

食品中转基因成分检测

第 9 章

定性 PCR 检测 MON810 玉米、Bt-176 玉米 和 Roundup Ready®大豆

M. Querci, M. Maretti, M. Mazzara



目 录

第 9 章

定性 PCR 检测 MON810 玉米、Bt-176 玉米和 Roundup Ready®大豆

试验部分	3
引言	3
植物特异性 PCR: 大豆- <i>lectin</i> 基因	6
植物特异性 PCR: 玉米- <i>zein</i> 基因	10
筛选方法检测转基因植物	13
35S 启动子的检测	13
<i>nos</i> 终止子的检测	15
巢式PCR特异性检测MON810玉米、Bt-176玉米和Roundup Ready®大豆	19
MON810 玉米的检测	19
Bt-176 玉米的检测	24
Roundup Ready®大豆的检测	29

实验部分

引言

下面的操作程序是利用基于 PCR 的方法，可用于原材料和加工材料中筛选转基因生物（通过 35S 启动子和 *nos* 终止子）和检测特异的转基因生物（Roundup Ready®大豆、MON810 玉米和 Bt-176 玉米），同时通过和相应的非转基因样品（大豆和玉米）进行比较确定。

下面的方法仅给出定性结果，说明样品中存在/不存在目的序列。

设备

- 微量移液器
- 热循环仪
- 微量离心机
- 涡旋混合器
- 反应管架
- 0.2 ml PCR 反应管
- 1.5 ml 微量离心管
- 带有紫外线防护罩的隔离无菌室

注意

所有的设备应当不带有 DNA，使用前尽可能灭菌。
为了避免污染，应当尽可能使用浮质过滤移液枪头。

试剂

- dATP

CAS1923-31-7

- dCTP CAS102783-51-7
- dGTP CAS93919-41-6
- dTTP CAS18423-43-3
- 10× PCR 缓冲液 (一般地, 应和 *Taq* DNA 聚合酶来自同一供应商)
- 25 mM MgCl₂
- *Taq* DNA 聚合酶
- 上游和下游寡聚核苷酸
- 矿物油 (应用于没有热盖的热循环仪)
- 无核酸酶的水

4 mM dNTP 储备液

- dNTPs 以预混合储存的形式供给——包括相同浓度的 dATP, dCTP, dGTP, dTTP-或者以单一浓度分装储存。如果单一分装储存, 那么需要在无菌去离子水中溶解每一种 dNTP, 配成终浓度为 4 mM 的 dNTP 储存液。
 - 分装保存于-20°C, 可以稳定保存数月。

20 μM 引物溶液

引物寡聚核苷酸一般以干粉的形式提供, 应当稀释成终浓度为 20 μM 的溶液。

- 根据供应商的说明配制 20 μM 的引物溶液。
 - 1 μM=1 pmol/μl, 因此 20 μM=20 pmol/μl
 - X nmol 引物+10 X μl 无菌水= 100 pmol/μl=100 μM
 - 65°C 温浴 5 min, 振荡混匀, 65°C 再温浴 3 min

- 1:5 稀释→准备一个含有 400 μ l 无菌水的离心管，加入 100 μ l 引物溶液 (100 μ M) →终浓度：20 μ M

- 分装，于-20℃保存，至少可以稳定保存 6 个月；干粉状引物-20℃可保存 3 年。

10×PCR 缓冲液

- 一般地，10×PCR 缓冲液含有 500 mM KCl、100 mM Tris-HCl (pH 9.0, 25℃)、1% Triton X-100，应当和 *Taq* DNA 聚合酶一起提供使用。使用前，缓冲液应混匀并轻微离心。
- 分装，保存于-20℃，可以稳定保存数月。

25 mM MgCl₂ 溶液

“PCR 级” MgCl₂ 溶液一般与 *Taq* DNA 聚合酶一起提供使用。

每次使用前，溶液应混匀并轻微离心 (由于长时间的保存可能破坏浓度梯度的)。-20℃保存。

无核酸酶水

分装灭菌无核酸酶、去离子水，用于制备反应体系和稀释 DNA。对于每次的分析研究，应该使用一管新的分装水。

植物特异性 PCR: 大豆-*lectin* 基因

以 *lectin* 基因作为靶基因来鉴定大豆 DNA。

通过使用引物 GMO3/GMO4，进行 PCR 来确定样品中是否存在可扩增的大豆 DNA。

引物GMO3/GMO4 的特性

GMO3	
序列	GCCCTCTACTCCACCCCATCC
长度	22
分子量 (g/mol)	6471.6
熔点* (G/C)	65.1
GMO4	
序列	GCCCATCTGCAAGCCTTTTGTG
长度	23
分子量 (g/mol)	6981.1
熔点* (G/C)	59.6

* 以 50 mM 的[Na⁺]为基准测定

对照

在每次 PCR 分析研究中设置对照实验非常是很重要的。设计阴性对照用于核查设计阴性对照用于检测 PCR 试剂是否被 DNA 污染，设定特异样品的阳性对照也是非常重要，以确定 PCR 反应的效率和特异性。

