

## 转基因大豆 DNA 检测芯片的研究

刘 璇 郑文杰 赵卫东 贺 艳 唐丹舟 刘 辉

(天津出入境检验检疫局,天津 300201)

**摘要:**为提高对转基因大豆的监督检测能力,研制了转基因大豆 DNA 检测芯片。根据转基因大豆(Roundup Ready)中所转入的外源基因,选择 *CaMV35S* 启动子、*NOS* 终止子、*NOS/EPSPe* 基因和内源 *Lectin* 基因设计特异性引物,采用多重 PCR 法对待测样品进行扩增,通过缺口平移法合成 DIG-dUTP 标记杂交探针,并制备基因芯片。在对 PCR 反应和扩增产物与芯片杂交条件进行优化的同时,比较了芯片检测的特异性和重复性,并对检测的灵敏度进行测试。结果表明,该方法具有较好的特异性和重复性,检测灵敏度可达 0.5%,由于采用了多重 PCR 技术,一次可同时检测多个基因,提高了检测的准确性和效率。

**关键词:**植物;转基因;黄豆;DNA 芯片;聚合酶链反应

### Research of gene chip for detection of genetically modified soybean

LIU Xuan, ZHENG Wen-jie, ZHAO Wei-dong, HE Yan, TANG Dan-zhou, LIU Hui

(Tianjin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tianjin 300201, China)

**Abstract:** According to the plasmid map of genetically modified soybean (Roundup Ready), three exogenous gene (*CaMV35S* promoter, *NOS* terminator, *NOS/EPSPe* gene) and one endogenous gene (*Lectin*) were selected as target genes to design and synthesize their primers. The probe was synthesized using the method of nick translation and labeled with DIG-dUTP. Multiplex PCR was used to amplify the target sequence in soybean sample DNA, then the DNA chips were hybridized with PCR product, at last the chips displayed the hybridization result. The DNA chip for identifying genetically modified soybean was highly specific and reproducible and its sensitivity was 0.5%, meanwhile the detection efficiency was highly improved with the use of multiplex PCR. So genetically modified soybean could be detected and identified rapidly and correctly.

**Key Words:** Plants, Transgenic; Soybeans; DNA Chip; Polymerase Chain Reaction

出于对转基因作物安全性考虑,中国、欧盟、日本、韩国等国家和组织纷纷制定相应的法律和法规要求对转基因作物和加工食品进行标识,以对人、动物的健康和生态环境多样性进行保护。建立一套简便、快速、准确的检验技术以满足日常检测的要求是十分必要的。目前国际上常用的检测方法有 PCR-电泳检测、ELISA 检测、实时荧光定量 PCR 检测以及试纸条检测,上述方法的局限性在于对含有多个外源基因的转基因作物一次只能检测一个基因,因此费时、费力,容易造成假阴性<sup>[1,2]</sup>。

基因芯片(gene chip)又称 DNA 芯片(DNA

chip),是指在表面积较小的基片表面有序地固定大量的基因探针(probe),从而形成 DNA 微阵列。芯片上每一特定位置的核苷酸序列都是已知的,与待测样品杂交后根据各点产生的信号的强弱,利用激光共聚焦扫描和电藕荷器件(CCD)成像等方法对杂交结果进行检测,因此 DNA 芯片技术具有高度并行性、高通量、微型化和自动化等优点,具有广泛的应用前景<sup>[3]</sup>。

在所有转基因作物中,转基因大豆的种植面积最大,在国际贸易中占有重要的地位。为了有效地对转基因大豆进出口贸易进行监测,保证我国对外贸易的可持续性发展,本研究将多重 PCR 技术与

基金项目:天津市科委基金项目(033182811)

作者简介:刘璇 女 工程师

通讯作者:郑文杰 女 高级工程师

This work was supported by the Science and Technology Plan of Tianjin, China. (033182811)

DNA 芯片技术相结合对转基因大豆 DNA 芯片检测方法进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器

PCR 仪 Tgradient, 德国 Biometra 公司; 杂交炉 MAX 14, 英国 HyBaid 公司; 紫外交联仪 CL508, 英国 UVI 公司; 低温高速离心机 Allerga 64R, 美国 Beckman 公司; 核酸蛋白分析仪 lambda 35, 美国 PE 公司; 化学发光荧光可见光系统 Chemilmager 4400, 美国 Alpha 公司; 芯片点样仪 612 型, 上海棱光生物技术公司; 微量加样器 法国 Dilon 公司。

### 1.2 材料

转基因大豆 (Roundup Ready) 和非转基因大豆均由美国 SDI 公司提供。

### 1.3 试剂及试剂盒

植物基因组 DNA 提取试剂盒 Promega (Wizard Magnetic DNA Purification System For Food); 多重 PCR 扩增试剂盒 QIAGEN (Multiplex PCR Kit); 核酸杂交试剂盒 Roche (DIG High Primer DNA Labeling and Detection starter Kit); Taq 酶体系 Promega; dNTPs Promega; SSC Promega; 杂交膜 Pharmacia (Hybond-N+)。

