



大豆中转基因成分微滴式数字 PCR 检测方法研究

刘 炜,杨 芳,李丽华,王英姿,陈信全

(江门海关 技术中心,广东 江门 529000)

摘 要:为了探讨转基因大豆品系及其衍生产品鉴定的高效技术手段,本研究建立了转基因大豆的微滴式数字 PCR (ddPCR)筛选检测方法。利用 3 种方法提取大豆基因组 DNA,分析提取方法和保存时间对微 ddPCR 检测拷贝数的影响。同时,应用特异性引物,以 4 种转基因大豆筛选靶标元件为扩增靶标,对微滴式数字 PCR 检测方法进行体系优化、灵敏度测试和准确度验证。结果表明:使用 Promega 植物基因组 DNA 提取试剂盒,提取的 DNA 对转基因作物的外源拷贝数进行鉴定的结果更为准确可靠。与荧光定量筛选方法相比,ddPCR 方法更加灵敏和准确。检测体系的最适探针浓度为 $100\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$,最佳退火温度为 $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。以 4 种靶标元件 *CaMV35S* 启动子、*T-NOS* 终止子、*pat* 基因和 *T-E9* 终止子开展 ddPCR 检测,检测灵敏度较高,准确性较好。转基因大豆含量为 1% 时对 *CaMV35S* 和 *T-NOS* 靶标参数的绝对检测限为 2 个拷贝,*pat* 为 5 个拷贝,*T-E9* 为 10 个拷贝。本研究建立的 ddPCR 检测方法可用于大豆转化体的定量检测。

关键词:转基因大豆;检测方法;数字 PCR;分子检测

Detection of Transgenic Components in Transgenic Soybean by Droplet Digital PCR

LIU Wei, YANG Fang, LI Li-hua, WANG Ying-zi, CHEN Xin-quan

(Technology Center of Jiangmen Customs, Jiangmen 529000, China)

Abstract: In order to explore the efficient technical means of identification in transgenic soybean and their derivatives, a droplet digital PCR (ddPCR) screening method was established in this study. We used soybean genomic DNA extracted by three methods to study the effects of extraction quality and preservation time on the copy number identification results of ddPCR. And we carried out the system optimization, sensitivity test and accuracy verification of the ddPCR method by applying four target elements of transgenic soybean as amplification targets. The results showed that it is more accurate and reliable to identify the foreign copy number of transgenic crops by using the DNA extracted from Promega plant genome DNA extraction kit. Compared with fluorescence quantitative screening, ddPCR was more sensitive and accurate. The optimum concentration of probe was $100\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ and the optimum annealing temperature was $58\text{ }^{\circ}\text{C}$. Four target elements, *CaMV35S* promoter, *T-NOS* terminator, *pat* gene and *T-E9* terminator, were detected by ddPCR with high sensitivity and accuracy. The absolute limit of detection (LOD) for *CaMV35S* and *T-NOS* target parameters was two copies, five copies for *pat* and ten copies for *T-E9* when the content of transgenic soybean was 1%. The ddPCR method established in this study can be used for quantitative detection of soybean transformants.

Keywords: genetically modified soybean; detection method; digital PCR; molecular identification

转基因大豆是最早实现商业化的农作物,也是全球种植面积最大的转基因作物,在美国、巴西、阿根廷等国家得到广泛的推广和应用。根据 ISAAA 数据显示,2019 年全球转基因大豆种植面积已达 $9\,190\text{ 万 hm}^2$,占转基因作物种植面积的 $48\%\text{ }^{[1]}$ 。全球已有 60 多个国家和地区发布了转基因产品标识管理制度,对含有转基因成分的产品实施标识管理^[2]。我国是转基因大豆的主要进口国之一,截止目前,我国已有 17 个转基因大豆品系批准进口用作加工原料,近几年随着国际形势的不断变化,大宗农产品进出口贸易,尤其是进口转基因大豆具有了“经贸关系风向标”的意义。快速准确地检出目前中国未批准的转基因大豆品系,不仅对于保障进

口贸易安全具有重要意义,同时有利于我国在进出口贸易中占据主动权^[3]。

目前,转基因作物检测主要基于核酸和蛋白质开展鉴定和分析^[4]。基于核酸的转基因检测方法除传统 PCR 检测技术之外,等温扩增技术 (LAMP)、基因芯片技术 (Gene chip)、数字 PCR 技术 (Digital PCR) 和生物传感器 (Biosensor) 等新型检测技术也不断被研发和应用^[5]。数字 PCR 技术是基于单分子靶标基因的 PCR 扩增反应,反应液被分配到大量独立反应单元中进而发生单拷贝核酸独立荧光 PCR 扩增,根据泊松分布原理计算出初始样品中靶标核酸的精确拷贝数。由于数字 PCR 反应无需依赖梯度浓度标准物质绘制标准曲线即可对目标核

