

技术与方法

电化学发光 PCR 技术检测转基因植物 *

刘晋峰 邢达 ** 沈行燕 朱德斌

(华南师范大学激光生命科学研究所, 广州 510631)

摘要 随着转基因植物种类的增多, 转基因植物的检测也成了当今的热门话题. 电化学发光法是将电化学与化学发光两种高灵敏度方法相结合, 实现了检测的高效、准确、无毒害. 电化学发光 PCR 法首次将电化学发光技术、PCR 技术和双探针杂交技术结合起来, 用于检测 CaMV (cauliflower mosaic virus) 35 S 启动子, 从而判断其是否含有转基因成分. PCR 产物与生物素标记的探针杂交, 可以起到筛选的作用; 与三联吡啶标记的探针杂交则可用于电化学发光检测. 两种探针同时与转基因样品 PCR 产物杂交, 使结果避免假阳性的影响而更加准确. 实验表明: 此方法可以准确地检测到 35 S 启动子的存在. 该方法灵敏度高, 可靠性强, 操作简便, 结果准确, 有望成为一种高效的转基因检测方法.

关键词 电化学发光, 转基因植物, CaMV35 S 启动子

学科分类号 Q63

转基因生物体或遗传工程体 GMO (genetically modified organisms) 是借助于基因工程技术将外源基因转入生物体内, 实现基因在生物体内表达而获得一种具有新的优良性状的生物体^[1]. 目前, 世界上转基因植物已经有一百多种, 全球转基因植物田间试验数量超过 1 万例. 转基因作物在带来巨大效益的同时也有许多潜在问题, 转基因作物的安全性在全球范围内引起了激烈的争论与普遍关注^[2]. 关于 GMO 检测方法目前主要是 ELISA 法和 PCR 法, 但都存在着一些不足之处. ELISA 法检测 GMO 时, 因蛋白质容易热变性, 所以很难检测转基因原料加工的食品, 另外, ELISA 法的灵敏度较低, 而且耗力耗时; 普通 PCR 法是特异性扩增 GMO 中的启动子, 终止子或外源基因, 通过凝胶电泳, 从而达到检测的目的, 此法比 ELISA 法灵敏度高, 但是容易产生非特异性扩增和假阳性结果.

电化学发光 (electrochemiluminescence, ECL) 是指通过电化学方法产生一些特殊的物质, 然后这些电生物质之间或电生物质与其他物质之间进一步反应产生的一种发光现象. 它是化学发光与电化学方法相互结合的产物^[3]. 其工作原理如下: 化学发光剂三联吡啶钌 $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ 和电子供体三丙胺 (TPA) 在阳极表面分别被氧化成 $[Ru(bpy)_3]^{3+}$ 和 TPA^+ . TPA^+ 很不稳定, 失去一个质子 (H^+), 形成强还原剂 $TPA\cdot$. 这两个反应基团

($[Ru(bpy)_3]^{3+}$ 和 TPA^+) 在电极表面迅速反应, 三价的 $[Ru(bpy)_3]^{3+}$ 被还原形成激发态的二价 $[Ru(bpy)_3]^{2+}$, $TPA\cdot$ 自身被氧化成二丙胺和丙醛. 接着激发态的 $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ 衰减成基态的 $[Ru(bpy)_3]^{2+}$, 同时发射一个波长为 614 nm 的光子 (图 1)^[7]. 这一过程在电极表面周而复始地进行, 产生许多光子, 使光信号得以增强, 从而使检测灵敏度大大提高^[4]. 与其他几种标记技术相比,

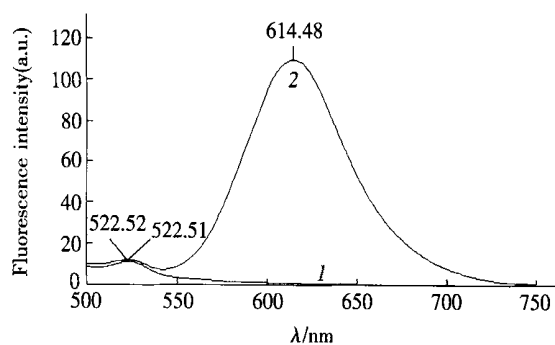


Fig. 1 Fluorescence spectrum of $[Ru(bpy)_3]^{2+}$

1: Fluorescence spectrum of DMF; 2: Fluorescence spectrum of $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ in DMF excitation = 456 nm.

