

转基因大豆 BPS-CV127-9 PCR 定量检测研究

李 宁^{1,2}, 赵 蕾³, 孙红炜¹, 李 凡¹, 杨淑珂¹, 路兴波¹

(1. 山东省农业科学院 植物保护研究所/山东省植物病毒学重点实验室, 山东 济南 250100; 2. 济宁医学院 公共卫生学院, 山东 济宁 272067; 3. 山东师范大学 生命科学学院, 山东 济南 250014)

摘要:采用 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 技术, 建立转基因大豆 BPS-CV127-9 的定量检测方法。通过设计特异引物, 扩增内标准基因 *lectin* 和 BPS-CV127-9 的 5'侧翼序列, 建立 2 种基因的拷贝数-CT 标准曲线, 根据标准曲线方程计算样品中的转基因含量, 并且通过熔解曲线分析扩增反应特异性。结果表明, *lectin* 基因和侧翼序列标准曲线线性关系良好, R^2 值分别为 0.999 和 0.998, 变异系数 (CV) 1.50% ~ 18.51%、标准偏差 (SD) 0.02 ~ 0.07。检测 4 个已知 BPS-CV127-9 含量 (1%、0.5%、0.1%、0.05%) 的转基因混合样品, 实测值与实际值接近。该检测方法具有快速、灵敏、准确、特异、高通量等优点, 可以作为转基因大豆 BPS-CV127-9 的定量检测方法。

关键词:品系特异性; 实时荧光定量 PCR; 转基因大豆

中图分类号: S816.35

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2012)05-0808-05

Quantitative Detection of Genetically Modified Soybean BPS-CV127-9

LI Ning^{1,2}, ZHAO Lei³, SUN Hong-wei¹, LI Fan¹, YANG Shu-ke¹, LU Xing-bo¹

(1. Institute of Plant Protection, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, Shandong; 2. School of Public Health, Jining Medical University, Jining 272067, Shandong; 3. College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, Shandong, China)

Abstract: A quantitative method to detect the transgenic soybean BPS-CV-127-9 by using real-time PCR technique based on fluorescence dye SYBR Green I was investigated in this study. The endogenous *lectin* gene and the 5' flanking sequences of BPS-CV-127-9 were amplified through the specific primers, and the transgenic content was then calculated according to the standard curve equation. Meanwhile the specificity of PCR amplification was analyzed by corresponding melting curves. The results showed that the standard curves of *lectin* and the 5' flanking sequences of BPS-CV-127-9 genes have good linear relationship, and their R^2 values were 0.999 and 0.998, respectively. The coefficient of variance was 1.50%-18.51% and standard deviation was 0.02-0.07. Four mixed samples with genetically modified contents of BPS-CV-127-9 was 0.05%, 0.1%, 0.5% and 1% respectively were detected, and the detection results agreed well with actual value. In conclusion, this method was fast, sensitive, simple, accurate, specific and of high throughput, and could be used to detect transgenic soybean BPS-CV-127-9 quantificationally.

Key words: Event-special; Real-time PCR; Genetically modified soybean

近些年来,转基因技术日趋成熟,许多转基因作物已在一些国家种植和消费。自转基因作物投入商业化种植 16 年来,全球转基因作物种植面积累计已经超过 10 亿公顷。2011 年,全球 29 个国家的 1 540 万农民种植了共 1.6 亿公顷的转基因作物。1996 至 2011 年,全球转基因作物的种植面积增加了 94 倍^[1]。为了维护消费者的知情权和选择权,很多国家都对转基因产品进行标识规定。欧盟 (EC) 1829/2003 号条例规定食品中含有超过 0.9% 的转基因成分时,必须在标签上做出标示;根据我国 2001 年发布了《农业转基因生物标识管理办法》的规定,凡是在中国境内销售的大豆及其制品若属转基因生物,必须进行标识^[2-4]。进行有效的定量检测是转基因标识管理的关键。在转基因含量分析中应用最多的就是实时定量 PCR 技术。

