

参考文献

- [1] CHANG F H, KULIS D M, TILL D G, et al. Toxin production of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) from the Bay of Plenty, New Zealand[J]. *Toxicon*, 1997, 35(3): 393-409.
- [2] 李芳, 李雪梅, 李猷刚, 等. 贝类毒素检测方法研究概况[J]. *食品研究与开发*, 2015, 36(23): 184-186.
- [3] 付金花, 沈和定, 何培民, 等. 温度对麻痹性贝毒含量的小鼠生物测定法的影响[J]. *环境与健康*, 2008, 25(10): 914-916.
- [4] 黄爱君, 黄海燕, 刘建军. 麻痹性和腹泻性贝类毒素的检测方法研究进展[J]. *环境与健康*, 2010, 27(1): 84-86.
- [5] VAN DEN TOP H J, ELLIOTT C T, HAUGHEY S A, et al. Surface plasmon resonance biosensor screening method for paralytic shellfish poisoning toxins: a pilot interlaboratory study [J]. *Anal Chem*, 2011, 83(11): 4206-4213.
- [6] 胡晓玲, 陈剑刚, 张瑰. ELISA 快速测定带子中麻痹性贝类毒素含量[J]. *现代预防医学*, 2012, 39(18): 4799-4802.
- [7] 陈裕华, 刘红河. 高效液相色谱-串联质谱联用测定水产中麻痹性贝类毒素[J]. *中国热带医学*, 2012, 12(6): 656-659.
- [8] 陈剑刚, 朱炳辉, 梁素丹, 等. 固相萃取-液相色谱-串联质谱法测定贝类中的脂溶性贝类毒素[J]. *中国食品卫生杂志*, 2015, 27(6): 624-629.
- [9] 陈剑刚, 朱炳辉, 梁素丹, 等. 固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法测定贝类中的麻痹性贝类毒素[J]. *中国卫生检验杂志*, 2016, 26(1): 4-8.
- [10] 刘红河, 杨俊, 陈裕华, 等. 亲水作用液相色谱-串联质谱联用法测定海产品中麻痹性贝类毒素[J]. *现代预防医学*, 2010, 37(7): 1328-1332.
- [11] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 贝类中麻痹性贝类毒素的测定: GB 5009.213—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.

实验技术与方法

转基因鲑鱼 AquAdvantage 品系特异性实时荧光聚合酶链式反应检测方法的建立

刘二龙¹, 卢丽², 吕英姿¹, 蒋湘¹, 李立夏¹, 李嘉琪¹, 杜雅萍¹, 郑高彬¹

(1. 黄埔出入境检验检疫局, 广东 广州 510730; 2. 广东出入境检验检疫局技术中心, 广东 广州 510623)

摘要:目的 实现转基因鲑鱼 AquAdvantage 的标识管理, 建立其品系特异性实时荧光聚合酶链式反应(PCR)检测方法。方法 针对转基因鲑鱼的品系特异性序列设计引物和 TaqMan 探针, 建立转基因鲑鱼实时荧光 PCR 检测方法, 并对该方法的特异性、灵敏度和重复性进行检测。结果 建立的转基因鲑鱼实时荧光 PCR 方法特异性强, 在 600 000~60 拷贝范围内呈良好的线性关系, 其线性回归方程为 $y = -3.2194x + 40.805$, $R^2 = 0.997$, 检测限为 60 拷贝, 检测重复性良好。结论 建立的品系特异性实时荧光 PCR 方法可应用于转基因鲑鱼 AquAdvantage 的鉴定。

关键词: 转基因鲑鱼; AquAdvantage; 实时荧光聚合酶链式反应; 品系特异性; 检测

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2017)05-0576-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2017.05.011

Event-specific real-time polymerase chain reaction detection method of genetically modified AquAdvantage salmon

