

第二代抗草甘膦大豆 PCR 检测方法研究

李飞武, 李葱葱, 邢珍娟, 刘娜, 康岭生, 宋新元, 邵改革, 张明

(吉林省农业科学院, 农业部转基因植物环境安全监督检验测试中心, 吉林 长春 130033)

摘要:为建立转基因大豆 Roundup RReady2Yield™ (RR2Y) 转化体特异性定性 PCR 检测方法, 以 *lectin* 基因作为内参照基因, 根据 RR2Y 外源插入片段 5' 端与植物基因组连接区序列设计特异性引物, 从 RR2Y 中特异性地扩增出 223bp 的预期产物。对该方法进行重现性、特异性、灵敏度、稳定性和可重复性测试, 结果显示: 该方法能够特异性检测出 RR2Y 转化体; 将 100% RR2Y 基因组 DNA 用 A3244 基因组 DNA 进行梯度稀释, 以 100 ng DNA 为模板, 该方法的检测灵敏度达到 0.05%, 约为 40 个起始模板拷贝; 以 RR2Y DNA 含量为 10%、1%、0.1% 的样品为模板, 进行稳定性和可重复性, 假阴性率为 0。结果表明: 此方法适用于 RR2Y 的转化体特异性定性 PCR 检测。

关键词:转基因生物; Roundup RReady2Yield™; 转化体特异性 PCR

中图分类号: S565.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-9841(2009)02-0296-05

Establishment of an Event-specific Qualitative PCR Method for Detection of Roundup RReady2Yield™

LI Fei-wu, LI Cong-cong, XING Zhen-juan, LIU Na, KANG Ling-sheng, SONG Xin-yuan, SHAO Gai-ge, ZHANG Ming

(Jilin Academy of Agricultural Sciences, National Center for Environmental Safety Inspection of Transgenic Plants, Ministry of Agriculture, Changchun 130033, Jilin, China)

Abstract: Roundup RReady2Yield™ (RR2Y) is a glyphosate-tolerant genetically modified soybean, which is approved to be imported and used as raw material in China. For labeling them according to the regulations on safety of agricultural genetically modified organisms, an event-specific qualitative PCR method for RR2Y is urgently needed to be established, which is the aim of this study. The specific primers were designed based on the 5'-junction sequences of the exogenous integrant of RR2Y, and amplification products of 223 bp were obtained. The ruggedness, specificity, sensitivity, stability and repeatability of this method were tested. The results showed that RR2Y event can be distinguished specifically from other GM and non-GM crops by using this method, and the limit of detection is up to 0.05%.

Key words: Genetically modified organism, Roundup RReady2Yield™, Event-specific PCR

自 1996 年以来, 全球转基因作物种植面积以年均 10% 以上的速率增长, 2007 年达到 1.143 亿 hm^2 , 其中种植面积最大的作物为抗除草剂大豆, 达 5860 万 hm^2 ^[1]。与转基因作物产业化的蓬勃发展相对应的, 是各国民众对其安全性的担忧, 为此, 世界上很多国家都制订了关于转基因生物安全管理的法律法规。我国在积极推进转基因生物研究和产业化的同时, 也制订了一系列法律法规和管理办法, 对其实行安全评价、产品标识、生产许可、经营许可、进口许可、加工许可等制度, 而对转基因生物及其产品进

行精准检测是保证这些制度顺利实施的有力技术支撑。

目前转基因产品检测方法主要有两大类: 一类是基于核酸的检测方法, 如 PCR、Southern 杂交、基因芯片等, 另一类是基于外源蛋白质的检测方法, 如 ELISA、侧向流动免疫方法等^[2]。根据检测靶序列不同, PCR 检测策略分为 4 类: 筛选检测、基因特异性检测、构建特异性检测、转化体特异性检测^[3]。筛选检测以启动子、终止子等通用元件为检测对象, 具有低特异性^[4], 基因和构建特异性检测分别以外源基