### 1.4 引物

通过引物设计软件 (Oligo 6.0) 进行引物设计, 针对位点为 *CaMV35S* 启动子、*NOS* 终止子、*CaMV35S-EPS PS*、*NOS-EPS PS*、内源 *Lectin* 等基因片段。为进行多重 PCR, 在引物设计时尽可能使它们的退火温度相近, 本研究设计的 5 对引物退火温度均为 54 °C, PCR 扩增片段控制在 100 ~ 200 bp 范围内。

*CaMV35S* 启动子: 5'-GCT CCT ACA AAT GCC ATC A-3'

(195 bp) 5'-GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA-3'

*NOS* 终止子: 5'-TTA AGA TTG AAT CCT GIT GCC G-3'

(180 bp) 5'-TAA TTT ATC CTA GIT TGC CCG C-3'

*CaMV35S-EPS PS* 5'-TGG CGC CCA TGG CCT CCA TG-3'

(209 bp) 5'-CCT TCG CAA GAC CCT TCC TCT ATA-3'

*NOS-EPS PS* 5'-CCG AAG ATC GAA CTC TCC G-3'

(147 bp) 5'-TGA TAA TCA TCG CAA GAC CGG-3'

*Lectin* 5'-GCC CTC TAC TCC ACC CCA ATC C-3'

(118 bp) 5'-GCC CAT CTG CAA GCC TTT TTG TG-3'

### 1.5 探针标记

用 1.4 中设计的引物对样品基因组核酸进行 PCR 扩增, 扩增产物通过 Klenow 酶和 DIG-dUTP, 采用切口平移法进行标记, 按试剂盒说明进行操作 (Roche, DIG High Primer DNA Labeling and Detection

starter Kit)。

### 1.6 DNA 芯片的制备

用 1.4 中设计的引物扩增样品核酸提取物, 扩增产物通过芯片点样仪点到杂交膜上, 每点点样 5 次, 将芯片干燥、紫外交联等处理后, 得到可用于检测的 DNA 芯片。点

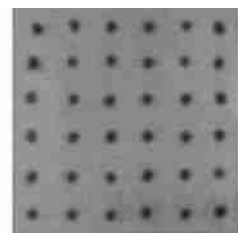


图 1 芯片阵列

样阵列见图 1。  
图 1 中芯片面积为 15 mm × 15 mm, 第 1 列为空白对照, 第 2 列为内源 *Lectin* 基因, 第 3 列为 *CaMV35S*, 第 4 列为 *NOS*, 第 5 列为 *CaMV35S-EPS PS*, 第 6 列为 *NOS-EPS PS*, 每列重复 6 次, 以保证结果的重复性和准确性。

### 1.7 样品基因组 DNA 的提取

将转基因大豆 Roundup Ready 纯品 (阳性样品) 与非转基因大豆 (阴性样品) 分别制成质量百分比为 5%、1%、0.5%、0.1% 的试样。将上述试样各称取 200 mg, 采用基因组 DNA 提取试剂盒 (Promega) 提取 DNA, 具体步骤参照试剂盒使用说明。提取产物经核酸蛋白分析仪测定 DNA 浓度和纯度, 并通过 0.5% 琼脂糖凝胶电泳观察产物的质量。提取 DNA 于 -20 °C 冷冻保存备用。

### 1.8 多重 PCR 扩增

将试样 DNA 稀释 10 倍作为反应模板, 终浓度为 50 ~ 100 ng/μl, 在 200 μl 离心管中依次加入 PCR 反应缓冲液、dNTPs、5 对引物、Hotstar Tap 酶、DNA 模板、补足 ddH<sub>2</sub>O 使反应总体积为 50 μl。各组分的终浓度参照试剂盒 (QIAGEN, Multiplex PCR Kit) 说明。

多重 PCR 扩增条件为 95 °C 变性 10 min; 94 °C 30 s; 54 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 1 min; 72 °C 最后延伸 40 min, 共 40 个循环。

### 1.9 探针的制备

将 1.8 中扩增产物通过缺口平移法制备探针混合物。

### 1.10 芯片杂交和结果判读

预杂交 在杂交皿中加入 300 μl 预杂交液 (Roche 杂交试剂盒提供);

杂交 将 1.9 中 PCR 产物探针混合物 100 μl 煮沸 10 min, 迅速于冰水混合物中冷冻 5 min, 加入 200 μl 杂交反应液 (杂交试剂盒提供) 涡旋混匀, 加入杂交皿中, 于杂交炉中 45 °C 杂交 1 h。

