

耶拿荧光定量 PCR 在转基因饲料检测中的应用

甄 珍*

(齐齐哈尔出入境检验检疫局, 齐齐哈尔 161005)

摘要: **目的** 优化耶拿荧光定量 PCR 在转基因饲料检测中的检测条件。**方法** 采用已知转基因品系的玉米蛋白粉样品, 通过选择常用的不同品牌的 Premix 溶液、8 连管及不同的反应程序进行 C_t 值对比, 得出最佳的检测方案。**结果** 最佳的检测方案如下: Takara Premix 溶液、LightCycler 8-Tube Strips (white) 八连管及 95 °C 30 s, 95 °C 5 s~60 °C 30 s, 40 个循环的反应程序, 在此条件下可检测出饲料产品中痕量的转基因成分。**结论** 耶拿荧光定量 PCR 对饲料中痕量转基因成分的检测结果可靠, 适用于饲料转基因成分的检测。

关键词: 荧光定量 PCR; 转基因; 饲料

Application of Jena fluorescence quantitative PCR in the detection of genetically modified feed

ZHEN Zhen*

(Qiqihar Entry-Exit Inspection And Quarantine Bureau, Qiqihar 161005, China)

ABSTRACT: Objective To optimize the detection conditions of Jena fluorescent quantitative PCR for detection of genetically modified feed. **Method** Using the corn gluten meal samples with known genetically modified strains, 2 brands of Premix solutions, 8-Tube Strip and different reaction procedures were selected to perform C_t value comparison to obtain the best detection scheme. **Results** The optimum detection scheme was as follows: Takara Premix solution, LightCycler 8-Tube Strips (white) and 95 °C 30 s, 95 °C 5 s~60 °C 30 s for 40 cycles, and trace amounts of genetically modified components in feed products could be detected. **Conclusion** The detection result of the genetically modified components in feed detected by Jena fluorescent quantitative PCR is reliable, which is suitable for the detection of genetically modified components in feed.

KEY WORDS: fluorescence quantitative PCR; transgenesis; feed

1 引言

耶拿荧光定量 PCR 仪为近几年在国内新推广的仪器产品, 多数产品销往各大高校进行科学研究, 检测原理为在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析。但该仪器产品在检验领域尤其是转基因检测领域的应用还很少。饲料中的转基因成分往往是痕量的^[1-3], C_t 值较低, 故

其对仪器的性能要求非常高。本研究依据 SN 1201-2014《植物性饲料中转基因成分定性 PCR 检测方法》^[4], 拟优化耶拿荧光定量 PCR 在转基因饲料检测中的检测条件。

2 材料和方法

2.1 仪器与试剂

qTOWER2.2 荧光定量 PCR(德国耶拿公司); AB2-4S1 生物安全柜(新加坡 ESCO 公司); e-spect 核酸蛋白分析仪

*通讯作者: 甄珍, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品农产品微生物及转基因检验。E-mail: 171405573@qq.com

*Corresponding author: ZHEN Zhen, Master, Engineer, Qiqihar Entry-Exit Inspection And Quarantine Bureau, Qiqihar 161005, China. E-mail: 171405573@qq.com

(日本 Malcom 公司);

Premix 溶液: FastStart Universal ProbeMaster(Roche 公司), Premix Ex Taq(Probe qPCR)(Takara 公司);

八连管: LightCycler 8-Tube Strips (white) (Roche 公司), FG,OPTICAL CAP (8 CAPS/STRIPS)(AB 公司), FG,TUBE 8-STRING OPTICAL(AB 公司);

引物、探针: 5PRIME FAM 3PRIME TAMER (Invitrogen 公司)、5PRIME FAM 3PRIME TAMER (Invitrogen 公司);

样品: 玉米蛋白粉(含转基因 MON810 品系);

提取试剂盒: Foodproof GMO Sample preparation kit(Biotecon 公司);

阳性对照: 购自 erm-crm 公司, 含量 99%;

