

文章编号:1005-8737(2001)04-0013-05

## 用地高辛标记的 PCR-ELISA 技术快速检测转基因鱼

陈 茹,林志雄,刘琳琳,朱道中,罗长保,颜思通  
(广州出入境检验检疫局 动物检疫实验室,广东 广州 510406)

**摘 要:**取含有小鼠重金属螯合蛋白(mMT)基因启动子及人生长激素(hGH)基因的鱼样品,以 Qiagene 核酸纯化技术对鱼组织 DNA 进行纯化。常规 PCR 检测显示, mMT 启动基因和 hGH 基因的 PCR 产物分别为 240 bp 和 130 bp, 与设计相符。PCR 产物的核酸测序结果证实其扩增产物具特异性。地高辛-PCR(Dig-PCR)标记反应显示, 2 个基因均产生 1 条 Dig 标记的特异产物带。Dig-PCR-ELISA 检测敏感性试验显示, 对 mMT 启动子和 hGH 基因的检测敏感性可达  $10^{-3}$ , 与常规 PCR 结合琼脂糖凝胶电泳检测方法相比, 检测敏感性可提高至 100~1 000 倍。试验证明, 针对 mMT 和 hGH 基因所建立的 Dig-PCR-ELISA 技术特异可靠。

**关键词:** Dig-PCR-ELISA; 小鼠重金属螯合蛋白基因启动子; 人生长激素基因; 转基因鱼; 快速检测  
**中图分类号:** S961.6      **文献标识码:** A

转基因生物及其产品(GMOs)已成为世界关注的焦点之一。有关转基因鱼的研究在中国、加拿大、美国、英国、日本已取得可喜进展<sup>[1-3]</sup>。虽然在转基因鱼的研制过程中, 研究者已通过运用分子生物学技术检测外源基因来筛选阳性个体, 所应用的技术有 PCR、斑点杂交、Southern 杂交等<sup>[2-5]</sup>, 但目前尚无专题研究报道。地高辛标记的 PCR-ELISA 技术(DIG-PCR-ELISA)已成功应用于动植物病原体的检测<sup>[6,7]</sup>, 但应用于转基因鱼检测尚未见报道。本研究将该技术应用于检测转基因鱼的两种外源基因, 检测效果理想。

### 1 材料和方法

#### 1.1 转基因鱼材料来源

含小鼠重金属螯合蛋白(mMT)启动子和人生长激素(hGH)基因的转基因鱼样品及非转基因鱼样品(阴性)由中国科学院武汉水生生物研究所提供。

收稿日期:2001-03-26

基金项目:广东省出入境检验检疫局科研项目(GDK15-2000)

作者简介:陈 茹(1968-),女,高级工程师,硕士,从事动物检验检疫研究。

#### 1.2 鱼组织 DNA 纯化方法

采用 Qiagene 核酸纯化技术(Qiagene cat. 69504), 具体操作按产品说明进行。

#### 1.3 试剂及检测方法

Taq 酶等试剂由 Promega 公司提供, 引物序列见表 1。PCR 反应体系如下: 设 50  $\mu$ l 反应体积, 含  $10\times$  PCR 缓冲液 5  $\mu$ l, 25 mmol/g MgCl<sub>2</sub> 4  $\mu$ l, 10 mmol/L dNTP 1  $\mu$ l, 50  $\mu$ mol/L 上、下游引物各 1  $\mu$ l, 模板 DNA 2  $\mu$ l, 无菌双蒸水 35.5  $\mu$ l, Taq 酶 1~2 u。每次检测, 设阳性模板对照、阴性模板对照和无模板阴性对照各 1 管。PCR 反应条件如下:

mMT: 94 $^{\circ}$ C 1'  $\rightarrow$  ( 94 $^{\circ}$ C 30"  $\rightarrow$  58 $^{\circ}$ C 30"  $\rightarrow$  72 $^{\circ}$ C 30" )  $\times$  30  $\rightarrow$  72 $^{\circ}$ C 5'

hGH: 94 $^{\circ}$ C 1'  $\rightarrow$  ( 94 $^{\circ}$ C 50"  $\rightarrow$  55 $^{\circ}$ C 30"  $\rightarrow$  72 $^{\circ}$ C 30" )  $\times$  30  $\rightarrow$  72 $^{\circ}$ C 5'