收稿日期: 2008-12-19

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项资助项目(2008ZX08012-001)。

作者简介: 李飞武(1982-), 男, 研究实习员, 硕士, 研究方向为转基因植物及其产品检测。E-mail: protura@sina.com。

通讯作者: 张明, 研究员。E-mail: zhangming5451@sina.com。

因和外源插入载体中两个元件的连接区序列为检测对象,具有较高的特异性,但不能区分转入相同基因或相同外源载体的不同转基因生物^[5],而转化体特异性检测以外源插入载体与植物基因组的连接区序列为检测对象,这段连接区序列对每种转基因生物而言都是严格特异的,并且在转基因生物基因组上是单拷贝的,因此该类检测方法具有高度的特异性,已经成为转基因生物及其产品检测方法的首选。目前已经建立转化体特异性检测方法的转基因生物包括 RRS、Bt11、MON810、MON863、NK603、Bt176、GA21、T25、GT73、MON531、MON1445 等^[5-15]。

第二代抗草甘膦大豆(Roundup RReady2YieldTM, RR2Y)是美国孟山都公司利用农杆菌介导法获得的最新转基因大豆品种,具有比第一代抗草甘膦大豆(Roundup Ready Soybean, RRS)更优异的农艺性状。作为 RRS 的替代产品,RR2Y 已在美国、加拿大等国家获准商业化种植,必将迅速成为全球种植面积最大的转基因作物。RR2Y 已于 2008 年在我国获准进口用作加工原料,依据我国转基因生物安全管理法律法规要求,应当对其进行标识和安全管理。以 RR2Y 转化体特异性序列为依据,建立针对 RR2Y 的特异性定性 PCR 检测方法,并对该方法的重现性、特异性、灵敏度、稳定性和可重复性进行测试。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

转基因大豆 RR2Y、RRS,非转基因大豆 A3244,转基因玉米 NK603、GA21、MON810、MON863、LY038,转基因油菜 GT73,均由孟山都公司研发。

Bt 抗虫水稻由华中农业大学研发。

非转基因大豆吉育 84,非转基因玉米吉单 180,非转基因油菜中油杂 11 号,非转基因水稻油优 63 购自市场。

1.2 试剂

CTAB、Tris、EDTA 等试剂购自北京鼎国生物技术有限公司,DNA 分子量 Marker 购自北京天根生物技术有限公司,Taq DNA 聚合酶、dNTPs 等购自宝生物工程(大连)有限公司。引物信息见表 1,由北京奥科生物技术有限公司合成。

1.3 主要仪器设备

Centrifuge 5415D 高速离心机(Eppendorf AG); ND1000 分光光度计(NanoDrop Technologies, Inc.);

My Cycler PCR 仪(BioRad Laboratories, Inc.); DYY-6B 型电泳仪(六一仪器厂);凝胶成像系统(BioRad Laboratories, Inc.)。

表 1 引物序列信息

Table 1 Primer sequences and amplified products

检测对象 Target	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	扩增产物长度 Length of PCR product
lectin	lectin - F	GCCCTCTACTCCACCCCATCC	118 bp ^[16]
	lectin - R	GCCCATCTGCAAGCCTTTTGTG	
RR2Y	RR2Y - F	CTGCTCCACTCTTCCTTT	223 bp
	RR2Y - R	AGACTCTGTACCTGACCT	

1.4 方 法

1.4.1 总 DNA 提取 采用普通 CTAB 方法^[16](略有修改)提取总 DNA:取 100~200 mg 在液氮中充分研磨的样品,加入 0.6 mL CTAB 提取液(15 g·L⁻¹ CTAB,50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl(pH 8.0),10 mmol·L⁻¹ EDTA(pH 8.0),1 mol·L⁻¹ NaCl,7.5 g·L⁻¹ PVP)和 50 μg RNaseA,65℃ 孵育 40 min,期间颠倒混匀 2~3 次,冷却至室温;加入 0.6 mL 氯仿,颠倒混匀 2 min,12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,转移上清,重复本步骤 2 次;加入等体积无水乙醇,轻缓颠倒混匀,静置 10 min;12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,弃上清,加入 1 mL 70% 乙醇洗涤沉淀,12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,弃上清;晾干,加入 100 μL TE 缓冲液溶解 DNA 沉淀,4℃ 保存备用。

