

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2011)03-0129-05

遗传育种

# 应用多重 PCR-DHPLC 方法快速检测转基因马铃薯及 EH92-527-1 品系鉴定

白 月<sup>1</sup>, 栾凤侠<sup>1\*</sup>, 高宏伟<sup>2</sup>

( 1. 黑龙江出入境检验检疫局, 黑龙江 哈尔滨 150001; 2. 山东出入境检验检疫局, 山东 青岛 266001 )

**摘要:**以 EH92-527-1 转基因马铃薯为试材, 应用多重 PCR 技术同时扩增马铃薯的内源基因(*UGPase*) 和外源基因(*NOS* 终止子、*NPTII* 结构基因和 EH92-527-1 品系特异基因), 将扩增产物在 DHPLC 非变性条件下分离, 分析几个基因扩增的结果; 将模板进行稀释, 确定了方法的检测灵敏度, 并与凝胶电泳结果相比较, 建立了马铃薯转基因成分筛选检测及品系鉴定的多重 PCR-变性高效液相色谱(DHPLC)方法。试验结果表明, 该方法能够同时筛选检测转基因马铃薯的四个内、外源基因, 且与凝胶成像相比, 有更好的检测灵敏度, 可达到  $1 \text{ ng} / \mu\text{L}$ 。本文首次建立的马铃薯多重 PCR-DHPLC 检测方法, 能够高通量快速准确的检测马铃薯中的转基因成分及对品系进行鉴定。

**关键词:**转基因马铃薯; 多重 PCR; 变性高效液相色谱; 筛选检测; 品系鉴定

## Rapid Detection of GMO Potato and Identification of the Line EH92-527-1 by Multiplex PCR and DHPLC

BAI Yue<sup>1</sup>, LUAN Fengxia<sup>1\*</sup>, GAO Hongwei<sup>2</sup>( 1. Heilongjiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Harbin, Heilongjiang 150001, China;  
2. Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao, Shandong 266001, China )

**Abstract:** *UGPase* gene, EH92-527-1 differential line gene, *NOS* terminator and *NPTII* gene in the line EH92-527-1 GMO potato were amplified by multiplex PCR. And the products were separated by DHPLC (Denatured High Performance Liquid Chromatography) undenaturedly. Various grads of samples were used for the sensitivity testing. These results were compared with gel electrophoresis. The multiplex PCR-DHPLC separation method was proposed for the detection of transgenic components and differential line gene in potato. The results showed that the method could be used to detect the four genes in GMO potato. And the limit of detection was  $1 \text{ ng} / \mu\text{L}$  which was better than that of gel electrophoresis. This method was first-done, rapid, accurate and high throughput. And it could be used for detecting and identifying GMO potato.

**Key Words:** GMO potato; multiplex PCR; DHPLC; detection; identification

马铃薯(*Solanum tuberosum*)是茄科作物, 易感染病虫害, 如晚疫病、环腐病、卷叶病等病害, 及线虫、地老虎和蛴螬等虫害。为了获得高产、抗病虫害和高淀粉、高蛋白质含量的马铃薯品种, 人们通过转基因等生物技术手段, 已研发出很多转基因品系。目前, 商品化的转基因马铃薯主要有抗马铃

薯甲虫(*Cry A*、*cry3Aa*)品系和抗病毒(马铃薯 Y 病毒 PVY, 马铃薯卷叶病毒 PLRV)等品系<sup>[1]</sup>。这些品系都采用 *NPT* 作为标记基因, 启动子多为 CaMV35S 或 FMV35S, 终止子多为 *NOS*、*E93'* 或 *tbcS*。现有的转基因马铃薯检测技术主要有单一 PCR 方法<sup>[2-3]</sup>, 多重 PCR 方法<sup>[4]</sup>及实时荧光 PCR 方

收稿日期: 2010-01-17

基金项目: 国家质检总局 2011 年项目(2011IK200); 黑龙江省科技厅青年基金项目(QC2010022)。

作者简介: 白月(1979-), 女, 硕士研究生, 工程师, 主要从事转基因食品检测工作。

\* 通信作者(Corresponding author): 栾凤侠, 教授, 主要从事转基因食品检测技术研究工作, E-mail: Botao111@yahoo.com.cn。