酸进行准确的拷贝数定量,避免了实时荧光定量 PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, qPCR) 技术在实际应用中的各种局限。应用数字 PCR 技术开展转基因成分精准检测已成为热点研究领域^[6]。应用数字 PCR 进行转基因作物检测的研究目前已有报道。国内外研究者研究开发了多种转基因玉米^[4,7]、大豆^[3,8-9]、水稻^[10]等作物转化体特异性数字 PCR 检测方法。芯片式和微滴式是目前主要的数字 PCR 类型,两种类型的数字 PCR 的定量原理一致,都是利用有限的分散与稀释,使每个独立的反应体系(如微孔或微滴)中尽可能只含有一个拷贝的目标分子^[10]。*p35S* 和 *tNOS*、*pat* 和 *T-E9* 是转基因大豆的 4 个主要检测靶标基因,适用于对未知大豆样品的筛查,可覆盖 80% 以上商业化转基因大豆品系。因此,基于这 4 个主要检测靶标基因建立高效检测方法可有效降低转化体特异性鉴定范围,是一种成本效益高的检测手段。本研究建立了基于这 4 种靶标基因的大豆微滴式数字 PCR(droplet digital PCR, ddPCR) 检测方法,以期利用数字 PCR 技术精准检测转基因大豆成分,保证转基因大豆进出口安全奠定方法基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 大豆样品 供试转基因大豆为公开大豆转化体 356043、FG72、A2704-12、MON87705、40-3-2、SYHTOH2、DBN09004-6 和 W62,均为本实验室收集保存。供试非转基因大豆购自本地超市。

混合大豆样品(各转基因大豆质量分数均为 1%,以非转基因大豆填充)为本实验室按照标准方法混合制备。

1.1.2 主要试剂 2 × ddPCR supermix for probes (Biorad,美国),10 × Hitaq qPCR master mix (TakaRa,日本)。

1.1.3 主要仪器与设备 BioSpec-nano 紫外分光光度计(岛津)、台式冷冻离心机(Sigma,德国)、罗氏 480 实时荧光定量 PCR 仪(Roche,瑞士)、QX200 微滴式数字 PCR 平台(Biorad,美国)。

1.2 试验设计

1.2.1 DNA 提取方法和保存时间对 ddPCR 拷贝数影响分析 分别以 CTAB 方法、天根和 Promega 植物 DNA 提取试剂盒提取非转基因大豆样品 DNA。分别将 3 种提取方法获得的 DNA 样品稀释至 4 个不同浓度,以大豆内参基因 *Lectin1* 为靶标进行 qPCR 和 ddPCR 扩增分析,将 qPCR 扩增的 Ct 值标准曲线与稀释度进行相关性分析。DNA 质量评价

标准参考欧盟对实时荧光定量检测方法中模板 DNA 质量评价要求^[11]。对不同方法提取的 DNA 样本、不同保存时间(当天、提取后 150 d、提取后 300 d,均于 4 ℃ 保存)的 DNA 样品进行 ddPCR。以浓度为 5 ng·μL⁻¹ 的大豆 DNA 为模板,采用 ddPCR 方法扩增内参基因 *Lectin1*,每次 3 个重复。计算 3 次 ddPCR 的平均拷贝数和相对标准方差,分析不同 DNA 提取方法和不同保存时间对 ddPCR 拷贝数鉴定结果的影响。

1.2.2 ddPCR 扩增体系优化 以转基因大豆基因组 DNA 为模板,以 *CaMV35* 启动子、*T-NOS* 终止子、*pat* 基因和 *T-E9* 终止子为靶标,优化大豆转基因成分检测的 ddPCR 反应体系。反应体系中正、反向引物终浓度均为 500 nmol·L⁻¹,探针浓度分别为 500, 200, 100 和 50 nmol·L⁻¹,通过分析扩增信号的分布和强弱确定扩增反应体系中最适探针浓度和退火温度。将退火温度设定为 8 个梯度(52, 54, 56, 58, 60, 62, 64 和 66 ℃),选择阳性微滴和阴性微滴分辨率最好、中等信号强度雨滴最少的退火温度,即为本方法的最佳退火温度。