LIU Er-long¹, LU Li², LYU Ying-zi¹, JIANG Xiang¹, LI Li-xia¹, LI Jia-qi¹,
DU Ya-ping¹, ZHENG Gao-bin¹

(1. Huangpu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangdong Guangzhou 510730, China; 2. Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center, Guangdong Guangzhou 510623, China)

Abstract: Objective For implementation of labeling regulations, an event-specific real-time polymerase chain reaction (PCR) method for the detection of genetically modified AquAdvantage salmon was established in this study. **Methods**

收稿日期: 2017-05-05

基金项目: 广东出入境检验检疫局科技项目(2017GDK41)

作者简介: 刘二龙 男 高级兽医师 研究方向为动植物检验检疫技术 E-mail: erlongliu@126.com

Primers and TaqMan probe were designed based on the event-specific sequence of AquAdvantage salmon. The specificity, sensitivity and repeatability of the developed method were examined, respectively. **Results** The specificity test of this method showed it was specific to AquAdvantage salmon. The 600 000-60 copies range showed a good linear relationship with Ct values, and its linear regression equation was $y = -3.2194x + 40.805$ ($R^2 = 0.997$). The limit of quantification (LOQ) was 60 copies and the repeatability was good. **Conclusion** This event-specific real-time PCR method was suitable for the identification of genetically modified AquAdvantage salmon.

Key words: Transgenic salmon; AquAdvantage; real-time polymerase chain reaction; event-specific; detection

2015年11月16日美国食品药品监督管理局(FDA)发布公告确定水优鲑鱼(商品名 AquAdvantage salmon, AAS)与非转基因鲑鱼一样安全,这标志着转基因鲑鱼获得美国权威机构的最终批准,依法可以商业销售及食用^[1-3]。

转基因鲑鱼 AAS 由加拿大水丰(AquaBounty)公司研发,自1995年水丰公司致函美国FDA申请调查开始,到获得批准所花时间约二十年^[2]。

AAS 经由将构建的美洲绵鲑抗冻蛋白基因5'端启动子调控序列-大鳞大马哈鱼(王鲑)的生长激素蛋白编码区(opAFP-GHc2)显微注射到野生鲑鱼鱼卵研发而成,所使用的转基因片段来自大鳞大马哈鱼(王鲑)的生长激素蛋白编码区和美洲绵鲑抗冻蛋白基因启动子调控序列。转入重组生长激素基因的鲑鱼可在寒冷环境下仍然保持生长,使转基因鲑鱼达到上市规格的生长周期由3年缩短至18个月,大大降低了鲑鱼的养殖成本^[4-6]。

转基因鲑鱼直接食用的安全性是人们关注的焦点,另外其生态安全性也值得重视:转基因鲑鱼可能与自然环境中的其他鱼种发生有性交配,导致转基因漂移到自然鱼中,影响物种遗传多样性,或产生其他的未知风险。目前对转基因产品多数国家均采用相应的标识管理制度^[7-8],标识管理制度的建立和实施依赖于有效、准确的检测鉴定技术。品系特异性(转化事件特异性)聚合酶链式反应(event-specific PCR)检测的目标序列是外源插入序列与目的基因组间连接区,相较于筛选 PCR (screening PCR)、基因特异性 PCR (gene-specific PCR)和构建特异性 PCR (construct-specific PCR)具有更高的特异性,能用于鉴定转基因具体品系(甚至是同一质粒转化的不同品系),是目前转基因产品品系检测鉴定最重要的方法^[9]。本试验针对 AAS 插入的美洲绵鲑抗冻蛋白基因启动子区域与鲑鱼基因组 DNA 的 5'端连接区序列,建立特异性强、灵敏度高和稳定性良好的实时荧光定量 PCR 检测方法,满足监管部门对其转基因鲑鱼 AAS 正确标识的需求。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