阴性对照: 实验室保存的非转基因玉米样品。

2.2 实验方法

2.2.1 方法依据

SN 1201-2014《植物性饲料中转基因成分定性 PCR 检测方法》^[4]。

2.2.2 样品中 DNA 提取

根据 Foodproof GMO Sample preparation kit 提取试剂盒说明书的方法进行玉米蛋白粉中 DNA 提取, 方法如下:

称取 200 mg 玉米蛋白粉加入到 2 mL 微量离心管中, 加入提取缓冲液, 涡旋混合 30 s 后, 80 °C 温育 30 min。在温育过程中颠倒混合 2~3 次反应管, 温育后 13000 r/min 离心 10 min。吸取上清液 1 mL 至新的 2 mL 离心管中, 加入 400 μL 结合缓冲液, 随后轻柔彻底地反复吸打, 使之混合均匀。然后加入蛋白酶 K 操作液 80 μL, 轻柔彻底地反复吸打使之混合, 随后进行温育 72 °C, 10 min。温育后加入 200 μL 异丙醇并反复吸打, 充分混匀。将混合液加入到过滤管与收集管结合管的上层位置, 在微型离心机中进行 5000 r/min 离心 1 min。离心后弃去下层废液。加入剩余的混合液并重复离心步骤, 离心后弃去下层废液, 加 400 μL 清洗缓冲液操作液, 随后 6000 r/min 离心 1 min, 重复一次。离心后弃去下层废液, 通过 13000 r/min 离心 10 s 移除残留的清洗缓冲液。离心后将过滤管放入到一个干净的 1.5 mL 反应管中。加入 60 μL 预热至 70 °C 的洗脱液, 随后温育 15~25 °C, 5 min, 温育后 6000 r/min 离心 1 min, 即获得洗脱下的 DNA。

2.2.3 Premix 溶液的选择

Premix 溶液为实时荧光 PCR 反应混合液, 含有 Taq 酶、PCR buffer、Mg²⁺、UNG 酶、d(A,C,G)Tps、dUTP 和 ROX 染料。不同品牌的 Premix 溶液中酶活性的高低是不同的, 且 PCR 仪器反应程序运行时对酶的活性也有影响, 最终直接影响到实验结果 Ct 值的高低^[4]。

Premix 溶液有很多种品牌, 实验中采用较为常用的两种 Premix 溶液进行对比实验, 分别为 FastStart Universal

ProbeMaster 和 Premix Ex Taq(Probe qPCR)。实验过程中采用的反应程序为试剂说明书中要求的反应程序, 分别为: 95 °C 10 min, 95 °C 15 s-60 °C 1 min, 40 个循环(FastStart Universal ProbeMaster)和 95 °C 30 s, 95 °C 5 s-60 °C 30 s, 40 个循环(Premix Ex Taq)。实验过程采用耶拿公司原厂的白色八连管, 由于引物及探针都是根据 SN 1201-2014《植物性饲料中转基因成分定性 PCR 检测方法》标准中规定的序列进行人工合成的, 不同品牌的引物和探针不会有较大差异, 故在本研究中不作对比分析, 直接选用 Invitrogen 公司合成的 MON810 引物及探针。实验中做了阳性对照、水空白对照及阴性对照。对两种不同 Premix 溶液的反应体系分别进行 PCR 扩增, 将扩增后的 C_t 值进行对比分析^[5-8]。

2.2.4 八连管的选择

八连管也是影响实验结果的一个重要因素。八连管主要有白色和透明的两种管。从定量 PCR 信号检测原理上来说, 白管优于透明管, 但是由于不同品牌的荧光定量 PCR 要求不同, 有的需要用白管, 有的则需要用透明管, 有的两者均可。之前的实验一直使用的是耶拿公司原厂的白色八连管, 因此本研究对不同品牌的白管和透明管分别进行对比分析, 即 FG,OPTICAL CAP (8 CAPS/STRIPS)、FG,TUBE 8-STRING OPTICAL 和 LightCycler 8-Tube Strips (white)。前两者为 AB 公司的透明八连管、后者为 Roche 公司的白色八连管。对两种不同八连管的反应体系分别进行 PCR 扩增, 将扩增后的 C_t 值进行对比分析。

