

食品中转基因成分检测

第 11 章

实时 PCR 方法定量检测抗农达(Roundup Ready®)转基因大豆

N. Foti



目 录

第 11 章

实时 PCR 方法定量检测抗农达® (Roundup Ready®) 转基因大豆

实验部分	3
引言	3
应用 ABI PRISM® 7700 系统的实时 PCR	3
应用 LightCycler® (Roche) 系统的实时 PCR	8
参考文献	15

实验部分

引言

以下程序适合于实时定量 PCR 的方法定量检测原材料以及加工材料中转基因大豆品系 (抗农达®大豆—**Roundup Ready® soybean**)。实时定量 PCR 方法采用两种不同的 PCR 热循环仪, 通过测量荧光值来实时检测目标基因的扩增, 使用的两种仪器分别是: ABI PRISM® 7700 序列检测系统 (Applied Biosystems) 和 LightCycler® (Roche)。

实时 PCR 分别用于扩增内源参照 DNA 靶序列 (对大豆是唯一的), 和转基因大豆品系 (抗农达®大豆) 特异性 DNA 靶序列。

定量检测过程依赖于两个独立的 PCR 体系, 每一个 PCR 体系都有特异的 DNA 引物和荧光标记的探针。其中的一个 PCR 体系检测转基因特异性 DNA 靶序列, 另一个 PCR 体系检测内源参照 DNA 序列用于检测转基因和非转基因大豆的定量参照。

注: 本手册中的操作程序选择用于教学目的, 应当作为实时 PCR 方法定量检测转基因作物的基本范例, 建议大家定期查阅相关资料以及文献来获取关于定量检测方法的最新发展和验证的信息, 同时请注意根据实验室现有仪器设备选择适当的操作程序。JRC 和 WHO 决不提倡专门使用任何特定公司和品牌的仪器。

应用 ABI PRISM® 7700 系统的实时 PCR

抗农达®转基因大豆特异性实时 PCR 检测程序: 复合 PCR 方法

此程序采用复合 PCR 的分析方法 (同一反应管中同时发生两个 PCR 反应), 扩增/定量大豆内源参照基因 *Lectin* 和抗农达®转基因大豆嵌入框的部分序列 (Onori 等提交)。lectin 和 RR 的 TaqMan 探针分别采用 VIC 染料和 FAM 染料标记, 使其可以在同一反应管中同时检测到多个的目标扩增。报告染料 FAM 与 VIC 不同之处在于它们最大发射波长不同。ABI PRISM® 7700 序列检测系统可以检测到具有不同发射波长的多种荧光染料。

在每个样品中, 抗农达®转基因大豆标记染料 (FAM) 的量以检测的植物材料标记染料 (VIC) 的量为基准, 进行标准化处理。取重复样品的 C_T 平均值, 得到 ΔC_T 值, 此 Δ

C_T 值与已知抗农达®转基因大豆浓度标准品的 ΔC_T 值产生的标准曲线进行比较 (比较 C_T 值的方法或称 $\Delta\Delta C_T$)。

该方法已成功应用于各种含有大豆原料、大豆成分以及大豆食品 (如: 饲料、豆制品、酸奶、豆粉、卵磷脂等) 等样品的检测。

此定量方法的性能已成功地在许多能力测试项目中得到了验证 (如: FAPAS®、GIPSA)

仪器和试剂

- ABI PRISM®7700 序列检测系统 (生物应用系统公司)
- 96 孔微量扩增光学反应板 (Cat No. N801-0560)
- MicroAmp Optical caps (Cat No. N801-0935)
- 2×Taqman® 通用 PCR 反应混和体系 (Cat No. 4304437) 包含: 2×TaqMan 缓冲液 AmpliTaq Gold®DNA 聚合酶 (5 U/ μ l)、AmpErase® UNG (1 U/ml)、dNTPs 200 μ M (含 dUTP)、阴性 (passive) 参照 1
- 微量离心机
- 15 ml 锥形管冷冻离心机
- 微量移液器
- 涡旋混合器
- 反应管架
- 1.5 ml 微量离心管
- 15 ml 聚丙烯锥形离心管
- 去核酸酶水
- 参照基因特异性引物 (Le-F 和 Le-R) 和探针 (Le-探针)