PCR 检测研究中，下面的对照是必须使用的：

- 阳性对照：纯 DNA，来自传统大豆
- 阴性对照：纯 DNA，来自其他的种类，不含有 *lectin* 基因
- 无模板对照：反应体系的阴性对照，用水代替 DNA

反应体系的制备

根据表 1 给出的说明，一组 10 个样品（包括阳性/阴性/无模板对照）所须的试剂要一起混合。下面的程序应用于含有 48 μl GMO3/GMO4 混合体系和 2 μl DNA 溶液的样品，在配制反应体系时所有的试剂都应置于冰上。

表 1. GMO3/GMO4 反应体系

	终浓度	1 个样品	10 个样品
无菌、去离子水		32.75 μl	327.5 μl
10 \times PCR缓冲液	1 \times	5 μl	50 μl
25 mM MgCl ₂	2.5 mM	5 μl	50 μl
4 mM dNTPs	0.2 mM	2.5 μl	25 μl
20 μM 引物 GMO3	0.5 μM	1.25 μl	12.5 μl
20 μM 引物 GMO4	0.5 μM	1.25 μl	12.5 μl
Taq DNA 聚合酶	0.025 U/ μl	0.25 μl	2.5 μl
总计		48 μl	480 μl

- 准备 1.5 ml 微量离心管
- 按照表 1 给出的顺序加入试剂
- 用移液器轻轻混合 GMO3/GMO4 的反应体系并轻微离心
- 分装，取 48 μl 加入到 0.2 ml 的 PCR 反应管中
- 在上面的分装液中加入 2 μl DNA 溶液
- 轻轻振荡并轻微离心
- 把 PCR 反应管放到热循环仪中

PCR 程序* (GMO3/GMO4)

	温度	时间
预变性	95 $^{\circ}\text{C}$	3 min
变性	95 $^{\circ}\text{C}$	30 s
退火	63 $^{\circ}\text{C}$	30 s
延伸	72 $^{\circ}\text{C}$	30 s

循环数	40	
最后延伸	72°C	3 min
	4°C	∞

扩增后，样品轻微离心并放置冰上。

*** 注:**检测过程中，将使用 *Perkin Elmer Gene Amp PCR system 9600, ABI 9700* 热循环仪，如果 PCR 程序进行了相应的调整与测试，那么使用不同型号或品牌的热循环仪都会产生相同的结果¹。

PCR 产物的分析

DNA 扩增后，用含有溴化乙啶的琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行分析。每 8 μl PCR 反应液与 2 μl 上样缓冲液混合；随后样品加入琼脂糖凝胶（1.5%）上样孔中，100V 电压下电泳 1h 以上。在样品孔旁的上样孔中加入 DNA 分子量标记（15 μl，100 bp 梯度）同时电泳，这样可以准确地确定扩增片段的大小。电泳结束后，采用紫外光透射仪可直接观察凝胶中的 DNA，并拍照，以便提供实验结果的永久记录。

实验结果的解释

检测天然大豆的 *lectin* 基因的引物对 GMO3/GMO4 用作系统对照校验；一个 118bp 的 *lectin* 基因特异性条带确定提取的 DNA 的质量是否适合的扩增。

阳性对照试验将扩增产生 118 bp 的条带，阴性对照和无模板对照试验均不会产生可见的条带。

如果阳性/阴性对照试验没有产生预期的结果，那么对被选择样品进行 PCR 分析是无效的。

¹ JRC 和 WHO 不会推荐培训课程中用到的和该手册中使用的任何仪器设备。我们实验室中进行的检测分析应该很容易用其他的可选择性仪器重复出来，但要考虑到系统的特性差异。

如果对照实验产生了预期的结果，但样品没有 118 bp 的条带，则意味着在样品中没有可扩增的大豆 DNA 存在。应当注意，本单元中的这一操作程序或其他程序都是定性的方法，因此只会给出定性（是/否）结果。

植物特异性 PCR: 玉米-*zein* 基因

以 *zein* 基因为靶基因来鉴定玉米 DNA。

通过使用引物 ZEIN3/ZEIN4, 进行 PCR 来确定样品中是否存在可扩增的玉米 DNA。

引物 ZEIN3/ZEIN4 的特性

ZEIN3	
序列	AGTGCGACCCATATTCCAG
长度	19
分子量 (g/mol)	5772.3
熔点* (G/C)	55.2

ZEIN4	
序列	GACATTGTGGCATCATCATTT
长度	21
分子量 (g/mol)	6410.9
熔点* (G/C)	51.7

* 以 50 mM 的[Na⁺]为基准测定

对照

- 阳性对照: 纯 DNA, 来自传统玉米
- 阴性对照: 纯 DNA, 来自其他的种类, 不含有 *zein* 基因
- 无模板对照: 反应体系的阴性对照, 用水代替 DNA

