

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.20240023

转基因抗虫大豆转化体 CAL16 定性 PCR 检测方法

陆佳雨, 王沛然, 许 学, 吴 爽, 胡笑林, 李 晨, 潘伟芹, 江雅婷, 汪秀峰*
安徽省农业科学院水稻研究所, 农业农村部农作物生态环境安全检验检测中心(合肥), 安徽 合肥 230031

摘要:【目的】转基因大豆 CAL16 的抗虫融合蛋白 Cry1Ab/Vip3Da 对大豆鳞翅目害虫有很好的抗性效果,但目前针对抗虫大豆 CAL16 及其衍生品种的定性检测的方法尚未建立,本研究旨在根据外源片段插入位置,设计 CAL16 转化体的特异的定性 PCR 检测引物,弥补标准上的空白。【方法】根据技术资料公布的插入位置和载体信息,在左边界(LB端)和右边界(RB端)设计多对引物,分别对引物进行特异性测试、扩增反应优化、测序验证、稳健性测试、灵敏度测试、检出限测试等。【结果】数据显示,引物组合 CAL16-F/R 具有很好的特异性和稳健性,检出限为 0.10%,符合相关转基因分子检测标准的要求,国内的 8 家转基因生物安全检测机构能够重复试验结果,因此,该方法可以在检测行业中推广使用。【结论】转基因抗虫大豆 CAL16 定性 PCR 检测方法的建立,为我国 CAL16 抗虫大豆及其衍生品种的安全监管提供技术支撑。

关键词: 转基因; 大豆; CAL16 转化体; PCR 检测



开放科学标识码
(OSID 码)

Qualitative PCR detection method for transgenic insect-resistant soybean transformant CAL16

LU Jiayu, WANG Peiran, XU Xue, WU Shuang, HU Xiaolin, LI Chen,
PAN Weiqin, JIANG Yating, WANG Xiufeng*
Anhui Academy of Agricultural Sciences Rice Research Institute, Crop Ecological Environment Safety Inspection and Testing Center (Hefei), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Hefei, Anhui 230031, China

Abstract: 【Aim】The insect fusion protein Cry1Ab/Vip3Da of transgenic soybean CAL16 has shown good resistance against soybean lepidopteran pests; however, a qualitative detection method for insect-resistant soybean CAL16 and its derivatives has not yet been established. The purpose of this study was to design a specific qualitative polymerase chain reaction (PCR) detection primer for CAL16 transformants based on the insertion position of exogenous fragments to fill the gap in the standard. 【Method】Based on the insertion position and vector information published in the technical data, multiple pairs of primers were designed at the left boundary (LB terminus) and right boundary (RB terminus). The primers were subjected to specificity testing, amplification reaction optimization, sequencing verification, robustness testing, sensitivity testing, and detection limit testing. 【Result】The data showed that the primer combination CAL16-F/R had good specificity and robustness and that the detection limit was 0.10%, which met the requirements of relevant transgenic molecular testing standards. Eight genetically modified organism (GMO) safety testing institutions in China were able to replicate the test results. Therefore, this method can be used in the testing industry. 【Conclusion】The establishment of a qualitative PCR detection method for CAL16 in transgenic insect-resistant soybean provides technical support for the safety supervision of this transformant and its derivatives in China.

Key words: genetically modified; soybean; CAL16 transformant; PCR test

转基因技术作为农业发展的前沿科技,是应用范围最广、技术更新迭代最快的有利于农业增产的手段(马骊,2023)。早在 20 世纪 90 年代,全球转基因作物的商业化种植规模已经发展到相当高的水平,2019 年,全球的转基因农作物的种植面积达到了 1.904 亿 hm²。转基因作物的产业化发展创造出了巨

大的经济效益和环境效益,将为第二次绿色革命的实现起到至关重要的作用(王旭静等,2023;张启发,2010)。目前,我国的转基因技术开发已取得了显著成效,转基因作物的研发也取得了重要进展,然而,随着转基因作物生产规模的商业化,市场上抗病、抗虫、抗逆等转基因产品越来越多,衍生出很多生物安全性问题,因此,加快建立起一个完善、严格且高效的转基因监管制度和检测手段,是我国推动转基因作物产业化和生物安全管理规范化过程中的关键一步(国际农业生物技术应用服务组织,2019;柳晓丹等,2016;徐琳杰等,2018;周少芸,2007)。