- 插入基因特异性引物 (RR-F 和 RR-R) 和探针 (RR-探针)

参照基因引物和探针

	长度 (bp)	分子量	序列
Le-F	19	5586.0	TCC ACC CCC ATC CAC ATT T
Le-R	24	7532	GGC ATA GAA GGT GAA GTT GAA GGA
Le-探针	23	7019.0	5'-(VIC)-AAC CGG TAG CGT TGC CAG CTT CG- (TAMRA) -3'

插入基因引物和探针

	长度 (bp)	分子量	序列
RR-F	23	7014	GCC ATG TTG TTA ATT TGT GCC AT
RR-R	25	7712	GAA GTT CAT TTC ATT TGG AGA GGA C
RR-探针	33	10137	5'-(FAM)-CTT GAA AGA TCT GCT AGA GTC AGC TTG TCA GCG-(TAMRA)-3'

反应混合体系配制

- 首先将反应试剂解冻，按反应要求的量轻轻混匀反应各组分并轻微离心，始终将解冻的试剂置于冰上。
- 在冰上放置一个 15 ml 离心管中，按下面提到的顺序 (DNA 除外) 依次加入以下成分，配制反应混和体系。每一个 DNA 提取样品重复检测三次。请注意，考虑到由于溶液粘性造成的移液误差，应配制四个以上的反应所需的反应混合液。

表 1. 复合 PCR 检测的反应混合体系配制

	PCR 反应中各 成分终浓度	每个反应管 混合体系 (μ l)	每个样品混合 体系 (三个重 复) (μ l)	混合体系总体 积 (32+4 样品) (μ l)
灭菌去离子水		18.3	54.9	1976.4
2 \times TaqMan 通用反应混 合液	1 \times	25	75	2700
Le-F 引物 (20 μ M)	40 nM	0.1	0.3	10.8
Le-R 引物 (20 μ M)	40 nM	0.1	0.3	10.8

RR-F 引物 (20 μ M)	100 nM	0.25	0.75	27
RR-R 引物 (20 μ M)	100 nM	0.25	0.75	27
Le 探针 (10 μ M)	100 nM	0.5	1.5	54
RR 探针 (10 μ M)	100 nM	0.5	1.5	54
DNA	50-250 ng	5	15	
总体积		50	150	

- 将配制好的混合液轻轻混匀并轻微离心。
- 对每一个待测的 DNA 样品准备一个 1.5 ml 微量离心管，包括：绘制标准曲线样品 (0.1%、0.5%、1%、2% 和 5% 的 CRM-RR 大豆)、未知浓度样品、对照样品 (0% RR 大豆、RR 大豆 DNA 和无模板对照)。
- 向每个 1.5 ml 微量离心管中加入 3 个重复所需的混合体系溶液(135 μ l 混合液)。然后每管加入 3 个重复所需的 DNA 量 (即, 15 μ l DNA)。涡旋混合至少三次，每次大约 10 s。这一步骤是非常重要的，因为这样有助于把每个样品重复之间的差异减少到最小。
- 用离心机将混合液轻微离心。在冰上放一块 96 孔反应板，放平，按水平方向从左到右的顺序，每孔加入 50 μ l 反应混合液，都加好之后，用装盖工具盖上光学盖。

注意：不要在光学板上写字，并且不要触摸光学盖。

- 确保所有分装的混合液都在每个孔的底部，壁上或盖子上无残液或气泡。
- 将反应板置于 ABI PRISM® 7700 仪器上，打开一个新的设置窗口编排每一孔中的样品类型：IPC 样品使用 VIC 荧光探测通道，UNKM 样品使用 FAM 荧光探测通道。
- 样品的 PCR 扩增程序依照表 2 所述。

表 2. ABI PRISM®7700 定量检测抗农达®转基因大豆的复合 PCR 扩增程序

设置：实时 PCR 模式

50 μ l 反应体积

步骤	进程	温度 $^{\circ}$ C	时间	产物	循环数
1	UNG	50 $^{\circ}$ C	120 s	无	1
2	预变性	95 $^{\circ}$ C	600 s	无	1
3	扩增 变性	95 $^{\circ}$ C	15 s	无	45
4	退火 延伸	60 $^{\circ}$ C	60 s	测量荧光值	