法<sup>[5]</sup>, 其中单一 PCR 和多重 PCR 需要使用含有剧毒的溴化乙锭制备琼脂糖凝胶分析结果, 且操作繁琐; 实时荧光 PCR 方法是对几个基因分别进行扩增, 反应成本较高; 多重 PCR 方法是在一个 PCR 反应里同时对多对引物进行扩增, 减少了操作过程, 但邵碧英等<sup>[6]</sup>研究的转基因马铃薯多重 PCR 检测方法需琼脂糖凝胶电泳分析, 且应用的阳性样品是质粒而不是转基因株系, 不能对马铃薯的品系进行鉴定。

本文以 EH92-527-1 转基因马铃薯为阳性材料, 应用多重 PCR 方法, 同时扩增马铃薯内源参照基因 *UGPase*, 筛选基因 *NPTII*, 终止子 *NOS* 及 EH92-527-1 品系特异基因, 通过现代化仪器变性高效液相色谱(DHPLC)技术分离这几个基因。DHPLC 技术又称 WAVE 核苷酸片段分析系统, 是利用高效液相色谱原理, 将 PCR 扩增后的 DNA 片段与缓冲液(TEAA)混合, 形成液相流动相, 流动相被高压驱动, 通过 DNA Sep 分离柱对 DNA 片段进行分离和分析。通过分离片段出峰的位置, 判断检测结果。

本研究旨在建立一种新的转基因检测分析方法, 高通量, 简便, 灵敏度高, 快速准确, 并将其应用在转基因马铃薯检测中, 既可筛选检测, 又能品系鉴定, 为马铃薯中转基因成分的检测和监管提供有力的技术支持和保障。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验材料

转基因马铃薯 EH92-527-1 品系由山东出入境检验检疫局高宏伟博士提供。该品系是瑞典 BASF Plant Science Holding GmbH 公司研发的转基因株系<sup>[6]</sup>, 其基因构建中有 *gbss* 基因(*granule-bound starch synthase*)、*NPTII* 和 *NOS* 基因<sup>[7]</sup>。非转基因作物试验材料: 水稻、大豆、小麦、麦片、玉米为黑龙江检验检疫局技术中心实验室保留样品; 番茄、油菜、马铃薯、茄子、甜椒、辣椒、芹菜、萝卜为市售商品。

### 1.2 主要试剂及试剂配制

DNA 提取试剂盒(MERCK), GoTaq Flexi DNA Polymerase, Multiplex PCR Qiagen multiplex PCR kit (PROMEGA), 三乙胺乙酰盐 TEAA(Transgenomic公司), 乙腈(FISHER 公司), 琼脂糖(INVITROGEN), 去离子水(MILLI-Q)。DHPLC 缓冲液, A 液 0.1 mol/L 三乙胺乙酰盐, B 液 0.1 mol/L TEAA 和 25% 乙腈,

D 液乙腈 + 水(8 + 2, V:V)。

### 1.3 主要仪器

基因扩增仪 PE9700(美国 ABI), 凝胶成像系统 GEL 2000、电泳仪、电泳槽(美国 BIORAD), 变性高效液相色谱 DHPLC(美国 Transgenomic 公司), 纯水器(美国 MILLI-Q), 核酸蛋白仪, 高速离心机(BECKMAN), 移液器(EPPENDORF)。

### 1.4 试验方法

#### 1.4.1 DNA 的提取

可以按照检验检疫行业标准中所述的 CTAB 方法提取样品 DNA<sup>[8]</sup>。本文使用的是商品化的 DNA 提取试剂盒。使用核酸蛋白仪测定模板 DNA 的纯度和浓度, 纯度应在 1.6 以上, 浓度稀释成 50 ng/ $\mu$ L, 备用。

#### 1.4.2 内、外源基因的引物序列

研究设计马铃薯内源基因 *UGPase* 基因 152 bp 和 EH92-527-1 品系特异基因 135 bp, 并进行特异性试验(课题未结题, 序列未公开)。*NPTII* 基因 215 bp 引物序列为 5'-CTCACCTTGCTCCTGCCGAGA-3', 5'-CGCCTTGAGCCTGGCGAACAG-3' 和 *NOS* 基因 180 bp 引物序列 5'-GAATCCTGTTGCCGGTCTTG-3', 5'-TTATCCTAGTTTGCGCGCTA-3', 为检验检疫行业标准<sup>[8]</sup>中引用的序列。以上引物均由大连宝生物公司合成。

