

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2019.03.012

转基因棉花 MON88701 品系特异性实时 荧光 PCR 检测方法的建立

雷水娟¹, 刘二龙^{2*}, 卢 丽³, 吕英姿², 蒋 湘², 李嘉琪², 夏柔菲²
¹江西科技师范大学生命科学学院, 江西 南昌 330038; ²黄埔海关, 广东 广州 510730;
³广州海关, 广东 广州 510623

摘要:【目的】建立转基因棉花 MON88701 品系特异性实时荧光聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 检测方法。【方法】利用实时荧光 PCR 技术, 根据转基因棉花 MON88701 品系特异性序列设计引物和探针, 建立转基因棉花 MON88701 实时荧光 PCR 检测方法, 并测定本方法的灵敏度、特异性及可重复性。【结果】建立的检测方法特异于转基因棉花 MON88701 成分的检测, 灵敏度测试表明其定量下限为 34 拷贝; 重复性试验显示其相对标准偏差在可接受范围内。【结论】本研究建立的转基因棉花 MON88701 品系特异性实时荧光 PCR 检测方法具有良好的特异性和高灵敏度, 适合对转基因棉花 MON88701 品系进行检测。

关键词: 转基因棉花 MON88701; 品系特异性; 实时荧光 PCR

Establishment event-specific real-time polymerase chain reaction method for detection of genetically modified cotton line MON88701

LEI Shuijuan¹, LIU Erlong^{2*}, LU Li³, LÜ Yingzi², JIANG Xiang², LI Jiaqi², XIA Roufei²
¹College of Life Science, Jiangxi Science & Technology Normal University, Nanchang, Jiangxi 330038, China;
²Huangpu Customs, Guangzhou, Guangdong 510730, China; ³Guangzhou Customs, Guangzhou, Guangdong 510623, China

Abstract: 【Aim】To establish a real-time PCR detection method for the genetically modified (GM) Roundup Ready cotton event MON88701, which has not been authorized by the Ministry of Agriculture of China. 【Method】The specific primer pairs and probe based on the MON88701 event-specific sequence were designed and then the real-time PCR detection system was established. The specificity, sensitivity and repeatability were analyzed. 【Result】The real-time PCR method was specific for detecting MON88701. The limit of quantification (LOQ) was 34 copies MON88701 genomic DNA. Repeatability of the established event-specific real-time PCR method was assessed and the relative standard deviation (RSD) was within the acceptable range. 【Conclusion】The established event-specific quantitative real-time PCR method of MON88701 in this study has a good specificity and high sensitivity, and is suitable for the detection of the unauthorised event MON88701.

Key words: genetically modified cotton MON88701; event-specificity; real-time PCR

棉花是一种富含蛋白质、油和料纤维的高附加值经济作物, 其含纤维素 87%~90%, 常作为纺织和服装的一种重要原料(毕美超, 2016)。2018 年我国棉花种植面积为 335.23 万 hm², 全国棉花总产量 609.6 万 t (国家统计局, 2018), 2017 年我国累计进口棉花 115.48 万 t, 比 2016 年增长 29%(搜棉网, 2018)。

MON88701 是一种耐受麦草畏和草铵膦 2 种除

草剂的转基因棉花品系, 由孟山都公司研发。MON88701 经由农杆菌介导 PV-GHHT6997 质粒转入 Coker 130 棉花研发而成, 其 T-DNA 含有 *dmo* 基因盒和 *bar* 基因盒, 分别编码麦草畏单加氧酶和膦丝菌素 N-乙酰转移酶, 它们在转基因植株内均为 1 个拷贝。MON88701 最早于 2013 年在美国上市, 目前在巴西、澳大利、新西兰、加拿大、哥伦比亚等国

