

转基因苜蓿草 J163 品系特异性实时荧光 PCR 检测方法的建立

刘二龙¹, 卢丽², 吕英姿¹, 蒋湘¹, 张旺², 林惠娇¹, 郑高彬¹, 唐婕^{3*},
林学勤¹, 秦焯敏¹

(1. 黄埔出入境检验检疫局, 广州 510730; 2. 广东出入境检验检疫局, 广州 510623;
3. 陕西省动物研究所, 西安 710032)

摘要: **目的** 建立针对我国农业部未颁发农业转基因生物安全证书的转基因苜蓿草品系 J163 品系特异性实时荧光(Polymerase Chain Reaction, PCR)检测方法。**方法** 利用 TaqMan 实时荧光 PCR(real-time PCR)技术, 根据转基因苜蓿草品系 J163 5'端外源插入片段 P-eFMV 与苜蓿草基因组 DNA 之间的邻接区序列设计引物和探针, 建立了转基因苜蓿草 J163 品系特异性实时荧光 PCR 检测方法, 并对本方法的特异性、灵敏度及可重复性进行了测定。**结果** 建立的检测方法特异于转基因苜蓿草 J163 成分检测, 检测最低 DNA 浓度为(limit of detection, LOD)为 15 pg, 相当于 9 拷贝转基因苜蓿草 J163 基因组 DNA, 重复性试验显示, 其标准偏差(Standard deviation, SD)和相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)均在可接受范围内。**结论** 本研究建立的转基因苜蓿草 J163 品系特异性实时荧光 PCR 检测方法特异性好, 灵敏度高, 能够快速、准确、稳定地对转基因苜蓿草 J163 成分进行检测分析。

关键词: 实时荧光 PCR; 转基因苜蓿 J163; 品系特异性

Establishing an event-specific real-time polymerase chain reaction detection method for genetically modified alfalfa events J163

LIU Er-Long¹, LU Li², LV Ying-Zi¹, JIANG Xiang¹, ZHANG Wang², LIN Hui-Jiao¹,
ZHENG Gao-Bin¹, TANG Jie^{3*}, LIN Xue-qin¹, QIN Zuo-ming¹

(1. Huangpu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510730, China, 2. Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510730, China; 3. Shaanxi Institute of Zoology, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT: Objective To establish a real-time PCR detection method for genetically modified (GM) Roundup Ready alfalfa events J163, which has not been authorized by the Ministry of Agriculture of China. **Method** The specific primer pairs and probe based on the 5' junction sequence spanning the alfalfa DNA and inserted P-eFMV fragment of J163 were designed and then the real-time PCR detection system was established. The specificity, sensitivity and repeatability were analyzed. **Results** The real-time PCR method was specific for GM alfalfa J163 detection, the limit of detection(LOD) were 15 pg J163 genomic DNA or 10 copies of alfalfa J163 haploid genomic DNA. Repeatability of the established event-specific real-time PCR method for

基金项目: 陕西省科学院应用基础专项 (2013K-12)

Fund: Supported by Shaanxi Province Academy of Sciences Application Foundation (2013K-12)

*通讯作者: 唐婕, 副研究员, 主要研究方向为微生物与分子生物学。E-mail: 22223520@qq.com

*Corresponding author: TANG Jie, Associate Researcher, Shaanxi Institute of Zoology, Xi'an 710032, China. E-mail: 22223520@qq.com

GM alfalfa J163 was assessed and the standard deviation (SD) and the relative standard deviation (RSD) were all in the acceptable range. **Conclusion** The established event-specific quantitative real-time PCR method for GM alfalfa J163 detection has a high specificity and a good sensitivity, and is suitable for quantification of J163 samples quickly and accurately.

