

转基因大豆 MON87751 品系特异性实时荧光定量 PCR 检测方法建立

刘二龙¹, 郑冠津¹, 王毅谦², 李志勇^{3*}, 魏霜³, 关丽军³, 卢丽³, 蒋湘¹, 刘金华⁴, 王振华⁵

(1. 黄埔海关技术中心, 广东广州 510730; 2. 南京海关动植物与食品检测中心, 江苏南京 210019; 3. 广州海关技术中心, 广东广州 510623; 4. 长春海关技术中心, 吉林长春 130000; 5. 武汉海关技术中心, 湖北武汉 430000)

摘要 [目的] 为完善我国转基因检测方法体系, 建立转基因大豆 MON87751 品系特异性实时荧光聚合酶链式反应 (real time polymerase chain reaction, PCR) 检测方法。[方法] 根据 MON87751 的 3' 端邻接区序列设计特异性引物和探针, 建立 MON87751 品系特异性实时荧光 PCR 检测方法, 并测定该方法的灵敏度、特异性及可重复性。[结果] 灵敏度测试显示, 其定量下限为 40 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] 该研究建立的 MON87751 品系特异性实时荧光 PCR 检测方法特异性良好, 灵敏度高, 有良好的可重复性, 适合对转基因大豆 MON87751 品系进行检测鉴定。

关键词 实时荧光 PCR; 转基因大豆 MON87751; 品系特异性

中图分类号 S565.1 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)04-0102-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.04.027



开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):

Establishing an Event-specific Real-time Polymerase Chain Reaction Detection Method for Genetically Modified Soybean Event MON87751

LIU Er-long¹, ZHENG Guan-jin¹, WANG Yi-qian² et al (1. Huangpu Customs Technology Center, Guangzhou, Guangdong 510730; 2. Animal Plant and Food Inspection Center of Nanjing Customs, Nanjing, Jiangsu 210019)

Abstract [Objective] In order to improve the genetically modified detection method system in China, a real-time polymerase chain reaction (PCR) detection method specific to the genetically modified soybean MON87751 was established. [Method] The specific primer pairs and probe based on the sequence of the 3' adjacent region of MON87751 were designed and then the real-time PCR detection method was established. The specificity, sensitivity and repeatability were analyzed. [Result] The real-time PCR method was specific for detecting MON87751. The limit of quantification (LOQ) was 40 copies MON87751 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 MON87751 has good specificity, high sensitivity and good reproducibility, and is suitable for the identification of soybean MON87751.

Key words Quantitative real-time PCR; Genetically modified soybean MON87751; Event-specificity

大豆是一种富含蛋白与脂肪的粮食及油料作物。我国是世界大豆第一消费国和进口国, 国产大豆难以满足国内市场消费需求, 故而大豆贸易逆差大, 2019 年大豆进口量为 8 851 万 t^[1]。转基因大豆 MON87751 由孟山都公司研发, 其含有稳定整合的 cry1A.105 和 cry2Ab2 表达盒^[2], 主要产生 Cry1A.105 和 Cry2Ab2 两种针对鳞翅目害虫的杀虫蛋白。MON87751 于 2014 年在美国上市, 目前在欧盟、澳大利亚、新西兰、加拿大、日本、韩国、中国台湾和美国等国家或地区获得批准允许用作食品、饲料或种植。为完善我国转基因产品检测技术体系, 为转基因产品的监管提供强有力的技术支持, 笔者采用实时荧光 PCR 技术平台, 根据 MON87751 3' 端邻接区序列设计引物、探针, 建立了 MON87751 品系特异性检测方法, 以期为实现高通量的检测提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材料和试剂 转基因油菜 MON88302、转基因棉花 MON88913、转基因油菜 DP-073496-4、转基因大豆 A2704-12、转基因大豆 GTS 40-30-2、转基因甜菜 H7-1、转基因玉米