#### 1.4 核酸序列分析

用 PCR 引物做为测序引物, 直接对扩增片段进行序列分析。

#### 1.5 电泳检测

用 2% 琼脂糖凝胶, 溴化乙锭染色, 60V 电泳, 置紫外透色仪观察电泳结果, 摄像记录。

### 1.6 Dig-PCR 标记反应

采用 Roche 公司提供的试剂, 设 100  $\mu\text{l}$  反应体积, 每一反应含  $10 \times \text{PCR}$  缓冲液 10  $\mu\text{l}$ , 25 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  8  $\mu\text{l}$ , 10 mmol/L dNTP 2  $\mu\text{l}$ , 50  $\mu\text{mol/L}$  上、下游引物各 2  $\mu\text{l}$ , 模板 DNA 2  $\mu\text{l}$ , Taq 酶 1~2 u, 设阴性模板对照和无模板阴性对照。所用引物及 PCR 反应参数同以上常规 PCR。

### 1.7 生物素标记的寡核苷酸探针

mMT 启动子和 hGH 基因特异的寡核苷酸探针序列见表 1, 两条探针均在 5' 端标记生物素基团。由上海生工生物工程公司制备。

### 1.8 核酸杂交及 Dig-ELISA 检测

采用 Roche 公司试剂, 检测程序如下: 取 5~10  $\mu\text{l}$  Dig-PCR 产物, 与 20~40  $\mu\text{l}$  变性缓冲液混匀, 室温放置 10 min, 加 200  $\mu\text{l}$  生物素标记的寡核苷酸探针 (10 pmol/ml), 混匀, 按每孔 200  $\mu\text{l}$  加到链霉亲和素包被的微孔板, 55 $^{\circ}\text{C}$  反应 1.5 h, 倾去反应液, 用洗涤缓冲液洗 6 次, 每次浸泡 2~3 min; 每孔加入 200

$\mu\text{l}$  100 倍稀释的酶标物, 37 $^{\circ}\text{C}$  反应 30 min, 同上洗涤 6 次, 每孔加入 200  $\mu\text{l}$  ABTS 底物液, 室温, 避光放置 20~30 min, 肉眼观察显色反应, 测  $\text{OD}_{405}$ 。

### 1.9 Dig-PCR-ELISA 检测敏感性试验

取 mMT 启动子或 hGH 基因的 Dig-PCR 产物, 用双蒸水做 10 倍比稀释, 分别取 5~10  $\mu\text{l}$  进行 Dig-ELISA 检测, 设阴性模板对照和无模板空白对照。每一样品做 3 组重复, 以空白对照的  $\text{OD}_{405}$  平均值做为本底值, 其余样品的  $\text{OD}_{405}$  值均取其 3 组的平均值减去本底值。

## 2 结果

### 2.1 mMT 启动子和 hGH 基因的 PCR 检测

mMT 启动子和 hGH 基因的 PCR 产物分别为 240 bp 和 130 bp, 与设计相符。hGH 基因的扩增产物为 cDNA, 不含内含子序列。如图版 I、II (见附页) 所示。

表 1 PCR 引物及生物素标记的寡核苷酸探针序列

Table 1 PCR primers and biotin labelled probes

基因 Gene	上游引物序列 Sense primers	下游引物序列 Antisense primers	生物素探针 Biotin labelled probe
mMT	5'TGTGCACACTGG CGCTCCAG	5'TCTGGTGAAGCT GGAGCTA	5'-BIOTIN-GGTGACGCTTA GAGGACAGCCTG
hGH	5'TCTCAGAGTCTAT TCCGACAC	5'AAGACACTCCTG AGGAACTG	5'-BIOTIN-CTCCGCATCTC CCTGCTGCTC

### 2.2 PCR 产物的核酸测序与分析

取 mMT 启动子 PCR 产物, 以上游 PCR 引物做为测序引物进行测序, 并运用 DNAsis 分析软件,

将测得的序列与 GeneBank 中检索到的 mMT 启动子基因序列 (M11534) 相比较。测序结果如图 1。

10	20	30	40	50	60
CCGCCCGAAA	AGTGCCTCG	GCTCTGCCAA	GGACGCGGGG	CGCGTGACTA	TGCGTGGGCT
70	80	90	100	110	120
GGAGCAACCG	CCTGCTGGGT	GCAAACCCTT	TGCGCCCGGA	CTCGTCCAAC	GACTATAAAG
130	140	150	160	170	180
AGGGCAGGCT	GTCTCTAAG	CGTCACCACG	ACTTCAACGT	CCTGAGTACC	TTCTCCTCAC
190	200	210	220	230	240
TTACTCCGTA	GCTCCAGCTT	CCCCCAGAA	.....	.....	.....

