

实验技术与方法

北极苹果结构特异性实时荧光聚合酶链式反应检测方法建立

刘二龙¹, 卢丽², 吕英姿¹, 蒋湘¹, 李嘉琪¹, 夏柔菲¹

(1. 黄埔海关, 广东 广州 510730; 2. 广州海关, 广东 广州 510623)

摘要:目的 为实现转基因北极苹果 (ArcticTM apple) 目的标识管理, 建立特异性实时荧光聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 检测方法。方法 针对转基因北极苹果特异性序列设计引物和 TaqMan 探针, 建立转基因北极苹果实时荧光 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 建立的转基因北极苹果实时荧光 PCR 特异性强, 定量检测限为 20 拷贝, 扩增效率为 96%, 检测重复性良好。结论 建立的特异性实时荧光 PCR 法可应用于转基因北极苹果的鉴定。

关键词: 北极苹果; 实时荧光聚合酶链式反应; 结构特异性; 检测

中图分类号: R155 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2019)01-0049-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2019.01.011

A construct-specific real-time polymerase chain reaction for
quantitative detection of ArcticTM apple

LIU Erlong¹, LU Li², LYU Yingzi¹, JIANG Xiang¹, LI Jiaqi¹, XIA Roufei¹

(1. Huangpu Customs, Guangdong Guangzhou 510730, China;

2. Guangzhou Customs, Guangdong Guangzhou 510623, China)

Abstract: Objective For implementation of labeling regulations, a construct-specific real-time polymerase chain reaction (PCR) method for quantitative detection of ArcticTM apple was established in this study. **Methods** Primers and TaqMan probe were designed based on the specific sequence of ArcticTM apple. The specificity, sensitivity and repeatability of the developed method were examined, respectively. **Results** The specificity test of this method showed it specific to ArcticTM apple; The limit of quantification was 20 copies and the amplification efficiency was 96%. It had good repeatability. **Conclusion** This construct-specific real-time PCR method was suitable for the identification of ArcticTM apple.

Key words: ArcticTM apple; real-time polymerase chain reaction; construct-specific; detection

北极苹果 (ArcticTM apple) 是由加拿大奥卡诺根特色水果公司 (Okanagan Specialty Fruits) 研发的转基因抗褐变苹果^[1]。目前批准上市的北极苹果共有三个品系: ArcticTM Golden Delicious、ArcticTM Granny 和 ArcticTM Fuji。由农杆菌介导载体 GEN-03^[2] 分别转入金冠 (ArcticTM Golden Delicious, GD743, 2015 年美国 and 加拿大批准上市)、青苹果 (ArcticTM Granny, GS784, 2015 年美国 and 加拿大批准上市) 和富士 (ArcticTM Fuji, NF872, 2016 年美国批准上市)^[3-4]。GEN-03 质粒载体包括嵌合的多酚氧化酶 (PPO) 抑制序列, 含苹果 PPO 基因家族四个基因 *PPO2*、*GPO3*、*AP05* 和 *pSR7* (简称 PGAS)^[5] 的序列, 它们由具有非翻译前导序列的重复增强子的花

椰菜花叶病毒 35S (Cauliflower Mosaic Virus 35S, CaMV 35S) 启动子^[6] 和胭脂碱合成酶 (nopaline synthase, NOS) 终止子调控。北极苹果主要的外源基因为 *PPO* 抑制基因和抗生素筛选基因 *nptII*。

北极苹果是采用 RNAi 技术减少苹果中整个 PPO 基因家族的表达而生产抗褐变的苹果品系。其中转入的 PPO 抑制序列产生双链 RNA (double stranded RNA, dsRNA), 它抑制转录的过程是由长链的 dsRNA 被 dicer 酶切割后形成短的双链小干扰 RNA (small interfering RNAs, siRNAs) 并形成无活性的 RNA 诱导沉默复合体 (RNA induced silencing complex, RISC), 在三磷酸腺苷 (ATP) 解旋酶作用下, RISC 中 siRNAs 解链, 正义链被降解, 反义链通过序列互补直接剪切目标 mRNA 使其翻译水平下降从而抑制 PPO 表达, 产生抗褐变苹果^[7]。其中 ArcticTM Fuji (NF872) 在第 3、13 和 17 号染色体上有多个 GEN-03 片段插入, Southern Blot 结果显示 ArcticTM Fuji (NF872) 插入的 PPO 可能为 4 个有功

