术对转基因玉米和大豆的 35S 启动子和 NOS 终止子进行水平测试时, 检测灵敏度达到 2%^[5], 而利用 PCR—ELISA 法对转基因大豆的检测灵敏度比欧盟推荐 PCR 方法提高 5—10 倍。

目前, 对 PCR 产物特异性的确认主要包括电泳、RFLP、序列分析等方法, 少量样品可以用通过电泳, 用分子量标准确定 DNA 条带的大小, 也可用 RFLP 或核酸测序及同源性分析进行验证, 但这些方法均不适于大批量样品检测。利用 PCR—ELISA 方法, 在 PCR 结束后用标记探针与管壁上的固相产物杂交, 这样就提高了检测的特异性, 因为 PCR 扩增出的非特异性产物与探针互补的可能性很小, 而且结果的判定通过紫外分光光度计或酶标仪, 以数字的形式输出。与此同时, 通过凝胶电泳对液相产物进行检测。两次检测有效地避免了假阳性出现,

3 讨论

PCR—ELISA 法是利用共价交联在 PCR 管壁上的寡核苷酸作为固相引物, 同时加入与固相引物序列反向的引物作为液相引物。在 Taq 酶作用下, 以目标核酸为模板进行扩增, 固相产物交联在管壁上, 液相产物游离于液体中。对于固相产物可用标记探针与之杂交, 再用碱性磷酸酯酶标记的链亲和素进行 ELISA 检测, 同时通过凝胶电泳对液相产物

同时,方法简便快速适于较大量样品的检测,大大提高了检测效率。

本实验的检测技术虽定为 PCR—ELISA,但对于 ELISA 方法应用本实验的更确切的含义是分子杂交。因此,PCR 法和 ELISA 法相结合,对于被检测样品完成了两次杂交的检测,结果更为可靠。

本项研究的关键技术是固相引物的包被,该技术为朱水芳发明专利^[4]。其中,液相引物与固相引物的浓度比值决定了两种产物的量,8:1 利于杂交检测,同时也适合凝胶电泳检测。

国际上现对转基因产品(GMOs)的检测普遍定位于 3 种基因,即 CaMV 35S 启动子、NOS 终止子及 NPT II 基因,如检不出视为非转基因,只要检出其中一种即为转基因。因几乎所有近来研究的转基因植物中均存在 35S 启动子和 NOS 终止子,这是目前界定任一植物是否为转基因作物的通用标准,当然,这并不是永远不变的。应不断发展检测引物及探针,如抗生素基因、来自农杆菌 Ti 质粒边界序列及信号序列(启动子及终止子)及密切关注现在不常用或新的标记物和调节基因的应用,随时建立新的检测引物及探针。另外,由于 35S 启动子的序列来自于花椰菜花叶病毒, NOS 终止子序列来自根瘤农杆菌。某些植物能自然感染花椰菜花叶病毒或根瘤土壤杆

菌,尽管检测方法十分严密,也不能排除产生假阳性的可能。从现已有技术方法相比较,PCR—ELISA 法还是一种高效可靠适于大批量鉴定的方法。因此,本项研究利用 PCR—ELISA 方法对 4 个来源不同的大豆进行转基因检测,所获检测结果应具有国际法律效应。当然,本实验结果对于有人提出的“外源 DNA 直接导入技术”所获的品种如大豆黑生 101 等是否为转基因的疑问,在此也得到了具有分子检验依据的确切回答。

参 考 文 献

- 1 赵文军,陈红运,黄文胜. PCR—ELISA 在转基因产品检测中的应用[J]. 植物检疫, 2001, 15(5): 297-299.
- 2 姚文国,朱水芳主编. 国外转基因产品检测技术汇编[J]. 深圳: 深圳出入境检验检疫局, 2001: P1—7, 38—45.
- 3 王国英. 转基因植物的安全性评价[J]. 农业生物技术学报, 2001, 9(3): 205-207.
- 4 S. F. Zhu. 2000. Establishment of Aunique Method for Rapid Detection of GMOs products; Capture PCR—ELISA In the proceeding of the First Asian phytopathology congress 2000. 8: 12-17.
- 5 Markus L, Peter B. IUPAC collaborative trial study of a merhod to detcor genetically modified soybeans and msize in dried powder J. AOAC Inter. 1999, 84(4): 923-928.

STUDY ON QUALITATIVE TEST OF TRANSGENES BY PCR—ELISA IN SOYBEAN CULTIVARS

Lei Bojun¹ Lu Xiaobo¹ Shan Hong¹ Zhu Shuifang² Chen Hongyun² Zhao Wenjun²

(1. Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086;

2. Quarantine Institute in Animals and Plants of State Quality Test Bureau, Beijing 100029)

Abstract The oligonucleotides which covalent primers, bonded on the wall of a PCR tube as solid primers, have bean amplified by PCR equipment. The Solid and Liquid phase amplified by PCR were hybridized and done with gel—eleitro phoresis respectively. Some Heilongjiang soybean cultivars Suchas Hefeng 35 and Heinong 37 (bred by conventional breeding), Heisheng 101 (bred by introducing exogenous DNA through pollen tube channel, and Soybean of American 2 from Dalian importing, were tested by the PCR—ELISA. The result showed that Soybean of American 2 was a transgenic soybean, Heisheng 101, Hefeng 35 and Heinong 37 were not. Those have important meaning in plant molecular breeding, ecological protecting and safety monitoring.

Key words Soybean; Transgene; Direct introduction exogenous DNA; Qualitative analysis