

论著

转基因大豆的 PCR - 免疫层析筛查方法研究初探

王 静^{1,2} 徐宝梁¹ 陈 颖¹ 苏 宁¹ 陈彦长¹

(1. 中国检验检疫科学研究院,北京 100025; 2. 军事医学科学院微生物流行病学研究所,北京 100071)

摘 要:目的 建立转基因大豆的 PCR - 免疫层析(PCR - ICT)快速筛查新技术。方法 利用转基因植物通常含有的 CaMV35S 启动子作为转基因成分的筛查标记,根据其序列设计特异性引物和探针,分别用生物素和地高辛标记,用胶体金免疫层析技术检测并鉴定 PCR 产物。结果 用新建立的 PCR - ICT 方法可以检出含 0.5% 转基因大豆的标准品,对大豆样品的检测结果与琼脂糖凝胶电泳检测结果一致。结论 PCR - ICT 方法通过 DNA 杂交和金标显色来同时检测、鉴定 PCR 产物,可以简便、快速地筛查转基因产品。

关键词:黄豆;植物,基因修饰;启动区(遗传学);聚合酶链反应;免疫测定

Preliminary Study on PCR-Immunochromatographic Test for Screening Genetically Modified Soybeans

WANG Jing, XU Bao-liang, CHEN Ying, SU Ning, CHEN Yan-zhang

(Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100025, China)

Abstract: Objective To develop a PCR-immunochromatographic test (PCR-ICT) for screening genetically modified (GM) soybean. **Method** The promoter CaMV35S was used as a marker for screening genetically modified organisms (GMOs). According to the gene sequences of promoter CaMV35S introduced into GMOs, PCR primers were quoted from previous reports and the former primer was labeled with biotin, and a specific probe was designed and labeled with digoxigenin. The PCR amplification product was detected and identified by colloid gold immunochromatographic test. **Result** 0.5% of standard GM soybean powder could be detected by the newly developed PCR-ICT. The results of detecting soybean samples using this test consisted with those of using agar gel electrophoresis. **Conclusion** The newly developed PCR-ICT appears to be a rapid and convenient technique for screening GMOs. It could simultaneously detect and identify specific PCR product by DNA hybridization and colloid gold immunochromatographic test.

Key word: Soybeans; Plants, Genetically Modified; Promoter Regions (Genetics); Polymerase Chain Reaction; immunoassay

随着大量的转基因农产品直接或间接地被制作成人类消费的食品,其安全性也受到越来越广泛的关注。为保证消费者的健康权、知情权和选择权,有必要对市场上的相关食品进行转基因成分的检测和标识。

本研究以公认的 CaMV35S 启动子基因的 PCR 筛查方法为基础^[1-3],借鉴 PCR - ELISA 和免疫层析试验(Immunochromatographic test, ICT)模式的思路^[3-5],建立了大豆转基因产品的 PCR - ICT 筛查方法,即将 PCR 技术和胶体金免疫层析技术探索性地结合,通过对寡核苷酸引物和探针进行标记,使 PCR 扩增产物带有相应检测标记,利用胶体金标记抗体来检测特异性 PCR 产物,达到同时检测、鉴定特异性 PCR 产物的目的。

1 材料与方法

1.1 试验材料 Roundup Ready 转基因大豆粉标准品来自美国 SDI 公司。美国转基因大豆样品、国产非转基因大豆样品由江苏连云港出入境检验检疫局提供。

1.2 引物及探针 PCR 引物采用欧盟使用的 CaMV35S 启动子基因引物^[2],并在上游引物的 5 端标记生物素(上游引物: 5 Biotin - GCTCCTACAAATGCCATCA - 3, 下游引物: 5 - GATA GTGGGATTGTCCGICA - 3)。根据目的基因序列设计特异性的寡核苷酸探针,并在 5 端标记地高辛(5 DIG - CAACCACGCTTCAAA GCAA GTGGATTGA - 3),由上海生工生物工程技术有限公司合成并标记。

