

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2023.01.007

转基因抗虫耐除草剂玉米 MON87411 精准定量检测方法的建立

李凌燕^{1,2*}, 张旭冬¹⁺, 陈子言¹, 王颢潜¹, 乌 兰², 田 锦², 张秀杰^{1*}, 陈 红^{1*}, 梁晋刚^{1*}
¹农业农村部科技发展中心, 北京 100176; ²北京农业职业学院, 北京 102442

摘要:【目的】抗虫耐除草剂玉米 MON87411 是孟山都远东有限公司利用农杆菌介导方法研发的玉米转化体, 已获得我国进口用作加工原料的农业转基因生物安全证书。为满足生物安全监管的要求, 亟需建立该转化体的定量检测方法。【方法】根据抗虫耐除草剂玉米 MON87411 的两端旁侧序列信息设计引物和 Taqman 探针, 进行引物筛选、特异性检测、PCR 体系优化、标准曲线建立、正确度及精密度检测、检出限及定量限测试、微滴数字 PCR 方法验证等。【结果】该方法能特异、定量地检测出抗虫耐除草剂玉米 MON87411 转化体成分, 检出限低至 10 拷贝, 定量限为 40 拷贝。对测试样品定值准确, 经微滴数字 PCR 方法验证结果一致。【结论】本方法为该新品种转基因玉米品系的精准定量提供了一种新的检测方法, 为生物安全监管提供了有效的技术支撑。



开放科学标识码
(OSID 码)

关键词: 转基因玉米; MON87411; 抗虫耐除草剂; 实时荧光 PCR; 微滴数字 PCR; 精准定量

Establishment of accurate quantitative detection method for insect-resistant and herbicide-tolerant maize MON87411

LI Lingyan^{1, 2*}, ZHANG Xudong¹⁺, CHEN Ziyang¹, WANG Haoqian¹, WU Lan²,
TIAN Jin², ZHANG Xiujie^{1*}, CHEN Hong^{1*}, LIANG Jingang^{1*}

¹Development Center of Science and Technology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100176, China;

²Beijing Vocational College of Agriculture, Beijing 102442, China

Abstract: 【Aim】 Insect-resistant and herbicide-tolerant maize MON87411 is a maize event developed by Monsanto Far East Co. Ltd. using agrobacterium mediated transformation through recombinant DNA techniques. It has obtained a safety certificate for genetically modified agricultural organisms imported to China as raw materials for processing. Establishing a quantitative detection method for the event to meet the requirements of biosafety compliance is necessary. 【Method】 Primers and TaqMan probes were designed based on the flanking sequence information of maize MON87411. After primer screening, specificity detection, PCR system optimization, standard curve establishment, accuracy and precision detection, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) detection, and droplet digital PCR validation were performed. 【Result】 The results showed that the method could specifically and quantitatively detect the components of maize MON87411, with a LOD of 10 copies and a LOQ of 40 copies. The values of the tested samples were accurate, and the results were consistent with those of droplet digital PCR. 【Conclusion】 The method provides a new detection method for accurately quantifying the new genetically modified maize MON87411 and provides effective technical support for biosafety supervision.

Key words: genetically modified maize; MON87411; insect-resistant and herbicide-tolerant; real-time PCR; droplet digital PCR; accurate quantitative

收稿日期(Received): 2022-02-15 接受日期(Accepted): 2022-04-29

基金项目: 农业科研杰出人才培养计划(2021年); 转基因生物新品种培育重大专项(2019ZX08013011, 2016ZX08012003)

作者简介: 李凌燕, 女, 硕士, 高级实验师。研究方向: 生物安全。E-mail: 80200@bvca.edu.cn; 张旭冬, 女, 农艺师。研究方向: 农业转基因生物安全检测和管理。E-mail: zxd59198116@126.com

* 同等贡献作者(The two authors contributed equally to this work)

* 通信作者(Author for correspondence), 张秀杰, E-mail: zhxj7410@sina.com; 陈红, E-mail: chen hong@agri.gov.cn; 梁晋刚, E-mail: liangjingang@agri.gov.cn

自 1996 年转基因作物商业化种植以来,全球种植面积已达 1.9 亿 hm^2 。转基因玉米 *Zea mays* L. 作为主要的转基因作物之一,仅 2019 年种植面积就达到 6090 万 hm^2 ,种植面积占全球玉米种植总面积的 31% (国际农业生物技术应用服务组织, 2021)。随着转基因作物及其产品的不断推广和应用,转基因作物及其衍生食品的安全性问题引起了社会的强烈关注 (徐若梅, 2018), 全球已有 71 个国家或地区相继对转基因产品进行了强制标识管理, 如韩国和日本分别将转基因成分的标识阈值定为 3.0% 和 5.0%, 欧盟仅为 0.9%。我国也颁布了《农业转基因生物标识管理办法》, 对转基因生物实行标识管理制度 (Zeng *et al.*, 2021)。

