

转基因水稻潮霉素标记基因 PCR 检测方法的建立及其在基因水平转移研究中的应用

沈立明^{1,4} 吴永宁¹ 周萍萍¹ 张建中² 魏晓丽³

(1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100050; 2. 中国疾病预防控制中心传染病控制所,北京 102206; 3. 中国科学院遗传与发育生物学研究所,北京 100101; 4. 贵阳医学院公共卫生学院,贵州 贵阳 550001)

摘要:为建立用于基因水平转移研究,尤其是 DNA 经加工和消化后稳定性研究的针对转基因水稻潮霉素标记基因 *hpt* (hygromycin phosphotransferase) 的定性和实时定量 PCR 体系,设计针对 *hpt* 的上游通用引物多个片段定性 PCR 扩增体系,以植物叶绿体基因 *rbcl* 为内对照,PCR 扩增产物经测序验证。将定性 PCR 中最小片段(236 bp)连接到质粒载体 pUC18-pMD T 载体上,提取质粒经验证后做外标。应用 TaqMan-MGB 荧光探针和引物,建立定量的外标校正曲线法,并评价方法的精密度。建立的定性 PCR 体系能稳定扩增出 236 bp~910 bp 不同大小的 5 个 *hpt* 片段,并经测序验证。实时定量 PCR 的线性范围为 $10^5 \sim 10$ 拷贝 ($R^2 = 0.998$),最低能检出 10 拷贝,重复性好。本研究已成功建立了用于转基因水稻标记基因 *hpt* 基因水平转移研究的定性和定量 PCR 系统。

关键词:植物;转基因;基因;基因水平转移;聚合酶链反应

Development of PCR Detection System for Marker Gene Hygromycin Phosphotransferase (*hpt*) in Transgenic Rice and Its Application

SHEN Li-ming, WU Yong-ning, ZHOU Ping-ping, ZHANG Jian-zhong, WEI Xiao-li
(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100050, China)

Abstract: Qualitative and real-time quantitative PCR methods were developed to facilitate the investigation of the persistence of *hpt* gene within transgenic rice in different processed foods and degradation test *in vitro* and *in vivo*. Using *rbcl* gene fragment as inner positive control, a fragment-multiplex PCR system was established to detect fragments of the *hpt* gene of genetically modified rice with lengths between 236 bp and 910 bp, the amplified fragment was further confirmed via DNA sequencing. The 236 bp minimal fragment of qualitative PCR were cloned in the vector pUC18-pMD T and used as external standards of quantitative PCR. The real-time quantitative PCR method was developed based on TaqMan technology by the MGB probe for detecting the inserted DNA, which showed a good linear correlation ($R^2 = 0.998$) and precision at wide range between 10 and 10^5 DNA copies per reaction, and detection limit was 10 copies. The results indicated that the quantitative PCR system could work reliably and stably and fit well with the aim for monitoring degradation of *hpt* gene in different processed food and degradation process *in vitro* and *in vivo*.

Key word: Plants, Transgenic; Genes; Horizontal Gene Transfer; Polymerase Chain Reaction

标记基因目前广泛用于植物的遗传转化,随着转基因植物商品化种植,转基因植物食品中标记基因能否水平转移至消化道微生物或上皮组织并成功结合和表达,从而影响人或动物的安全,成为很受关注的问题。转基因植物食品中标记基因水平转移由此成为转基因食品安全性评价的一个重要方面。依据基因水平转移发生所需的条件,在对其进行安全

性评价时,需从 DNA 的稳定性和转化能力展开。食物经加工、烹调 and 消化道的作用后,无论从片段大小和量的角度均会有不同程度的变化。定性、定量 PCR 扩增是研究这一变化过程中 DNA 稳定性、完整性的基本方法^[1]。

我国已研制出具有独立知识产权和产业化前景的转 *scK* 水稻 s86,其使用的标记基因为潮霉素抗性基因 *hpt*。对 *hpt* 抗性基因进行安全性评价,验证其食用的安全性,并为转基因食品安全性评价标准制定提供参考,必要而迫切。本文建立了针对潮霉素标记基因 *hpt* 的定性和实时定量 PCR 方法,并探讨了转基因植物基因水平转移研究中 PCR 方法建立

