

转基因苜蓿草 J101 品系特异性定性 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, 唐婕³, 郑高彬¹, 林学勤¹, 符其姣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** 建立转基因苜蓿草 J101 品系特异性定性 PCR 检测方法。**方法** 根据转基因苜蓿草品系 J101 5' 端外源插入片段与苜蓿草基因组 DNA 之间的邻接区序列设计引物, 建立了转基因苜蓿草 J101 品系特异性定性 PCR 检测方法, 并对本方法的特异性、灵敏度进行了测定。**结果** 建立的检测方法特异于转基因苜蓿草 J101 检测, 检测最低 DNA 浓度为(limit of detection, LOD)为 80 pg, 相当于 50 拷贝转基因苜蓿草 J101 基因组 DNA。**结论** 本研究建立的转基因苜蓿草 J101 品系特异性定性 PCR 检测方法特异性好, 灵敏度高, 能够快速、准确地对转基因苜蓿草 J101 进行检测分析。

关键词: 转基因苜蓿 J101; 品系特异性; 定性 PCR

Event-specific qualitative PCR detection method of genetically modified alfalfa events J101

LIU Er-Long^{1*}, LU Li², LV Ying-Zi¹, JIANG Xiang¹, ZHANG Wang², TANG Jie³,
ZHENG Gao-Bing¹, LIN Xue-Qin¹, FU Qi-Jiao¹

(1. Huangpu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510730, China; 2. Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China; 3. Shaanxi Institute of Zoology, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT: Objective To establish a event-specific qualitative PCR detection method for genetically modified (GM) alfalfa events J101. **Methods** The specific primer pairs based on the 5' junction sequence spanning the alfalfa DNA and inserted fragment of J101 were designed and then the PCR detection system was established. The specificity and sensitivity were analyzed. **Results** The qualitative PCR method was specific for GM alfalfa J101 detection, the limit of detection (LOD) were 80 pg J101 genomic DNA or 50 copies of alfalfa J101 genomic DNA. **Conclusion** The established event-specific PCR method for GM alfalfa J101 detection has a high specificity and good sensitivity, and is suitable for detection of J101 samples quickly and accurately.

KEY WORDS: genetically modified alfalfa J101; event-specific; qualitative PCR

*通讯作者: 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

*Corresponding author: LIU Er-Long, Engineer, Huangpu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510730, China. E-mail: erlongliu@126.com

1 引言

我国牛奶的产量和品质较国外有较大的差距, 优质的饲草(以苜蓿草为代表)缺乏也是原因之一。目前高质量的苜蓿草主要从美国进口, 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^[1]。

抗草甘膦转基因苜蓿草 J101(商品名 Roundup Ready alfalfa events J101)是由美国孟山都公司研制开发的一种抗除草剂转基因苜蓿草品系, 2005 年美国 and 加拿大批准环境释放作为饲料应用^[2], 目前尚未获得我国转基因生物安全证书。

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, 后者以 PCR 技术基础应用的更加广泛。根据扩增目标片段位置的不同, 基于核酸基础上的 PCR 检测可以分为 4 种检测策略:(1)筛查法: 对转基因产品中的启动子、终止子等通用基因进行筛查;(2)基因特异性检测: 对转基因产品中的外源目的基因进行检测;(3)构建特异性检测: 对外源目的基因与启动子或终止子的特异连接序列进行检测;(4)品系特异性/转化事件特异性检测: 对外源片段与宿主基因组 DNA 特异连接序列进行检测^[3]。

本研究基于 J101 5'端外源插入片段与苜蓿草基因组 DNA 之间的邻接区序列建立了转基因苜蓿草 J101 品系特异性定性检测方法, 实现了转基因苜蓿草 J101 品系进行鉴别性检测, 可以满足检疫监管的需求。

2 材料与方法

2.1 材料、试剂与仪器

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、小麦和油菜籽由本实验室储备, 转基因苜蓿草 J101 由重庆出入境检验检疫局惠赠。

主要试剂: Ex taq 酶(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: PCR 仪(BIORAD S1000)、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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.2.2 引物设计

为了建立抗草甘膦转基因苜蓿 J101 品系特异性定性检测方法, 查找专利得到 J101 品系转基因片段部分序列^[4], 其外源插入片段元件组成见图 1。

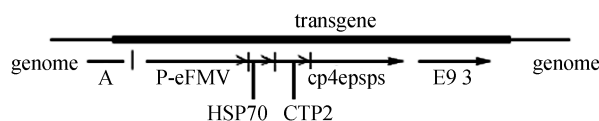


图 1 转基因苜蓿 J101 品系外源插入片段示意图

Fig. 1 The sketch map of inserted exogenous fragment in roundup ready alfalfa event J101

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 70 kDa 蛋白; CTP2: 叶绿体转运肽基因 2; cp4epsps: 来源于农杆菌 CP4 的莽草酸羟基乙酰转移酶基因(5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸酯合成酶基因); E9 3': 终止子; A 为本文扩增边界片段

