应用多重 PCR 技术筛选检测转 Bt 基因作物

李飞武[1,2]，闫伟[1]，龙丽坤[1]，李葱葱[1]，张世宏[2]，张明[1]
（1.吉林省农业科学院，吉林长春 130033）（2.吉林大学植物科学学院，吉林长春 130033）

摘要：Bt 基因在抗虫转基因作物中广泛应用，是转基因食品筛选检测中最主要的目的基因。本研究依据核苷酸序列分析结果，将在转基因作物中常见的 8 种 Bt 基因（*cry1Ab*、*cry1Ac*、*cry1Ab/Ac*、*cry1A.105*、*cry1Ac-M*、*cry2Ab*、*cry3A* 和 *cry3Bb*）划分为 cry1A、cry2A、cry3A 三个组，并根据每个组的一致性序列设计了可分别检测各组 Bt 基因的特异性检测引物，其中 cry1A 组采用了简并引物，经过特异性、灵敏度等测试，建立了针对 cry1A 组、cry2A 组和 cry3A 组的单一 PCR 检测方法。此外，通过将这三对检测引物放入同一 PCR 体系中，还建立了可特异检测上述 3 组 Bt 基因的三重 PCR 方法。结果表明，本研究建立的单一 PCR 和三重 PCR 方法均可从各类样品中准确检测出预期 *Bt* 基因成分，检测灵敏度达到 0.1%。本方法特异性强、灵敏度高，在转基因成分的筛选检测中有很好的应用前景。

关键词：转基因生物；多重 PCR；简并 PCR；Bt 基因；筛选检测
文章篇号：1673-9078(2014)5-262-266

Screening Detection of *Bt* Genes in Genetically Modified Crops Using a Multiplex PCR Assay

LI Fei-wu[1,2], YAN Wei[1], LONG Li-kun[1], LI Cong-cong[1], ZHANG Shi-hong[2], ZHANG Ming[1]
(1.Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)
(2.College of Plant Science, Jilin University, Changchun 130033, China)

Abstract: Since *Bt* genes were widely used in insect-resistant transgenic crops, they became the most important target genes in screening genetically modified food. Based on nucleotide sequences analysis, eight common *Bt* genes (*cry1Ab, cry1Ac, cry1Ab/Ac, cry1A.105, cry1Ac-M, cry2Ab, cry3A and cry3Bb*) in transgenic crops were divided into cry1A, cry2A and cry3A groups. To detect three groups of *Bt* genes, degenerate primers for cry1A group and specific primers for cry2A and cry3A groups were designed according to the consensus sequences of each group, and three singlet PCR methods for each group respectively were established after testing specificity and sensitivity in this study. In addition, using the three pairs of PCR primers, a triplex PCR method also established to screen the three groups of *Bt* genes simultaneously. The results revealed that these methods could accurately detect the targeted *Bt* genes from the various transgenic samples, and the detection sensitivity was up to 0.1%. As the method established in this study showed highly specific and sensitive, it would be a good prospect in the screening of genetically modified organism.

Key words: genetically modified organisms; multiplex PCR; degenerate PCR; Bt gene; screening detection

转基因技术作为现代生物技术的核心，在现代农业中广泛应用。自 1996 年转基因作物实现大规模商业化推广以来，全球种植面积以接近 10%的平均速率逐年迅猛增长，2012 年超过了 1.7 亿公顷[1]。随着转基因技术的不断发展，人们对于转基因生物及其产品的安全性的关注度越来越高，围绕转基因生物的环境安全和食用安全展开了长期而广泛的争论。为此，包括我国在内的 50 多个国家和地区建立了标识制度，对转基因产品实行严格监管[2]。标识监管制度的实施，依赖于快速、灵敏、准确的检测方法。

目前转基因产品检测技术主要分为两大类，一类以外源 DNA 为检测对象，如 PCR、LAMP 等，另一类以外源基因表达的蛋白质为检测对象，如 ELISA、快速检测试纸条等[3-4]。其中，PCR 方法表现出良好的灵敏度、准确度和稳定性，是当前应用最广的转基因检测技术，国内外已建立的转基因检测方法标准中绝大多数都是基于 PCR 技术。与 1 个反应体系中仅能

