



# 转基因大豆 MON87701 品系 qPCR 和 3D - dPCR 检测方法的建立

温洪涛<sup>1</sup>, 杨 洋<sup>1</sup>, 丁一佳<sup>1</sup>, 张晓磊<sup>1</sup>, 关海涛<sup>1</sup>, 李 亮<sup>2</sup>, 张瑞英<sup>1</sup>

(1. 黑龙江省农业科学院 农产品质量安全研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 中国农业科学院 生物技术研究所, 北京 100081)

**摘 要:**转基因大豆 MON87701 是由孟山都公司研发的商业化抗虫大豆品系, 目前已在 17 个国家广泛应用。为建立适用于 MON87701 大豆的高效检测方法, 本研究基于实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, qPCR) 和芯片式数字 PCR (3D digital PCR, 3D-dPCR) 平台, 对 44 种不同转基因材料进行测试, 建立双重定量检测方法。研究结果显示: 只在转基因大豆 MON87701 样品中获得了阳性结果, 证实该方法中引物和探针组合具有较高的特异性。进一步对 2%、0.9%、0.09% 和 0.02% 不同含量的 MON87701 转基因大豆进行定量测试, 建立的 qPCR 和 3D-dPCR 两种方法的定量限均达到 0.09%, 检出限均达到 0.02%, 两者并无明显差别, 但由于 3D-dPCR 和 qPCR 相比不需要标准物质制作标准曲线, 并且对 DNA 提取质量要求更低, 因此使用起来更加便捷高效, 为转基因检测提供了新的方法和思路。

**关键词:**转基因大豆; MON87701; 定量检测; qPCR; 3D-dPCR

## Establishment of qPCR and 3D-dPCR Detection Method of Genetically Modified Soybean MON87701

WEN Hong-tao<sup>1</sup>, YANG Yang<sup>1</sup>, DING Yi-jia<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-lei<sup>1</sup>, GUAN Hai-tao<sup>1</sup>, LI Liang<sup>2</sup>, ZHANG Rui-ying<sup>1</sup>

(1. Quality & Safety Institute of Agricultural Products, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China; 2. Biotechnology Research Institute, Chinese Agricultural Academy of Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** Genetically modified (GM) soybean event MON87701 is a commercial insect resistant soybean developed by Monsanto company, which has been widely used in 17 countries. In order to established efficient detection method of MON87701, this study established duplex quantitative detection method based on real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR) and 3D digital PCR (3D-dPCR) platforms and tested 44 different transgenic materials. The result showed: The positive results were only obtained in the samples of MON87701, which confirmed that the primer and probe combination in the method had high specificity. The LOQs of the both methods were 0.09% and the LODs were 0.02%. There was no significant difference between the two methods. However, 3D-dPCR method does not need reference materials and the requirement on DNA quality is lower, it is more convenient and efficient providing new methods and ideas for the GMO detection.

**Keywords:** Genetically modified soybean; MON87701; Quantitative detection; qPCR; 3D-dPCR

转基因作物商业化种植已有 21 年, 2017 年全球转基因作物种植面积已达 1.898 亿  $\text{hm}^2$ , 共 24 个国家种植了转基因作物, 商业化转化体数量达到 517 个, 共包含 31 种作物<sup>[1]</sup>。随着转基因作物及其产品的不断推广和应用, 各个国家对转基因作物的监管逐渐加强, 全球已有 70 多个国家和地区相继开展转基因产品标识管理, 绝大多数国家都为定量标识, 如欧盟的标识阈值为 0.9%、韩国为 3%、日本为 5%<sup>[2]</sup>, 因此急需建立准确可靠、适用性广的定量检测方法, 为监管提供相应的技术支撑。对于转基因产品的定量检测目前最为常见的方法是实时荧光定量 PCR (Real-time fluorescence quantitative PCR, qPCR)<sup>[3]</sup>, 这种方法的特异性好、灵敏度高<sup>[4]</sup>, 但其

依赖于标准物质和标准曲线, 属于相对定量, 因此影响其结果的因素过多<sup>[5]</sup>。

数字 PCR (digital PCR, dPCR) 是近年来发展比较迅速的一种新型核酸定量检测方法, 该方法通过对样品进行极限稀释, 利用基于荧光探针检测的终点法 PCR 和泊松分布计算对样品进行 DNA 拷贝数的绝对定量<sup>[6]</sup>。由于该方法具有同实时荧光定量 PCR 同源的技术基础、相近的特异性和灵敏度, 且不依赖于标准物质和标准曲线, 已被广泛应用于转基因检测、基因表达研究、基因组拷贝数鉴定、致病微生物鉴定和定量等众多科研领域<sup>[7-9]</sup>。QuantStudio™ 3D 数字 PCR (QuantStudio™ 3D digital PCR, 3D-dPCR) 是 Thermo Fisher 公司 2013 年推出的