大西洋鲑鱼、赤鲱鱼、带鱼、金线鱼、龙虾、鲈鱼、乌鲳鱼、鲟鱼、帝王蟹、青口贝和白虾由本实验室收集储备。

1.1.2 主要仪器与试剂

ABI 7500 和 ABI 7500FAST 实时荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统)、nanodrop2000c 微量分光光度计(美国 Thermo)、研磨机。

Wizard® 基因组 DNA 纯化试剂盒[普洛麦格(北京)生物技术有限公司];Primex Ex Taq (2 ×) for qPCR(大连宝生物工程有限公司);质粒 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司);引物和探针由上海闪晶分子生物科技有限公司合成,稀释成浓度为 10 μmol/L 的工作液使用。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取

称取研磨后的 100 mg 鱼肉样品,使用 Wizard® 基因组 DNA 纯化试剂盒提取 DNA,每次 DNA 提取均设置提取空白对照,微量分光光度计测定浓度。

1.2.2 质粒构建

转基因鲑鱼内源生长激素(growth hormone, GH)和 AAS 品系特异性双基因阳性质粒[将 GH 基因的 160 bp 片段(如图 1)和 AAS 的 5'品系特异性边界序列的 150 bp 片段(如图 2)构建到 AmpR 抗性的 PUC57 载体上,构建得到的质粒转入受体菌 DH5a 后 -70 °C 保存。以下称 AFP-Aqu 质粒]为本实验室构建。

1.2.3 实时荧光 PCR 检测方法的建立与优化

根据转入的美洲绵鲑抗冻蛋白基因启动子区域与鲑鱼基因组 5'端边界序列(位置如图 3 中 A 处所示),应用 Primer 5.0 软件设计引物和探针(扩增的序列片段见图 2)。将设计的引物、探针经美国国家生物技术信息中心(NCBI)网站上使用 BLAST 数据库比对确定引物和探针的理论特异性;鲑鱼内源基因用于鱼类生长激素(扩增的序列片段见图 1),用于鲑鱼来源样品 DNA 的检测及转基因成分的相对定量。具体引物探针信息见表 1。

```

1  CACGCATCCA CCCACCATG CATCTCTCTC TGTCTCCAC AGGGGAGCCA GGATGGCGTA
61 CTGAGCCTGG ATGACAATGA CTCTCAGCAT CTGCCTCCCT ACGGGAAC TA CTACCAGAAC
121 CTGGGGGGCG ATGGCAACAT CAGGAGAAAC TACGAACTGT

```

注:阴影部分依次为上游引物 GH-F,探针 GH-P,下游引物 GH-R

图1 GH部分扩增序列

Figure 1 Portion sequence for amplify GH

```

1  GTTGTACTGC TGATGCCTCT GATACCACAC AGACTGGGCC TCACGTTGTA CTGCTGATAC
61 CACACAGACT GGGCCTCACG TTGTACTACT GATACCACAC AGTAGTACAA CGTTGGCAGA
121 TGTATGAGAA CTAACCCTACT GACTGAACTT

```

注:下划线部分为鲑鱼基因组序列;阴影部分依次为上游引物 Aqu-F,探针 Aqu-P,下游引物 Aqu-R

图2 AAS的5'端部分边界序列

Figure 2 Portion 5' flanking sequence of AAS

表1 实时荧光PCR的引物、探针

Table 1 Sequence of primer pair/probe used in this study

检测目标	引物/探针	序列(5'-3')	扩增产物长度/bp	来源
转基因鲑鱼品系 特异性序列	Aqu-F	CACGTTGTA CTGCTGATA	98	本研究
	Aqu-R	GTGGTTTAGTTCTCATAATC		
	Aqu-P	FAM-CCTCACGTTGTA CTGCTGATA-BHQ1		
GH基因	GH-F	CACAGGGGAGCCAGGATG	86	[10]
	GH-R	CAGGTTCTGCTAGTAGTCCCGTAG		
	GH-P	VIC-TGAGCCTGGATGACAATGACTCTCAG-BHQ1		

