

## 转基因“华番一号”番茄的筛选和特异性的 定性、定量 PCR 检测方法

杨立桃<sup>1,3</sup> 赵志辉<sup>2</sup> 申慧峰<sup>3</sup> 潘爱虎<sup>4</sup> 张大兵<sup>3</sup>

(1. 南京大学生命科学学院,江苏 南京 210093;2. 南京农业大学动物医学院,江苏 南京 210095;  
3. 上海交通大学生命科学技术学院,上海 200240;4. 上海市农业科学院生物技术研究中心,上海 201106)

**摘要:**为给转基因植物监测提供技术支持,建立了转基因“华番一号”番茄筛选和特异性的定性、定量 PCR 检测方法。转基因“华番一号”的筛选 PCR 检测主要以转基因通用元件 *CaMV35S* 启动子和 *NOS* 终止子为目的基因片段,特异性 PCR 检测以转基因外源重组子的 *CaMV35S* 启动子和反义 *EFE* 基因的相邻序列为目的片段;实验同时设立番茄的 *LAT52* 基因为转基因番茄定性、定量 PCR 检测的内对照基因。在所建立的 PCR 检测体系中,定性 PCR 筛选和特异性检测的检测极限为 68 个拷贝,实时定量 PCR 方法的检测极限为 3 个拷贝;筛选定量 PCR 检测的定量极限为 3 个拷贝,特异性定量 PCR 检测的定量极限为 25 个拷贝。最后通过对 2 个已知含量的转基因番茄“华番一号”混合试样的检测,证明了该体系可以有效地用于转基因番茄“华番一号”的筛选和特异性的定性、定量 PCR 检测。

**关键词:**植物,转基因,转基因“华番一号”番茄,聚合酶链反应,遗传筛选

### Screening and construct specific detection of transgenic BIOSCIEN tomato by conventional and real-time PCR

YANG Li-tao, ZHAO Zhi-hui, SHEN Hui-feng, PAN Ai-hu, ZHANG Da-bing

(Department of Biological Science and Technology, Nanjing University, Jiangsu Nanjing 210093, China)

**Abstract:** Genetically modified (GM) tomatoes have been approved for commercialization in many countries since the first GM tomato FLAVR AVAR was permitted for planting in 1994. In China, GM tomato BIOSCIEN with a character of long shelf-life was the first GM plant approved for commercialization in 1996. To meet the requirement of GM tomatoes labeling policy that has been actualized in China since 2001, the screening and construct specific PCR detection for detecting the universal elements transformed into tomato, such as Cauli-

- [2] Vaitilgöm M, Pijneburg H, Norman W Schaad, et al. Real-time quantitative PCR detection of genetically modified maximizer maize and roundup ready soybean in some representative Foods [J]. J Agric FoodChem, 1999, 47: 5261-5266.
- [3] 郑文杰, 刘, 刘伟, 等. 转基因大豆加工产品的定性 PCR 检测 [J]. 农业生物技术学报, 2003, 11 (5): 467-471.
- [4] Hideo Kuribara, Yoichiro Shindo, Akihiro Hino, et al. Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and soybean [J]. Journal of AOAC International, 2002, 85 (5): 1077-1089.
- [5] Heather Hird, Joanne Powell, Mari-Louise, et al. Determination of percentage of Round up soya in soya flour using real-time polymerase chain reaction: Interlaboratory study [J]. Journal of AOAC International, 2003, 86 (1): 66-71.
- [收稿日期: 2004 - 12 - 16]

中图分类号: R15; Q343.1; S52 文献标识码: A 文章编号: 1004 - 8456 (2005) 02 - 0123 - 04

基金项目: 上海市科学技术委员会科研计划项目 (03ZD19307); 国家研究与开发专项 (JY03-B-20)。

作者简介: 杨立桃 男 博士

通讯作者: 张大兵 男 教授

This work was supported by the Science and Technology Plan of Shanghai (03ZD19307) and Research and Development of Special Subject of Nation (JY03 - B - 20), China.