*国家自然科学基金面上资助项目 (60378043), 广东省自然科学基金团队资助项目 (015012) 和广东省科技计划资助项目 (2002C20607).

**通讯联系人.

Tel: 020-85210089, E-mail: xingda@scnu.edu.cn

收稿日期: 2003-09-15, 接受日期: 2003-11-10

ECL 有许多优点: 无放射性危害, 是一种在电极表面由电化学引发的特异性化学发光反应, 灵敏度高, 检测线性范围宽, 检测速度快, 检测仅需几十秒到几分钟, 与其他化学发光体系相比, 标记物三联吡啶钌复合物相当稳定^[5~7].

据报道, 大约 75% 的转基因植物中使用 CaMV (cauliflower mosaic virus) 35 S 启动子^[2], 检测样品中是否含有 CaMV35 S 启动子, 可知样品是否转基因植物. 本文中, 首次利用电化学发光检测仪检测 35 S 启动子, 从而判断是否存在转基因成分, 希望通过此实验发展一种高灵敏度的转基因植物检测方法.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 转基因植物叶片: 转基因番木瓜叶片来自华南农业大学资源与环境学院.

1.1.2 引物及探针: 上游引物为 5' gtcctacaatgccatca 3', 下游引物为 5' gatagtgggattgtgcgtca 3'^[8]. 探针 1 为 5' cggcagaggcatcttcaacgatggcc-biotin 3', 探针 2 为 5' Rurtttccacgatgctcctcgtgggtggg 3'.

以上引物和探针的核苷酸序列均由上海生工生物工程技术有限公司合成.

1.1.3 主要试剂: UNIQ-10 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒、Taq DNA 聚合酶、dNTP、100 bp DNA Ladder 均购于上海生工生物工程技术有限公司.

1.1.4 仪器: 电化学发光检测仪器由本课题组自行设计. 其结构示意图如图 2 所示, 主要由带有磁富集电极的电化学发光反应样品池、恒电位仪 (HDV-7C, 福建三明无线电二厂)、单光子计数模

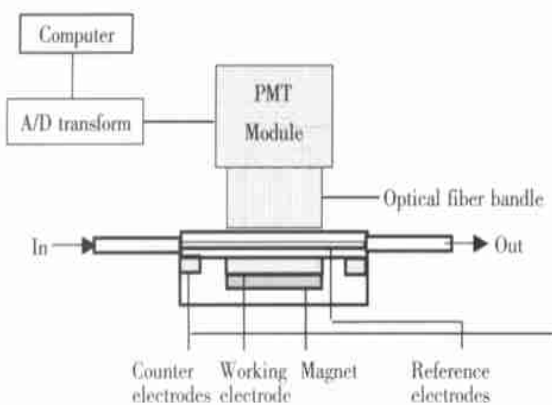


Fig. 2 A diagram of the essential components of the instrument

块 (MP-962, Perkinelmer)、信号采集与处理系统构成. 其中, 样品池中的工作电极与对电极分别采用铂片和环状铂丝结构. 光子收集和传输采用石英光纤束 (通光截面 5 mm, 南京春辉科技实业有限公司). 单光子计数模块由高灵敏度通道光电倍增管、高压电源、信号前放大器、放大甄别器等集成, 它将单个光子信号最终转换为标准 TTL 脉冲, 再由计数模块采集数字脉冲信号输入计算机. 数据采集和处理均采用以 Labview 编程语言自行开发的软件.

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取: 取 0.2 g 样品叶片, 按照 UNIQ-10 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒操作步骤提取基因组 DNA.