MON810、转基因玉米 NK603、转基因玉米 BT11、转基因玉米 MIR162、非转基因大豆为黄埔海关技术中心购置及保存; 大豆内源基因植物凝集素基因 (Lectin 基因) 和 MON87751 品系特异性外源基因双基因阳性质粒为黄埔海关技术中心构建。

主要试剂: Primex Ex Taq (2×) for qPCR (TAKARA); 引物和探针工作液的终浓度为 10 μmol/L (上海闪晶生物); DNA 提取试剂盒 DP-305 (北京天根)。

主要设备: 实时荧光 PCR 仪 ABI7500fast、ABI7500 (美国应用生物系统公司); 研磨机 Tube Mill 100 control (德国 IKA); 微量分光光度计 nanodrop2000c (美国 Thermo 公司)。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取。 称取 100 mg 研磨成粉末状的样品提取样品中的基因组 DNA, 测定 DNA 浓度并于 4 °C 保存备用。

1.2.2 引物组和探针设计。 根据转基因大豆 MON87751 品系 3' 端邻接区序列 (品系特异性片段), 应用 Primer Primer 5.0 软件设计引物和探针。选用内源基因 Lectin 用于样本核酸提取质量监测及定量分析。

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 TAKARA RR390 酶系对不同体积的引物探针进行优化 (25 μL 体系)。A 组: Premix Ex Taq™ 12.5 μL, ROX Reference Dye II 0.2 μL, 10 μmol/L MON87751-F 和 MON87751-R 各 0.5 μL, 10 μmol/L 探针 MON87751-P 1.0 μL, 模板 2.0 μL 和 ddH₂O 8.3 μL。B 组: Premix Ex Taq™

基金项目 广东省科技计划项目 (2017B020207008); 广州市科技计划项目 (201704030125); 国家重点研发计划 (2018YFF0215605); 南京海关科技计划项目 (2021KJ18)。

作者简介 刘二龙 (1978—), 男, 湖南郴州人, 高级兽医师, 硕士, 从事动植物分子鉴定研究。* 通信作者, 博士, 从事食品安全快速检测技术研究。

收稿日期 2021-04-06; **修回日期** 2021-05-24

12.5 μL , ROX Reference Dye II 0.2 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ MON87751-F 和 MON87751-R 各 0.4 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 探针 MON87751-P 0.8 μL , 模板 2.0 μL 和 ddH₂O 8.7 μL 。C 组: Premix Ex TaqTM 12.5 μL , ROX Reference Dye II 0.2 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ MON87751-F 和 MON87751-R 各 0.2 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 探针 MON87751-P 0.4 μL , 模板 2.0 μL 和 ddH₂O 9.5 μL 。退火延伸温度分别设置为 60 和 58 $^{\circ}\text{C}$, 反应程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s; 60 $^{\circ}\text{C}$ (58 $^{\circ}\text{C}$) 34 s, 40 个循环, 于 60 $^{\circ}\text{C}$ (58 $^{\circ}\text{C}$) 收集荧光信号。

1.2.4 特异性测试。用“1.2.1”的方法提取“1.1”中样品 DNA 为模板, 阳性对照为 Lectin-MON87751 质粒, 阴性对照为非转基因大米 DNA, 进行特异性测试。

1.2.5 灵敏度测试。将提取的 Lectin-MON87751 DNA 缓冲液稀释至 4 000 000、400 000、40 000、4 000、400、40 和

20 拷贝/ μL 进行转基因大豆 MON87751 实时荧光 PCR 检测, 进行灵敏度测试。

1.2.6 可重复性测试及建立标准曲线。将提取的 Lectin-MON87751 质粒 DNA 溶液加入 TE 缓冲液稀释至 4 000 000、400 000、40 000、4 000、400、40 和 20 拷贝/ μL , 每个样品进行 3 次重复试验, 进行实时荧光 PCR 检测线性范围测试及可重复性测试。