1.2.3 ddPCR 检测体系特异性分析 利用优化的 ddPCR 方法体系,对 7 个转基因大豆(2704-12、FG72、SYHTOH2、DBN09004-6、MON87705、40-3-2 及 356043)的靶标元件进行检测,各转基因大豆添加量为 1%,验证 ddPCR 方法体系的特异性。

1.2.4 ddPCR 检测极限确定 将 W63 和 MON87705 转基因大豆的基因组 DNA 分别稀释至 50, 20, 10, 5 和 1 拷贝,对转基因检测序列进行 ddPCR 扩增,12 次重复,以阳性结果的符合率分析本方法的精确性,并将 100% 准确性的片段拷贝数确定为本方法的检测限(Limit of Detection, LOD)。

1.2.5 ddPCR 准确度分析 分别将含有 4 种靶标元件的转基因大豆 356043、FG72、2704-12 和 MON87705 品系粉末按每种 1% 比例混合,其他成分为非转基因大豆粉末,制备 9 组混合样品(AI),样本充分混匀。采用 Promega 试剂盒提取混合转基因大豆样品 DNA,检验 DNA 质量后,对各样品进行 ddPCR 检测,以靶标元件检测结果的准确性确定本方法的准确度。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取和纯化 将大豆籽粒用研磨仪进行粉碎,并各部分试验设计要求制备单个转化体或多个转化体混合样品,充分混匀。分别采用 CTAB 法^[12]和两种植物 DNA 提取试剂盒方法(Promega, Genomic DNA Purification Kit, A1120,美国;天根植物基因组提取试剂盒,国产)提取样品基因组 DNA,

采用 BioSpec-nano 紫外分光光度计测定 DNA 质量和浓度,用 1 × TE 缓冲液将纯化的 DNA 溶液稀释至 10.0 mg·L⁻¹。

1.3.2 引物和探针 引物和探针由广州睿博兴科生物科技有限公司合成,用 1 × TE 缓冲液稀释至10 μmol·L⁻¹工作液。具体信息详见表 1。

表 1 转基因大豆筛选特异性扩增引物和探针
Table 1 The screening primers and probes in realtime and digital PCR

靶标基因 Target gene	引物/探针 Primer/Probe	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	扩增产物 Amplification production/bp	参考文献 Reference
CaMV35S	P35S-qF	ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT	101	[13]
	P35S-qR	CCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCT		
	P35S-qP	FAM-CCCCTACTCCTTCGCAAGACCCTTCCT-BHQ1		
T-NOS	TNOS-qF	GTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTG	151	[13]
	TNOS-qR	CGCTATATTTTGTCTTCTATCGCGT		
	TNOS-qP	FAM-AGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA-BHQ1		
pat	pat-qF	GTCGACATGTCTCCGGAGAG	191	[14]
	pat-qR	GCAACCAACCAAGGCTATC		
	pat-qP	FAM-TGGCCGCGGTTTGTGATATCGTTAA-BHQ1		
T-E9	Te9-qF	TCTTGTACCATTGTGTGCTTGT	108	[14]
	Te9-qR	GGACCATATCATTCATTAACCTCTTCTCC		
	Te9-qP	FAM-CGGTTTTTCGCTATCGAACTGTGAAATGAAATGG-BHQ1		
LectinI	Le1-F	GCCCTCTACTCCACCCCCA	118	[15]
	Le1-R	GCCCCTCTGCAAGCCTTTTT		
	Le1-P	HEX-AGCTTCGCGCTTCCTTCAACTTCAC-BHQ1		

1.3.3 qPCR 方法 使用罗氏 480 实时荧光定量 PCR 仪(Roche,瑞士)进行 qPCR 扩增。反应体系: 10 × Hitaq qPCR master mix 10.0 μL,上下游引物(10 μmol·L⁻¹)各 1.0 μL,探针(10 μmol·L⁻¹)0.4 μL, DNA 模板(5.0 mg·L⁻¹)2.0 μL,超纯水补齐至 20.0 μL。反应程序:95 ℃ 5 min;95 ℃ 15 s,60 ℃ 60 s,40 个循环。60 ℃ 阶段采集荧光信号,4 次平行。

