

技术与方法 Techniques and Methods

实时荧光定量 PCR 技术及其在植物转基因产品检测中的应用

王荣谈¹, 刘冬儿², 厉建萌³, 张大兵², 杨立桃^{2,*}¹上海瑞丰农业科技有限公司, 上海 201106; ²上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240; ³农业部科技发展中心, 北京 100026

Quantitative Real-Time Fluorescence PCR Technology and Its Application in Genetically Modified Organisms Detection

WANG Rong-Tan¹, LIU Dong-Er², LI Jian-Meng³, ZHANG Da-Bing², YANG Li-Tao^{2,*}¹Shanghai Ruifeng Agricultural Technical Company, Shanghai 201106, China; ²School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China; ³Development Center for Science and Technology, Ministry of Agriculture, Beijing 100026, China

摘要: 实时荧光定量 PCR 技术因其实时、快速、高效和准确定量的优点, 已经广泛用于转基因产品定量检测。本文介绍荧光定量探针技术的原理、特点及其在植物转基因产品检测中的应用情况。

关键词: 实时定量 PCR; 荧光探针; 转基因生物

随着全球转基因产品阈值标识制度的实施, 转基因产品的定量检测技术日益重要, 越来越多的检测技术用于转基因产品的定量检测。如实时荧光定量 PCR、ELISA 和传感器技术等, 特别是定量 PCR 技术已经成为转基因产品定量的核心技术而广泛使用(Michelini 等 2008; Elenis 等 2008)。但是, 由于荧光信号发生原理很多, 实时荧光定量 PCR 方法多种多样。本文主要根据荧光信号发生原理的差异, 介绍了已有的实时荧光定量 PCR 方法及其在植物转基因产品检测中的应用, 并对其在定量检测时的特异性、灵敏度、成本等优缺点等作了比较。

1 荧光染料技术

根据染料与双链 DNA 分子的结合能力, 荧光染料可分为非饱和性荧光染料和饱和性荧光染料两类。染料型探针产生的荧光属于可逆荧光。

1.1 非饱和性荧光染料 最早应用于实时荧光定量 PCR 的染料为溴化乙啶, SYBR Green I 荧光染料出现后, 因为毒性小、灵敏度高(为溴化乙啶的 10~25 倍)和荧光信号强的优势很快代替了溴化乙啶, 成为应用十分广泛的双链 DNA 插入染料(Zipper 等 2004)。SYBR Green I 可以与双链 DNA 的小沟结合, 而不与单链 DNA 结合, 结合后在约 488 nm 和 254 nm 激发光的激发下, 发射出大约 560 nm 的荧

光, 信号增强 800~1 000 倍(Querci 等 2006)。随着 PCR 循环的进行, 染料结合到新合成的 DNA 分子上, 使其荧光信号与 PCR 产物同步增加, 通过实时监测反应过程中的荧光信号就可以测定 PCR 产物的增加量, 从而定量测定起始模板 DNA 量。在 PCR 反应结束后该染料还可用于融解曲线分析。每一个特定的 DNA 分子都有其特定的熔链温度 (T_m), 当 DNA 分子解链时, SYBR Green I 染料从 DNA 分子中释放出来, 荧光信号显著降低, 出现特异的熔链峰, 根据其对应的 T_m 值就可以判断 DNA 产物的特异性(Elenitoba-Johnson 等 2001)。

SYBR Green I 的最大优势在于其低成本和高度的通用性, 几乎可以用于任何型号的定量 PCR 仪和任何目标 DNA 序列的扩增。然而它的局限性也很明显, 其非特异性双链 DNA 结合模式决定了它不能用于特定目标 DNA 序列的分析, 不能用于复合 PCR, 其信号容易受引物二聚体的干扰(Bustin 2005)。由于 SYBR Green I 的低成本和良好的适用性, 现已成为转基因定量检测中的常用的荧光染料之一, 特别是在对定量准确性和灵敏度要求不高