用 ND1000 分光光度计检测 DNA 质量和浓度,将 DNA 稀释至 50 mg·L⁻¹,备用。

1.4.2 PCR 扩增 PCR 反应采用 50 μL 体系:10×PCR 缓冲液(含 Mg²⁺) 5 μL,10 mmol·L⁻¹ dNTPs mix 4 μL(每种 dNTP 终浓度为 200 μmol·L⁻¹);10 μmol·L⁻¹ 引物各 1 μL(终浓度为 200 nmol·L⁻¹);5 U·μL⁻¹ rTaq DNA 聚合酶 0.25 μL;模板 DNA 2 μL(100 ng);加灭菌超纯水至终体积为 50 μL。

PCR 反应程序:94℃ 5 min;94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,共进行 35 次循环;72℃ 10 min。在重现性分析中,退火温度分别采用 54℃、56℃、58℃、60℃ 和 62℃。

PCR 产物用 10 g·L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 样品 DNA 提取质量

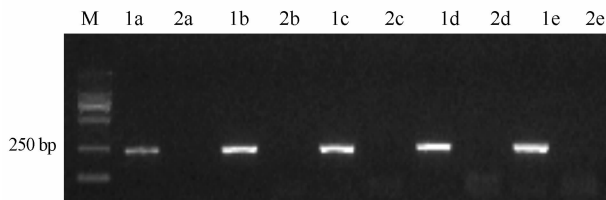
高质量的 DNA 是 PCR 检测获得成功的前提条件。分别以 lectin 基因、zSSIb 基因、HMG I/Y 基因

和 *SPS* 基因作为大豆、玉米、油菜和水稻的内参照基因,检测样品 DNA 的提取质量。各样品中分别能扩增出预期 118 bp、88 bp、206 bp、277 bp 的产物(未提供图谱),表明采用的 CTAB 法能够从不同植物样品中提取到适用于 PCR 检测的基因组 DNA。

2.2 不同退火温度的重现性分析

引物是 PCR 检测方法中最核心的技术参数,引物的特异性决定了检测方法的特异性。采用的检测引物是根据 RR2Y 外源插入片段 5' 端与植物基因组连接区序列设计,上、下游引物分别结合在植物基因组和外源插入载体启动子上,扩增产物在 RR2Y 基因组 DNA 上仅有一个拷贝,具有严格的特异性。

选择 54℃、56℃、58℃、60℃、62℃ 共 5 个退火温度,按照 1.4.2 的反应体系和反应程序对 RR2Y 进行扩增。结果显示,采用 5 个退火温度,均能特异性地从 RR2Y 大豆中扩增出预期片段,而在非转基因大豆对照中未得到任何扩增(见图 1),表明研究采用的方法适用于 RR2Y 的特异性检测,并可耐受退火温度的小幅改变。根据引物序列的 T_m 值,确定 60℃ 为最适退火温度,初步建立了 RR2Y 转化体特异性检测方法。



M, D2000; 1, RR2Y; 2, A3244;
a, b, c, d, e 分别为 54℃, 56℃, 58℃, 60℃, 62℃ 退火
M, D2000; 1, RR2Y; 2, A3244;
a, b, c, d, e; The annealing temperature was 54℃, 56℃, 58℃, 60℃ and 62℃, respectively.

图 1 不同退火温度的重现性分析

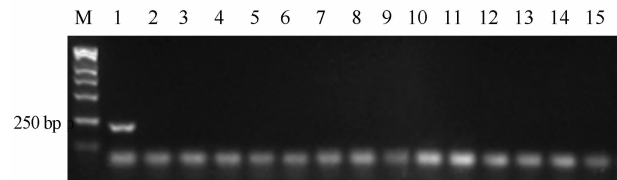
Fig. 1 Ruggedness of the method at different annealing temperature

2.3 特异性测试

高度特异性是检测方法必须具备的基本特性,为测试建立的 RR2Y 检测方法的特异性,选择转基因大豆 RR2Y、RRS,非转基因大豆 A3244、吉育 84,转基因玉米 NK603、GA21、MON810、MON863、LY038,非转基因玉米吉单 180,转基因油菜 GT73,非转基因油菜中油杂 11 号, Bt 抗虫水稻,非转基因水稻油优 63 等样品作为测试对象,涵盖大豆、玉米、油菜、水稻等作物,既有其他抗草甘膦转基因作物