转基因大豆 BPS-CV127-9 (以下简称 CV127) 是巴斯夫植物科学公司通过基因枪转化法将目的基因转入大豆商业品种 Conquista 种子的胚轴组织中经过筛选获得。转基因大豆 CV127 中含有拟南芥 *csr1-2* 基因表达盒, *csr1-2* 基因来自拟南芥突变株, 由于基因突变使得乙酰羟氨酸合成酶大亚基第 653 位置的氨基酸由丝氨酸突变为天冬氨酸, 转基因大豆 CV127 表达了改变的 At AHASL 蛋白 (乙酰羟氨酸合成酶)。由于含有 *csr1-2* 基因植物对咪唑啉酮不敏感, 可以完成植物支链氨基酸的合成, 因此转基因大豆 CV127 具有抗咪唑啉酮类除草剂的功能^[5]。对 CV127 的分子生物学分析表明, 只有单一拷贝的 *csr1-2* 基因表达盒被整合到 CV127 的基因组中的单一一位点上; 各种表达元素完好无损; 无任何细菌质粒骨架序列插入 CV127 基因组。

收稿日期: 2012-05-13

基金项目: 国家转基因重大专项 (2008ZX08012-001)。

第一作者简介: 李宁 (1986-), 男, 硕士, 助教, 研究方向食品质量与安全。E-mail: lining-001@126.com。

通讯作者: 路兴波 (1970-), 男, 博士, 研究员, 研究方向转基因检测。E-mail: luxb99@sina.com。

本研究根据 CV127 插入位点的 5'端侧翼序列,设计转化体特异性定量引物。通过实时定量 PCR 制作内标基因和 5'端侧翼序列标准曲线,以此为基础检测大豆混合样品中 CV127 成分的含量。本研究旨在探讨使用一种低成本的 SYBR Green I 染料定量 PCR 方法^[6],来确定大豆中转基因 CV127 成分的含量。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

100% 转基因大豆 CV127 由巴斯夫公司提供; CV127 转基因成分含量分别为 1%、0.5%、0.1%、0.05% (W/W) 的混合大豆样品由农业部提供。

SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Perfect Real Time) 购自大连宝生物工程有限公司;复杂植物基因组提取试剂盒购自北京康为世纪生物技术有限公司;引物由上海博尚生物技术公司合成。

选用 ABI StepOne 定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);紫外分光光度计、台式冷冻离心机(美国 Beckman 公司);BIO-RAD PCR 扩增仪(美国伯乐公司);GDS800 凝胶成像系统(美国 UVP 公司);生物安全柜(新加坡 ESCO 公司)。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 称取 100 mg 研磨后

表 1 实时荧光定量 PCR 扩增所用引物和探针

Table 1 Primer pairs used in real time quantitative PCR

名称 Name	引物 / 探针序列 Primer/Probe sequence(5' - 3')	扩增片段长度 Fragment size/bp
内标基因 <i>lectin</i>	Forward:GCCCTCTACTCCACCCCATCC Reverse:GCCCATCTGCAAGCCTTTTGTG	118
CV127 转化体特异性序列	Reverse:GCCCTCCTTATTTATCCCTTAGT	
CV127 event specific sequence	Forward:AGGCTTCAGCAGGTTCTGT	147

1.2.4 转基因含量的计算方法 大豆内标准 *lectin* 基因标准曲线用来定量大豆基因组拷贝数,CV127 5'端侧翼序列标准曲线用来定量转基因成分的拷贝数,二者的比值为样品中转基因成分的含量^[8]。转基因成分含量计算公式为:

转基因大豆 CV127 含量(%) = 外源基因拷贝数/内标基因拷贝数 × 100%

1.3 数据分析

使用 ABI StepOne 定量 PCR 仪数据分析软件 StepOne Software v2.1 对实验数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取结果

电泳检测及紫外分光光度计测定结果表明,提取的 DNA 完整性良好,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 接近 1.8,样品