收稿 2009-03-02 修定 2009-05-06

资助 国家“863”计划(2007AA10Z418)和国家自然科学基金(30700499)。

* 通讯作者(E-mail: yylltt@sjtu.edu.cn; Tel: 021-34204869)。

检测和高通量的检测以及复合 PCR 产物的溶解曲线分析中应用得十分广泛(Levin 2005)。2003 年 Hernández 等用 SYBR Green I 定量检测转基因玉米 Maximizer 176、Bt11、MON810、GA21 和转基因大豆 GTS 40-3-2, 并利用融解曲线分析多重 PCR 的产物特异性, 检测各种转基因事件的灵敏度都达到 0.1% (Hernández 等 2003)。

1.2 饱和性荧光染料 饱和性的荧光染料技术的原理与非饱和的荧光染料相同, 具备 SYBR Green I 的一般优势和缺点。相比之下, 饱和性荧光染料的优点在于其有更高的定量准确性和较高的分辨率。在定量 PCR 反应体系中染料浓度一般很低, 较高浓度会抑制 PCR 反应。饱和性染料与双链 DNA 分子结合的饱和度比非饱和性染料的小, 在低浓度下就可以与 DNA 饱和性结合, 因此其对 PCR 反应的抑制性比非饱和性染料小, 同时对 PCR 产物的 Tm 值影响较小, 更适合于融解曲线分析, 很好地弥补了非饱和性染料的这一缺点。Monis 等(2005)比较饱和性染料 SYTO9 与 SYBR Green I 在实时荧光定量 PCR 和融解曲线分析时的特性中, 以 0.5~33 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 SYTO9 与 SYBR Green I 用于 *Legionella* 的 16S rDNA、hlyA 和 mip 基因的 real-time PCR 扩增, 发现高浓度的 SYBR Green I 会使 16S rDNA 的 Tm 增加 10 °C 以上, 以致复合 PCR 产物的熔链峰变形, 难以区分各个产物, 而高浓度的 SYTO9 只能使 16S rDNA 的 Tm 增加 2 °C, 同时对熔链峰的影响较小。

用于转基因检测的饱和性荧光染料主要有 Eva Green、LC Green 和 SYTO9 等。这些染料对 PCR 的抑制性较低, 可以使用较高的反应浓度, 对融解

曲线分析影响较小, 适用高分辨 DNA 融解分析 (HRM)。转基因检测通常需要使用复合定量 PCR 同时分析多个目标序列, 为了检验扩增的特异性, 对其产物进行融解曲线分析就十分必要, 然而在扩增的目标序列大小相近时, 饱和性的染料在其融解曲线分析中有极大的优势。现在荧光染料法已经是转基因作物的实时定量 PCR 检测中应用得十分广泛的技术, 不仅可以用来定量测定未知样品中转基因成分的百分含量, 还可以在融解曲线分析中区分等位基因变异等(Gibson 2006)。

2 荧光探针技术

荧光探针是用特定荧光基团标记的, 可以与特异 DNA 序列结合的寡聚核苷酸, 只有在其杂交的序列发生 PCR 扩增时, 其荧光信号才会发生变化, 因此可以很好的指示目标序列的扩增。荧光探针根据其发光原理可以分为序列特异性探针和引物特异性探针两类(Gibson 2006)。

2.1 靶序列特异性探针 序列特异型探针是添加到 PCR 反应体系中的引物以外的一段寡聚核苷酸序列, 根据其工作原理可分为水解型探针和杂交型探针。水解型探针利用 Taq DNA 聚合酶 5' → 3' 端外切酶活性, 将探针酶切水解而促使其标记基团分离而释放荧光, 其荧光信号不可逆, 不能进行融解曲线分析, 如 TaqMan、锚定核苷酸探针(LNA)、Allglo 探针; 杂交型探针是通过与目标序列杂交而使其标记基团分离而释放荧光, 其自身不被降解, 其荧光信号是可逆的, 可以进行融解曲线分析, 如荧光能量共振转移探针(FRET)、分子信标(MB)。各种不同的靶序列特异性探针的优缺点比较见表 1。