反应体系的制备

根据表 2 给出的说明, 一组 10 个样品 (包括阳性/阴性/无模板对照) 所须的试剂要一起混合。

下面的程序应用于含有 48 μl ZEIN3/ZEIN4 混合体系和 2 μl DNA 溶液样品，在配制反应体系过程时所有的试剂都应置于冰上保存。

表 2. ZEIN3/ZEIN4 反应体系

	终浓度	1 个样品	10 个样品
无菌、去离子水		32.75 μl	327.5 μl
10 \times PCR缓冲液	1 \times	5 μl	50 μl
25 mM MgCl ₂	2.5 mM	5 μl	50 μl
4 mM dNTPs	0.2 mM	2.5 μl	25 μl
20 μM 引物 ZEIN3	0.5 μM	1.25 μl	12.5 μl
20 μM 引物 ZEIN4	0.5 μM	1.25 μl	12.5 μl
Taq DNA 聚合酶	0.025 U/ μl	0.25 μl	2.5 μl
总计		48 μl	480 μl

- 准备 1.5 ml 微量离心管
- 按照表 2 给出的顺序依次加入试剂
- 用移液器轻轻混合 ZEIN3/ZEIN4 的反应体系并轻微离心
- 分装，取 48 μl 加入到 0.2 ml 的 PCR 反应管中
- 在上面的分装液中加入 2 μl DNA 溶液
- 轻轻振荡并轻微离心
- 把 PCR 反应管放到热循环仪中

PCR 程序 (ZEIN3/ZEIN4)

	温度	时间
预变性	95 $^{\circ}\text{C}$	3 min
变性	96 $^{\circ}\text{C}$	1 min
退火	60 $^{\circ}\text{C}$	1 min
循环数	40	
最后延伸	72 $^{\circ}\text{C}$	3 min
	4 $^{\circ}\text{C}$	∞

扩增后，样品轻微离心并放置冰上。

PCR 产物分析

DNA 扩增后，用含有溴化乙啶的琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行分析。每 8 μl PCR 产物与 2 μl 上样缓冲液混合；随后样品加入琼脂糖凝胶 (1.5%) 上样孔中，100 V 电压下电泳 1h 以上。在样品孔旁的上样孔中加入 DNA 分子量标记 (15 μl , 100 bp 梯度) 同时电泳，这样可以准确地确定扩增片段的大小。电泳结束后，用紫外透射仪直接观察凝胶中的 DNA，并拍照，以便提供实验结果的永久记录。

实验结果解释

检测天然玉米内源 *zein* 基因的引物对 ZEIN3/ZEIN4 作为系统对照以检测提取 DNA 的质量是否适于扩增；如果提取的 DNA 质量足以进行 PCR 扩增，则在凝胶上会观察到一个 227 bp 的 *zein* 基因特异性条带。

阳性对照试验可扩增出 227 bp 的条带。

阴性对照和无模板对照试验得不到可见的条带。

如果阳性/阴性对照试验没有产生预期的结果，那么对被选择样品进行 PCR 分析也是无效的。

如果对照可以产生预期的结果，但样品没有 227 bp 的条带，则意味着在样品中没有可扩增的玉米 DNA 存在。

筛选方法检测转基因植物

基因是受启动子和终止子的调控的。最常用的调控转基因序列的是 35S 启动子 (来自花椰菜花叶病毒 -CaMV) 和 *nos* 终止子 (来自根瘤土壤杆菌 -*Agrobacterium tumefaciens*)。如果在含有大豆和/或玉米的检测样品中鉴定出了这调控序列中的一个, 就说明存在转基因成分。

在转基因抗农达® (Roundup Ready®) 除草剂大豆中, 可能会同时鉴定到 35S 启动子和 *nos* 终止子, 然而在 Bt-176 和 MON810 玉米品系中仅有 35S 启动子。

35S 启动子的检测

引物 p35S-cf3 和 p35S-cr4 的特性

p35S-cf3	
序列	CCACGTCTTCAAAGCAAGTGG
长度	21
分子量 (g/mol)	6414.5
熔点* (G/C)	57.4

p35S-cr4	
序列	TCCTCTCCAAATGAAATGAACTTCC
长度	25
分子量 (g/mol)	7544.2
熔点* (G/C)	56.3

* 以 50 mM 的[Na⁺]为基准测定

对照

- 阳性对照: DNA 来自标准参考物质 (含有 0.5%转基因玉米)
- 阴性对照: DNA 来自标准参考物质 (不含转基因玉米)
- 无模板对照: 反应体系的阴性对照, 用水代替 DNA