flower mosaic virus 35S (*CaMV35S*) promoter and the *nopaline synthase* (*NOS*) terminator of *Agrobacterium tumefaciens*, and the specific inserted heterologous DNA sequence between *CaMV35S* promoter and anti-sense *ethylene-forming enzyme* (*EFE*) gene were set up, respectively. To make the detection methods normative, a novel single copy tomato gene *LAT52* was also used as an endogenous reference gene in the PCR detection systems. The limit of detection (LOD) of screening and construct specific detection for BIOSCIEN was 68 haploid genome copies in conventional qualitative PCR detection, and 3 copies in TaqMan real-time PCR detection. The limit of quantification (LOQ) of screening quantitative PCR assay for BIOSCIEN was 3 copies and 25 copies for construct specific quantitative PCR. Two samples with known BIOSCIEN tomato contents were detected using the established conventional and real-time PCR systems, and the results indicated that the established BIOSCIEN screening and construct specific PCR detection systems were reliable, sensitive, and accurate.

**Key Words:** Plants, Transgenic; BIOSCIEN tomato; Polymerase Chain Reaction; Genetic Screening

虽然转基因植物已在全球许多国家和地区广泛种植,但是由于其安全性的问题和消费者的要求,已有30多个国家开始实施转基因植物及其产品的标签制度。然而,各国之间的转基因标签制度不尽相同,例如,美国和加拿大实施自愿性的转基因标签制度;欧盟等国实施强制性的转基因标签制度,欧盟规定的转基因标签的阈值为0.9%<sup>[31]</sup>,韩国为3.0%<sup>[41]</sup>,日本为5.0%<sup>[51]</sup>;在我国规定了5大类17种转基因植物及其产品必须标示,例如,番茄、番茄酱、大豆、大豆油、玉米和棉籽等<sup>[61]</sup>。

为了转基因标签制度的顺利实施,定性、定量PCR方法已成为最主要的转基因植物及其加工产品的筛选和特异性检测方法。目前,已经建立了转基因大豆(GTS 40-3-2)和转基因玉米(Bt11、Event176、Mon810、T25和GA21)的筛选和特异性定性、定量PCR检测方法<sup>[7-12]</sup>,但是关于转基因番茄的筛选和特异性检测的报道还很少。针对我国转基因标签制度对于转基因番茄检测的要求,首先通过分子克隆、测序分析了转基因“华番一号”番茄的外源插入重组子的序列,然后以外源重组子的*CaMV35S*启动子和反义*EFE*基因的相邻序列为目的序列,建立了转基因“华番一号”番茄的特异性定性、定量PCR检测系统,同时以*CaMV35S*启动子和*NOS*终止子序列为目的序列建立了转基因“华番一号”番茄的筛选PCR检测系统。

## 1 材料与方法

1.1 材料 转基因“华番一号”番茄由华中农业大学提供。非转基因番茄由上海农业科学院园艺所提供。灵敏度检测所用标准试样是将经鉴定为转基因的“华番一号”番茄与非转基因番茄混合,由本实验室制成。

植物基因组DNA抽提试剂盒购自上海瑞丰农业科技,定性PCR用Taq DNA聚合酶及其缓冲

液购自Takara, dNTPs购自上海生工生物工程有限公司,定量PCR用Taq DNA聚合酶及其缓冲液、dNTPs、MgCl<sub>2</sub>购自上海美源生物科技有限公司,DL2000 DNA Marker购自Takara, Pfu DNA聚合酶及其缓冲液购自Promega。其余试剂均为分析纯。

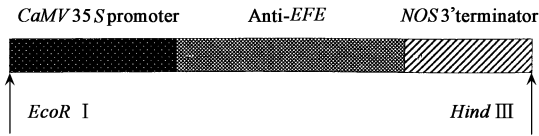
DY-501型核酸电泳仪, BECKMAN公司的DU<sup>R</sup>640核酸和蛋白分析仪、图象分析系统为上海天能公司生产的凝胶成像系统,定性PCR仪为MJ Research, Inc. PTC100,定量PCR仪为Corbett Research, Australia, Rotor-Gene 2000。

### 1.2 方法

1.2.1 番茄DNA的抽提和纯化 番茄基因组DNA利用上海瑞丰农业科技有限公司的植物基因组DNA抽提试剂盒提取和纯化, DNA样品的质量用琼脂糖凝胶电泳和核酸定量检测的方法进行评价。取一定量DNA溶液在含有溴乙锭的1%琼脂糖里进行凝胶电泳分析,判断其浓度和纯度。利用BECKMAN公司的DU<sup>R</sup>640核酸和蛋白定量分析仪对DNA样品进行质量测定及浓度定量。