家已经获得批准种植或允许用作食品、饲料原料,但在我国尚未获得农业部批准。

2016 年欧盟转基因食物与饲料基准实验室建立了一种 MON88701 品系特异性的实时荧光聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 检测方法 (European Union, 2016), 但目前国内尚未见 MON88701 品系特异性检测方法的报道。为打破其他国家和地区设置的转基因产品贸易技术壁垒, 完善我国转基因产品品系识别及定量检测技术体系, 保护消费者对转基因产品的知情权, 本研究基于 MON88701 5' 端邻接区序列, 建立 MON88701 品系特异性实时荧光 PCR 检测方法, 为相关部门监管转基因棉花 MON88701 品系提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 供试材料 转基因油菜 MON88302、转基因油菜 DP-073496-4、转基因棉花 MON88913、转基因大豆 A2704-12、转基因大豆 GTS 40-30-2、转基因玉米 MIR162、转基因玉米 MON810、转基因玉米 NK603、转基因玉米 BT11、转基因甜菜 H7-1、非转基因大米和非转基因棉花新陆早 51 号。供试材料为本实验室购置保存; 棉花内源基因棉花乙醇脱氢酶 C 基因 (AdhC 基因) (Mazzara, *et al.*, 2007) 和转基因棉花 MON88701 品系特异性片段双基因阳性质粒样品为本实验室构建。

1.1.2 主要试剂 Primex Ex Taq (2×) for qPCR (大连宝生物); DNA 提取试剂盒 (北京天根公司); 终浓度 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的引物和探针工作液 (闪晶生物公司)。

1.1.3 主要仪器与设备 实时荧光定量 PCR 仪 ABI 7500、ABI 7500FAST (美国应用生物系统公司); 微滴式数字 PCR 系统 QX 200 (美国伯乐公司); 微量分光光度计 nanodrop 2000c (美国 Thermo 公司); 研磨机 (德国 IKA)。

1.2 实验方法

1.2.1 样品基因组 DNA 的提取与纯化 称取 100 mg 研磨好的样品, 使用基因组 DNA 提取试剂盒提取样品中的基因组 DNA, 然后采用微量分光光度计测定提取基因组 DNA 的浓度, 最后将已测定好浓度的 DNA 溶液置于 -20°C 条件下备用。

1.2.2 引物和探针设计 根据相关基因数据库所述转基因棉花 MON88701 品系转入的基因盒 5' 端与棉花基因组邻接区序列, 设计引物和探针通过

Primer 5.0 软件。然后在 NCBI 网站上将设计好的引物、探针通过 Blast 比对, 确定引物和探针的理论特异性; 用棉花内源基因 AdhC 对棉花来源样品 DNA 进行检测。

1.2.3 实时荧光 PCR 反应体系退火温度及引物探针配比的优化 采用宝生物酶系混合物推荐的引物探针比, 采用不同体积的引物探针进行优化。

A 组的扩增反应体系为: $25 \mu\text{L}$, 包括 Premix Ex TaqTM $12.5 \mu\text{L}$, ROX Reference Dye II $0.2 \mu\text{L}$, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 检测引物 MON88701-F 和 MON88701-R 各 $0.5 \mu\text{L}$, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 检测探针 MON88701-P $1 \mu\text{L}$, 34000 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ DNA 模板 (转基因棉花 MON88701 品系基因组 DNA) $2 \mu\text{L}$ 和 ddH₂O $8.3 \mu\text{L}$ 。

B 组的扩增反应体系为: $25 \mu\text{L}$, 包括 Premix Ex TaqTM $12.5 \mu\text{L}$, ROX Reference Dye II $0.2 \mu\text{L}$, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 检测引物 MON88701-F 和 MON88701-R 各 $0.4 \mu\text{L}$, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 检测探针 MON88701-P $0.8 \mu\text{L}$, 34000 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ DNA 模板 (转基因棉花 MON88701 品系基因组 DNA) $2 \mu\text{L}$ 和 ddH₂O $8.7 \mu\text{L}$ 。

C 组的扩增反应体系为: $25 \mu\text{L}$, 包括 Premix Ex TaqTM $12.5 \mu\text{L}$, ROX Reference Dye II $0.2 \mu\text{L}$, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 检测引物 MON88701-F 和 MON88701-R 各 $0.2 \mu\text{L}$, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 检测探针 MON88701-P $0.4 \mu\text{L}$, 34000 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ DNA 模板 (转基因棉花 MON88701 品系基因组 DNA) $2 \mu\text{L}$ 和 ddH₂O $5.9 \mu\text{L}$ 。

退火温度分别设置为 $58, 60^\circ\text{C}$, 反应程序为 95°C 30 s , 95°C 5 s , 58°C 34 s , 40 个循环, 于 $58, 60^\circ\text{C}$ 分别收集荧光信号。