#### 1.4.3 单一 PCR 反应体系及扩增程序

PCR 反应体系为: 5X 的 PCR 缓冲液的 5 $\mu$ L, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2.5 $\mu$ L, 2.5 mmol/ $\mu$ L dNTPs 2.0  $\mu$ L, 10 pmol/ $\mu$ L 上、下游引物各 0.5  $\mu$ L, 模板 DNA 2.0  $\mu$ L, GoTaq DNA Polymerase 酶(5 U/ $\mu$ L) 0.2  $\mu$ L, 补充水至 25  $\mu$ L。PCR 扩增程序: 95  $^{\circ}$ C 2 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 58  $^{\circ}$ C 40 s, 72  $^{\circ}$ C 60 s, 循环 40 次; 72  $^{\circ}$ C 10 min。

#### 1.4.4 多重 PCR 反应体系及扩增程序

多重 PCR 反应体系: 5X 的 PCR 缓冲液 7.5  $\mu$ L, 25 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 3.0 $\mu$ L, 2.5 mmol/L, dNTPs 3.0 $\mu$ L, GoTaq DNA Polymerase 酶(5 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, 模板 DNA 2.0  $\mu$ L, 10 pmol/ $\mu$ L 引物各 1 $\mu$ L。多重 PCR 扩增程序: 95  $^{\circ}$ C 2 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 40 s, 72  $^{\circ}$ C 60 s, 循环反应 40 次; 72  $^{\circ}$ C 5 min。扩增多重 PCR 产物测序确证。将转基因马铃薯模板 DNA 浓度稀释成 5 ng/ $\mu$ L, 2.5 ng/ $\mu$ L, 1.25 ng/ $\mu$ L, 0.625 ng/ $\mu$ L, 使用多重 PCR Qiagen multiplex PCR kit 试剂, 反应体系为: 2 X Qiagen mix 12.5 $\mu$ L, Q-Solution 2.5  $\mu$ L,

DNA 2.0  $\mu\text{L}$ , 10 pmol/ $\mu\text{L}$  EH92-527-1 品系基因引物共 0.6  $\mu\text{L}$ , *UGPase* 基因引物共 0.5  $\mu\text{L}$ , *NOS* 基因引物共 1.0  $\mu\text{L}$ , *NPTII* 基因引物共 0.6  $\mu\text{L}$ , 补充水至 PCR 反应体积为 25  $\mu\text{L}$ 。多重 PCR 扩增程序: 95  $^{\circ}\text{C}$  15 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  90 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  60 s, 循环反应 35 次; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min, 获得多重 PCR 方法的检测灵敏度。

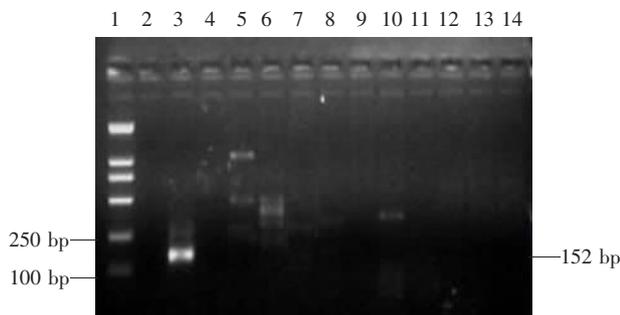
#### 1.4.5 DHPLC 分离方法

使用 PS-DVB & C18 DNASEP 色谱柱(1.6 mm  $\times$  50 mm, 粒度 3  $\mu\text{m}$ ), 检测器为紫外检测器; 将 PCR 产物放入 DHPLC 进样室, 设定基因片段大小为 80~420 bp。流动相: A 液为 50.2%, B 液为 49.8%; 柱温 50  $^{\circ}\text{C}$ , 上样量: 5  $\mu\text{L}$ , 流速: 0.9 mL/min; 进行 DHPLC 分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 新设计引物特异性实验

用常见的作物及茄科植物对马铃薯内源基因 *UGPase* 进行引物特异性试验(图 1)。用常见的作物对转基因 EH92-527-1 马铃薯品系基因进行特异性试验(图 2)。结果表明: 马铃薯内源基因 *UGPase* 仅在 3 泳道马铃薯样品中有扩增, 5、6、10 泳道虽然有条带, 但扩增的都不是目的片段; EH92-527-1 品系基因仅在 2 泳道该品系中被扩增, 说明这两对引物特异性很高。



注: 1-分子量(DL 2000); 2-水空白对照; 3-马铃薯; 4-番茄; 5-茄子; 6-甜椒; 7-辣椒; 8-芹菜; 9-油菜; 10-萝卜; 11-大豆; 12-玉米; 13-小麦; 14-大米。

Note: 1-marker(DL 2000); 2-CK; 3-potato; 4-tomato; 5-eggplant; 6-pimiento; 7-capsicum; 8-celery; 9-rape; 10-radish; 11-soya; 12-corn; 13-wheat; 14-rice.