KEY WORDS: quantitative real-time PCR; genetically modified alfalfa J163; event-specificity

1 引言

苜蓿草是美国继玉米、小麦、大豆后第四大农作物, 因其蛋白含量约占总干草质量的 17%~20%, 与其他豆科牧草相比是一种极好的饲料作物。截至今年 7 月份, 在我国注册的美国苜蓿草生产厂商就已达 71 家, 据统计, 2014 年 1~6 月中国进口苜蓿草总计 40.56 万吨, 同比增 26.94%; 进口金额总计 14966.77 万美元, 同比增 23.08%^[1]。

抗草甘膦转基因苜蓿草 J163(商品名 Roundup Ready Alfalfa Events J163)是由美国孟山都公司研制开发一种转基因苜蓿草品系, 2005 年美国 and 加拿大批准环境释放和作为饲料应用^[2], 目前我国尚未批准其进口, 国内外还没有转基因苜蓿 J163 品系特异性检测方法的报道。欧洲转基因食品和饲料参考实验室 (CRL-GMFF) 目前也尚无检测 J163 品系特异性方法。有效的检测方法是转基因苜蓿草检验检疫监管基础, 因此, 为了对我国转基因苜蓿草 J163 监管提供必要的技术支撑, 本研究基于 J163 5' 端外源插入片段 P-eFMV 与苜蓿草基因组 DNA 之间的邻接区序列列建立了转基因苜蓿草 J163 品系特异性实时荧光 PCR 方法。

2 材料与方法

2.1 材料、试剂与仪器

转基因苜蓿草 J163, 转基因玉米品系 MIR162, 转基因玉米品系 89034, 转基因玉米品系 NK63, 转基因玉米品系 BT11, 转基因大豆转基因大豆 GTS40-3-2, 转基因大米 cry IA(a/b), 非转基因大叶苜蓿, 大米, 黑豆, 豌豆, 大豆, 小麦, 油菜籽, 木薯, 椰籽粕, 为本实验室储备, 转基因苜蓿草 J163 由重庆出入境检验检疫局惠赠。

主要试剂: Premix Ex Taq TM(TaKaRa); 植物基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限

公司; 引物和探针由宝生物公司合成, 稀释为终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的工作液使用。

主要仪器: ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司); 微量分光光度计(nanodrop2000c, 美国)、研磨机(IKA, 德国)。

2.2 方法

2.2.1 植物材料以及混合样品基因组 DNA 的提取与纯化

称取 100 mg 左右研磨成干粉的样品, 使用天根植物基因组 DNA 提取试剂盒并按照其操作说明书提取基因组 DNA。提取的基因组 DNA 用微量分光光度计 nanodrop2000c 测定浓度。提取的 DNA 溶液在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.2.2 引物和探针设计

经查找美国专利中查找得到 J163 品系转基因片段部分序列^[3], 其外源插入片段元件组成见图 1。

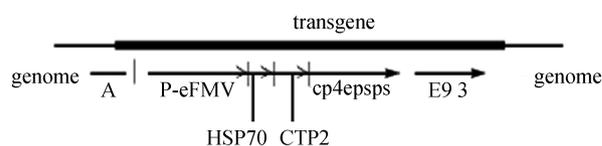


图 1 转基因苜蓿 J163 品系外源插入片段示意图

Fig 1 The sketch map of inserted exogenous fragment in Roundup Ready alfalfa event J163

genome: 苜蓿草基因组 DNA; P-eFMV: 增强的玄参花叶病毒 (FMV35s) 启动子; HSP70: 热休克 70kDa 蛋白; CTP2: 叶绿体转运肽基因 2; cp4epsps: 来源于农杆菌 CP4 的莽草酸羟甲基转移酶基因(5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸酯合成酶基因); E93: 终止子; A 为引物和探针设计位置

genome: alfalfa genome DNA; P-eFMV: enhanced version of the Figwort Mosaic Virus (FMV)35S Promoter; HSP70: Heat shock 70 kDa protein HSP70; CTP2: the chloroplast transit peptide 2 cp4epsps: 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase obtained from *Agrobacterium* sp. strain CP4; E93: E9 3 terminator; A: the location of the primer pair and probe