2.2.5 反应程序的优化

PCR 反应程序对实验结果起着至关重要的作用, 直接影响到引物及探针与模板 DNA 反应效果以及最终 Ct 值的高低^[9]。饲料中转基因的含量本身就是痕量的, 如若反应不完全会导致出现假阴性的结果。上述实验中一直采用 Premix 溶液说明书中说明的反应程序进行实验, 本次实验将对 Premix 溶液说明书中的反应程序与 SN 1201-2014《植物性饲料中转基因成分定性 PCR 检测方法》标准中规定的反应程序进行对比。对两种不同反应程序分别进行 PCR 扩增, 将扩增后的 Ct 值进行对比分析。

3 结果与分析

3.1 样品中提取 DNA 的含量

将 Foodproof GMO Sample preparation kit 提取试剂盒提取出的样品中的 DNA 用核酸蛋白分析仪进行 DNA 含量的测定。经测定, 玉米蛋白粉中 DNA 浓度为 14.5 ng/μL, Abs₂₃₀ 为 0.212, Abs₂₆₀ 为 0.298, Abs₂₈₀ 为 0.192, A_{260/230} 为 1.368, A_{260/280} 为 1.510。由此可见, 类似玉米蛋白粉这种深加工的饲料产品, 其提取后的 DNA 含量很低(SN 1201-2014 标准中要求 DNA 模板浓度应在 40~50 ng/μL)^[10], 对于需要检测的转基因核酸成分则要求更为痕量, 且 DNA 样品本身的纯度不好, A₂₆₀/A₂₈₀ 的比值太低, 不符合

1.8~2 的要求, DNA 中含有的盐离子等杂质也会对 PCR 扩增有抑制作用^[10, 11]。

3.2 不同 Premix 溶液对比结果

对 2 种不同 Premix 溶液的反应体系分别进行 PCR 扩增, 扩增后的 C_t 值如图 1 所示。

由实验结果可知, 两种不同 Premix 溶液 PCR 扩增结果中阳性对照、阴性对照和空白对照结果都正常, 但 FastStart Universal ProbeMaster 的 Premix 溶液扩增效果差, 双平行实验中只有一个有 C_t 值, 不稳定。故选用 Premix Ex Taq(Probe qPCR)。

3.3 不同八连管对比结果

对 2 种不同八连管的反应体系分别进行 PCR 扩增, 扩

增后的 C_t 值如图 2 所示。

由实验结果可知, 2 种不同八连管 PCR 扩增结果中阳性对照、阴性对照、空白对照结果都正常, 但 FG, OPTICAL CAP(8 CAPS/STRIPS)的透明八连管扩增效果差, 没有扩增出样品中 MON810 的 C_t 值(C_t 值为 0), 而 LightCycler 8-Tube Strips 的白色八连管效果好, 扩增出样品中 MON810 的 C_t 值(平均 C_t 值为 37.12)与 3.2 实验结果(平均 C_t 值为 37.67)相近。故选用 LightCycler 8-Tube Strips 的白色八连管。