转基因成分标识是基于转基因成分含量的精准定量检测。国际上检测转基因的主要方法是基于核酸水平的 PCR 检测, 而实时荧光定量 PCR (real-time PCR) 技术是目前应用最为广泛的技术之一 (雷展等, 2021; Gong *et al.*, 2020)。该技术是在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程, 根据已知浓度标准的 C_t 值与其浓度对数呈负线性相关的原理, 建立标准曲线, 然后对目标基因进行定量分析, 具有灵敏度高、特异性强、自动化程度高、实时、准确等特点。微滴式数字 PCR (droplet-based digital PCR, ddPCR) 是新兴的一项核酸检测定量技术, 该技术不依赖任何校准物, 无需构建标准曲线, 以形成大量油包水微滴的形式对核酸进行成千上万倍稀释, 然后以每个小微滴为独立的反应单元进行 PCR 反应, 最后利用泊松分布原理, 实现对核酸检测的绝对定量。该方法操作简便、快速高效、准确性高、重复性好, 也成为转基因成分含量精准检测的定量方法之一 (斯能武等, 2021)。

抗虫耐除草剂玉米 MON87411 是孟山都远东有限公司利用农杆菌介导的方法研发的抗虫耐除草剂玉米转化体, 该转化体能耐受草甘膦除草剂, 还具有防控玉米根虫的性状。2014 年澳新食品标准局 (Food Standards Australia New Zealand, FSANZ) 批准孟山都转基因玉米 MON87411 用于食品, 2015 年美国最终审批。该转化体已获得进口用作加工原料的农业转基因生物安全证书, 具有良好的产业化前景。在国际上, 欧盟已经发布了针对该

转化体的实时荧光定量 PCR 检测标准 (ENGL, 2016), 但该标准在国内尚未得到确认。我国也没有相关的国家标准。刘二龙等 (2017) 针对 MON87411 转化体插入序列 5' 端与玉米基因组邻接区序列设计引物和探针, 建立了该转化体特异性实时荧光定性定量 PCR 检测方法。本研究拓展了转基因玉米 MON87411 转化体的定量检测方法, 以转化体插入序列 3' 端与玉米基因组邻接区序列设计引物和探针, 建立了一种新的定量检测方法, 以期为我国转基因玉米的安全监管提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品 抗虫耐除草剂玉米 MON87411、非转基因受体玉米 LH244, 由孟山都远东有限公司提供; 特异性测试样品中, 其他转基因玉米、大豆 *Glycine max* (Linn.) Merr.、水稻 *Oryza sativa* L.、油菜 *Brassica chinensis* L. 和棉花 *Gossypium* spp. 及非转基因样品均由本实验室长期保存。转基因作物混合样品混合比例见表 1。

1.1.2 主要试剂 高效植物基因组 DNA 提取试剂盒购于天根生化科技 (北京) 有限公司; TaqMan™ Gene Expression Master Mix 购于赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 2×ddPCR Supermix for probes 预混液, 购自美国 Bio-Rad 公司; 引物和探针由上海生工生物公司合成; 其余试剂均为国产分析纯。

1.1.3 主要仪器设备 台式冷冻离心机 (Eppendorf, 美国) Q5000 超微量紫外分光光度计 (Quawell, 美国)、C1000 型梯度 PCR 仪 (Bio-Rad, 美国)、CFX 96 实时荧光分析仪 (Bio-Rad, 美国)、QX-100 微滴数字 PCR 仪 (Bio-Rad, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 将抗虫耐除草剂玉米 MON87411 及其受体种子单株育苗, 用天根高效植物基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA。转基因玉米混合样、转基因大豆混合样、转基因油菜混合样、转基因水稻混合样、转基因棉花混合样、非转基因大豆、非转基因玉米、非转基因棉花、非转基因油菜、非转基因水稻取 100 mg 粉末样品, 按照植物基因组 DNA 提取试剂盒操作说明书操作。超微量紫外分光光度计测定 DNA 质量和浓度, 用去离子水将 DNA 溶液稀释至 $25 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