2 结果与分析

2.1 方法的建立及优化

2.1.1 实时荧光 PCR 引物和探针设计。通过分析转基因大豆 MON87751 3' 端邻接区序列设计的多组引物和探针, 分析引物与探针的反应效率、扩增效果, 最终选择表 1 中的引物和探针建立 MON87751 品系特异性检测方法。

表 1 引物组、探针序列

Table 1 Sequence of primer pair and probe

目标 Detect target	引物/探针 Primer/probe	序列(5'-3') Sequence	产物 Amplicon length//bp	来源 Reference
MON87751 品系特异性 序列 MON87751 strain specific sequence	MON87751-F	GCTGCGGACATCTACATTTTTG	133	该研究设计
	MON87751-R	TGACCGAGCTGTCTTGTCTCTC		
	MON87751-P	FAM-TTGACCATCATACTCATTGCTGATCCATG-BHQ1		
Lectin 基因 Lectin gene	Lectin-F	CTTCTCGCACCAATTGACA	102	文献[3]
	Lectin-R	TCAAACCTCAACAGCGACGAC		
	Lectin-P	VIC-AGCCACAAACACATGCAGGTTATCTTGG-BHQ1		

2.1.2 PCR 反应体系优化。在扩增体系的退火温度为 58 $^{\circ}\text{C}$ 时, 3 组引物探针组 B、A 和 C 的扩增曲线均扩增良好, 其中 Ct 值最小为 B 组(图 1); 温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 时, B、A 和 C 3 组均扩增良好, A 和 B 组 Ct 值接近, C 组 Ct 稍高, 但 3 组引物探针 Ct 值较退火温度为 58 $^{\circ}\text{C}$ 时 Ct 值高(图 2)。因此, 基于扩增效率和经济性, 考虑选择 B 组体积配比、58 $^{\circ}\text{C}$ 作为退火温度引物探针配比。

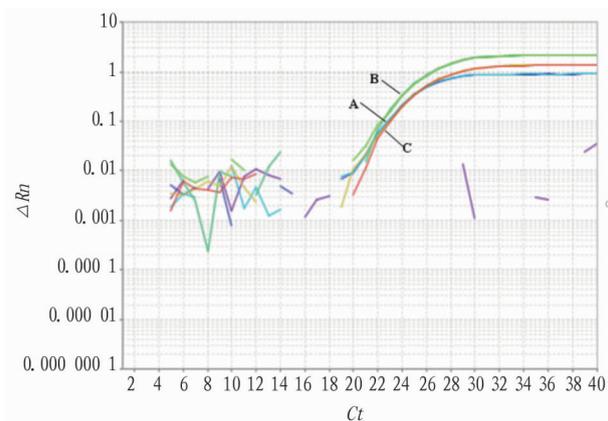


图 1 退火温度为 58 $^{\circ}\text{C}$ 时的扩增结果

Fig.1 Amplification diagram with annealing temperature of 58 $^{\circ}\text{C}$

2.2 特异性测试 由图 3 可知, 采用 MON87751 品系特异性 MON87751-F/R/P 引物和探针进行实时荧光 PCR 时, 其他农作物材料 DNA 为模板的反应均无典型荧光扩增曲线, 只有阳性样品 MON87751 的 DNA 模板有典型荧光扩增曲线, 表明该研究的检测方法特异性良好。