在 21 世纪初期,我国大豆 *Glycine max* (Linn.) Merr. 的进口规模还不到 2000 万 t,随着经济社会发展以及国民对于肉蛋奶需求量的不断增加,目前,每年我国的大豆进口规模已近亿吨,是国内生产的大豆总额的 5 倍以上,因此,加快国内转基因大豆产业的研究和推广迫在眉睫(崔宁波和张正岩,2016;任海祥等,2012)。转基因抗虫大豆 CAL16 是我国首个获得生产应用安全证书的抗虫大豆,获批区域为南方大豆种植区,其抗虫工作原理是通过农杆菌介导法,将外源抗虫基因 *Cry1Ab/Vip3Da* 导入到大豆基因组中,使大豆对绝大部分大豆鳞翅目害虫产生抗虫效应。然而,目前大豆 CAL16 转化体及其衍生品种尚未建立有针对性的定性标准,因此,及时建立抗虫大豆 CAL16 定性检测方法,对其进行有效监管,将为推进转基因大豆产业化应用起到关键性作用。转基因检测技术是生物安全评价的重要手段,针对转化体的检测方案有多种,包括基因芯片法、定性 PCR 等,其中定性 PCR 检测方法灵敏度高、特异性强、操作简便、成本低、可重复性好,应用最为广泛(蔡军等,2016;Salisu *et al.*,2017)。参照玉米 *Zea mays* L. 等已发布的转基因植物及其产品成分检测标准,定性 PCR 引物需同时满足以下条件:条带单一、扩增效率高、特异性好、灵敏度 $\leq 0.05\%$ 、检出限 $\leq 0.1\%$ 、稳健性好、可循环验证(常丽娟等,2023;董文凤等,2023;李凌燕等,2023)。本研究以抗虫大豆 CAL16 转化体为材料,进行引物设计和测试试验,在 CAL16 转化体外源片段插入位置的左右两翼,各设计多对能够同时扩增基因组和插入片段的 PCR 引物。从而完成引物的初筛、反应条件优化、特异性测试、灵敏度测试、检出限测试、稳健性测试和循环验证等研究工作,最终鉴定出各方面特性均能够满足标准制定

需求的引物。该方法的建立将对抗虫大豆 CAL16 转化体的安全评价、监管和知识产权保护提供重要的理论和实践支撑,为未来我国转基因大豆产业化发展奠定良好的基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

抗虫大豆 CAL16 转化体由杭州瑞丰生物科技有限公司研发,CAL16 阳性样品(转基因)、阴性样品(非转基因)、转基因玉米 *Zea mays* L.、转基因水稻 *Oryza sativa* L.、转基因棉花 *Gossypium hirsutum* L.、其他转基因大豆、转基因油菜 *Brassica chinensis* L. 均由农业农村部科技发展中心提供,阳性样品为单一纯合体,纯度大于 99%。CAL16 不同质量分数的样品由 CAL16 转基因大豆品种和非转基因阴性品种 DNA 按不同浓度比例混合制备而成。

1.2 试验方法

1.2.1 特异性引物设计及筛选 利用 NCBI 网站的 Primer-BLAST 引物在线设计功能,针对插入位置的左边界(LB)5'端和右边界(RB)3'端分别设计片段大小为 120~300 bp 的特异性引物,并保证前后引物分别在大豆基因组和插入片段上,随后利用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 条带的亮度和特异性。

1.2.2 植物基因组 DNA 的提取 取本试验新鲜植物组织约 100 g,液氮研磨成粉末备用,随后按照植物基因组 DNA 提取试剂盒[TIANGEN,天根生化科技(北京)有限公司]操作要求,分离不同材料的基因组 DNA,采用 Thermo Scientific NanoDrop One 微量 UV-Vis 分光光度计测定提取的基因组 DNA 浓度和纯度,按照浓度需求将所有材料基因组 DNA 浓度稀释至 $25 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 保存于 -20°C 冰箱。

1.2.3 反应体系配制和优化 不同引物浓度下片段的扩增效率和特异性都不同,以拷贝数比值为 1% 的抗虫大豆 CAL16 基因组 DNA 为模板,将退火温度设定为 58°C ,选择与大豆内标准基因(*Lectin*)相同的扩增程序,将引物浓度分为 5 个梯度,分别为 0.1 、 0.2 、 0.4 、 0.6 和 $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,结合琼脂糖凝胶电泳试验检测不同浓度下的条带亮度。

1.2.4 灵敏度测试 设置了 0.050% 和 0.025% (转化体 DNA 占比)2 个拷贝数比值样品,每个样品重复 4 次,引物浓度按照 1.2.3 进行,扩增体系和内标准基因(*Lectin*)保持一致。

1.2.5 检出限测试 随机抽取 60 份抗虫大豆 CAL16 转化体特异性序列拷贝数比值为 0.050% (转化体 DNA 占比) 的样品进行检出限测试,扩增体系模板用量均为 50 ng,引物浓度按照 1.2.3 进行,扩增体系和内标准基因 (*Lectin*) 保持一致。

1.2.6 稳健性测试 2 名实验人员在不同时间段独立操作,使用 2 台 PCR 仪,分别对 60 份不同拷贝数比值的样品进行测试,引物浓度按照 1.2.3 进行,扩增体系和内标准基因 (*Lectin*) 保持一致。

1.2.7 循环验证 为了通过对抗虫大豆 CAL16 及其衍生品种 PCR 方法的标准文本各参数的验证,综合评价标准文本的科学性、先进性和适用性,选择 8 个已通过“双认证”的转基因生物安全检测机构对标准文本进行循环验证、检验验证和综合评价。共设计了 11 个样品,其中对照 3 个、试样 8 个。每个试样设置 3 个平行子样(试样的 3 个平行应为 3 份不同子样的 DNA),每个子样至少做 3 个 PCR 反应重复;每个对照设置 1 个子样,至少做 3 个 PCR 反应重复,分别对内标准基因和 CAL16 转化体特异性引物进行 PCR 扩增,共计 162 个反应。