表 1 转基因混合样品组分
Table 1 Components of genetically modified mixed sample

样品 Sample	组分 Components	混合方式 Mixed mode
转基因玉米混合物 Genetically modified corn mixture	Bt11、Bt176、MON810、MON863、GA21、NK603、T25、TC1507、MON89034、MON88017、59122、MIR604、3272、MON87460、MIR162、DAS40278-9、4114、MON87427、5307	每种转化体含量为 1%,以非转基因玉米为填充物 The content of each transformant was 1% and non-transgenic maize was used as the filler
转基因大豆混合物 Genetically modified soybean mixture	GTS40-3-2、MON89788、A5547-127、A2704-12、356043、305423、CV127、MON87701、MON87708、MON87769、MON87705、FG72、DAS68416-4、SHZD32-1	每种转化体含量为 1%,以非转基因大豆为填充物 The content of each transformant was 1% and non-transgenic soybean was used as the filler
转基因水稻混合物 Genetically modified rice mixture	TT51-1、KF-6、KMD-1、M12、KF-8、KF-2、G6H1、T1C-19	每种转化体含量为 1%,以非转基因水稻为填充物 The content of each transformant was 1% and non-transgenic rice was used as the filler
转基因油菜混合物 Genetically modified rape mixture	MS1、MS8、RF1、RF2、RF3、T45、Oxy-235、Topas19/2、MON88302、73496	每种转化体含量为 1%,以非转基因油菜为填充物 The content of each transformant was 1%, and non-transgenic rapeseed was used as filler
转基因棉花混合物 Genetically modified cotton mixture	MON1445、MON531、MON15985、LLCOTTON25、MON88913、GHB614、COT102	每种转化体含量为 1%,以非转基因棉花为填充物 The content of each transformant was 1% and non-transgenic cotton was used as filler

1.2.2 引物和探针的设计 本研究以外源插入序列与玉米基因组连接区域的转化体特异性序列为靶标,应用 Primer Express 3.0 设计引物探针,共设计 8 对引物组合,同时将转化体研发者提供的引物探针组合(3'-3)引入试验进行对比(表 2,3)。引物筛选以 *zSSIIb* 为内标准基因,以 10%的 MON87411 基因组 DNA 为模板,采用实时荧光 PCR 扩增体系

[DNA 模板 2.0 μL, 2×TaqMan™ gene expression master mix 12.5 μL, 上、下游引物 (10 μmol·L⁻¹) 各 1.0 μL, 10 μmol·L⁻¹ 探针 0.5 μL, 补充 ddH₂O 至 25.0 μL] 和反应程序(95 ℃ 预变性 10 min, 1 个循环; 95 ℃ 变性 10 s, 60 ℃ 退火 30 s, 40 个循环) 进行 PCR 扩增,每个反应设置 3 个平行 3 次重复。

表 2 MON87411 实时荧光 PCR 检测备选引物和探针
Table 2 Alternative primers and probes for real-time fluorescence PCR detection of MON87411

5'端引物和探针 5'-end primers and probes	序列(5'—3') Sequences (5'—3')	3'端引物和探针 3'-end primers and probes	序列(5'—3') Sequences (5'—3')
MON87411-5-Q	CCGGGAAAT CTACATGGATC	MON87411-3-2Q	CGGCCGCG TTTAAACTAT
MON87411-5-1F-2	GGCAA AACACTAATG AATAGTTAAG	MON87411-3-1F	TG TAACAGAAAA CACCATC
MON87411-5-1F-3	GGCAAAACACTAATG AATAG	MON87411-3-1R	TGCAACAAAGTGAACACCAG
MON87411-5-1R	GCTGCGGACATCTACATTTT	MON87411-3-2R	AAGTGAAGTACTTCTAGGCTAG
MON87411-5-2R	AATAACGCTGCGGACATCT		
MON87411-5-3R	CTCCATATTGACCATCATACTC		

表 3 MON87411 实时荧光 PCR 检测备选引物探针组合
Table 3 Selection of primers and probes for real-time PCR detection of MON87411

序号 Numbers	上游引物 Upstream primers	下游引物 Downstream primers	引物探针组合 Primer/probe combinations	片段长度 Segment length/bp
5'-1	MON87411-5-1F-2	MON87411-5-1R	MON87411-5-Q	141
5'-2	MON87411-5-1F-2	MON87411-5-2R	MON87411-5-Q	146
5'-3	MON87411-5-1F-2	MON87411-5-3R	MON87411-5-Q	84
5'-4	MON87411-5-1F-3	MON87411-5-1R	MON87411-5-Q	141
5'-5	MON87411-5-1F-3	MON87411-5-2R	MON87411-5-Q	146
5'-6	MON87411-5-1F-3	MON87411-5-3R	MON87411-5-Q	84
3'-1	MON87411-3-1F	MON87411-3-1R	MON87411-3-2Q	146
3'-2	MON87411-3-1F	MON87411-3-2R	MON87411-3-2Q	103
3'-3	MON87411-QF	MON87411-QR	MON87411-QP	109

1.2.3 特异性测试 以去离子水作为空白对照模板,以受体玉米 DNA 作为阴性对照模板,采用通用

实时荧光 PCR 扩增体系和程序进行扩增,每个反应设置 3 个平行重复。

1.2.4 引物与探针浓度的确定 为了获得最优的引物和探针反应浓度,试验设置 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 共 5 个探针浓度,对应的引物浓度为探针浓度的 2 倍。以 10% 的 MON87411 基因组 DNA 为模板,通用实时荧光 PCR 体系和程序进行扩增,通过扩增曲线和 C_t 值筛选最优组合。