的样品,按照试剂盒说明书提取基因组 DNA。电泳及紫外分光光度计法检测 DNA 溶液浓度及纯度。

1.2.2 标准曲线制作 CV127 5'端侧翼序列标准曲线:将提取的 100% 阳性转基因大豆 CV127 DNA 以超纯水按照 10 倍稀释至 10%、1%、0.1%、0.01%,进行 PCR 反应。大豆 *lectin* 内标准基因按照上述方法将 100% 阳性转基因大豆 CV127 DNA 5 倍稀释至 20%、4%、0.8%、0.16%。每个浓度做 2 个平行,分别做 *lectin* 基因和侧翼序列的定量 PCR。反应结束后仪器自动生成以拷贝数的自然对数值为横坐标,以 Ct 值(荧光值达到指定阈值时的循环次数)为纵坐标的标准曲线图。同时对含有转基因成分 1%、0.5%、0.1%、和 0.05% 的大豆混合物进行定量检测。每次反应设计空白对照^[7]。

1.2.3 定量 PCR 反应条件 反应体系(20 μL)含 2 × SYBR[®] Premix Ex Taq 10 μL,forward primer(10 μmol·L⁻¹)1 μL,reverse primer(10 μmol·L⁻¹)1 μL,50 × ROX Reference Dye 0.4 μL,DNA 模板 1 μL,ddH₂O 6.6 μL。PCR 引物详见表 1。

扩增反应条件为 95℃ 预变性 30 s;95℃ 变性 5 s,60℃ 退火/延伸 30 s,共计 40 个循环。循环结束后进行溶解曲线分析,溶解曲线的温度从 60℃ 升至 95℃,每升高 0.5℃ 收集一次荧光信号。

DNA 的浓度为 60 ~ 80 ng·μL⁻¹,符合定量 PCR 检测要求。

2.2 标准曲线的建立

2.2.1 内标准基因 *lectin* 的定量标准曲线 不同稀释浓度的转基因大豆 CV127 内标准基因 *lectin* 的扩增曲线如图 1 所示。平均 Ct 值的变幅为 23.00 ~ 26.96,标准偏差为 0.01 ~ 0.03,变异系数为 0.13% ~ 0.99%。图 2 为转基因大豆 CV127 内标准基因 *lectin* 标准曲线。该标准曲线的回归方程为: $y = -3.230x + 35.394$,线性相关系数 $R^2 = 0.999$ 。扩增效率为 103.98%。

2.2.2 CV127 5'端侧翼序列标准曲线 不同稀释浓度的转基因大豆 CV127 5'端侧翼序列的扩增曲线见图 3。平均 Ct 值的变幅为 2.26 ~ 35.36,标准偏差为 0.08 ~ 0.13,变异系数为 0.38% ~ 0.46%。图 4 为 CV127 5'端侧翼序列标准曲线。该标准曲

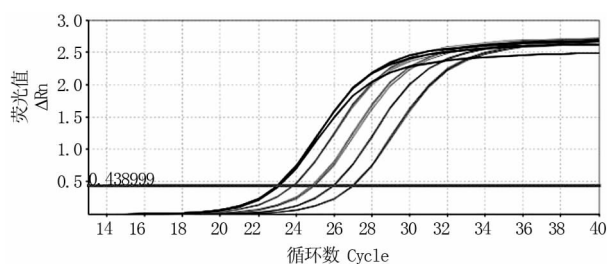


图1 大豆内标准 *lectin* 基因扩增曲线
Fig.1 Amplification curve of *lectin* gene

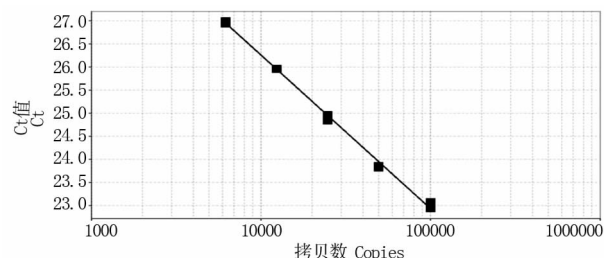


图2 *lectin* 基因标准曲线
Fig.2 Quantitative standard curve of *lectin* gene

线的回归方程为: $y = -3.330x + 39.582$, 线性相关系数为 $R^2 = 0.998$, 扩增效率为 99.648%。

2.3 溶解曲线分析

由于 SYBR Green I 染料能与任何 DNA 双链发生结合, 产生荧光, 特异性不强, 反应结束后需要进行溶解曲线分析判断反应特异性。扩增反应结束后, 逐渐加热升高反应温度, 产物解链, 荧光强度减弱。每升高 0.5℃ 收集荧光, 用 ΔRn (荧光信号改变) 的负的一次导数与温度作图, 在扩增产物的解