2.1.1 TaqMan 探针 TaqMan 探针一般是长度为

表 1 序列特异性探针的比较

特征	TaqMan	TaqMan MGB	LNA	Allglo	FRET	MB
特异性	+++	++++	+++++	+++++	++++	+++
灵敏度	+++	++++	++++	+++++	+++	+++
多重反应	+++	++++	++++	++++	+	+++
融解曲线分析	-	-	-	-	++	++
成本	++	++++	++++	++	+++	++

“+”表示肯定, “+”越多表示等级程度越高。“-”表示否定。下表同此。

20~30 个碱基的寡聚核苷酸, 其退火温度一般比引物的高 10 °C, 其 5' 端含有一个报告基团, 在 3' 端含有一个淬灭基团(Holland 等 1991)。当探针完整

时, 报告基团受 Forster 型能量转移的抑制不发荧光。当目标序列存在时, 该探针杂交到 2 条引物结合位点之间的区域, 在 PCR 的延伸阶段通过 Taq

DNA聚合酶的5'→3'外切酶活性在探针的报告基团和淬灭基团之间降解该探针,促使报告基团与淬灭基团分离而释放荧光(Holland等1991),产生的荧光属于积累荧光。该探针设计简单、应用方便、体系优化比较容易、成本相对较低,而且可连接多种荧光基团,用于多个目标序列的检测。常用的报告基团有FAM、TET、VIC、HEX、JOE、ROX等。这些优点为TaqMan探针应用于复合定量PCR提供了良好的基本条件。该技术以其良好的特异性、稳定性和灵敏度成为目前在转基因检测中应用得最广泛、最成熟的实时定量PCR荧光探针技术。该技术的缺点就是荧光基团和淬灭基团标记在探针的两端,相隔较远,常存在荧光淬灭不彻底的情况,减小探针的长度可以解决该问题但同时又降低了探针的特异性和稳定性(Levin 2005)。

在TaqMan探针基础上进一步发展出了一种TaqMan MGB探针,该探针是在TaqMan探针的3'端连接上小沟结合物(Querci等2006)。MGB是一个小的新月形分子,可以与双螺旋DNA的小沟结合。当TaqMan探针与目标序列杂交时,MGB稳定地退火掺入到在探针和目标序列之间形成的DNA双螺旋小沟内,增强探针与目标序列的结合和识别能力(Kutyavin等2000),该探针产生的荧光属于积累荧光。相比TaqMan探针,TaqMan MGB探针提高了探针的T_m值,因此可以设计得更短(一般13~20个碱基),这样荧光基团与淬灭基团靠得更近,淬灭更加彻底,可降低本底荧光信号,另外3'端引入非荧光的淬灭基团,可大大提高信噪比。这些优点使得TaqMan MGB探针在定量PCR中,特别是多重PCR中,有更好的准确性、稳定性、特异性和灵敏度。La Paz等(2007)以转基因玉米Mon810事件特异性分析为模型,比较了SYBR Green I、TaqMan和TaqMan MGB等荧光技术的适用性,发现三者都具备良好的稳定性和灵敏度,可以准确测定0.1% Mon810,另外TaMan和TaqMan MGB的PCR扩增效率(E)达到90%以上,测定的相对标准偏差(RSD)低于1.5%,而且很容易适应快速循环模式,明显优于SYBR Green I,这些说明了二者在转基因检测中的良好的适用性。

2.1.2 锚定核苷酸探针(locked nucleic acid, LNA)

锚定核苷酸探针的工作原理与TaqMan探针相同,其独特之处在于其探针中包含一种核酸类似物,即

锚定核苷酸,其呋喃核糖环中形成2'-氧-4'碳亚甲基连接,这个连接将其呋喃核糖环结构锁定成一个刚性的双环模式。当其与目标序列结合时,可以降低核糖结构的柔韧性,增强杂交稳定性和特异性,提高探针的T_m值,该探针产生的荧光属于积累荧光。一般每增加1个LNA分子可将探针的T_m值提高8℃,探针可以设计得更短,具备更高的信噪比、灵敏度和准确性(Costa等2004)。Salvi等(2008)设计了一个长为8 bp的LNA探针,并用该探针和TaqMan探针检测转基因玉米Mon810,发现LNA探针的检测下限(LOD)可以达到5个拷贝的模板DNA,相对检测下限达到0.0125%,远低于欧盟0.9%的标识阈值,而且可以准确定量到26 pg的转基因玉米DNA,显示其有良好的灵敏度和准确性。