数据分析和结果解释

实时 PCR 运行结束后，用 ABI PRISM® 7700 序列检测系统软件对所得数据进行分析，获得每一样品的每一个报告染料的 C_T 值。

在序列检测系统软件设立窗口中，应该给每个样品进行编号，相同样品的重复应当给与相同的编号。

通过选择分析菜单中的“analyse”进入自动评估扩增标绘点窗口，调整 FAM 和 VIC 层的域值。

在运行分析后，输出 Excel 文档的结果，在 Excel 表格中打开输出的结果文档，可以看到一个表格，含有两组分别对应于 FAM 和 VIC 染料层上每个样品的 C_T 值数据。

计算每一组重复的 C_T (FAM) 和 C_T (VIC) 值差的平均值得到 ΔC_t 值 ($C_{T\text{FAM}} - C_{T\text{VIC}}$)

对于每一个样品，转基因的百分含量是将样品的 ΔC_T 值与标准品的浓度的对数和 ΔC_T 值之间的关系相比较，然后通过计算获得的。

应用 LightCycler® (Roche) 系统的实时 PCR

抗农达®转基因大豆特异性实时 PCR 检测程序

此方法包括扩增/定量大豆内源参照基因 *Lectin* 和抗农达®转基因大豆嵌入框的部分序列。扩增在两个独立的 PCR 反应 (BgVV, EU Tender Report, 2000) 中进行。两个 PCR 体系都采用 FAM 荧光标记探针。

对于每一个样品, 转基因大豆特异性序列的量和参照基因序列 (*Lectin* 基因) 的量可以分别通过其各自的标准曲线进行确定。转基因大豆含量是由转基因大豆特异性序列的量除以参照基因的量, 得到转基因大豆相对含量。

仪器和试剂

- Roche LightCycler®系统
- LightCycler® Sample Capillaries。Roche, Cat No. 1909339
- LightCycler®Capillaries Adapter。Roche, Cat No. 1909312
- LightCycler® FastStart DNA Master 杂交探针。Roche, Cat No 3003248 含有: FastStart Taq DNA 聚合酶, dNTP 混和物 (dUTP 代替 dTTP) 和反应缓冲溶液 10×conc., PCR 级别无菌水
- 无核酸酶 (无 DNase & RNase) 的牛血清蛋白 (BSA), 如: Promega Cat No R9461 (1µg/µl)
- Platinum Taq DNA 聚合酶 5 U/µl (同开始的 10×缓冲溶液和 50 mM MgCl₂ 是一起的), Invitrogen-Life Technologies Cat No 10966026
- 微量离心机
- 微量移液器
- 涡旋混合器

- 反应管架
- 1.5 ml 微量离心管
- 去无核酸酶水
- 参照基因特异性引物 (GM1-F, GM1-R) 和探针 (GM1-探针)
- 转基因特异性引物 (GM2-F, GM2-R) 和探针 (GM2-探针)

参照基因引物和探针

	序列
GM1-F	5'-CCA GCT TCG CCG CTT CCT TC-3'
GM1-R	5'-GAA GGC AAG CCC ATC TGC AAG CC-3'
GM1-探针	5'-(FAM)-CTT CAC CTT CTA TGC CCC TGA CAC-(TAMRA)-3'

转基因引物和探针

	序列
GM2-F	5'-CAT TTG GAG AGG ACA CGC TGA-3'
GM2-R	5'-GAG CCA TGT TGT TAA TTT GTG CC-3'
GM2-探针	5'-(FAM)-CAA GCT GAC TCT AGC AGA TCT TTC (TAMRA)-3'

标准曲线

在每一次 PCR 操作中, 5 个梯度的 DNA 标准稀释浓度作为 PCR 检测的模板, 分别使用内标基因和外源基因两种反应混和体系进行反应, 得到两条标准曲线。