1.2.2 转基因“华番一号”番茄的外源插入重组子邻接序列的分析 图1显示为华中农业大学转基因“华番一号”中转基因用的质粒示意图。转基因“华番一号”番茄是通过插入番茄自身含有的*EFE*基因翻译的反义链获得的,在建立特异性PCR检测方法时只针对反义*EFE*基因是不可行的,必须利用构建特异性PCR检测方法同时针对外源重组子的*CaMV35S*启动子和反义*EFE*基因设计特异性的引物,建立特异性PCR检测方法。根据图1,我们设计了一组引物分别位于*CaMV35S*启动子的3'端和反义*EFE*基因的5'端,利用PCR扩增*CaMV35S*启动子和反义*EFE*基因之间的DNA片段、克隆分析*CaMV35S*启动子和反义*EFE*基因之间的相邻序列。

1.2.3 番茄的内标准参照基因*LAT52* 在转基因番茄的定性、定量PCR检测时,一个具有种间特异



点状方框表示 *CaMV35S* 启动子, 中间方框表示反义 *EFE* 基因, 斜线方框表示 *NOS* 终止子, 箭头表示相应的酶切位点。

图1 转基因“华番一号”的外源重组子结构示意图

性、种内非特异性和低拷贝数的内标准基因是必需的。实验中, 根据 yang 等的报道, 选择了番茄的

*LAT52* 基因 (Genbank No. 19263) 为转基因番茄 PCR 检测的内标准参照基因<sup>[1]</sup>。

1.2.4 PCR 引物 根据获得的外源重组子的特异的 DNA 相邻序列、*CaMV35S* 启动子和 *NOS* 终止子的序列, 利用美国 ABI 公司的 Primer Express 2.0 软件设计了特异性的 PCR 引物和 TaqMan 探针。引物和探针由上海博亚生物科技有限公司合成, 其核苷酸序列和扩增片段长度见表 1, 用适当体积的重蒸水将引物稀释至 25  $\mu\text{mol/L}$ , 探针稀释至 10  $\mu\text{mol/L}$ , 并保存于 -20 备用。

表1 引物和探针序列

检测系统	目的基因	名称	序列 (5' ~ 3')	扩增片段(bp)
外源基因定量检测	<i>CaMV35S</i>	35S - 3F	GCCTCTGCCGACAGTGGT	83
		35S - 4	AAGACGTGGTGAACGCTTC	
		-		
	<i>NOS</i>	35S - P	CAAAAGATGGACCCCAACCCACG	87
		<i>Nos</i> - 3F	TTGCAATAAAGTTCTTAAAGATTGAAT	
		-		
	<i>35S - anti EFE</i>	<i>Nos</i> - 4	ACATGCTTAACGTAATCAACAGAAATT	148
		-		
		<i>Nos</i> - P	CTGTTGCCGGTCTTGGCATGATTATCAT	
内标准基因 定性定量检测	<i>LAT52</i>	<i>E</i> - 3F	TGTGATACTCCACTGACGTAAGG	92
		<i>E</i> - 4R	TTTAAATATAGCAATCTATGATCGACTCTAG	
		<i>E</i> - P	CAATCCACTATCCCTTCGCAAGACCCCTTCCT	
		<i>L</i> - 1F	AGACCACGAACGATATTTGC	
外源基因定性检测	<i>CaMV35S</i>	<i>L</i> - 2R	TCTTTGCCTTTTCATATCCA GACA	195
		<i>L</i> - p	CTCTTTGCA GICCTCCCTTGGGCT	
	<i>NOS</i>	35S - 1F	GCTCTACAAAATGCCATCA	180
		35S - 2R	GATAGTGGGATTGTGCGTCA	
		-		
	<i>35S - anti EFE</i>	<i>NOS</i> - 1	GAATCCTGTTGCCGGICTTG	153
		-		
		<i>NOS</i> - 2	TTATCCTAGTTTGC GCGCTA	
		-		
		<i>E</i> - 1F	TTCGCAAGACCCCTTCCTC	908
		<i>E</i> - 2R	GCAAGTGCTTAGATCCCAAT	
		CS - F	ATTGCGATAAAGGAAAGG	
		CS - R	ATTGGAGAAATTGGCTGA	

