

论著

转基因大豆低密度基因芯片的检测方法研究

周萍萍¹ 尤元海² 吴永宁¹ 张建中²

(1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100050;

2. 中国疾病预防控制中心传染病控制所, 北京 102206)

摘要:目的 建立 Roundup Ready 转基因大豆(简称 RRS)的基因芯片检测方法,探讨其在转基因大豆检测中的应用。方法 根据大豆中所转入的外源基因,选择 *camv35s* 启动子、*nos* 终止子和 *cp4 epsps* 基因,以大豆内源基因 *lectin* 基因为内参照基因设计了引物和探针,并制备了核苷酸芯片;通过多重 PCR 对样品核酸进行扩增和荧光标记后,将 PCR 产物与芯片杂交,检测大豆样品中所含的外源基因,并评价方法的灵敏度。结果 检测转基因含量不同的 RRS 标准参考物,结果显示:*camv35s* 启动子、*nos* 终止子、外源基因 *cp4 epsps* 检测灵敏度均可达 0.45%。结论 本研究所建立的基因芯片检测方法有良好的灵敏度及可重复性,有助于实现转基因大豆的高通量、高灵敏的检测。
关键词:转基因;大豆;寡核苷酸序列分析;聚合酶链反应

Study on Detection Method of Low density Gene Chip of Transgenic Soybeans

ZHOU Ping-ping, YOU Yuan-hai, WU Yong-ning, ZHANG Jian-zhong

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100050, China)

Abstract: **Objective** To develop the detection method of low-density gene chip to detect exogenous genes in transgenic soybeans simultaneously. **Method** Three exogenous DNA fragment, including *camv35s* promoter, *nos* termination and *cp4 epsps* gene, and endogenous gene *lectin* were selected as target genes, the primers and probes of which were designed and synthesized, then the probes were immobilized on the chip. Multiplex PCR was used to amplify the target sequences from the soybean sample meanwhile the Cy5-dUTP was adulterated into amplicons, which were hybridized with DNA microarray to evaluate the sensitivity. **Results** The results showed that the DNA chip for identifying various RRS Certified Reference Materials was highly specific and repeatable and the detection level of the exogenous genes in RRS was 0.45%. **Conclusion** The DNA microarray procedure might help to develop a method with high throughput and sensitivity in detecting transgenic soybean.

Key word: Transgenes; OLIGONUCLEOTIDE ARRAY; Sequence Analysis; Polymerase Chain Reaction

国际农业生物技术应用服务组织 (ISAAA) 在 2006 年度报告中报道,全球转基因作物种植面积正以 13% 的速度迅猛增长,首次突破了 1 亿公顷^[1]。鉴于转基因食品的安全性尚无定论,为保障消费者的知情权和选择权,许多国家对转基因食品实行标识管理。我国政府对转基因食品采取了强制性标识管理,2002 年实施的“农业转基因生物标识管理办法”列出了第一批标识管理的转基因食品,转基因大豆名列首位^[2]。迄今为止,转基因大豆依然是最主要的转基因作物,种植面积 5 860 万公顷(占全球转基因作物总种植面积的 57%)。在转基因作物中,转基因大豆——抗草甘膦大豆(Roundup Ready)是世界上种植面积最大的转基因作物^[1]。

推进转基因食品标识制度的实施,必须发展可靠的检测方法。目前转基因食品的官方检测方法有 2 种,一是基于蛋白质的检测,如酶联免疫反应法(ELISA)^[3],二是基于 DNA 的检测,如聚合酶链反应法(PCR)^[4]。相对于蛋白质来说,DNA 较稳定,即使在深加工产品中也能检测出 DNA 的存在。基于 DNA 检测的 PCR 技术十分灵敏,呈现高度特异性和敏感度,可以进行转基因食品的定性、定量检测^[5]。但是,因为 PCR 检测一次只能针对一种转基因成分,欲得到比较完整的信息,需要进行多次不同的反应,操作繁琐。伴随着世界范围内新的转基因作物不断涌现,已有的 PCR 检测技术不能满足大量的不同品系转基因食品检测的需要^[6]。DNA 芯片检测是 20 世纪 80 年代末在美国出现的一项新兴技术,具有高通量、微型化和自动化的特点,一次检测能够定性筛选大量不同种类的基因修饰物^[7,8],进而大大提高了对转基因食品的检测能力。本文以 Roundup Ready 大豆为检测样品,探讨建立其基因芯片检测