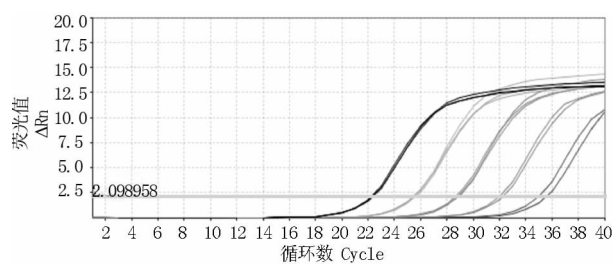


图3 CV127 特异性序列扩增曲线
Fig.3 Amplification curve of CV127 specific sequence

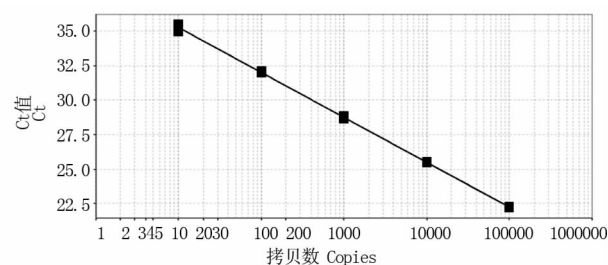


图4 CV127 特异性序列标准曲线
Fig.4 Quantitative standard curve of CV127 specific sequence

链温度上便会产生单一峰, 单一峰对应的温度即 DNA 片段的 T_m 值。非特异扩增 (如引物二聚体) 的熔解温度较特异性结合低, 不产生特异性的峰值, 从而将特异性信号与非特异性信号分别开来。由图 5、6 可以看出 *lectin* 基因和 CV127 侧翼序列产物产生单一的峰, T_m 值分别为 84.86℃、76.81℃, 2 对引物特异性良好, 满足检测要求。

