

# 食品中转基因成分检测

## 第 8 章

### 定性 PCR 系统的特征描述

**M. Querci, M. Mazzara**



## 目 录

## 第 8 章

## 定性 PCR 系统的特征描述

手册中所描述的定性 PCR 系统的特征	3
植物特异性 PCR	3
<i>lectin</i> 基因的检测	3
<i>zein</i> 基因的检测	3
筛选方法: CaMV 35S 启动子和 <i>nos</i> 终止子的检测	3
CaMV 35S启动子的检测	4
<i>nos</i> 终止子的检测	5
转基因特异性 PCR	6
特异性检测 Roundup Ready®大豆的 CTP/EPSPS 基因框	6
玉米 Bt-176 中人工合成的 <i>cryIA(b)</i> 基因的检测	6
特异性检测玉米 MON810 的 E35S 启动子/hsp70 外显子-内含子框	8
参考文献	10

## 手册中所描述的定性 PCR 系统的特征

在转基因检测过程中可以应用不同的检测系统：1) 植物-特异性引物用于确定从样品中提取的 DNA 的存在及其质量 (可扩增性)；2) “筛选方法”是基于对最常用的调控序列的特异性检测：比如 35S 启动子和 nos 终止子。这两种方法可以按照简单的 PCR 操作程序进行。最后，GMO-特异性引物将被用于“巢式 PCR”来选择性地检测和鉴定不同的转基因品系。本章简要地介绍了用于检测和描述农达® (Roundup Ready®) 除草剂大豆、MON810 玉米和 Bt-176 玉米中的 *cryA(b)*基因的不同系统，关于引物序列及其组成的更多信息见第 9 章。

## 植物特异性 PCR

### *lectin* 基因的检测

引物 **GMO3** 和 **GMO4** (Meyer *et al.*, 1996)，可以用来鉴定大豆 DNA，该引物对的扩增产物是大豆特异性 *lectin (Le1)* 基因的一个片段。

如上所述，检测的目的是为了确定从含有大豆的样品中提取的 DNA 及其质量，这里所说的 DNA 质量通过 PCR 的可扩增性来确定。根据 Meyer 和 Jaccaud (1997) 的报道，对于从加工食品中提取的 DNA，我们使用引物 **GMO3** 和 **GMO4**，用于巢式 PCR 第二轮大豆-PCR 检测，预期可扩增到 **118 bp** 大小的产物。

### *zein* 基因的检测

玉米 *zein* 基因 (*Zel*，编码一个 10 kb 的蛋白) 特异性引物 **ZEIN3** 和 **ZEIN4** (Studer *et al.*, 1997) 将用于确认从含有玉米样品中抽提的 DNA 及其质量。至于 *zein* 基因，最初设计引物 **ZEIN3** 和 **ZEIN4** 是用于巢式 PCR 中作为内部引物 (第二轮 PCR) 来检测从加工食品中抽提的玉米 DNA。如果提取的目的 DNA 是存在的、且完整、可扩增，那么我们可期望扩增得到一个 **277 bp** 的片段。

## 筛选方法：*CaMV 35S* 启动子和 *nos* 终止子的检测

通过 PCR 方法检测 35S 启动子和 *nos* 终止子就是所谓的“筛选方法”，该方法用于鉴定转基因植物食品。采用 35S 启动子和 *nos* 终止子用做目的序列可用于检测大多数的转基因食品，因为到目前为止，它们几乎存在于所有欧盟批准的转基因植物中 (Hemmer, 1997)。在表 1 中列出了一些批准进入欧盟市场的商业化转基因玉米品系的特征。在此过程中，使用 35S 启动子和 *nos* 终止子来验证用于检测加工食品组分中农达® (Roundup Ready®) 除草剂大豆和 Maximizer 玉米 (Bt-176) 成分的 PCR 方法 (lipp *et al.*,2001)。