图 1 *UGPase* 基因 PCR 特异性试验  
Figure 1 The specific test of *UGPase* gene

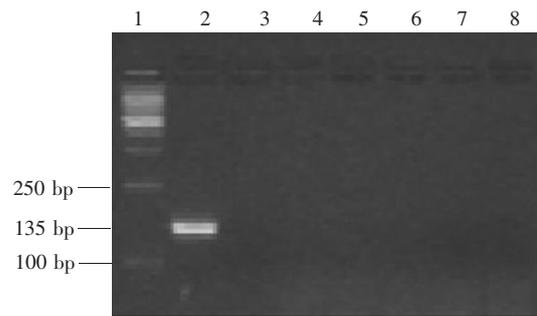


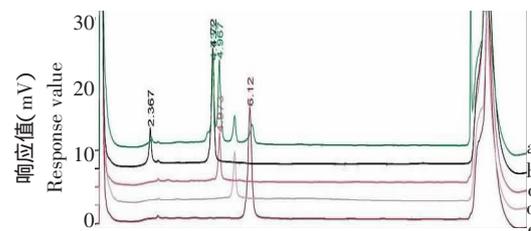
图 2 EH92-527-1 马铃薯品系基因 PCR 特异性试验  
Figure 2 The specific test of EH92-527-1 line gene

注: 1-分子量(DL 2000); 2-EH92-527-1 品系基因; 3-非转基因马铃薯; 4-番茄; 5-油菜; 6-大豆; 7-麦片; 8-萝卜。

Note: 1-marker(DL 2000); 2-EH92-527-1 line gene; 3-non-GMO potato; 4-tomato; 5-rape; 6-soya; 7-cornmeal; 8-radish.

### 2.2 PCR 扩增产物 DHPLC 分离结果

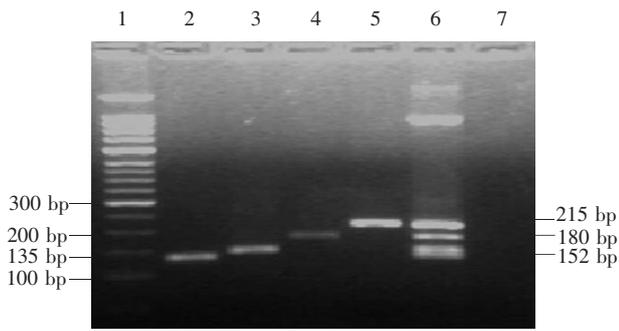
对转基因马铃薯 EH92-527-1 品系特异性基因 135 bp, *NPT* 筛选基因 215 bp, 终止子 *NOS* 基因 180 bp 及内源 *UGPase* 基因 152 bp 分别进行了单一 PCR 和多重 PCR 扩增, 扩增产物的 DHPLC 分离结果(图 3), 峰图 a 的 4 个峰与峰图 b、c、d、e 的出峰时间一致, 出峰的顺序依次为 EH92-527-1 品系基因、*UGPase* 基因、*NOS* 基因和 *NPT* 基因。峰图 b EH92-527-1 品系基因在 2.3 min 的位置出现一个杂峰, 可能是试剂峰或引物二聚体形成的峰, 和其它目的片段较远, 不影响判定多重 PCR 结果。通过与经 4% 琼脂糖凝胶电泳分析后的结果相比较(图 4), 2、3、4、5 泳道单一 PCR 扩增条带与 6 泳道多重 PCR 的几个扩增条带与目的片段一致, 且 2、3、4、5、6 泳道与 b、c、d、e、a 峰图一一对应, 说明 DHPLC 的分离结果准确。



注: 出峰顺序从上到下依次为多重 PCR 结果, EH92-527-1 品系基因、*UGPase*、*NOS* 和 *NPT* 基因。

Note: The sequence of apex is the result of multiplex-PCR, EH92-527-1 line gene, *UGPase*, *NOS*, *NPT* from up and down.