1.2.2 PCR 扩增: 转基因植物叶片, 非转基因植物叶片, 水 (作为阴性对照) 以相同的条件进行 PCR 扩增, 扩增条件为: 94 3min (使基因组 DNA 变性), 以下进行 40 个循环, 94 20 s, 54 40 s, 72 60 s, 40 个循环结束后, 在 72 下延伸 3 min.

1.2.3 核酸探针杂交: 取扩增产物 15 μ l, 加入过量的核酸探针, 置于水浴锅中控制温度进行杂交, 94 5 min, 65 1 h^[9].

1.2.4 电化学发光检测: 依次将杂交后非转基因植物和转基因植物样品连上链霉亲和素包被的磁珠^[4,10], 用清洗液清洗以除去游离的探针, 然后, 分别加入样品池中进行电化学发光检测. 每次加样前, 用蒸馏水清洗样品池.

2 结果与讨论

转基因植物检测方法的基本原理如图 3 所示. 如前所述, 本文采用 Lipp 等的方法对转基因植物的 CaMV35S 启动子中一段 195 bp 序列特异扩增, 由于非转基因植物 DNA 中不含 CaMV35S 启动子而不被扩增. PCR 产物变性后在杂交缓冲液中与过量的两种核酸探针杂交, 两种探针分别标记有生物素和三联吡啶钌, 非特异性扩增产物不能与探针杂交. 杂交后的产物通过生物素与链霉亲和素包被的磁珠连接, 将生物素标记的 DNA 序列收集到样品池中, 其他的成分则被洗去. 随后, 用电化学发光检测仪检测样品池中的电化学发光信号. 因为该信号是由三联吡啶钌复合物产生, 所以就可以根据发光信号的强度确定成功杂交两条探针的序列含量, 从而可以确定样品中是否含有转基因的成分.

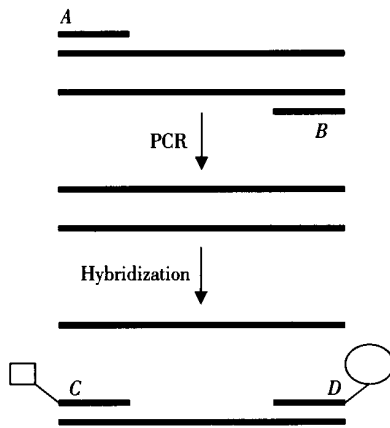


Fig. 3 The basic principle of GMO detection

A, B: primer; C: biotin-labeled probe; D: ruthenium-labeled probe; \square : biotin; \circ : ruthenium.

2.1 仪器灵敏度测试

图 4 是 pmol 级不同含量标记样品的电化学发光信号检测结果。样品由低浓度到高浓度依次检测，每次样品检测后用蒸馏水清洗样品池，待仪器本底降到相同的信号值再进行新的样品检测，以避免信号叠加产生的误差。由图 4 可知：电化学发光检测仪可以检测到 0.1 pmol 的标记样品，并在样品含量 0.1 pmol 至 256 pmol 之间有很好的线性度。

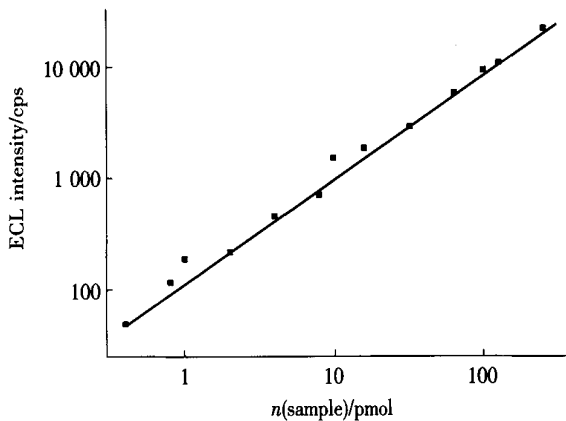


Fig. 4 Detection of picomolar quantity of samples

2.2 双探针杂交

两条探针是根据转基因植物扩增片段中的序列设计的。样品在进行杂交之前要进行热变性，使双链 DNA 解链成为两条单链。然后，两条过量的探针与单链 DNA 进行杂交。杂交上探针的转基因植物 PCR 产物可以被磁珠选择性地吸附，从而分离出来，用于电化学发光检测。因为非转基因植物 PCR 产物和由于非特异性扩增产物中不含与探针