1.3 样品 DNA 的提取和纯化 将大豆用粉碎机磨成粉状,称取 100 mg 粉末样品,参照文献方法^[6]提取、纯化 DNA。

1.4 PCR 反应 PCR 扩增体系采用不对称引物浓

基金项目:科技部社会公益研究重点项目(202DIA50034);国家质检总局基金资助项目(K03099)。

作者简介:王静 女 副研究员

度,生物素标记的引物 1.0 $\mu\text{mol/L}$,未标记引物 0.2 $\mu\text{mol/L}$,其余扩增条件和琼脂糖凝胶电泳检测参考文献[6]。

1.5 PCR - ICT检测方法的建立

1.5.1 胶体金抗体结合物的制备 胶体金颗粒的制备采用柠檬酸钠还原法,100 ml 双蒸水加热至沸腾,加入 1% HAuCl_4 1 ml 和 1% 柠檬酸三钠 1.5 ml (胶体金颗粒直径 25 nm),加热搅拌至溶液颜色变为酒红色,冷却,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。胶体金抗体结合物的制备参考文献[5]。利用比色法确定金标记最适 pH,沉淀法确定最低蛋白稳定量。1% K_2CO_3 调节 100 ml 胶体金溶液 pH 至最适值,快速搅拌下将抗体加入胶体金中,静置 5 min,加入过滤后的 10% BSA,继续搅拌 10 min。12 000 r/min 离心 30 min,小心弃去上清液,用 0.01 mol/L Tris (TBS, pH 8.2, 含 0.02% 叠氮钠,1% 蔗糖) 100 ml 将沉淀重新悬浮,4 $^{\circ}\text{C}$ 贮存备用。

1.5.2 免疫层析测试条的制备 带衬板的硝酸纤维素膜(NC膜,分别固定了质控及测试用的捕获物:链霉亲和素及地高辛抗体,1 $\mu\text{l}/\text{cm}$)与吸收垫(高吸水量滤纸,兼作手柄)部分重叠贴在粘垫板上,切成 0.3 cm 宽的条,干燥室温贮存。

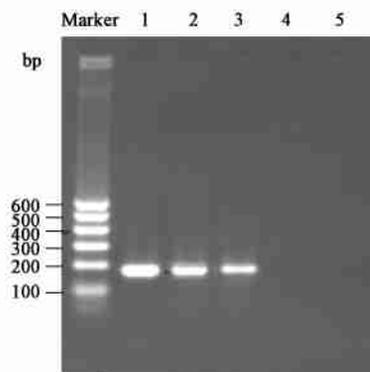
1.5.3 免疫层析检测 PCR 产物 PCR 产物经 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min后,取 10 μl 迅速加入已含 30 μl 金标抗体和 5 μl 探针的混合溶液中。将测试条浸入溶液,10 min 左右观察结果。

结果判断:质控带和检测带同时呈现红色,结果为阳性。质控带显色而检测带不显色,结果为阴性。质控带若不显色,检测无效。

2 结果

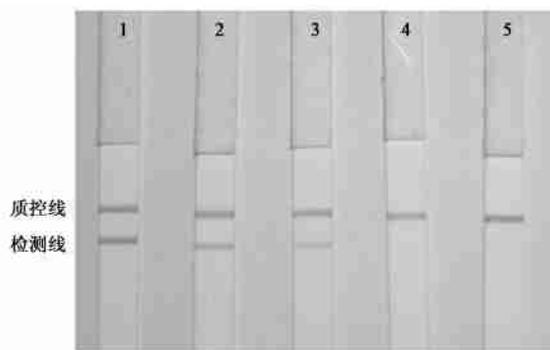
2.1 不同浓度转基因大豆标准品的检测 以 2.0%、1.0%、0.5%、0%转基因大豆标准品提取的 DNA 为模板,经 PCR 扩增,扩增产物分别用金标免疫层析测试条和琼脂糖凝胶电泳检测。结果 2.0%、1.0%、0.5% 转基因大豆标准品的扩增产物