基于苜蓿基因组 DNA 的 5' 端外源 P-eFMV 启动子插入片段与苜蓿基因组 DNA 之间的邻接区序列分

析,使用 PrimerExpress 3.0 软件(AppliedBiosystems, USA)设计引物和探针。将设计的引物和探针在 NCBI 网站数据库中进行 Blast 比对,确定引物和探针理论上的特异性。内源基因 *acc*(acetyl CoA carboxylase)^[3] 引物探针用于检测苜蓿样品基因组 DNA 是否成功提取以及是否适于进行实时荧光 PCR 扩增;引物和探针均由 TaKaRa 公司合成。序列信息详见表 1。

2.2.3 实时荧光 PCR 反应体系

实时荧光 PCR 检测反应体系为 20 μ L: Premix Ex TaqTM 10 μ L, 10 μ mol/L 上、下游引物各 0.4 μ L, ROX Reference Dye II 0.2 μ L, 探针 0.6 μ L, DNA 模板 1.5 μ L 和 ddH₂O 6.9 μ L。实时荧光 PCR 检测的反应程序为: Stage 1: 预变性 95 $^{\circ}$ C 30 s; Stage 2: 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 40 个循环,并收集荧光信号。

2.2.4 实时荧光 PCR 检测方法的特异性

利用 15 种常见植物材料转基因玉米品系 MIR162, 转基因玉米品系 89034, 转基因玉米品系 NK63, 转基因玉米品系 BT11, 转基因大豆 GTS40-3-2, 转基因大米 cry IA(a/b), 非转基因大叶苜蓿、大米、黑豆、豌豆、大豆、小麦、油菜籽、木薯及椰子粕的基因组 DNA 为模板,采用已建立的转基因苜蓿 J163 品系特异性实时荧光 PCR 方法进行扩增,检测本文建立的方法的特异性。

2.2.5 荧光 PCR 方法的灵敏度及标准曲线建立

将提取的转基因苜蓿草 J163 基因组 DNA 溶液用 TE 缓冲液梯度稀释至 100 ng/ μ L、10 ng/ μ L、1 ng/ μ L、100 pg/ μ L、10 pg/ μ L、1 pg/ μ L, 利用本研究设计的 J163 品系特异性检测引物和探针 J163-1/2/P 和苜蓿内源基因 *acc* 引物和探针 *acc*-1/2/p 进行实时荧光 PCR 扩增。测定建立的检测方法的检测下限(limit of detection, LOD)。对上述 6 个浓度 DNA 进

行实时荧光 PCR 扩增,每个浓度设置 3 个平行重复,最后对结果进行统计分析得到 LOD(检出率超过 95% 时能检测到的最低模板浓度)。

以模板浓度的对数值为横坐标,以对应的 Ct 值为纵坐标建立 J163 品系特异性片段序列和苜蓿内源基因 *acc* 的标准曲线。

2.2.6 可重复性测试

对上述倍比稀释的 DNA 溶液,对本文建立 J163 品系特异性检测方法的重复性进行了测试,对 3 次平行重复的标准偏差(standard deviation, SD)和相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)进行了统计分析。

3 结果与分析

3.1 引物和探针设计

本研究根据转基因苜蓿草 J163 品系的 5'-eFMV 外源插入片段和苜蓿草基因组 DNA 邻接区序列进行分析,设计了多对品系特异性引物和探针,对引物和探针的反应效率、扩增曲线和扩增效果进行筛选和分析,最终选择 J163-1/2/P 引物和探针建立转基因苜蓿草 J163 品系特异性检测方法(序列见表 1)。

3.2 特异性测试

为了测试建立的转基因苜蓿草 J163 品系特异性检测方法的特异性,以 15 种常见作物基因组 DNA 为模板进行实时荧光 PCR 扩增。

采用 *acc*-1/2/p 引物和探针对所有提取的植物材料 DNA 样品进行 PCR 扩增,只有苜蓿来源的植物出现扩增曲线其它非苜蓿植物材料则无荧光增幅,表明提取的苜蓿 DNA 适于用作实时荧光 PCR 扩增(图略)。