图 3 单一 PCR 与多重 PCR 产物 DHPLC 图谱比较  
Figure 3 DHPLC results of PCR and multiplex-PCR



注：1-分子量(50bp DNA Ladder)；2-EH92-527-1 品系基因；3-*UGPase*；4-*NOS*；5-*NPTII*；6-多重 PCR；7-空白对照。  
 Note: 1-marker(50bp DNA Ladder); 2-EH92-527-1 line gene; 3-*UGPase*; 4-*NOS*; 5-*NPTII*; 6-multiplex-PCR; 7-CK.

图 4 单一 PCR 和多重 PCR 检测结果  
 Figure 4 Results of PCR and multiplex-PCR

2.3 测序确证

对转基因马铃薯 EH92-527-1 品系特异基因、

*NOS*、*NPT* 外源基因和内源基因 *UGPase* 的四重 PCR 扩增产物进行凝胶电泳分析后，将目的片段切下，回收、纯化并测序(INVITROGEN 公司)，在 NCBI 中比对，内、外源基因测序结果与目的片段有 100% 的同源性(图 5~8)。说明多重 PCR 扩增的片段特异性非常好，为下一步色谱分析提供可靠保证。  
 2.4 多重 PCR-DHPLC 分析与凝胶成像检测灵敏度差异

将稀释成 5 ng/μL, 2.5 ng/μL, 1.25 ng/μL, 0.625 ng/μL 的转基因马铃薯模板 DNA 经多重 PCR 扩增后，用凝胶电泳和 DHPLC 分别进行分析(图 9~10)，a、b、c、d 峰图与 2、3、4、5 泳道对应比较，结果可以看出，当模板浓度达到 1.25 ng/μL 时，凝胶成像结果 4 泳道中 *UGPase* 基因已检测不到，但在 DHPLC 图谱峰图 c 中还能够清晰地看到峰型，表明 DHPLC 分离比凝胶成像具有更好的分辨率和灵敏度。

```
>[gb] HM036220.1 [D] Binary vector pKM24KH, complete sequence
Length=12945
Score = 115 bits(62), Expect = 3 e-23
Identities = 62 / 62(100%), Gaps = 0 / 62(0%)
Strand = Plus / Minus

Query 30      CACTGATAGTTTAAACTGAAGCGGGAAACGACAATCTGATCATGAGCGGAGAATTAAGG  89
              |||
Sbjct 2038    CACTGATAGTTTAAACTGAAGCGGGAAACGACAATCTGATCATGAGCGGAGAATTAAGG  1979

Query 90      GA      91
              ||
Sbjct 1978    GA      1977
```

图 5 EH92-527-1 品系特异基因测序结果  
 Figure 5 Sequence result of EH92-527-1 line gene

```
>[gb] U20345.1 STU20345 Solanum tuberosum UDP-pyrophosphorylase(UGPase), gene
UGPase-Lemhilo allele,complete sequence cds
Length = 7646
Score = 176 bits(95), Expect = 2 e-41
Identities = 118/128(92%), Gaps = 6 / 128(4%)
Strand = Plus / Minus

Query 3      TTTTGGCTGTG-ATTCTGGGTGATGGGGATATCTTCAACCATTATGT-GATCTAATTAC  60
Sbjct 3444    TTTTGGCTGTGATTCTGGGTGATGGGGATATCTTCAACCATTATGTGATCTAATTAC  3503

Query 61     CACTATGATTTGGTG-T-AAGAA--TACTATAAACAGATACTCCTACTATCCAATTTTG  116
Sbjct 3504    CACTATGATTTGGTGTAAAGAAAGTACTATTAACAGATACTCCTACTATCCAATTTTG  3563

Query 117    CTGCTTAT  124
Sbjct 3564    CTGCTTAT  3571
```

图 6 *UGPase* 基因测序结果  
 Figure 6 Sequence result of *UGPase* gene



### 3 讨 论

近年来建立并迅速发展的 DHPLC 是一种新型基因分析技术, 与传统方法比具有高通量检测、自动化程度高、灵敏度和特异性较高、检测 DNA 片段和长度变动范围广、价格便宜等优点, 且所要分析的 PCR 产物不用纯化, 可以直接上机检测, 多应用于微生物<sup>[9]</sup>及医学领域<sup>[10]</sup>, 进行基因分析、突变检测等等。本文首次将该方法应用于马铃薯转基因成分检测中, 分析转基因片段, 替代凝胶分析, 不用溴化乙锭, 不用点样, 跑电泳等繁琐操作。