收稿日期：2014-01-13
基金项目：国家转基因生物新品种培育科技重大专项课题（2013ZX08012-001）；吉林省农业科技创新工程项目（2013）
作者简介：李飞武（1982-），男，博士生，助理研究员，研究方向为转基因生物安全
通讯作者：张世宏（1969-），男，博士，教授，研究方向为植物逆境分子生物学及抗逆基因工程

检测 1 种靶标 DNA 的单一 PCR 相比，多重 PCR 方法通过在单个反应管中加入多种靶标 DNA 的检测引物，可在 1 个反应体系中同时检测多至 10 余种靶标 DNA，大大提高检测效率，现已越来越多地应用到转基因检测方法研究中[5~6]。

抗虫性是目前转基因生物研究和产业化的最重要的性状之一，2012 年全球含有抗虫性状的转基因作物的种植面积占全部转基因作物种植面积的 41%[1]，使用频率最高的抗虫基因均为来源于苏云金芽孢杆菌的 Bt 基因，如 *cry1Ab*、*cry1Ac*、*cry2Ab* 等，因此，以 Bt 基因为检测对象的 PCR 方法在转基因生物监管中具有很好的实用性。

本研究以最常用的 8 种 Bt 基因为对象，在核苷酸序列分析基础上将其分为 3 类，每类筛选出 1 对引物，通过特异性和灵敏度验证，建立了可分别检测 3 类 Bt 基因的单一 PCR 方法，以及可同时检测 3 类 Bt 基因的三重 PCR 方法。

1 材料与方法

1.1 植物材料

转基因玉米 MON810、MON89034、MON88017、MON863，转基因棉花 MON531、MON15985 由孟山都公司惠赠；转基因玉米 Bt11、Bt176、MIR604 由先正达公司惠赠；转基因玉米 Bt38 由中国农业大学惠赠；转基因水稻 TT51-1 由华中农业大学惠赠；非转基因玉米、水稻、棉花为本实验室保存样品。转基因材料中的 *Bt* 基因信息见表 1。

表 1 转基因材料中 *Bt* 基因信息

Table 1 Description of *Bt* gene in transgenic crops

转化体名称	cry1A 组					cry2A 组	cry3A 组	
	cry1Ab	*cry1Ac*	*cry1Ab/Ac*	*cry1A.105*	*cry1Ac-M*	cry2Ab	cry3A	cry3Bb
Bt11	√							
Bt176	√							
MON810	√							
Bt38					√			
TT51-1			√					
MON531		√						
MON15985		√				√		
MON89034				√		√		
MIR604							√	
MON863								√
MON88017								√

注：“√”表示样品中含有相应的 Bt 基因。

1.2 主要试剂和仪器

植物基因组 DNA 提取试剂盒，购自北京天根生物技术有限公司；HS-Taq DNA 聚合酶、dNTPs、DNA 分子量 Marker 等，购自大连宝生物工程有限公司；GeneFinder 核酸染料，购自厦门百维信生物科技有限公司。

Bio-Rad C1000 型 PCR 仪、Bio-Rad GelDoc XR+ 凝胶成像系统、Thermo Fisher ND1000 紫外/可见光分光光度计。

1.3 实验方法

1.3.1 基因组 DNA 提取

按照植物基因组 DNA 提取试剂盒的操作说明，提取样品的基因组 DNA，并使用 ND1000 分光光度计测定 DNA 浓度和纯度，用 1×TE 缓冲液稀释至 50 ng/μL，放于 4 ℃备用。

1.3.2 Bt 基因核苷酸序列分析及引物设计

应用 Vector NTI Advance® 11.5（美国 Life Technologies公司）对 8 种不同Bt基因的核苷酸序列进行比对分析。根据序列分析结果，使用Primer Premier 5.0（加拿大Premier公司）设计特异性引物。引物信息详见表 2。所有引物由上海生工生物公司合成和纯化，用双蒸水稀释至 10 μmol/L备用。

1.3.3 PCR 反应体系及程序

单一 PCR 采用 25 μL 反应体系，各组分终浓度为：1×PCR buffer（10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.3)，50 mmol/L KCl，1.5 mM $MgCl_2$），200 μmol/L dNTP，200 nmol/L 上下游引物，1 U HS-Taq DNA 聚合酶，100 ng DNA 模板。PCR 扩增程序：95 ℃预变性 5 min；94 ℃