(大豆、玉米、油菜),又有抗虫、品质改良等其他性状转基因作物(玉米、水稻)和非转基因作物,具有很好的代表性。

特异性测试结果如图 2 所示,仅在 RR2Y 中扩增出预期片段,而在其他样品中均未得到任何扩增,表明建立的 RR2Y 检测方法对 RR2Y 具有严格的特异性。



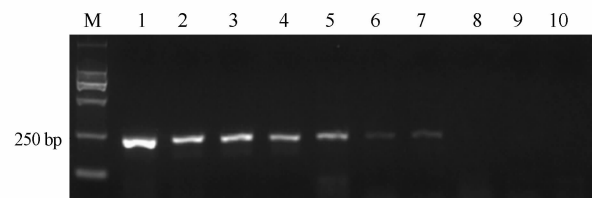
M, D2000; 1, RR2Y; 2, RRS; 3, A3244; 4, 吉育 84; 5, NK603; 6, GA21; 7, MON810; 8, MON863; 9, LY038; 10, 吉单 180; 11, GT73; 12, 中油杂 11 号; 13, Bt 水稻; 14, 油优 63; 15, 对照
M, D2000; 1, RR2Y; 2, RRS; 3, A3244; 4, Jiyu 84; 5, NK603; 6, GA21; 7, MON810; 8, MON863; 9, LY038; 10, Jidan 180; 11, GT73; 12, Zhongyouza No. 11; 13, Bt rice; 14, Shanyou63; 15, Control

图 2 方法特异性测试

Fig. 2 Specificity of the method

2.4 灵敏度测试

将 RR2Y 和 A3244 大豆 DNA 溶液(初始浓度均为 50 mg · L⁻¹)按不同比例混合配成 RR2Y 相对含量为 50%、10%、5%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、0.01% 的样品,其中大豆 DNA 总浓度仍为 50 mg · L⁻¹。采用 RR2Y 检测方法,对上述样品进行 PCR 扩增,用以确定此法的检测极限。扩增结果见图 3,在相对含量为 0.05% 以上(含 0.05%)的样品中均能特异地检测到预期片段,表明在以 100 ng 大豆基因组 DNA 为模板的前提下,其检测灵敏度可以达到 0.05%,根据大豆基因组 DNA 大小^[17](1115 Mb)计算,相当于约 40 个大豆基因组拷贝数。



M, D2000; 1, 50% RR2Y; 2, 10% RR2Y; 3, 5% RR2Y; 4, 1% RR2Y; 5, 0.5% RR2Y; 6, 0.1% RR2Y; 7, 0.05% RR2Y; 8, 0.01% RR2Y; 9, A3244; 10, blank control

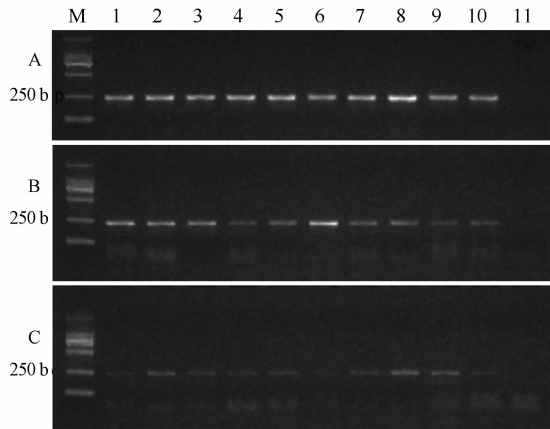
图 3 方法灵敏度测试

Fig. 3 Sensitivity of the method

2.5 稳定性和可重复性测试

采用 RR2Y 检测方法,对 2.4 中 10%、1%、

0.1% 三个浓度样品进行 PCR 扩增, 每个样品重复 10 次, 用以测试本方法的稳定性和可重复性。结果如图 4 所示, 在所有样品及各次重复中, 均能得到准确的检测结果, 假阴性率为 0, 表明该方法具有良好的稳定性和可重复性。