表 1 引物和探针序列

Table 1 Sequence of primer pair/probe used in this study

检测目标 Detect target	引物/探针 Primer/probe	序列(5'-3') Sequence	扩增产物长度/bp Amplicon length	来源 Reference
J163	J163-1 J163-2 J163-p	CGATTACCCCTCCTACTTTTTC TTGGAGACTCTGTACCCTGACCTT TTGGAGACTCTGTACCCTGACCTT	170	本研究设计
<i>acc</i>	<i>acc</i> -1 <i>acc</i> -2 <i>acc</i> -p	GATCAGTGAAGTTCGCAAAGTAC CAACGACGTGAACACTACAAC TGAATGCTCCTGTGATCTGCCCATGC	91	[2]

采用转基因苜蓿草 J163 品系特异性引物和探针 J163-1/2/p 进行实时荧光 PCR 扩增时, 只有以转基因苜蓿 J163 品系 DNA 为模板时才有荧光扩增曲线, 采用其它植物材料基因组 DNA 为模板的扩增均无扩增 (图 2)。上述结果表明, 本研究建立的品系特异性实时荧光 PCR 检测方法特异于转基因苜蓿草 J163 品系的检测。

3.3 灵敏度测试

在本实验中, 将提取的转基因苜蓿草 J163 基因组 DNA 溶液用 TE 缓冲液梯度稀释至 100 ng/μL、10

ng/μL、1 ng/μL、100 pg/μL、10 pg/μL、1 pg/μL 进行本文建立检测方法的灵敏度测试, 结果见图 3 所示。以大于 15 pg(10 pg/μL, 1.5 μL/反应)基因组 DNA 为模板时, 3 次扩增反应均出现荧光增幅, 且 3 次扩增的 Ct 值均值为, 三次测得的 Ct 值 SD 均小于 0.25。而以 1.5 pg(1 pg/μL, 1.5 μL)基因组 DNA 为模板时, 无阳性扩增曲线。因此, 本研究建立的转基因苜蓿草 J163 品系特异性实时荧光 PCR 方法的灵敏度为 15 pg, 由于苜蓿草的基因组 DNA 的估算为 1510 Mbp, 相应的, 重量大约估算为 1.6 pg^[4], 即检测的灵敏度相当于 9 拷贝基因组 DNA。

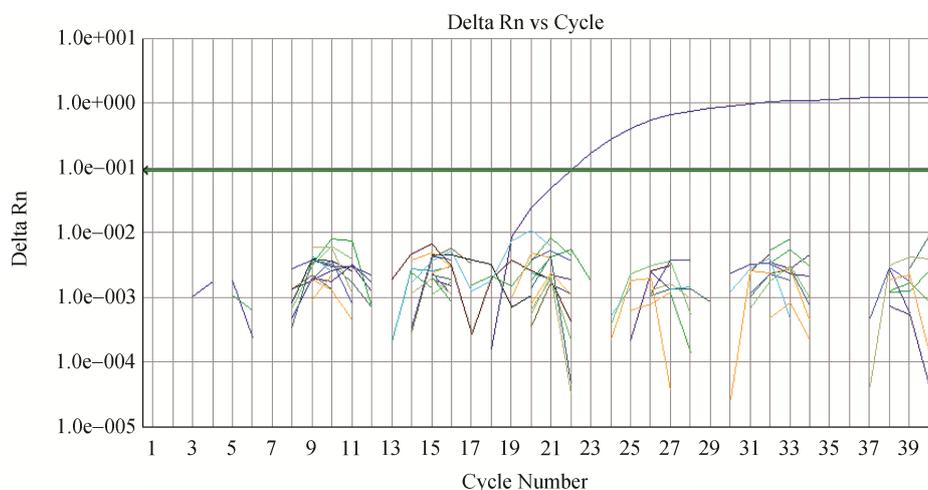


图2 建立的转基因苜蓿草J163品系特异性检测方法的特异性测试

Fig. 2 Specificity test of the established even-specific detection method for GM alfalfa J163