反应体系制备

根据表 3 给出的说明，一组 10 个样品（包括阳性/阴性/无模板对照）所需的试剂要一起混合。

下面的程序应用于含有 48 μl p35S-cf3/p35S-cr4 混合体系和 2 μl DNA 溶液的样品，在配制反应体系时所有的试剂都应置于冰上。

表 3. p35S-cf3 / p35S-cr4 反应体系

	终浓度	1 个样品	10 个样品
无菌、去离子水		32.75 μl	327.5 μl
10 \times PCR缓冲液	1 \times	5 μl	50 μl
25 mM MgCl ₂	2.5 mM	5 μl	50 μl
4 mM dNTPs	0.2 mM	2.5 μl	25 μl
20 μM 引物 p35S-cf3	0.5 μM	1.25 μl	12.5 μl
20 μM 引物 p35S-cr4	0.5 μM	1.25 μl	12.5 μl
Taq DNA 聚合酶	0.025 U/ μl	0.25 μl	2.5 μl
总计		48 μl	480 μl

- 准备 1.5 ml 微量离心管
- 按照表 3 给出的顺序依次加入试剂
- 用移液器轻轻混合 p35S-cf3 / p35S-cr4 的反应体系并轻微离心
- 分装，取 48 μl 上述混合液加入到 0.2 ml 的 PCR 反应管中
- 在上面的分装液中加入 2 μl DNA 溶液
- 轻轻振荡并轻微离心
- 把 PCR 反应管放到热循环仪中

PCR 程序 (p35S-cf3 / p35S-cr4)

	温度	时间
预变性	95 $^{\circ}\text{C}$	3 min
变性	95 $^{\circ}\text{C}$	25 s

退火	62°C	30 s
延伸	72°C	45 s
循环数	50	
最后延伸	72°C	7 min
	4°C	∞

扩增后，样品轻微离心并放置冰上。

PCR 产物的分析

目的序列扩增后，用含有溴化乙啶的琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物来进行分析。每 8 μ l PCR 产物与 2 μ l 上样缓冲液混合；随后样品加入琼脂糖凝胶 (2.5%) 上样孔中，100V 电压下电泳 1h 以上。在样品孔旁的上样孔中加入 DNA 分子量标记 (15 μ l, 100 bp 梯度) 同时电泳，这样可以准确地确定扩增片段的大小。电泳结束后，可在紫外透射仪下观察凝胶中的 DNA，并拍照，以便提供实验结果的永久记录。

实验结果的解释

引物对 p35S-cf3 / p35S-cr4 被用于检测 CaMV 35S 启动子，扩增产生一个 123 bp 的片段。此启动子调控许多转基因植物的基因表达，如抗农达® (Roundup Ready®) 除草剂大豆 和玉米 Bt-176。

阳性对照也将扩增产生一个 123 bp 的条带，阴性对照和无模板对照不会产生可见的条带，如果阳性/阴性对照没有产生预期的结果，那么对被选择样品进行 PCR 分析是无效的。

如果对照产生了预期的结果，样品中产生了 123 bp 的条带，则意味着在样品中存在修饰过的 DNA。

nos 终止子的检测

引物 HA-nos 118-f 和 HA-nos 118-r 的特性

HA-nos 118-f	
序列	GCATGACGTTATTTATGAGATGGG
长度	24

分子量 (g/mol)	7462.8
熔点* (G/C)	56.2
HA-nos 118-r	
序列	GACACCGCGCGCGATAATTTATCC
长度	24
分子量 (g/mol)	7296.9
熔点* (G/C)	61.2

* 以 50 mM 的[Na⁺]为基准测定

对照

- 阳性对照: DNA 来自标准参考物质 (含有 0.5%转基因 RRS)
- 阴性对照: DNA 来自标准参考物质 (不含转基因大豆)
- 无模板对照: 反应体系体系的阴性对照, 用水代替 DNA

反应体系制备

根据表 4 给出的说明, 一组 10 个样品 (包括阳性/阴性/无模板对照) 所需的试剂要一起混合。

下面的程序应用于含有 48 μ l HA-nos118-f/HA-nos118-r 混合体系和 2 μ l DNA 溶液的样品, 在配制反应体系时所有的试剂都应置于冰上。

表 4. HA-nos118-f/HA-nos118-r 反应混合体系

	终浓度	1 个样品	10 个样品
无菌、去离子水		32.75 μ l	327.5 μ l
10 \times PCR缓冲液	1 \times	5 μ l	50 μ l
25 mM MgCl ₂	2.5 mM	5 μ l	50 μ l
4 mM dNTPs	0.2 mM	2.5 μ l	25 μ l
20 μ M 引物 HA-nos118-f	0.5 μ M	1.25 μ l	12.5 μ l
20 μ M 引物 HA-nos118-r	0.5 μ M	1.25 μ l	12.5 μ l
Taq DNA 聚合酶	0.025 U/ μ l	0.25 μ l	2.5 μ l
总计		48μl	480μl

- 准备 1.5 ml 微量离心管
- 按照表 4 给出的顺序依次加入试剂
- 用移液器轻轻混匀 HA-nos118-f/HA-nos118-r 的反应体系并轻微离心
- 分装，取 48 μ l 上述混合液加入到 0.2 ml 的 PCR 反应管中
- 在上面的分装液中加入 2 μ l DNA 溶液
- 轻轻振荡并轻微离心
- 把 PCR 反应管放到热循环仪中