1.2.5 标准曲线的建立 以 1.2.1 提取的抗虫耐除草剂玉米 MON87411(经传统 PCR 方法鉴定为杂合子)及其受体植株叶片基因组 DNA 作为标准品。用去离子水将基因组 DNA 溶液稀释至 $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,用去离子水依次稀释配制成 100、10、1、0.25、0.0625 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 5 个浓度的样品。分别以这 5 个浓度的样品为模板,进行玉米内标准基因 *zSSIIb* 和 MON87411 转化体特异性序列的荧光定量扩增。每个样品设 3 个平行,重复 3 次。以 C_t 值为纵坐标,样品中检测靶标拷贝数对数值为横坐标,绘制标准曲线。

1.2.6 正确度和精密度测试 设置抗虫耐除草剂玉米 MON87411 和阴性对照样品基因 DNA 初始浓度为 $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,配制抗虫耐除草剂玉米 MON87411 含量为 5%、1% 和 0.1% 玉米基因组 DNA 梯度样品,每次设 3 个平行样,重复 3 次实验,计算结果的偏差(Bias)和相对标准偏差(relative standard deviation, RSD),评价检测方法的正确度和精密度。

1.2.7 检出限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantitation, LOQ)的确定 LOD 的确定:设置抗虫耐除草剂玉米 MON87411 转化体含量为 0.1% 和 0.05% 的样品分别进行 60 次测试,计算结果的偏差和相对标准偏差。

LOQ 的确定:设置 18 份抗虫耐除草剂玉米 MON87411 转化体含量为 0.1% 的样品,进行定量测试,计算偏差和相对标准偏差。

1.2.8 微滴数字 PCR 验证 以抗虫耐除草剂玉米 MON87411 含量为 5%、1%、0.1% 的玉米基因组 DNA 样品为模板,应用 1.2.2 所述的 *zSSIIb* 内标准基因和筛选出的转化体特异性引物序列,采用通用的微滴数字 PCR 反应体系和程序进行扩增,测试样品含量,评价测试方法的正确度和精密度。在 20 μL 的 PCR 反应体系中,包括 2 $\times$ ddPCR Supermix for probes 预混液 10 μL ,上下游引物和探针各 1 μL ,模板 1 μL ,无菌超纯水补足 20 μL ,混匀后离心。将其小心转移至微卡发生器,切忌产生气泡,同时与微卡发生器相应位置加入重油 70 μL ,盖上垫片,放入微滴生成器中生成微滴。吸取 40 μL 生成的微滴,小心转移至数字 PCR 96 孔反应板中,170 $^{\circ}\text{C}$ 热封后在 PCR 仪上开始循环,PCR 仪爬坡速度设置为 $2^{\circ}\text{C} \cdot \text{s}^{-1}$,循环参数为:95 $^{\circ}\text{C}$, 10 min; 40 个循环(94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$, 1 min); 98 $^{\circ}\text{C}$, 10 min。

2 结果与分析

2.1 引物探针的筛选

以 *zSSIIb* 为内标准基因,以 10% 的 MON87411 基因组 DNA 为模板,采用 1.2.2 中扩增体系和反应程序进行扩增,每个反应设置 3 个平行重复。根据结果选择扩增信号最强、 C_t 值最小的引物作为候选引物。扩增结果如图 1A 所示,8 对引物探针组合均获得特异性扩增,且引物探针组合 5'-1、5'-2、5'-3 扩增 C_t 值较小,效果较好。但是分析引物序列发现,5'-1 与 5'-2 正向引物相同,扩增片段长度只相差 5 个碱基,差异较小,故选 5'-2、5'-3 与 3'-3 引物探针组合进行比较,用于下一步验证。

验证结果见图 1B,在空白和阴性样品中没有扩增曲线,且 3'-3 组合 C_t 值较小,明显优于其他的引物/探针,因此,选用 3'-3 组合进行后续测试,并将此引物/探针组合命名为 MON87411-QF/QR/QP。

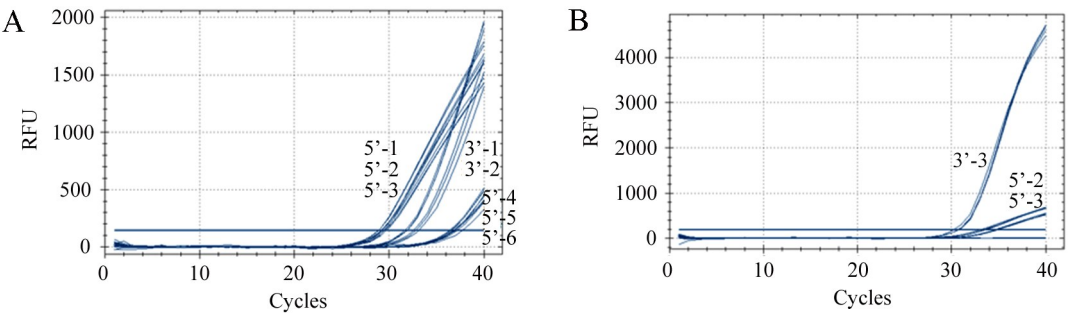


图 1 MON87411 实时荧光 PCR 方法引物/探针的筛选 (A) 及比较 (B)
Fig.1 Primers/probes screening (A) and comparison (B) by real-time fluorescence PCR method for MON87411