PCR反应体系为20 μl,其中 Premix Ex Taq™ 10 μl, ROX Reference Dye II 0.2 μl, DNA模板2 μl, 10 μmol/L的 Aqu-F、Aqu-R和探针 Aqu-P按A、B和C三组配比添加, ddH₂O补足体积。反应程序为95℃预变性30 s;95℃变性5 s,58或60℃退火延伸34 s,40个循环,于58或60℃退火延伸时收集荧光信号。A组 Aqu-F、Aqu-R和探针 Aqu-P体积分别配比分别为0.5、0.5、1 μl, B组为0.4、0.4、0.8 μl, C组为0.2、0.2、0.4 μl,即A组上游引物、下游引物和探针的终浓度分别为250、250和500 nmol/L, B组为200、200和400 nmol/L, C组为100、100和200 nmol/L。适宜的引物和探针浓度组合根据循环阈值(*C_t*值)、荧光强度和扩增曲线综合判定。

1.2.5 重复性测试及标准曲线建立

将分别将提取的 AFP-Aqu 质粒 DNA 溶液稀释至300 000、30 000、15 000、3 000、1 500、300、150、30、15拷贝/μl,加入2 μl作为模板,进行实时荧光PCR检测,每份样品3个平行,根据其 *C_t* 值的计算标准偏差(*SD*)和相对标准偏差(*RSD*),并选择线性范围建立标准曲线。

1.2.6 灵敏度测试

将转基因鲑鱼 AFP-Aqu 质粒 DNA 用 ddH₂O 稀释至300、150和30拷贝/μl分别进行扩增,测定本方法的定量下限(limit of quantification, LOQ),每个浓度20个重复。统计 *C_t* 值分析得出 LOQ。

2 结果与分析

2.1 实时荧光PCR检测方法的建立与优化

退火温度分别为60和58℃时,A、B、C组的引物和探针终浓度配比结果如图4、5所示,A、B、C组引物与探针均得到良好的扩增曲线,结合扩增曲线、*C_t*值及经济性,拟选择B组作为体系反应的浓度。B组引物探针在58和60℃检测的 *C_t* 值相差不明显,结合检测方法的通用性,选择退火温度为60℃。

最后确定的20 μl反应体系如下: Premix Ex Taq™ 10 μl, ROX Reference Dye II 0.2 μl, 10 μmol/L Aqu-F和 Aqu-R各0.4 μl,探针 Aqu-P 0.8 μl, DNA模板2 μl和 ddH₂O 6.2 μl;反应程序为95℃预变性30 s;95℃变性5 s,60℃退火延伸



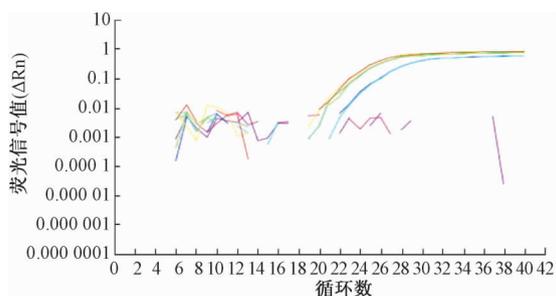
注:A为本试验引物探针设计的5'端边界序列区域

图3 AFP-GHc2结构图

Figure 3 Schematic representation of opAFP-GHc2

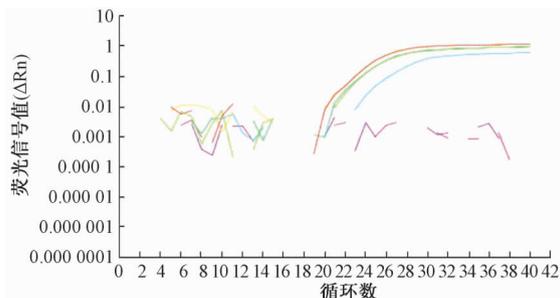
1.2.4 实时荧光PCR法特异性测试

采用大西洋鲑鱼、赤鲈鱼、带鱼、金线鱼、龙虾、鲈鱼、乌鳊鱼、鲟鱼、帝王蟹、青口贝和白虾的DNA为模板,阳性样品为转基因鲑鱼 AFP-Aqu 质粒,阴性对照为大豆DNA。对建立的实时荧光PCR检测方法进行特异性测试。