PCR 程序 (HA-nos118-f/HA-nos118-r)

	温度	时间
预变性	95°C	3 min
变性	95°C	25 s
退火	62°C	30 s
延伸	72°C	45 s
循环数	50	
最后延伸	72°C	7 min
	4°C	∞

扩增后，样品轻微离心并放置冰上。

PCR 产物的分析

目的序列扩增后，用含有溴化乙啶的琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物来进行分析。每 8 μ l PCR 产物与 2 μ l 上样缓冲液混合；随后样品加入琼脂糖凝胶 (2.5%) 上样孔中，100V 电压下电泳 1h 以上。在样品孔旁的上样孔中加入 DNA 分子量标记 (15 μ l, 100 bp 梯度) 同时电泳，这样可以准确地确定扩增子的大小。电泳结束后，可在紫外透射仪下观察凝胶中的 DNA，并拍照，以便提供实验结果的永久记录。

实验结果的解释

引物对 HA-*nos118-f*/HA-*nos118-r* 被用于检测 *nos* 终止子，PCR 扩增产生一个 118 bp 的片断，此终止子存在于抗农达® (Roundup Ready®) 除草剂大豆和其它转基因植物中 (如：玉米 Bt-11)。

阳性对照将扩增产生 118 bp 的条带。

阴性对照和无模板对照不会产生可见的条带，如果阳性/阴性对照没有产生预期的结果，那么对被选择样品进行 PCR 分析是无效的。

如果对照产生了预期的结果，样品中扩增出了 118 bp 的条带，则意味着在样品中存在修饰过的 DNA。

巢式PCR特异性检测MON810玉米、Bt-176玉米和Roundup Ready®大豆

MON810玉米的检测

此检测体系对 MON810 是特异的。目标元件是 CaMV 35S 启动子和 hsp70 外显子/内含子 1 区域，它们分别为组成型调控序列和增强转录水平的热休克蛋白基因。

引物 mg1、mg2、mg3 和 mg4 的特性

mg1	
序列	TATCTCCACTGACGTAAGGGATGAC
长度	25
分子量 (g/mol)	7665.1
熔点* (G/C)	59.6

mg2	
序列	TGCCCTATAACACCAACATGTGCTT
长度	25
分子量 (g/mol)	7560.2
熔点* (G/C)	57.9

mg3	
序列	ACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTC
长度	25
分子量 (g/mol)	7472.2
熔点* (G/C)	61.2

mg4	
序列	GCATTCAGAGAAACGTGGCAGTAAC
长度	25
分子量 (g/mol)	7722.9
熔点* (G/C)	59.6

* 以 50 mM 的[Na⁺]为基准测定

对照

- 阳性对照: DNA 来自标准参考物质 (含有 0.1% MON810 玉米)
- 阴性对照: DNA 来自标准参考物质 (不含转基因玉米)
- 无模板对照: 反应体系的阴性对照, 用水代替 DNA

反应混合体系制备 1

根据表 5 给出的说明, 一组 10 个样品 (包括阳性/阴性/无模板对照) 所需的试剂要一起混合。

下面的程序应用于含有 48 μl mg1/mg2 混合体系和 2 μl DNA 溶液的样品, 在配制反应体系时所有的试剂都应置于冰上。

表 5. mg1/mg2 反应混合体系

	终浓度	1 个样品	10 个样品
无菌、去离子水		32.75 μl	327.5 μl
10 \times PCR缓冲液	1 \times	5 μl	50 μl
25 mM MgCl ₂	2.5 mM	5 μl	50 μl
4 mM dNTPs	0.2 mM	2.5 μl	25 μl
20 μM 引物 mg1	0.5 μM	1.25 μl	12.5 μl
20 μM 引物 mg2	0.5 μM	1.25 μl	12.5 μl
Taq DNA 聚合酶	0.025 U/ μl	0.25 μl	2.5 μl
总计		48 μl	480 μl

- 准备 1.5 ml 微量离心管
- 按照表 5 给出的顺序依次加入试剂
- 用移液器轻轻混匀 mg1/mg2 的反应体系并轻微离心
- 分装, 取 48 μl 上述混合液加入到 0.2 ml 的 PCR 反应管中
- 在上面的分装液中加入 2 μl DNA 溶液
- 轻轻振荡并轻微离心

- 把 PCR 反应管放到热循环仪中

PCR 程序 (mg1/mg2)

	温度	时间
预变性	95°C	3 min
变性	95°C	45 s
退火	60°C	50 s
延伸	72°C	50 s
循环数	35	
最后延伸	72°C	3 min
	4°C	∞