1.2.5 定性 PCR 体系及反应条件 扩增转基因番茄外源插入重组子的特异序列的 PCR 反应体系为 50  $\mu\text{l}$ , 反应条件为 1  $\times$  PCR 缓冲液, 0.2 mmol/L 的 dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP, 0.8 mmol/L PCR 引物以及 20 ng 转基因番茄基因组 DNA, 1U Pfu 聚合酶。PCR 扩增的技术参数为: 94  $^{\circ}\text{C}$  7 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  60 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 共 35 个循环, 再 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min。PCR 反应结束后, 向反应管中加入 1U Taq DNA 聚合酶, 72  $^{\circ}\text{C}$  30 min 加尾, 取 20  $\mu\text{l}$  加尾后产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 回收目的片段连接到 T 载体上。

筛选和特异性定性 PCR 反应的体积为 30  $\mu\text{l}$ , PCR 反应条件为 1  $\times$  PCR 缓冲液, 0.2 mmol/L 的 dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP, 0.8 mmol/L PCR 引物以及不同质量的番茄基因组 DNA, 1.5 U Taq DNA 聚

合酶。PCR 扩增的技术参数为: 94  $^{\circ}\text{C}$  7 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 共 35 个循环, 再 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min。PCR 产物取 10  $\mu\text{l}$  在 2% 琼脂糖凝胶中电泳分析。

1.2.6 定量 PCR 体系及反应条件 定量 PCR 反应体积为 25  $\mu\text{l}$ , 1  $\times$  PCR 缓冲液, 5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ 、0.2 mmol/L 的 dATP、dCTP 和 dGTP、0.4 mmol/L 的 dUTP、1.5 U Taq DNA 聚合酶、0.2 U Amperase uracil N-glycosylase (UNG)、1  $\mu\text{l}$  DNA 模板溶液, 以及优化好的 100 nmol/L 引物和 300 nmol/L 探针。

定量 PCR 扩增的反应条件为 50  $^{\circ}\text{C}$  2 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  10 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 共 50 个循环。每个试样平行做 3 个反应, 重复试验 3 次。试验数据由 Rotor Gene 2000-4.6 软件 (Corbett Research, Australia) 分析。

## 2 结果与分析

2.1 转基因“华番一号”番茄的外源插入重组子的邻接序列 通过 PCR 扩增、克隆和测序分析,我们获得了转基因“华番一号”番茄的外源插入重组子的 *CaMV35S* 启动子和反义 *EFE* 基因之间的相邻序列。利用设计的分别位于 *CaMV35S* 启动子和反义 *EFE* 基因的 PCR 引物扩增得到 908 bp 的目的片段,序列分析结果显示其中含有 *CaMV35S* 启动子的

245 bp 片段,652 bp 的部分反义 *EFE* 基因序列, *CaMV35S* 启动子和反义 *EFE* 基因之间为 11 bp 的连接序列,其中含有 *Bam*H 和 *Xba* 的限制性酶切位点。获得的序列已经列入 Genbank 数据库 (Genbank No. AY615305)。根据分析的邻接区的序列,设计了定性、定量 PCR 引物和 TaqMan 探针,引物和探针的具体位置见图 2,用于建立转基因“华番一号”番茄的特异性定性、定量 PCR 检测系统。

```
attgcgataaaggaaaggccatcgttgaagatgcctctgccgacagtggtcccaaagat
ggacccccacccacgaggagcatcgtggaaaagaagacgttccaaccacgtcttcaaa
gcaagtggattgattgtgatatctccactgacgtaagggatgacgcaaatcccactatc
                                E-3F                                E-P
cttcgcaagacccttctctctatat aaggaagttcatttcatttggagaggacagggtac
E-1F
ccggggatcCTCTAGAGTCGATACATAGATTGCTATATTTAAATATATTTTTCAAACCAATTTTTT
E-4R
TAATTGAATTGGGATCTAAGCACTTGC AATTGGATCACTTTCATTGCCTTCATTGCITCAAATCTT
E-2R
GGCTCTTTGGCTTGAAACTTGAGTCCAGCATATAACTTCATGTAATCATCAAACACAAACTTTGGATAC
ACTTGTGTA CTTTCTCTGCTCTTTTCAACCAAAGTTTTGCTGGATATATTACTGCATCACTTCCCTG
GATTGTAAAATGAGGCTAATGACATTCGTGTCCCGTCTGTTTGTGCAATTACTCTGTGCAGCACACTCT
TGTACTTCCCGTTAGTGATCACCTCAAGTTGGTCACCAAGGTTAACCACAATAGAGTGGCGCATGGGA
GGAACATCGATCCATTGCTCGTCTTTGAGGAGTTGAAGGCCACTCACTTGTGATCTTGAACAGAAG
TATGATGCCTCCTGCGTCTGTATGAGCGGAGTCCCTTGATCAAATCGGGCTTAGGACATGGTGGATA
GTTGCTAACTTTAGTACCAAAGTTGGGACCTTTTGATCCATAAAAGGCATTTTTCAAGTAACCTTTTTT
AAGTCCAAGATTTTCACAGAGTAAGTCAAGTAACTCCTCAGCCAATTTCTCCAAT
```