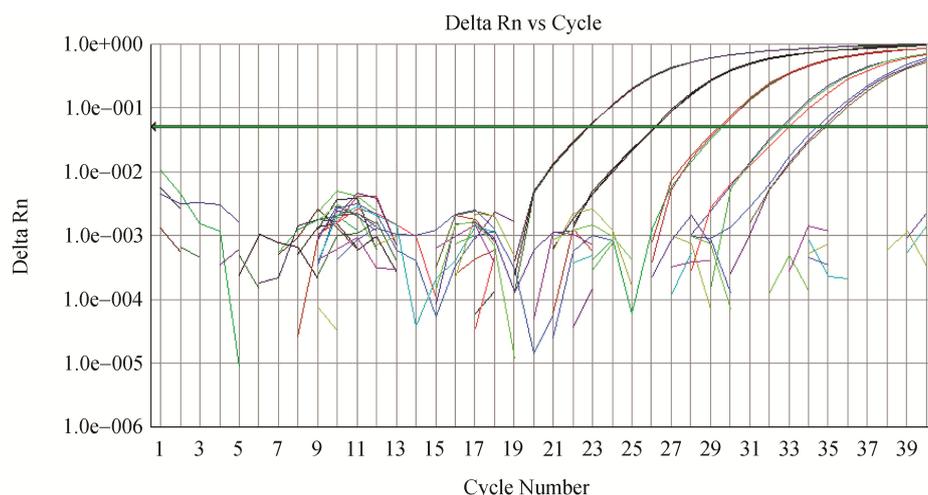


图 3 转基因苜蓿草 J163 品系实时荧光 PCR 方法灵敏度测试

每个荧光 PCR 反应的苜蓿草基因组 DNA 分别为 150、15、1.5、0.15、0.015、0.0015 pg

Fig. 3 Sensitivity tests for the established Real-time PCR method for GM alfalfa J163

The quantities of the J163 genome in each dilution were 150, 15, 1.5, 0.15, 0.015 and 0.0015 pg per reaction, respectively.

3.4 制备标准曲线

利用5个浓度梯度稀释的转基因苜蓿 J163 成分的基因组 DNA 溶液(100 ng/ μ L、10 ng/ μ L、1 ng/ μ L、100 pg/ μ L、10 pg/ μ L、1 pg/ μ L 苜蓿草 J163 基因组 DNA)为模板进行 PCR 扩增,建立了苜蓿草内源基因 *acc* 和转基因苜蓿草 J163 品系特异性序列标准曲线,以实现相对定量分析。结果表明,苜蓿草内源基因 *acc* 的标准曲线回归方程为 $Y=-3.502X+38.246$, 线性相关系数(R^2)为 0.9989, 扩增效率 E 为 93%(图 4A, B)。转基因苜蓿草 J163 品系特异性序列扩增的线性回归方程为 $Y=-3.032X+38.216$, 线性相关系数(R^2)为 0.9908, 扩

增效率 E 为 114%(图 4C, D), 表明标准曲线的线性良好, 扩增效率高。由标准曲线的 R^2 大于 0.98, 均高于定量检测标准曲线相关系数的要求^[5], 因此说明本文建立的方法适合于苜蓿草品系 J163 成分的定量分析。

3.5 重复性测试

建立的实时荧光 PCR 方法的重复性测试结果如表 2 所示。采用 4 个浓度梯度的基因组 DNA 进行的扩增结果表明, 4 组 Ct 值 3 次平行重复间的标准偏差(SD)介于 0.05 ~ 0.13, 相对标准偏差(RSD)介于 0.17% ~ 0.42% 均在可接受的范围之内^[6], 表明本文建立的转基因苜蓿 J163 品系特异性实时荧光 PCR 方法具有很好的可重复性。