2.2 特异性测试

以 2.1 筛选的引物/探针组合 MON87411-QF/QR/QP 进行特异性测试,结果如图 2A 所示,仅在抗虫耐除草剂玉米 MON87411 中获得了典型的扩增曲线,而在其他转基因作物混样和非转基因作物中均未获得扩增曲线,表明本方法筛选的引物/探针具有很好的特异性。

由图 2B 可知,探针浓度的增加,荧光扩增曲线上升幅度增大, C_t 值略有减少,探针浓度为 $0.4\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以上浓度的 C_t 值基本保持不变。综合考量扩增效率和体系配置的适用性等因素,确定检测的引物浓度为 $0.8\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,探针浓度为 $0.4\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

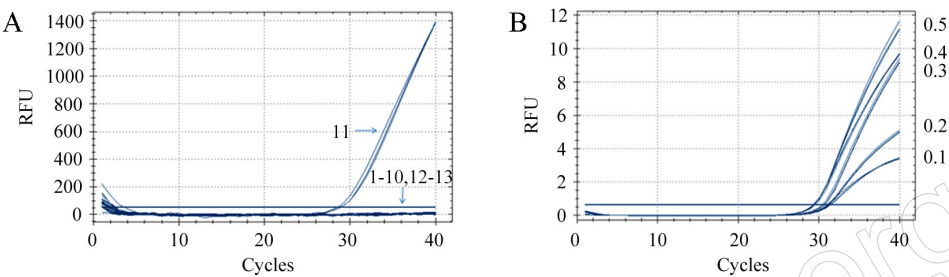


图 2 MON87411 实时荧光 PCR 方法特异性测试 (A) 及引物/探针浓度测定 (B)

Fig.3 Specificity test (A) and primer/probe concentration test (B) of real-time PCR method for MON87411

1: 空白对照; 2: 阴性对照; 3: 非转基因棉花; 4: 转基因大豆混合样; 5: 其他转基因玉米混合样; 6: 转基因棉花混合样; 7: 转基因水稻混合样; 8: 转基因油菜混合样; 9: 非转基因大豆; 10: 其他非转基因玉米; 11: 1% MON87411; 12: 非转基因水稻; 13: 非转基因油菜。探针浓度: $0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1: Blank; 2: Negative; 3: Non-GM cotton; 4: Mixed transgenic soybean samples; 5: Other GM maize mixture samples; 6: Mixed GM cotton samples; 7: Mixed GM rice samples; 8: Mixed GM rapeseed samples; 9: Non-GM soybean; 10: Other non-GM maize; 11: 1% MON87411; 12: Non-GM rice; 13: Non-GM canola. The probe concentrations: $0.1, 0.2, 0.3, 0.4$ and $0.5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

2.3 标准曲线的建立

每个 PCR 反应设置 3 个平行,重复 3 次试验。根据标准 DNA 溶液 PCR 反应的 C_t 值及初始模板拷贝数的对数分别绘制 MON87411 和 $zSSIb$ 的标准曲线(图 3),结果显示,3 次重复试验中抗虫耐除草剂玉米 MON87411 转化体和 $zSSIb$ 检测反应标

准曲线的回归系数 R^2 、效率 E 、斜率、截距等所有指标均满足标准(标准曲线斜率 $-3.6\sim-3.1$, $R^2\geq 0.98$, 扩增效率 $90\%\sim 110\%$), 抗虫耐除草剂玉米 MON87411 转化体和 $zSSIb$ 检测体系的 C_t 值与模板拷贝数间均具有良好的线性关系。