收稿日期: 2018-11-13

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疫技术

E-mail: erlongliu@126.com

能的拷贝,Arctic™ Golden (GD743) 插入的 PPO 可能为 1~2 个拷贝,Arctic™ Granny (GS784) 可能为 4 个拷贝。

目前对转基因产品多数国家均采用相应的标识管理制度^[8]并规定了相应阈值^[9-12],我国目前施行无阈值管理制度^[13],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。现国内外尚未见北极苹果特异性实时荧光聚合酶链式反应 (PCR) 检测方法的报道,为完善我国转基因产品定量检测技术体系,针对北极苹果建立结构特异性实时荧光 PCR 检测方法,实现对北极苹果三个品系 GD743、GS784 和 NF872 的标识性检测。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

ABI7500 和 ABI7500 FAST 实时荧光定量 PCR 仪 (美国应用生物系统)、nanodrop2000c 微量分光光度计、研磨机。

富士苹果、黄金帅苹果、青苹果 (Granny Smith)、皇后苹果 (Queen)、红玫瑰苹果 (Pacfic Rose)、爵士苹果 (Jazz)、嘎拉苹果 (Gala)、梨、山竹 (*Garcinia mangostana* L.)、油桃 (*Nectarine*)、荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.)、龙眼 (*Dimocarpus longan* Lour.)、转基因玉米 MIR162、甜菜 H7-1 由本实验室收集储备,北极苹果内源基因苹果核糖体 ITS1-5.8S RNA^[14]和北极苹果特异性片段双基因阳性质粒为本实验室构建:将苹果核糖体 ITS1-5.8S 的 100 bp 片段和北极苹果 PGAS 和 NOS 邻接区结构特异性片段 277 bp 克隆到氨苄青霉素 (AmpR) 抗性的 PUC57 载体上构建得到的重组质粒,将重组质粒转入受体菌 DH5a 后-70℃保存,以下称 Malus-Arctic 质粒。

植物基因组 DNA 提取试剂盒、质粒 DNA 提取试剂盒均购自天根生化科技 (北京) 有限公司;Primex Ex Taq (2×) for qPCR (大连宝生物);引物和探针由闪晶生物公司合成,稀释浓度为 10 μmol/L 的工作液使用。

1.2 方法

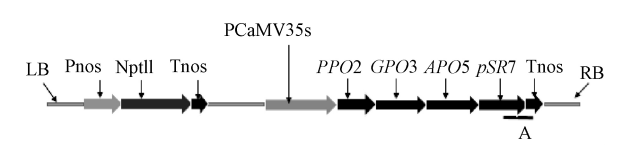
1.2.1 DNA 提取

按照植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书分离、纯化样品基因组 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 实时荧光 PCR 法的建立与优化

针对北极苹果 GD743、GS784 和 NF872 三个品系共有的特异性 PGAS 和 NOS 邻接区序列设计引物和 TaqMan 探针序列 (GEN-03 T-DNA 结构图见

图 1,扩增序列见图 2),应用 Primer 5.0 软件设计引物和探针。将设计的引物、探针经 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;选择苹果核糖体 ITS1-5.8S RNA (GenBank: AF186494.1) 引物 Malus-F/R 和探针 Malus-P 用于检测苹果样品基因组 DNA 是否成功提取以及是否适于进行实时荧光 PCR 扩增 (扩增序列片段见图 3),并用于苹果来源样品 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。



注:A 为扩增的邻接区

图 1 GEN-03 的 T-DNA 部分

Figure 1 Sketch map of T-DNA of GEN-03

```
1 CTACGCGGC ACCATTGAGA ACAGTCTCA TAATAACATC CATCTCTGGT GCGGTGACC
61 GAACGAGACC CACACGAAG ACATGGGTAA CTCTACTCC GCGGCTCGAT CGTTCAACA
121 TTTCGCAATA AAGTTTCCTA AGATTGAATC CTGTTCCGG TCTTCGGATG ATTATCAAT
181 AATTTCCTGT GAATTACGTT AAGCATGTAA TAATTACAT GTATGCGATG ACGTTATTTA
```

注:阴影部分依次为 Arctic-F,Arctic-P,Arctic-R

图 2 北极苹果特异性序列

Figure 2 Special sequence of Arctic™ apple

```
1 GGAATCTGAA CGAAGAGCG CGTCCCGCC GCCCGGAAA CGGTGCGGC GCGGGTGCGT
61 CGTCTGCTTC GATAAGTCAA AACGACTCTC GGCAACGAT
```