基金项目:国家科技部 863 计划(2002AA212041);
973 计划(2001CB109001)。

作者简介:周萍萍 女 助理研究员

通讯作者:吴永宁 男 研究员 博士生导师

张建中 男 研究员 博士生导师

方法,并初步评价其灵敏度及应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验样品 Roundup Ready Soybean 40 - 3 - 2 (简称 RRS) 阳性和阴性样品由美国孟山都 (Monsanto) 公司提供。RRS 标准参考物,5 %、2 %、1 %、0.45 %、0.1 %购买于比利时 IRMM。spvC 中国 CDC 传染病模板,控制所惠赠。

1.1.2 主要试剂和材料 2 ×CTAB 提取液(自备): 100 mmol/L Tris - 盐酸 (pH 8.0), 20 mmol/L EDTA, 1.4 mol/L 氯化钠, 质量浓度 20 mg/L CTAB, 40 mmol/L 巯基乙醇。Taq 酶, dNTP, 为华美生物工程公司产品。高效液相杂交液、蛋白酶 K (20 mg/ml)、二甲亚砜 (DMSO)、Tris 饱和酚、氯仿、无水乙醇均购自北京博大泰克公司。氨基载玻片 (76.2 mm × 25.6 mm) 和 384 孔板购自上海百傲科技有限公司。DNA 纯化试剂盒, 美国 Promega 公司。热启动缓冲液 (10 × Rockstart buffer 自备): 500 mmol/L Tris、160 mmol/L (NH₄)₂SO₄、1 % 吐温 20、50 mmol/L H₃PO₄, 最终调 pH = 8.8。

1.1.3 主要仪器 Gene TACTIM G3 芯片工作站、芯片点样仪、芯片杂交仓、芯片扫描仪, 美国 Perkin Elmer 公司; PCR 仪, Little Genius TC - 25 - H 型 HANGZHOU DAHE Thermo-Magentic 公司; 紫外交联仪, CL - 1000 Ultraviolet 型; EAGLE EYETIM II 型读胶仪, 美国 Stratagene 公司。

1.1.4 DNA 的提取 基因组 DNA 提取用 CTAB 法^[3], 溶于 TE (pH 8.0), DNA 浓度在 260 nm 的紫外

分光光度计下测得, 将 DNA 浓度用双蒸水调到 10 ~ 100 ng/μl 于 - 20 °C 保存。

1.1.5 引物的设计与筛选及探针设计 参照文献报道及应用 Primer 5.0 软件, 选取转基因大豆的启动子 *camv35s*、终止子 *nos*、外源结构基因 *cp4 epsps* 及大豆的管家基因 *lectin* 作为目标检测基因, 设计并合成了多对引物。每一对引物经 PCR 扩增可得到相应的产物, 产物经纯化、鉴定后做探针。将多对引物混合, 可在一个多重 PCR 扩增体系中扩增出各自的目的基因, 在体系中加入一定数量的荧光标记的 dNTP, 可对目的基因进行荧光标记。所以引物选择的标准是 (1) 引物特异性好, 扩增效率高。(2) 在引物与探针的设计上要尽量使它们的退火温度一致 (55 ~ 60 °C)。(3) 探针的长度在 150 ~ 450 bp。经过多重 PCR 扩增体系的筛选, 留取 4 对引物用于制备探针和进行扩增标记。引物序列见表 1, 由北京奥科生物公司合成。探针序列见表 2。序列经由大连宝生物 (TaKaRa) 工程公司测定验证。

表 1 引物序列

引物名称	序列 (5' - 3')	bp
camv35s - 1	CCGACAGTGGTCCCAAAGATGGAC	162
camv35s - 2	ATATAGAGGAAGGGTCTTGC GAA GG	
nos - 1	GATTGAATCTGTGCCGGT	213
nos - 2	GTAACATAGATGACACCGCG	
cp4epsps - 1	GGAGTCTTCCAGACCGTTCAT	294
cp4epsps - 2	TTCGCGCCCTGCTTGTT	
lectin - 1	TGCCGAAGCAACCAACATGATCCT	414
lectin - 2	TGATGGATCTGATAGAATTGACGTT	

表 2 芯片杂交的探针序列 (经测序鉴定)

