

PCR 结合核酸斑点杂交技术检测转基因番茄研究

梁彦君, 陈文虎, 王梦娜, 许爱霞, 冯俊丽

(浙江理工大学生命科学学院生物工程研究所, 杭州 310018)

摘 要: 基于转基因番茄的安全性评价, 建立健全番茄转基因检测体系尤为迫切。文章采用转基因作物检测常用的传统定性 PCR 技术和核酸斑点杂交技术, 针对转基因番茄中常用的 35S(花椰菜花叶病毒启动子)、NOS(胭脂碱合成酶终止子)、*NPTII*(新霉素转移酶基因)、35S-*EFE*(35S 和番茄 *EFE* 基因的交联结构)、以及 *Lat52*(番茄内参基因), 检测了阳性对照质粒 PBI121、华蕃一号样品和阴性对照合作 903 番茄。从华蕃一号中成功检出 35S、NOS、*NPTII*、35S-*EFE* 和内参基因 *Lat52*, 阴性对照番茄合作 903 中只有内参基因 *Lat52* 检出。试验重复性良好, 检测灵敏度高, 两种方法相互补充, 排除假阳性。核酸斑点杂交一次可检出多个外源基因, 增加了检测通量, 为我国番茄转基因检测提供参考。

关键词: 转基因番茄; 外源基因检测; 定性 PCR 技术; 核酸斑点杂交

中图分类号: Q788

文献标志码: A

0 引 言

番茄是重要的蔬果产品, 我国是番茄出口大国。自 20 世纪 90 年代第一例转基因番茄培育成功以来, 番茄转基因技术发展迅速, 番茄的耐储藏、抗病毒、抗逆性等转基因品系相继培育成功^[1]。1996 年, 我国华中农业大学也成功将番茄中乙烯合成酶基因的反义抑制链导入番茄植株, 培育出我国第一个获准商业化的转基因品种华蕃一号^[2]。然而转基因产品的安全性和合理性一直以来备受争议, 所以围绕转基因植株的外源基因检测方法也备受关注。包括中国在内的多个国家和地区针对转基因产品, 尤其是农产品制定了一系列法律法规, 欧盟国家要求要严格保护消费者的知情权, 对转基因食品明确标识^[3]。此外, 随着人口膨胀, 世界性的粮食问题凸显, 全世界转基因农作物的数量逐年上涨, 包括大豆, 玉米, 番茄, 辣椒, 棉花等作物均有一定数量的种植, 并进入市场^[4]。在生物技术突飞猛进的时代, 相

信会有越来越多的转基因作物问世并进入人们的生活, 因此健全和完善转基因物种外源基因检测体系就显得很有必要^[5]。

目前转基因番茄检测方法中, 大致分为核酸检测方法和蛋白质检测方法两大类^[6]。核酸检测中包括 PCR 技术、real-time PCR 技术、多重 PCR 技术、Northern 杂交技术、基因芯片技术等^[7]。蛋白质检测中主要使用酶联免疫吸附技术。一般根据不同作物选择合适的方法体系。当前转基因番茄检测的方法日趋成熟, 涉及的检测方法基本涵盖了常用的检测技术, 但是在方便性和可靠性等方面仍然需要探索^[8]。本文探究转基因检测方法中的 PCR 和 Northern 斑点杂交技术, 两种技术结合可保证结果的可靠性, 斑点杂交实验中 1 个样品 4 个重复来保证实验的重复性。在同一张膜上同时检出了 3 个外源基因和 1 个种属内参基因, 实现了检测量的优化, 成本较低, 结果可靠性良好, 操作简单, 可以为转基因番茄检测方法提供参考。

收稿日期: 2012-11-28

基金项目: 国家质检总局科研项目(2012IK290)

作者简介: 梁彦君(1987-), 男, 甘肃陇南人, 硕士研究生, 主要从事植物病毒与天然药物生物反应器。

通信作者: 冯俊丽, 电子邮箱: fengjunli0722@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

转基因番茄华蕃一号由华中农业大学提供,合作903番茄为本实验室保存。

1.1.2 试剂

植物基因组提取试剂盒(TianGen公司); TaKaRa Taq™ Hot Start Version(Takara公司); Biotin DecaLabel™ DNA Labeling Kit(Ferments公司); Biotin Chromogenic Detection Kit(Ferments公司); 正电尼龙膜(Hybond-N⁺)。其他酶均购自Takara公司,其他试剂属于自配试剂如SSC,杂交液预杂交液SDS等,药品均为国产分析纯产品。