2.1.3 Allglo 探针 Allglo探针结构和工作原理与TaqMan探针相似,它具备TaqMan、TaqMan MGB和MB的所有优点,其独特之处在于其特殊的荧光标记染料。该探针的荧光基团可以互为报告基团和淬灭基团,可以标记在探针的两端也可以标记在探针的中间,还可以标记2个以上的荧光基团,未杂交时其几乎没有背景荧光。其染料上含有可以提高探针T_m值的化学基团,极大提高了杂交的特异性和稳定性。杂交后其探针水解,所有荧光基团都成为荧光报告基团,荧光信号大大提高,信噪比高于TaqMan和MGB很多(<http://www.allelogic.com>),而该探针的合成成本只有MGB的一半,该探针产生的荧光属于积累荧光。现在有多种荧光染料可以用于Allglo探针,如MAR、JUP、SAT、URA、NEP等,它们的激发波长和发射波长与TaqMan探针的常用染料的波长相似,所以该探针的使用不需要特殊仪器设备,而且可以用于多重定量PCR。Allglo探针具备极高的灵敏度,不仅在基因定量中具备极大的优势而且可以用于SNP分型。

2.1.4 荧光能量共振转移探针(fluorescence resonance energy transfer, FRET)

该技术是在PCR反应体系中加入2条探针,在其中一条探针的3'端标记荧光供体基团,另一条探针的5'端标记荧光受体基团,当2条探针结合到目标序列的相邻区域,促使荧光供体基团和荧光受体基团靠近,荧光供体基团受蓝光的激发其能量转移给受体基团,后者就会发射出荧光信号(Haugland 2002; Querci等2006)。在PCR反应中,这2条探针不断结合到合成的产物

上,从而积累荧光信号,指示PCR产物的积累。该技术使用的探针是成对的,二者必须杂交到同一目标序列的相邻区域(通常相距1~5个核苷酸),而且供体的发射光谱必须以受体的吸收光谱交错重叠(Levin 2005)。FRET探针由于采用的是2条探针,故其特异性高,同时该探针由于其需要设计2条探针,探针的末端要封闭以避免引发延伸反应,所以成本很高,设计不太方便。另外该探针的背景荧光比较强,信噪比较低,也因此影响了它的灵敏度,该探针产生的荧光属于实时荧光。该探针技术是比较早期的技术,主要用于基因定量,现在应用的比较少,已逐渐为TaqMan等技术所代替。

2.1.5 分子信标(molecular beacons, MB) 分子信标是一种自身可以形成茎环结构的DNA探针,探针的两端分别标记上荧光报告基团和淬灭基团。当探针未与目标序列杂交时,其茎环结构可促使2个基团相互靠近,荧光基团释放的所有光子被淬灭基团吸收。杂交后茎环结构展开,2个基团就会分开,报告基团发射出荧光(Tyagi和Kramer 1996),该探针产生的荧光属于积累荧光。该技术的特点就是只需要一条探针,比FRET探针的成本低,但是其缺点就是探针杂交时只有其环状部分与目标序列配对结合,因此稳定性比较差,其茎环结构也容易受其他因素的影响导致假阳性的出现(Levin 2005)。另外应用于该探针的荧光基团比较少,标记有一定的困难,背景信号比较强。分子信标已经是转基因检测中的常用技术,可用于区分等位基因,定量转基因百分含量等(Tyagi 1998)。Andersen等(2006)比较了MB、SYBR Green I、TaqMan和TaqMan MGB在转基因大豆RRS的定量检测中的适用性,发现四者都具备良好的适用性,但MB的PCR反应效率最低,而且对PCR循环条件和反应体系的变化特别敏感,从而显示了其有一定的不稳定性。然而正是由于MB的这些特点,Lin等(2008)利用了 Hg^{2+} -DNA复合体诱导MB构型变化的特点,研制了一种通用分子信标,用以检测SNPs,这对分析转基因作物的内源基因多态性和外源T-DNA插入后引起的突变等有参考价值。