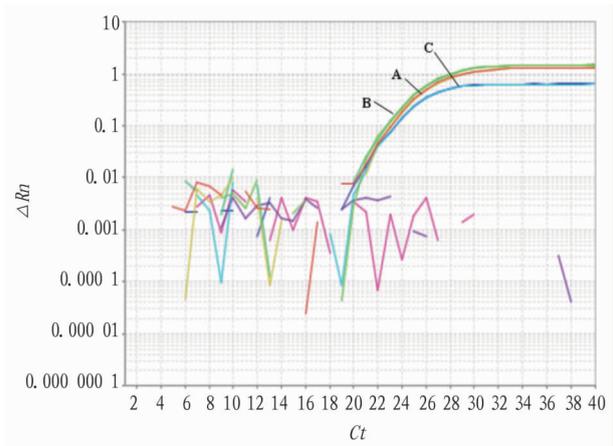


图 2 退火温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 时的扩增结果

Fig.2 Amplification diagram with annealing temperature of 60 $^{\circ}\text{C}$

2.3 灵敏度测试、可重复性测试及标准曲线建立 按“1.2.5”进行 7 个浓度梯度扩增, 其最低检测浓度为 20 拷贝/ μL 。扩增曲线见图 4。

2.4 标准曲线制备 按“1.2.6”进行转基因大豆 MON87751 品系实时荧光 PCR 检测, 测试结果的 Ct 值见表 2。根据表 2 中 Ct 值数据与拷贝数对数值建立线性回归方程为 $y = -3.43x + 42.12$, 扩增效率 95.55% (90%~110%), R^2 为 0.99, 表明该方法的线性相关性良好, 扩增效率满足定量检测标准的要求(图 5), 且在线性范围内, Ct 值的 SD 为 0.04~0.39, RSD 为 0.20%~1.27% (表 2)。最低模板量 40 拷贝时, 其 RSD 远小于 25%, 设定该方法的定量限为 40 拷贝。