注:阴影部分依次为 Malus-F,Malus-P,Malus-R

图 3 苹果核糖体 ITS1-5.8S RNA 基因部分扩增序列

Figure 3 Partial amplification sequence of apple ribosomal ITS1-5.8S RNA gene

扩增反应体系均为 25 μl;包括 Premix Ex Taq™ 12.5 μl,ROX Reference Dye II 0.2 μl,10 μmol/L 上游引物和下游引物各 0.5 μl,10 μmol/L 检测探针 0.5 μl,DNA 模板 2 μl 和 ddH₂O 8.8 μl;反应程序为 95℃预变性 30 s;95℃变性 5 s,60℃退火、延伸 34 s,40 个循环,于 60℃收集荧光信号。

1.2.3 实时荧光 PCR 法特异性测试

采用富士苹果、黄金帅苹果、青苹果、皇后苹果、红玫瑰苹果、爵士苹果、嘎拉苹果、梨、山竹、油桃、荔枝、龙眼、转基因玉米 MIR162、甜菜 H7-1 基因组 DNA 为模板,按 1.2.2 对北极苹果内源苹果核糖体 ITS1-5.8S RNA 进行实时荧光 PCR 法的特异性测试。

1.2.4 检测线性范围测试及标准曲线建立

将提取阳性标准品的 Malus-Arctic 质粒 DNA 溶液加 TE 缓冲液分别稀释至 1×10⁶、1×10⁵、1×10⁴、1×10³、1×10²、1×10¹ 和 5 拷贝/μl 作为 DNA 模板,进行北极苹果实时荧光 PCR 法检测的线性范围测试及可重复性测试,每份样品进行 9 次重复试验,

表 1 实时荧光 PCR 的引物、探针
 Table 1 Sequence of primer pair, probes

检测目标	引物/探针	序列(5'-3')	产物长度/bp	来源
北极苹果特异性序列	Arctic-F	TGACCCGAACCAGACCCAC	127	本研究
	Arctic-R	CAGGATTCAATCTTAAGAACTTTATTG		
	Arctic-P	FAM-TAACTTCTACTCCGCGGCTCGATCG-BHQ1		
核糖体 ITS1-5. 8S RNA	Malus-F	GGAATATGAACGAAAGAGCG	100	[14]
	Malus-R	ATCCGTTGCCGAGAGTCGTT		
	Malus-P	VIC-TGCGTCGTCGTCTTCGATAA-BHQ1		

水为空白对照,实时荧光 PCR 法检测反应体系和反应程序按 1. 2. 2 进行。以模板量的对数值与所得循环阈值(Ct 值)建立标准曲线。

1. 2. 5 可重复性测试

将 1. 2. 4 中不同浓度模板 9 个平行扩增结果计算标准偏差(SD)和相对标准偏差(*RSD*)进行可重复性分析。

2 结果与分析

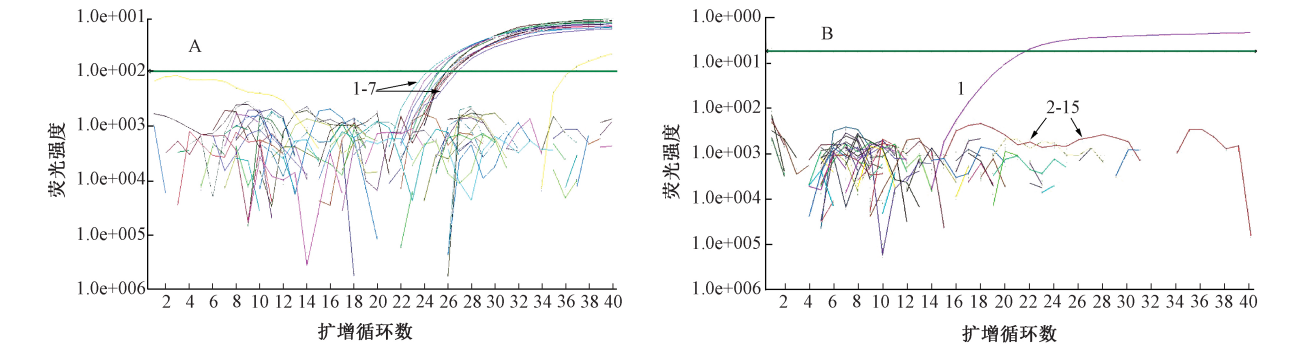
2. 1 引物和探针设计及体系建立

根据北极苹果特异的 PGAS 和 NOS 邻接区序列进行分析,设计了多对特异性引物和探针,对引

物和探针的反应效率、扩增曲线和扩增效果进行筛选和分析,最终选择引物 Arctic-F/R 和探针 Arctic-P 建立北极苹果结构特异性检测方法(序列见表 1)。