1.1.3 仪器

PCR仪(BIO-RAD公司); 分子杂交仪(TECHNE公司); 凝胶成像分析系统(TANON公司); 微量紫外分光光度计(Thermo公司)。

1.2 方法

1.2.1 样品基因组DNA提取

两种番茄种子在培养皿中浸泡24 h催芽后种在温室,取3~5叶期番茄的幼嫩真叶100 mg,用植物基因组DNA提取试剂盒提取样品DNA,具体步骤参照试剂盒,提取后0.7%凝胶电泳检测其完整性,并用微量紫外分光光度计得出其在260、280 nm处的OD值,并计算出浓度和纯度。DNA溶液于-20℃保存备用。

1.2.2 引物设计

从NCBI数据库中搜索已经报道的转基因番茄外源基因序列信息,经BLAST后用DNA-star、Megalign等软件比较其序列同源性,筛选出报道的目的片段基因后导入Primer premier 5.0进行引物设计,委托上海生工生物有限公司进行合成。

1.2.3 目的基因的定性PCR扩增检测

用1.2.2中设计的引物对样品DNA进行扩增检测,筛选出了特异性良好的5对引物分别对应于转基因番茄基因组DNA上的5个目的片段,以含有转基因植物常用外源启动子35S(花椰菜花叶病毒启动子),NOS终止子(胭脂碱合成酶终止子)以及标记基因NPTII(新霉素转移酶基因)的质粒PBI121为阳性对照,华蕃一号番茄DNA和阴性对照合作903番茄DNA样品为检测样本进行PCR扩增检测。200 μL薄壁管中依次加入10×Buffer

2.5 μL, dNTP mix 2 μL, 上下游引物各1 μL, 模板1 μL, HS-Taq 0.125 μL, 加ddH₂O至25 μL。反应程序为94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共35个循环, 最后72℃延伸5 min。反应结束后取5 μL, 3%琼脂糖凝胶电泳检测结果。

1.2.4 杂交膜的制备

选用1.2.3中4对引物扩增的产物点膜, 分布情况为: 第1列为35S-EFE, 第2列NOS, 第3列为NPTII, 第4列Lat52, 第5列为空白对照, 每列4个重复, 华蕃一号和合作903各点1张膜。具体制备过程是, 先将膜用灭菌双蒸水浸泡10 min, 再用15×SSC浸泡30 min到2 h, 晾干。将点样用样品沸水浴变性5 min, 冰中速冷, 用铅笔在正电尼龙膜上标好位置并标记, 将样品点在尼龙膜的毛面, 每个样品一般点5 μL(2~10 μg DNA)。样品点好后, 放在干净的滤纸上, 先室温干燥0.5~1 h, 然后在80℃真空干燥固定2 h, 密封保存备用。

1.2.5 生物素探针的制备

选择外源基因引物35S-EFE, NOS, NPTII和内参基因引物Lat52, 分别对华蕃一号样品和合作903番茄样品进行4重PCR扩增标记。扩增产物纯化后, 取10 μL做模板制作生物素标记探针, 具体步骤参照Biotin DecaLabel™ DNA Labeling Kit: 1.5 mL离心管中依次加入DNA模板(PCR产物)10 μL(100~1 000 ng), 5×Reaction buffer 10 μL, ddH₂O 24 μL, 混匀, 离心3~5 s。100℃水浴中煮沸变性5~10 min, 冰水骤冷。再加入Biotin Labeling Mix 5.0 μL, Klenow fragment exo(5U) 1 μL, 混匀, 离心3~5 s, 37℃孵育2~4 h。加入1 μL EDTA(0.5 M, pH 8.0)终止反应, -20℃保存备用。