2 结果与分析

2.1 特异性引物设计及筛选

根据 NCBI 网站在 5'端和 3'端分别设计了 6 条

引物,设计的原则需保证前后引物分别在基因组和 T-DNA 插入片段上(图 1)。将这些引物组合分成 8 份用于检测引物特异性(表 1)。结合 PCR 和琼脂糖凝胶电泳试验,发现引物组合 No.2 和 No.7 的条带亮度和特异性都要优于其他组合(图 2A)。在 CAL16 转化体拷贝数比值为 0.500%、0.100%、0.050% 和 0.025% 条件下,对这 2 对引物进行二次筛选特异性测试,结果显示,No.2 引物在 0.025% 拷贝数比值条件下仍然能观察到清晰的 DNA 条带,而 No.7 引物在 0.025% 拷贝数比值条件下的 DNA 条带已难以分辨,显然 No.2 引物优于 No.7 引物(图 2B、C)。引物 No.2 的片段大小(259 bp)、扩增特异性和扩增效率符合标准引物需求(条带清晰单一,无非特异性扩增),因此,可将其作为候选引物进行下一步测试,并将 No.2 引物正式命名为 CAL16-F/R。

2.2 引物浓度优化

为了改进和优化 CAL16-F/R 引物的扩增效率,设置 0.1、0.2、0.4、0.6 和 1.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 5 种引物浓度梯度进行 PCR 反应的扩增。结果显示,当引物浓度达到 0.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之后,DNA 条带亮度最为清晰明亮,且在后续浓度中并没有显著提升(图 3),因此,将 0.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 确定为最优 PCR 引物浓度。

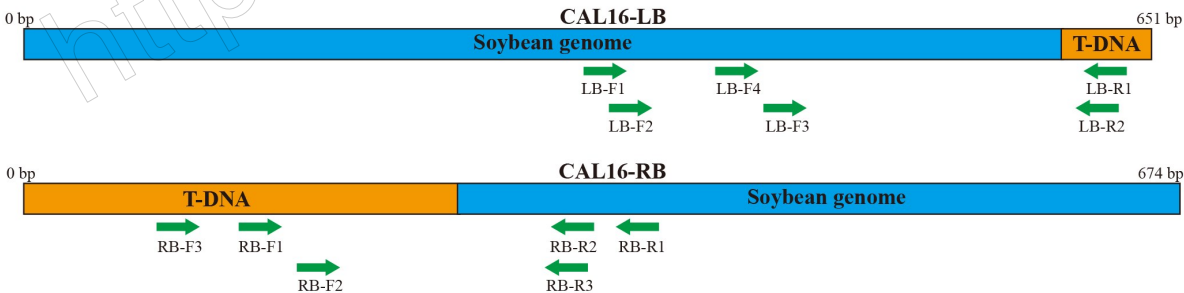


图 1 抗虫大豆 CAL16 转化体 PCR 引物位置

Fig.1 PCR primer position of insect-resistant soybean CAL16 transformant

表 1 8 对 PCR 扩增引物组合及其序列

Table 1 Eight pairs of PCR amplification primer combinations and sequences

编号 Number	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
1	LB-F1: ACATCTCACTACTTTCATTCTTGCC	LB-R1: TAAAAACGTCCGCAATGTGT
2	LB-F2: TTCATTCTTGCCTTAGGAAGT	LB-R1: TAAAAACGTCCGCAATGTGT
3	LB-F4: AAATCAAGACATTTGTTGTTAGGT	LB-R2: CGTCCGCAATGTGTTATTAA
4	LB-F3: TCAAGACATTTGTTGTTAGGTTTT	LB-R1: TAAAAACGTCCGCAATGTGT
5	RB-F1: AATGGCGAATGCTAGAGCAGCTTGAG	RB-R1: CAAGAATAGTGGACATGTGACTTATG
6	RB-F2: AGATTGTCGTTTCCCGCCTTCAGTTT	RB-R2: ATAATGGTAGAATCCTTGGAGTTG
7	RB-F3: CGCCCTTCCCAACAGTTG	RB-R2: ATAATGGTAGAATCCTTGGAGTTG
8	RB-F1: AATGGCGAATGCTAGAGCAGCTTGAG	RB-R3: TGGTAGAATCCTTGGAGTTGGA