2.2 引物特异性探针技术 引物型探针就是以荧光基团标记的引物,在PCR反应中它既充当引物引发DNA链的延伸,也充当探针,可与目标DNA序列结合,以其结构或构型的变化而引起荧光信号的变

化。这种技术不需要引物以外的探针,使得反应体系的优化更简单。但引物探针只能靠引物来保证其反应的特异性,因此其特异性一般低于序列特异性探针。这类探针可以根据引物和探针序列通用和特异性进一步分为通用引物探针和特异性引物探针两类。

2.2.1 特异性引物探针

2.2.1.1 Scorpions 探针 Scorpions探针是杂交探针技术进一步发展的产物,它由一个茎环结构和特异性引物组成,茎环的5'端标记荧光报告基团,3'端标记淬灭基团并与引物的5'端连接。茎环结构闭合时荧光被淬灭,当引物引发了延伸反应后,茎环结构就会展开并与同一条链上的互补的特异性目标序列杂交,发射荧光(Querci等2006),该探针产生的荧光属于积累荧光。Scorpions技术不需要引物以外的单独探针,其杂交区域处于同一条DNA链上,荧光信号可以迅速产生,反应迅速,同时具备较好的特异性。该技术中其引物由于携带茎环结构,容易影响PCR反应的效率和稳定性(Theilwell等2000; Whitcombe等1999)。

2.2.1.2 LUX (light upon extension) 荧光探针 LUX技术在PCR中的一条引物的3'末端标记荧光基团,该引物内部含有互补序列,自身可形成能淬灭荧光的茎环结构。在PCR延伸阶段,引物可以展开茎环结构,与目标序列结合释放荧光,使荧光信号显著增加(Nazarenko等2002a),该探针产生的荧光属于积累荧光。通过实时监测荧光信号的变化就可以检测样品中的目标DNA序列。该技术的优点显而易见,它可以省略额外的探针,节约成本。虽然它仅靠2条引物来确保反应的特异性,但其不会形成引物二聚体,仍然可以获得较好的特异性,其特异性介于SYBR Green I和TaqMan探针之间。由于荧光基团是标记在引物上的,所以其PCR产物都带有荧光基团,因此可以进行融解曲线分析,检验产物的特异性和污染情况。同时该技术还可以在一个反应管中进行多重反应,检测多个目标序列(Nazarenko等2002b)。它的缺点就是引物设计比较困难,但现在有专门的软件LUX[®] Designer用于设计此类引物。由于发夹结构的荧光淬灭能力有限,只能淬灭少数的荧光素的荧光信号,目前可以应用到该技术中的荧光素主要有FAM、JOE和Alexa Fluor 546。

2.2.1.3 Plexor 荧光探针 Plexor™ 技术利用了2种特殊的碱基: 异鸟嘌呤(iso-dG)和5' 甲基异胞嘧啶(iso-dC), 二者可以形成独特的相互配对, 而不与其他任何碱基配对。在合成引物时, 将 iso-dC 掺入到其中一条引物中, 并用荧光素标记5'末端, 在PCR反应中, 将标记有淬灭基团的 Dabcyl-iso-dGTP 加入到反应体系中, 在扩增过程中只有 iso-dGTP 能够掺入到与 iso-dC 互补的位置, 并有效淬灭荧光基团(Krenke 等 2005)。该技术的独特之处在于随着反应的进行, 荧光信号是不断减小。该技术的极大优点是具有很高的特异性, 可以有效的避免假阳性, 其PCR产物还可以用于融解曲线分析, 可以很好的检验反应的特异性。同时引物的设计与一般的引物设计一样简单, 不需要特殊的结构和构型(Krenke 等 2005; Sherrill 等 2004)。Buh Gasparic 等(2008)以 LNA、LUX、Plexor 和 TaqMan 等技术检测转基因玉米 Mon810 的内源特异性基因和外源基因5'端旁侧序列, 测定了它们在检测中的特异性和灵敏度以及量化的动力学范围和重复性, 实验结果显示 LUX 技术的特异性和灵敏度比其他3种技术的灵敏度低, LNA 探针具备特异性比其他3种技术的特异性高。Plexor 技术在定量测定 Mon810 的含量时的准确性不理想, 测定值与真实值的偏差大于30% (Buh Gasparic 等 2008)。