用 TE 缓冲液 (0.1 M, pH 8.0) 稀释浓度为 2% 的抗农达®转基因大豆, 配置浓度梯度标准 DNA 溶液, 分别构建大豆总 DNA 和转基因 DNA 定量的标准曲线, 标准曲线第一个点的 DNA 浓度大约为 100 ng, 表 3 中总结了标准曲线中各点的 DNA 的浓度和稀释:

表 3. 标准曲线中各点 DNA 的量和稀释

	DNA 量 (ng) / 反应	大豆 DNA%	转基因 DNA%	稀释倍数
STD1	100	100	2	
STD2	50	50	1	1: 2
STD3	25	25	0.5	1: 4
STD4	12.5	12.5	0.25	1: 8
STD5	6.25	6.25	0.125	1: 16

混合体系配制

- 首先将反应试剂解冻，按反应要求的量轻轻混匀反应各组分并轻微离心，始终将解冻的试剂置于冰上。
- 在冰上放置一个 15 ml 离心管中，按下面提到的顺序 (DNA 除外) 依次加入以下成分，配制反应混和体系。请注意，考虑到由于溶液粘性造成的移液误差，反应混合液应配制比所需反应数多两个以上。

表 4. GM1 体系反应混合体系的配制

成分	PCR 反应终浓度	反应体积 (μl)	总体积 (18 个反应)
10× Platinum <i>Taq</i> 聚合酶缓冲溶液	1×	2	36
MgCl ₂ (50 mM)	4 mM	1.6	28.8
dATP、dGTP、dCTP、dTTP (4 mM)	0.8 mM	4	72
GM1-F 引物 (20 μM)	500 nM	0.5	9
GM1-R 引物 (20 μM)	500 nM	0.5	9
GM1 探针 (10 μM)	200 nM	0.4	7.2
无核酸酶 BSA (1 μg/μl)	0.1 mg/ml	2	36
Platinum <i>Taq</i> 聚合酶 (5 U/μl)	0.8 U	0.16	2.9
去核酸酶水	#	6.85	123.5
DNA		2	
总体积		18 μl+2 μl DNA	324.2 (w/o DNA)

表 5. GM2 体系反应混合体系的配制

成分	PCR 反应浓度	反应体积 (μl)	总体积 (18 个反应)
10× Platinum <i>Taq</i> 聚合酶缓冲溶液	1×	2	36
MgCl ₂ (50 mM)	4 mM	1.6	28.8
dATP、dGTP、dCTP、dTTP (4 mM)	0.8 mM	4	72
GM2-F 引物 (20 μM)	500 nM	0.5	9
GM2-R 引物 (20 μM)	500 nM	0.5	9
GM2 探针 (10 μM)	200 nM	0.4	7.2
无核酸酶 BSA (1 μg/μl)	0.1 mg/ml	2	36
Platinum <i>Taq</i> 聚合酶 (5 U/μl)	0.8 U	0.16	2.9
去核酸酶水	#	6.85	123.5
DNA		2	
总体积		18 μl+2 μl DNA	324.2 (w/o DNA)

- 将配制好的混合液轻轻混匀并轻微离心
- 准备两个 0.5 ml 微量离心管 (分别用于 GM1 和 GM2 PCR 检测系统), 用于每一个待测 DNA 样品 (标准曲线样品和未知样品)
- 向每管中加入两个重复所需的混合体系溶液(36 μl 混合液)。然后每管加入 2 个重复所需的 DNA 量 (即: 4 μl DNA)。每管涡旋混合至少三次, 每次大约 10 s。这一步骤是非常重要的, 因为这样有助于把每个样品重复之间的差异减少到最小值
- 将毛细管置于预冷的离心机上
- 根据提供的方案向每个毛细管中移取 20 μl 的混合体系液。(见表 6 “Plate set up-loading order”-Standard LightCycler® carousel)
- 在微型离心机上低速离心 (1150 rpm)。这一步骤是为了保证反应混合物中的所有成分都进入毛细管底部。
- 将毛细管移至 LightCycler® (Roche) carousel