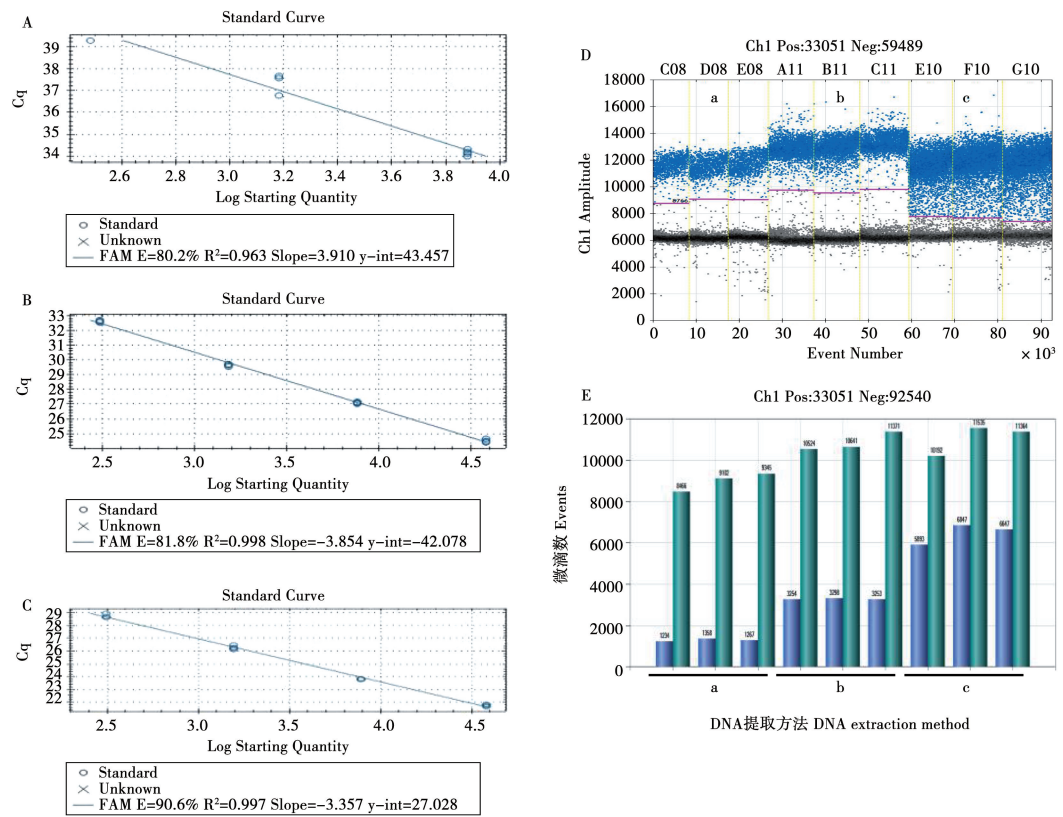
1.3.4 ddPCR 方法 使用 QX200(Bio-Rad,美国)平台进行 ddPCR 扩增。反应体系: 2 × ddPCR supermix for probes 10 μL,上下游引物(10 μmol·L⁻¹)各 0.8 μL,探 针(10 μmol·L⁻¹)0.2 μL, DNA 模板 1 μL,超纯水补齐至 20.0 μL。将配制好的 20 μL 反应液和 70 μL 微滴生成油分别加入微滴生成卡的对应位置,盖上一次性胶垫,放入微滴生成仪(Bio-Rad,美国)中生成微滴,将 20 μL 微滴转移至 96 孔板中,盖上专用铝膜后放进预热至 180 ℃的 PX1 热封仪(Bio-Rad,美国)中封膜 5 s,取出。将封膜的 96 孔板置入C1000 普通 PCR 仪中进行扩增。反应程序:95 ℃ 10 min;94 ℃ 30 s,58 ℃ 1 min,98 ℃ 10 min, 40 个循环,升降温速度为 2 ℃·s⁻¹;4 ℃ 保存,降温速度为 1 ℃·s⁻¹。反应结束后,将 96 孔板平缓放入微滴读取仪(QX200 droplet reader)中收集微滴信号。

1.4 数据分析
采用 LightCycler 480SW 1.5.1 软件分析 qPCR 结果;采用 QuantaSoft Version 软件分析 ddPCR 结果。

2 结果与分析

2.1 DNA 质量对 ddPCR 鉴定结果的影响
以大豆内参基因 *LectinI* 为靶标,分别以不同稀释度 DNA 为模板进行 qPCR 扩增,Ct 值标准曲线与 DNA 浓度的相关性分析结果如图 1A ~ C 所示, Promega 试剂盒法相关性最优、CTAB 法次之、天根试剂盒法相关性较低。参考欧盟对定量检测方法模板 DNA 质量评价中的要求^[11],Promega 试剂盒提取的 DNA 可以达到实时荧光 PCR 定量检测的质量要求。