清洗 2 × SSC, 2 × 15 min; 1 × SSC, 3 × 10 min, 0.1 × SSC, 2 × 15 min。

封闭与显色 参照杂交试剂盒说明进行。

结果判读 若芯片上相应位点出现蓝紫色斑点表明此试样含有该基因序列,结果通过化学发光荧光可见光系统成像保存,数据分析备用。

## 2 结果和讨论

### 2.1 用试剂盒法获得的 DNA 质量可满足 PCR 反应的要求

采用 Promega 公司植物基因组 DNA 提取试剂盒获得的大豆基因组 DNA 经核酸蛋白分析仪测定  $A_{260}$  为 0.937,  $A_{260/280}$  为 1.996;DNA 经琼脂糖电泳,结果表明 DNA 片段完整,没有明显的降解。

### 2.2 检测中采用转基因大豆作为阳性对照可防止假阴性结果的出现

在对未知大豆样品进行检测时,必须以转基因大豆的芯片杂交结果作为对照,避免假阴性结果的出现,造成漏检。在芯片质量合格和杂交反应条件正常的情况下,阳性样品中的内外源基因的 PCR 扩增片段与芯片上相应位点的探针进行杂交可出现蓝紫色的杂交斑点,若未出现斑点说明芯片质量不合格、探针浓度过低或杂交反应条件需进一步优化。

### 2.3 影响多重 PCR 扩增的因素

PCR 扩增缓冲液的影响 常规 PCR 缓冲液使用标准缓冲液,由 1.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ , 10 mmol/L Tris·HCl (pH8.3) 和 50 mmol/L KCl 组成。据文献报道 TMAC、Triton-X 100、明胶能增强 PCR 扩增的特异性<sup>[4]</sup>,因而,在多重 PCR 缓冲液中可加入 1 mmol/L TMAC 和 0.1% Triton-X 100。

循环参数的影响 为了使反应后加尾整齐,多重 PCR 的延伸时间比常规 PCR (循环时延伸时间为 40 s,最后延伸为 5 min) 长,通过反复的优化实验,我们认为循环时延伸时间为 1 min,最后延伸时间为 40 min 扩增效果较好,扩增产物加尾整齐。

Hotstar DNA 聚合酶的影响 在 PCR 起始阶段,模板量较低,在起始循环较低温度下形成非特异性配对进行非特异性延伸对目的扩增的影响尤其大,导致杂带产生甚至目的片段无法扩增。而 Hotstar DNA 聚合酶在常温下没有活性,需 95℃ 激活 15 min 才具有聚合酶的活性,可以避免起始循环较低温度下形成非特异性配对延伸,大大地提高了 PCR 反应的特异性和灵敏度,尤其适合于多重 PCR 扩增中基因组模板复杂、样品量较少、目的扩增片段长度多样化等特点。

### 2.4 影响地高辛探针标记的因素

使用地高辛标记系统时,可根据地高辛系统的

不同用途,获得的用以制备探针的模板的类型、以及探针可达到的灵敏度,选择探针标记方法<sup>[5]</sup>。本研究中采用了切口平移法进行探针标记,该方法快速、简便、灵敏度较高,可满足转基因植物产品检测的要求。DNA 模板的纯度越高,标记的效率也就越高,因此在进行标记前应对 PCR 扩增产物进行回收纯化或使用苯酚、氯仿等试剂抽提 DNA 模板。

### 2.5 重复性

将转基因大豆和非转基因大豆各制备 10 份进行 10 次检测,并分别设立空白对照和阳性对照。结果表明多重 PCR-DNA 芯片杂交检测体系结果稳定,10 次检测结果基本一致,有较好的重复性。说明芯片质量稳定,可满足检测的要求。

### 2.6 灵敏度

对转基因大豆质量百分比分别为 5%、1%、0.5%、和 0.1% 的试样进行检测。进行基因组 DNA 提取、多重 PCR 扩增、与芯片杂交。随着转基因大豆含量的递减,杂交后显色斑点的颜色和颜色的深浅也呈现相应的衰减趋势。对于 5%、1%、0.5% 试样,检测信号较强,内外源基因均可检出,而当含量降低为 0.1% 时,信号较弱,只检出 *Lectin* 基因和 *CaMV35S* 启动子基因,因此该芯片检测方法的灵敏度可定为 0.5%。

## 参考文献

- [1] Livak KJ, Flood S J A, Marmaro J, et al. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization[J]. PCR Meth Appl, 1995, 4:357-362.
- [2] Genn Mcgall, Jeff Labadie, Phil Brock, et al. light-directed synthesis of high density oligonucleotide array using semiconductor photoresists [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1996, 93(24):13555-13560.
- [3] Wang Joseph. Survey and summary from DNA biosensors to gene chips [J]. Nucleic Acid Research, 2000, 28 (16): 3011-3016.
- [4] J 萨姆布鲁克, E F 费里奇, T 曼诺蒂斯, 著. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1996, 680.
- [5] Urdea M S, Warner B D, Runing J A, et al. A comparison of nonradioisotopic hybridization assay using fluorescent, chemiluminescent and enzyme-labeled synthetic oligodeoxyribonucleotide[J]. Nucleic Acids Res, 1988, 16: 4937-4956.

[收稿日期:2004-12-26]

中图分类号:R15;Q343.1;S52 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2005)02-0132-03