扩增后，样品轻微离心并放置冰上。

反应体系制备 2

根据表 6 给出的说明，10 个一组的样品（包括阳性/阴性/无模板对照）所需试剂要一起混合。

下面的程序应用于含有 49 μl mg3/mg4 混合体系和 1 μl 第一次 PCR 预扩增的 DNA 溶液的样品，在配制反应体系时所有的试剂都应置于冰上。

表 6. mg3/mg4 反应混合体系

	终浓度	1 个样品	10 个样品
无菌、去离子水		33.75 μl	337.5 μl
10 \times PCR 缓冲液	1 \times	5 μl	50 μl
25 mM MgCl ₂	2.5 mM	5 μl	50 μl
4 mM dNTPs	0.2 mM	2.5 μl	25 μl
20 μM 引物 mg3	0.5 μM	1.25 μl	12.5 μl
20 μM 引物 mg4	0.5 μM	1.25 μl	12.5 μl
Taq DNA 聚合酶	0.025 U/ μl	0.25 μl	2.5 μl
总计		49 μl	490 μl

- 准备 1.5 ml 微量离心管
- 按照表 6 给出的顺序依次加入试剂
- 用移液器轻轻混匀 mg3/mg4 的反应体系并轻微离心

- 分装，取 49 μl 上述混合液加入到 0.2 ml 的 PCR 反应管中
- 在上面的分装液中加入 1 μl DNA 溶液
- 轻轻振荡并轻微离心
- 把 PCR 反应管放到热循环仪中

巢式 PCR 程序 (mg3/mg4)

	温度	时间
预变性	95°C	3 min
变性	95°C	45 s
退火	60°C	50 s
延伸	72°C	50 s
循环数	40	
最后延伸	72°C	3 min
	4°C	∞

扩增后，样品轻微离心并放置冰上。

PCR 产物的分析

目的序列扩增后，用含有溴化乙啶的琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物来进行分析。每 8 μl PCR 产物与 2 μl 上样缓冲液混合；随后样品加入琼脂糖凝胶 (2.5%) 上样孔中，100V 电压下电泳 1h 以上。在样品孔旁上样孔中加入 DNA 分子量标记 (15 μl , 100 bp 梯度) 同时电泳，这样可以准确地确定扩增片段的大小。电泳结束后，可在紫外透射仪下观察凝胶中的 DNA，并拍照，提供实验结果的永久记录。

实验结果的解释

引物对 mg1/mg2 和 mg3/mg4 用于巢式 PCR 特异性检测 MON810 玉米，最终产生一个 149 bp 的片段，其特异性来源于引物的设计，该引物对位于 E-35S 启动子和 hsp70 外含子/内显子基因区域。阳性对照将扩增产生 149 bp 的条带。阴性对照和无模板对照不会产生可见的条带。

如果阳性/阴性对照没有产生预期的结果，那么对被选择样品进行 PCR 检测是无效的。

如果对照产生了预期的结果，且样品中扩增产生了 149 bp 的条带，则意味着在样品中存在 MON810 玉米 DNA。

Bt-176 玉米的检测

目标基因是 *cryIA(b)*，此基因可以保护植物免受害虫的侵害，如：欧洲玉米螟。

引物 *CRYIA1*、*CRYIA2*、*CRYIA3* 和 *CRYIA4* 的特性

CRYIA1	
序列	CGGCCCCGAGTTCACCTT
长度	18
分子量 (g/mol)	5394.6
熔点* (G/C)	59.5

CRYIA2	
序列	CTGCTGGGGATGATGTTGTTG
长度	21
分子量 (g/mol)	6519.2
熔点* (G/C)	57.6

CRYIA3	
序列	CCGCACCCTGAGCAGCAC
长度	18
分子量 (g/mol)	5397.6
熔点* (G/C)	61.7

CRYIA4	
序列	GGTGGCACGTTGTTGTTCTGA
长度	21
分子量 (g/mol)	6479.2
熔点* (G/C)	57.6

* 以 50 mM 的[Na⁺]为基准测定

对照

- 阳性对照：DNA 来自标准参考物质 (含有 0.1% Bt-176 玉米)

- 阴性对照: DNA 来自标准参考物质 (不含转基因玉米)
- 无模板对照: 反应体系的阴性对照, 用水代替 DNA

反应体系制备 1

根据表 5 给出的说明, 一组 10 个样品 (包括阳性/阴性/无模板对照) 所需的试剂要一起混合。下面的程序应用于含有 48 μl CRYIA1/CRYIA2 混合体系和 2 μl DNA 溶液的样品, 在配制反应体系时所有的试剂都应置于冰上。

表 5. CRYIA1/CRYIA2 反应混合体系

	终浓度	1 个样品	10 个样品
无菌、去离子水		32.75 μl	327.5 μl
10 \times PCR 缓冲液	1 \times	5 μl	50 μl
25 mM MgCl ₂	2.5 mM	5 μl	50 μl
4 mM dNTPs	0.2 mM	2.5 μl	25 μl
20 μM 引物 CRYIA1	0.5 μM	1.25 μl	12.5 μl
20 μM 引物 CRYIA2	0.5 μM	1.25 μl	12.5 μl
<i>Taq</i> DNA 聚合酶	0.025 U/ μl	0.25 μl	2.5 μl
总计		48 μl	480 μl