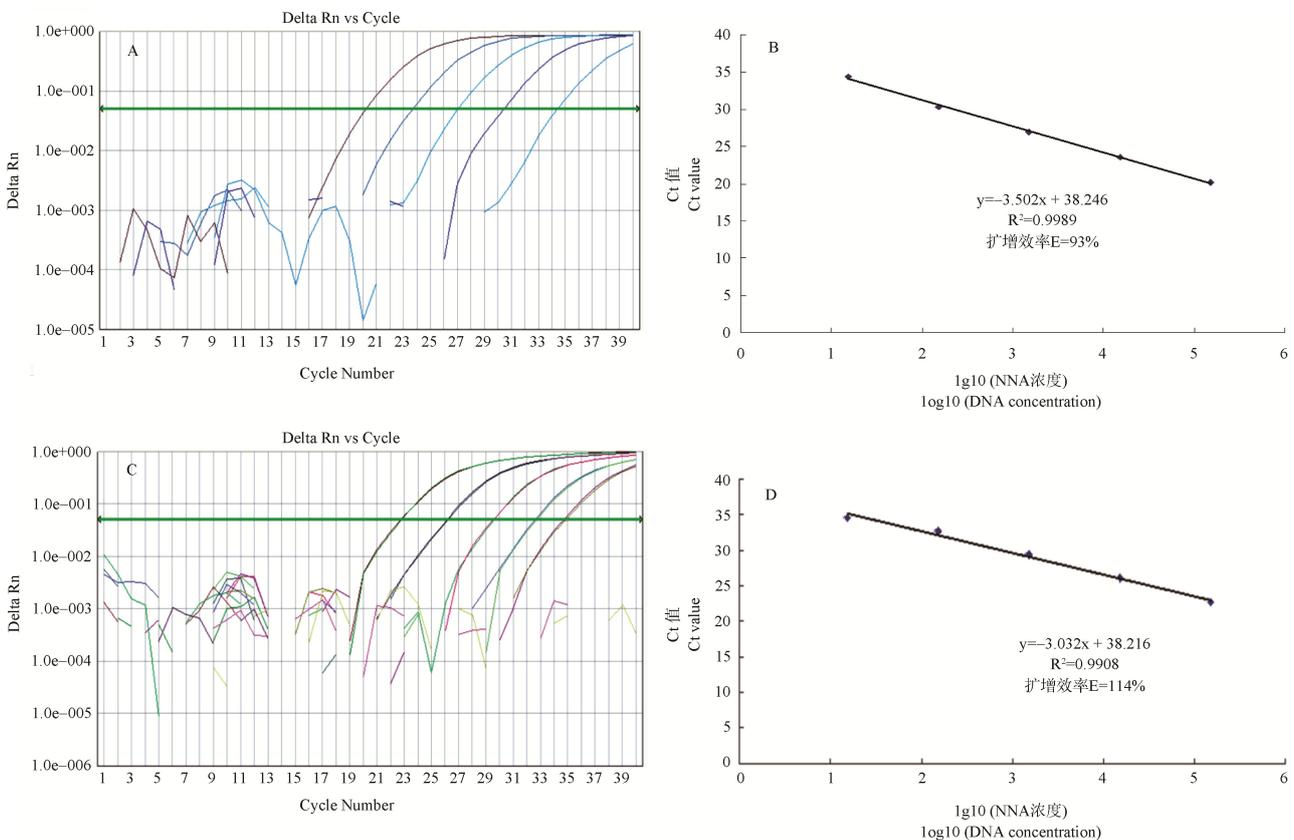


图4 苜蓿草内源基因 *acc* 和转基因苜蓿草 J163 品系特异性序列扩增曲线及标准曲线

Fig 4 Amplification plots and standard curves of *acc* gene and event-specific sequence of GM alfalfa J163

A: 苜蓿草内源基因 *acc* 扩增曲线; B: 苜蓿草内源基因 *acc* 标准曲线; C: 转基因苜蓿草 J163 品系特异性序列扩增曲线; D: 转基因苜蓿草 J163 品系特异性序列标准曲线。

A: The amplification curves of alfalfa endogenous gene *acc*; B: The standard curve of alfalfa endogenous gene *acc*; C: The amplification curves of the event-sequence of GM alfalfa 163. D: The standard curve of the event-specific sequence of GM alfalfa J163.