变性 30 s，65 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 30 s，共 35 个 循环；72 ℃延伸 7 min。

表 2 引物序列信息

Table 2 List of the primers used in this study

检测对象	引物名称	序列(5'-3')	扩增产物大小/bp
cry1A 组	cry1A-F	CAA*Y*ATCGGTATCAACAACCAGC	150
	cry1A-R	GGCAC*R*TTGTTGTTCTGTGGTGG	
cry2A 组	cry2A-F	GGCAAACCGAGTCCTTCGAGAC	364
	cry2A-R	TCGGAGATGAAGGTGCGTGTCT	
cry3A 组	cry3A-F	CTTCCTGAACACCATCTGGCCC	232
	cry3A-R	GAACAGCTCGCGGATGCGG	

三重 PCR 的反应体系和程序与单一 PCR 相同，仅在反应体系中加入了 3 对引物，每条引物的终浓度均为 200 nmol/L。

PCR 结束后，取 5 μL 扩增产物用 2%的琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 Bt 基因序列分析及引物设计

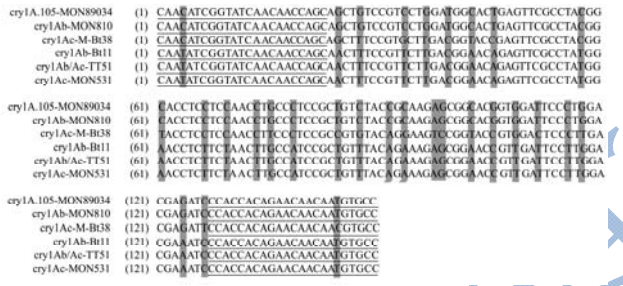


图 1 cry1A 组 Bt 基因的核苷酸序列比对结果

Fig.1 Alignment of the nucleotide sequences for the cry1A group of Bt gene

注：阴影部分表示序列存在差异；下划线部分为引物结合位置。

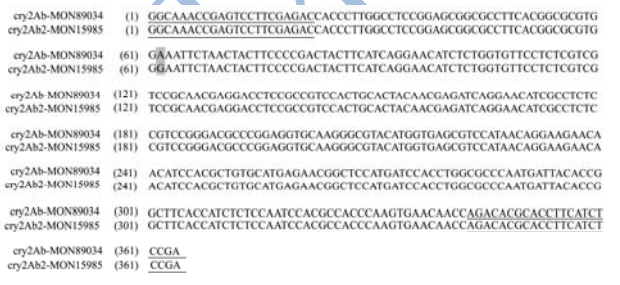


图 2 cry2A 组 Bt 基因的核苷酸序列比对结果

Fig.2 Alignment of the nucleotide sequences for the cry2A group of Bt gene

注：阴影部分表示序列存在差异；下划线部分为引物结合位置。

利用转基因生物检测方法数据库（GMDD）、GenBank 数据库、专利等文献途径，获得 8 种 Bt 基因的核苷酸序列。根据序列同源性比对分析结果（见图 1~3），可将这 8 种 *Bt* 基因分为三组：cry1A 组（*cry1Ab*、*cry1Ac*、*cry1Ab/Ac*、*cry1A.105*、*cry1Ac-M*），cry2A 组（*cry2Ab*），cry3A 组（*cry3A*、*cry3Bb*）。

以各组 Bt 基因的一致性序列为模板，设计针对每组 Bt 基因的特异性检测引物，引物结合位置见图 1~3。特别地，由于 cry1A 组中的 5 种 Bt 基因的核苷酸序列存在较大差异，在引物设计时采用了简并碱基，其上下游引物各含有 1 个简并碱基。引物序列及扩增产物大小等信息见表 2。