- 准备 1.5ml 微量离心管
- 按照表 5 给出的顺序依次加入试剂
- 用移液器轻轻混合 CRYIA1/CRYIA2 反应体系并轻微离心
- 分装, 取 48 μl 上述混合液加入到 0.2 ml 的 PCR 反应管中
- 在上面的分装液中加入 2 μl DNA 溶液
- 轻轻振荡并轻微离心
- 把 PCR 反应管放到热循环仪中

PCR 程序 (CRYIA1/CRYIA2)

	温度	时间
预变性	95°C	3 min
变性	95°C	40 s
退火	60°C	40 s
延伸	72°C	40 s
循环数	25	
最后延伸	72°C	3 min
	4°C	∞

扩增后，样品轻微离心并放置冰上。

反应体系制备 2

根据表 6 给出的说明，一组 10 个样品（包括阳性/阴性/无模板对照）所需的试剂要一起混合。

下面的程序应用于含有 49 μl CRYIA3/CRYIA4 混合体系和 1 μl 第一次 PCR 预扩增 DNA 溶液的样品，在配制反应体系时所有的试剂都应置于冰上。

表 6. CRYIA3/CRYIA4 反应体系

	终浓度	1 个样品	10 个样品
无菌、去离子水		33.75 μl	337.5 μl
10 \times PCR缓冲液	1 \times	5 μl	50 μl
25 mM MgCl ₂	2.5 mM	5 μl	50 μl
4 mM dNTPs	0.2 mM	2.5 μl	25 μl
20 μM 引物CRYIA3	0.5 μM	1.25 μl	12.5 μl
20 μM 引物CRYIA3	0.5 μM	1.25 μl	12.5 μl
Taq DNA 聚合酶	0.025 U/ μl	0.25 μl	2.5 μl
总计		49 μl	490 μl

- 准备 1.5ml 微量离心管
- 按照表 6 给出的顺序依次加入试剂
- 用移液器轻轻混合 CRYIA3/CRYIA4 反应体系并轻微离心
- 分装，取 49 μl 上述混合液加入到 0.2 ml 的 PCR 反应管中

- 在上面的分装液中加入 1 μl DNA 溶液
- 轻轻振荡并轻微离心
- 把 PCR 反应管放到热循环仪中

PCR 程序 (CRYIA3/CRYIA4)

	温度	时间
预变性	95°C	3 min
变性	95°C	40 s
退火	60°C	40 s
延伸	72°C	40 s
循环数	35	
最后延伸	72°C	3 min
	4°C	∞

扩增后，样品轻微离心并放置冰上。

PCR 产物的分析

目的序列扩增后，用含有溴化乙啶的琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物来进行分析。每 8 μl PCR 产物与 2 μl 上样缓冲液混合；随后样品加入琼脂糖凝胶 (2.5%) 上样孔中，电压 100 V 下电泳 1 h 以上。在相邻的凝胶上样孔中加入 DNA 标记 (15 μl , 100 bp 梯度) 同时电泳，这样可以准确地确定扩增的大小。电泳结束后，可在紫外透射仪下观察凝胶中的 DNA，并拍照，提供实验结果的长久记录。

实验结果的解释

设计引物对 CRYIA1/CRYIA2 和 CRYIA3/CRYIA4 用于巢式 PCR 特异性检测人工合成的 *cryIA(b)* 基因玉米，产生一个 189 bp 的片段。此基因存在于玉米 Bt-176 和其它品系中 (如: Bt-11)。

阳性对照将扩增产生 189 bp 的条带。

阴性对照和无模板对照不会产生可见的条带。

如果阳性/阴性对照没有产生预期的结果，那么对被选择样品进行 PCR 分析也是无效的。

如果对照产生了预期的结果，并且样品中产生了 189 bp 的条带，则意味着在样品中存在 Bt-176 玉米 DNA。

Roundup Ready®大豆的检测

目标基因是 CP4 *EPSPS* 基因，此基因使植物具有对农达®除草剂的抗性。

引物 *GM05*、*GM09*、*GM07* 和 *GM08* 的特性

GM05	
序列	CCACTGACGTAAGGGATGACG
长度	21
分子量 (g/mol)	6479.4
熔点* (G/C)	59.5

GM09	
序列	CATGAAGGACCGGTGGGAGAT
长度	21
分子量 (g/mol)	6559.4
熔点* (G/C)	59.5

GM07	
序列	ATCCCACTATCCTTCGCAAGA
长度	21
分子量 (g/mol)	6309.6
熔点* (G/C)	55.8

GM08	
序列	TGGGGTTTATGGAAATTGGAA
长度	21
分子量 (g/mol)	6579.8
熔点* (G/C)	51.7

* 以 50 mM 的[Na⁺]为基准测定

对照

- **阳性对照:** DNA 来自标准参考物质 (含有 0.1% RRS)