以大豆内参基因 *LectinI* 为靶标,分别以 3 种提取方法的 DNA(5.0 mg·L⁻¹)为模板进行 ddPCR 的检测结果如图 1D ~ E 所示,ddPCR 检测反应均获得了较好的扩增结果,但 DNA 模板质量对 ddPCR 反应 *Lectin* 拷贝数有较大影响。DNA 模板质量越高则检测到的 *Lectin* 拷贝数越高。推测 DNA 质量对于检测灵敏度也有一定影响,建议在低含量转基因成分检测中应对模板 DNA 进行必要的纯化,并进行有效的质量分析,以保证转基因含量判定的准确性。



注:A. 以天根试剂盒提取的 DNA 为模板;B. 以 CTAB 法提取的 DNA 为模板;C. 以 Promega 试剂盒提取的 DNA 为模板;D. 3 种方法提取的 DNA 样品的 ddPCR 扩增结果;E. ddPCR 扩增体系中阳性微滴(蓝色柱)和总微滴数(绿色柱)。a. 以天根试剂盒提取的 DNA 为模板;b. 以 CTAB 法提取的 DNA 为模板;c. 以 Promega 试剂盒提取的 DNA 为模板。

Note:A. Use DNA extracted with the Tiangen kit as the template; B. Use DNA extracted by the CTAB method as the template; C. Use DNA extracted with the Promega kit as the template; D. ddPCR amplification results with DNA samples as template extracted by the three methods; E. Positive droplets(blue columns) and total droplet number(green columns) in the ddPCR amplification system. a. Use DNA extracted with the Tiangen kit as the template; b. Use DNA extracted by the CTAB method as the template; c. Use DNA extracted with the Promega kit as the template.

图 1 不同方法提取 DNA 的 ddPCR 鉴定结果分析

Fig. 1 Analysis of PCR identification results with DNA extracted by different methods

2.2 DNA 保存时间对 ddPCR 绝对定量的影响

以不同保存时间的 DNA 样品为模板进行 ddPCR 检测的 *Lectin* 拷贝数如表 2 所示,以 Program 试剂盒提取的 DNA 为模板的 ddPCR 扩增结果的 *Lectin* 拷贝数显著高于其他两种提取方法提取 DNA 的扩增结果。同一种方法中,以保存 300 d 的 DNA

为模板扩增的 *Lectin* 拷贝数不低于新提取 DNA 的扩增结果,RSD 分析表明 Promega 试剂盒提取 DNA 的 3 次测定的精确性最高。因此天根和 Promega 植物基因组提取试剂盒提取的 DNA 随着保存时间的延长,对 ddPCR 方法的绝对定量不会产生影响。

表 2 不同方法提取的 DNA 保存不同时间后 ddPCR 的 *Lectin* 拷贝数分析

Table 2 The <i>Lectin</i> copy number of ddPCR for DNA extracted by different methods and stored by different days					
提取方法 Extraction method	<i>Lectin</i> 拷贝数 <i>Lectin</i> copy number/(个·μL ⁻¹)			平均值 Mean	相对标准偏差 RSD/%
	1 d	150 d	300 d		
CTAB	215	227	270	237	12.18
天根试剂盒 Tiangen kit	298	313	310	298	2.59
Promega 试剂盒 Promega kit	427	430	421	426	1.07

2.3 ddPCR 扩增体系优化

如图 2A 所示,随着探针浓度降低,扩增的阳性信号强度降低,但阳性微滴与阴性微滴界限区分明显,因此,从信号区分度和探针成本两方面考虑,最适探针浓度为 100 nmol·L⁻¹。如图 2B 所示,退火温

度导致 ddPCR 荧光信号值与阴性微滴区分度的差异,退火温度过高或过低都会导致阳性信号雨滴现象或无法自动检测阳性阈值,因此 58 ℃ 为本研究中 ddPCR 扩增反应的最佳退火温度。