表 2 转基因苜蓿草 J163 品系特异性实时荧光 PCR 方法可重复性测试
Table 2 Repeatability of the established event-specific real-time PCR for GM alfalfa J163

DNA 模板量 Amount of DNA(ng)	拷贝数 Copy number ^a	Ct 值 Ct value			平均 Ct 值 Mean Ct value	SD	RSD/%
		1	2	3			
150	93750	24.34	24.49	24.58	24.47	0.10	0.40
30	18750	26.96	26.96	27.06	27.00	0.05	0.17
6	3750	29.95	29.86	29.66	29.82	0.12	0.41
1.2	750	31.83	32.08	32.14	32.02	0.13	0.42

a. calculated based on an estimated genome size of 1510 Mbp

4 讨论

目前我国存栏数为 1500 万头奶牛, 对优质饲草需求量非常大。转基因苜蓿通过饲料进入动物养殖的食物链, 致使牛奶、肉等制品成为转基因食品, 可能对于人的健康产生影响。根据《农业转基因生物安全管理条例》等法规, 为保障消费者的知情权, 凡是在中国境内销售的转基因生物, 必须进行标识, 中国目前实施无阈值的强制性标识制度^[7]。

对转基因产品标识需要检测方法的支撑。目前对转基因产品的检测主要包括对蛋白质和核酸检测两大类, 而后者应用最广泛的是荧光 PCR 检测技术, 相较普通 PCR 技术, 它具有更高的灵敏度、特异性和稳定性。可通过荧光信号的积累实现实时监测整个 PCR 进程, 而后通过扩增曲线和标准曲线对未知模板进行定性或定量分析。目前已有多种转基因作物品系如转基因棉花 MON88913^[8], 转基因棉花 GHB119^[9], 转基因油菜品系 Topas19/2 等建立了实时荧光 PCR 方法^[7]。

品系特异性检测方法是基于外源插入片段和宿主基因接合区的边界序列建立特异性的检测方法, 可以对转基因产品品系进行判定, 被认为是最适合转基因标识的检测判定方法^[7]。Zimmermann 等^[10]首次使用 inverse PCR 策略获得 Bt11 的接合区序列并建立品系特异性检测方法。品系特异性检测可以区分转化于同一类质粒的不同基因品系。如油菜的 Rf1 和 Rf2^[11]。

转基因苜蓿草 J163 品系由孟山都公司开发的耐草甘膦除草剂的转基因品系, 草甘膦(gluphosate)是孟山都(Monsanto)公司生产的是一种施用于叶面的广谱的、非选择性的有机磷类除草剂(商品名为 Roundup)。它对于一年生和多年生杂草都有极强的控制能力。Monsanto 公司将具有抗草甘膦除草剂能力的 EPSPS 基因转入苜蓿草中, 使其具有抗草甘膦除

草剂能力^[13]。由于目前对转基因苜蓿草的转基因成份的检测尚无法检测到品系, 只能进行启动子、终止子或 EPSPS 等基因的筛查, 为此, 本研根据转基因苜蓿草 J163 利用 TaqMan 实时荧光 PCR(real-time PCR)技术, 根据转基因苜蓿草品系 J163 5'端外源插入片段 P-eFMV 与苜蓿草基因组 DNA 之间的邻接区序列设计引物和探针, 建立了转基因苜蓿草 J163 品系特异性实时荧光 PCR 检测方法。研究结果表明, 该方法特异性好, 灵敏度高、稳定性强, 快速准确, 适用于相关实验室进行对转基因苜蓿草 J163 进行品系特异性筛查, 可为满足我国出入境口岸对进境转基因苜蓿草的监管提供有力技术支撑。