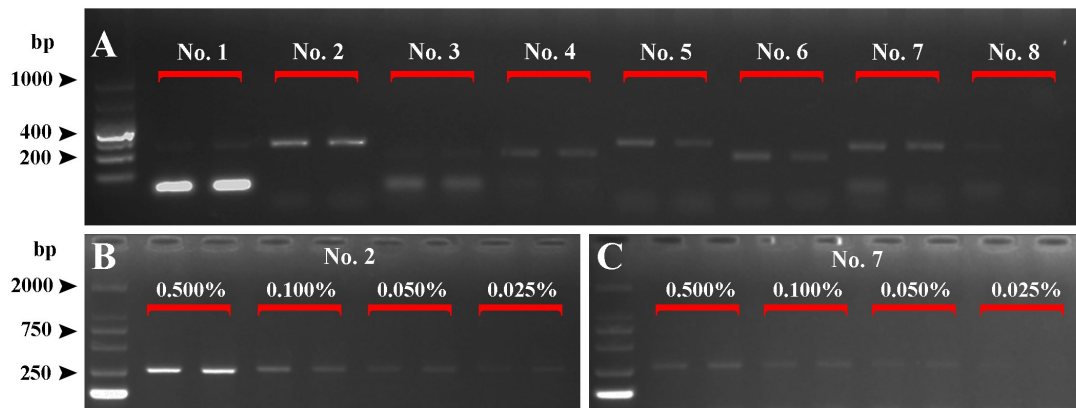


图 2 8 对引物的特异性筛选和基因组 DNA 不同浓度比例下的扩增效率

Fig.2 Eight pairs of primers were specifically screened and amplified at different concentration ratios of genomic DNA

A: 8 对引物扩增情况;B: No.2 引物扩增效率;C: No.7 引物扩增效率。每个反应重复 2 次。

A: Amplification of eight combinations of primers; B: Amplification efficiency of No.2 primer; C: Amplification efficiency of No.7 primer. Each reaction is repeated twice.

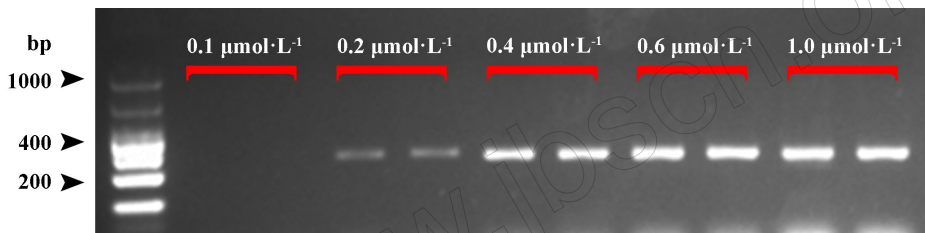


图 3 CAL16-F/R 引物在不同浓度梯度下的 PCR 扩增效率

Fig.3 PCR amplification efficiency of CAL16-F/R primers at different concentration

2.3 特异性测试

为了进一步明确 CAL16-F/R 引物的特异性,以空白对照(ddH₂O)、阴性对照(受体亲本)、阳性对照、1% CAL16 转化体、转基因玉米、转基因水稻、转基因棉花、转基因大豆(非 CAL16 转化体)、转基因油菜和非转基因大豆 DNA 作为模板,测试 CAL16-F/R 引物的特异性,结果显示,内标基因 *Lectin* 在各样本中均能观察到清晰明亮的条带(除空白对照),而 CAL16-F/R 引物正是由于其特异性,只在阳性对照和 1% CAL16 转化体为模板的泳道中检测到条带(图 4),表明 CAL16-F/R 引物符合要求,能够特异性检测 CAL16 转化体。

2.4 测序验证及序列分析

对 CAL16-F/R 引物的扩增产物进行测序比对,结果显示,扩增片段的序列信息和研发者设计引物的参考序列一致,进一步证实 CAL16-F/R 引物真实可行(图 5)。

2.5 灵敏度测试

对引物 CAL16-F/R 进行灵敏度测试,在 2 个拷贝数比值 0.050% 和 0.025% 样品中,大豆内标准基

因 *Lectin* 均能有效扩增(图 6A);引物 CAL16-F/R 也均能扩增得到抗虫大豆 CAL16 转化体预期 259 bp 的 DNA 片段(图 6B),≥0.025% 的样品均能扩增出清晰明亮条带。因此,CAL16-F/R 引物的灵敏度为 0.025%,考虑到该方法的适用性以及同类的统一性,在检测标准文本中将该方法的引物灵敏度放宽至 0.050%。

2.6 检出限测试

随机抽取 60 份抗虫大豆 CAL16 转化体拷贝数比值为 0.05% 的样品对引物 CAL16-F/R 进行扩增效率测试,结果显示,本方法的检出限为 0.05%,相当于反应体系中加入 50 ng DNA 模板,约 20 个拷贝,考虑到该方法的适用性以及同类的统一性,在检测标准文本中将本方法的检出限放宽至 0.10% (相当于反应体系中加入 50 ng DNA 模板,约 40 个拷贝)(图 7)。

2.7 稳健性测试

稳健性测试结果显示,2 名操作员在不同时间和仪器上对同样品的测试结果完全一致,表明方法稳健性符合要求(图 8)。

2.8 循环验证

为了进一步验证方法可行性,邀请了 8 家循环验证单位对该方法进行验证,8 个实验室分别对抗虫大豆 CAL16 转化体定性 PCR 检测,各单位的测试结果均与预期一致(表 2)。该方法技术参数(条带单一、扩增效率高、特异性好、灵敏度 $\leq 0.050\%$ 、

检出限 $\leq 0.10\%$ 、稳健性好、可循环验证)全部符合农业部 2259 号公告-5-2015(中华人民共和国农业部,2015)、European Network of GMO Laboratories (ENGL,2015)和 SN/T 4561-2016(中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,2017)等相关标准的要求,可作为标准方法在检测行业推广应用。