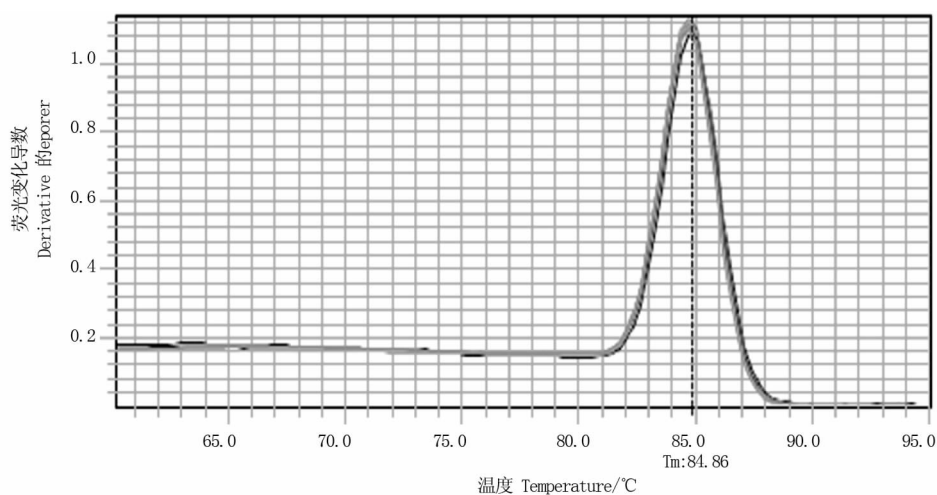


图5 *lectin* 基因溶解曲线
Fig.5 Melting curve of *lectin* gene

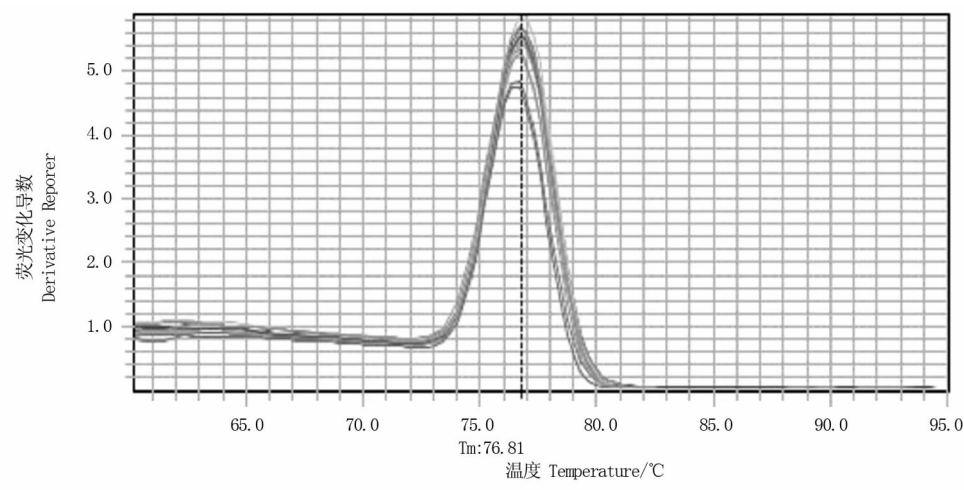


图6 CV127 特异性序列溶解曲线

Fig.6 Melting curve of CV127 specific sequence

2.4 混合样品中转基因大豆 CV127 含量测定

实验检测了 4 个已知不同转基因含量 (0.05%、0.1%、0.5%、1%) 的大豆混合样品中 CV127 的含量。根据建立的标准曲线,计算混合样

品中转基因大豆的含量。由表 1 可见,本实验建立起的 CV127 的 SYBR Green 荧光实时定量 PCR 检测体系能有效的检测转基大豆 CV127 最低含量为 0.05% 的样品。

表 1 定量检测混合样品中 CV127 含量的结果

Table1 Quantitative detection results of the content of CV127 in mixed samples

样品 Samples /%	<i>lectin</i>		CV127		转基因含量 GMO content /%	均值 Mean/%	标准偏差 SD	变异系数 CV/%
	Ct 值 Ct	相对拷贝数 Relatively copies	Ct 值 Ct	相对拷贝数 Relatively copies				
1.0	23.82	54167.45	29.51	575.49	1.06	1.08	0.02	1.50
	23.89	51622.51	29.11	563.58	1.09			
	23.86	52537.90	29.50	578.14	1.10			
0.5	24.05	46242.33	31.12	181.97	0.39	0.47	0.07	11.60
	24.19	41847.62	30.35	214.50	0.51			
	24.16	42682.51	30.88	215.89	0.51			
0.1	23.63	61440.85	32.03	84.91	0.14	0.13	0.01	6.55
	23.55	65007.50	32.11	79.62	0.12			
	23.57	64373.49	32.32	76.73	0.12			
0.05	23.70	58923.05	35.09	27.15	0.05	0.05	0.01	18.51
	23.68	58089.36	35.16	33.80	0.06			
	23.49	59667.52	35.23	20.75	0.04			

3 讨 论

本实验中 *lectin* 基因和 CV127 5'侧翼序列扩增效率分别为 103.98% 和 99.648%,接近 100%,并且二者的扩增效率差异小于 5%。实验结果显示转基因大豆混合样品的测定值和真实值较为接近,变异系数在 1.50% ~ 18.51%,满足了转基因定量检测的要求,可以用于转基因大豆 CV127 的定量检测^[9]。

SYBR Green 实时荧光定量 PCR 方法因通用性好而被广泛的使用在基因检测中。由于 SYBR Green I 染料可以和所有的双链 DNA 结合,包括引物二聚体、单链二级结构、非特异的扩增等,从而影响定量反应的准确性,因此引物的特异性直接影响反应成功与否,同时需要通过溶解曲线的分析确定反应产物是否单一。本实验通过转基因大豆 CV127 5'侧翼序列,设计特异性的引物,并通过 NCBI 对引物特异性进行比对,结合溶解曲线的分析,

引物可以特异性的扩增 CV127 5'侧翼序列^[10]。

目前转基因定量检测标准中普遍采用的是 TaqMan 探针法,相对于 SYBR Green 染料法,添加了一条荧光标记的探针,特异性强,不需要进行溶解曲线分析,反应时间缩短。但探针成本高,专一于对应的基因序列。使用 SYBR Green 染料法通用性好,成本相对较低。本实验中通过提取 100% 转基因大豆 CV127 DNA 梯度稀释制作标准曲线,简便快捷,可以很好的检测出转基因大豆 CV127 含量为 0.05% 的大豆混合样品。