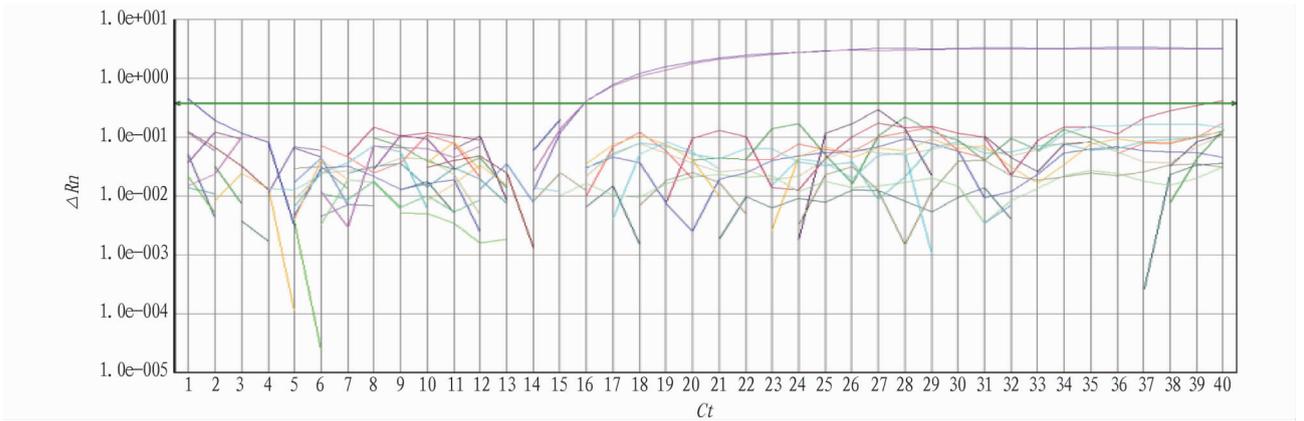


图3 MON87751 特异性测试
Fig.3 Specificity test for MON87751

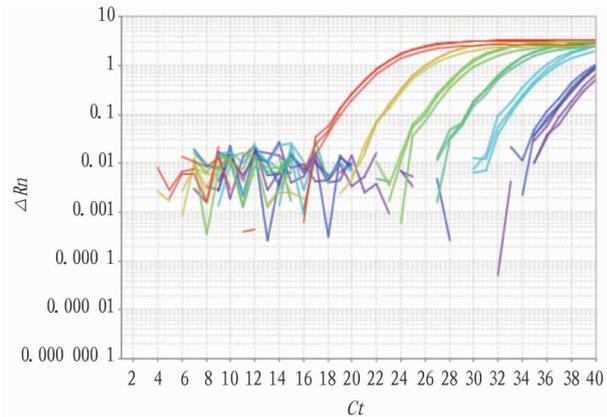


图4 MON87751 灵敏度测试
Fig.4 Sensitivity tests for MON87751

3 讨论

目前对转基因产品多数国家均采用相应的标识管理制度,转基因产品标识需要检测方法的支撑。欧盟转基因食品和饲料基准实验室有建立 MON87751 5'边界序列的 PCR 检测方法^[4],但国内尚缺乏该检测方法及相关标准。实时荧光定量 PCR 技术在转基因检测中应用广泛,被誉为“金标准”,其可监测 PCR 进程中探针发光基团的信号,从而实现定性或定量分析^[5-7]。

品系特异性 PCR(Event-specific PCR)检测方法检测的目标序列是外源基因与植物基因组间边界序列,甚至可以区分相同质粒转化的转基因品系^[8],品系特异性检测方法报道较早见于 Bt11 品系检测方法的建立^[9],目前在转基因品系鉴定中应用广泛^[10-15]。

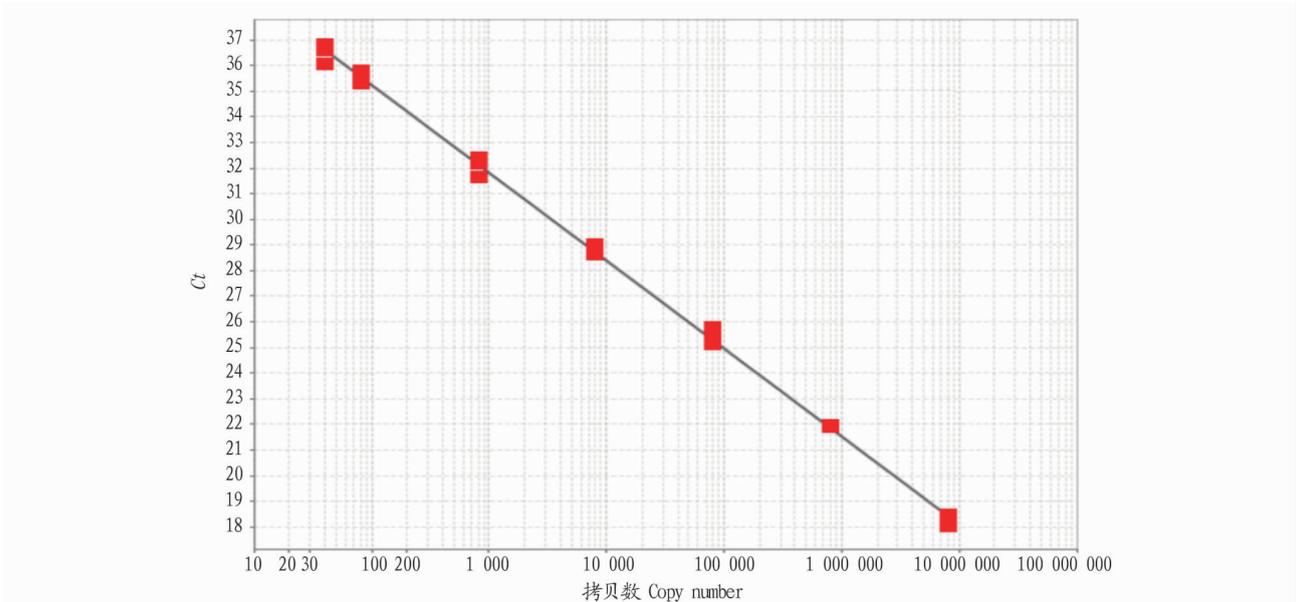


图5 实时荧光 PCR 检测 MON87751 品系的标准曲线
Fig.5 The standard curve of the event-specific sequence of MON87751

该研究针对转基因大豆 MON87751 3'端边界特异性序列,基于实时荧光 PCR 平台,设计引物和探针建立 MON87751 品系特异性检测方法,定量下限为 40 拷贝,扩增效率为 95.55%,重复性测试显示,各平行间样品所得 Ct 的