收稿日期: 2019-06-04

基金项目: 转基因新品种培育重大专项 (2018ZX08011-04B)。

第一作者简介: 温洪涛 (1980-), 男, 博士, 副研究员, 主要从事转基因检测及安全评价。E-mail: wen0891@163.com。

通讯作者: 张瑞英 (1963-), 女, 硕士, 研究员, 主要从事转基因检测及安全评价。E-mail: zhruying@163.com。

dPCR 平台,与 Bio-Rad 公司较早推出的的微滴式数字 PCR(droplet digital PCR, ddPCR)不同,3D-dPCR 是一种基于超高密度亲疏水微孔芯片的新型数字 PCR 平台,目前已有多个利用 3D-dPCR 进行定量检测的报道<sup>[10-11]</sup>。

MON87701 抗虫转基因大豆由美国孟山都公司研发,2010 年在加拿大率先被批准种植,截止 2019 年已有 17 个国家批准其用做加工原料、饲料或者种植使用。中国于 2013 年发放了 MON87701 大豆的转基因生物安全证书,允许其进口用做加工原料。付海滨等<sup>[12]</sup>研发了针对 MON87701 品系的荧光定性检测方法。欧洲转基因食品与饲料标准实验室已(European Union Reference Laboratory for GM Food & Feed, EURL-GMFF)针对 MON87701 转基因大豆建立起了基于 TaqMan 探针的 qPCR 检测方法<sup>[13]</sup>,但其方法中 MON87701 转化体特异性片段和内源

*Lectin* 基因需要单独检测。目前为止还未见将 MON87701 转化体特异性片段和内源 *Lectin* 基因放在同一体系内检测的荧光定量方法的报道。本研究以 MON87701 转化体和 *Lectin* 基因为目标,设计特异性引物和不同荧光标记的 TaqMan 探针,优化反应条件后同时建立了 MON87701 转化体和 *Lectin* 基因的双重 qPCR 和双重 3D-dPCR 检测方法;并且比较了两种方法的优缺点,为 MON87701 转基因大豆的定量检测提供了多种解决方案,也可为其它转基因产品的定量检测提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究共使用了包括 MON87701 大豆在内的 44 种转基因材料,具体信息见表 1。

表 1 转基因材料来源  
Table 1 The sources of GMO materials

序号 Serial number	转化事件 Event	货号 Code	物种 Species	来源 Source
1	MON88017	0406-D	玉米	AOCS
2	5307	0411-C	玉米	AOCS
3	5307	0411-D	玉米	AOCS
4	MIR604	0607-A2	玉米	AOCS
5	MON87460	0709-A	玉米	AOCS
6	MON89034	0906-E	玉米	AOCS
7	MIR162	1208-A	玉米	AOCS
8	Mon87403	0216-A	玉米	AOCS
9	Mon87411	0215-B	玉米	AOCS
10	Bt11	ERM-BF412b	玉米	IRRM
11	MON863	ERM-BF416c	玉米	IRRM
12	3272	ERM-BF420b	玉米	IRRM
13	98140	ERM-BF427d	玉米	IRRM
14	DAS-40278	ERM-BF433d	玉米	IRRM
15	VCO-01981-5	ERM-BF438b	玉米	IRRM
16	DP-004114-3	ERM-BF439b	玉米	IRRM
17	MON87705	0210-A	大豆	AOCS
18	MON87708	0311-A	大豆	AOCS
19	MON87769	0809-B	大豆	AOCS
20	MON89788	0906-B	大豆	AOCS
21	CV127	0911-C	大豆	AOCS
22	FG72	0610-A2	大豆	AOCS
23	DAS-68416	ERM-BF432d	大豆	IRRM
24	DAS-44406	ERM-BF436b	大豆	IRRM
25	DAS-81419	ERM-BF437b	大豆	IRRM

续表 1

序号 Serial number	转化事件 Event	货号 Code	物种 Species	来源 Source
26	MON88302	1011-A	油菜	AOCS
27	T45	0208-A5	油菜	AOCS
28	MS8	0306-F5	油菜	AOCS
29	RF3	0306-G4	油菜	AOCS
30	Topas 19/2	0711-D3	油菜	AOCS
31	GT73	0304-B	油菜	AOCS
32	73496	ERM-BF434b	油菜	IRRM
33	MON531	0804-C	棉花	AOCS
34	MON15985-7	0804-D	棉花	AOCS
35	MON1445	0804-B	棉花	AOCS
36	MON88913	0906-D	棉花	AOCS
37	LL25	0306-E2	棉花	AOCS
38	GHB614	1108-A5	棉花	AOCS
39	EH92-527-1	0806-D	马铃薯	AOCS
40	AM04-1020	ERM-BF430b	马铃薯	IRRM
41	AV43-6-G7	ERM-BF431b	马铃薯	IRRM
42	PH05-026-0048	ERM-BF435B	马铃薯	IRRM
43	H7-1	1206-B	甜菜	AOCS
44	LL62	0306-I8	水稻	AOCS

AOCS:美国油脂化学家协会;IRMM:欧洲标准物质研究中心。  
AOCS;American Oil Chemists’ Society;IRRM;Institute for Reference Materials and Measurements.