基金项目:国家科技部 973 计划(2001CB109001);国家科技部 863 计划(2002AA212041)

作者简介:沈立明 男 副教授 博士生

通讯作者:吴永宁 男 研究员 博士生导师

转基因水稻潮霉素标记基因 PCR 检测方法的建立
及其在基因水平转移研究中的应用 ——沈立明 吴永宁 周萍萍等

的有关问题。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验样品 含 *hpt* 抗性基因的转 *sc6* 基因大米 (s86) 及其亲本对照 (M86) 由中国科学院遗传与发育研究所和福建农业科学院合作培育并提供。

1.1.2 主要试剂 2 × CTAB 提取液 100 mmol/L Tris-HCL (pH 8.0), 20 mmol/L EDTA, 1.4 mol/L NaCl, 质量浓度 20 mg/L CTAB, 40 mmol/L 巯基乙醇。普通 PCR Taq 酶和 dNTP 由博大泰克公司提供。定量 PCR 体系用 TaKaRa ExTaq™ PCR Version. 2.1, PMD18-T vector 购自 TaKaRa 公司。PCR 产物纯化用 QIAGEN 公司生产的 QIAquick Gel Extraction kit, 操作见说明书。v gene 质粒提取试剂盒购自杭州 v gene 公司。

1.1.3 引物和荧光探针 应用 Primer 5.0 软件设计, 根据 *hpt* 基因序列 (1023 bp) 设计并合成了 6 条引物, 建立 *hpt* 的上游通用引物的普通 PCR 扩增体系, 扩增出 236 ~ 910 bp 5 个不同大小的片段, 以植物内源基因 *rbcl* (ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase large subunit) 为内参, 由上海 Sangon 公司合成, 引物设计策略见图 1。定量 PCR 引物及 TaqMan-MGB 探针用 primer express 2.0 设计, 探针 5 端标记 FAM, 3 端标记淬灭基团, 由上海基康生物公司合成。引物及探针序列见表 1。

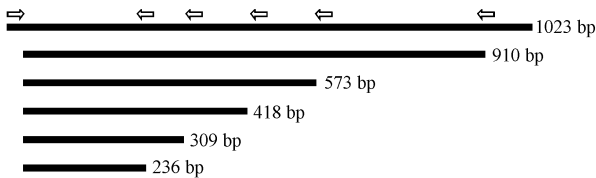


图 1 引物设计策略

表 1 引物及荧光探针序列

引物	序列 (5'-3')	扩增片段 (bp)
Hpt1	AGGGCGAAGAAATCTCGTGCT	
Hpt2 ^a	CAGTTCGGTTTCAGCCAGGT	236
Hpt3 ^a	AACCCGCTCGICTGGCTAAG	309
Hpt4 ^a	GTGTCGICCATCACAGTTTG	418
Hpt5 ^a	TCGCCTCGCTCCAGICAATG	573
Hpt6 ^a	GGCGTTCGGTTTCCACTATC	910
rbcl F	AAATCTTACTGGTACATGGAC	
rbcl R	TCATCATCTTTGGTAAAAATCAAG	433
HptF	TCCGGAAGTGCTTGACATTG	
HptR	CACGGCGGAGATGCA	
HptP	AGCGAGAGCCTGACC	

注: a 为 Hpt2 ~ 6 均以 Hpt1 为上游引物

1.1.4 主要仪器 RoboCycler™ GRADIENT 40 PCR 仪 (STRATA GENE), Line Gene (Bioer, 杭州博日)。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 基因组 DNA 提取用 CTAB 法^[2], 质粒提取用 v gene 质粒提取试剂盒, 参照说明书方法进行, 均溶于 TE (pH 8.0), 于 -20℃ 保存。

1.2.2 *hpt* PCR 扩增体系的建立 根据 *hpt* 基因序列选择性设计并合成了 6 条引物, 建立转基因水稻抗性标记基因 *hpt* 的上游通用引物 PCR 扩增检测体系。以植物内源基因 *rbcl* 为内参^[3]。引物设计策略见图 1。

PCR 扩增反应体系为 20 μl, 其中含 1 × PCR 缓冲液、0.2 mmol/L dNTP、0.9 U Taq 酶、500 nmol/L 的上下游引物、模板 DNA 2 μl。