1.2.4 实时荧光 PCR 检测方法的特异性 提取转基因油菜 MON88302、转基因油菜 DP-073496-4、转基因棉花 MON88913、转基因大豆 A2704-12、转基因大豆 GTS 40-30-2、转基因玉米 MON810、转基因玉米 BT11、转基因玉米 MIR162、转基因玉米 NK603、转基因甜菜 H7-1、非转基因棉花的基因组 DNA 为模板, 阳性对照为 Adhc-MON88701 质粒, 阴性对照为非转基因大米 DNA。通过已建立的转基因棉花 MON88701 品系特异性实时荧光 PCR 检测方法进行扩增, 对该检测方法的特异性进行鉴定。

1.2.5 实时荧光 PCR 方法的灵敏度及标准曲线建立 将提取的 Adhc-MON88701 质粒 DNA 稀释后用微滴数字 PCR 进行定量, 然后用 TE 缓冲液分别稀释至 $340000, 34000, 17000, 3400, 1700, 340, 170,$

34 和 17 拷贝 · μL^{-1} , 进行线性范围测试、可重复性测试和灵敏度检测。上述 9 个浓度 DNA 溶液进行实时荧光 PCR 扩增, 每个浓度 3 个平行孔。

1.2.6 可重复性测试 对 1.2.5 中倍比稀释的 DNA 溶液, 测定本实验建立的方法的可重复性, 并统计分析其标准偏差、相对标准偏差。

2 结果与分析

2.1 实时荧光 PCR 检测方法的建立与优化

2.1.1 PCR 检测方法的建立与优化 该实验设计的多对引物和探针, 是通过分析转基因棉花 MON88701 品系转入的基因盒 5' 端与棉花基因组邻接区序列(图 1), 然后分析引物与探针的反应效

率、扩增曲线和扩增效果, 对引物和探针进行筛选, 最终选择 MON8870-F/R/P 引物和探针建立转基因棉花 MON88701 品系特异性检测方法, 序列见表 1。

2.1.2 PCR 反应体系退火温度及引物探针配比优化 退火温度为 58 $^{\circ}\text{C}$ 时(图 2), 从左到右分别为 B、A 和 C 组的扩增曲线, 3 组均扩增良好, B 组 Ct 值最小; 退火温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 时(图 3), 从左到右分别为 A、B 和 C 组的扩增曲线, 3 组均可有效扩增, 但 Ct 值均比 58 $^{\circ}\text{C}$ 时稍高, 所以基于经济性和扩增效率, 考虑选择 58 $^{\circ}\text{C}$ 作为退火温度、B 组引物探针配比为本研究的扩增反应体系比较合适。

1 TTGAGT**GAAA** TGCAGAGTTA CAAGAACATC CTTGATAACC TTATTATAT AAAAATTAGG
61 ACATATTCTC **TTAAGGTAGC** CAAAGCCCGG GCTTAATTAA **GGCGCGCCCGG** CCAAGTC
118 GGC CGCGGCCGCG TTAAC**CAAGCT** TCTGCAGAAT TCGTCA

图 1 MON88701 特异性序列

Fig.1 Specific sequence of MON88701

阴影部分依次为 MON8870-F, MON8870R, MON8870P。

The shaded parts are MON8870-F, MON8870R, MON8870P respectively.

表 1 实时荧光 PCR 的引物、探针

Table 1 Primers and probes for real-time fluorescent PCR

检测目标 Detection target	引物/探针 Primers/probes	序列 Sequence (5'-3')	产物长度 Product length /bp	来源 Source
MON88701 品系特异性序列	MON88701-F MON88701-R	GAAATGCAGAGTTACAAGAACATCC TGACGAATTCTGCAGAAGCTTG	151	本研究设计 This study
MON88701 Specific sequence AdhC 基因	MON88701-P Adhc-F	FAM-CCAAAGCCCGGGCTTAATTAAGGC-BHQ1 CACATGACTTAGCCCATCTTTGCG	73	Mazzara <i>et al.</i> , 2007
AdhC gene	Adhc-R Adhc-P	CCCACCCCTTTTGTGTTTAGC VIC-TGCAGGTTTGGTGCCACTGTGAATG -BHQ1		