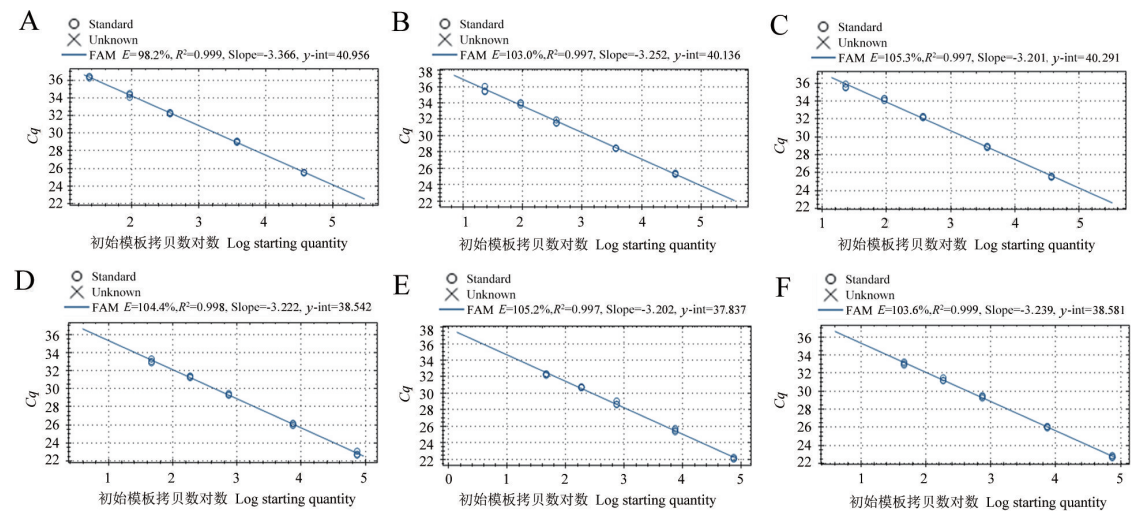


图 3 MON87411 和 $zSSIb$ 的标准曲线

Fig.3 Standard curves of MON87411 and $zSSIb$

A, B, C: MON87411; D, E, F: $zSSIb$.

2.4 正确度和精密度测试

如表 4 所示,3 次重复测试结果显示 3 个浓度的偏差均小于 25%, 相对标准偏差均小于 25%, 说明转基因玉米 MON87411 转化体实时荧光 PCR 定量检测方法的正确度与精密度均符合相关标准的要求,重复性较好。

表 4 MON87411 检测方法的正确度和精密度测试
Table 4 Accuracy and precision test of the detection method for MON87411

预期含量 Expected content/%	MON87411 测定含量 Content of MON87411/%			平均值 Average/%	偏差 Bias/%	标准偏差 SD/%	相对标准偏差 RSD/%
	第 1 次 No.1	第 2 次 No.2	第 3 次 No.3				
5.0	5.78	5.06	4.90	5.25	4.97	0.47	8.96
1.0	1.00	0.90	1.11	1.00	0.33	0.11	10.78
0.1	0.11	0.09	0.12	0.11	6.60	0.02	15.40

2.5 检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 的确定

LOD 的确定: 分别设置模板 DNA 为 0.1% 和 0.05% 的情况下 60 次平行反应均有典型扩增曲线 (图 4), 由此确定本方法的检出限可达 0.05%, 以反应体系中加入 50 ng 模板 DNA 计算, 为 10 个拷贝。

LOQ 的确定: 设置模板 DNA 为 0.1% 的样品, 进行 18 次定量测试的扩增曲线 (图 5), 结果表明, 偏差和相对标准偏差均 $\leq 25\%$ (表 5), 即确定本方法的定量限为 0.1%, 以反应体系中加入 100 ng 模板 DNA 计算, 为 40 个拷贝。

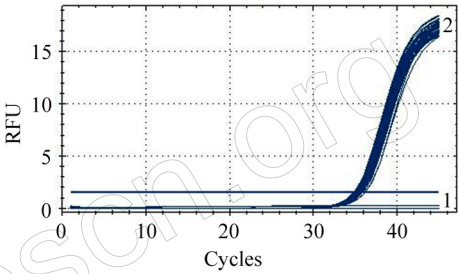


图 4 LOD 测试扩增曲线图
Fig.4 Plot of LOD test amplification
1: 空白对照; 2: 抗虫耐除草剂玉米 MON87411。
1: Blank control; 2: Insect-resistant herbicide-resistant maize MON87411.

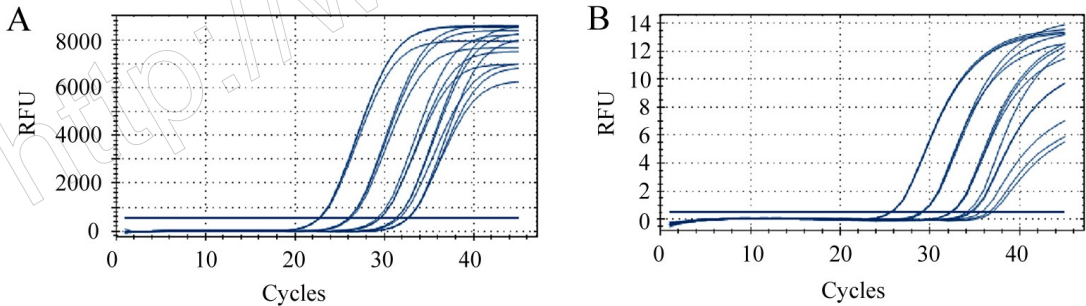


图 5 LOQ (0.1%) 测试扩增曲线图
Fig.5 Plot of LOQ (0.1%) test amplification
A: zSSIb; B: MON87411.