植物 DNA 提取试剂盒 (DNeasy Plant Mini Kit, 德国 Qiagen 公司);qPCR 试剂盒及 PCR 板 (SsoAdvanced Universal Probes Supermix, 美国 Bio-Rad 公司);Easy Dilution 缓冲液 (TAKARA 公司);数字 PCR 芯片套装 (QuantStudio™ 3D Digital PCR 20K Chip Kit v2);3D-dPCR 酶试剂盒 (QuantStudio™ 3D Digital PCR Master Mix v2);引物及探针合成由美国 Thermo Fisher Scientific 公司完成。

1.2 仪器与设备

核酸定量仪 (Nanodrop ND-2000);PCR 仪 (ProFlex);实时荧光 PCR 仪 (ABI 7500);数字 PCR 仪 (QuantStudio™ 3D, 美国 Thermo Fisher Scientific

公司);旋涡混匀仪 (VX-200, 美国 Labnet 公司);金属浴 (H<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PRO, 北京卡尤迪公司);台式离心机 (5424R, 德国 Eppendorf 公司)。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取 基因组 DNA 提取方法参照试剂盒说明书。

1.3.2 引物及探针 转基因大豆 MON87701 特异性引物及探针使用 Oligo 7 软件设计;大豆内标准基因 *Lectin* 引物及探针序列参照 SN/T 1204-2016<sup>[14]</sup>, 其探针的 5’ 荧光标记使用 VIC (2-氯-7-苯基-1,4-2-氯-6-羧基荧光素)。引物和探针具体序列及所使用的荧光标记如表 2 所示。

表 2 引物和探针  
Table 2 Primers and probes

引物和探针 Primer and probe	序列(5’-3’) Sequence(5’-3’)	扩增片段长度 Fragment length/bp	来源 Source
Lectin-F	GCCCTCTACTCCACCCCA	118	SN/T 1204-2016
Lectin-R	GCCCATCTGCAAGCCTTTT		
Lectin-P	VIC-AGCTTCGCCGCTTCCTTCAACTTCAC-BHQ1		
MON87701-5qF	AAGAAAATTGGTGATATGAAGAT	73	本研究
MON87701-5qR	ATCACTGTTTGACACACACTA		
MON87701-5qP	FAM-ACATGCTTAGCATGCCCCAGGCAC-BHQ1		

1.3.3 qPCR 反应体系和程序 总体系 20  $\mu\text{L}$ , 其中 SsoAdvanced Universal Probes Supermix 10  $\mu\text{L}$ , MON87701 转化体特异性序列正向引物 0.6  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、反向引物 0.6  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、探针 0.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 单重体系中不加入 *Lectin* 基因引物和探针, 双重体系中 *Lectin* 基因正反向引物终浓度均为 0.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、探针终浓度 0.2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 模板 DNA 含量按照不同试验要求加入, 使用双蒸水补足至 20  $\mu\text{L}$ 。反应程序为: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 15 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  退火延伸 60 s, 共进行 46 个循环; 在第二阶段的退火延伸 (60  $^{\circ}\text{C}$ ) 时段收集荧光信号。

1.3.4 引物特异性分析 采用 qPCR 方法利用 44 种转基因材料验证 MON87701 引物探针的特异性, 其中 MON87701 转基因大豆含量为 1%, 反应体系和程序按照 1.3.3 中单重体系方法进行, DNA 模板 100 ng。

1.3.5 标准曲线建立 将转基因含量为 100% 的 MON87701 标准物质提取的 DNA 溶液, 用 Easy Dilution 缓冲液依次稀释至 44 200, 8 840, 1 768, 354, 70  $\text{copy}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , 反应体系和程序按照 1.3.3 中双重体系进行, 每个反应中加入 2  $\mu\text{L}$  DNA 溶液, 每个浓度梯度设置 3 次平行。利用公式  $Ct = K \times \lg A + B$  分别建立 MON87701 特异序列和 *Lectin* 的标准曲线方程, 其中  $Ct$  为荧光 PCR 反应中荧光信号超过相应阈值的循环数,  $K$  为曲线斜率,  $A$  为拷贝数值,  $B$  为截距。

1.3.6 双重 3D-dPCR 检测反应体系和程序 3D-dPCR 反应包括 5 个步骤: 体系配制、样品加载及芯片密封、PCR 扩增、芯片读取和芯片分析。反应总体系为 14.5  $\mu\text{L}$ , 各成分浓度为: 1  $\times$  3D Digital PCR Master Mix v2, 正反向引物终浓度各 0.56  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,

探针终浓度 0.28  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。配置好的体系通过上样仪自动加载到芯片各微孔中, 体系加载完成后需使用 Immersion Fluid 覆盖芯片表面并将芯片密封, 然后将芯片放置于平板 PCR 仪上进行扩增。PCR 扩增程序: 96  $^{\circ}\text{C}$ , 预变性 10 min; 98  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  退火 2 min, 共 40 个循环。扩增结束后将芯片置入 Quant Studio™ 3D 中进行读取, 最后使用 Analysis Suite™ Cloud Software 软件进行数据分析。