2. 2 实时荧光 PCR 法特异性

采用引物 Malus-F/R 和探针 Malus-P 对所有提取的样品 DNA 进行实时荧光 PCR 时,只有富士苹果、黄金帅苹果、青苹果、皇后苹果、红玫瑰苹果、爵士苹果和嘎拉苹果来源的 7 种 DNA 模板出现扩增曲线,其他农作物无典型扩增曲线,表明北极苹果内源基因苹果核糖体 ITS1-5. 8S RNA 扩增结果正确(图 4A),表明提取的 DNA 模板质量符合实时荧光 PCR 法要求。



注:A:1~7 分别为富士苹果、黄金帅苹果、青苹果、皇后苹果、红玫瑰苹果、爵士苹果、嘎拉苹果基因组 DNA 模板;其他无扩增曲线的样品为:梨、山竹、油桃、荔枝、龙眼、转基因玉米 MIR162、甜菜 H7-1 基因组 DNA 模板;B:1 为阳性标准品 Malus-Arctic,2~15 分别为富士苹果、黄金帅苹果、青苹果、皇后苹果、红玫瑰苹果、爵士苹果、嘎拉苹果、梨、山竹、油桃、荔枝、龙眼、转基因玉米 MIR162、甜菜 H7-1 基因组 DNA 模板

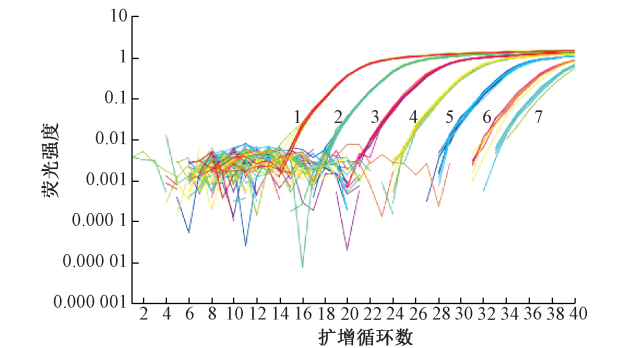
图 4 实时荧光 PCR 特异性测试
 Figure 4 Specificity test by real-time PCR

采用富士苹果、黄金帅苹果、青苹果、皇后苹果、红玫瑰苹果、爵士苹果、嘎拉苹果、梨、山竹、油桃、荔枝、龙眼、转基因玉米 MIR162、甜菜 H7-1 基因组 DNA 为模板,阳性标准样品为 Malus-Arctic 质粒,阴性对照为非转基因大米 DNA,对建立的北极苹果实时荧光 PCR 法的特异性进行测试。采用北极苹果特异性引物 Arctic-F/R 和探针 Arctic-P 对所有提取的样品的 DNA 进行实时荧光 PCR 时,只有阳性标准样品 Malus-Arctic 质粒的 DNA 模板有典型荧光扩增曲线,以其他农作物材料 DNA 为模板的均无典型荧光扩增曲线(图 4B),表明本试验建立的北极苹果实时荧光 PCR 法特异性良好。

2. 3 线性范围及标准曲线

表 2 显示,在 $2\times 10^6\sim 10$ 拷贝范围内 7 个浓度梯度的 9 个平行均能有典型扩增曲线,最低检测限(LOD)为 10 拷贝(图 5);因 10 拷贝浓度所得 Ct 值的 SD 和 *RSD* 较 2×10^1 拷贝所得结果稍高,故确定最低定量检测限(LOQ)在 20 拷贝较为理想;以模板量的对数值与所得 Ct 值建立标准曲线,线性回归方程为 $y=-3.43x+39.579$, r^2 为 0.998,扩增效率为 96%(介于 90%~110%),表明其线性相关性良好,扩增效率高,均符合 ENGL(European Network of GMO Laboratories)中定量检测方法的相关要求^[15],可应用于北极苹果的定量检测。