- 样品的 PCR 扩增循环程序依照表 7 所述

表 6. 板孔位置设置-LightCycler® carousel-loading order: 位置 1 到 16 为 GM1 体系, 位置 17 到 32 为 GM2 体系。每个参照基因和转基因的 DNA 样品都要重复。

位置	样品 (%)	位置	样品 (%)	位置	样品 (%)
1	STD (100)	13	U2	25	STD (0.125)
2	STD (100)	14	U2	26	STD (0.125)
3	STD (50)	15	NTC	27	U1
4	STD (50)	16	NTC	28	U1
5	STD (25)	17	STD (2)	29	U2
6	STD (25)	18	STD (2)	30	U2
7	STD (12.5)	19	STD (1)	31	NTC
8	STD (12.5)	20	STD (1)	32	NTC
9	STD (6.25)	21	STD (0.5)		
10	STD (6.25)	22	STD (0.5)		
11	U1	23	STD (0.25)		
12	U1	24	STD (0.25)		

表 7. LightCycler® 系统 PCR 扩增循环程序

设置: 所有步骤升降温设定为 20 °C/s

荧光显示模式: F1/I

变性:

循环数	1						
类型	无	荧光显示模式			F1/1		
阶段序号	温度	时间	升降温速度	2° 目标温度	Step Size	步骤延时 (循环数)	产物模式
1	96°C	120 s	20°C/s	0°C	0°C	0	无

循环:

循环数	45						
类型	定量	荧光显示模式			F1/1		
阶段序号	温度	时间	升降温速度	2° 目标温度	Step Size	步骤延时 (循环数)	产物模式
1	95°C	5 s	20°C/s	0°C	0°C	0	无
2	60°C	15 s	20°C/s	0°C	0°C	0	单
3	72°C	15 s	20°C/s	0°C	0°C	0	无

冷却:

循环数	1						
类型	无	荧光显示模式			F1/1		
阶段序号	温度	时间	斜率	2° 目标温度	Step Size	步骤延时 (循环数)	产物模式
1	40°C	30 s	20°C/s	0°C	0°C	0	无

运行期间, 点击 **EDIT SAMPLE (样品编辑)** 键可编辑样品名。定义所有的位置的样品为 “Unknowns” (包括校准 DNA)

数据分析及结果解释

- 在数据分析前置窗口上选择 ‘FluorescenceF1/F2’ , 进行数据分析。

- 点击 quantification (定量) 键进行定量设置。
- LightCycler®软件提供了两种不同的定量方法：“Second Derivative Maximum”法和“Fit Point”法。“Fit Point”的方法更适合于采用 RR-大豆 DNA 检测试剂盒进行定量，使用下列的设置：baseline adjustment (基线校准) 设置为“Proportional (按比例)”；number of points (点数) 设置为 2。
- 标出标准曲线及所有相应的未知反应
- 打开菜单“Step2: Noise Band (步骤 2, 噪音限)”
- 将 noise band (噪音限) 移至 0.1 的位置。Noise Band 可以用鼠标手动移动，也可以按“Change Graph Settings”键，按这个键会跳出“Manual Cursor Adjustment”窗口，光标值可以由 0.1 定义
- 打开菜单“Step3: Analysis (步骤 3: 分析)”
- 在“Step 3: Analysis”中，可计算出校准标准及未知 DNA 模板的交叉点和相应浓度。
- 对照标准曲线的 r 值， $r \geq -0.98$ 是可接受的，最理想的 r 值=-1

参考文献

- EU Tender Report. (2000). Development of qualitative as well as quantitative detection methods to identify a genetic modification in soybean and maize products. *Report of the EU tender n. XXIV/98/A3/001*.
- LightCycler® Operator's Manual, version 3.0 (Roche Molecular Biochemicals).
- User Bulletin #2. Relative quantitation of gene expression. ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System. PE Applied Biosystems, 1997.
- User Bulletin #5. Multiplex PCR with TaqM VIC probes .ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. PE Applied Biosystems, 1998.
- Onori, R., Foti, N., Donnarumma, E., and Miraglia, M. Real-Time PCR "Multiplex" Method for the Quantification of Roundup Ready soybean in processed food. *European Food Research and Technology Journal* (submitted).