1.3.7 稳定性、灵敏度和定量限测试 将转基因大豆 MON87701 与非转基因大豆粉末按质量分数配置成 2%、0.9%、0.09% 和 0.02% 的混合样品, 对不同含量的样品分别进行 3 次独立的 DNA 提取。实时荧光 PCR 数据分析采用  $Ct$  值相对标准差相 (Relative Standard Deviation, RSD) 分析方法, 3D-dPCR 数据分析采用有效反应孔的相对标准差分析方法, 测试两种方法的稳定性、灵敏度和定量限, qPCR 结果根据标准曲线公式计算出样品拷贝数; 3D-dPCR 属于绝对定量, 通过泊松分布原理计算样品拷贝数。MON87701 特异序列相对含量 (%) = MON87701 特异序列拷贝数/*Lectin* 基因拷贝数  $\times 100$ 。

1.4 数据分析

数据分析和图表绘制使用 SDS v2.0 和 Excel 2013。

2 结果与分析

2.1 引物特异性分析

qPCR 方法特异性验证结果显示: 除 MON87701 转基因大豆外, 水稻、大豆、玉米、马铃薯、棉花、油菜等 43 种转基因材料均未出现扩增曲线 (图 1), 表明供试引物具有很好的特异性。

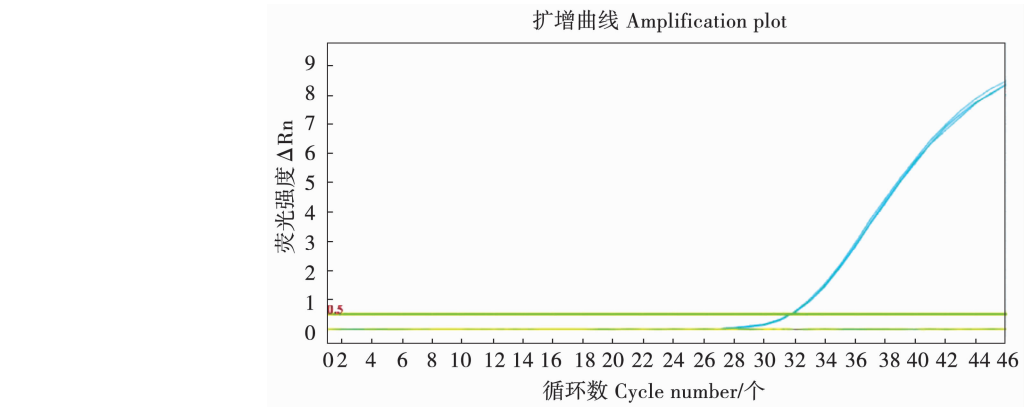


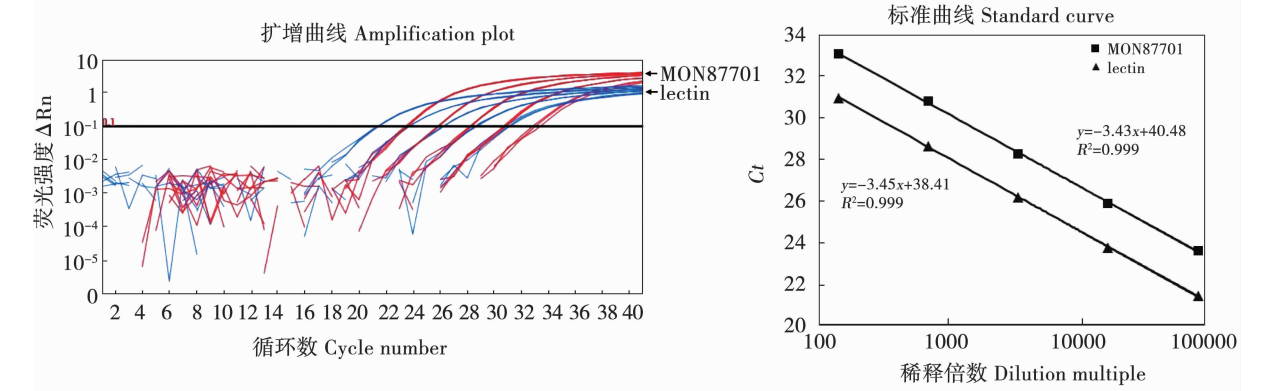
图 1 转基因大豆 MON87701 引物特异性测试

Fig. 1 Specificity tests of transgenic soybean MON87701

2.2 双重 qPCR 检测方法建立

2.2.1 标准曲线 根据 EURL<sup>[15]</sup> 对 qPCR 标准回归曲线的各项参数的详细规定,标准曲线的线性相关系数  $R^2 \geq 0.98$ , 扩增效率  $E$  [Efficiency =  $10^{(-1/\text{slope})} - 1$ ] 的范围为 90% ~ 110%, 斜率 (slope)

范围为 -3.1 ~ -3.6。本研究中的大豆内标准基因 *Lectin* 和 MON87701 转化体特异性 qPCR 的标准曲线方程中的各项参数均在规定范围内 (图 2), 表明该方法适合 MON87701 转基因大豆的定量分析。



A: MON87701 特异序列和 *Lectin* 基因扩增曲线, 扩增曲线从上到下依次为 MON87701 浓度 2%、0.9%、0.09%、0.02% 和 0; B: MON87701 特异序列和 *Lectin* 基因标准曲线及参数。  
A: Amplification plot of MON87701 specific sequence and *Lectin* gene, the amplification curves from top to bottom were 2% , 0.9% , 0.09% , 0.02% and 0 respectively; B: Standard curve of MON87701 specific sequence and *Lectin* gene.