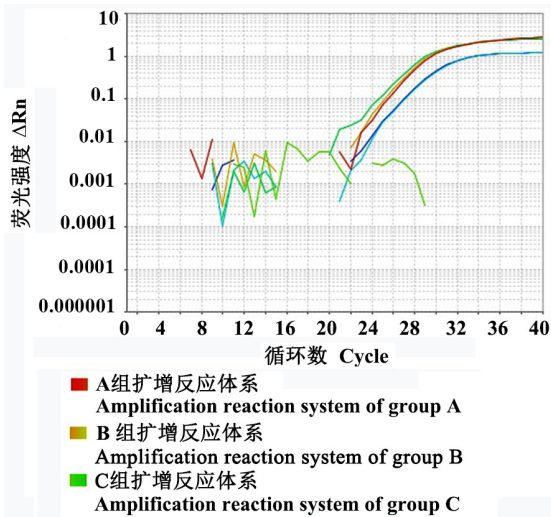


图 2 退火温度为 58 $^{\circ}\text{C}$ 时的扩增图

Fig.2 Amplification plots of A, B and C prime/probe group at 58 $^{\circ}\text{C}$

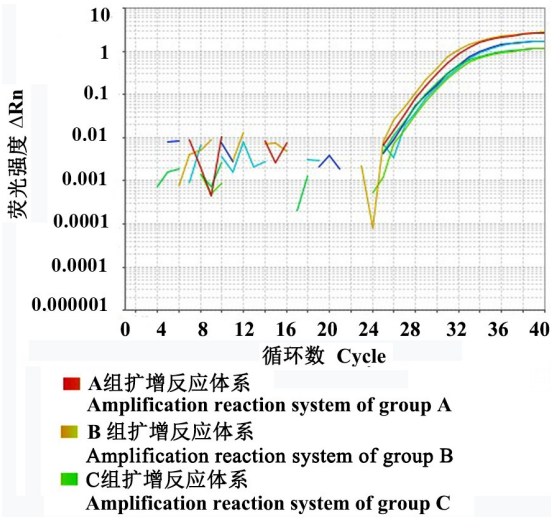


图 3 退火温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 时的扩增图

Fig.3 Amplification plots of A, B and C prime/probe group at 60 $^{\circ}\text{C}$

2.2 特异性测试

采用 1.2.4 中 14 种样品的 DNA 测定本实验建立的转基因棉花 MON88701 品系特异性检测方法的特异性, 结果(图 4)表明: 采用转基因棉花 MON88701 品系特异性引物 MON88701-F/R 和探针 MON88701-P 进行实时荧光 PCR 时, 典型荧光扩增曲线的只有阳性样品 Adhc-MON88701, 无典型曲线的均为其他农作物材料样品, 说明本实验的检测方法特异性良好。

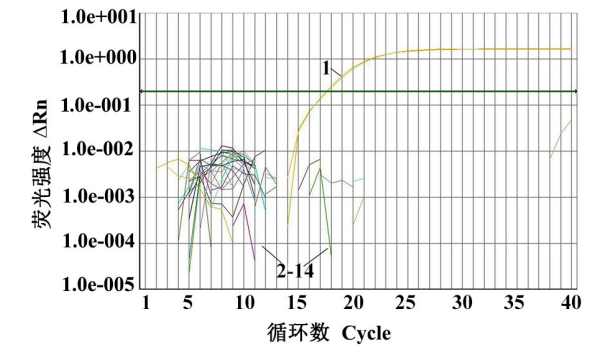


图 4 MON88701 的特异性测试
Fig.4 Specific test of MON88701

1: Adhc-MON88701 阳性样品; 2~14: 分别为转基因油菜 MON88302、转基因油菜 DP-073496-4、转基因棉花 MON88913、转基因大豆 A2704-12、转基因大豆 GTS 40-30-2、转基因玉米 MON810、转基因玉米 BT11、转基因玉米 MIR162、转基因玉米 NK603、转基因甜菜 H7-1、非转基因棉花、阴性对照和空白对照。
1: Positive sample of Adhc-MON88701; 2-14: Genetically modified rapeseed MON88302, genetically modified rapeseed DP-073496-4, genetically modified cotton MON88913, genetically modified soybean A270412, genetically modified soybean GTS 40-30-2, genetically modified corn MON810, genetically modified corn BT11, genetically modified corn MIR162, genetically modified corn NK603, genetically modified sugar beet H7-1, non-genetically modified cotton, negative control and blank control, respectively.