表 2 实时荧光 PCR 法的灵敏度及可重复性						
Table 2 Repeatability of the real-time PCR method						
拷贝数/拷贝	Ct 值			平均 Ct 值	SD	RSD/%
2×10^6	17.98	17.82	17.97	17.96	0.06	0.35
	17.99	17.92	18.01			
	18.00	17.92	18.01			
2×10^5	21.43	21.39	21.44	21.43	0.04	0.18
	21.45	21.46	21.47			
	21.49	21.37	21.41			
2×10^4	24.91	24.96	24.89	24.88	0.11	0.46
	25.01	24.99	24.91			
	24.85	24.78	24.64			
2×10^3	28.08	27.99	28.24	28.17	0.11	0.39
	28.15	28.21	28.10			
	28.11	28.26	28.35			
2×10^2	31.94	31.54	31.60	31.64	0.17	0.53
	31.45	31.84	31.66			
	31.58	31.45	31.74			
2×10^1	34.96	34.58	34.71	34.81	0.25	0.73
	34.55	34.61	34.84			
	34.77	34.93	35.36			
10	35.86	36.92	36.83	36.46	0.35	0.96
	36.28	36.41	36.27			
	36.21	36.84	36.49			



注:1~7 分别为 $2\times10^6\sim10$ 拷贝 *Malus-Arctic* 质粒 DNA 模板

图 5 灵敏度测试扩增图

Figure 5 Sensitivity test for the Arctic™ construct-specific assay

2.4 可重复性

由表 2 可知,各个浓度 Ct 值的 SD 介于 0.04~0.35,*RSD* 介于 0.18%~0.96%,均小于 25%,在可接受的范围之内^[15],表明本试验建立的北极苹果特异性实时荧光 PCR 法可重复性良好。

3 讨论

本试验针对美国已上市的转基因北极苹果的三个品系,建立了北极苹果实时荧光 PCR 特异性检测方法。一方面,由于北极苹果采用的启动子、终止子和 *nptII* 均为常见基因元件,在其他转基因产品中广泛应用,因而采用基因筛查策略难以实现对北极苹果进行特异性的筛查;另一方面,北极苹果转入的其 PPO 抑制序列 PGAS,采用 ClustalW 比对显示相似度较高,采用基因特异筛查法在

PGAS 序列难以找到合适位点设计引物探针,经过比对和筛选,针对北极苹果特异性的 PGAS 和 NOS 邻接区序列设计引物和探针,建立北极苹果特异性实时荧光 PCR 法,可实现对北极苹果 GD743、GS784 和 NF872 三个品系进行通用性检测,具有特异性好、灵敏度高、可重复性好等优点,扩增效率为 96%,最低定量检测下限为 20 拷贝。可有效解决国内外转基因北极苹果无特异性检测方法问题,该检测方法的建立对于海关检验检疫、国内农业产品食品监管中北极苹果及其产品的标识性检测具有重要意义。

参考文献

[1] 周洲. 加拿大:转基因北极富士苹果等待 FDA 和 USDA 认可 [J]. 中国果业信息, 2016,33(7):29-30.

[2] Arctic Fuji apple event NF872 [EB/OL]. (2018-01-30) [2018-09-30]. <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/genetically-modified-foods-other-novel-foods/approved-products/arctic-fuji-apple.html>.

[3] Arctic apple events GD743 and GS784[EB/OL]. (2015-03-26) [2018-09-30]. <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/genetically-modified-foods-other-novel-foods/approved-products/arctic-apple-events-gd743-gs784.html>.

[4] VAN ENGELEN F A, MOLTHOFF J W, CONNER A J, et al. pBINPLUS: an improved plant transformation vector based on pBIN19[J]. Transgenic Research, 1995, 4(4):288-290.

[5] BOSS P K, GARDNER R C, JANSSEN B J, et al. An apple polyphenol oxidase cDNA is up-regulated in wounded tissues[J]. Plant Molecular Biology, 1995, 27(2):429-433.

[6] DATLA R S S, BEKKAOUI F, HAMMERLINDL J K, et al. Improved high-level constitutive foreign gene expression in plants using an AMV RNA4 untranslated leader sequence [J]. Plant Science, 1993, 94(1/2):139-149.

[7] SHARP P A. RNA interference—2001 [J]. Genes & Development, 2001, 15(5):485-490.

[8] 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,2008,112(1):232-238.

[9] European Commission. Commission regulation (EC) No. 1829 Concerning on genetically modified food and feed[Z]. 2003-09-22.