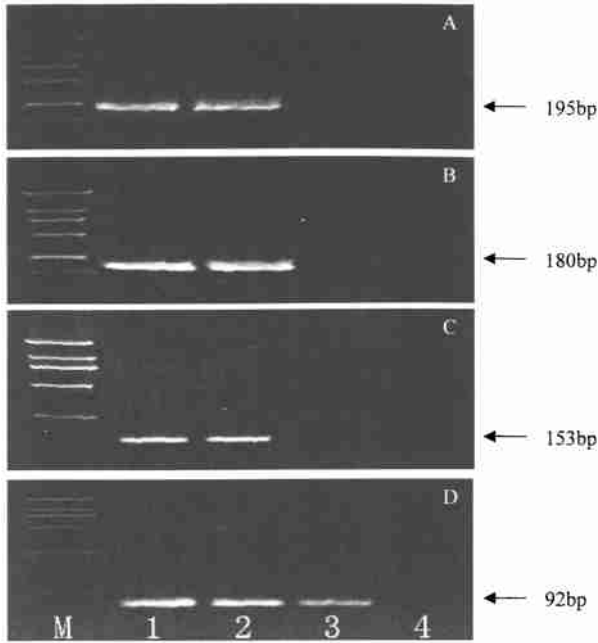
小写字母表示 *CaMV35S* 启动子 3 端序列,大写字母表示反义 *EFE* 基因的 5 端序列。加黑斜体的序列为定性筛选 PCR 检测的引物,方框中序列为定量筛选 PCR 检测的引物和探针。

图 2 “华番一号”番茄筛选特异性 PCR 检测的外源重组子序列和相应的定性、定量 PCR 引物序列

2.2 转基因“华番一号”番茄的筛选和特异性的定性 PCR 检测 转基因“华番一号”番茄的筛选 PCR 检测选择 *CaMV35S* 启动子和 *NOS* 终止子为检测的目的基因,并设计了 2 对特异性引物(35S-1F/2R 和 Nos-1F/2R),引物 35S-1F/2R 特异性扩增 *CaMV35S* 启动子的 195 bp DNA 片段,引物 Nos-1F/2R 特异性扩增 *NOS* 终止子的 180 bp DNA 片段。利用上述引物建立的转基因番茄筛选 PCR 检测系统,在转基因“华番一号”番茄的种子和叶片样品中 PCR 扩增出目的基因片段(*CaMV35S* 启动子和 *NOS* 终止子),在非转基因番茄和空白对照中没有目的基因的片段扩增(见图 3A、3B)。转基因“华番一号”番茄的特异性检测引物 E-1F/2R,特异性地扩增 *CaMV35S* 启动子和反义 *EFE* 基因之间的 153 bp 片段。PCR 检测时,在转基因“华番一号”番茄的种子和叶片试样中 PCR 扩增出目的基因片段,在非转基因番茄和空白对照

中没有目的基因的片段扩增(见图 3C)。在番茄的内标准基因 *LATS2* 的检测时,目的基因片段在转基因“华番一号”番茄的种子、叶片和非转基因番茄试样中都得到了扩增,在空白对照中没有扩增(见图 3D)。