参考文献

- [1] James C. 2011 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,2012,32(1):1-14. (James C. Global status of commercialized biotech/GM crops;2011[J]. China Biotechnology,2012,32(1):1-14.)
- [2] European Commission Regulation(EC) No. 258/97 of the European Parliament and of the council of 27 January,1997 Concerning Novel Foods and Novel Food Ingredients[S].
- [3] European Commission Regulation (EC) No. 1829/2003,1830/2003[S]. Official Journal of the European Communities,2003, L268:1-28.
- [4] 农业部第 10 号令. 农业转基因生物标识管理办法:附件[S]. 2001. (China Ministry of Agriculture Decree No. 10. Administration of Agricultural Genetically Modified Organisms identified; Accessories[S]. 2001.)
- [5] 王秀君,郎志宏,单安山,等. 氨基酸生物合成抑制剂类除草剂作用机理及耐除草剂转基因植物研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2008(2):110-116. (Wang X J, Lang Z H, Shan A S, et al. Advances in mechanism of herbicide in inhibiting amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant transgenic plants[J]. China Biotechnology,2008(2):110-116.)
- [6] Hernández M, Teresa E, Salomé P, et al. Development of real-time PCR systems based on SYBR[®] Green I, Amplifluor[™] and TaqMan[®] technologies for specific quantitative detection of the transgenic maize event GA21[J]. Journal of Cereal Science,2004,39(1):99-107.
- [7] 朱元招,尹靖东,李德发,等. 抗草甘膦转基因大豆 PCR 定量检测研究[J]. 中国农业大学学报,2005(3):25-29. (Zhu Y Z, Yin J D, Li D F, et al. Quantitative PCR method for detecting glyphosate-tolerant gene transfer in soybeans[J]. Journal of China Agricultural University,2005(3):25-29.)
- [8] Liu J, Guo J C, Zhang H B, et al. Development and in-house validation of the event-specific polymerase chain reaction detection methods for genetically modified soybean MON89788 based on the cloned integration flanking sequence[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2009,57(22):10524-10530.
- [9] Takabatake R, Akiyama H, Sakata K, et al. Development and evaluation of event-specific quantitative PCR method for genetically modified soybean A2704-12[J]. Journal of the Food Hygienic Society of Japan,2011,52(2):100-107.
- [10] Andersen C B, Holst-Jensen A, Knut G B, et al. Equal performance of taqMan, MGB, molecular beacon, and SYBR green-based detection assays in detection and quantification of Roundup Ready Soybean[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2006,54(26):9658-9663.

欢迎订阅 2013 年《黑龙江农业科学》

《黑龙江农业科学》是黑龙江省农业科学院主办的综合性科技期刊。是全国优秀期刊、黑龙江省优秀期刊。现已被中国核心期刊(遴选)数据库、中国学术期刊综合评价数据库等多家权威数据库收录。

本刊内容丰富,栏目新颖,信息全面,可读性强。月刊,每月 10 日出版,国内外公开发行。国内邮发代号 14-61,每期定价 5.00 元,全年 60.00 元;国外发行代号 M8321,每期定价 8.00 美元,全年 96.00 美元。

热忱欢迎广大农业科研工作者、农业院校师生、国营农场及农业技术推广人员、管理干部和广大农民群众踊跃订阅。全国各地邮局均可订阅,漏订者可汇款至本刊编辑部补订。汇款写明订购份数、收件人姓名、详细邮寄地址及邮编。

另外,2011 年合订本已出版,还有少量 2007~2010 年合订本珍藏版欢迎订购。2007 年合订本每册定价 80.00 元,2008~2009 年合订本每册定价 90.00 元,2010~2011 年合订本 150.00 元,邮费各 10.00 元,售完为止。

欢迎投稿 欢迎订阅 欢迎刊登广告

地址:哈尔滨市南岗区学府路 368 号《黑龙江农业科学》编辑部 邮编:150086

电话:0451-86668373

信箱:nykx13579@sina.com 网址:www.haasep.cn