表 1.批准进入欧盟市场的一些商业化转基因玉米品系的特征

名称	研发公司	特性	启动子	导入基因	终止子
			<b>35S</b>	<i>Bar</i>	35S
<b>Event176</b>	Ciba-Geigy	Bt,bar	PEPC	<i>cryIA(b)/int.9PEPC</i>	35S
			CDPK	<i>cryIA(b)/int.9 PEPC</i>	35S
<b>Bt-11</b>	Novartis	Bt, pat	<b>35S</b>	<i>cryIA(b)/int. IVS6</i>	<b>nos</b>
<b>T25</b>	AgrEvo	pat	<b>35S</b>	<i>pat</i>	35S
<b>MON810</b>	Monsanto	Bt	<b>E35S</b>	<i>cryIA(b)/int.hsp70</i>	-
			<b>E35S</b>	<i>cryIA(b)/int.hsp70</i>	-

### CaMV 35S启动子的检测

这个启动子调控许多转基因植物基因的表达，如农达® (Roundup Ready®) 除草剂大豆和玉米Bt-176。对于它的特异性检测，可用引物et al., 2001)。预期的扩增片段大小为**123 bp**，如下图1中所显示的序列，在这个序列中，引物 p35S-cf3 和 p35S-cr4位于CaMV35S启动子序列的相应区域。

ID A18053\_3; parent: [A18053](#)

AC A18053;

FT promoter 396..1779

FT /note="35S3 promoter sequence derived from cauliflower

FT mosaic virus isolate CabbB-JI"

SQ Sequence 1384 BP;

```

nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
1140
ctgccgacag tggtcceaaa gatggacccc cacccacgag gagcatcgtg gaaaaagaag
1200
acgttccaac cacgtcttca aagcaagtgg attgatgtga catctccact gacgtaaggg
1260
atgacgcaca atcccactat ccttcgcaag acccttctc tatataagga agttcattc

```

```

1320                                     p35S-cr4
      atttgagag_gacacgctga aatcaccagt ctctctctat aaatctatct ctctctctat
1380
      aacc
1384
//

```

图 1. 花椰菜花叶病毒 (CaMV) 35S 启动子的部分序列以及引物 p35S-cf3 和 p35S-cr4 的杂交位点。

### *nos* 终止子的检测

引物 **HA-*nos*118-f** 和 **HA-*nos*118-r** (Lipp *et al.*, 2001) 可用于检测 *nos* 终止子。这个终止子存在于抗农达® (Roundup Ready®) 除草剂大豆以及其它的转基因植物中 (如: 玉米 Bt-11)。*nos* 终止子的扩增可产生一个 **118 bp** 的 DNA 片段。如图 2 中显示, 引物 HA-*nos*118-f 和 HA-*nos*118-r 位于抗农达® (Roundup Ready®) 除草剂大豆的转基因序列内部。

来自孟山都公司 (Monsanto) 的抗农达® (Roundup Ready®) 除草剂大豆

根据专利 WO 92/04449 获得的转基因部分的序列

```

                                             HA-nos118-r >
151   nnnnnnnnnn nnnnnnnnga tccccgatct agtaacatag atgacaccgc
201   gcgcgataat ttatcctagt ttgcgcgcta tattttgttt tctatcgcgt
                                             < HA-nos118-f
251   attaaatgta taattgcggg actctaataca taaaaccca tctcataaat
301   aacgtcatgc attacatggt aattattaca tgcttaacgt aattcaacag
351   aaattatatg ataatcatcg caagaccggc aacaggattc aatcttaaga
//

1601  gatccaggtg tcgccttctt tacggatcct ggcgcccatt gcctgcatgg
1651  ccttgcccgt attgatgacg tctctgcctt ccagaaggcc ggtgatgcgc
                                             GMO9 >
1701  gtttcaccgc tcgcgagacc gccgaacatg aaggaccggt gggagatcga
1751  cttgtcgccg ggaatgcgga cggttccgga aaggccagag gatttgcggg
1801  cggttgcggg ccggctgctt gcaccgtgaa gcatgcaggc tgtagccact
1851  gatgctgaaa tctaaagga acaaaacttt tgcataaaaa ttgaatcttt
1901  tttcaaaacc aacatagaat ttgctgaatt tttcagtttt ttagatccaa