3.4 不同反应程序对比结果

对两种 PCR 反应程序分别进行 PCR 扩增, 扩增后的 C_t 值如图 3 所示。

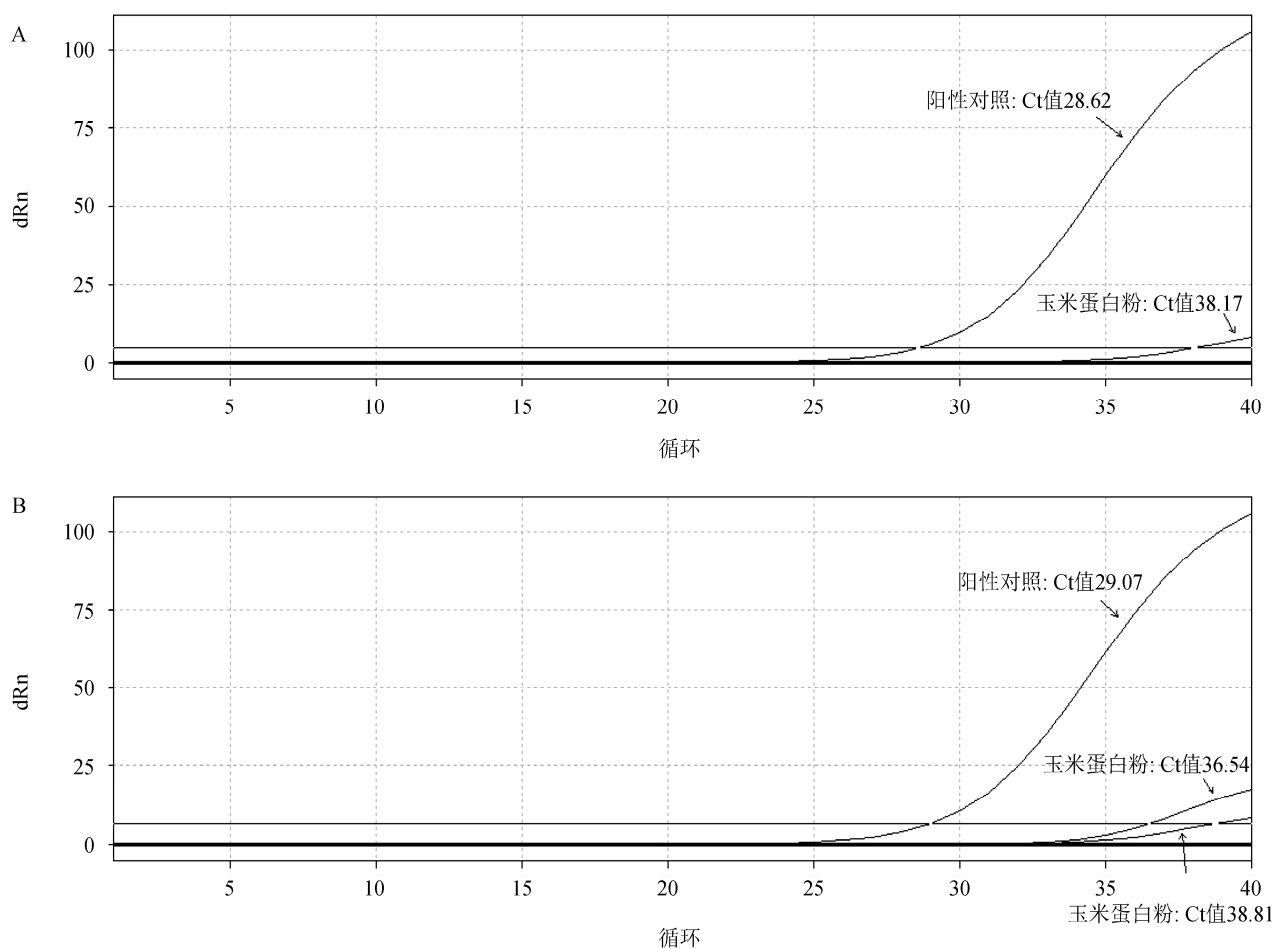


图 1 两种不同 Premix 溶液的反应体系分别进行 PCR 扩增后的 C_t 值

Fig. 1 C_t values of 2 different Premix solution reaction systems after PCR amplification

注: 图 A 为 FastStart Universal ProbeMaster 的 Premix 溶液; 图 B 为 Premix Ex Taq(Probe qPCR)的 Premix 溶液