图 1 mMT 启动子基因扩增产物序列

Fig.1 Sequence of mMT promoter amplified product

分析比较结果, PCR 产物 240 bp, 测得有效序列 209 bp, 自 5' 端第 2 bp 开始, 有 201 bp 连续排列

的序列与 M11534 从 5' 端第 53~253 bp 的序列完全吻合。

取 hGH 基因 PCR 产物, 以上游 PCR 引物做为测序引物进行测序, 并运用 DNAsis 分析软件将测

得的序列与 GeneBank 中检索到的 hGH 基因序列 (M13438) 做比较。测序结果见图 2。

```

      10          20          30          40          50          60
CCTCCACGGG  AGGAAACACA  ACAGAAATCC  AACCTAGAGC  GCTCCGCAT  CTCCTGCTG

      70          80          90          100         110         120
CTCATCCAGT  CGTGGCTGGA  GCCCGTGCAG  TTCCTCAGGA  GTGTCTTA.  .....
  
```

图 2 hGH 基因扩增产物序列

Fig. 2 Sequence of hGH amplified product

分析结果, PCR 产物 130 bp, 测得有效序列 108 bp, 从 5' 第 8~30 bp 的序列, 与 M13 438 从 5' 第 1 293~1 315 bp 的序列完全吻合; 所测序列从 31~

107 bp 的序列, 与 M13 438 从 1 409~1 485 bp 的序列完全吻合。M13438 从位点 1 316~1 408 bp 为内含子区域, 分析比较表明, 扩增产物与设计吻合。

表 2 Dig-PCR-ELISA 及电泳检测敏感性试验结果

Table 2 Sensitive detection results of Dig-PCR-ELISA and electrophoretic analysis

样品 Sample	mMT 启动子 mMT promoter			hGH 基因 hGH gene		
	电泳 Electrophoresis	Dig-ELISA		电泳 Electrophoresis	Dig-ELISA	
		OD <sub>405</sub>	显色 Color		OD <sub>405</sub>	显色 Color
10 <sup>0</sup>	+	2.123	++++	+	2.351	++++
10 <sup>-1</sup>	+	1.29	+++	+	1.564	+++
10 <sup>-2</sup>	-	0.39	++	-	0.843	++
10 <sup>-3</sup>	-	0.055	+	-	0.111	+
10 <sup>-4</sup>	-	0.001	-	-	0.007	-
阴性模板对照 Negative control	-	0.012	-	-	0.007	-

+, 检测阳性 Positive result.

### 2.3 Dig-PCR 反应

2 个基因均产生 1 条 Dig 标记的特异产物, 将 15.5 10  $\mu$ l 的产物原液经 10 倍、100 倍、1 000 倍稀释的样品进行电泳检测, mMT 产物的 10 倍稀释样品, 能在凝胶上形成一条肉眼可辨的荧光带 (图版 III 中不明显); hGH 基因产物的 10 倍稀释样品不能形成可辨荧光带。

### 2.4 Dig-ELISA 检测及检测敏感性试验

取 5  $\mu$ l Dig 标记的 PCR 产物原液及各稀释度样品 10  $\mu$ l, 对每一基因同时进行 3 组 Dig-ELISA 检测, mMT 启动子和 hGH 基因的 Dig-ELISA 检测敏感性均可达 10<sup>-3</sup> (即 1 000 倍稀释样品)。与电泳检测相比较的结果见表 2、图版 III、IV (附页) 及图 3。

## 3 讨论

(1) Dig-PCR-ELISA 技术是一种半定量核酸检测技术, 它具有传统 PCR 技术的优点, 并在特异性鉴定以及量化方面超越了后者。传统的 PCR 检测方法具有快速、灵敏的特点, 但针对 GMOs 的检测, 国际惯例要求需对 PCR 产物进行特异性鉴定实验, 常规的鉴定方法有酶切、杂交和序列分析<sup>[8]</sup>, 耗时