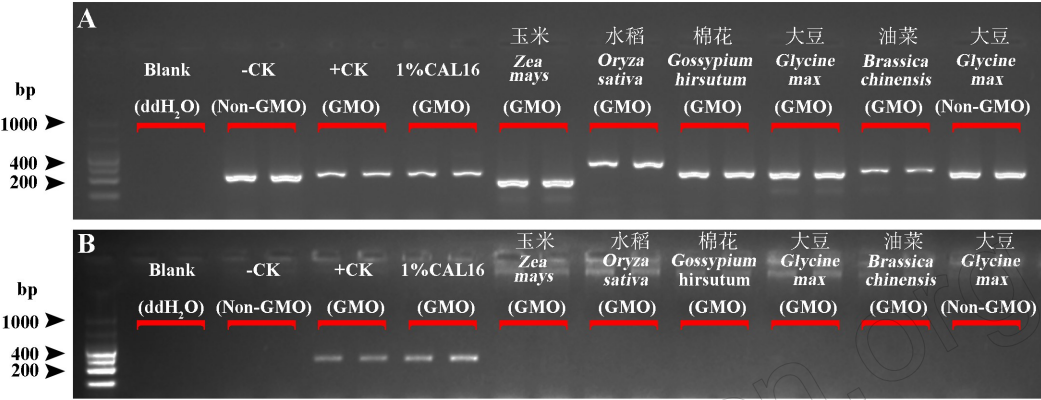


图 4 CAL16-F/R 引物在不同材料中的特异性测试

Fig.4 Specificity of CAL16-F/R primers in different materials

A: 内标准基因 *Lectin* 扩增情况; B: CAL16-F/R 引物扩增情况; Blank: 空白对照 (ddH₂O); -CK: 阴性对照 (CAL16 转化体受体亲本); +CK: 阳性对照 (CAL16 阳性转化体); GMO: 转基因; Non-GMO: 非转基因。
A: Amplification of the internal standard gene *Lectin*; B: Amplification of CAL16-F/R primers. Blank: Blank control, ddH₂O; -CK: Negative control, receptor parent; +CK: Positive control, positive transformant; GMO: Genetically modified organism; Non-GMO: Non-genetically modified organism.

		bp
CAL16-RefSeq	TTTCATTCTTGCCCTTAGGAAGTTATCTTTTACTTGATCAAATGATCATGTGAACACAAGTCTTTAAAAATCA	70
CAL16-No.2	TTTCATTCTTGCCCTTAGGAAGTTATCTTTTACTTGATCAAATGATCATGTGAACACAAGTCTTTAAAAATCA	70
CAL16-RefSeq	AGACATTGTGTTGTTAGGTTTTTTAATTCTATTGTTTAACGTTATTATTATTACTGCAAATATTTTGTI	140
CAL16-No.2	AGACATTGTGTTGTTAGGTTTTTTAATTCTATTGTTTAACGTTATTATTATTACTGCAAATATTTTGTI	140
CAL16-RefSeq	GCTACATGTTGACTGATTATTTCTTTATATATAAAGTATGATAAAAGATAAGCCTGGGAAAAATATAATA	210
CAL16-No.2	GCTACATGTTGACTGATTATTTCTTTATATATAAAGTATGATAAAAGATAAGCCTGGGAAAAATATAATA	210
CAL16-RefSeq	CAAAAACAATAATAGTGGACAACCTTAATAACACATTGCGGACGTTTTTA -	259
CAL16-No.2	CAAAAACAATAATAGTGGACAACCTTAATAACACATTGCGGACGTTTTTA	260

图 5 CAL16-F/R 引物扩增片段的序列比对

Fig.5 Sequence alignment of CAL16-F/R primer amplification fragments

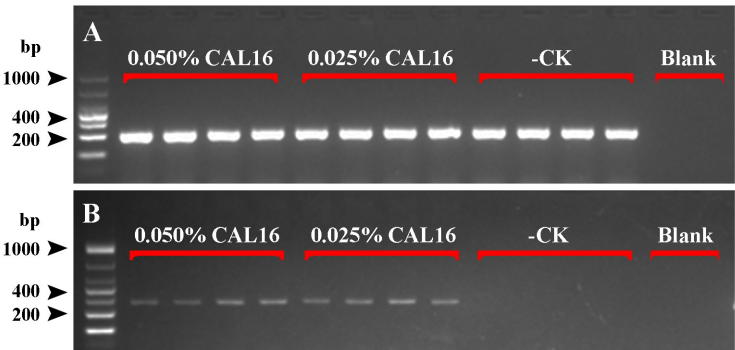


图 6 抗虫大豆 CAL16 转化体 PCR 方法灵敏度测试

Fig.6 Sensitivity test of PCR method for insect-resistant soybean CAL16 transformant

A: 内标准基因 *Lectin* 扩增情况; B: 引物 CAL16-F/R 扩增情况; -CK: 阴性对照; Blank: 空白对照 (ddH₂O)。
A: Amplification of the internal standard gene *Lectin*; B: Amplification of CAL16-F/R primers; -CK: Negative control; Blank: Blank control, ddH₂O.