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-enolpyruyl-shikimate-3-phosphate synthase obtained from *Agrobacterium* sp. strain CP4; E9 3': E9 3' terminator; A: the location of the primer pair

基于苜蓿基因组 DNA 的 5'端外源插入片段与苜蓿基因组 DNA 之间的邻接区序列分析, 使用 Primer Premier 5 设计引物和探针。将设计的引物在 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)^[2] 引物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 PCR 反应体系

PCR 反应体系为 25 μL : Takara Ex Taq 12.5 μL , J101-1/2 分别 0.5 μL , DNA 模板 1 μL , ddH₂O 10.5 μL ; 反应程序为: 98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循

环。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。

2.2.4 PCR 的特异性和灵敏度测试

为确定本文检测 J101 品系引物 J101-1/2 的特异性, 采用转基因玉米品系 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、小麦、油菜籽和苜蓿草 J101 共 10 种基因组 DNA 为模板, 利用普通 PCR 进行扩增, 进行特异性检测。

采用 100 ng/μL、16 ng/μL、1.6 ng/μL、0.16 ng/μL、0.08 ng/μL 及 0.016 ng/μL 的 J101 品系的基因组 DNA 为模板进行普通 PCR 检测, 进行灵敏度测试。

3 结果与分析

3.1 引物设计

本研究根据转基因苜蓿草 J101 品系的 5' 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, 对引物扩增效果进行筛选和分析, 最终选择 J101-1/2 引物建立转基因苜蓿草 J101 品系特异性检测方法(序列见表 1), 引物位置如图 2 所示。

3.2 PCR 检测苜蓿草 J101 的特异性和灵敏度测试

为确定本文检测 J101 品系引物 J101-1/2 的特异

性, 对不同品种的农作物基因组 DNA 进行了普通 PCR 检测, 电泳结果表明, 引物对 J101-1/2 能特异性扩增出 J101 品系的 201 bp 片段, 其他 9 种作物无扩增(图 3 A)。该对引物的普通 PCR 的灵敏度显示, 采用 100 ng/μL、16 ng/μL、1.6 ng/μL、0.16 ng/μL、0.08 ng/μL 及 0.016 ng/μL 的 J101 品系的基因组 DNA 为模板进行检测, 在模板量不少于 0.08 ng 时, 特异性 201 bp 的片段能扩增出来。表明其灵敏度约为 0.08 ng 基因组 DNA, 由于苜蓿草的基因组 DNA 的估算为 1510 Mbp, 重量大约可估算为 1.6 pg^[5], 即本文建立的定性检测方法的灵敏度相当于 50 拷贝基因组 DNA, 结果如图 3 B 所示。

4 讨论

目前我国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, 存在一定食品安全风险。根据《农业转基因生物标识管理办法》, 凡是在中国境内销售的转基因生物, 必须进行标识^[6]。目前各国强制标识的转基因限量各不相同。欧盟和俄罗斯为 0.9%^[7,8], 韩国和日本分别是 3% 和 5%^[9,10], 中国目前实施无阈值的强制性标识制度^[5]。

表 1 引物和探针序列
Table 1 Sequence of primer pair/probe used in this study

检测目标	引物/探针	序列(5'-3')	扩增产物长度/bp	来源
J101	J101-1	GTGTGTACGGATACAAAGTCAAACA	201	本研究设计
	J101-2	GGGATCAGATTGTCGTTTCC		
<i>acc</i>	<i>acc-1</i>	GATCAGTGAAGTTCGCAAAGTAC	91	[2]
	<i>acc-2</i>	CAACGACGTGAACACTACAAC		

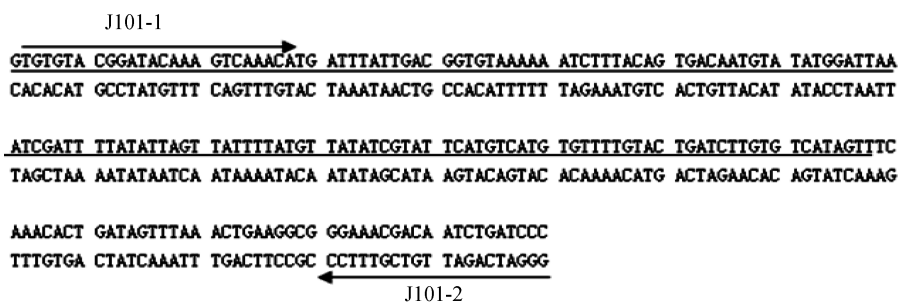


图 2 J101 5' 端邻接区序列及引物在序列上的位置(下划线部分为 J101 基因组 DNA 序列)

Fig. 2 Locations of primer pair in J101 5' flanking sequence (J101 genomic DNA sequence was underlined)