2.3 灵敏度测试

将提取的 Adhc-MON88701 质粒 DNA 溶液分别稀释至 340000、34000、17000、3400、1700、340、170、34 和 17 拷贝·μL⁻¹共 9 个浓度梯度进行检测(图 5)。9 个浓度梯度均有典型扩增曲线, 其最低检测拷贝数为 34 拷贝(25 μL 反应体系上样量 2 μL)。扩增图从左至右分别为 340000~17 拷贝·μL⁻¹扩增曲线。

2.4 制备标准曲线

利用 2.3 中 9 个浓度梯度 DNA 作为模板, 进行转基因棉花 MON88701 品系实时荧光 PCR 检测, 建立转基因棉花 MON88701 品系特异性序列标准曲线(图 6), 以实现转基因棉花 MON88701 品系的相对定量分析。测试结果的 Ct 值如表 2 所示, 根据表 2 中的 Ct 值数据与在 34~680000 拷贝(25

μL 体系中上样量为 2 μL) 范围内 9 个浓度的对数值与所得 Ct 值建立标准曲线如图 6 所示, 线性回归方程为 $y = -3.48x + 39.91$, $R^2 = 0.99$, 扩增效率为 94%(介于 90%~110%), 表明本实验建立的 MON88701 品系特异性实时荧光 PCR 检测方法在模板量 34~680000 拷贝范围内线性相关性良好, 扩增效率高, 符合 ENGL(european network of gmo laboratories)相关要求 (Grl-gmff, 2009); 在模板量为 34~680000 拷贝的线性范围内, 其 Ct 值的 SD 介于 0.22~0.62, RSD 介于 0.78%~2.90%, 表明在线性范围内最低模板量 34 拷贝时, 其 SD 和 RSD 均小于 25%, 所以确定本实验的定量检测下限为 34 拷贝。

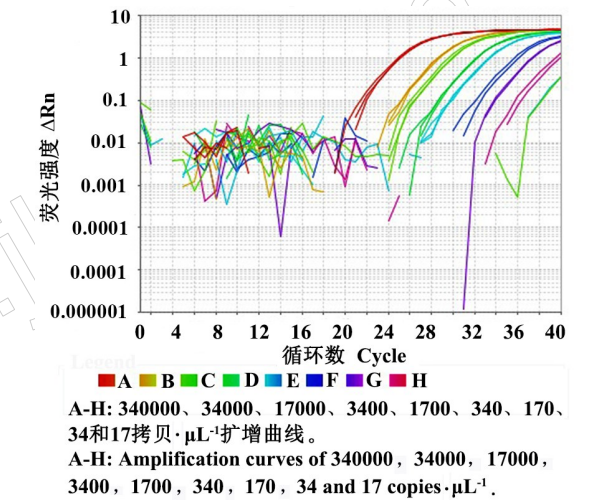


图 5 MON88701 的灵敏度测试
Fig.5 Sensitivity test of MON88701

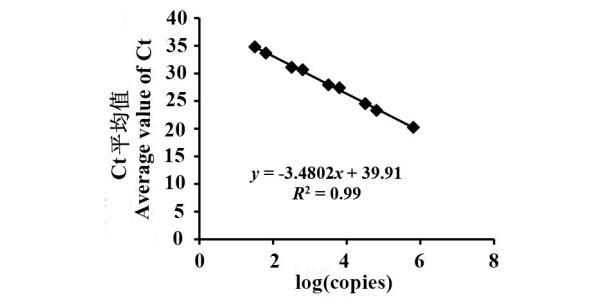


图 6 MON88701 实时荧光 PCR 标准曲线
Fig.6 Standard curve of real-time PCR method for MON88701

3 讨论

为保证转基因产品标签制度顺利实施, 需要建立准确、稳定的检测方法对转基因作物进行有效鉴别(刘二龙等, 2015)。目前各国均研究和发展了一些基于不同技术平台的转基因检测方法, 其中以基于核酸基础上的 PCR 方法为主流(吴永彬等, 2011)。品系特异性实时荧光 PCR 能对外源基因插

入受体基因组位点的唯一性特征来设计引物探针进行检测 (Kluga *et al.*, 2012), 具有特异、快速、高灵敏性和高能量等特点 (Anklam *et al.*, 2002), 因此是目前被广泛认可和采用的一种检测方法。目前已有多

种转基因作物品系建立了实时荧光 PCR 方法, 如转 *Bt* 基因大米 (吴孝横等, 2009)、转基因玉米 Bt176 (李葱葱等, 2007)、转基因大豆 (吴影等, 2007) 等。