PCR 扩增条件 95℃ 预变性 5 min、95℃ 变性 40 s、57℃ 退火 48 s、72℃ 延伸 1 min、40 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。

1.2.3 PCR 扩增产物的测序与分析 以抽提的 s86 大米 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物经凝胶电泳后切胶回收, 测序。DNA 测序由上海博亚生物技术公司完成, 序列分析用 Vector NTI 6.0 软件。

1.2.4 实时定量 PCR 方法的建立

外标及 PCR 体系的建立 将上述最小片段 (236 bp) 连接到质粒载体 pUC18-pMD T 载体上, 转化进入感受态的 *E. coli* DH5, 提取质粒经验证后做外标。应用 TaqMan-MGB 荧光探针和引物, 建立定量的外标校正曲线。反应体系为 25 μl, 其中含 1 × PCR 缓冲液、6 mmol/L MgCl₂、0.2 mmol/L dNTP、360 nmol/L 的上下游引物、1.125 U Taq DNA 聚合酶、180 nmol/L 荧光探针, 模板 2.5 μl。PCR 扩增为 2 步法: 95℃ 10 s; 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 45 个循环。

校正曲线的建立 质粒提取纯化后, 用核酸测定仪测定浓度, 按文献方法进行计算和稀释^[4], 梯度稀释为 4 × 10⁴、4 × 10³、4 × 10²、4 × 10、4 copies/μl。通过测定, 计算机自动生成校正曲线, 纵坐标为临界循环值 *C_t*, 横坐标为拷贝数。

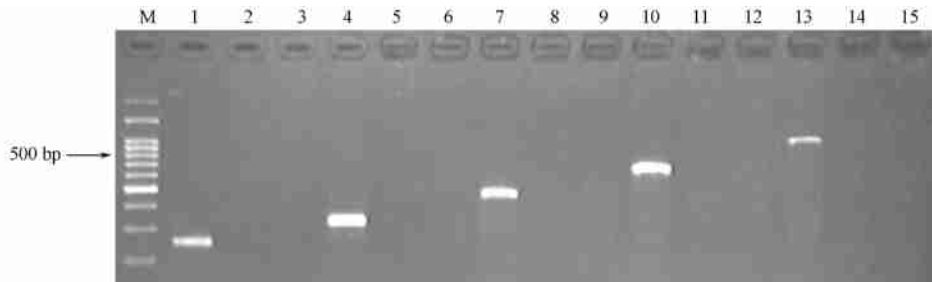
检测方法精密度分析 用上述梯度稀释的质粒 DNA, 每个浓度 5 份做定量 PCR, 通过不同拷贝数 *C_t* 值的统计学分析, 计算标准差和相对标准差, 评价方法的精密度。

3 结果

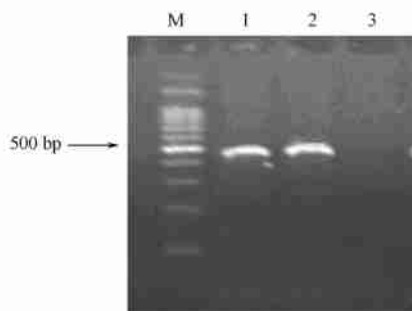
2.1 定性 PCR 检测 s86 转基因大米及对照 M86 中 *hpt* 建立的 PCR 扩增体系在 s86 转基因大米中能稳定扩出 *hpt* 不同大小的 236、309、418、573、910 bp

的5个片段(图2)。经测序,5个片段均与预期的 *hpt* 片段序列相同。而相对应的对照 M86 与空白对照相似,没有这些片断。与此同时,也建立了植物内

源基因 *rbcl* 的 PCR 扩增技术(图3),在 s86 转基因大米及对照 M86 中均能稳定扩出 *rbcl*,在空白对照中没有 *rbcl*。



1,4,7,10,13 分别为 s86 236,309,418,573,910 bp *hpt* 片段,
M86(2,5,8,11,14),空白对照(3,6,9,12,15)。M 为 100 bp ladder
图2 s86 转基因大米及对照 M86 *hpt* 片段 PCR 扩增结果