注:从左到右分别为 A、B、C 组扩增曲线

图 4 退火温度为 60 °C 时 A、B、C 组引物探针扩增图
Figure 4 Amplification plots of A, B and C prime pair/probe group annealing at 60 °C



注:从左到右分别为 A 组、B 组和 C 组扩增曲线

图 5 退火温度为 58 °C 时 A、B、C 组引物探针扩增图
Figure 5 Amplification plots of A, B and C prime pair/probe group annealing at 58 °C

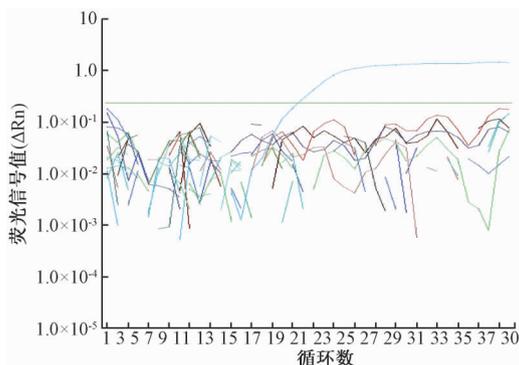
34 s, 40 个循环, 于 60 °C 收集荧光信号。

2.2 实时荧光 PCR 方法特异性测试

以大西洋鲑鱼等 12 种非转基因鲑鱼样品的 DNA 和转基因鲑鱼阳性质粒 AFP-Aqu 质粒的 DNA 为模板, 采用 AAS 的品系特异引物和探针 Aqu-F/R/P 进行实时荧光 PCR 扩增, 如图 6 所示, 只有转基因鲑鱼 AFP-Aqu 质粒的 DNA 成功扩增, 其他 DNA 样品均无典型的实时荧光扩增曲线。上述结果表明 AAS 的品系特异性引物和探针的特异性良好。

2.3 重复性测试及标准曲线建立

将提取 AFP-Aqu 质粒 DNA 稀释至 300 000、30 000、15 000、3 000、1 500、300、150、30、15 拷贝/μl, 加入 2 μl DNA 作为模板, 进行 AAS 实时荧光 PCR 检测, 每份样品进行 3 次重复试验, 水为空白对照, 计算 Ct 值的 SD 和 RSD, 如表 2 所示, 扩增曲线如图 7 所示。由表 2 可知, 在模板量为 600 000 ~ 60 拷贝范围内所得的 Ct 值表明, 其 SD 介于 0.03 ~ 0.35, RSD 介于 0.12% ~ 1.01% 均在可接受范围内^[11], 即 600 000 ~ 60 拷贝范围内可重复性良好。采用 600 000 ~ 60 拷贝 8 个浓度梯度所得 Ct 值建立标准曲线, 其线性回归方程为: $y = -3.2194x + 40.805$,



注:阳性扩增曲线为 AFP-Aqu 质粒分子;阴性信号分别为:西洋鲑鱼、赤鲑鱼、带鱼、金线鱼、龙虾、鲈鱼、乌鳊鱼、鳊鱼、帝王蟹、青口贝和白虾、阴性对照

图 6 转基因鲑鱼实时荧光 PCR 检测方法特异性试验结果

Figure 6 Specificity of event-specific real-time PCR

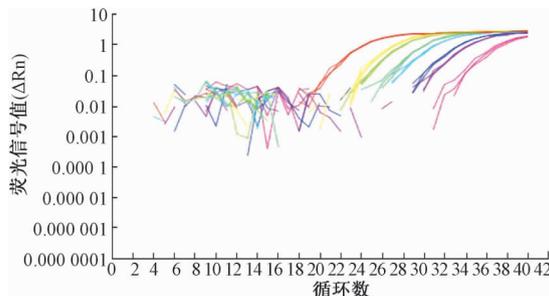
$R^2 = 0.997 > 0.98$, 扩增效率为 104% (介于 90% ~ 110%), 表明其线性相关性良好, 扩增效率良好, 均符合欧洲转基因实验室联盟 (ENGL) 相关要求^[11]。