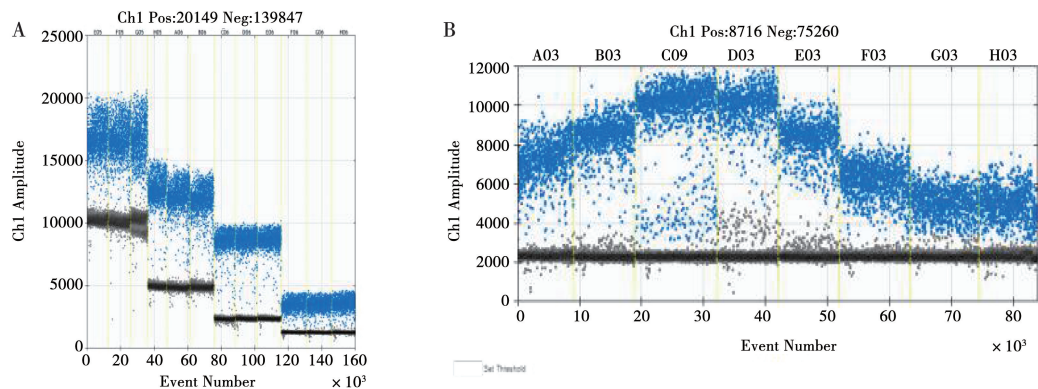


图2 以 *CaMV35* 启动子为 ddPCR 靶标元件时探针浓度 (A) 和退火温度 (B) 的优化

Fig.2 The optimization concentration (A) of probe and annealing temperature (B) of digital PCR when using the *CaMV35* promoter as the ddPCR target element

进一步研究表明,以 *T-NOS* 终止子、*pat* 基因和 *T-E9* 终止子为靶标元件的 ddPCR 体系的最佳探针浓度为 200 nmol·L⁻¹,最适退火温度为 58 ℃ (图略)。并以此优化条件进行后续的体系扩增和验证试验。

2.4 ddPCR 检测的特异性分析

使用 1% 转基因大豆的样品检测优化 ddPCR 方法体系特异性的结果表明,7 个转基因大豆 (2704-12、FG72、SYHTOH2、DBN09004-6、MON87705、40-3-2 及 356043) 的靶标元件的检测结果均准确 (图 3),说明该 ddPCR 方法特异性较好。

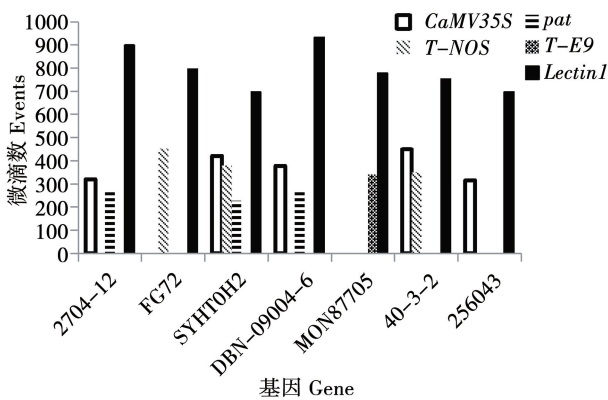


图3 优化 ddPCR 方法特异性分析

Fig.3 The analysis on specificity of optimized ddPCR method

2.5 ddPCR 检测极限确定

如表 3 所示, *CaMV35S* 和 *T-NOS* 靶标 12 次重复的阳性率均为 100% 时的拷贝数可低至 2 个; *pat* 基因 12 次重复阳性率为 100% 时的拷贝数为 5 个; *T-E9* 终止子的 12 次重复阳性率为 100% 时的拷贝数为 10 个。因此,本方法对 *CaMV35S* 和 *T-NOS* 靶标参数的绝对检测限 (LOD) 为 2 个拷贝, *pat* 为 5 个

拷贝, *T-E9* 为 10 个拷贝。

通过对多次重复定量数据的 RSD 值进行分析的结果表明,以 *CaMV35S* 进行绝对拷贝数的判定,定量极限 (LOQ) 可达到 5 个拷贝。

表3 转基因大豆中筛选靶标的绝对检测极限 (LOD) 测定

Table 3 The LOD test of transgenic soybean ingredient

样品 Sample	靶标 Target	拷贝数 Copy number	阳性比率 Positive ratio	阳性符合率 Expected proportion/%
W63	CaMV35S	10	12/12	100
		5	12/12	100
		2	12/12	100
		1	2/12	16.7
	T-NOS	10	12/12	100
		5	12/12	100
		2	6/12	50.0
		1	2/12	16.7
	pat	10	12/12	100
		5	12/12	100
		2	8/12	66.7
		1	2/12	16.7
MON 87705	T-E9	10	12/12	100
		5	8/12	66.7
		2	6/12	50.0
		1	0/12	0.0

2.6 数字 PCR 方法的准确度分析

如表 4 所示,混合样品的 ddPCR 检测结果与转基因大豆所含筛选元件信息完全一致。ddPCR 检测极限和准确度分析结果说明,与荧光定量筛选方法相比,ddPCR 方法更加灵敏和准确。

表 4 混合样品的检测鉴定准确性分析

Table 4 The analysis on accuracy of the detection method for mixtures of different soybean samples