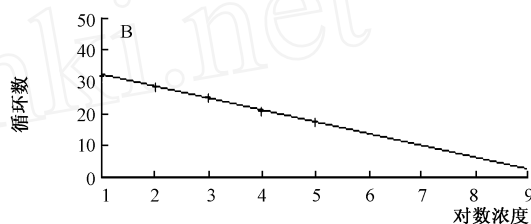
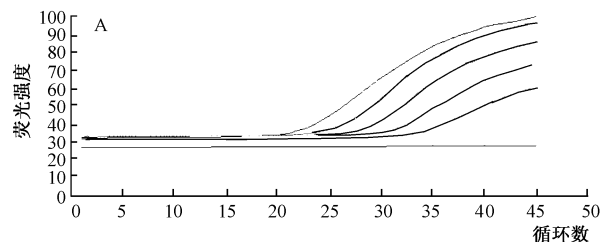


M: 100 bp ladder, 1: s86 转基因大米, 2: M86, 3: 空白对照
图3 植物 *rbcl* 基因 PCR 扩增结果

2.2 实时定量 PCR 检测

2.2.1 校正曲线的建立 标准系列 Real-time PCR 扩增结果见图4(A),拷贝浓度依次为 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、10。校正曲线见图4(B)。从图4可知,校正曲线的线性方程 $y = 36.15 - 3.68x$, $R^2 = 0.998$,线性范围为 $10 \sim 10^5$ 拷贝,最低检测限为 10 拷贝。

2.2.2 检测方法精密度测定 从表2可知, $10 \sim 10^5$ 个拷贝梯度稀释质粒重复测定的结果表明,方法具



A 为标准系列 Real-time PCR 扩增曲线图, B 为校正曲线图

图4 实时定量 PCR 结果

有良好的准确性和重现性。且拷贝数越高,重复性越好。

表2 精密度测定结果

质粒拷贝数	G 值					均值	标准差	相对标准差
	1	2	3	4	5			
100000	17.68	17.63	17.67	17.66	17.74	17.73	0.09	0.50
10000	21.55	20.38	21.39	21.35	21.41	21.48	0.15	0.69
1000	25.21	26.54	24.88	25.46	25.77	25.52	0.20	0.78
100	29.61	29.15	29.38	28.93	28.12	28.87	0.57	2.00
10	33.10	32.92	31.57	32.25	32.51	32.47	0.60	1.80

3 讨论

3.1 基因水平转移是一个自然现象。当转基因食品出现时,必然会出现其转基因成分,特别是当抗生素抗性基因存在时就会产生是否会转移至消化道微生物、上皮组织的疑问。由于这种担心甚至争论的存在,转基因植物食品中标记基因的水平转移问题是转基因食品安全性评价重要内容之一^[5]。由于自

然转化是当前认识到的转基因植物基因水平转移至细菌的最可能机制,因此发生基因水平转移的一个重要前提是有适宜的 DNA,即不完全降解并具有转化活性的 DNA。食物经加工、烹调、消化后,食物中 DNA 受到加工及烹调过程中的热、压力等物理和化学因素以及消化道胃酸和小肠内由胰腺和肠上皮细胞产生的大量脱氧核糖核酸酶(DNase)的作用,均

可降低含量及其片段的大小^[5-8]。为充分了解在食物加工和消化过程中 DNA 的降解情况,在进行转基因植物基因水平转移研究时,首先应建立针对目标片段的定性或定量 PCR 检测方法。DNA 在食物或消化道的降解是随机的,国外文献多通过设计不同引物,扩增不同大小的片段来研究这一过程。本研究 PCR 引物设计与 Andrea W 等采用的策略类似^[8],利用上游通用引物 PCR 扩增检测体系扩增出片段大小逐渐增大的 5 个片段;从概率上来说,小片段保存下来并能扩出的可能性大,这样有利于观察 DNA 降解的变化过程。

基于 PCR 技术的转基因标识技术,所选择的目标片段往往在 100 bp 左右,但在研究 DNA 的转化时,应充分考虑片段的结构、序列和长度等方面,其长度范围对于结构基因应在 150~6000 bp,调节基因为 100~150 bp,而转基因植物基因水平转移至细菌时,至少 250 bp 大小的片段才有意义^[11]。因此,本研究中最小片段选择在 236 bp,所扩片段最大 910 bp,接近 *hpt* 全长序列 1023 bp。