表 2 实时荧光 PCR 方法的可重复性测试

Table 2 Repeatability of the real-time PCR method

DNA 模板量 (拷贝数/反应)	Ct 值			平均 Ct 值	SD	RSD /%
	1	2	3			
600 000	22.51	22.40	22.39	22.43	0.07	0.30
60 000	25.58	25.36	25.60	25.51	0.13	0.52
30 000	26.43	26.29	26.30	26.34	0.08	0.30
6 000	28.38	28.50	28.40	28.43	0.06	0.23
3 000	29.38	29.32	29.38	29.36	0.03	0.12
600	31.76	31.93	31.70	31.80	0.12	0.38
300	32.70	32.66	32.57	32.64	0.07	0.20
60	33.95	34.61	34.11	34.22	0.35	1.01
30	—	37.10	—	—	—	—

注:—表示无此数据



注:阳性信号从左到右分别为 300 000、30 000、15 000、3 000、1 500、300、150 和 30 拷贝/μl 质粒 DNA

图 7 重复性试验扩增曲线

Figure 7 Amplification plots of repeatability test curves of real-time PCR method for AAS

2.4 灵敏度测试

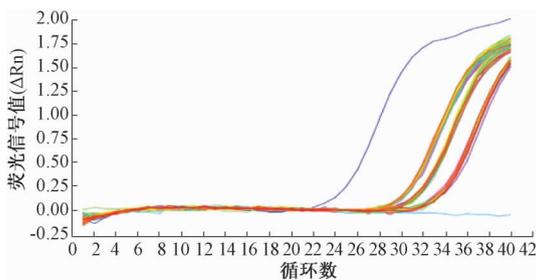
在 2.3 线性范围内采用转基因鲑鱼 AFP-Aqu 质粒 DNA 的 30、150、300 拷贝/μl 三个梯度分别进行扩增, 模板量 2 μl, 每个浓度 20 个重复, 检测结果如表 3 和图 8 所示。以 60 拷贝扩增 20 次均出现阳

性扩增, C_t 值间的 $RSD < 0.25\%$, 随着 DNA 浓度降低, SD 逐渐变大, 为得到稳定的扩增和定量结果, 因此确定本方法的 LOQ 为 60 拷贝质粒 DNA。

表3 转基因鲑鱼 AAS 品系特异性实时荧光 PCR 方法灵敏度测试

Table 3 Sensitive tests for the established real-time PCR method for AAS

目标	模板量(拷贝数/反应)	阳性结果/扩增次数	平均 C_t 值	SD	RSD /%
AAS 品系特异	60	20/20	34.24	0.30	0.41
性序列	300	20/20	32.20	0.13	0.41
	600	20/20	31.01	0.09	0.28