探针所检测的基因	序列 (5' - 3')	探针长度 (bp)
camv35s	CCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCAACACGAGGACATCGTGAAAAAGACGTTCC AACCACGTTCTCAAA GCAA GTGGA TTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAAGGATGACGACAAT CCCCTATCC TTCGCAAGACCTTCTCTATAT	162
nos	GTAACATA GATGACACCGCGCGGATAATTATCCTA GTTTCGCGCTATATTTGTTTCTATCGC GATTTAAATGATAATTGCGGACTCTAATCATAAAACCATCTCATAAAATAACGTCATGCATT CATGTTAATTATACATGCTTAACGTAATTCACAGAAATTATGATAATCATCGCAAGACCGGC AACAGGATTCAATC	213
cp4epsps	GGAGTCTTCCAGACCGTTCATCAGGTCGCCCTTCCGCGAAGCGCGCGCGACAGCGAATCG GATATCTGTCGATCATCGAAGCGCGCGGTTCTCCGCGACCGTGACGCCCTTCA GCGTGGAGGAAGC GAACGCGCAGGTCCGCCACGTTCTGCCGCCGGCAA GCGCGGGTTGATGACTTCGATGTCGGCGC CCATTTCTGCA GCGTCA GGATGAGGCCGGTGC GGGTGGGTTCATCA GCACGTTGAGGATGGTGA CGTCGGA GCCCGGAACAA GCA GGGCCGCAA	294
lectin	TGCCGAAGCAACCAACATGATCTCCAA GGA GACGCTATTGTGACCTCCTCGGAAA GTTACAAC TCAATAAGGTTGACGAAACGGCACCCCAAAACCTCGTCTCTTGGTTCGCCCTCTACTCCACCCC CATCCACATTTGGGACAAA GAAACCGGTA GCGTTCGCA GCTTCGCCGCTTCCTCAACTTCACCTTC TATGCCCTTGACACAAAA GCGTTGCA GATGGGCTTGCTTCTTCTCGACCAATTGACACTAA GC CACAAACATGCA GGTATCTTGGTCTTTCAACGAAAACGA GTCTGGTGATCAA GTCGTCGCTGT TGAGTTTGACACTTTCGGAACCTCTTGGGATCCACCAATCCACACATCGGAATTAACGTCAATCT ATCAGATCCATCA	414

1.2 方法

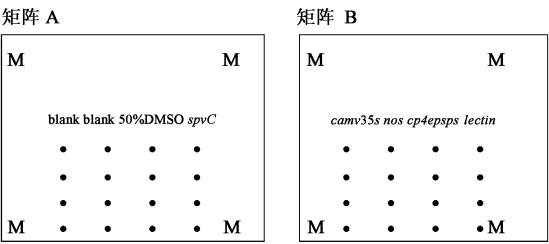
1.2.1 RockStart PCR(热启动 PCR)扩增反应体系的建立 RockStart PCR 扩增反应体系为20 μ l,其中含 Rockstart buffer 4.0 μ l、引物 (Primer, 5 μ mol/L) 1.6 μ l、dNTP(10 mmol/L) 0.4 μ l、模板 DNA (216 ng/ μ l) 2.0 μ l、Taq (3 U/ μ l) 0.3 μ l、去离子水 11.7 μ l。

PCR 反应条件 95 预变性5 min;94 变性 40 s;58 退火40 s;72 延伸1 min;进行 40 个循环;72 延伸5 min。

PCR 产物的检测 扩增完毕后,取2.0 μ l反应液与0.4 μ l 6 $\times$ 溴酚蓝缓冲液混合,在 1.5 %琼脂糖凝胶(含 EB 0.5 g/ml)中电泳,用读胶仪观察结果并照相。

1.2.2 探针的制备与纯化 探针是将单纯 PCR 产物进行切胶回收,采用试剂盒法纯化。经测序鉴定与文献报道一致。

1.2.3 基因芯片的制备及探针排布阵列示意图 DNA 芯片的矩阵分布设计成 6 $\times$ 6 阵列,采用基因芯片全自动点样仪点样,其矩阵分布见图 1。矩阵 A 为质控矩阵(M 为定位标记 marker,目的是标明探针所在位置;Blank 为空白对照,目的是监控杂交后的背景;50 % DMSO 为阴性对照,目的是监控杂交后的背景;spvC 为阳性对照,目的是监控芯片杂交体系的情况)。矩阵 B 为检测矩阵(从左至右分别为检测 *camv35s*、*nos*、*cp4epsps* 和 *lectin* 基因的固定探针)。每种探针重复 4 个点,查看检测信号的重复性。