样品 DNA 的抽提是 PCR 成功与否的关键,为排除模板中 PCR 抑制物造成的假阴性,本研究以叶绿体 *rbcl* 基因的保守区域为内对照。

本研究 PCR 扩增结果显示,建立的 PCR 扩增体系能稳定扩出 *hpt* 的 236、309、418、573、910 bp 的片段。经测序验证,5 个片段均与所设计引物预期的 *hpt* 片段序列相同。由此,本研究已成功建立针对 *hpt* 的多个片段 PCR,利用这一体系可很好“监测”转基因水稻中 *hpt* 在食物加工和消化过程中 *hpt* 的降解情况。

3.2 在研究转基因植物基因水平转移时,除基因的完整性与稳定性外,其量的变化也是一个关键因素。国外文献采用了竞争定量 PCR 的方法或 SYBR Green I 荧光定量 PCR 方法对这一问题进行研究^[6,9],而针对转基因成分的标识,多采用相对定量的实时定量 PCR 方法。实时定量 PCR (real-time quantitative PCR) 技术是一种快速、准确、灵敏、特异性高且能定量的 PCR 技术。在临床诊断、疾病监测和评价以及转基因食品检测等方面已得到广泛的应用^[10,11]。本研究将定性 PCR 中理论上“存活”时间最长的最小片段(236bp)连接到质粒载体 *pUC18-pMD T* 载体上,转化进入感受态的 *E. coli* DH5,提取质粒经验证后做外标。应用 TaqMan-MGB 荧光探针和引物,建立定量的外标校正曲线法,并评价了方法的重复性。结果显示,校正曲线的线性方程 $y =$

$36.15 - 3.68x$, $R^2 = 0.998$,线性范围为 $10 \sim 10^5$ 拷贝,最低检测限为 10 拷贝,方法重复性好。后续研究拟采用这一技术对不同加工条件和体外模拟消化道模型中潮霉素标记基因的稳定性进行研究,以期观察其量的变化。

参考文献

- [1] Van den Eede G, Aarts H, Buhk H J, et al. The relevance of gene transfer to the safety of food and feed derived from genetically modified (GM) plants[J]. Food and Chemical Toxicology, 2004, 42: 1127-1156.
- [2] Somma M. The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms, session 4, extraction and purification of DNA [EB/OL]. <http://gmotraining.jrc.it/>. European Commission Joint Research Center. 2004.
- [3] 权洁霞, 张艺兵, 陈长法, 等. 植物转基因成分 PCR 检测内对照系统的建立[J]. 云南植物研究, 2004, 24(3): 333-340.
- [4] Applied biosystems. Creating standard curves with genomic DNA or plasmid DNA templates for use in quantitative PCR [EB/OL]. www.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/quant_pcr.pdf.
- [5] Bauer T, Weller P, Hammes W P, et al. The effect of processing parameters on DNA degradation in food[J]. Eur Food Res Technol, 2003, 217: 338-343.
- [6] Mart ír-Or ú S M, O'Donnell A G, Ariño J, et al. Degradation of transgenic DNA from genetically modified soya and maize in human intestinal simulation [J]. British Journal of Nutrition, 2002, 87: 533-542.
- [7] Chambers P A, Duggan P S, Heritage J, et al. The fate of antibiotic resistance marker genes in transgenic plant feed material fed to chickens [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2002, 49: 161-164.
- [8] Andrea W, Angela H A M, van Hoek, et al. Persistence of DNA studied in different ex vivo and in vivo rat models simulating the human gut situation[J]. Food and Chemical Toxicology, 2004, 42: 1127-1156.
- [9] Netherwood T, Mart ír-Or ú S M, O'Donnell A G, et al. Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract [J]. Nature Biotechnology, 2004, 22(2): 204-208.
- [10] Bonfini L, Heinze P, Kay S, et al. Review of GMO detection and quantification techniques[Z]. EUR 20348 EN, 2002.
- [11] Dieter K. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations[J]. Trends Mol Med, 2002, 8(6): 257-260.

[收稿日期:2006-03-17]

中图分类号:R155.2;TS201.6;Q943.2 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2006)03-0193-04