M, D2000; 1-10(A), 10% RR2Y; 1-10(B), 1% RR2Y; 1-10(C), 0.1% RR2Y; 11, A3244

图 4 方法稳定性和可重复性测试

Fig. 4 Stability and repeatability of the method

3 讨论

为规范转基因生物安全管理, 保障消费者的知情权和选择权, 世界上很多国家和地区都制订了转基因生物标识管理制度, 要求对超过特定阈值的转基因生物及其产品进行标识。各国的标识阈值稍有差别, 如欧盟、日本、韩国分别为 0.9%、5% 和 3%, 而我国现行标识制度为定性标识, 即零阈值。我国标识制度的顺利实施依赖于高特异性、高灵敏度的检测方法, PCR 方法是转基因生物及其产品检测的最主要手段之一。

目前已有大量关于抗草甘膦大豆 PCR 检测方法的报道^[6, 18-19], 涵盖筛选检测、基因特异性检测、构建特异性检测、转化体特异性检测等水平, 我国也建立了相关检测方法标准^[20], 但这些检测技术方法都是针对第一代产品 (RRS), 而针对第二代产品 (RR2Y) 的检测方法还鲜有报道。研究以大豆植物凝集素基因 (*Lectin*) 为内参照基因, 建立了 RR2Y 转化体特异性水平的定性 PCR 检测方法, 该方法具有高度特异性、稳定性和可重复性, 检测灵敏度达到 0.05%, 其技术参数能够满足我国转基因生物安全管理过程中对 RR2Y 的检测需求, 具有良好的应用前景。

参考文献

- [1] James C. 2007 年全球转基因作物商业化发展态势[J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(2): 1-10. (James C. Global status of commercialized biotech/GM crops; 2007 [J]. China Biotechnology, 2008, 28(2): 1-10.)
- [2] Alexander T W, Reuter T, Aulrich K, et al. A review of the detection and fate of novel plant molecules derived from biotechnology in livestock production [J]. Animal Feed Science and Technology, 2007, 133(1): 31-62.
- [3] Anklam E, Gadani F, Heinze P, et al. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products [J]. European Food Research and Technology, 2002, 214: 3-26.
- [4] Wolf C, Scherzinger M, Wurz A, et al. Detection of cauliflower mosaic virus by the polymerase chain reaction: Testing of food components for false-positive 35S promoter screening results [J]. European Food Research and Technology, 2000, 210: 367-372.
- [5] Rønning S B, Vaitilingom M, Berdal K G, et al. Event specific real-time quantitative PCR for genetically modified Bt11 maize (*Zea mays*) [J]. European Food Research and Technology, 2003, 216: 347-354.
- [6] Berdal K G, Holst Jensen A. Roundup ready soybean event-specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analyses [J]. European Food Research and Technology, 2001, 213: 432-438.
- [7] Hernandez M, Pla M, Esteve T, et al. A specific real-time quantitative PCR detection system for event MON810 in maize YieldGard® based on the 3'-transgene integration sequence [J]. Transgenic Research, 2003, 12: 179-189.
- [8] Huang H Y, Pan T M. Detection of genetically modified maize MON810 and NK603 by multiplex and real-time polymerase chain reaction methods [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52: 3264-3268.
- [9] Yang L T, Xu S C, Pan A H, et al. Event specific qualitative and quantitative polymerase chain reaction detection of genetically modified MON863 maize based on the 5'-transgene integration sequence [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53: 9312-9318.
- [10] Pan A H, Yang L T, Xu S C, et al. Event-specific qualitative and quantitative PCR detection of MON863 maize based on the 3'-transgene integration sequence [J]. Journal of Cereal Science, 2006, 43: 250-257.
- [11] Christer R N, Kunt G B, Arne H J. Characterisation of the 5' integration site and development of an event-specific real-time PCR assay for NK603 maize from a low starting copy number [J]. European Food Research and Technology, 2004, 219: 421-427.
- [12] Taverniers I, Windels P, Vaitilingom M, et al. Event specific plasmid standards and real-time PCR methods for transgenic Bt11, Bt176, and GA21 maize and transgenic GT73 canola [J]. Journal of