注:M 为定位 marker; blank 为空白对照; 50 % DMSO 为阴性对照; spvC 为阳性对照; *camv35s* 为启动子; *nos* 为终止子; *lectin* 为管家基因。

图 1 DNA 芯片的矩阵分布

1.2.4 点样及点样后处理 在探针中加入等体积 DMSO 稀释探针,使探针浓度为500 ng/ μ l,将探针加到 384 孔板对应的孔中,用点样仪取样,并按下列步骤进行处理。湿化:将玻片的阵列面向 60 水浴锅,在蒸发的液面上停留数秒,让固定探针再水合化,同时查看阵列点的情况;干烤:80 1 h;紫外交联:将玻片上打印有 DNA 的面朝紫外灯方向,以 250 mJ 的紫外照射,使 DNA 固定在玻片上;清洗:0.1 % SDS 震荡清洗2 min,水震荡清洗2 min $\times$ 2;变性:90 水浴2 min,立即浸入预冷无水乙醇中、晾干

待杂交。

1.2.5 多重 PCR 荧光标记扩增体系的建立 采用多重 PCR 方法对提取的被检测基因进行扩增和 Cy5 荧光标记。反应体系:在25 μ l PCR 体系中含 10 $\times$ Rockstart buffer 5.0 μ l, Primer (混合引物 2 μ mol/L) 5.5 μ l, dNTP (10 mmol/L, 无 dTTP) 0.5 μ l, Cy5 dUTP (1 mmol/L) 0.5 μ l, dTTP (1 mmol/L) 2.0 μ l, 模板 DNA (120 ng/ μ l) 3.5 μ l, Taq (3 U/ μ l) 0.5 μ l, 去离子水 7.5 μ l。引物对等比例混合:35s - 1、35s - 2 (2 μ mol/L) 1.5 μ l; nos - 1、nos - 2 (2 μ mol/L) 1.5 μ l; lectin - 1、lectin - 2 (2 μ mol/L) 1.0 μ l。

PCR 反应条件:同 1.2.1。

1.2.6 质控 为了保证基因芯片方法的准确性和可靠性,同时还设计了阳性质控引物和探针 (*spvC*), *spvC* 是鼠伤寒沙门菌的质粒上的侵袭素基因,基因模板由中国疾病预防控制中心传染病控制所诊断室所赠。

阳性对照 *spvC* 普通 PCR 反应标记体系的建立

在25 μ l PCR 体系中含 10 $\times$ buffer 2.5 μ l、Primer (混合引物 2 μ mol/L) 5.5 μ l、dNTP (10 mmol/L, 无 dTTP) 0.5 μ l、Cy5 dUTP (1 mmol/L) 0.5 μ l、dTTP (1 mmol/L) 2.0 μ l、模板 DNA (90 ng/ μ l) 0.5 μ l、Taq (3 U/ μ l) 0.5 μ l、去离子水13.0 μ l。

PCR 反应条件与 1.2.1 相同。采用乙醇沉淀法纯化标记多重 PCR 扩增产物^[9]。

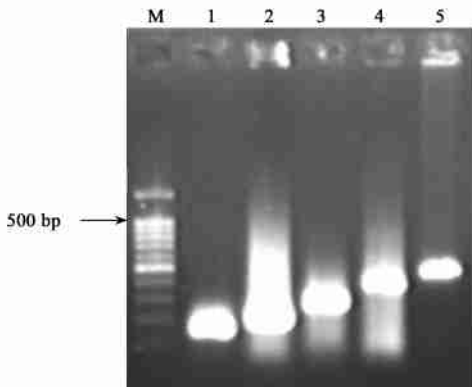
1.2.7 芯片的杂交和信号检测 按1 10比例,吸取标记的多重 PCR 扩增产物 10 μ l,与高效杂交液 100 μ l混合;在芯片杂交仓 42 杂交18 h;将芯片取出,放入洗膜液,洗涤 2 min;放入洗膜液,在 42 下洗涤2 min,水洗2 min;晾干待扫描。