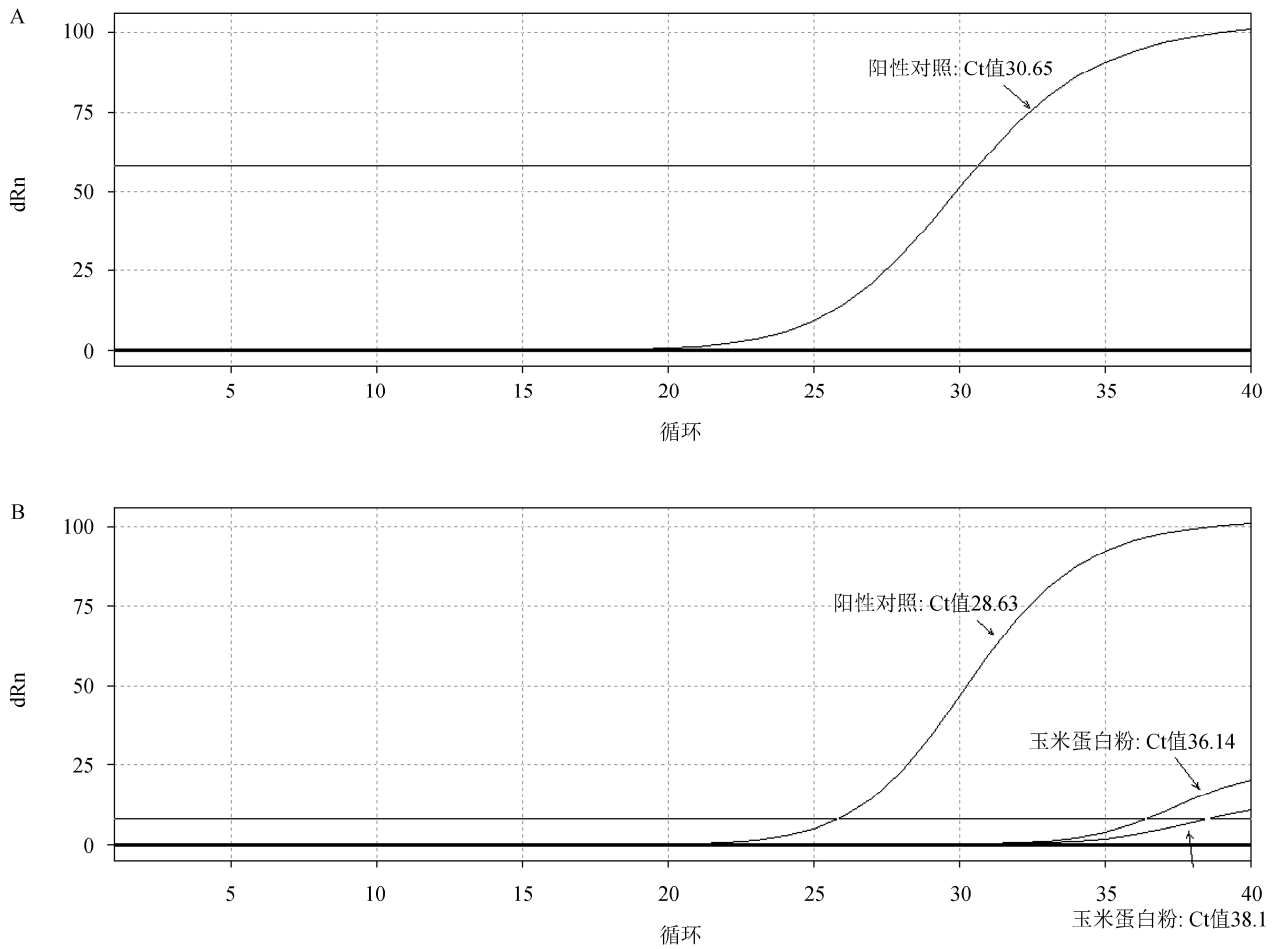


图 2 两种不同八连管的反应体系分别进行 PCR 扩增后的 Ct 值

Fig. 2 Ct values of 2 different 8-tube strips reaction systems after PCR amplification