图 2 转基因大豆 MON87701 qPCR 扩增和标准曲线  
Fig. 2 Amplification and regression curves of qPCR for the detection of GM soybean event MON87701

2.2.2 稳定性分析 qPCR 方法的稳定性是影响转基因定量结果的重要指标。对 2%、0.9%、0.09% 和 0.02% 的 4 种不同转基因含量的混合样品进行实时荧光 PCR 试验, Ct 值 SD 范围均为 0.01

~ 0.52, RSD 范围为 0.05% ~ 1.36% (表 3), 符合 EURL 规定的 ≤ 25% 的阈值范围, 说明试验的稳定性较好。

表 3 转基因大豆 MON87701 双重 qPCR 检测效果  
Table 3 Effect of duplexq PCR for detection of GM soybean event MON87701

样品含量 Sample content/%	目标序列 Target sequence	Ct			SD	RSD/%
		1	2	3		
2	MON87701 特异序列	31.58	31.54	31.61	0.02	0.08
	<i>Lectin</i>	23.65	23.72	23.84	0.07	0.29
0.9	MON87701 特异序列	32.82	32.75	32.73	0.03	0.10
	<i>Lectin</i>	24.15	24.03	24.21	0.06	0.27
0.09	MON87701 特异序列	36.95	36.47	35.96	0.35	0.96
	<i>Lectin</i>	24.42	24.45	24.45	0.01	0.05
0.02	MON87701 特异序列	38.33	38.59	37.21	0.52	1.36
	<i>Lectin</i>	23.84	23.88	23.89	0.02	0.08

2.2.3 灵敏度和定量限测试 经测试 4 个浓度 MON87701 标准样品的相对含量测量值分别为 2.20%、1.29%、0.14% 和 0.03%, RSD 分别为 3.82%、4.99%、23.86% 和 38.27% (表 4)。含量为 0.02% 的样品均能被检出, 说明该方法的灵敏度较好, 检出限可达到 0.02%, 但其 3 次重复的相对标准差 RSD 高于 25% 的阈值范围, 说明在这个相对含量下的定量结果精密度较差, 而 0.09% 以上含量的