图 3 cry3A 组 Bt 基因的核苷酸序列比对结果

Fig.3 Alignment of the nucleotide sequences for the cry3A group of Bt gene

注：阴影部分表示序列存在差异；下划线部分为引物结合位置。

2.2 单一 PCR 方法的特异性

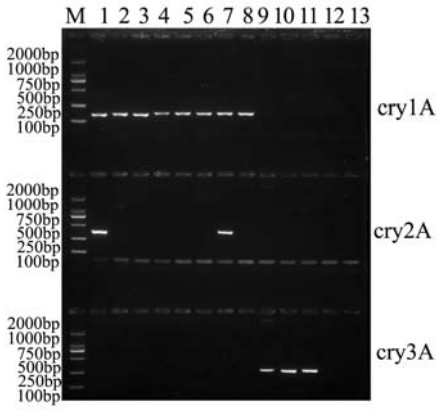


图 4 单一 PCR 检测 Bt 基因的特异性

Fig.4 Specificity of the singlet PCR for detection of Bt gene

注: M 为 DL2000 DNA Marker; 1~13 分别为 MON89034、MON810、Bt11、Bt176、Bt38、MON531、MON15985、TT51-1、MON863、MON88017、MIR604、非转基因对照、空白对照。

以质量分数为 1%的转基因玉米 MON89034、MON810、Bt11、Bt176、Bt38、MON863、MON88017、MIR604，转基因棉花 MON531、MON15985，转基因水稻 TT51-1 等 11 种转基因作物，以及非转基因玉米、棉花、水稻为研究对象，测试针对每组 Bt 基因的单一 PCR 检测方法的特异性。结果如图 4 所示，3 种单一 PCR 方法均能特异性地从上述转基因样品中检测到与预期一致的 Bt 基因（每种样品的预期结果见表 1），而在非转基因阴性对照和空白对照中无任何扩增，说明设计的 Bt 基因筛选检测引物具有很好的特异性。

2.3 单一 PCR 方法的灵敏度

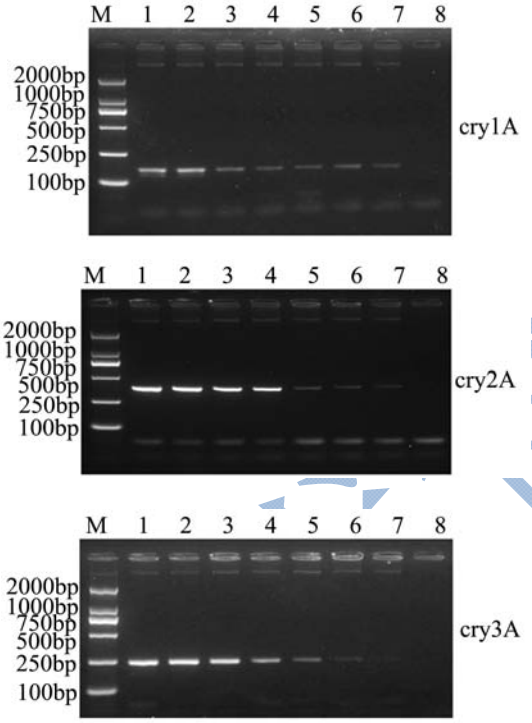


图 5 单一 PCR 检测 Bt 基因的灵敏度

Fig.5 Sensitivity of the singlet PCR for detection of Bt gene

注: M 为 DL2000 DNA Marker; 对 cry1A-F/R 和 cry2A-F/R，1~8 分别代表质量分数为 10%、5%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、0.01%、0 的 MON89034 玉米样品；对 cry3A-F/R，1~8 分别代表质量分数为 10%、5%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、0.01%、0 的 MON863 玉米样品。

将 100%的 MON89034 玉米粉与非转基因玉米粉按质量比混合，制备成 MON89034 玉米质量分数分别为 10%、5%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、0.01%的 7 份样品，作为 cry1A 组和 cry2A 组 Bt 基因检测方法灵敏度测试样品；采用同样的方法制备不同含量的 MON863 玉米样品，作为 cry3A 组 Bt 基因检测方法灵敏度测试样品。结果显示（图 5），3 个 PCR 检测体系均可从转基因含量为 0.1%，甚至更低含量的样品中检测出预期 Bt 基因成分，表明本研究建立的 Bt 基因筛选检测方法的检出限可达到 0.1%。