注: 图 A 为 FG, OPTICAL CAP (8 CAPS/STRIPS)的八连管; 图 B 为 LightCycler 8-Tube Strips 的八连管

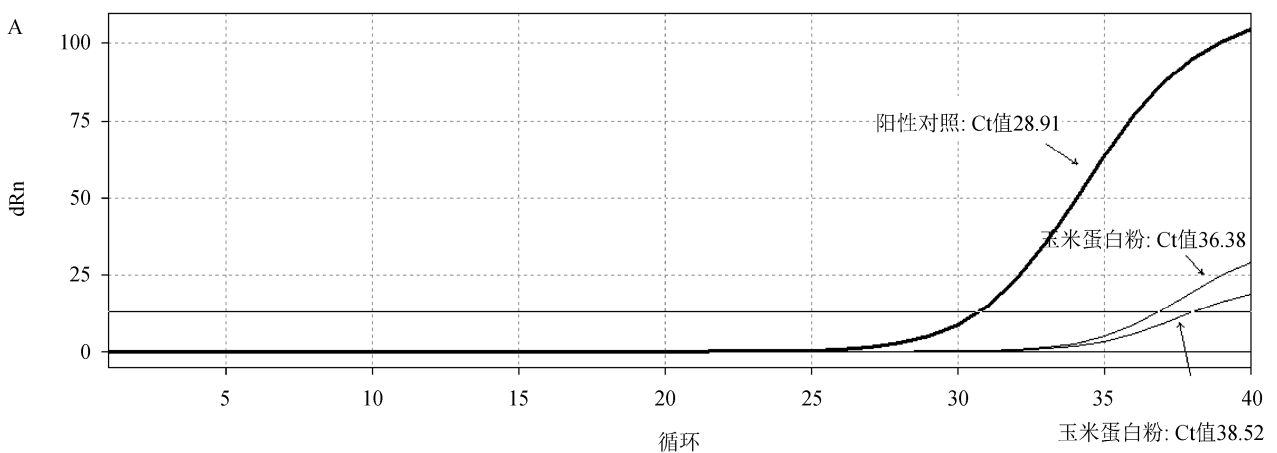
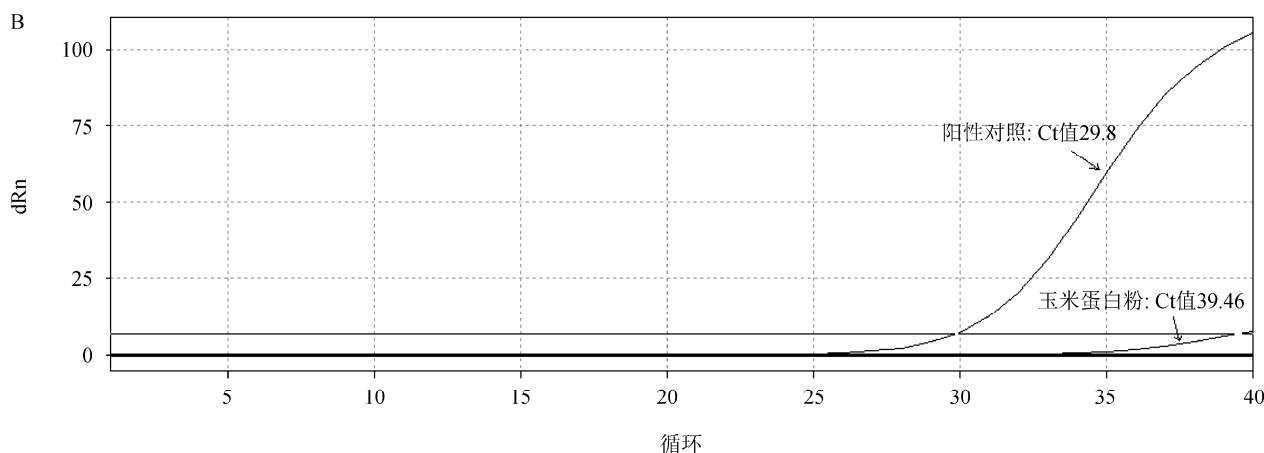