定量结果精密度小于 25%, 因此该方法的定量下限可达到 0.09%。

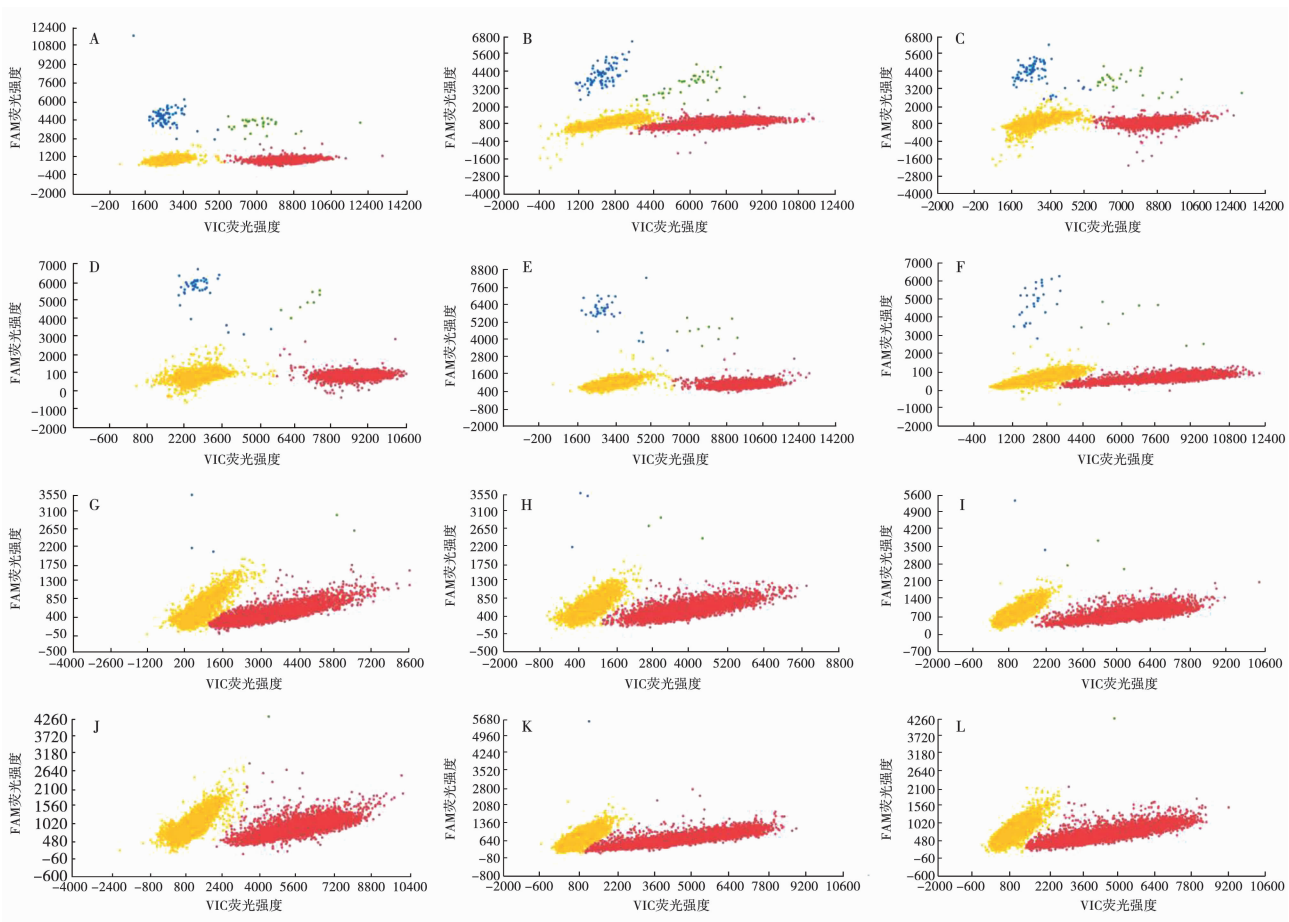
2.3 双重 3D-dPCR 检测方法建立

2.3.1 稳定性分析 使用 3D-dPCR 对质量分数不同的 MON87701 混合样品进行独立 DNA 提取, 3D-dPCR 荧光信号检测结果表明: 该反应体系可以对本底、*Lectin* 基因和 MON87701 特异序列的荧光扩增信号做出有效的区分 (图 3)。

表 4 双重 qPCR 定量检测转基因大豆 MON87701 结果

Table 4 Quantitative results of duplex qPCR for detection of GM soybean event MON87701

样品含量 Sample content/%	目标序列 Target sequence	拷贝数浓度 Copy number concentration /( copies · μL <sup>-1</sup> )			测试含量 Text content/%				RSD/%
		1	2	3	1	2	3	平均值 Average	
2	MON87701 特异序列	393	404	385	2. 07	2. 23	2. 31	2. 20	3. 82
	<i>Lectin</i>	18978	18112	16718					
0. 9	MON87701 特异序列	171	179	182	1. 26	1. 22	1. 39	1. 29	4. 99
	<i>Lectin</i>	13594	14727	13060					
0. 09	MON87701 特异序列	11	15	21	0. 09	0. 13	0. 19	0. 14	23. 86
	<i>Lectin</i>	11352	11127	11127					
0. 02	MON87701 特异序列	4	4	9	0. 03	0. 02	0. 06	0. 03	38. 27
	<i>Lectin</i>	16718	16278	16169					



A ~ C: 2% MON87701; D ~ F: 0. 9% MON87701; G ~ I: 0. 09% MON87701; J ~ L: 0. 02% MON87701; 黄色: 本底信号; 红色: *Lectin* 基因扩增信号; 蓝色: MON87701 扩增信号; 绿色: *Lectin* + MON87701 扩增信号。

A ~ C: 2% MON87701; D ~ F: 0. 9% MON87701; G ~ I: 0. 09% MON87701; J ~ L: 0. 02% MON87701; Yellow: Background signal; Red: Amplified signal of *Lectin* gene; Blue: Amplified signal of MON87701 specific sequence; Green: Amplified signal of *Lectin* + MON87701.

图 3 转基因大豆 MON87701 3D-dPCR 荧光信号图

Fig. 3 Fluorescence signal map of 3D-dPCR for detection of GM soybean event MON87701

由于 3D-dPCR 是依据发生有效反应的孔数来计算最终结果,因此能检测到的荧光反应孔数是该方法的关键量值,根据泊松分布原理一般认为其最低有效反应数应大于10 000<sup>[11]</sup>,表 5 是数字 PCR 试验中有效反应孔数的稳定性分析,可以看出全部有效反应孔数均为15 000 个以上,RSD 为 1. 52% ~ 5. 07%,均小于 25%,符合转基因定量检测相关规定,说明本研究中建立起的双重 3D-dPCR 试验体系



具有良好的稳定性。

2.3.2 灵敏度和定量限测试

对2%、0.9%、0.09%和0.02%不同含量样品的分析结果如表6所示:最终测试结果分别为2.13%、0.97%、0.11%和0.03%,*RSD*为3.28%、4.82%、12.17和28.76%,除0.02%样品的*RSD*大于25%外,其余3个浓度的测试精密度良好,说明该方法的检出限达到0.02%,定量限达到0.09%。

表5 转基因大豆 MON87701 双重 3D-dPCR 检测的有效孔数分析

Table 5 Analysis of accepted reactions of duplex 3D-dPCR for detection of GM soybean event MON87701

MON87701 含量	目标序列 Target Sequence	有效反应数			SD	RSD/%
Content of MON87701		No. of accepted reactions				
/%		1	2	3		
2	MON87701 特异序列	16545	16718	17532	372. 68	2. 20
	Lectin	16545	16718	17532		
0. 9	MON87701 特异序列	17718	17640	16516	475. 59	2. 75
	Lectin	17718	17640	16516		
0. 09	MON87701 特异序列	15652	16859	18072	855. 60	5. 07
	Lectin	15652	16859	18072		
0. 02	MON87701 特异序列	16393	16689	17109	254. 41	1. 52
	Lectin	16393	16689	17109		