用基因芯片扫描仪在660 nm处对标记 Cy5 的杂交结果进行扫描。实验使用的芯片扫描仪 cut-off 值阳性结果设定为 600,背景值设定为 100。本研究根据扫描仪读取的信号相对比值进行结果判读。经反复多次的测定,以阴性探针信号为背景值,计算阳性探针与阴性探针信号的比值结果大于 4.1 为阳性样品。以空白对照为背景值,计算阴性探针信号与空白对照信号比值,结果小于 2.3 为阴性样品。信号在 2.3 ~ 4.1 之间为可疑,需要重新检测再确定。

2 结果

2.1 热启动 PCR 扩增体系扩增结果 用上文所述过的方法,可稳定扩增出转基因大豆中的 *camv35s*、*nos*、*cp4epsps*、*lectin* 基因片段。用 1.2.6 中建立的 PCR 扩增体系及 PCR 反应条件,以鼠伤寒沙门菌 *spvC* 为模板,以 *spvC* - 1、*spvC* - 2 为引物进行

PCR 扩增,能稳定地扩增出阳性质控对照 *spvC* 基因片段。这些基因片段经 1. 2. 2 ~ 1. 2. 4 步骤后,用固定在芯片上的固定探针和多重 PCR 荧光标记的 PCR 产物进行芯片杂交,以检测目标基因是否存在。这些固定探针对应的长度分别为 162、213、294、414、484 bp。所有片段被固定在芯片上成为固定探针。图 2 显示的是这些固定探针。经切胶回收,试剂盒纯化后的琼脂糖凝胶电泳结果均与理论值相符。

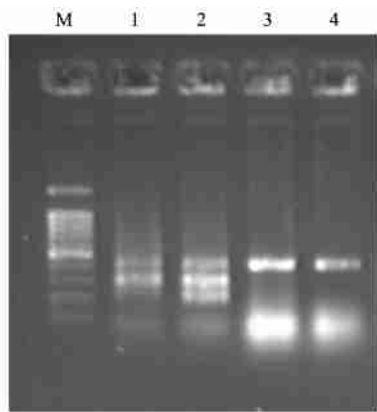


M:100 bp ladder 1: *cam35s* (162 bp) 2: *nos* (213 bp)
3: *cp4 epsps* (294 bp) 4: *lectin* (414 bp) 5: *spvC* (484 bp)

图 2 转基因大豆 DNA 检测芯片固定探针电泳结果

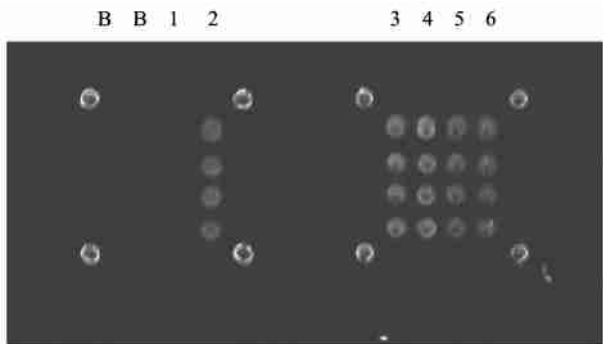
2.2 多重 PCR 荧光标记扩增体系结果 将本文建立的多重 PCR 荧光标记体系分别以 Roundup Ready 40 - 3 - 2 转基因大豆和非转基因大豆 DNA 为模板进行 PCR 扩增,所得到的扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果见图 3。图 3 中泳道 1 和 2 为转基因大豆的平行扩增电泳结果,均可看到 3 条扩增条带(其中 1 的一条比较弱),片段大小为 213,294,414 bp,表明所扩增的模板中有 *nos* 终止子, *cp4 epsps* 外源基因和管家基因 *lectin* 的存在;泳道 3 和 4 为非转基因大豆的平行扩增电泳结果,均只有一条扩增条带,片段大小为 414 bp,表明所扩增的模板中只有管家基因 *lectin* 的存在。此电泳结果验证了多重 PCR 扩增体系特异性和可重复性。在已建立好的基因芯片检测方法中可省略此步骤,多重 PCR 荧光扩增产物直接和芯片杂交进行荧光检测。

2.3 Roundup Ready 40 - 3 - 2 转基因大豆和非转基因大豆芯片杂交和信号检测结果 将 Roundup Ready 40 - 3 - 2 转基因大豆和非转基因大豆 DNA 模板分别进行多重 PCR 扩增荧光标记,在芯片杂交仓和已经点样处理过的芯片进行杂交。杂交 18 h 后清洗过的芯片在基因芯片扫描仪 660 nm 处对 Cy5 标记的杂交情况进行扫描,结果见图 4 和图 5。图 4 中右侧矩阵 B 结果显示,从 Roundup Ready 40 - 3 - 2 转基因大豆中检测到 *camv35s* 启动子、*nos* 终止子、外源基因 *cp4 epsps* 和大豆管家基因 *lectin*,与预期结