2.4 多重 PCR 方法的特异性

为提高检测效率，将 3 组 Bt 基因的检测引物置于同一 PCR 反应体系中，并经过反应体系和反应程序验证，建立了针对 8 种 Bt 基因的三重 PCR 检测方法。结果如图 6 所示，该方法可从阳性对照样品（MON89034 玉米和 MON863 玉米的等量混合样品）中同时扩增出 3 个预期片段产物，在 MON810、Bt11 等其他 10 种测试样品中也可获得与预期一致的检测结果（表 2），表明该方法具有很好的特异性。与单一 PCR 方法的扩增产物信号相比（见图 4），三重 PCR 方法中 cry1A 类 Bt 基因的扩增产物信号呈现不均等性，如 Bt176（泳道 3）、MON15985（泳道 9）等稍弱于其他转化体，但并未对结果判定造成影响。

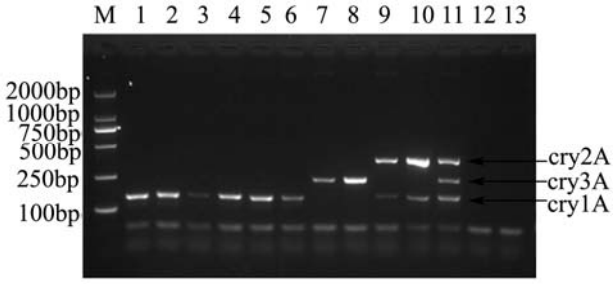


图 6 三重 PCR 检测 Bt 基因的特异性

Fig.6 Specificity of the triplex PCR for detection of Bt gene

注: M 为 DL2000 DNA Marker; 1~13 分别为 MON810、Bt11、Bt176、Bt38、MON531、TT51-1、MON863、MIR604、MON15985、MON89034、阳性对照、非转基因对照、空白对照。

2.5 多重 PCR 方法的灵敏度

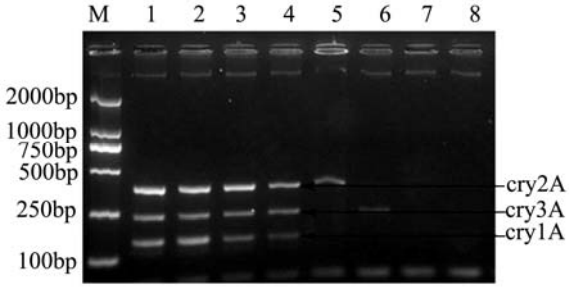


图 7 三重 PCR 检测 Bt 基因的灵敏度

Fig.7 Sensitivity of the triplex PCR for detection of Bt gene

注: M 为 DL2000 DNA Marker; 1~6 分别代表每种转化体质量分数 1%、0.5%、0.2%、0.1%、0.05%、0.01%的 MON89034

与 MON863 混合样品；7 为非转基因对照；8 为空白对照。

为验证多重 PCR 检测体系的灵敏度，将 100%的 MON89034 玉米粉和 100%的 MON863 玉米粉等量混匀后，再与非转基因玉米粉按质量比混合，制备成每种转化体质量分数分别为 1%、0.5%、0.2%、0.1%、0.05%、0.01%的样品，测试结果表明，应用本方法可从 0.1%及以上含量的测试样品中稳定检测出预期 *Bt* 基因成分（见图 7），表明该三重 PCR 方法的检测灵敏度可达到 0.1%。

3 讨论

Bt 蛋白具有良好的杀虫效果，在抗虫转基因作物中应用广泛。对天然的 Bt 基因序列进行基于密码子偏好性的改造，是转 Bt 基因作物研究的手段之一。根据国内外相关数据库的统计信息，在商业化抗虫转基因作物中应用的 Bt 基因已超过 10 个，涉及转基因玉米、大豆、棉花、马铃薯、番茄的 30 余个转化体。因此，建立 Bt 基因特异性的检测方法并应用到实际检测中，可为转基因生物监管提供重要的技术支撑。

当多个基因的核苷酸序列存在差异时，可通过在差异较小的区段设计简并引物，实现用 1 对引物检测多个靶标 DNA 的目的[7]。本研究在对 Bt11、Bt176、MON810、MON89034、TT51-1、MON531、MON15985、Bt38 等 8 种转基因作物中的 5 种 Bt 基因（*cry1Ab*、*cry1Ac*、*cry1A.105*、*cry1Ab/Ac*、*cry1Ac-M*）的核苷酸序列进行比较分析的基础上，筛选出 1 对简并引物，建立了可同时检测这 5 个基因的简并 PCR 方法，经验证，该方法具有良好的准确性，灵敏度可达 0.1%。