RSD 均远小于 25%,表明该方法特异性良好,灵敏度较高,具有良好的稳定性,可为相关部门鉴定检测转基因大豆 MON87751 提供方便快捷的方法。

表 2 灵敏度和可重复性测试

Table 2 Repeatability of the event-specific method for MON87751

DNA 模板量(拷贝数) Amount of DNA(Copy number)	Ct 值 Ct value			Ct 平均值 Mean of Ct value	SD	RSD %
	1	2	3			
8 000 000	18.13	18.06	18.49	18.23	0.23	1.27
800 000	21.89	21.97	21.96	21.94	0.04	0.20
80 000	25.17	25.35	25.79	25.44	0.32	1.25
8 000	28.75	28.64	29.01	28.80	0.19	0.66
800	32.20	31.66	32.39	32.08	0.38	1.18
80	35.79	35.80	35.32	35.64	0.27	0.77
40	36.59	36.08	36.84	36.50	0.39	1.06

参考文献

- [1] 王红蕾. 浅谈中国 2020 年度大豆行业市场状况与区域竞争格局[J]. 山西农经, 2021(4): 104-105.
- [2] ISAAA GM Approval Database GM Crop Events List MON87751 [EB/OL]. (2013-01-12) [2020-03-31]. <https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/event/default.asp?EventID=370>.
- [3] SAVINI C, MARETTI M, MAZZARA M, et al. Event-specific method for the quantification of soybean MON 87705 using real-time PCR validation report [R]. 2012.
- [4] European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (EURL GM-FF), Joint Research Centre (JRC), European Commission. Event-specific Method for the Quantification of Soybean MON 87751 Using Real-time PCR-Validation Report and Validated Method [R]. 2016.
- [5] MARMIROLI N, MAESTRI E, GULLÌ M, et al. Methods for detection of GMOs in food and feed [J]. Anal Bioanal Chem, 2008, 392(3): 369-384.
- [6] COTTENET G, BLANCPAIN C, SONNARD V, et al. Development and validation of a multiplex real-time PCR method to simultaneously detect 47 targets for the identification of genetically modified organisms [J]. Anal Bioanal Chem, 2013, 405(21): 6831-6844.
- [7] ANKLAM E, GADANI F, HEINZE P, et al. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products [J]. Eur Food Res Technol, 2002, 214(1): 3-26.
- [8] WU G, WU Y H, XIAO L, et al. Event-specific qualitative and quantitative PCR detection of genetically modified rapeseed Topas 19/2 [J]. Food Chem, 2009, 112(1): 232-238.
- [9] ZIMMERMANN A, LÜTHY J, PAULI U. Event specific transgene detection in Bt11 corn by quantitative PCR at the integration site [J]. LWT Food Sci Technol, 2000, 33(3): 210-216.
- [10] 雷水娟, 刘二龙, 卢丽, 等. 转基因棉花 MON88701 品系特异性实时荧光 PCR 检测方法的建立 [J]. 生物安全学报, 2019, 28(3): 225-229.
- [11] 袁俊杰, 魏霜, 龙阳, 等. 转基因大豆 MON87701 和 MON87708 双重实时荧光 PCR 检测技术的建立与应用 [J]. 农业生物技术学报, 2020, 28(2): 342-348.
- [12] 鲁军, 李刚, 赵建宁, 等. 5 种转基因油菜转化体特异性多重 PCR 检测方法 [J]. 生物安全学报, 2017, 26(3): 244-250.
- [13] 刘二龙, 卢丽, 吕英姿, 等. 转基因大豆 MON87701 和 MON87708 双重实时荧光 PCR 检测方法的建立 [J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(1): 272-278.
- [14] 刘二龙, 卢丽, 吕英姿, 等. 转基因甜菜 GTSB77 品系特异性实时荧光聚合酶链式反应检测方法建立 [J]. 中国食品卫生杂志, 2020, 32(1): 49-52.
- [15] 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, 22(3): 380-388.
- [16] 柏菊, 王振龙. 基于一维水质模型的淮北市区纳污能力计算 [J]. 安徽水利水电职业技术学院学报, 2011, 11(1): 10-12.
- [17] 董飞, 刘晓波, 彭文启, 等. 地表水水环境容量计算方法回顾与展望 [J]. 水科学进展, 2014, 25(3): 451-463.
- [18] 周刚, 雷坤, 富国, 等. 河流水环境容量计算方法研究 [J]. 水利学报, 2014, 45(2): 227-234, 242.
- [19] 于雷, 吴舜泽, 范丽丽, 等. 河流水环境容量一维计算方法 [J]. 水资源保护, 2008(1): 39-41.
- [20] 金菊良, 魏一鸣, 丁晶. 基于改进层次分析法的模糊综合评价模型 [J]. 水利学报, 2004, 35(3): 65-70.
- [21] 熊健. 基于多层次模糊综合评判法的南宁市水资源承载力现状评价 [D]. 南宁: 广西大学, 2018.
- [22] 陈守煜, 胡吉敏. 可变模糊评价法及在水资源承载力评价中的应用 [J]. 水利学报, 2006, 37(3): 264-271, 277.
- [23] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 水域纳污能力计算规程: GB/T 25173—2010 [S]. 北京: 中国水利水电出版社, 2010.
- [24] 中国环境规划院. 全国水环境容量核定技术指南 [R]. 北京: 中国环境规划院, 2003.
- [25] 生态环境部. 环境影响评价技术导则 地表水环境: HJ 2.3—2018 [S]. 北京: 中国环境出版社, 2018.
- [26] 张浩然. 基于三种评价模型的河南省水环境承载力研究 [D]. 郑州: 华北水利水电大学, 2020.