```

```

1951      aaacaagaaa acttgaagat ttaggaactt ggggtttatg gaaattggaa
2001      ttgggattaa gggtttgat cccttgagcc atgttgtaa tttgtgcat
2051      tcttgaaaga tctgctagag tcagcttgc agcgtg tcct ctccaatga
2101      aatgaacttc cttatataga ggaaggg tct tgcgaaggat agtgggattg
2151      tg cgtcaccc cttacgtcag tgg agatattc acatcaat cc acttgctttg
2201      aagacgtgg tggaacgtct tctttttcca cgatgctcct cgtgggtggg
2251      ggtccatctt tgggaccact gtcggcagag gcatcttcaa cgatggcctt
2301      tcctttatcg caatgatggc atttgtagga gccaccttcc tttccacta
2351      tcttcacaat aaagtgacag atagctgggc aatggaatcc gaggaggtt
2401      ccgatatta ccctttgttg aaaagtctca catcg

```

图 2. 孟山都公司 (Monsanto) 的抗农达® (Roundup Ready®) 大豆中转基因部分的序列。

序列来源于专利 WO 92/04449

## 转基因特异性 PCR

设计扩增引物用于鉴定抗农达® (Roundup Ready®) 除草剂大豆、Bt-176 玉米和 MON810 玉米品系。这些引物的设计要能够分别检测到插入农达® (Roundup Ready®) 除草剂大豆、Bt-176 玉米和 MON810 玉米基因组中的特异性基因结构。

### 特异性检测抗农达® (RoundupReady®) 大豆中 CTP/EPSPS 基因框

通过巢式PCR, 设计一对引物GMO9/GMO5 和 GMO8/GMO7用于特异性检测抗农达® (Roundup Ready®) 转基因大豆 (Meyer 和 Jaccaud, 1997)。外部引物**GMO9** 和 **GMO5**互补于CP4 EPSPS 基因和CaMV 35S启动子的DNA序列。这两个引物的扩增DNA将产生**477 bp**的片段。内部引物**GMO8** 和 **GMO7**互补于epsps矮牵牛花基因和CaMV 35S 启动子的DNA序列, 这些内部引物的扩增DNA将产生一个**169 bp**的片段, 如图2所示。