1.2.6 核酸斑点杂交检测

准备预杂交液: 各组分终浓度: 6×SSC, 0.5% SDS, 5×Denharts液, 50%的去离子甲酰胺。以2×SSC浸膜5 min, 取鲑鱼精DNA, 100℃水浴中煮沸变性10 min, 冰水骤冷。将变性的鲑鱼精DNA加入预杂交液中, 调至终浓度50~100 μg/mL。将湿润的膜放入杂交管, 以20 mL/100 cm²加入预杂交液, 放入杂交炉中42℃预杂交2~3 h。准备杂交液: 生物素标记的探针于100℃水浴变性5 min, 冰水骤冷, 加入到预杂交液中。弃去预交液, 以每100 cm²膜加60 μL的杂交液在杂交炉中42℃杂交过夜。弃去杂交液, 以2×SSC, 0.1% SDS, 室温洗涤2次, 每次10 min, 用滤纸将膜吸干。配置各显

色液和洗脱液,显色反应按 Biotin Chromogenic Detection Kit 试剂盒说明进行,结果为肉眼可见蓝紫色斑点,拍照记录结果,判读杂交结果。

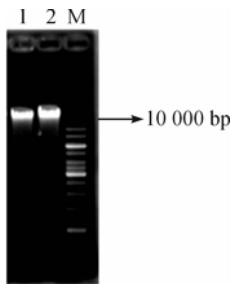
2 结果与分析

2.1 样品 DNA 提取结果

按 1.2.1 中方法提取的基因组 DNA 260 nm、280 nm OD 比值大多为 1.7~1.9 之间,如图 1 所示,0.7%琼脂糖凝胶电泳检测条带清晰,完整性好,经测试其提取浓度为 190~220 ng/ μ L,纯度良好,稀释成约 100 ng/ μ L 的样品可满足后续试验要求。

2.2 引物筛选结果

实验按照 1.2.2 中的方法针对转基因番茄常用的 35S 启动子、NOS 终止子、35S-EFE 交联结构基



M:1 kb DNA Ladder;1:华蕃一号基因组 DNA;
2:合作 903 基因组 DNA

图 1 转基因番茄华蕃一号和合作 903 番茄的 DNA 提取结果
因、标记基因 *NPTII* 以及番茄种属特有的内参基因 *Lat52*,5 个目的基因片段各设计 2~3 对引物,然后测试引物扩增情况,选出特异性好的 5 对引物作为后续实验用引物,筛选的引物信息见表 1。

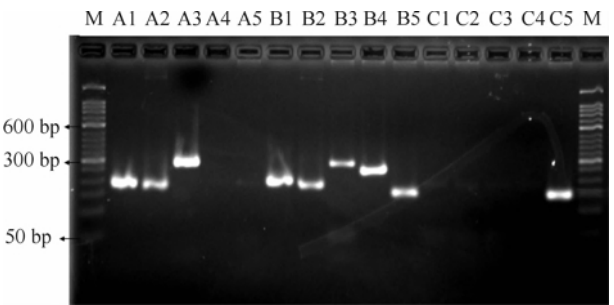
表 1 筛选出的引物序列

扩增基因(序列)	引物名称	引物序列	产物大小
<i>CaMV</i> 35S 启动子	35S-FP	GCTCCTACAAATGCCATCA	195 bp
	35S-RP	GATAGTGGGATTGTGCGTCA	
NOS 终止子	NOS-FP	GAATCCTGTTGCCGGTCTTG	180 bp
	NOS-RP	TTATCCTAGTTTGC GCGCTA	
35S-EFE 交联结构基因	35S-EFE-FP	TGGGATCTAAGCACTTGCAATTGGA	243 bp
	35S-EFE-RP	GCACAAACAGACGGGACACGAAT	
<i>NPTII</i> 新霉素转移酶基因	<i>NPTII</i> -FP	GAAAAATACCGCTGCGTAAAAG	285 bp
	<i>NPTII</i> -RP	TCAGGGCTTTGTTCATCTTCAT	
<i>Lat52</i> 番茄种属内参基因	<i>Lat52</i> -FP	ATGCAGGAACATCAGCACAGAGGC	150 bp
	<i>Lat52</i> -RP	TCTTTGCAGTCCCTCCCTTGGGCTT	