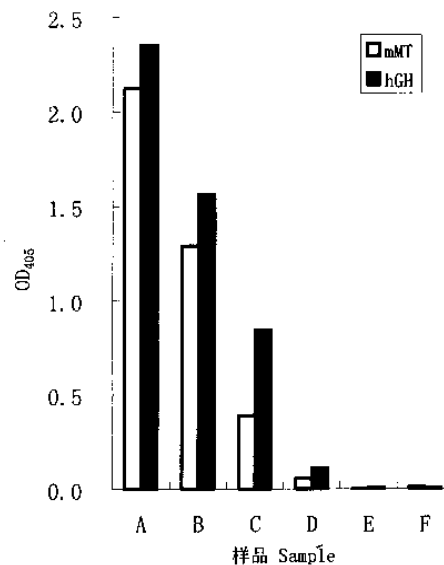


图 3 mMT 启动子及 hGH 基因 Dig-PCR-ELISA 敏感性试验数值图

Fig. 3 Sensitivity detection results of mMT promoter & hGH gene by absorbance value

A, B, C, D, E, F 分别为 Dig-PCR 产物原液、10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup> 及阴性模板对照样品。A: undiluted product; B, C, D, E, F: 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> diluted samples and negative control, respectively.

长、操作繁琐或检测成本高。而 Dig-PCR-ELISA 技术将 PCR、核酸杂交鉴定以及 ELISA 量化检测相结合,不需电泳和纯化 PCR 产物,全检测过程只需 5~6 h,能满足出入境检验检疫部门快速、准确的工作要求,并适合科研部门进行阳性转基因样品的快速筛选和鉴定。

(2) Dig-PCR-ELISA 检测敏感性实验结果表明,与电泳检测方法相比较,检测敏感性可提高达 100~1 000 倍。

(3) 为确保 Dig-ELISA 的检测特异性,需严格控制杂交与洗涤条件。本研究采用高温、短时间及严格的洗涤条件,有效降低了本底反应。对于不同的检测对象,需摸索相应的反应条件,并应设阴性对照和空白对照。

(4) 本研究进行了常规 PCR 检测实验和对 PCR 产物的核酸序列分析,其目的是检验用于 Dig-ELISA 的引物及反应条件的特异性,同时也提供一传统检测技术参照。分析结果表明,所设计的引物及 PCR 反应条件特异可靠。图 2 中泳道 3、4 在 130 bp 前面尚有一条荧光带,根据相对分子量判断,应为引物二聚体。

(5) 本研究对转基因鱼的检测实验表明, Dig-PCR-ELISA 技术快速、灵敏、特异。该技术在仪器方面只需普通 PCR 仪和酶标仪,普通实验室可配备;所需的全套试剂已商品化,操作方法易实现标准化;检测结果可进行数据处理,客观准确。上述特点表明,该技术具有较强实际应用潜力,适合应用于检验检疫等部门。

(6) 对 GMOs 的检测往往要求进行定量,因此能否应用 Dig-PCR-ELISA 技术进行准确的核酸定量检测,值得探讨。已有研究者提出,通过设置一组不同浓度的标准品,与待检样品同时检测,根据标准品 OD 值的变化规律,可推算出待检样品中目标模

板的量化数值<sup>[6,7,9]</sup>。关键应了解标准品符合何种反应规律,不同检测对象(如单拷贝基因和多拷贝基因)的反应规律是否一致。目前尚未见到系统、成熟的研究报道。如能实现应用 Dig-PCR-ELISA 技术进行核酸定量检测,与应用定量 PCR 仪进行的定量检测相比较,将能显著降低核酸定量检测的成本,并进一步提高 Dig-PCR-ELISA 技术的实用价值。