在 ICT 条上呈现红色检测带,而阴性标样和空白对照未出现特异性检测带。电泳检测的结果(目的片段长度为 195 bp)与此一致,见图 1、2。



1~4:2.0%、1.0%、0.5%、0%转基因大豆标准品,5:空白对照。

图 1 转基因大豆标准品 PCR 产物的电泳结果



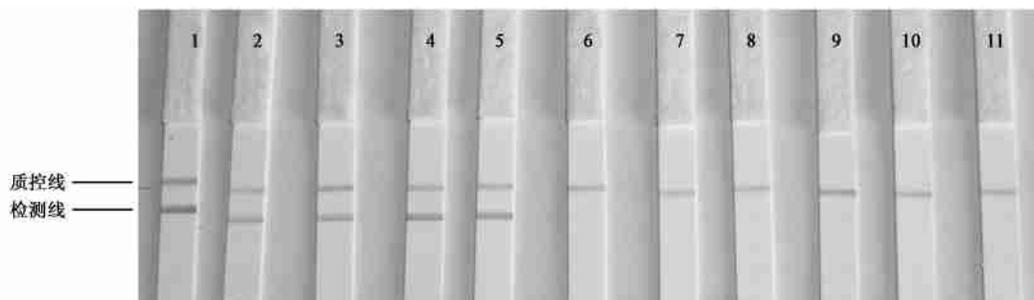
1~4:2.0%、1.0%、0.5%、0%转基因大豆标准品,5:空白对照。

图 2 转基因大豆标准品 PCR - ICT 检测结果

2.2 大豆样品检测 用新建立的 PCR - ICT 方法检测本课题组保存的部分转基因大豆样品和非转基因大豆样品(图 3),结果与琼脂糖凝胶电泳/测序检测结果一致。

3 讨论

对 PCR 产物即 PCR 检测结果的确证,一般采用限制性内切酶消化^[10]、DNA 杂交^[11,12]、PCR 产物直接测序及巢式 PCR 等方法。每种方法各有其优缺点,如测序方法可靠但因仪器昂贵难以普及;检测转



1:转基因大豆标准品 2~5:转基因大豆;6~10:非转基因大豆;11:空白对照。

图 3 大豆样品的 PCR - ICT 检测结果

基因产品的 PCR 产物多在 200 bp 以下,很难找到合适的酶切位点使酶切后的两个片段均能在电泳中检出;巢式 PCR 易造成产物污染等。目前已发展了 PCR - ELISA 方法用以 DNA 固相或液相杂交^[3,4,13]。

免疫层析试验 (ICT) 是出现于 20 世纪 80 年代初期的一种独特的免疫分析方法,因其具有快速、简便、直观、经济等特点,已被广泛用于临床诊断、病原微生物筛查、毒素检测等众多领域^[5]。本研究探索性地将 PCR 技术和免疫层析技术结合,建立了 PCR - ICT 方法。PCR 引物序列采用了欧盟使用并被公认的 CaMV35S 启动子基因引物,并在上游引物的 5' 端标记生物素,设计了具有特异性 DNA 序列的捕获探针,通过 DNA 杂交和金标显色检测、鉴定 PCR 产物,省去了琼脂糖凝胶电泳分析和后续的鉴定程序。

由于目前转基因技术中使用的基因构件主要来源于花椰菜花叶病毒 (CaMV) 的 35S 启动子,绝大部分转基因产品含有这个基因片段,所以检测 35S 启动子基本可达到检测转基因产品的目的 (十字花科的植物如油菜除外,因其易自然感染 CaMV)。目前世界上大多数国家如欧盟、俄罗斯、日本、韩国、澳大利亚、新西兰等规定需强制性标识的转基因产品的含量阈值一般在 1%,本研究建立的 PCR - ICT 方法可以检出含 0.5% 转基因成分大豆样品中的目的基因,能够满足检测的需要。该法在其他转基因产品中的应用有待进一步评价。

[致谢:感谢军事医科院卫生流行病学研究所杨瑞馥研究员在实验过程给予的指导和帮助。]

参考文献

[1] ANKLAM E, GADANI F, HEINZE P, et al. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in

agriculture crops and plant-derived food products [J]. *Eur Food Res Technol*, 2002, 214:3-26.