### 玉米 Bt-176 中人工合成的 cryIA(b) 基因的检测

设计引物对CRYIA1/CRYIA2 和CRYIA3/CRYIA4, 通过巢式PCR特异性检测人工合成的*cryIA(b)*基因 (Studer等, 1997)。外部引物CRYIA1 和 CRYIA2, 以及内部引物CRYIA3 和CRYIA4互补于*cryIA(b)* 基因的DNA序列。如图3所示, 两个外部引物(CRYIA1/CRYIA2) 扩增一个**420 bp**的片段, 而内部引物CRYIA3 /CRYIA4则扩增一个**189 bp**的片段。

```
ID I41419 standard; DNA; UNC; 1947 BP.
AC I41419;
.....
DE Sequence 3 from patent US 5625136.
.....
RA Koziel M.G., Desai N.M., Lewis K.S., Kramer V.C., Warren G.W., Evola
S.V.,
RA Crossland L.D., Wright M.S., Merlin E.J., Launis K.L., Rothstein S.J.,
RA Bowman C.G., Dawson J.L., Dunder E.M., Pace G.M., Suttie J.L.;
RT "Synthetic DNA sequence having enhanced insecticidal activity in maize";
RL Patent number US5625136-A/3, 29-APR-1997.
.....
FT source 1..1947
FT /db_xref="taxon:12908"
FT /organism="unclassified"

SQ Sequence 1947 BP; 412 A; 729 C; 528 G; 278 T; 0 other;
   atggacaaca accccaacat caacgagtgc atcccctaca actgcctgag caaccccgag
60   gtggaggtgc tgggcggcga ggcgcatcgag accggctaca ccccatcga catcagcctg
120   agcctgacc agttcctgct gagcgcagttc gtgcccggcg cggccttctg gctgggcctg
180   gtggacatca tctggggcat cttcggcccc agccagtggg acgccttct ggtgcagatc
240   gagcagctga tcaaccagcg catcgaggag ttcgcccgca accaggccat cagccgcctg
300   gagggcctga gcaacctgta ccaaacttac gccgagagct tccgcgagtg ggaggccgac
360   cccaccaacc cgccttgcg cgaggagatg cgcattcagt tcaacgacat gaacagcgcc
420   ctgaccaccg ccatccccct gttcgccgtg cagaactacc aggtgcccct gctgagcgtg
480   tacgtgcagg ccgccaacct gcacctgagc gtgctgcgcg acgtcagcgt gttcggccag
540   cgctggggct tcgacgccgc caccatcaac agccgctaca acgacctgac ccgcctgatc
600   ggcaactaca ccgaccacgc cgtgcgctgg tacaacaccg gcctggagcg cgtgtgggggt
660   cccgacagcc gcgactggat caggtacaac cagttccgcc gcgagctgac cctgaccgtg
720   ctggacatcg tgagcctggt cccaactac gacagccgca cctaccccat cgcaccgtg
780   agccagctga cccgcgagat ttacaccaac cccgtgctgg agaacttca cggcagcttc
```

```

840      cgcggcagcg cccagggcat cgagggcagc atccgcagcc cccacctgat ggacatcctg
900      aacagcatca ccatctacac cgacgcccac cgcggcgagt actactggag cggccaccag
960      atcatggcca gccccgtcgg cttcagcggc cccgagtca ccttccccct gtacggcacc
1020      atgggcaacg ctgcacctca gcagcgcac gtggcacagc tgggccaggg agtgtaccgc
1080      accctgagca gcaccctgta cgtcgacct ttcaacatcg gcatcaacaa ccagcagctg
1140      正向引物CRYIA3
      agcgtgctgg acggcaccga gttcgctac ggcaccagca gcaacctgcc cagcgccgtg
1200      taccgcaaga gcggcacctg ggacagcctg gacgagatcc cccctcagaa caacaacgtg
1260      反向引物CRYIA4
      ccacctcgac agggcttcag ccaccgtctg agccacgtga gcatgttccg cagtggcttc
1320      agcaacagca gcgtgagcat catccgtgca cctatgttca gctggattca ccgcagtgcc
1380      gagttcaaca acatcatccc cagcagccaa atcaccaga tccccctgac caagagcacc
1440      反向引物CRYIA2
      aacctgggca gcggcaccag cgtggtgaag ggccccggct tcaccggcgg cgacatcctg
1500      cgccgcacca gccccggcca gatcagcacc ctgcgcgtga acatcaccgc cccctgagc
1560      cagcgctacc gcttcgcat ccgctacgcc agcaccacca acctgcagtt ccacaccagc
1620      atcgacggcc gccccatcaa ccagggcaac ttcagcgcca ccatgagcag cggcagcaac
1680      ctgcagagcg gcagcttccg caccgtgggc ttcaccaccc cttcaactt cagcaacggc
1740      agcagcgtgt tcacctgag cgcaccagtg ttcaacagcg gcaacgaggt gtacatcgac
1800      cgcacagagt tcgtgcccgc cgaggtgacc ttcgaggccg agtacgacct ggagagggct
1860      cagaaggccg tgaacgagct gttcaccagc agcaaccaga tcggcctgaa gaccgacgtg
1920      accgactacc acatcgatca ggtgtag

```

图 3. 玉米 Bt-176 中优化的 *cryIA(b)* 基因：根据美国专利 No 5625136 和 Genbank 数据库 (编号 No 141419)，获得的 *cryIA(b)* 基因 SEQ ID No. 3 的序列，