匹配的序列，所以不能和核酸探针杂交，这样可以减少非特异性扩增带来的假阳性结果的产生。

2.3 电化学发光检测结果

图 5 为电化学发光检测转基因番木瓜叶片的结果。样品 1 为空白对照，样品 2 为非转基因番木瓜叶片，样品 3 为未转基因番木瓜叶片。可以看出，在空白对照与非转基因叶片检测中，电化学发光信号基本一致，而转基因叶片电化学发光检测信号已经超过 100，信噪比很高。因此，可以通过观察电化学发光信号的强度，来判断植物样品中是否含有转基因的成分，从而实现转基因植物的检测。

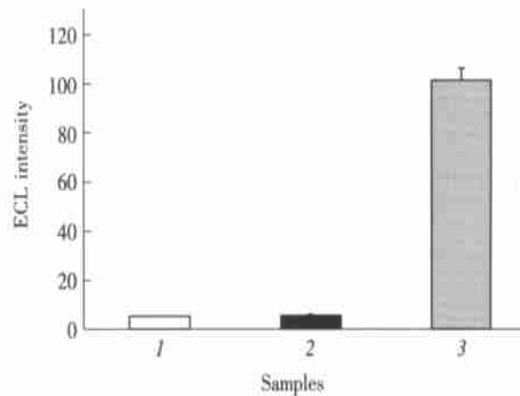


Fig. 5 The detection of genetically modified papaya leaf

1: control; 2: non-GM papaya leaf; 3: GM papaya leaf.

为了验证该方法的可行性，本文用 PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。转基因植物 PCR 产物的凝胶电泳出现一条 195 bp 的片段，非转基因植物 PCR 产物和空白对照无任何明显条带产生 (图 6)。与电化学发光法检测的结果一致。

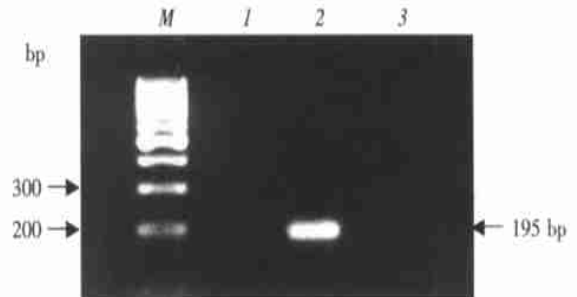


Fig. 6 PCR amplification of genetically modified plant DNA

M: 100 bp DNA ladder; 1: control; 2: PCR product of GM plant; 3: PCR product of non-GM plant.

20 世纪 90 年代初 Kenten 等^[10]建立了电化学发光核酸分析方法，随着生物工程技术的进步，该

法在基因检测中得到了很好的应用。然而，到目前为止，国内外尚未有文献报道将该法用于转基因植物的检测。本文首次将电化学发光分析方法、PCR技术和双探针杂交技术结合起来用于转基因植物的检测，希望通过此实验能够建立一种新的快速准确检测转基因植物的方法。结果显示：非转基因植物样品的电化学发光信号只有几个计数，与空白对照基本一致，我们认为检测不到信号；转基因植物样品的电化学发光信号强度约为101，可以明显检测到发光信号。转基因和非转基因植物样品的电化学发光信号的信噪比很高，因此，我们认为通过电化学发光PCR方法检测转基因植物是可行的。在核酸探针杂交过程中，PCR产物与生物素标记探针杂交可以起到样品筛选的作用，与连钉探针杂交的目的则是用于电化学发光的检测。采用双探针杂交能够避免因为PCR非特异性扩增产生的假阳性结果，提高结果的准确性。该方法所用的试剂中没有电泳检测中溴化乙锭、同位素等毒害物质。与传统的凝胶电泳检测方法相比，该法操作简便。电化学发光PCR法检测转基因植物具有较宽的线性度，可望将其发展成为一种定量检测转基因植物的方法。