- Agricultural Food Chemistry, 2005, 53: 3041-3052.
- [13] Hernandez M, Esteve T, Prat S, et al. Development of real-time PCR systems based on SYBR Green I, Amplifluor™ and TaqMan technologies for specific quantitative detection of the transgenic maize event GA21 [J]. Journal of Cereal Science, 2004, 39: 99-107.
- [14] Collonnier C, Schattner A, Berthier G, et al. Characterization and event specific-detection by quantitative real-time PCR of T25 maize insert [J]. Journal of AOAC International, 2005, 88: 536-546.
- [15] Yang L T, Pan A H, Zhang K, et al. Qualitative and quantitative PCR methods for event specific detection of genetically modified cotton MON1445 and MON531 [J]. Transgenic Research, 2005, 14 (6): 817-831.
- [16] Jankiewicz A, Broll H, Zagon J. The official method for the detection of genetically modified soybeans (German Food Act LMBG < plicrow > 35): a semi-quantitative study of sensitivity limits with glyphosate-tolerant soybeans (Roundup Ready) and insect-resistant Bt maize (Maximizer) [J]. European Food Research and Technology, 1999, 209(2): 77-82.
- [17] Arumuganathan K, Earle E D. Nuclear DNA content of some important plant species [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1991, 9 (3): 208-218.
- [18] Ovesna J, Dedicova L, Horacek J, et al. Comparison of different PCR-based protocols for detection of Roundup Ready soybean [J]. Czech Journal of Genetically Plant Breeding, 2002, 38(1): 55-63.
- [19] Hurst C D, Knight A, Bruce I J. PCR detection of genetically modified soya and maize in foodstuffs [J]. Molecular Breeding, 1999, 5: 579-586.
- [20] 罗云波, 黄昆仑, 张大兵, 等. 转基因植物及其产品检测—大豆定性 PCR 方法 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2003. (Luo Y B, Huang K L, Zhang D B, et al. Detection of genetically modified plant organisms and derived products- qualitative PCR methods for soybeans [S]. Beijing: Agricultural Press, 2003.)

欢迎订阅 2009 年《大豆科学》

《大豆科学》是由黑龙江省农业科学院主管主办的我国大豆领域专业学术性期刊,也是被国内外多家重要数据库和文摘收录源收录的重点核心期刊,反映大豆科学的最新研究成果。主要刊登有关大豆遗传育种、品种资源、生理生态、耕作栽培、植物保护、营养肥料、生物技术、食品加工、药用功能及工业用途等方面的学术论文、科研报告、研究简报、国内外研究述评、学术活动简讯和新品种介绍等。

国内外收录《大豆科学》的主要数据库有:中国科学引文数据库(CSCD),中国科技信息所的数据库(CJCR),中国期刊全文数据库(CAJCED),中国学术期刊综合评价数据库,中国知识源总库-中国科技期刊精品数据库,中国科技期刊(遴选)数据库,万方数据库和英国国际农业与生物科学中心数据库(CAB International)。国内外收录《大豆科学》的权威文摘期刊有:《中国学术期刊文摘》、《中国学术期刊文摘(英文版)》、《中国农业文摘-粮食与经济作物》、《中国农业文摘-植物保护》、《中国生物学文摘》、英国的国际农业与生物科学中心数据库文摘《Soybean Abstract》、美国的《生物学文摘》和《植物育种文摘》等。

《大豆科学》主要面向从事大豆科学研究的科技工作者,大专院校师生、各级农业技术推广部门的技术人员及科技种田的农民。

国内外公开发行人,双月刊,16开本,每期180页。国内每期订价:10.00元,全年60.00元,邮发代号:14-95。国外每期订价:10.00美元(包括邮资),全年60美元。国外由中国国际图书贸易总公司发行,北京399信箱。国外代号:Q5587。

本刊热忱欢迎广大科研及有关企事业单位刊登广告,广告经营许可证号:2301030000004。

地址:哈尔滨市南岗区学府路368号《大豆科学》编辑部。

邮编:150086

电话:0451-86668735

E-mail: dadoukx@sina.com