表 5 MON87411 的 LOQ 测试结果
Table 5 LOQ test results of MON87411

重复 Replication	MON87411 转化体拷贝数 Copies of the event MON87419/copies	zSSIb 基因拷贝数 Copies of zSSIb gene/copies	百分比 Percentage/%	偏差 Bias/%
1	28.7	31800	0.090	9.81
2	28.9	33400	0.087	13.47
3	29.1	33900	0.086	14.09
4	29.7	33900	0.086	13.78
5	30.2	35300	0.085	14.55
6	30.4	35700	0.085	14.87
7	37.0	36900	0.100	0.24
8	40.0	37400	0.107	6.89
9	42.0	37700	0.112	11.52
10	42.6	37700	0.113	12.91

续表 5

重复 Replication	MON87411 转化体拷贝数 Copies of the event MON87419/copies	<i>zSSIb</i> 基因拷贝数 Copies of <i>zSSIb</i> gene/copies	百分比 Percentage/%	偏差 Bias/%
11	49.9	42000	0.119	18.90
12	51.2	42700	0.120	19.89
13	45.4	43500	0.104	4.27
14	45.9	43800	0.105	4.77
15	47.1	43900	0.107	7.34
16	47.5	44700	0.106	6.19
17	49.3	45000	0.109	9.46
18	49.6	47300	0.105	4.86
平均值 Average	-	-	0.10	10.44
标准偏差 SD	-	-	0.01	-
相对标准偏差 RSD	-	-	11.72	-

2.6 微滴数字 PCR 验证

由表 6 和图 6 可知,3 个浓度的偏差 (Bias) 均小于 25%,相对标准偏差(RSD)均小于 25%,说明

MON87411 检测方法的正确度与精密度均符合相关标准的要求,重复性较好。

表 6 微滴数字 PCR 测试结果
Table 6 Results of micro-droplet digital PCR test

百分比 Element /%	MON87411 转化体拷贝数 Copies of foreign sequences/copies			zSSIb 拷贝数 Copies of zSSIb/copies			测试含量 Test content /%	偏差 Biss/%	标准偏差 SD/%	相对标准 偏差 RSD/%
	1	2	平均值 Average value	1	2	平均值 Average value				
5.0	1040.0	972	1006.0	19440	19160	19300	5.21	0.21	0.198	3.80
1.0	181.2	188	184.6	20000	19440	19720	0.94	-0.06	0.049	5.29
0.1	26.8	28	27.4	25880	25960	25920	0.11	0.01	0.007	6.73

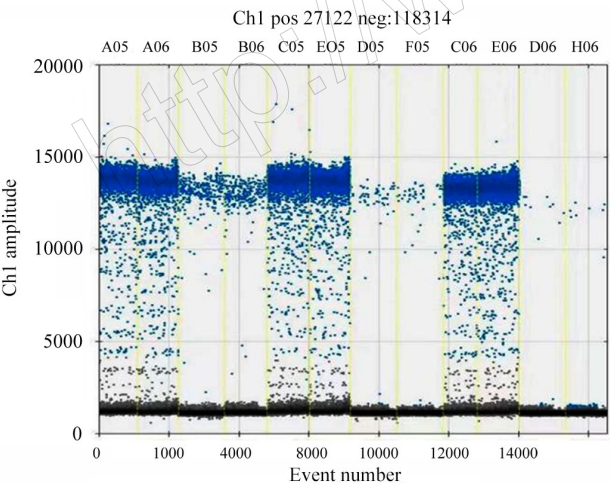


图 6 MON87411 数字 PCR 扩增微滴图
Fig.6 Digital PCR amplification droplet diagram of MON87411

3 讨论与结论

目前,我国研究人员多以定性检测方法为主检测转基因玉米转化体(温洪涛等,2020;武文艳等,2020)。随着各国转基因阈值管理和标识制度的实施,转基因产品的定量检测是必然趋势(Zhuang & Yu,2013)。目前,国际公认的转基因成分定量分析方法主要是实时荧光 PCR 和数字 PCR(杨晨,

2021)。但是,实时荧光 PCR 在定量过程中,需要依靠标准品建立标准曲线来实现未知样品的相对定量。数字 PCR 可以有效解决实时荧光 PCR 法的局限性,无需借助标准物质构建标准曲线来实现定量目的(龙丽坤等,2021),但数字 PCR 检测成本高,设备普及率低,限制了转基因检测方法的应用推广范围(刘双等,2021;赵新等,2022)。建议在检测过程中,根据样品实际情况灵活结合运用实时荧光 PCR 与数字 PCR 进行检测。