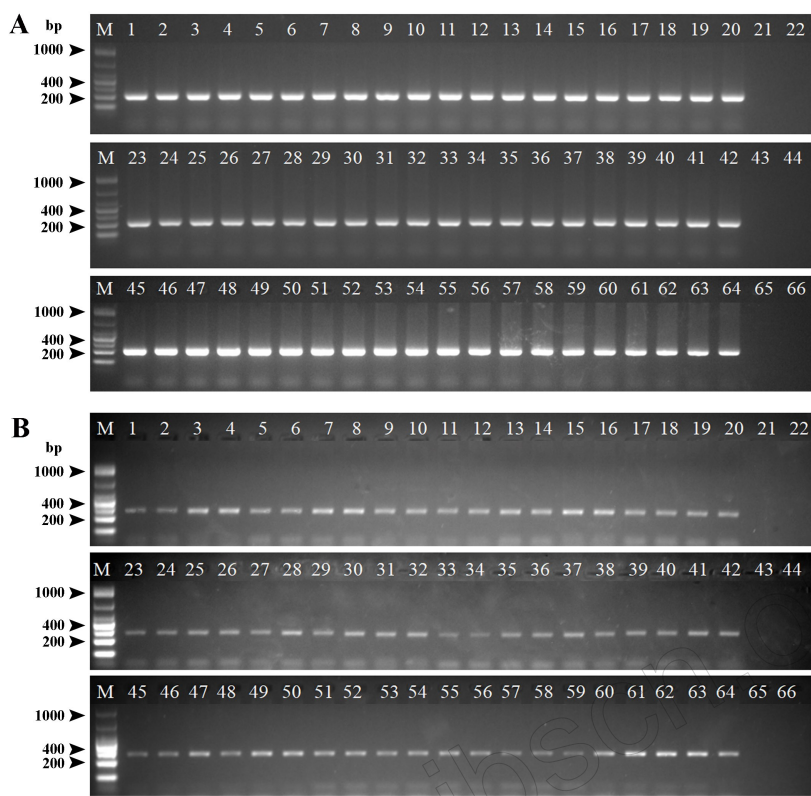


图 7 抗虫大豆 CAL16 转化体 PCR 方法检出限测试

Fig.7 Detection limit test of CAL16 transformant in insect-resistant soybean by PCR method

A: 内标准基因 *Lectin* 扩增情况; B: CAL16-F/R 引物扩增情况。1~20、23~42、45~64 为转化体样本, 21、22、43、44、65、66 为空白对照。

A: Amplification of the internal standard genes *Lectin*; B: Amplification of CAL16-F/R primers. 1~20, 23~42, and 45~64 were transformant samples, and 21, 22, 43, 44, 65, and 66 were blank controls.

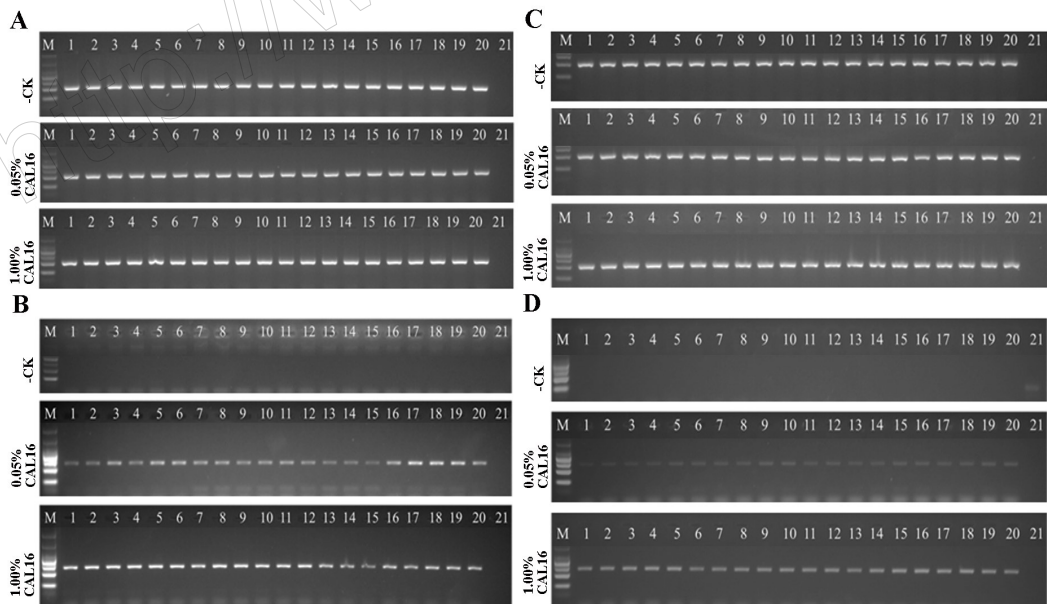


图 8 抗虫大豆 CAL16 转化体 PCR 方法稳健性测试

Fig.8 Robustness test of PCR method for insect-resistant soybean CAL16 transformant

A: 实验员 1 用 PCR 仪 1 检测内标准基因 *Lectin* 扩增情况; B: 实验员 1 用 PCR 仪 1 检测 CAL16-F/R 引物扩增情况; C: 实验员 2 用 PCR 仪 2 检测内标准基因 *Lectin* 扩增情况; D: 实验员 2 用 PCR 仪 2 检测 CAL16-F/R 引物扩增情况。

-CK、0.05% CAL16 和 1.00% CAL16 样品各 20 份。

A: Experimenter 1 used a PCR machine 1 to detect the amplification of the standard genes *Lectin*. B: Experimenter 1 used a PCR instrument 1 to detect the amplification of CAL16-F/R primers; C: Experimenter 2 used a PCR machine 2 to detect the amplification of the standard genes.