参考文献

- [1] 2014 年 1-6 月中国进口苜蓿干草 40.56 万吨 同比增 26.94% [EB/OL]. http://www.sdcy.gov.cn/art/2014/8/7/art_5561_83138.html. China imported 405,600 tons of alfalfa hay from January to June 2014, a 26.94 percent increase over the same period last year [EB/OL]. http://www.sdcy.gov.cn/art/014/8/7/rt_5561_3138.tml.
- [2] Alexander TW, Reuter T, McAllister TA. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction assays for an alfalfa (*Medicago sativa*)-specific reference gene to use in monitoring transgenic cultivars [J]. *Agric Food Chem*, 2007, 8(55): 2918-2922.
- [3] Beazley KA, Ferreira KL, Filtzpanck SN, et al. Glyphosate tolerant alfalfa events and methods for detection [P]. United States patent, US 7,566,817 B2, Jul. 28, 2009.
- [4] Arumuganthan K, Earle ED. Nuclear DNA content of some important plant species[J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1991, 9: 208-218.
- [5] Taverniers I, Van Bockstaele E, De Loose M. Cloned plasmid DNA fragments as calibrators for controlling GMOs: Different real-time duplex quantitative PCR methods [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2004, 378: 1198-1207.
- [6] European Network of GMO laboratories(ENGL).2008.Definition

- of Perf-requirements minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing. <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/Min-Perf-requirements Analytical methods.pdf>
- [7] Wu G, Wu YH, Xiao L, *et al.* Event-specific qualitative and quantitative PCR detection of genetically modified rapeseed Topas 19/2 [J]. *Food Chem*, 2008, (1): 232–238.
- [8] 杨立桃, 蒋玲曦, 沈恺琳, 等. 2009. 转基因棉花 MON88913 转化体特异性定性、定量 PCR 检测方法[J]. *食品安全质量检测技术*, 2009, 01: 10–19.
- Yang LT, Jiang LX, Shen KL, *et al.* Event-specific qualitative and quantitative PCR detection methods for genetically modified cotton MON88913 [J]. *Food Saf Qual Detect Technol*, 2009, 1: 10–19.
- [9] 汪秀秀, 杨捷琳, 宋青, 等. 转基因棉花 GHB119 品系特异性定量 PCR 检测方法的建立[J]. *农业生物技术学报*, 2014, 3: 380–388.
- Wang XX, Yang JL, Song Q, *et al.* Establishment of a Novel Event-specific Quantitative PCR Method for genetically Modified Cotton(*Gossypium sp.*)GHB119 Detection [J]. *J Agric Biotechnol*, 2014, 22(3): 380–388.
- [10] Zimmermann A, Lüthy J, Pauli U. Event specific transgene detection in Bt11 corn by quantitative PCR at the integration site [J]. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 2000, 33, 210–216.
- [11] U. S. Food and Drug Administration (1999). <http://www.agbios.com/docroot/decdocs/bnfl064.pdf>.
- [12] 潘良文, 陈家华, 沈禹飞, 等. 进口转基因抗草甘膦油菜籽和大豆中 CP4-EPSPS 基因的检测比较研究[J]. *生物技术通讯*, 2001, 3: 175–177.
- Pan LW, Chen JH, Shen YF, *et al.* Detection comparison of CP4-EPSPS gene from genetically modified Roundup-Ready rapeseed and soybean [J]. *Letters In biotechnology*, 2001, 3: 175–177.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



刘二龙, 工程师, 主要研究方向为微生物与分子生物学。

E-mail: erlongliu@126.com

唐 婕, 工程师, 主要研究方向为微生物与分子生物学。

E-mail: 22223520@qq.com