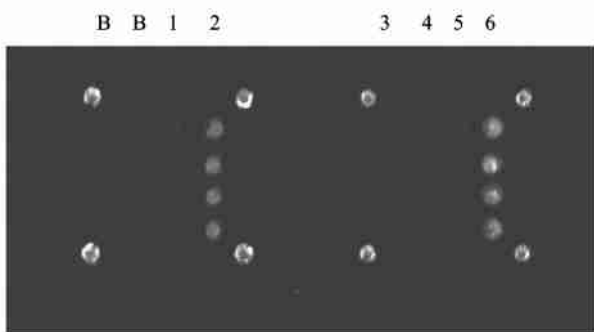
Marker:100 bp ladder 1:转基因大豆 2:转基因大豆
3:非转基因大豆 4:非转基因大豆

图 3 转基因大豆和非转基因大豆多重 PCR 电泳结果



B:空白 1:50 %DMSO(阴性对照)
2: *spvC*(阳性对照) 3: *camv35s* 启动子 4: *nos* 终止子
5: *cp4 epsps* 6: *lectin*(管家基因)

图 4 Roundup Ready 40 - 3 - 2 转基因大豆芯片杂交结果



B:空白 1:50 %DMSO(阴性对照)
2: *spvC*(阳性对照) 3: *camv35s* 启动子 4: *nos* 终止子
5: *cp4 epsps* 6: *lectin*(管家基因)

图 5 Roundup Ready 40 - 3 - 2 非转基因大豆芯片杂交结果

果一致。图 5 右侧矩阵表明阴性样品只有 *lectin* 基因,没有其他外源基因的存在。从杂交的质控矩阵 A 可以看到空白对照及 50 % DMSO(阴性对照)没有阳性信号,说明杂交体系没有非特异杂交的干扰。而 *spvC*(阳性对照)杂交结果阳性,说明杂交体系正常,没有假阴性。

2.4 基因芯片检测方法的灵敏度评价 本研究以转基因含量分别为 100 %、5 %、2 %、1 %、0.45 %、0 % 的 Roundup Ready 40 - 3 - 2 转基因大豆的 DNA 为模