试验在验证了转基因“华番一号”番茄的筛选和特异性定性 PCR 检测系统的同时,检测了转基因“华番一号”番茄筛选和特异性 PCR 检测系统的定性检测灵敏度。为了检测上述 PCR 系统的检测灵敏度,试验选择了一系列浓度梯度的转基因“华番一号”番茄基因组 DNA 为 PCR 扩增模板(100、10、1、0.1、0.05、0.01 ng/μl),结果低于 0.05 ng 的转基因“华番一号”番茄基因组 DNA 没有被扩增,说明上述筛选和特异性 PCR 检测系统的灵敏度为 0.05 ng,根据 Arumuganathan 等人报道的番茄单倍体基因组的质量为 0.74 pg<sup>[21]</sup>,筛选和特异性 PCR 检测系统的灵敏度相当于 68 个拷贝的转基因番茄单倍体基因



箭头表示 PCR 扩增产物的长度。A 图为 *CaMV35S* 启动子的 PCR 扩增结果, B 图为 *NOS* 启动子的 PCR 扩增结果, C 图为 *35S-anti EFE* 的 PCR 扩增结果, D 图为番茄内标准基因 *LAT52* 的 PCR 扩增结果。泳道 M 为 DL2000 Marker; 泳道 1 为转基因新鲜番茄; 泳道 2 为转基因番茄种子; 泳道 3 为非转基因番茄; 泳道 4 为空白对照。

图 3 转基因“华番一号”番茄样品的扫描和筛选 PCR 检测产物的电泳分析结果

组。试验建立的定性 PCR 系统的检测灵敏度与报道的转基因玉米和大豆的定性 PCR 检测的灵敏度相近, 说明试验建立的转基因“华番一号”番茄的筛选和特异性定性 PCR 检测系统适合应用于实际检测。

### 2.3 转基因“华番一号”番茄的筛选和特异性定量 PCR 检测

2.3.1 筛选和特异性定量 PCR 检测体系的重现性  
定量 PCR 反应的重现性反映所建立的定量 PCR 体系的稳定性和可靠性。为了检测建立的转基因“华番一号”番茄的筛选和特异性定量 PCR 检测体系的重现性, 将转基因番茄和非转基因番茄混合制成含有不同转基因“华番一号”番茄含量的混合样品 (0%、0.1%、1%、5% 和 10%), 每个 PCR 反应加入 10 ng 混合样品的 DNA, 每个反应平行重复 3 次。定量 PCR 反应的结果显示, 番茄内标准基因 *LAT52* 的 PCR 反应的平均 *Ct* 值在 29.35 和 29.40 之间, 标准偏差在 0.03 到 0.07 之间 (表 2)。在筛选和特异性定量 PCR 扩增中, *CaMV35S* 启动子的不同转基因含量混合样品的定量 PCR 扩增的平均 *Ct* 值在 33.26 和 39.68 之间, 标准偏差在 0.05 到 0.06 之间 (表 2); *NOS* 终止子反应的平均 *Ct* 值在 28.00 和 34.88 之间, 标准偏差在 0.03 到 0.07 之间 (表 2)。特异性序列 (*35S-anti EFE*) 反应的平均 *Ct* 值在 30.06 和 36.52 之间, 标准偏差在 0.03 到 0.09 之间 (表 2)。上述数据表明实验建立的转基因“华番一号”番茄的

筛选和特异性定量 PCR 检测系统是稳定和可靠的。

表 2 转基因番茄 (0% ~ 10%) 定量 PCR 系统的重现性检测

转基因含量 (%)	<i>Ct</i> 值			平均 <i>Ct</i> 值	标准偏差	<i>RSD</i>
	1	2	3			
Total (HEX dye) <i>LAT52</i> 基因						
0.0	29.35	29.32	29.38	29.35	0.03	0.023
0.1	29.28	29.42	29.36	29.35	0.07	0.021
1.0	29.34	29.41	29.46	29.40	0.06	0.009
5.0	29.40	29.38	29.43	29.40	0.03	0.009
10.0	29.45	29.32	29.39	29.39	0.07	0.001
Transgenic (FAM dye) <i>CaMV35S</i> 启动子						
0.1	39.73	39.68	39.64	39.68	0.05	0.029
1.0	36.51	36.58	36.49	36.53	0.05	0.034
5.0	34.15	34.26	34.18	34.20	0.06	0.008
10.0	33.26	33.30	33.21	33.26	0.05	0.018
Transgenic (FAM dye) <i>NOS</i> 终止子						
0.1	34.85	34.82	34.96	34.88	0.07	0.025
1.0	31.49	31.52	31.46	31.49	0.03	0.016
5.0	29.07	29.10	29.13	29.10	0.03	0.029
10.0	27.99	27.96	28.05	28.00	0.05	0.012
Transgenic (FAM dye) <i>35S-anti EFE</i>						
0.1	36.52	36.49	36.55	36.52	0.03	0.004
1.0	33.31	33.24	33.25	33.27	0.04	0.008
5.0	31.12	31.15	30.99	31.09	0.09	0.049
10.0	30.07	30.11	30.01	30.06	0.05	0.015