致谢 中科院武汉水生所朱作言院士、汪亚平博士在百忙中提供珍贵转基因鱼研究材料,特此表示衷心感谢。

#### 参考文献:

- [1] 丘才良,刘东.转基因鱼的研究[J].生命的化学,1993,13(4):7-9.
- [2] 朱作言,许克圣,谢岳峰,等.转基因鱼模型的建立[J].中国科学B辑,1989,2:147-155.
- [3] Du S J, Gong Z, Fletcher G L, et al. Grow enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an "All Fish" chimeric growth hormone gene construct[J]. Bio Technology, 1992, 10:176-181.
- [4] 孙效文,梁利群.全鱼基因工程鱼的构建[J].高技术通讯,1993,3(9):23-26.
- [5] 费云标,黄涛,于建康,等.转抗冻蛋白基因鱼的研究[J].生物工程学报,1993,9(4):387-388.
- [6] Shamloul A M, Hadidi A. Sensitive detection of potato spindle tuber and temperate fruit free viroids by reverse transcription polymerase chain reaction-probe capture hybridization [J]. J Virol Meth, 1999, 80:145-155.
- [7] Zerbini M, Gibellini D, Musiani M, et al. Automated detection of digoxigenin-labelled B19 parvovirus amplicons by a capture hybridization assay[J]. J Virol Meth, 1995, 55:1-7.
- [8] Kuiper H A. Summary report of the ILST Europe workshop on detection methods for novel foods derived from genetically modified organisms[J]. Food Control, 1999, 10:339-349.
- [9] Vlieger A M, Medenblik A M J C, Gijlswijk V, et al. Quantitation of polymerase chain reaction product by hybridization-based assays with fluorescent, colorimetric, or chemiluminescent detection[J]. Anal Biochem, 1992, 205:1-7.

## Rapid detection of transgenic fish with digoxigenin-labelled polymerase chain reaction combined with ELISA technique

CHEN Ru, LIN Zhi-xiong, LIU Lin-lin, ZHU Dao-zhong, LUO Chang-bao, YAN Si-tong  
(Animal Inspection & Quarantine Laboratory, Guangzhou Import  
& Export Inspection & Quarantine Bureau, Guangzhou 510406, China)

**Abstract:** The fishes, with mouse metallothion (mMT) promoter gene and human growth hormone (hGH) gene, respectively, were collected from Institute of Hydrobiology (CAS), and the DNA was purified from the fish tissues using Qiagene nucleic-acid-purification technique. The routine PCR detection shows that the PCR products with 240 bp and 130 bp can be got respectively from mMT promoter gene and hGH gene, which corresponds with the designing. The results of nucleic acid sequence detection for PCR products verify that the amplified products have specificity. The reaction of Dig-PCR shows each of the two genes can produce a band showing special product labelled with Dig. The sensitive test of Dig-PCR-ELISA shows that the test sensitivity of mMT promoter gene and hGH gene can get to  $10^{-3}$ , 100~1 000 times as much as the routine PCR method combined with agarose gel electrophoretic analysis. It comes to the conclusion that the Dig-PCR-ELISA technique for mMT and hGH genes has specific reliability.

**Key words:** Dig-PCR-ELISA; mMT promoter; hGH; transgenic fish; rapid detection

### [会讯]

#### 中国实验动物水生实验动物专业委员会成立大会 暨水生实验动物专题研讨会在广州闭幕

2001年11月26日“中国实验动物水生实验动物专业委员会成立大会暨水生实验动物专题研讨会”在广州召开。来自全国各地的专家学者近百人参加了大会。中国实验动物学会秘书长方喜业、广东省科技厅条财处处长黄梅玉、广东省政协副主席潘金培、中山大学林浩然院士、国家外国专家局刘一农教授和中国水产科学研究院副院长李杰人等到会祝贺并发表讲话。

10多年来,对水生实验动物的培育和科学研究,已经引起我国科技工作者的关注,并已取得多项研究成果。中国水产科学研究院珠江水产研究所在水生实验动物剑尾鱼的纯系培育方面已进行了10多年的研究,建立了剑尾鱼的繁育基地;中国科学院水生生物研究所对稀有鮡鲫进行了实验动物化研究;湖南省衡阳医学院进行了红鲫纯系的雌核发育等研究;清华大学以斑马鱼进行了胚胎发育研究;中国环境科学研究院采用剑尾鱼、稀有鮡鲫进行生态毒理学应用的研究;广东省实验动物监测所应用剑尾鱼等水生动物作为石油开发污染物毒性监测的筛选物种;南京农业大学动物医学院应用剑尾鱼进行了渔用药物的安全性评价和安全浓度确定等试验。这些工作在基础上构筑了我国水生实验动物向高层次发展的平台。

大会选举产生了由25名委员组成的第1届委员会以及由吴淑勤(主任委员)、桂建芳、孟安明、黄韧、吴瑞生(副主任委员)、黄志斌(秘书长)、刘家平、王剑伟(副秘书长)等8人组成的常务委员会。大会还通过了专业委员会的工作条例。

(吴均 供稿)