板进行多重 PCR 扩增荧光标记。并用芯片杂交检测,结果显示转基因含量 0.45 % 以上的 RRS 40 - 3 - 2 均可被检出。检测结果见图 6。

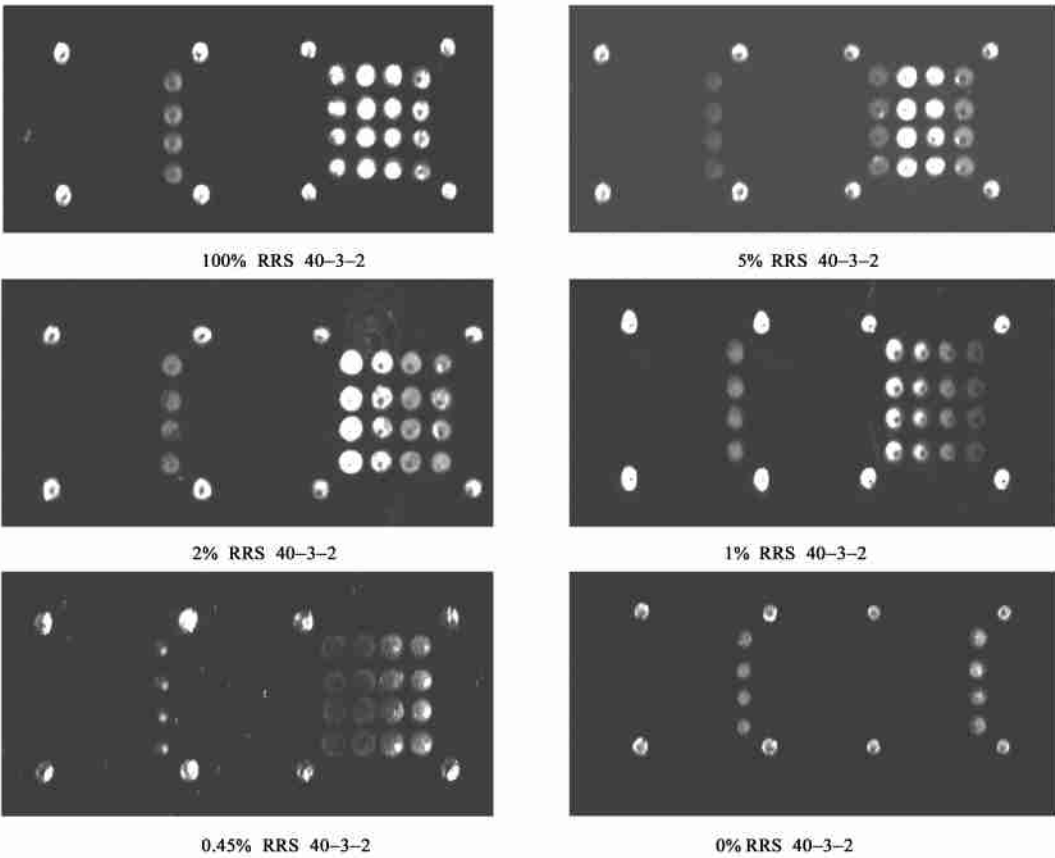


图 6 不同转基因含量的 RRS 基因芯片检测的芯片扫描结果

3 讨论

目前,国际上对转基因食品检测的 DNA 方法多为 PCR 方法。PCR 法检测转基因食品程序一般包括筛选和定性两部分。筛选即通过对大部分转基因食品中插入的公共基因元件如 *camv35s* 启动子、*nos* 终止子、标记基因或抗性基因进行检测,初步判断是否含有转基因成分,但存在一定的假阳性和假阴性^[9]。如果初筛的结果为阳性可进一步做定性检测,即通过检测该食品的外源结构基因以判断转入的外源结构基因的类型。基因芯片检测可以同时完成筛选和定性检测。在筛选检测和定性检测的同时检测种属特异的管家基因做内源参照基因,可以确定样品 DNA 的抽提质量,检验 PCR 扩增系统的稳定性,避免假阴性结果。也可以应用管家基因探针有效地鉴别未知的转基因深加工产品,特别是多种成分的混合型加工产品中的 DNA 来源。因此本研究在这些方向作了一些探索,建立了高灵敏度可重复性的基因芯片检测方法。

样品基因组 DNA 的抽提是转基因食品检测的第一步,也是关键的一步^[10]。后面的分析结果依赖

于这第一步的成功。本研究采用的 CTAB 法和纯化试剂盒结合的方法既可以发挥 CTAB 对植物细胞膜的高效裂解作用,也可以用专门结合 DNA 的树脂硅胶柱起到纯化的作用。100 mg 样品可以抽提到 50 ng 左右的基因组 DNA。

本研究中引物设计的一个特别的原则是尽量在一个目的基因的编码区内设计引物,不同于大多数 PCR 检测文献中的在两个基因的连接区设计引物。这样就尽可能地避免了在杂交时探针间交叉错配。

热启动 PCR 是除了好的引物设计之外,提高 PCR 特异性最重要的方法之一^[11]。本研究所用的 ROCK Buffer 热启动 PCR 的原理是将一定浓度的 Mg^{2+} 加入到富含磷酸的缓冲液中,形成的磷酸镁沉淀稳定、耐储存,可以将 Mg^{2+} 和 Taq 酶隔开,只有在预变性反应后的第三个热循环 Mg^{2+} 才会被释放到反应中,被 Taq 聚合酶所利用。从 PCR 扩增的结果可以看出热启动 PCR 有效抑制了 PCR 反应中的引物错配和引物二聚体,大大提高了反应的特异性^[12]。

在固定探针点样体积一定情况下,固定探针的

浓度越高,所能固定的探针也就越多。但高浓度的固定探针会加大成本和工作量,所以对固定探针浓度的优化是必要的。固定探针的浓度1 000 ng/μl时固定率最高,但250 ng/μl的固定率已经足以达到较好的杂交效果。因此,250 ng/μl的固定探针浓度是本实验条件下的最佳选择。