D: Experimenter 2 used a PCR machine 2 to detect the amplification of CAL16-F/R primers.

Twenty samples of -CK, 0.05% CAL16 and 1.00% CAL16 each.

表 2 CAL16 转化体定性 PCR 检验方法循环验证结果

Table 2 Cyclic verification for the transformant PCR detection method for CAL16

样品名称 Sample name	1	2	3	4	5	6	7	8
空白对照 Blank control	-	-	-	-	-	-	-	-
阴性对照 Negative control	-	-	-	-	-	-	-	-
阳性对照 Positive control	+	+	+	+	+	+	+	+
1.00% CAL16 大豆 1.00% CAL16 soybeans	+	+	+	+	+	+	+	+
其他转基因大豆混样 Other transgenic soybeans mixture samples	-	-	-	-	-	-	-	-
转基因玉米混样 Transgenic corn mixture samples	-	-	-	-	-	-	-	-
转基因水稻混样 Transgenic rice mixture samples	-	-	-	-	-	-	-	-
转基因棉花混样 Transgenic cotton mixture samples	-	-	-	-	-	-	-	-
转基因油菜混样 Transgenic rape mixture samples	-	-	-	-	-	-	-	-
非转基因大豆混样 Non-transgenic soybeans mixture samples	-	-	-	-	-	-	-	-
0.05% CAL16 大豆 0.05% CAL16 soybeans	+	+	+	+	+	+	+	+

“+”表示阳性结果,“-”表示阴性结果,1~8 表示 8 家检测机构。
“+” indicates a positive result,“-” indicates a negative result, and 1-8 indicates 8 testing institutions.

3 讨论与结论

随着全球转基因作物的大规模商业化种植以及转基因技术的不断更新迭代,转基因产品的种类和数量逐渐增加,转基因技术的应用面也愈加广泛,许多国家也因此建立了相应的法律法规和标签政策,以保证转基因产品的可追溯性和消费者的知情权(Fraiture *et al.*, 2015)。转基因产品在给生活带来便利的同时,也衍生出了具有争议性的问题,比如食品安全、环境保护、社会公平、宗教信仰等(包琪等, 2014; 崔凯和 Shoemaker, 2020; 孙晓萍, 2007; 姚尧, 2017),因此,加强转基因产品的管理、确立完善的监督体系以及研发严格的成分检测技术显得尤为重要(候吉超等, 2022; 展进涛等, 2017)。转基因检测技术有基因芯片法、等温扩增技术、数字 PCR 技术、普通定性 PCR、实时荧光定量 PCR (雷水娟等, 2019)等,其中 PCR 检测方法鉴于其优异的特性,目前应用最为广泛,是国内外转化体检测的金标准(王颢潜等, 2018; 翟勇等, 2010, 2010; 中华人民共和国农业部, 2018; LIU *et al.*, 2018)。PCR 技术在转基因成分检测领域的利用已形成很多国家标准,基于荧光定性和定量检测技术的发展,普通 PCR 技术正在慢慢被取代,但目前检测机构仍然以普通定性 PCR 筛查为主,通过特异性定性来区分转化体的身份,因此,规范普通定性 PCR 的操作流程,探索最优的反应体系和条件,仍然是我国目前转基因成分检测必不可少的技术手段。

本研究结合 CAL16 大豆转化体的插入片段和插入位置的序列,设计了 8 对引物,通过鉴别 PCR

引物扩增的特异性,筛选到引物 CAL16-F/R 条带单一且清晰,片段大小为 259 bp,对该引物进行反应条件优化、灵敏度测试、检出限测试、稳健性测试和循环验证,均表现良好且稳定,满足标准制定的所有要求,故此引物适用于建立抗虫大豆 CAL16 转化体特异性的 PCR 定性方法。随着转基因检测技术的不断更新和发展,实时荧光定量 PCR 方法和实时荧光定性 PCR 方法的建立已成必然趋势,高效检测方法的建立将进一步完善抗虫大豆 CAL16 转化体的安全检测、产权保护和产品监管,为我国转基因大豆的产业化和生物安全管理提供技术和理论支撑。

参考文献

包琪, 贺晓云, 黄昆仑, 2014. 转基因食品安全性评价研究进展. 生物安全学报, 23(4): 248-252.

蔡军, 李慧, 胡梦龙, 傅洋, 汪磊, 王璐, 2016. 转基因成分分析检测技术研究进展. 食品安全质量检测学报, 7(2): 706-714.