2.3.2 筛选和特异性定量 PCR 检测的灵敏度 为了确定转基因“华番一号”番茄的筛选和特异性定量 PCR 检测系统的灵敏度, 试验分别以含有 25 000、2 500、250、25、3 和 1 个拷贝的转基因番茄单倍体基因组 DNA 为定量扩增模板进行 PCR 扩增, 结果在筛选定量 PCR 系统中, 最低含 3 个拷贝的转基因番茄单倍体基因组 DNA 试样在 3 个平行反应中都可以正常扩增而在特异性定量 PCR 系统中, 有 2 个平行反应正常扩增, 1 个反应没有扩增 (表 3)。检测结果证明筛选定量 PCR 检测系统的检测灵敏度为 3

表 3 转基因番茄通用元件和 *35S-anti EFE* 的定量 PCR 检测灵敏度

拷贝数	<i>Ct</i> 值			平均 <i>Ct</i> 值	标准偏差
	1	2	3		
<i>CaMV35S</i> 启动子					
$2.5 \times 10^4$	19.23	19.37	19.39	19.33	0.07
$2.5 \times 10^3$	23.39	23.22	23.62	23.41	0.16
$2.5 \times 10^2$	26.04	26.02	25.93	26.00	0.05
25	29.58	29.40	29.39	29.46	0.09
3	32.06	31.99	32.03	32.03	0.03
1	-	-	-	-	-
<i>NOS</i> 终止子					
$2.5 \times 10^4$	12.51	12.70	12.62	12.61	0.09
$2.5 \times 10^3$	16.47	16.56	16.59	16.54	0.04
$2.5 \times 10^2$	19.18	19.36	19.14	19.23	0.10
25	22.89	22.63	22.70	22.74	0.11
3	25.74	25.92	25.88	25.85	0.08
1	-	-	-	-	-
<i>35S-anti EFE</i>					
$2.5 \times 10^4$	16.02	15.84	15.90	15.92	0.07
$2.5 \times 10^3$	19.84	19.97	20.27	20.03	0.18
$2.5 \times 10^2$	22.86	22.36	22.51	22.58	0.21
25	26.02	25.82	25.40	25.75	0.26
3	28.88	-	28.96	28.92	-
1	-	-	-	-	-

注: - 为未检出。

个拷贝,而特异性定量 PCR 检测的灵敏度为 25 个拷贝。试验建立的定量 PCR 检测系统的检测灵敏度完全满足欧盟、韩国、日本等规定的转基因标签阈值(欧盟 0.9%、韩国 3.0%、日本 5.0%)<sup>[3-5]</sup>。

2.3.3 已知转基因含量的番茄混合样品的筛选和特异性定量 PCR 检测 利用建立的转基因“华番一号”番茄的筛选和特异性定量 PCR 检测系统,定量分析了 2 个已知转基因含量的转基因“华番一号”番茄混合样品(0.5%和 1.0%)。在定量 PCR 分析中,定量校正曲线是必须的,试验将含有 18.5%转基因“华番一号”番茄的番茄试样 DNA 稀释为 100、10、1、0.1、0.01 ng/ $\mu$ l 的浓度,分别取 1  $\mu$ l 不同浓度的 DNA 试样为扩增模板构建定量 PCR 的校正曲线。构建的筛选和特异性定量 PCR 的校正曲线的相关性系数在 0.9984 和 0.9997 之间(*CaMV35S* 启动子的校正曲线的相关性系数为 0.9984,*NOS* 终止子的为 0.9997,特异性检测片段 *35S-anti EFE* 为 0.9986,内标准基因 *LAT52* 的为 0.9988)。