目的基因片段与探针杂交时,除了要考虑探针分子的 GC 含量、长度以及浓度等可能会对杂交产生一定的影响的因素外,由于杂交位于固相表面,一定程度的空间阻碍作用也会影响杂交。本研究曾尝试过将合成好已知浓度的寡核苷酸探针点在玻片上去杂交目的基因片段的方法,但几次都失败了,原因就是应该考虑到杂交时的空间阻碍,因为寡核苷酸探针的长度一般只有 20 几个碱基,比 PCR 产物的长度要短得多。通过向探针中引入间隔分子或分子连接臂等方法是值得考虑的消除空间阻碍作用的一个有效办法。与 PCR 产物作为探针相比,寡核苷酸探针的风险在于其长度越短,其特异性就越差,杂交强度越低,检测的灵敏度就越差。

需要指出的是由于 *camv35s* 启动子的序列是从花椰菜花叶病毒中获得,*nos* 终止子序列是从根瘤土壤杆菌中获得,某些植物能自然感染花椰菜花叶病毒或根瘤土壤杆菌,即使检测结果呈阳性,也不能排除样品本身是受病毒或细菌污染的可能^[15]。

本研究中多重 PCR 的扩增产物的检测不是通过电泳,而是通过探针杂交。由于荧光素检测的灵敏性,对于绝大部分引物来说其扩增效率是足够的,也可通过调整引物间的比例消除引物竞争使各引物的扩增效率达到最佳。芯片的杂交结果受许多条件的影响,如洗液的温度、清洗时间及光线等。只有严格地控制好实验条件才能获得较可靠的检测结果。电泳检测结果最终还需要测序验证,但芯片检测平台一旦建立,无需测序等其它方法鉴定。本研究将多重 PCR 技术与芯片技术相结合,将转基因大豆的外源基因检测探针整合到一张芯片上,实现了对多个基因的同时检测,一步达到检测及鉴定的目的。下一个研究目标是在此工作基础上把不同性状的转基因大豆、玉米、油菜籽、水稻整合到一张芯片上,实

现高通量检测。

参考文献

- [1] ISAAA. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2006 [ISAAA Brief 35-2006: Executive Summary] [EB/OL]. [2006]. <http://www.isaaa.org>.
- [2] 金尧军,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.
- [3] Joint FAO/WHO food standards programme codex committee on methods of analysis and sampling twenty-fourth session 18-22 November 2002, Budapest, Hungary [EB/OL]. [2003-08-01]. http://flairflow4.vscht.cz/a103_23e.pdf.
- [4] GARCÍA-CAÑAS V, CONZÁLEZ R, CIFUENTES A. Ultrasensitive detection of genetically modified maize DNA by capillary gel electrophoresis with laser-induced fluorescence using different fluorescent intercalating dyes[J]. J Agric Food Chem,2002, 50(16): 4497-4502.
- [5] HOLST-JENSEN A, RONNING S B, LOVSETH A, et al. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs) [J]. Anal Bioanal Chem,2003,375(8):985-993.
- [6] 刘炎.基因芯片技术进展及应用[J].南通医学院学报,2000,20(4):440-441.
- [7] 缪海珍,朱水芳,张谦,等.采用基因芯片技术筛查农作物转基因背景[J].复旦学报(自然科学版),2003,42(4):633-637.
- [8] WIRTENBERGER M, HEMMINKI K, CHEN B, et al. SNP microarray analysis for genome-wide detection of crossover regions [J]. Hum genet,2005,117(4):389-397.
- [9] LÜBECK M. Detection of genetically modified plants -methods to sample and analyze GMO content in plants and plant products. [EB/OL]. [2003-08-01]. <http://www.sns.dk/erhvogadm/biotek/detection.htm>.
- [10] LIPP M, ANKLAM E, BRODMANN P, et al. Results of an interlaboratory assessment of a screening method of genetically modified organisms in soy beans and maize [J]. Food Control, 1999, 10:379-383.
- [11] KELLOGG D E, RYBALKIN I, CHEN S, et al. TaqStart Antibody: "hot start" PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase [J]. Biotechniques, 1994, 16(6):1134-1137.
- [12] BARNES W M, ROWLYK K R. Magnesium precipitate hot start method for PCR [J]. Mol Cell probes, 2002,16(3):167-171.
- [13] WISEMAN G. State of the Art and Limitations of Quantitative polymerase Chain Reaction [J]. J AOAC Int, 2002, 85:792-796.

[收稿日期:2007-09-12]

中图分类号:R15;S565.1;Q789

文献标识码:A

文章编号:1004-8456(2008)02-0097-06