表6 转基因大豆 MON87701 特异序列 3D-dPCR 定量检测结果

Table 6 Quantitative results of 3D-dPCR for detection of GM soybean event MON87701 specific sequence

样品含量 Sample content/%	目标序列 Target sequence	拷贝数浓度 Copy number concentration /(copies·μL <sup>-1</sup> )			测试含量 Test content/%				RSD/%
		1	2	3	1	2	3	平均值 Mean	
2	MON87701	101.35	98.73	90.80	2.25	2.17	2.05	2.16	3.28
	Lectin	4501.88	4559.81	4424.67					
0.9	MON87701	43.12	40.52	41.71	1.04	0.96	0.91	0.97	4.82
	Lectin	4126.30	4235.36	4560.81					
0.09	MON87701	5.42	6.71	4.73	0.10	0.12	0.09	0.11	12.17
	Lectin	5217.11	5386.84	5354.05					
0.02	MON87701	1.91	1.79	0.77	0.04	0.04	0.02	0.03	28.76
	Lectin	4633.19	4483.95	4413.72					

3 讨论

十几年来对于转基因产品定量的主流解决方案一直是 qPCR 方法,然而近年随着市场竞争加剧及试剂成本的下降,3D-d PCR 正在得到大规模的普及,目前针对大豆、水稻、玉米等作物特定转基因品系的 3D-d PCR 定量方法已陆续研发成功<sup>[16-19]</sup>,刘津等<sup>[20]</sup>建立的转基因大豆 MON89788 双重 3D-d PCR 检测方法的定量限为 0.1%,检出限为 0.01%,但针对 MON87701 转化体特异性的双重数字 PCR 定量方法还未见报道。本研究中首先设计了 MON87701 转基因大豆转化体特异性的引物和探针,并用 44 种不同种类的转基因材料验证了其具有较高的特异性,随后建立起针对转基因大豆 MON87701 转化体特异性的双重 qPCR 和双重 3D-dPCR 定量检测方法,两种的方法检出限均到达 0.09%,检出限达到 0.02%。

本研究中双重 qPCR 和双重 3D-dPCR 定量检

测方法的检出限和定量限并无明显差别,这可能与两种方法均基于荧光 PCR 反应有关,虽然荧光 PCR 原则上能够检出 1 个拷贝的目标片段,但反应体系中拷贝数在 10 以下的时候结果通常重复性较差,其精确性无法得到有效保证,这也是 PCR 试验在核酸定量检测中所具有的局限性。另一方面,3D-dPCR 相比 qPCR 具有着一定的优势:其一,不需要使用标准物质建立标准曲线,可使实验过程变得更加简单和高效;其二,由于反应体系中的 DNA 和抑制物被随机分散,使 PCR 反应过程不易受到 DNA 提取质量和抑制物的影响,由此使 3D-dPCR 对 DNA 样本的质量要求更低,使其更加适合检测背景复杂、含量较低的产品<sup>[21]</sup>。

本研究建立的转基因大豆 MON87701 转化体特异性双重 3D-dPCR 检测体系特异性高、稳定性好,检出限和定量限均可以满足转基因产品成分定量检测的要求,该方法的建立为中国转基因监管工作提供了有力的技术支撑,同时也为未来中国转基因

产品标识阈值管理增添了新的技术储备。

4 结 论

本研究建立了基于双重 qPCR 和双重 3D-dPCR 的转基因大豆 MON87701 定量检测方法,并比较了两者的优缺点,结果显示双重 3D-dPCR 和 qPCR 相比虽然定量限和检出限并无本质区别,但前者对样本质量要求更低且无需标准物质,因此更加高效,是未来转基因检测的更优选择。

参考文献

[1] 国际农业生物技术应用服务组织. 2017 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势[J]. 中国生物工程杂志, 2018, 38(6): 1-8. (International Agricultural Biotechnology Application Service Organization. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2017[J]. China Biotechnology, 2018, 38(6): 1-8.)

[2] 徐琳杰, 刘培磊, 熊鹏, 等. 国际上主要国家和地区农业转基因产品的标识制度[J]. 生物安全学报, 2014, 23(3): 301-304. (Xu L J, Liu P L, Xiong L, et al. International labeling policies for genetically modified agricultural products[J]. Journal of Biosafety, 2014, 23(3): 301-304.)

[3] 王颖潜, 陈锐, 李夏莹, 等. 转基因产品成分检测技术研究进展[J]. 生物技术通报, 2018, 34(3): 1-6. (Wang H Q, Chen R, Li X Y, et al. Research progress on the testing technologies for composition in genetically modified products[J]. Biotechnology Bulletin, 2018, 34(3): 1-6.)

[4] Cankar K, Stebih D, Dreo T, et al. Critical points of DNA quantification by real-time PCR-effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms[J]. BMC Biotechnology, 2006, 6(1): 37.

[5] Dörries H H, Remus I, Grönwald A, et al. Development of a qualitative, multiplex real-time PCR kit for screening of genetically modified organisms (GMOs) [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010, 396(6): 2043-2054.