2.2.2 通用引物探针

2.2.2.1 通用模板(universal template, UT)探针 荧光染料技术具备通用性但没有序列特异性, 一般的探针技术具备序列特异性但不具备通用性, 通用模板探针则是一种兼具通用性和序列特异性的实时定量 PCR 荧光技术。该技术是在一条引物的5'端连接一段约 20 bp 的通用模板序列, 该序列可以与荧光探针特异性杂交, 其探针的结构与 TaqMan 相同。当反应进行到第3个循环时另一条引物与新合成的含有通用序列的 DNA 链退火, 引发延伸反应, 利用 Taq DNA 聚合酶的5' → 3' 外切酶活性在探针的报告基团和淬灭基团之间降解杂交在通用序列上 UT 探针, 释放荧光, 该探针产生的荧光属于积累荧光(Zhang 等 2003)。该技术要求 UT 探针的 Tm 值比引物的目标特异性部分高 5~10 °C, 并不与模板 DNA 任何区域杂交。同一 UT 探针可以用于多个目标序列的检测, 可以大大节约成本。该技术是 Zhang 等(2003)开发的, 他们将这种探针技术

用于检测转基因玉米 Event 176, 内源和外源基因标准曲线可以检测到 0.01~100 ng 的 DNA, 线性相关系数 R^2 达到 0.99 以上。同时用不同的染料标记 UT 探针, 进行复合定量 PCR 定量检测 Event 176 的内源基因 *Invertase 1* 和外源基因 *CryIA (b)* 可以检测到 10 pg 的玉米基因组 DNA, 显示了良好的特异性、重复性和灵敏度。

2.2.2.2 Antiprimer 探针 Li 等(2006)在 UT 探针的基础上发展了一种新的通用模板探针 Antiprimer。该技术是将一条引物的5'末端连接一段标记有荧光报告基团的通用序列, 当该引物未参与PCR反应时, 标记有荧光淬灭基团的 Antiprimer 可以与该引物的通用序列结合从而淬灭荧光, 该探针产生的荧光属于积累荧光。当引物参与了 PCR 反应, 由于 Antiprimer 的 Tm 值比引物的特异性部分低 5~10 °C, 引物的通用序列会结合到新合成的 PCR 产物中而不能与 Antiprimer 结合, 这样合成的 PCR 产物就可以发射荧光信号。该技术原理简单, 操作方便, 其引物和探针不需要任何特殊的设计, 荧光探针序列具备通用性, 可以用于任何目标序列的检测, 显然可以大大降低成本。相比于 UT 探针, 其通用模板序列可以设计得很短, 荧光报告基团和淬灭基团连接在 2 条序列上, 彼此可以靠得很近, 荧光淬灭彻底, 本底荧光信号低, 信噪比大大提高。