注: 阳性信号从左到右分别为: 阳性对照, 600、300、60 拷贝质粒(每个浓度做 20 个重复); 阴性信号为阴性对照

图8 灵敏度试验结果

Figure 8 Sensitive of detection of event-specific real-time PCR

3 小结

转基因三文鱼 AAS 是世界上第一个获批可直接食用的动物来源的转基因食品^[12]。在水丰技术公司转基因鲑鱼 AAS 等待美国 FDA 审批的十几年中, 已有 20 家 30 种转基因鱼和转基因动物正在研究开发之中, 其中有几种已经向 FDA 申请商业化^[1]。转基因鲑鱼 AAS 的上市, 将为后面一大批送审的其他转基因食用动物提供了示范效应, 对人们的生活将产生深远影响^[13-15]。目前各国对于转基因植物产品认定的阈值各不相同^[6,16], 转基因动物产品的尚未制定相关阈值。为保障消费者的知情权和选择权并为检疫监管部门提供转基因鲑鱼 AAS 产品标识的技术支持, 建立准确、高通量、快速的转基因鲑鱼 AAS 检测技术至关重要。本试验针对美洲绵鲟抗冻蛋白基因启动子区域与鲑鱼基因组 5' 端邻接区序列建立的转基因鲑鱼 AAS 品系特异性实时荧光 PCR 方法, 可实现对 AAS 品系高度特异、灵敏的检测与鉴定, 满足口岸检验检疫部门的实际需求。

参考文献

- [1] 王大元. 美国转基因三文鱼商业化的启示[J]. 科学通报, 2016, 61(3): 289-295.
- [2] 向治霖. 转基因三文鱼诞生记[J]. 方圆, 2015(36): 62-65.
- [3] 林雨晨. 动物转基因食品在美国首次上市[J]. 食品安全导刊, 2015(34): 11.
- [4] AquAdvantage salmon[EB/OL]. (2017-08-24)[2017-09-08]. https://en.wikipedia.org/wiki/AquAdvantage_salmon.
- [5] GROSSMAN M R. Genetically engineered animals in the United States: the AquAdvantage salmon[J]. European Food & Feed Law Review, 2016, 11(3): 190.
- [6] BEN H A, NABI N, ZELLAMA M S, et al. A new specific reference gene based on growth hormone gene (GH1) used for detection and relative quantification of Aquadvantage[®] GM salmon (*Salmo salar* L.) in food products[J]. Food Chemistry, 2015, 190(6): 1040-1045.
- [7] 刘二龙, 卢丽, 吕英姿, 等. 转基因苜蓿草 J101 品系特异性实时荧光 PCR 检测方法的建立[J]. 植物检疫, 2015, 29(3): 77-82.
- [8] 中华人民共和国农业部. 农业转基因生物标识管理办法: 农业部令 第 10 号 [A/OL]. (2002-03-20) [2017-03-20]. http://www.moa.gov.cn/ztl/zjyqwgz/zcfg/201007/t20100717_1601302.htm.
- [9] HOLST-JENSEN A, RØNNING S B, LØVSETH A, et al. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs)[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2003, 375(8): 985-993.
- [10] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 食品中常见鱼类及其制品的鉴别方法 第 3 部分: 鲑鱼成分检测实时荧光 PCR 法: SN/T 3589.3—2013 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.
- [11] European Network of GMO laboratories (ENGL). Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing [EB/OL] (2008-10-13) [2014-11-01]. <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/Min-Perf-requirements-Analytical-methods.pdf>.
- [12] FLETCHER G L, SHEARS M A, YASKOWIAK E S, et al. Gene transfer: potential to enhance the genome of Atlantic salmon for aquaculture [J]. Animal Production Science, 2004, 44(11): 1095-1100.
- [13] 马志英, 金月梅. 转基因三文鱼上市: 转基因食品已从植物跨域到动物[J]. 生命与灾害, 2016(2): 32-33.
- [14] BUCHANAN J. The regulatory pathway for genetically engineered AquAdvantage[®] salmon [J]. International Plant and Animal Genome Conference, 2014.
- [15] CLIFFORD H. AquAdvantage salmon a pioneering application of biotechnology in aquaculture [J]. BMC Proceedings, 2014, 8(Suppl 4): 1-2.
- [16] WU G, WU Y H, XIAO L, et al. Event-specific qualitative and quantitative PCR detection of genetically modified rapeseed Topas 19/2 [J]. Food Chemistry, 2009, 112(1): 232-238.