根据构建的定量校正曲线,定量分析了 2 个已知转基因含量的转基因“华番一号”番茄混合样品,1%的番茄叶片混合样品的筛选和特异性定量的结果分别是 1.02% (*CaMV35S* 启动子定量检测系统)、1.08% (*NOS* 终止子)和 1.10% (特异性片段 *CaMV35S-anti EFE*) (表 4);0.5% 的番茄种子粉末混合样品的筛选和特异性定量的结果分别是 0.46% (*CaMV35S* 启动子定量检测系统)、0.53% (*NOS* 终止子)和 0.51% (特异性片段 *CaMV35S-anti EFE*) (表 4)。利用试验建立的定量 PCR 系统定量分析的结果与实际已知的转基因含量比较接近,偏差较小。在定量 PCR 分析过程中,与实际转基因含量偏差的原因,主要是由于我们的样品是利用转基因番茄和非转基因番茄样品的质量进行混合的,而检测时是

表 4 转基因“华番一号”番茄混合样品的定量 PCR 检测

样品	探针 标记	$\alpha$ 值				平均值	标准 偏差	转基因含量 (%)
		1	2	3				
endogenous <i>LAT52</i> gene								
S1	HEX	28.34	28.38	28.21	28.31	0.09		
S2	HEX	28.23	28.29	28.31	28.28	0.04		
<i>CaMV35S</i> 启动子								
S1 (1.0%)	FAM	35.43	35.67	35.52	35.54	0.12	1.02	
S2 (0.5%)	FAM	36.89	36.59	36.43	36.64	0.23	0.46	
<i>NOS</i> 终止子								
S1 (1.0%)	FAM	30.32	30.29	30.53	30.38	0.13	1.08	
S2 (0.5%)	FAM	31.43	31.52	31.28	31.41	0.12	0.53	
<i>35S-anti EFE</i>								
S1 (1.0%)	FAM	32.11	32.35	32.26	32.24	0.12	1.10	
S2 (0.5%)	FAM	33.30	33.42	33.19	33.30	0.12	0.51	

以转基因番茄和非转基因番茄的基因组的质量比例计算的;定量 PCR 实验过程中加入 DNA 模板之间的微弱误差;PCR 反应的起始模板量和实际 PCR 扩增效率也是影响定量 PCR 结果的原因。

## 参考文献

- [1] Yang L, Pan A, Jia J, et al. Validation of a tomato specific gene, *LAT52*, used as an endogenous reference gene in qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenic tomatoes[J]. *J Agric Food Chem*(In press).
- [2] Arumuganathan K, Earle E D. Nuclear DNA content of some important plant species[J]. *Plant Mol Biol*, 1991, 9: 208-218.
- [3] European Commission Regulation (EC) No. 1829/2003 and 1830/2003[J]. *Off J Eur Commun L*, 2003, 18 (268): 1-28.
- [4] Notification No. 2000-31 Ministry of Agriculture and Forestry of Korea, Seoul, Korea. 2000, 22[Z].
- [5] Notification No. 1775 Food and Marketing Bureau, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan, Tokyo, Japan, 2000[Z].
- [6] 中华人民共和国农业部农业转基因生物标识管理办法[Z]. (2002).
- [7] Studer E, Rhyner C, Lüthy J, et al. Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified soybean and maize[J]. *Z Lebensm Unters Forsch A*, 1998, 207:207-213.
- [8] Vaitilingom M, Pijnenburg H, Gendre F, et al. Real-time quantitative PCR detection of genetically modified maximizer maize and roundup ready soybean in some representative foods [J]. *J Agric Food Chem*, 1999, 47: 5261-5266.
- [9] Zimmermann A, Lüthy J, Pauli U. Event specific transgene detection in Bt11 corn by quantitative PCR at the integration Site[J]. *Lebensm Wiss u Technol*, 2000, 33: 210-216.
- [10] Knut G Berdal, Arne Holst-Jensen. Roundup Ready(r) soybean event-specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analyses[J]. *Eur Food Res Technol*, 2001, 213:432-438.
- [11] Matsuoka T, Kuribara H, Akiyama H, et al. Detection of recombinant DNA segments introduced to genetically modified Maize (*Zea mays*) [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50: 2100-2109.
- [12] Marta Hernández, Maria Pla, Teresa Esteve, et al. A specific real-time quantitative PCR detection system for event MON810 in maize YieldGard based on the 3' transgene integration sequence [J]. *Transgenic Research*, 2003, 12: 179-189.

[收稿日期:2004-12-17]

中图分类号:R15;Q343.1;S641.2

文献标识码:A

文章编号:1004-8456(2005)02-0126-06