(上接第 94 页)

- [3] 郑小康, 彭少明. 鄂尔多斯市水环境承载力分析及污染物限排研究 [C]//2014 中国环境科学学会学术年会论文集(第五章). 北京: 中国学术期刊(光盘版)电子杂志社有限公司, 2014.
- [4] 马君梅, 戚华珍, 胡央群. 慈溪市地表水环境承载力研究 [C]//中国环境科学学会. 中国环境科学学会 2006 年学术年会优秀论文集(上卷). 北京: 中国环境科学出版社, 2006: 583-587.
- [5] 方晓波. 钱塘江流域水环境承载力研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2009.
- [6] 姜大川, 肖伟华, 范晨媛, 等. 武汉城市圈水资源及水环境承载力分析 [J]. 长江流域资源与环境, 2016, 25(5): 761-768.
- [7] 李辉艳, 帅红, 李晓鹏. 湘江长沙综合枢纽库区水环境承载力研究 [J]. 人民长江, 2020, 51(5): 60-67, 190.
- [8] 段志新. 承德市水环境承载力研究 [J]. 陕西水利, 2020(6): 41-44.
- [9] 黄海凤, 林春绵, 姜理英, 等. 丽水市大溪水环境承载力及对策研究 [J]. 浙江工业大学学报, 2004, 32(2): 157-162.
- [10] 潘祥东, 唐磊, 蒲迅赤, 等. 基于一维水质模型的盐津河纳污能力计算 [J]. 中国农村水利水电, 2020(6): 72-75, 81.
- [11] 王富强, 王雷, 荣飞. 基于一维水质模型的新乡市河流纳污能力计算 [J]. 华北水利水电大学学报(自然科学版), 2014, 35(5): 81-84.
- [12] 高嵩, 金勇, 钱军, 等. 基于一维河网水动力水质模型的引水泵站规模论证研究 [J]. 水利技术监督, 2020, 28(5): 177-180.
- [13] 刘晓东, 华祖林, 谢增芳, 等. 一维河流水质模型多参数识别的反演优化通用算法 [J]. 水力发电学报, 2012, 31(2): 122-127.