样品组 Sample group	转基因大豆 Genetically modified soybean	靶标 Target				符合性 Fitness
		<i>CaMV35S</i>	<i>T-NOS</i>	<i>pat</i>	<i>T-E9</i>	
A	356043/FG72	+	+			√
B	FG72/A2704-12		+	+		√
C	A2704-12/MON87705			+	+	√
D	356043/MON87705	+			+	
E	356043/FG72/A2704-12	+	+	+		√
F	FG72/A2704-12/MON87705		+	+	+	√
G	356043/A2704-12/MON87705	+		+	+	√
H	356043/FG72/MON87705	+	+		+	√
I	356043/FG72/A2704-12/MON87705	+	+	+	+	√

3 讨论

ddPCR 技术通过生成的微滴数判定模板中的靶标分子拷贝数。反应中,微滴生成是 PCR 反应的关键步骤,一般来说,微滴生成数为 8 000 以上时才能满足定量检测要求,同时生成的微滴数越多,定量结果也越准确^[16]。本研究的 ddPCR 特异性试验中样品微滴生成总数均大于 8 000,且阳性与阴性微滴能够明显区分,满足数字 PCR 的微滴分析要求。

有研究表明,数字 PCR 反应质量,与用于扩增的 DNA 模板质量^[17]、是否进行酶切、引物序列和引物浓度及退火温度有关^[18]。本研究采用两种提取试剂盒法和 CTAB 提取法共 3 种 DNA 提取方式,将未酶切的大豆 DNA 混合物在 4 ℃ 条件下保存较长时间后,天根和 Promega 植物基因组提取试剂盒提取的 DNA 虽然 DNA 发生降解或者变性,但对 ddPCR 方法的绝对定量不会产生影响。且 Bio-Rad 数字 PCR 使用手册推荐使用限制性内切酶对 DNA 进行剪切后再进行数字 PCR。二者的原因可能均是 DNA 的降解或剪切降低了样品粘度,提高了模板的可及性,从而从某种程度上提高检测性能。该研究结果证实了 DNA 提取方法对 ddPCR 体系的检测效果具有影响,为转基因定量检测的 DNA 提取质量控制提供了技术参考。

本研究选取 *CaMV35S* 启动子、*T-NOS* 终止子、*pat* 基因和 *T-E9* 终止子 4 个转基因大豆靶标元件,通过优化引物、探针浓度以及退火温度条件,建立了转基因大豆鉴定通用 ddPCR 检测方法。本方法灵敏度高,特异性强,最低检测限达到 2 个拷贝,灵敏度高于荧光定量检测方法。使用 7 种转基因大豆

转化体进行验证的结果表明,所有转化体均可准确检测,因此本方法可实现对低含量掺杂大豆样品的筛查检测。因此,本研究建立的 ddPCR 检测方法可作为大豆转化体定量检测方法的重要补充,为转基因大豆进出口监管^[19]提供可靠保障。

目前,数字 PCR 用于大豆转基因成分筛选时仍存在检测成本较高,检测通量有待进一步提高等不足,但随着相关技术的不断发展和改进,数字 PCR 技术的普及及成本降低,数字 PCR 技术在转基因检测领域的应用前景将更加广泛。

4 结论

本研究中以 Promega 植物基因组提取试剂盒提取的 DNA 样品质量更好,作为大豆检测模板进行数字 PCR 拷贝数鉴定的结果更稳定可靠。本研究建立的转基因大豆 ddPCR 检测体系的最适探针浓度为 100 nmol·L⁻¹,最佳退火温度为 58 ℃。以 *CaMV35S* 启动子、*T-NOS* 终止子、*pat* 基因、*T-E9* 终止子 4 种转基因元件为检测靶标的 ddPCR 检测体系适合对转基因大豆品系进行鉴定,且灵敏度高、准确性好。本研究结果可为改进转基因大豆的定量检测方法提供技术参考。

参考文献

[1] 国际农业生物技术应用服务组织. 2019 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, 2021, 41 (1): 114-119. (International Agriculture Biotechnology Application Service Organization. 2019 global biotechnology/GM commercialization development trend[J]. Chinese Journal of Bioengineering, 2021, 41 (1): 114-119.)

[2] 斯能武, 李俊, 武玉花, 等. 数字 PCR 在转基因定量检测中的研究进展[J]. 中国油料作物学报, 2021, 43 (1): 40-50.

(SI N W, LI J, WU Y H, et al. Research progress of digital PCR in quantitative detection of genetically modified organism [J]. Chinese Journal of Oil Crops, 2021, 43(1): 40-50.)