在进行多重 PCR 扩增时, 许多因素影响着扩增的结果<sup>[11]</sup>。如本文提高了缓冲液浓度, 增加酶的用量等。但在多重 PCR 扩增时引物的量很难确定, 由于不同的基因在整个基因组中的拷贝数不同, 且许多转基因作物的转化信息并不公开, 很难通过拷贝数及片段的大小去算出加入引物的量, 需要进行实验摸索, 优化 PCR 反应体系, 这样才能得到最佳的 DHPLC 分离图谱。本文根据多重 PCR 的需要, 各引物间要有一定的片段差异, 设计了符合条件的马铃薯内源基因和品系特异基因, 避免了假阳性的出现, 还能对品系进行鉴定。通过与凝胶成像结果比较, *UGPase* 与品系基因由于两条片段大小相差 17 bp, 比较接近, 在 4% 的凝胶电泳下分离的效果仍不是很理想, 而在 DHPLC 下却能看到很明显的 2 个独立的峰型, 因为 DHPLC 的理论分辨率为 1%, 即能分开 100 bp 和 101 bp 的片段。

将 DHPLC 结合多重 PCR 应用在转基因马铃薯检测上国内外目前还没有相关报道。本研究建立的马铃薯多重 PCR -DHPLC 快速检测方法, 提高了检测效率, 达到了高通量快速检测目的, 几个基因能够同时检测到的浓度为 1.25 ng / μL, 检测灵敏度能够满足未来转基因马铃薯产品的检测技术要求。但

受到多重 PCR 扩增能力的限制或者缺乏转基因信息等元素, 对该方法的使用还属于初级研究阶段。但随着研究的深入和技术的进步, 该方法在基因检测, 甚至植物领域应用会更加广泛。

#### [ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] 高宏伟, 梁成珠, 张艺兵, 等. 马铃薯中转基因成分定性 PCR 检测方法[S] // 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准, SN/T 1198-2003, 北京: 中国标准出版社, 2003.

[ 2 ] 曹际娟, 曹远银. NewLeaf-Y-(TM)转基因马铃薯 PCR 检测鉴定方法的建立[J]. 生物技术通讯, 2002, 13(5): 353-355.

[ 3 ] 高宏伟, 陈长法, 董道峰. 转基因马铃薯 PCR 检测方法[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2002, 33(4): 428-433.

[ 4 ] 邵碧英, 陈文炳, 杨婕. 马铃薯及其制品中转基因成分的多重 PCR 检测[J]. 食品科学, 2006, 27(1): 178-181.

[ 5 ] Chaouachi M, Malki R, Berard A, et al. Development of a realtime PCR method for the differential detection and quantification of four solanaceae in GMO analysis: potato (*Solanum tuberosum*), tomato (*Solanum lycopersicum*), eggplant (*Solanum melongena*), and pepper (*Capsicum annuum*)[J]. J Agric Food Chem. 2008, 56 (6): 1818-1828.

[ 6 ] Summary information format (SNIF) for products containing genetically modified higher plants (GMHPs). POTATO CLONE EH92-527-1 [EB/OL]. (2003-03-02) [2011-01-17]. <http://www.gmo-compass.org/eng/gmo/db/17.docu.html>.

[ 7 ] Broothaerts W, Corbisier P, Emons H. Development of a certified reference material for genetically modified potato with altered starch composition [J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(12): 4728-4734.

[ 8 ] 陈颖, 张祥林, 徐宝梁, 等. 番茄中转基因成分定性 PCR 检测方法[S] // 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准, SN/T 1816-2006, 北京: 中国标准出版社, 2006.

[ 9 ] 陆连寿, 张秀英, 郑明. 变性高效液相色谱检测技术在微生物领域的应用[J]. 中国兽药杂志, 2009, 43(9): 40-44.

[ 10 ] 李莉, 王翀, 陈瑶生. DHPLC 系统工作原理及其应用[J]. 生物技术通报, 2006(增刊): 120-124.

[ 11 ] Negariu O, Heerema N A, Dlouhy S R, et al. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol [J]. Bio Techniques, 1997, 3 (23): 504-511.

关于 2011 年中国马铃薯大会代表通讯录广告征集的通知

2011 年中国马铃薯大会代表通讯录的广告征集工作已经开始, 为使通讯录顺利出版, 请各单位提前做好版面设计(版面大小要求 216 mm × 291 mm), 及时与本编辑部进行沟通, 价格及其他详情电话或邮箱联系。

电 话 : 0451-55190003 ; E-mail : potatojb@neau.edu.cn