2.3 定性 PCR 检测结果

用表 1 中的 5 对引物按 1.2.3 中的体系程序分别对华蕃一号番茄、合作 903 番茄、以及阳性质粒 PBI121 进行定性 PCR 检测,结果显示:华蕃一号番茄中分别检出 *CAMV*-35S 启动子基因, *NOS* 终止子基因,标记基因 *NPTII*, *35S-EFE* 交联结构基因,以及番茄种属内参基因 *Lat52*,与阳性质粒 PBI121 中的 35S 启动子片段, *NOS* 终止子,标记基因 *NPTII* 基因条带大小相符,而合作 903 中均未检出外源基因,只有番茄种属内参基因 *Lat52* 有扩增。结果表明:PCR 检测华蕃一号和合作 903 番茄目的基因大小符合要求,成功检测出了阳性样品华蕃一号中的几个外源基因片段,以番茄种属内参基因为对照,大大降低了误差,实验重复性良好,可以用来检测其他番茄样品,而阴性对照中未检出转基因成分。以阳性质粒为对照,进一步验证了结果的

可靠性。结果如图 2 所示。



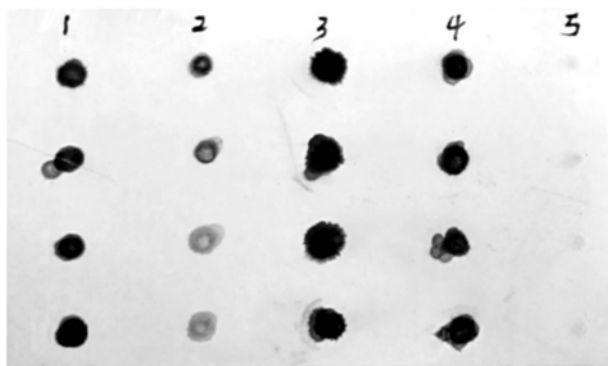
M:50 bp DNA Ladder(Takara 公司);A 系列 PCR 模板为质粒 PBI121;B 系列 PCR 模板为华蕃一号基因组 DNA;C 系列 PCR 模板为合作 903 番茄基因组 DNA。扩增顺序是 1:35S 启动子;2:*NOS* 终止子;3:标记基因 *NPTII*;4:*35S-EFE*;5:种属内参 *Lat52* 基因。

图 2 华蕃一号和合作 903 番茄的定性 PCR 检测结果

2.4 核酸斑点杂交检测结果

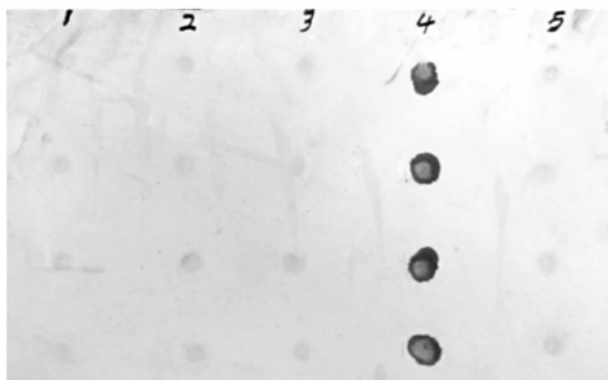
按照 1.2.6 中的杂交方法杂交显色实验完成

后,结果显示:华蕃一号样品对应的膜如图3,第一列 35SEFE 交联结构基因,第二列 NOS 终止子,第三列 NPTII 标记基因;第四列番茄种属内参基因 *Lat52* 的探针。上述4列分别显示出蓝紫色的杂交斑点,第五列空白对照则无结果,4个重复结果大体相同,说明核酸斑点杂交用来转基因检测的方法可行,重复性良好。合作903番茄样品杂交结果如图4,除第四列番茄内参基因 *Lat52* 有蓝紫色杂交斑点外,外源基因(第1~3列)和空白对照(第5列)均未出现蓝紫色杂交斑点。这表明核酸斑点杂交检测转基因成分的可行性,也可作为PCR检测方法的验证手段。



1:35SEFE 交联基因,2:NOS 终止子,3:NPTII 基因,4:内参基因 *Lat52*,5:空白对照。每个基因4个重复。

图3 华蕃一号番茄核酸斑点杂交结果



1:35SEFE 交联基因,2:NOS 终止子,3:NPTII 基因,4:内参基因 *Lat52*,5:空白对照。每个基因4个重复。

图4 合作903番茄核酸斑点杂交结果

3 讨论

用PCR的方法检测样品中的多个基因,几对引物之间的退火温度要尽可能相同,本实验采用的五对引物的退火温度大多控制在56℃左右,这样就保证了它们在同样的PCR体系中能很好地扩增,达到检测目的,用多重PCR方法制备生物素标记探针模板时,选取的四对引物的目的片段大小差异在30 bp