图 3 两种不同 PCR 反应程序分别进行 PCR 扩增后的 Ct 值

Fig. 3 Ct values of 2 different PCR reactions systems after PCR amplification

注: 图 A 为 Takara Premix 溶液的反应程序; 图 B 为 SN 1201-2014 《植物性饲料中转基因成分定性 PCR 检测方法》标准中规定的反应程序



续图 3 两种不同 PCR 反应程序分别进行 PCR 扩增后的 Ct 值

Fig. 3 Ct values of 2 different PCR reactions systems after PCR amplification

注: 图 A 为 Takara Premix 溶液的反应程序; 图 B 为 SN 1201-2014《植物性饲料中转基因成分定性 PCR 检测方法》标准中规定的反应程序

由实验结果可知, 两种 PCR 反应程序结果中阳性对照、阴性对照、空白对照结果都正常, 但 SN 1201-2014《植物性饲料中转基因成分定性 PCR 检测方法》标准中规定的反应程序扩增效果差, 双平行实验中只有一个有 C_t 值, 相比上述实验结果的 C_t 值相差很多, 而 Takara Premix 溶液的反应程序扩增效果好, C_t 值(平均 C_t 值为 37.45)与 3.2 实验结果相近(平均 C_t 值为 37.67), 故选择 Takara Premix 溶液的反应程序。

4 讨论

荧光定量 PCR 反应过程中的 Premix 溶液、八连管、反应程序等对最终的 C_t 值都有着很大的影响^[12-15]。不同的荧光定量 PCR 仪有着不同的试剂及反应程序的要求, 为了在饲料转基因检测中得到最佳实验效果, 需要在实验过程中找出最佳的试剂及反应程序方案。

通过本研究对耶拿荧光定量 PCR 在转基因饲料检测中的应用方案分析可知, Takara 的 Premix 溶液、LightCycler 8-Tube Strips (white)八连管及 95 °C 30 s, 95 °C 5 s-60 °C 30 s, 40 个循环的反应程序为最佳检测方案。用耶拿荧光定量 PCR 对类似于玉米蛋白粉这种深加工的饲料产品进行转基因成分检测时均可采用此方法。但本研究只针对了两种 Premix 溶液及八连管进行了对比实验, 在今后研究中可对其他品牌的 Premix 溶液及八连管做进一步的分析研究, 还可对反应程序进行进一步的优化, 使实验结果达到最佳效果。