[10] Chief Medical Officer of the Russian Federation. Hygiene requirements to safety and nutrition value of food products[EB/OL]. (2007-06-25) [2018-09-30]. <http://www.loc.gov/law/help/restrictions-on-gmos/restrictions-on-gmos.pdf>.

[11] APEC-JIRCAS Joint Symposium and Workshop on Agricultural Biotechnology. GMO labeling and detection methods in Japan [Z]. 2001-06-10.

[12] Ministry of Agriculture and Forestry of South Korea. MAF Notification 31. Guidelines for labeling of genetically modified agricultural products[Z]. 2000-04-22.

[13] 中华人民共和国农业部.农业转基因生物标识管理办法:农业部第 10 号令[Z].2017-10-30.

[14] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 出口食品及饮
料中常见水果品种的鉴定方法 第 6 部分:苹果成分检测 实
时荧光 PCR 法;SN/T 3729. 6—2013[S]. 北京:中国标准出
版社,2013.

minimum performance requirements for analytical methods of
GMO testing [EB/OL]. (2008-10-13) [2018-09-30]. [http://
gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/MPR%20Report%20Application%
2020_10_2015.pdf](http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/MPR%20Report%20Application%202010_2015.pdf).

[15] European Network of GMO Laboratories (ENGL). Definition of

实验技术与方法

食品中爱德万甜检测方法比较研究

廖燕芝,秦海蛟,龚琴,孙桂芳
(湖南省食品质量监督检验研究院,湖南 长沙 410111)

摘 要:目的 建立准确、适用食品中爱德万甜的检测方法并比较。方法 研究检测食品中爱德万甜的高效液相色谱-二极管阵列(HPLC-DAD)法、高效液相色谱-荧光(HPLC-FLD)法和液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法的准确度和精密度,并对3种方法的检出限进行比较。结果 HPLC-DAD法定量限较高(0.8 mg/kg),不满足食品中爱德万甜限量值检测需求;HPLC-FLD和LC-MS/MS法的定量限分别为80.0和0.8 μg/kg,满足食品中爱德万甜检测需求。HPLC-FLD和LC-MS/MS法在检测浓度范围内线性关系良好,在方法相应的1倍定量限、2倍定量限及常用限量值水平下的加标回收率在85.0%~103.1%,相对标准偏差为2.5%~9.5%。结论 HPLC-FLD和LC-MS/MS法准确度高、精密度好,能够满足对食品中爱德万甜快速准确的检测要求。

关键词:爱德万甜;高效液相色谱-二极管阵列;高效液相色谱-荧光;液相色谱-串联质谱;食品添加剂

中图分类号:R155 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-8456(2019)01-0053-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2019.01.012

Study on the determination of advantame in food

LIAO Yanzhi, QIN Haijiao, GONG Qin, SUN Guifang

(Hunan Institute of Food Quality Supervision Inspection and Research,
Hunan Changsha 410111, China)

Abstract: Objective Comparing and studying accurate and applicable detection method of advantame in food. **Methods** Quantitative detection method by high performance liquid chromatography-diode array detector (HPLC-DAD), high performance liquid chromatography-fluorescence detector (HPLC-FLD) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) were developed for the determination of advantame in processed foods. The detection limits, accuracy and precision of the method by HPLC-DAD, HPLC-FLD and LC-MS/MS were compared. **Results** The limit of quantification (LOQ) of method by HPLC-DAD was high (0.8 mg/kg), and it did not meet the requirement of advantame limit test in food. The LOQ was 80.0 μg/kg by HPLC-FLD and 0.8 μg/kg by LC-MS/MS, and they meet the requirement of advantame limit test in food. In the range of detection concentration, the HPLC-FLD and LC-MS/MS method had good linear relationship. The recovery was 85.0%-103.1% with relative standard deviation of 2.5%-9.5%. **Conclusion** The HPLC-FLD and LC-MS/MS method had high accuracy and good precision, and could be used for rapid and accurate detection of advantame in food.

Key words: Advantame; high performance liquid chromatography-diode array detector; high performance liquid chromatography-fluorescence detector; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; food additive

2017 年 10 月 30 日,原国家卫生和计划生育

委员会发布了 2017 年第 8 号公告^[1],批准了食品
添加剂新品种爱德万甜在部分食品中允许使用,
并规定了相应的最大使用量要求但未规定相应的
检测方法。爱德万甜(advantame)分子式为 N-[N-
[3-(3-羟基-4-甲氧基苯基)丙基-L-α-天冬氨酰]-L-