[2] PIETSCH K, WAIBLINGER U, BRODMANN P, et al. Screening method for the identification genetically modified organisms in food [Z]. European Commission, 1999.

[3] HANS-JOSEF BRNNERT, FRIEDRICH SPENER. PCR-ELISA for the CaMV35S promoter as a screening method for genetically modified roundup ready soybeans [J]. *Eur Food Res Technol*, 2001, 213:366-371.

[4] 刘光明,徐庆研,龙敏南,等.应用 PCR-ELISA 技术检测转基因产品的研究[J]. *食品科学*, 2003, 24(1):101-105.

[5] 胡孔新,王静,周蕾,等.固相免疫层析法检测细菌样本处理液的比较研究[J]. *中华检验医学杂志*, 2006, 29(1):74.

[6] 陈颖,葛毅强,徐宝梁,等.大豆加工食品中转基因成分的 PCR 检测[J]. *中国食品学报*, 2003, 3(1):61-66.

[7] 周萍萍,吴永宁,张建中.转基因食品检测方法的现况与进展[J]. *中国食品卫生杂志*, 2004, 16(3):254-258.

[8] GERT VAN DUJN, RIA VAN BIERT, HENRIFETTE BLEEKER MARCLIS, et al. Detection methods for genetically modified crops [J]. *Food Control*, 1999, 10:375-378.

[9] Joint FAO/WHO food standards programme codex committee on methods of analysis and sampling twenty fourth session 18222 November 2002, Budapest, Hungary [EB/OL]. [2003 - 08 - 01]. <http://PP.flairflow4.vscht.cz/Pal03-23e.pdf>.

[10] LIPP M, BRODMANN P, PIETSCH K, et al. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soybeans and maize in dried powder [J]. *J AOAC Int*, 1999, 82:923-928.

[11] WU K, TIAN L, HOLLINGWORTH J, et al. Functional analysis of tomato Pti4 in arabidopsis [J]. *Plant Physiol*, 2002, 128:30-37.

[12] JENNINGS J C, ALBEE L D, KOLWYCK D C, et al. Attempts to detect transgenic and endogenous plant DNA and transgenic protein in muscle from broilers fed YieldGard corn Borer corn [J]. *Poult Sci*, 2003, 82(3):371-380.

[13] 王静,徐宝梁,杨瑞馥,等.进口肉骨粉及动物饲料中牛源性成分的 PCR-微孔板杂交检测方法[J]. *饲料研究*, 2001, 10:16-19.

[收稿日期:2006 - 12 - 28]

中图分类号:R15;Q343.1;Q788 文献标识码:A 文章编号:1004 - 8456(2007)03 - 0198 - 03

福寿螺 (Amazonian snail) 又名大瓶螺,苹果螺,两栖淡水贝类软体生物,属软体动物门,腹足纲,中腹足目,瓶螺科。原产于南美洲亚马逊河流域。20 世纪 70 年代引入中国台湾,1981 年由巴西籍中国人引入广东。1984 年后,福寿螺已在广东广为养殖。由于过度养殖,被释放到野外。福寿螺适应环境的生存能力很强,又繁殖得快,因此迅速扩散于河湖与田野;其食量大且食物种类繁多能破坏粮食作物、蔬菜和水生农作物的生长,已成为广东、广西、福建等地的有害动物。在长江以南广大地区福寿螺可自然越冬,年发生两个世代。成为中国南方水域的一大患害。福寿螺还是一种人畜共患的寄生虫病的中间宿主,如果生吃或者食用未煮熟的螺肉,极易引起食源性“广州管圆线虫病”。