表 2 实时荧光 PCR 方法的灵敏度及可重复性测试
Table 2 Sensitivity and repeatability test of real-time fluorescent PCR method

DNA 模板量 Template/copies	Ct 值 Ct value			Ct 平均值 Ct average value	SD	RSD/%
	1	2	3			
680000	20.38	20.93	19.75	20.35	0.59	2.90
68000	23.26	23.61	24.00	23.62	0.37	1.57
34000	24.82	24.31	24.71	24.61	0.27	1.09
6800	26.73	27.03	25.90	26.55	0.59	2.20
3400	27.52	27.84	27.93	27.76	0.22	0.78
680	29.89	31.00	30.73	30.54	0.58	1.90
340	31.37	32.43	32.19	32.00	0.56	1.74
68	34.76	34.69	34.02	34.49	0.41	1.18
34	35.13	35.87	36.36	35.79	0.62	1.73

本研究针对转基因棉花 MON88701 品系转入的基因盒 5'端与棉花基因组邻接区序列来设计检测引物和探针, 建立转基因棉花 MON88701 品系特异性实时荧光 PCR 检测方法, 最低定量检测下限为 34 拷贝, 其扩增效率为 94% (介于 90% ~ 110%), 重复性实验的 SD 和 RSD 均符合 ENGL 要求, 表明该方法具有良好的特异性、高灵敏度和稳定性强的优点, 可应用于进出口口岸、农产品监管中转基因棉花 MON88701 的检测。

参考文献

毕美超, 2016. 保定棉田主要害虫的发生规律及不同品种抗虫性评价. 硕士学位论文. 保定: 河北农业大学.

国家统计局, 2018. 国家统计局关于 2018 年棉花产量的公告. (2018-12-29) [2019-07-03]. http://www.stats.gov.cn/tjsj/zxfb/201812/t20181229_1642170.html.

李葱葱, 王青山, 李飞武, 刘娜, 康岭生, 王晶, 赵宁, 张明, 2007. 用实时荧光 PCR 方法定量检测 Bt176 转基因玉米. 吉林农业科学, 32(5): 24-27.

刘二龙, 卢丽, 吕英姿, 蒋湘, 张旺, 唐婕, 郑高彬, 林学勤, 符其姣, 2015. 转基因苜蓿草 J101 品系特异性实时荧光 PCR 检测方法的建立. 植物检疫, 29(3): 77-82.

搜棉网, 2018. 2017 年我国棉花进口量超 115 万吨. (2018-1-17) [2019-07-03]. http://www.socotton.com/Html/IndustryNews/2018-1/17/_201811712003358.htm.

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

吴影, 宋丰顺, 陆徐忠, 赵伟, 杨剑波, 李莉, 2007. 实时荧光 PCR 技术定量检测转基因大豆方法的研究. 作物学

报, 33(10): 1733-1737.

吴永彬, 肖维威, 张宝, 蔡翠霞, 康文杰, 周琳华, 刘唐书, 马文丽, 2011. 转基因大豆、玉米、油菜和水稻品系特异性检测质粒标准分子的快速构建及应用. 中国生物化学与分子生物学报, 27(8): 775-782.

ANKLAM E, GADANI F, HEINZE P, PIJNENBURG H, EEDE G V D, 2002. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. *European Food Research & Technology*, 214(1): 3-26.

CRL-GMFF, 2009. Definition of minimum performance requirements for analytical methods of gmo testing. (2009-04-13) [2019-07-03]. http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/Min_Perf_Requirements_Analytical_methods.pdf.

KLUGA L, FOLLONI S, DEN BULCKE M, DEN EEDE G, QUERCI M, 2012. Applicability of the "real-time PCR-based ready-to-use multi-target analytical system for GMO detection" in processed maize matrices. *European Food Research & Technology*, 234(1): 109-118.

MAZZARA M, GRAZIOLI E, SAVINI C, DEN EEDE G, 2007. Event-specific method for the quantification of cotton line LLcotton25 using real-time PCR. (2007-03-14) [2019-07-03]. http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/LL-Cotton25_val_report.pdf.

European Union Reference Laboratory For Genetically Modified Food And Feed, 2016. Event-specific method for the quantification of cotton MON 88701 using real-time PCR. Ispra, Italy: JRC Publication.