参考文献

- [1] 肖有玉. 江苏饲料生产现状与转基因成分检测[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
Xiao YY. Status of feed manufacture in Jiangsu province and the detection on transgenic organisms from plants in feed [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012.
- [2] 邱良焱, 肖有玉, 储瑞武, 等. 江苏北部地区饲料中植物性转基因成分检测[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(9): 44-47.
Qiu LY, Xiao YY, Chu RW, *et al.* Detection of genetically modified components in feed in the northern area of Jiangsu [J]. Jiangsu Agric Sci, 2012, 40(9): 44-47.
- [3] 桂国春, 李克彬, 畅荣妮, 等. 出入境转基因产品及其分子检测现状与展望[J]. 生物技术通讯, 2014, 25(2): 290-294.
Gui GC, Li KB, Chang RN, *et al.* Status and perspective of the genetically modified organisms product and its molecular detection [J]. Lett Biotechnol, 2014, 25(2): 290-294.
- [4] SN 1201-2014 植物性饲料中转基因成分定性 PCR 检测方法[S].
SN 1201-2014 Protocol of PCR for detection of genetically modified feed [S].
- [5] 管庆丰, 王秀敏, 杨雅麟, 等. 转基因饲料的 PCR 检测策略[J]. 中国饲料, 2010, (19): 40-43.
Guan QF, Wang XM, Yang YL, *et al.* PCR detection strategy of genetically modified feed [J]. China Feed, 2010, (19): 40-43.
- [6] 周建嫄, 杨明杰, 杨杏芬, 等. PCR 法检测食品和动物饲料中的转基因成分[J]. 卫生研究, 2005, (6): 732-735.
Zhou JC, Yang MJ, Yang XF, *et al.* Detection of genetically modified components in food and animal feed by PCR [J]. J Hyg Res, 2005, (6): 732-735.
- [7] 季天荣, 何绮霞. 饲料中转基因成分的检测分析方法[J]. 广东饲料, 2010, (4): 38-40.
Ji TR, He QX. Detection and analysis method of genetically modified ingredients in feed [J]. Guangdong Feed, 2010, (4): 38-40.
- [8] 杜红方, 齐广海. 饲料中转基因植物成分的检测[J]. 中国饲料, 2006, (3): 33-36.
Du HF, Qi GH. Detection of genetically modified plants in feed [J]. China Feed, 2006, (3): 33-36.
- [9] 王颖, 余道坚, 康林, 等. 应用 PCR 技术检测饲料中的转基因成分[J]. 农业生物技术学报, 2002, 10(2): 180-183.

- Wang Y, Yu DJ, Kang L, *et al.* Detection of genetically modified ingredients in feed by PCR Technology [J]. *J Agric Biotechnol*, 2002, 10(2): 180-183.
- [10] 梁克红. 饲料加工工艺对大豆转基因成分影响规律的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2009.
- Liang KH. Degradation of transgenic ingredients of genetically modified soybean during feed processing [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2009.
- [11] 梁克红, 李俊, 李军国, 等. 转基因饲料 DNA 在加工过程中的降解研究进展[J]. *饲料工业*, 2008, 29(8): 51-53.
- Liang KH, Li J, Li JG, *et al.* Research progress on degradation of transgenic DNA in processing [J]. *Feed Ind*, 2008, 29(8): 51-53.
- [12] 张舒亚, 潘良文, 吕蓉, 等. 饲料中转基因成分的实时荧光 PCR 检测研究[J]. *中国饲料*, 2007, (19): 9-11.
- Zhang SY, Pan LW, Lu R, *et al.* Study on real time fluorescent PCR detection of genetically modified components in feed [J]. *China Feed*, 2007, (19): 9-11.
- [13] 袁磊, 孙红伟, 李凡, 等. 以实时荧光定量 PCR 技术检测转基因玉米 MON88017[J]. *作物学报*, 2011, (11): 2117-2121.
- Yuan L, Sun HW, Li F, *et al.* Detection of genetically modified maize MON88017 by real-time fluorescence quantitative PCR technique [J]. *Acta Agron Sin*, 2011, (11): 2117-2121.
- [14] 宋君, 郭灵安, 雷绍荣, 等. 实时荧光定量 PCR 检测转基因玉米 59122 的方法建立及测量不确定度评估[J]. *食品科学*, 2014, (24): 259-264.
- Song J, Guo LA, Lei SR, *et al.* Establishment of real-time fluorescence quantitative PCR detection of genetically modified corn 59122 and evaluation of measurement uncertainty [J]. *Food Sci*, 2014, (24): 259-264.
- [15] 陈旭, 齐凤坤, 康立功. 实时荧光定量 PCR 技术研究进展及其应用[J]. *东北农业大学学报*, 2010, (8): 48-155.
- Chen X, Qi FK, Kang LG. Research progress and application of real time fluorescent quantitative PCR technology [J]. *J Northeast Agric Univ*, 2010, (8): 48-155.

(责任编辑: 姚 菲)

作者简介



甄 珍, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品农产品微生物及转基因检测。
E-mail: 171405573@qq.com