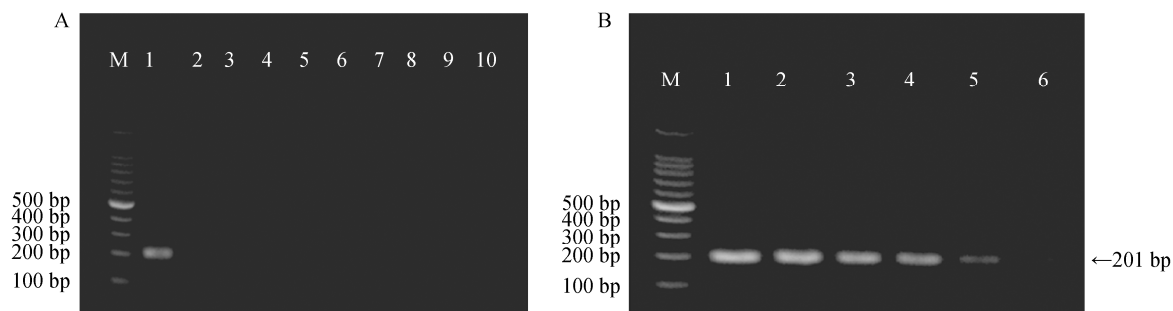


图 3 J101 品系定性 PCR 检测

Fig. 3 Qualitative PCR detection of genetically modified alfalfa events J101

A. J101 品系特异性试验; 1. J101; 2~10. 9 种非 J101 农作物; B. J101 品系灵敏度试验; 1~6 分别为 100 ng, 50 ng, 16 ng, 1.6 ng, 0.16 ng 和 0.08 ng J101 基因组 DNA 模板

A. Specificity test :1.J101;2-10 non- genetically modified alfalfa event J101 crops ;B.Sensitivity tests: The quantities of the J101 genome in each dilution were 100, 16, 1.6, 0.16,0.08 和 0.016ng per reaction, respectively.

国内转基因苜蓿草检测主要采用筛查的办法, 检测启动子、终止子或 EPSPS 等基因来确定是否转基因苜蓿草, 但对于不同品系的转基因苜蓿草不能进行鉴别性检测, 无法满足转基因产品身份识别等需求。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, 即使对于转化于同一类质粒的不同基因品系也可进行区分(如 Rf1 和 Rf2 油菜), 被认为是最适合转基因标识的检测判定方法^[11]。Zimmerman 等^[12]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。目前已建立转基因棉花、转基因水稻等多种品系特异性检测方法^[13,14]。

本文根据转基因苜蓿草品系 J101 5'端外源插入片段与苜蓿草基因组 DNA 之间的邻接区序列设计引物, 建立的转基因苜蓿草 J101 品系特异性定性 PCR 检测方法特异性好、快速准确, 适用于相关实验室对转基因苜蓿草 J101 进行品系鉴定。

参考文献

- [1] 山东草业网. 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, 2014-08-07/2014-11-01.
Grass Industry in Shandong. China imported 405600 tons of alfalfa hay between January and June 2014, increased 26.94% [EB/OL]. http://www.sdcy.gov.cn/art/2014/8/7/art_5561_83138.html, 2014-08-07/2014-11-01.
- [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]. *J Agric Food Chem*, 2007, 8 (55): 2918–2922.

- [3] 蒋利平, 翁绿水, 肖国樱. 转基因水稻 B2A68 事件特异性检测方法的建立[J]. *杂交水稻*, 2013, 5: 60–67.
Jiang LP, Weng LS, Xiao GY. Establishment of an event-specific method to detect transgenic rice B2A68 [J]. *Hybrid Rice*, 2013, 28(5): 60–67.
- [4] Beazley KA, Ferreira KL, Filtzpanck SN, *et al.* Glyphosate tolerant alfalfa events and methods for detection [P]. US 7,566,817 B2, 2009-07-28.
- [5] Arumuganthan K, Earle ED. Nuclear DNA content of some important plant species [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1991, 9: 208–218.
- [6] 中华人民共和国农业部, 农业部第 10 号令《农业转基因生物标识管理办法》[S]. 2002.
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Order 10 Administration of Agricultural Genetically Modified Organisms Labeling [S]. 2002.
- [7] European Commission. Commission regulation (EC) No. 1829, Concerning on genetically modified food and feed [S]. 2003.
- [8] Chief Medical Officer of the Russian Federation, Hygiene requirements to safety and nutrition value of food products [EB/OL]. <http://apps.fas.usda.gov/gainfiles/200707/1462918630.pdf>, 2007-06-25/2014-11-01.
- [9] Matsuoka T. GMO labeling and detection methods in Japan [R]. APEC-JIRCAS Joint Symposium and Workshop on Agricultural Biotechnology, 2001.
- [10] Ministry of Agriculture and Forestry of South Korea. MAF Notification, 31. Guidelines for labeling of genetically modified agricultural products [S]. 2000.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 杨立桃, 蒋玲曦, 沈恺琳, 等. 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, 1(1): 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.
- [14] 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 GHB119 detection [J]. *J Agric Biotechnol*, 2014, 22(3): 380–388.

(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