以上,这样能保证它们在同一体系中各自特异性扩增,为后续的标记实验提供保证^[9]。

Hot-starDNA 聚合酶可以消除模板在较低温度或常温下的错误扩增,高温加热前,抗 *Taq* 单克隆抗体与 *Taq* 酶结合,抑制聚合酶的活性,从而抑制低温条件下由引物的非特异性退火或引物二聚体引起的非特异性扩增。PCR反应液在冰中配制,然后置于PCR反应仪上进行PCR反应。这种冷启动法与热启动法相结合,更能有效地减少PCR过程中的非特异性反应,增强PCR扩增的特异性,能得到良好的PCR结果。

杂交探针的准备一定要保证探针的质量,各步骤要严谨操作,以保证后续杂交实验的进行。杂交时间不宜过长,一般最长不要超过20 h,避免背景太深,影响杂交结果。本实验杂交过夜16 h,得到的信号良好。制备杂交膜的时候,多个样品点膜时要避免样品在膜上相互渗透污染,本实验制备的杂交膜无污染,得到的斑点清晰。杂交膜显色时,加显色液和显色的过程要在黑暗的环境中完成,包括显色液要及时在黑暗的条件下配制,这样才能保证显色的结果良好。

转基因作物检测最重要的原则是结果的可靠性,避免假阳性和假阴性结果的出现,这就要求实验要有良好的重复性,另外准确地设置实验对照组也是很重要的^[10]。在检测过程中分别做了重复和对照,实验结果有良好的重复性,对照组和实验组的结果无冲突,验证了结果的正确性。本实验中的定性PCR检测是常规的检测方法,但是要保证结果的准确无误,一定要在实验设计方案中考虑到引物设计,退火温度,最适体系,对照组选择等诸多因素,这样才能保证结果的可信度。本实验遵循了以上原则,很好地验证了传统的PCR在番茄转基因成分检测中的运用价值^[11]。用核酸斑点杂交的方法检测了同一样品中的3个外源基因并以番茄内参基因为对照组基因,得到了良好的结果。核酸斑点杂交试剂用量小,一套试剂盒能检测50~60个样品,是一种比较经济的检测方案,另外一张膜上能检出多个基因也体现了它的优点。两种检测方法相互补充,可以作为转基因番茄转基因成分检测的参考。

转基因检测方法在关注其准确性和便捷性的同时,也需要考虑到其经济实用性和高通量检测能力^[12]。近些年来发展了很多检测手段,比如依据PCR检测方法建立起来的多重PCR,实现了节省试剂和增加检测量的目的,但一个稳定的多重PCR体

系的建立是一个复杂的探索过程。荧光定量 PCR 精确到可以检测出转基因成分的含量,实现检测的精细化,是近年来普遍使用的手段^[13]。随着基因芯片技术的发展,基因芯片用于转基因作物检测也日渐成为现实,基因芯片检测的高通量和准确度都令人信服,在转基因检测中占有很大优势,势必成为以后转基因检测的主流。由于转基因产品的不断产业化加上市场的流通日益加快,探索一种最简单、最便捷、最省时经济的检测方法是以后研究的主要方向,也是科研工作者们面临的挑战。

参考文献:

- [1] Yang L, Shen H, Pan A, et al. Screening and construct-specific detection methods of transgenic Huafan No. 1 tomato by conventional and real-time PCR[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005, 85(13): 2159-2166.
- [2] 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]. Agric Food Chem 2005, 53, 183-190.
- [3] Xu J, Miao H, Wu H, et al. Screening genetically modified organisms using multiplex-PCR coupled with oligonucleotide microarray[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2006, 22(1): 71-77.
- [4] 刘 垣, 郑文杰, 刘 伟, 等. 转基因番茄 DNA 检测芯片的研究[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(4): 109-112.
- [5] 赵 锦, 邓平建, 刘建军, 等. 转基因食品多重定性 PCR 及实时荧光定量 PCR 检测方法的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2004, 14(4): 412-414.
- [6] Elenis D S, Kalogianni D P, Glynou K, et al. Advances in molecular techniques for the detection and quantification of genetically modified organisms [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008, 392(3): 347-354.
- [7] Xu C J, Yang L, Chen K S. Development of a rapid, reliable and simple multiplex PCR assay for early detection of transgenic plant materials [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2005, 27(3): 283-288.
- [8] Rudi K, Rud I, Holck A. A novel multiplex quantitative DNA array based PCR(MQDA - PCR) for quantification of transgenic maize in food and feed[J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(11): e62-e62.
- [9] Guo J, Yang L, Chen L, et al. MPIC: a high-throughput analytical method for multiple DNA targets[J]. Analytical Chemistry-Columbus, 2011, 83(5): 1579-1586.
- [10] 许小丹, 文思远, 王升启, 等. 检测及鉴定 Roundup Ready 转基因大豆寡核苷酸芯片的制备[J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(4): 429-434.
- [11] 许 爽, 褚云霞, 张 辉, 等. 定性 PCR 技术及卡那霉素对 8 个番茄品种的转基因检测[J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(4): 765-769.
- [12] 顾晓敏, 黎事伦, 胡良勇, 等. 转基因番茄及其核酸检测技术研究进展[J]. 中国测试, 2009, 35(6): 81-87.
- [13] Weng H, Yang L, Liu Z, et al. Novel reference gene, high-mobility-group protein I/Y, used in qualitative and real-time quantitative polymerase chain reaction detection of transgenic rapeseed cultivars[J]. Journal of AOAC International, 2005, 88(2): 577-584.

Research on Detection of Transgenic Tomato with PCR in Combination with Nucleic Acid Spot Hybridization Technology

LIANG Yan-jun, CHEN Wen-hu, WANG Meng-na, XU Ai-xia, FENG Jun-li

(Bioengineering Institute, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: It is especially urgent to establish a complete tomato transgenic detection system based on transgenic tomato safety evaluation. This paper detects positive control plasmid PBI121, No. 1 Huafan sample and negative control cooperation 903 tomato with the traditional PCR technology and nucleic acid spot hybridization technology commonly used in detection of transgenic crops in allusion to 35S(cauliflower mosaic virus promoter), NOS(nopaline synthase terminator), *NPTII*(neomycin transferase gene), 35S-*EFE*(35S and cross-linked structure of tomato *EFE* gene) and *Lat52*(tomato reference gene) commonly used in transgenic tomato. 35S, NOS, *NPTII*, 35S-*EFE* and reference gene *Lat52* are detected in No. 1 Huafan and only reference gene *Lat52* is detected in negative control tomato cooperation 903. The test has a good repeatability and high detection sensitivity. Both methods complement each other and eliminate false positive. Nucleic acid spot hybridization can detect multiple foreign genes once and increases the de-

tection flux and provides reference for tomato transgenic detection in China.

Key words: transgenic tomato; exogenous gene detection; qualitative PCR technology; nucleic acid spot hybridization

(责任编辑: 许惠儿)

(上接第 746 页)

Preliminary Research on Synthesis of 10-hydroxycamptothecine Derivative and Its Antineoplastic Activity

CHEN Wen-duo^a, HUANG Yue^a, DONG Miao^a, XU Shao-wei^a, ZHOU Wei^a, TANG Bin^b, XU Tao^a

(a. Bioengineering Institute; b. Xinyuan Institute of Medicine and Biochnology,
Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: To improve the water solubility and stability of 10-hydroxycamptothecine, this research produces camptothecin derivative-10, 20(S)-O-disuccinyl hydroxycamptothecine by synthesizing it with succinic anhydride through esterification, represents the characteristics of the derivation with HNMR and measures the solubility of the derivative with water bath mixing method; detects the growth inhibition of colon cancer cell SW480 by the derivative with MTT colorimetric method; conducts DNA fragmentation analysis on and detects its influence on apoptosis of colon cancer cell line with Hoechst 33342 staining. The result shows that the water solubility(25℃) of the derivative is 2.3 mg, 21.8 times higher than that of 10-hydroxycamptothecine; the growth inhibition of tumour cell depends on dosage/time and its median inhibitory concentration(IC₅₀ value) is 700 nM; agarose gel electrophoresis finds typical DNA scalariform pattern. Hoechst 33342 staining shows that camptothecin derivative can induce cell apoptosis.

Key words: 10-hydroxycamptothecine; 10, 20(S)-O-disuccinyl hydroxycamptothecine; water solubility; apoptosis

(责任编辑: 许惠儿)