[3] 刘晓, 朱鹏宇, 景小艳, 等. 双重数字 PCR 在转基因大豆检测中的应用[J]. 生物技术进展, 2020, 10(1): 60-66. (LIU X, ZHU P Y, JING X Y, et al. Application of duplex droplet digital PCR for detection of genetically modified soybean [J]. Advances in Biotechnology, 2020, 10(1): 60-66.)

[4] 梁文, 杨镇州, 李妍, 等. 转基因玉米 MON89034、MON810、MIR162 双重数字 PCR 定量方法的建立[J]. 中国测试, 2019, 45(6): 70-76. (LIANG W, YANG Z Z, LI Y, et al. A quantitative method for genetically modified maize event MON89034, MON810, MIR162 using duplex digital PCR [J]. The Chinese Test, 2019, 45(6): 70-76.)

[5] 潘广, 章桂明, 刘新娇, 等. 我国转基因成分检测标准现状及分析[J]. 植物检疫, 2020, 34(6): 5-7. (PAN G, ZHANG G M, LIU X J, et al. The current status and analysis of detection standards for genetically modified ingredients in China [J]. Plant Quarantine, 2020, 34(6): 5-7.)

[6] DEMEKE T, DOBNIK D. Critical assessment of digital PCR for the detection and quantification of genetically modified organisms [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2018, 410(17): 4039-4050.

[7] 张秀杰, 李俊, 王颢潜, 等. 转基因玉米 MON87427/*zSSIb* 二重微滴数字 PCR 方法建立及应用[J]. 中国油料作物学报, 2021, 43(1): 90-98. (ZHANG X J, LI J, WANG H Q, et al. Development and application of MON87427/*zSSIb* duplex droplet digital PCR method [J]. Chinese Journal of Oil Crops, 2021, 43(1): 90-98.)

[8] 李夏莹, 肖晓琳, 单露英, 等. 转基因大豆 MON87751 基体标准物质的定值[J]. 植物检疫, 2020, 34(6): 67-71. (LI X Y, XIAO X L, SHANG L, et al. Characterization fixed value of genetically modified MON87751 soybean matrix reference material [J]. Plant Quarantine, 2020, 34(6): 67-71.)

[9] KOSIR A B, SPILSBERG B, HOLST-JENSEN A, et al. Development and inter-laboratory assessment of droplet digital PCR assays for multiplex quantification of 15 genetically modified soybean lines [J]. Science Report, 2017, 7(1): 8601.

[10] 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. (LIAO Q M, WANG X F, CHEN X Y, et al. Study on accurate quantitative method of transgenic rice G6H1 based on duplex droplet digital PCR [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2019, 27(1): 159-169.)

[11] European Network of GMO Laboratories. Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing [S]. European Commission, 2019. [2015-10-20].

[12] GRYSON N, MESSENS K, DEWETTINCK K. Evaluation and optimisation of five different extraction methods for soy DNA in chocolate and biscuits. Extraction of DNA as a first step in GMO analysis [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2004, 84(11): 1357-1363.

[13] HOLST-JENSEN A, RONNING S B, LOVSETH A, et al. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs) [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2003, 375(8): 985-993.

[14] DEBODE F, JANSSEN E, BERBEN G. Development of 10 new screening PCR assays for GMO detection targeting promoters (*pFMV*, *pNOS*, *pSSuAra*, *pTA29*, *pUbi*, *pRice actin*) and terminators (*t35S*, *tE9*, *tOCS*, *tg7*) [J]. European Food Research and Technology, 2013, 236(4): 659-669.

[15] KURIBARA H, SHINDO Y, MATSUOKA T, et al. Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and soybean [J]. Food Composition and Additives, 2002, 85(5): 1077-1089.

[16] COTTENET G, BLANCPAIN C, CHUAH P F. Performance assessment of digital PCR for the quantification of GM-maize and GM-soya events [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2019, 411(11): 2461-2469.

[17] 安娜, 柳方方, 董美, 等. 基于 PCR 技术的 DNA 分析测试关键要素[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(2): 624-629. (AN N, LIU F F, DONG M, et al. Key elements of DNA analysis based on PCR technology [J]. Genomics and Applied Biology, 2019, 38(2): 624-629.)

[18] FU W, ZHU P, WANG C, et al. A highly sensitive and specific method for the screening detection of genetically modified organisms based on digital PCR without pretreatment [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 12715.

[19] 史宗勇, 刘璇, 许冬梅, 等. 基于多靶标质粒分子的转基因大豆快速筛查方案(英文) [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2021, 37(11): 1540-1554. (SHI Z Y, LIU X, XU D M, et al. A rapid protocol for screening genetically modified soybean based on positive plasmid molecule containing multiple targets [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2021, 37(11): 1540-1554.