- 阴性对照: DNA 来自标准参考物质 (不含转基因大豆)
- 无模板对照: 反应体系的阴性对照, 用水代替 DNA

反应体系制备 1

根据表 7 的说明, 一组 10 个样品 (包括阳性/阴性/无模板对照) 所需的试剂要一起混合。

下面的程序应用于含有 48 μl GMO5/GMO9 混合体系和 2 μl DNA 溶液的样品, 在配制反应体系时所有的试剂都应置于冰上。

表 7. GMO5/GMO9 反应体系

	终浓度	1 个样品	10 个样品
无菌、去离子水		32.75 μl	327.5 μl
10 \times PCR 缓冲液	1 \times	5 μl	50 μl
25 mM MgCl ₂	2.5 mM	5 μl	50 μl
4 mM dNTPs	0.2 mM	2.5 μl	25 μl
20 μM 引物GMO5	0.5 μM	1.25 μl	12.5 μl
20 μM 引物GMO9	0.5 μM	1.25 μl	12.5 μl
Taq DNA 聚合酶	0.025 U/ μl	0.25 μl	2.5 μl
总计		48 μl	480 μl

- 准备 1.5 ml 微量离心管
- 按照表 7 给出的顺序依次加入试剂
- 用移液器轻轻混合 GMO5/GMO9 反应体系并轻微离心
- 分装, 取 48 μl 上述混合液加入到 0.2 ml 的 PCR 反应管中
- 在上面的分装液中加入 2 μl DNA 溶液
- 轻轻振荡并轻微离心
- 把 PCR 反应管放到热循环仪中

PCR 程序 (GMO5/GMO9)

	温度	时间
预变性	95°C	3 min
变性	95°C	30 s
退火	60°C	30 s
延伸	72°C	40 s
循环数	25	
最后延伸	72°C	3 min
	4°C	∞

扩增后，样品轻微离心并放置冰上。

反应体系制备 2

根据表 8 的说明，一组 10 个样品（包括阳性/阴性/无模板对照）所需试剂一起混合。

下面的程序应用于含有 49 μl GMO7/GMO8 混合体系和第一次 PCR 预扩增的 1 μl DNA 溶液的样品，在配制反应体系时所有的试剂都应置于冰上。

表 8. GMO7/GMO8 反应体系

	终浓度	1 个样品	10 个样品
无菌、去离子水		33.75 μl	337.5 μl
10 \times PCR 缓冲液	1 \times	5 μl	50 μl
25 mM MgCl ₂	2.5 mM	5 μl	50 μl
4 mM dNTPs	0.2 mM	2.5 μl	25 μl
20 μM 引物GMO7	0.5 μM	1.25 μl	12.5 μl
20 μM 引物GMO8	0.5 μM	1.25 μl	12.5 μl
Taq DNA 聚合酶	0.025 U/ μl	0.25 μl	2.5 μl
总计		49 μl	490 μl

- 准备 1.5 ml 微量离心管
- 按照表 8 给出的顺序依次加入试剂
- 用移液器轻轻混匀 GMO7/GMO8 反应体系并轻微离心
- 分装，取 49 μl 上述混合液加入到 0.2 ml 的 PCR 反应管中
- 在上面的分装液中加入 1 μl DNA 溶液

- 轻轻振荡并轻微离心
- 把 PCR 反应管放到热循环仪中

PCR 程序 (GM07/GM08)

	温度	时间
预变性	95°C	3 min
变性	95°C	30 s
退火	60°C	30 s
延伸	72°C	40 s
循环数	35	
最后延伸	72°C	3 min
	4°C	∞

扩增后，样品轻微离心并放置冰上。

PCR 产物的分析

目的序列扩增后，用含有溴化乙啶的琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物来进行分析。每 8 μl PCR 产物与 2 μl 上样缓冲液混合；随后样品加入琼脂糖凝胶 (2.5%) 上样孔中，100V 电压下电泳 1 h 以上。在样品旁的上样孔中加入 DNA 分子量标记 (15 μl , 100 bp 梯度) 同时电泳，这样可以准确地确定扩增片段的大小。电泳结束后，可在紫外透射仪下观察凝胶中的 DNA，并拍照，以便提供实验结果的永久记录。

实验结果的解释

设计引物对 GM05/GM09 和 GM07/GM08 用于巢式 PCR 特异性检测转基因抗农达® (Roundup Ready®) 除草剂大豆的基因结构，产生一个 169 bp 的片段。引物 GM05 和 GM07 互补于 CaMV 35S 启动子，GM09 与农杆菌 CP4 菌株 (*Agrobacterium* sp strain CP4) 的 CP4 *EPSPS* 基因序列互补，而 GM08 与 CTP *EPSPS* 基因序列互补。

阳性对照将扩增产生 169 bp 的条带。

阴性对照和无模板对照不会产生可见的条带。如果阳性/阴性对照没有产生预期的结果，那么对选择样品进行 PCR 分析也是无效的。

如果对照产生了预期的结果，并且样品中扩增产生了 169 bp 的条带，则意味着在样品中存在抗农达® (Roundup Ready®) 除草剂大豆 DNA。