检测效率是评价转基因检测方法实用性的一个重要指标。本研究在建立 3 类 Bt 基因的单一 PCR 检测方法基础上，将 3 对引物放到同一 PCR 反应体系中，实现了在同一反应管中同时检测 3 类 Bt 基因的多重 PCR 方法，与其他文献报道[8~10]的 Bt 基因定性或定量 PCR 检测方法相比，大大提高了抗虫转基因作物的筛选检测效率，在转基因产品检测中有很好的应用前景。

4 结论

本研究采用简并 PCR、多重 PCR 等技术，建立了能分别检测 cry1A 类基因（*cry1Ab*、*cry1Ac*、*cry1A.105*、*cry1Ab/Ac*、*cry1Ac-M*）、cry2A 类基因（*cry2Ab*）和 cry3A 类基因（*cry3A*、*cry3Bb*）的单一 PCR 检测方法，以及可同时检测上述 3 类 Bt 基因的三重 PCR 检测方法。单一 PCR 和三重 PCR 方法均可从各类样品中准确检测出预期 Bt 基因成分，检测灵敏度达到 0.1%，适用于抗虫转 Bt 基因作物的筛选检测。与单一 PCR 相比，三重 PCR 在保证准确性和灵敏度的前提下，表现出更高的检测效率。

参考文献

[1] Clive James. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2012 [R]. Ithaca, NY: ISAAA, 2012

[2] 张大兵,郭金超.转基因生物及其产品检测技术和标准化[J].生命科学,2011,23(2):195-204
ZHANG Da-bing, GUO Jin-chao. The development and standardization of testing approaches for genetically modified organisms and their derived products [J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2011, 23(2): 195-204

[3] ZHANG Miao, LIU Yi-nan, CHEN Li-li, et al. One simple DNA extraction device and its combination with modified visual loop-mediated isothermal amplification for rapid on-field detection of genetically modified organisms [J]. Analytical Chemistry, 2013, 85(1): 75-82

[4] 王小玉,邝筱珊,胡松楠,等.LAMP实时浊度法快速检测转基因玉米MON810[J].现代食品科技,2013,29(12):3002-3005
WANG Xiao-yu, KUANG Xiao-shan, HU Song-nan, et al. A real-time turbidimeter-based loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of genetically modified maize MON810 [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(12): 3002-3005

[5] XU Wen-tao, ZHAI Zhi-fang, HUANG Kun-lun, et al. A novel universal primer-multiplex-PCR method with sequencing gel electrophoresis analysis [J]. PLos One, 2012, 7(1): e22900

[6] A. Holck, B O Pedersen, E Heir. Detection of five novel GMO maize events by qualitative, multiplex PCR and fluorescence capillary gel electrophoresis [J]. European Food Research and Technology, 2010, 231(3): 475-483

[7] GUO Jin-chao, CHEN Li-li, LIU Xin. A multiplex degenerate PCR analytical approach targeting to eight genes for screening GMOs [J]. Food Chemistry, 2012, 132(3): 1566-1573

[8] Suchitra Kamle, Arvind Kumar, Raj K. Bhatnagar. Developme nt of multiplex and construct specific PCR assay for detecti on of *cry2Ab* transgene in genetically modified crops and product [J]. GM Crops, 2011, 2(1): 74-81

[9] 王东,宋君,雷绍荣,等.SYBR® Green I实时PCR检测转Cry1Ab/c基因水稻[J].中国测试,2009,35(3):84-86
WANG Dong, SONG Jun, LEI Shao-rong, et al. Detection for Bt transgenic rice with SYBR® green I real time PCR [J]. China Measurement & Test, 2009, 35(3): 84-86

[10] 吴孝槐,路勇.利用实时荧光PCR方法检测转Bt基因大米[J].现代食品科技,2009,25(2):211-216,220

WU Xiao-huai, LU Yong. Detection of BT transgenic rice gene by real-time fluorescence PCR [J]. Modern Food Science and Technology, 2009, 25(2): 211-216,220

现代食品科技