本研究以抗虫耐除草剂玉米 MON87411 的 3' 端旁侧序列为靶标,基于实时荧光 PCR 技术设计特异性引物和 Taqman 探针,经引物筛选、特异性、正确度、精密度、检出限、定量限等指标测试及微滴数字 PCR 方法验证,建立了抗虫耐除草剂玉米 MON87411 的特异性精准定量检测方法。结果表明,本方法特异性强、灵敏度高、重复性好,定量限达 0.1%(40 个拷贝),检出限达 0.05%(10 个拷贝),本研究为 MON87411 的定量检测提供了新的靶标位点和方法,为 MON87411 的安全监管提供了技术支撑。

参考文献

国际农业生物技术应用服务组织, 2021. 2019 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势. 中国生物工程杂志, 41(1): 114-119.

雷水娟, 刘二龙, 卢丽, 吕英姿, 蒋湘, 李嘉琪, 夏柔菲, 2019. 转基因棉花 MON88701 品系特异性实时荧光 PCR 检测方法的建立. 生物安全学报, 28(3): 225-229.

雷展, 王建成, 张晨, 李凯, 黄昆仑, 商颖, 许文涛, 2021. 转基因油菜 NS-B50027-4 定性定量检测方法的建立. 农业生物技术学报, 29(9): 1825-1835.

刘二龙, 卢丽, 吕英姿, 袁慕云, 蒋湘, 李嘉琪, 苏彩珠, 樊武疆, 林先准, 李培深, 吴险峰, 2017. 转基因玉米 MON87411 品系特异性实时荧光 PCR 检测引物、探针、方法和试剂盒: CN201710482322.8. 2017-10-17.

刘双, 赵新, 李瑞环, 刘娜, 兰青阔, 檀建新, 王永, 2021. 转基因大豆“ZH 10-6”数字 PCR 精准定量检测方法的建立. 中国农业大学学报, 26(11): 49-58.

龙丽坤, 赵宁, 李葱葱, 何禹璇, 董立明, 闫伟, 李飞武, 2021. 转基因玉米 CM8101 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立. 农业生物技术学报, 29(5): 1007-1015.

斯能武, 李俊, 武玉花, 吴刚, 张丽, 2021. 数字 PCR 在转基因定量检测中的研究进展. 中国油料作物学报, 43(1): 40-50.

温洪涛, 杨洋, 丁一佳, 苑冉, 张秀杰, 张瑞英, 2020. 耐除草剂玉米 G1105E-823C 定性检测方法. 生物技术进展, 10(6): 688-695.

武文艳, 刘新香, 周秒依, 刘金香, 刘亚, 2020. 转基因玉米 2A-5 特异性 PCR 方法的建立. 生物技术进展, 10(4): 363-370.

徐若梅, 2018. 全球转基因作物商业化的发展态势与启示. 安徽农业大学学报(社会科学版), 27(4): 62-67.

杨晨, 邓嘉慧, 陈佩虹, 丁清龙, 陈丹霞, 周露, 2021. 微滴式数字 PCR 和实时荧光定量 PCR 检测大豆中的转基因成分. 质量安全与检验检测, 31(5): 14-16.

赵新, 刘双, 刘娜, 李瑞环, 曹英芳, 兰青阔, 王永, 2022. 利用微滴数字 PCR 技术分析转基因大豆“GE-J12”中外源基因的拷贝数. 中国农业大学学报, 27(1): 58-66.

European Network of GMO Laboratories (ENGL), 2016. *Event-specific method for the quantification of maize MON87411 using real-time PCR validation report*. Brussels: European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed.

GONG L, ZHANG H W, LIU X, GAN X Y, NIE F J, YANG W J, ZHANG L, CHEN Y C, SONG Y X, ZHANG H X, 2020. Ectopic expression of *HaNAC1*, an ATAF transcription factor from *Haloxylon ammodendron*, improves growth and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Bio-chemistry*, 151: 535-544.

YANG L T, GUO J C, PAN A H, ZHANG H B, ZHANG K W, ZHENG M, ZHANG D B, 2007. Event-specific quantitative detection of nine genetically modified maizes using one novel standard reference molecule. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(1): 15-24.

ZENG H J, WANG J B, JIA J W, WU G G, YANG Q W, LIU X F, TANG X M, 2021. Development of a lateral flow test strip for simultaneous detection of BT-Cry1Ab, BT-Cry1Ac and CP4 EPSPS proteins in genetically modified crops. *Food Chemistry*, 335(15): 1-6.

ZHUANG Y, YU W X, 2013. Improving the enforceability of the genetically modified food labeling law in China with lessons from the European Union. *Vermont Journal of Environmental Law*, 14(3): 465-492.

(责任编辑:郭莹)