2.2.2.3 AUDP (attached universal duplex probes)

AUDP 是在 UT 探针和 Antiprimer 探针的基础上发展而来的技术, 该技术采用了 2 种通用探针: 荧光探针(FP)和淬灭探针(QP), 这 2 个探针序列不具备特异性, 不与待扩增的目标序列结合, 但二者可以相互结合而淬灭荧光信号。探针设计时, UT 序列的 Tm 值大约比 UT 引物中的特异性引物部分高 5~10 °C。UT 序列与靶序列特异性引物之间可以认为加上一段 Linker, Linker 序列的选择与引物中 GC 的含量及 Tm 值有关, 作用时是调节引物的 GC 含量, 并且保证 2 条引物的 Tm 值相近。在 PCR 反应中, 将一条引物的5'末端连接一段可与 FP 互补配对的通用序列, 反应进行到第3轮时, FP 可以与含有通用序列的模板结合, 充当引物引发延伸反应。当反应进行到第4轮时, 在另一条引物引发的延伸反应中, 与 FP 结合的 QP 在链置换作用和 Taq DNA 聚合酶的外切活性下被置换和水解, 从而使 FP 发生出荧光信号。该技术的优点在于其荧光信

号强, QP 可以链置换和 Taq DNA 聚合酶的 5' → 3' 外切酶活性双重作用下与 FP 分离, 迅速稳定的产生高强度的荧光信号(Yang等2008), 该探针产生的荧光属于积累荧光。该技术具备UT探针的所有优点, 其成本大约是现在一般探针合成成本的一半, 其荧光信号强度高而且稳定。其缺点是需要合成2

条引物, 原理复杂, 操作不太方便, 而且荧光信号产生比较晚, 反应缓慢。Yang等(2008)利用该技术检测转基因大豆 RRS 和转基因玉米 Bt176, 在双重 PCR 中对 RRS 的检测灵敏度达到了 10 pg, 同时可以检测到1%的Bt176, 证明了该技术在转基因检测中的良好适用性。

表2 引物特异性探针的比较

特征	Scorpions	LUX	Plexor	UT	Antiprimer	AUDP
特异性	++	++	+++	++	++	++
灵敏度	++	++	+++	++	++	++
设计难度	+++	++++	+	+	+	+
稳定性	++	++	++++	+++	+++	+++
成本	++	++	++	++	++	++

总之, 转基因作物研究飞速发展, 其安全性也常引起广泛的争议, 为了控制其可能存在的危险, 国际上普遍实行转基因标识制度。美国的转基因标识阈值为 5%, 欧盟为 0.9%。标识制度的实施要求人们准确, 稳定的检测样品中的转基因物质的百分含量。Real-time PCR 技术为转基因的定量检测提供了良好的技术手段。SYBR Green I 和 UT 探针的应用可以明显降低成本, 用于高通量检测; TaqMan MGB 和 Allglo 已经具备很高的特异性, 在复合PCR中有了很好的应用; 最新的技术如LNA探针、CPT 探针、Plexor 探针和 AUDP 等不断涌现并应用到转基因的检测中。应用于转基因检测的实时荧光定量 PCR 的荧光技术正在不断更新和发展, 向着更高的稳定性、灵敏度、高通量和低成本的方向发展。

参考文献

- Andersen CB, Jensen AH, Berdal KG, Thorstensen T, Tengs T (2006). Equal performance of TaqMan, MGB, molecular beacon, and SYBR green-based detection assays in detection and quantification of roundup ready Soybean. *J Agric Food Chem*, 54 (26): 9658~9663
- Buh Gasparic M, Cankar K, Zel J, Gruden K (2008). Comparison of different real-time PCR chemistries and their suitability for detection and quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnol*, 8: 26
- Bustin SA (2005). Real-time PCR. *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1117~1125
- Costa JM, Ernault P, Olivi M, Gaillon T, Arar K (2004). Chimeric LNA/DNA probes as a detection system for real-time PCR. *Clin Biochem*, 37: 930~932
- Elenis DS, Kalogianni DP, Glynou K, Ioannou PC, Christopoulos TK (2008). Advances in molecular techniques for the detection and quantification of genetically modified organisms. *Anal Bioanal Chem*, 392: 347~354
- Elenitoba-Johnson KS, Bohling SD, Wittwer CT, King TC (2001). Multiplex PCR by multicolor fluorimetry and fluorescence melting curve analysis. *Nat Med*, 7: 249~253
- Gibson NJ (2006). The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. *Clin Chim Acta*, 363 (1-2): 32~47
- Haugland RP(2002). *The Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*. Ninth Edition, Molecular Probes, Inc. <http://www.probes.com>
- Hernández M, Rodríguez-Lázaro D, Esteve T, Prat S, Pla M (2003). Development of melting temperature-based SYBR Green I polymerase chain reaction methods for multiplex genetically modified organism detection. *Anal Biochem*, 323: 164~170
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of thermus aquaticus DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88 (16): 7276~7280
- Krenke BE, Ekenberg S, Frackman S, Hoffmann K, Sprecher CJ, Storts DR (2005). Development of a novel fluorescent two-primer approach to quantitative PCR. <http://www.promega.com>
- Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, Singer MJ, Walburger DK, Likhov SG, Gall AA et al (2000). 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res*, 28 (2): 655~661
- La Paz JL, Esteve T, Pla M (2007). Comparison of real-time PCR detection chemistries and cycling modes using Mon810 event-specific assays as model. *J Agr Food Chem*, 55 (11):