参 考 文 献

1 Mannelli I, Minunni M, Tombelli S, *et al.* Quartz crystal

- microbalance (QCM) affinity biosensor for genetically modified organisms (GMOs) detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 2003, **18** (2-3): 129-140
- 2 吕山花, 邱丽娟, 陶波. 转基因植物食品检测技术研究进展. *生物技术通报*, 2002, (4): 34-38
- L ü S H, Qiu L J, Tao B. *Biotechnology Bulletin*, 2002, (4): 34-38
- 3 徐国宝, 董绍俊. 电化学发光及其应用. *分析化学*, 2001, **25** (1): 103-108
- Xu G B, Dong S J. *Chin J Anal Chem*, 2001, **25** (1): 103-108
- 4 Blackburn G F, Shah H P, Kenten J H, *et al.* Electrochemiluminescence detection for development of immunoassays and DNA probe assays for clinical diagnostics. *Clin Chem*, 1991, **37** (9): 1534-1539
- 5 Deaver D R. A new non-isotopic detection system for immunoassays. *Nature*, 1995, **377** (6551): 758-760
- 6 Yang H, Leland J K, Yost D, *et al.* Electrochemiluminescence: a new diagnostic and research tool. *Biotechnology*, 1994, **12** (2): 193-194
- 7 朱德斌, 邢 达, 沈行燕, 等. 一种基于电化学发光技术的高灵敏度 Presenilin-1 基因点突变检测方法. *科学通报*, 2003, **48** (13): 1424-1427
- Zhu D B, Xing D, Shen X Y, *et al.* *Chinese Science Bulletin*, 2003, **48** (13): 1424-1427
- 8 Lipp M, Brodman P, Pietsch K, *et al.* IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soybeans and maize in dried power. *J AOAC Inter*, 1999, **82**: 923-928
- 9 de Jong M D, Weel J F L, Schuurman T, *et al.* Quantitation of varicella-zoster virus DNA in whole blood, m, plasma, and serum by PCR and electrochemiluminescence. *J Clin Micro*, 2000, **38** (7): 2568-2573
- 10 Kenten J H, Casadei J, Link J, *et al.* Rapid electrochemiluminescence assays of polymerase chain reaction products. *Clin Chem*, 1991, **37** (9): 1626-1632

Detection of Genetically Modified Plant by Electrochemiluminescence PCR Method *

L IU Jin-Feng, XING Da **, SHEN Xing-Yan, ZHU De-Bin

(Institute of Laser Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract With the rapid development of the genetically modified plant, more and more genetically modified plant food has been pouring into the market. It has been paid much attention to detection of GMP under the controversy of GMP safety. Electrochemiluminescence method is the chemiluminescent reaction of species that are generated electrochemically at the surface of an electrode. It is a high efficiency and accurate detection method. Electrochemiluminescence PCR method makes electrochemiluminescence technique, PCR technique and two nucleic acid probes hybridization technique band together for the first time. In this method, whether plant containing GM component by detection of CaMV (Cauliflower mosaic virus) 35S promoter are distinguished. The results show thus, it is indicate that, the method can detect genetically modified plant exactly. The method is simple, reliable and correctly for analysis of GMP.

Key words electrochemiluminescence, genetically modified plant, CaMV35S promoter

* This research is supported by The National Natural Science Foundation of China (60378043), The Research Team Project of The Natural Science Foundation of Guangdong Province (015012), and The Project of Science and Technology of Guangdong Province (2002C20607).

** Corresponding author. Tel: 86-20-85210089, E-mail: xingda@sclu.edu.cn

Received: September 15, 2003 Accepted: November 10, 2003