常丽娟, 梁晋刚, 宋君, 刘文娟, 付成平, 代晓航, 王东, 魏超, 熊梅, 2023. 转基因玉米 ND207 转化事件特异性定性 PCR 检测方法及其标准化. 作物学报, 49(7): 1818-1828.

崔凯, SHOEMAKER S, 2020. 中美公众的转基因态度差异及公众质疑转基因原因探析. 华中农业大学学报(社会科学版) (6): 155-159.

崔宁波, 张正岩, 2016. 转基因大豆研究及应用进展. 西北农业学报, 25(8): 1111-1124.

董文凤, 梁晋刚, 李夏莹, 刘鹏程, 张旭冬, 王颢潜, 陈子言, 张秀杰, 2023. 转基因抗虫耐除草剂玉米 C0030.1.1 定性 PCR 检测方法的建立. 东北农业科学, 48(2): 49-54.

国际农业生物技术应用服务组织, 2019. 2018 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, 39(8): 1-6.
- 候吉超, 吴斌, 姜蕾, 宋晶晶, 任小娜, 王东, 2022. 转基因食品成分检测技术研究进展. 食品安全导刊(9): 158-163.
- 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.
- 柳晓丹, 许文涛, 黄昆仑, 梅晓宏, 2016. 复合性状转基因植物安全性评价的研究进展. 生物技术通报, 32(6): 1-6.
- 李凌燕, 肖冰, 张旭冬, 陈子言, 王颢潜, 张秀杰, 陈红, 梁晋刚, 2023. 转基因耐除草剂玉米 MON87419 品系特异性定性 PCR 检测方法的建立. 江苏农业科学, 51(1): 50-57.
- 马骊, 2023. 转基因作物现状与未来发展方向探讨. 分子植物育种, 21(6): 1906-1912.
- 任海洋, 南海洋, 曹东, 刘晓冰, 刘宝辉, 孔凡江, 2012. 大豆转基因技术研究进展. 东北农业大学学报, 43(7): 6-12.
- 孙晓萍, 2007. 转基因农产品的正负面效应及预防对策. 中国食物与营养(3): 14-16.
- 王颢潜, 陈锐, 李夏莹, 宋晶晶, 任小娜, 王东, 2018. 转基因产品成分检测技术研究进展. 生物技术通报, 34(3): 31-38.
- 王旭静, 王艳青, 唐巧玲, 焦悦, 王志兴, 2023. 全球转基因作物研发与产业化应用. 现代农药, 22(1): 11-19.
- 徐琳杰, 刘培磊, 李文龙, 孙卓婧, 宋贵文, 2018. 国际转基因标识制度变动趋势分析及对我国的启示. 中国生物工程杂志, 38(9): 94-98.
- 姚尧, 2017. 转基因负面舆论形成的原因和对策研究. 新闻研究导刊, 8(12): 70.
- 翟勇, 武玉花, 吴刚, 曹应龙, 卢长明, 2010. 转基因玉米 MON88017 转化事件特异性定性 PCR 检测方法及其标准化. 农业生物技术学报(6): 1208-1214.
- 展进涛, 邓鹏程, 谢锐, 2017. 中国转基因玉米生物技术创新及其产业化经济效应研究. 农业经济问题, 38(10): 18-26.
- 张启发, 2010. 大力发展转基因作物. 华中农业大学学报(社会科学版)(1): 1-6.
- 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 2017. 转基因检测非标方法确认评价指南: SN/T 4561-2016. 北京: 中国标准出版社.
- 中华人民共和国农业部, 2010. 转基因植物及其产品成分检测抗虫棉花 MON15985 及其衍生品种定性 PCR 方法: 农业部 1485 号公告-13-2010. 北京: 中国标准出版社.
- 中华人民共和国农业部, 2015. 转基因植物及其产品成分检测定 PCR 方法制定指南: 农业部 2259 号公告-4-2015. 北京: 中国标准出版社.
- 中华人民共和国农业部, 2018. 转基因植物及其产品成分检测耐除草剂玉米 COO10.1.1 及其衍生品种定性 PCR 方法: 农业农村部公告第 111 号-8-2018. 北京: 中国标准出版社.
- 周少芸, 2007. 转基因食品检测方法的研究进展. 福建稻麦科技, 25(1): 43-45.
- ENGL, 2015. *Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing*. Italy: European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed.
- FRAITURE M A, HERMAN P, TAVERNIERS I, DE LOOSE M, DEFORCE D, ROOSENS N H, 2015. Current and new approaches in GMO detection: challenges and solutions. *BioMed Research International*, 4(1): 1-22.
- LIU M M, ZHANG X J, GAO Y, SHEN Z C, LIN C Y, 2018. Molecular characterization and efficacy evaluation of a transgenic corn event for insect resistance and glyphosate tolerance. *Journal of Zhejiang University Science B*, 19(8): 610-619.
- SALISU I B, SHAHID A A, YAQOOB A, ALI Q, BAJWA K S, RAO A Q, HUSNAIN T, 2017. Molecular approaches for high throughput detection and quantification of genetically modified crops: a review. *Frontiers in Plant Science*, 16(8): 1670.

(责任编辑:陈晓雯)