- 4312~4318
- Levin RE (2005). The application of real-time PCR to food and agricultural systems. *Food Biotechnol*, 18 (1): 97~133
- Li J, Wang F, Mamon H, Kulke MH, Harris L, Maher E, Wang L, Makrigiorgos GM (2006). Antiprimer quenching-based real-time PCR and its application to the analysis of clinical cancer samples. *Clin Chem*, 52 (4): 624~633
- Lin YW, Ho HT, Huang CC, Chang HT (2008). Fluorescence detection of single nucleotide polymorphisms using a universal molecular beacon. *Nucleic Acids Res*, 36 (19): e123
- Michelini E, Simoni P, Cevenini L, Mezzanotte L, Roda A (2008). New trends in bioanalytical tools for the detection of genetically modified organisms: an update. *Anal Bioanal Chem*, 392: 355~367
- Monis PT, Giglio S, Saint CP (2005). Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis. *Anal Biochem*, 340: 24~34
- Nazarenko I, Lowe B, Darfler M, Ikononi P, Schuster D, Rashtchian A (2002a). Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labelled with a single fluorophore. *Nucleic Acids Res*, 30 (9): e37
- Nazarenko I, Pires R, Lowe B, Obaidy M, Rashtchian A (2002b). Effect of primary and secondary structure of oligodeoxyribonucleotides on the fluorescent properties of conjugated dyes. *Nucleic Acids Res*, 30: 2089~2095
- Querci M, Jermini M, Eede GV (2006). The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms. <http://gmotraining.jrc.it/>
- Salvi S, D'orso F, Morelli G (2008). Detection and quantification of genetically modified organisms using very short, locked nucleic acid TaqMan probes. *J Agr Food Chem*, 56: 4320~4327
- Sherrill CB, Marshall DJ, Moser MJ, Larsen CA, Daude-Snow L, Prudent JR (2004). Nucleic acid analysis using an expanded genetic alphabet to quench fluorescence. *J Am Chem Soc*, 126: 4550~4556
- Thelwell N, Millington S, Solinas A, Booth J, Brown T (2000). Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res*, 28: 3752~3761
- Tyagi S, Bratu DP, Kramer FR (1998). Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nat Biotechnol*, 16 (1): 49~53
- Tyagi S, Kramer FR (1996). Molecular Beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol*, 14 (3): 303~308
- Whitcombe D, Theaker J, Guy SP, Brown T, Little S (1999). Detection of PCR products using self probing amplicons and fluorescence. *Nat Biotechnol*, 17 (8): 804~807
- Yang LT, Liang WQ, Jiang LX, WQ Li, Cao W, Wilson ZA, Zhang DB (2008). A novel universal real-time PCR system using the attached universal duplex probes for quantitative analysis of nucleic acids. *BMC Mol Biol*, 9: 54
- Zhang YL, Zhang DB, Li WQ, Chen JQ, Peng YF, Cao W (2003). A novel real-time quantitative PCR method using attached universal template probe. *Nucleic Acids Res*, 31 (20): e123
- Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F (2004). Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res*, 32 (12): e103