### 特异性检测玉米 MON810 中的 E35S 启动子/hsp70 外显子-内含子框

设计引物对 mg1/mg2 和 mg3/mg4，用于巢式 PCR 特异性检测 E35S/hsp70 外显子-内含子 1 基因框 (Zimmermann *et al.*, 1998)。此基因结构是玉米 MON810 所特有的。外部引物 mg1 和 mg2 分别退火到 E35S 启动子序列和 hsp70 内含子 1 区域，而内部引物分别互补于 E35S 启动子序列和 hsp70 外显子 1 区域的 DNA 序列。如图 4 所示，两个外部引物 mg1/mg2 扩增一个 401 bp 的片段，而内部引物 mg3/mg4 扩增产生一个 149 bp 的片段。

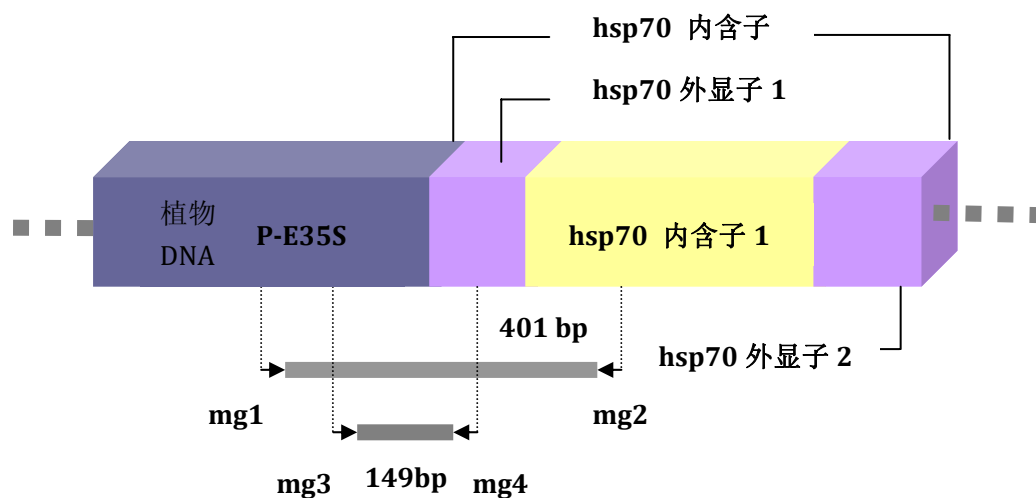


图 4. MON810 玉米品系部分转基因框示意图。示意图显示了含有增强的 CaMV 35S-启动子和玉米 hsp70 内含子的部分，以及引物 mg1、mg2、mg3 和 mg4 的相关位置 (修改自 Zimmermann *et al.*, 1998)。

## 参考文献

- Hemmer, W. (1997). Foods Derived from Genetically Modified Organisms and Detection Methods. *Biosafety Research and Assessment of Technology Impacts of the Swiss Priority Program Biotechnology - Report 2/97*, 61 pages. [http://www.bats.ch/publications/2\\_97.pdf](http://www.bats.ch/publications/2_97.pdf)
- Lipp, M., Bluth, A., Eyquem, F., Kruse, L., Schimmel, H., Van den Eede, G. and Anklam, E. (2001). Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. *European Food Research Technology* **212**, 497-504.
- Meyer, R., Chardonens, F., Hubner, P. and Luthy, J. (1996). Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A* **203**, 339-344.
- Meyer, R. and Jaccaud, E. (1997). Detection of genetically modified soya in processed food products: development and validation of a PCR assay for the specific detection of Glyphosate-Tolerant Soybeans. *Proceedings of the EURO FOOD CHEM IX Conference, Interlaken, Switzerland, Event No. 220* **1**, 23-28.
- Studer, E., Dahinden, I., Luthy, J. and Hubner, P. (1997). Nachweis des gentechnisch veränderten "Maximizer"-Mais mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). *Mitteilungen aus dem Gebiet der Lebensmittel und Hygiene* **88**, 515-524.
- Zimmermann, A., Liniger, M., Luthy, J. and Pauli, U. (1998). A sensitive detection method for genetically modified MaisGard<sup>TM</sup> corn using a nested-PCR system. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* **31**, 664-667.