[6] 杜智欣, 焦悦, 张亮亮, 等. 转基因成分定量检测技术研究进展[J]. 食品工业科技, 2017, 38(10): 379-384. (Du Z X, Jiao Y, Zhang L L, et al. Development of quantitative detection techniques of genetically modified organisms [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(10): 379-384.)

[7] Hindson B J, Ness K D, Masquelier D A, et al. Highthrough put droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number[J]. Analytical Chemistry, 2011, 83(22): 8604-8610.

[8] Pinheiro L B, Coleman V A, Hindson C M, et al. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification[J]. Analytical Chemistry, 2011, 84(2): 1003-1011.

[9] 王青, 刘宝瑞. 液滴数字 PCR 在肿瘤个体化治疗方面的应用[J]. 现代肿瘤医学, 2015, 23(12): 1771-1774. (Wang Q, Liu B R. Application of droplet digital PCR in personalized cancer therapy [J]. Journal of Modern Oncology, 2015, 23(12): 1771-1774.)

[10] 陈爱亮, 吴英, 蒋小玲, 等. 一种利用数字 PCR 检测食品中大肠菌群数量的方法[P]. 中国, CN201310613503. 1. 2014-03-26. (Chen I L, Wu Y, Jiang X L, et al. A method of detecting coliform in food by digital PCR [P]. China, CN201310613503. 1. 2014-03-26.)

[11] 胡佳莹, 姜羽, 杨立桃, 等. 利用 QuantStudio™ 3D 分析转基因玉米 MON863 含量[J]. 农业生物技术学报, 2016, 24(8): 1216-1224. (Hu J Y, Jiang Y, Yang L T, et al. Quantification of genetically modified maize (*Zea mays*) MON863 by QuantStudio™ 3D digital PCR [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2016, 24(8): 1216-1224.)

[12] 付海滨, 闫超杰, 李姝, 等. 转基因抗虫大豆 MON87701 品系实时荧光 PCR 检测方法的建立[J]. 辽宁农业科学, 2016(4): 23-26. (Fu H B, Yan C J, Li S, et al. Establishment of event specific real-time PCR method for detection of genetically modified soybean [J]. Liaoning Agricultural Sciences, 2016(4): 23-26.)

[13] Mazzara M, Delobel C, Pinski G, et al. Event-specific method for the quantification of soybean MON87701 using real-time PCR [R]. European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed, 2012.

[14] SN/T 1204-2016. 植物及其加工产品中转基因成分实时荧光 PCR 定性检验方法[S]. (SN/T 1204-2016. Protocol of the real-time PCR method for detecting genetically modified plants and their derived products[S].)

[15] European Network of GMO Laboratories (ENGL). Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing [R]. European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed, 2015.

[16] 于晓帆, 高宏伟, 孙敏, 等. 荧光 PCR 和数字 PCR 法检测转基因 DAS-44406-6 品系大豆[J]. 食品科学, 2016, 16(37): 235-241. (Yu X F, Gao H W, Sun M, et al. Detection of genetically modified soybean event DAS-44406-6 by real-time PCR method and digital PCR [J]. Food Science, 2016, 16(37): 235-241.)

[17] 任怡菲, 高琴, 邓婷婷, 等. 基于数字 PCR 的转基因水稻 LL62 品系精准定量检测方法建立[J]. 生物技术通报, 2016, 32(8): 69-76. (Ren Y F, Gao Q, Deng T T, et al. Establishment of precisely quantitative method of genetically modified rice LL62 based on digital PCR [J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(8): 69-76.)

[18] 张佳玲, 潘广, 章桂明, 等. 微滴式数字 PCR 定量检测转基因玉米品系 VCO-01981-5 [J]. 食品科学, 2017, 12(38): 246-252. (Zhang J L, Pan G, Zhang G M, et al. Quantitative detection of transgenic maize event VCO-01981-5 with droplet digital PCR [J]. Food Science, 2017, 12(38): 246-252.)

[19] 缪青梅, 汪小福, 陈笑芸, 等. 基于双重微滴数字 PCR 精准定量转基因水稻 G6H1 的方法研究[J]. 农业生物技术学报, 2019, 27(1): 159-169. (Miao Q M, Wang X F, Chen X Y, et al. Studies on accurate quantification of genetically modified rice (*Oryza sativa*) G6H1 based on duplex droplet digital PCR [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2019, 27(1): 159-169.)

[20] 刘津, 李婷, 洗钰茜, 等. 转基因大豆 MON89788 双重数字 PCR 通用定量检测方法的建立[J]. 食品科学, 2018, 4(39): 312-319. (Liu J, Li T, Xian Y Y, et al. An universal quantitative detection method for genetically modified soybean event MON89788 using duplex digital PCR [J]. Food Science, 2018, 4(39): 312-319.)

[21] 刘晓, 朱鹏宇, 王垚, 等. 数字 PCR 在功能核酸精准检测中的研究进展[J]. 生物技术通报, 2018, 34(9): 149-162. (Liu X, Zhu P Y, Wang Y. Development progress of digital PCR in the precise detection of functional nucleic acid [J]. Biotechnology Bulletin, 2018, 34(9): 149-162.)