

# 转基因大豆 OsDREB3 品系特异性定性 PCR 检测方法的建立

刘营 张明辉 霍楠 仇有文 敖金霞 高学军\*

(1. 东北农业大学 生命科学与生物技术研究中心, 哈尔滨 150036;  
2. 农业部转基因生物产品成分监督检验测试中心(哈尔滨), 哈尔滨 150036)

**摘要** 为建立转基因大豆 OsDREB3 品系特异性定性检测方法, 以转基因大豆 OsDREB3 为研究对象, 通过染色体步行方法, 成功获得转基因大豆 OsDREB3 上 pCAMBIA1301 质粒外源基因插入位点的 5' 端旁侧序列, 其扩增片段覆盖了转化载体及转基因大豆基因组旁侧序列, 扩增片段大小为 344 bp。同时根据旁侧序列设计引物, 建立 OsDREB3 品系特异性定性 PCR 方法, 以典型的转基因作物证明该方法检测转基因大豆 OsDREB3 具有高特异性, 灵敏度为 0.1%。

**关键词** 转基因大豆; OsDREB3; 染色体步行; 品系特异性; PCR 检测

**中图分类号** S 435. 651 **文章编号** 1007-4333(2012)04-0034-06 **文献标志码** A

## Establishment of event specific qualitative PCR for detecting transgenic soybean OsDREB3

LIU Ying, ZHANG Ming-hui, HUO Nan, QIU You-wen, AO Jin-xia, GAO Xue-jun\*

(1. Life Science and Biotechnology Research Center, Northeast Agricultural University, Harbin 150036, China;  
2. Supervision and Test Center (Harbin) for Molecular Characteristics of Genetically Modified Plants of Ministry of Agriculture, Harbin 150036, China)

**Abstract** By chromosome walking PCR technique, the 5' flanking sequences of the exogenous integration in the genome of in the pCAMBIA1301 plasmid of transgenic soybean OsDREB3 were cloned, and sequenced with the specific nested primers based on the border. According to the flanking sequence, the event specific primers were designed to amplify the fragment, which could span the exogenous DNA and carnation genome, and length was 344 bp. The event specific qualitative PCR detection method for transgenic soybean OsDREB3 was established. This assay was applied to detect typical genetically transgenic soybean OsDREB3, with high specificity, and the limit of detection exhibited 0.1%. The results showed that the qualitative PCR assay was accurate, rapid and efficient for detection of transgenic soybean OsDREB3.

**Key words** transgenic soybean; OsDREB3; chromosome walking; event specificity; PCR detection

目前 PCR 技术是转基因产品检测工作中应用最广泛的检测方法, 可分为 4 种检测方式: 基因特异性检测、载体特异性检测、筛选检测和品系特异性检测<sup>[1]</sup>。其中应用最广泛、现广为认可的检测方法为品系特异性检测, 它是检测外源基因在受体基因组的插入位点的唯一性特征<sup>[2]</sup>。品系特异性检测可以准确判断转基因品种是来自哪个转化事件, 因此可

以区分来自相同转化载体的不同转化事件<sup>[3-4]</sup>。品系特异性检测方法可以准确的识别不同的转基因作物品种<sup>[5-6]</sup>。

染色体步行技术是获得品系特异性最行之有效的 PCR 方法。染色体步行是指由基因组文库中的已知序列出发, 逐步探知其旁邻的未知序列或与已知序列呈线性关系的目的序列核苷酸组成的方法和

收稿日期: 2012-02-16

基金项目: 转基因重大专项资助项目(2011ZX08004-002)

第一作者: 刘营, 助理研究员, 博士研究生, 主要从事转基因检测技术研究, E-mail: lyneau@126.com

通讯作者: 高学军, 教授, 主要从事分子生物学与生物技术研究, E-mail: gaouxj5390@sina.com

过程<sup>[7]</sup>。获得旁侧序列是建立品系特异性鉴定方法的关键,因此选对染色体步行方法至关重要。染色体步行方法主要分为4种:接头连接介导染色体步行技术、利用引物错配的染色体步行技术、TAIL-PCR和环状PCR<sup>[7]</sup>。较常用的主要是TAIL-PCR和接头连接介导染色体步行方法<sup>[8-9]</sup>。目前,通过TAIL-PCR方法,李飞武等<sup>[10]</sup>获得了转基因大豆MON89788的3'端旁侧序列,郭娜娜等<sup>[11]</sup>获得了转基因大豆LEC1旁侧序列;通过接头连接介导染色体步行技术,霍楠等<sup>[12]</sup>获得了转基因小麦B73-6-1上pAHC25质粒外源基因插入位点的3'端旁侧序列,瞿勇等<sup>[13]</sup>获得转基因玉米MON88017外源基因插入位点旁侧序列,及Askild等<sup>[14]</sup>获得了转基因玉米MON8105'端旁侧序列信息,并据此建立了相应转基因植物品系特异性检测方法。

随着国际上对粮食作物中转基因成分安全性的广泛关注,国际贸易和各国食品、生物安全等部门对转基因产品实施IP(Identity Preservation)管理,加强了检测监控<sup>[15]</sup>。转基因大豆OsDREB3因其抗逆性状稳定即将进入商品化阶段,而我国有关抗除草剂及抗虫转基因大豆的检测方法成熟并已建立了相应的检测标准<sup>[16-19]</sup>,但有关抗逆基因的转基因大豆检测技术标准尚未建立。为了便于对即将商品化的转基因大豆OsDREB3进行安全监管和检测的需要,本试验根据pCAMBIA1301质粒上OsDREB3基因序列设计引物,利用染色体步行方法获得转基因大豆OsDREB3中pCAMBIA1301质粒的5'端旁侧序列,随后,在旁侧序列相邻的T-DNA(转表达载体)和大豆基因组上各设计一条引物,此对引物就可以对该转基因大豆OsDREB3进行品系特异性检测。本研究旨在由此建立抗逆转基因大豆定性检测体系。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

试验所用的转基因大豆OsDREB3由东北农业大学大豆研究所提供;其他转基因品种由本实验室保存;非转基因大豆购自哈尔滨唯农种子子公司。

### 1.2 试剂与仪器

*rTaq*DNA聚合酶、dNTP、DNA Marker

DL2000、Clontech Genome Walker™ Universal Kit试剂盒、定量PCR所需试剂购自大连宝生物工程有限公司;DNA纯化试剂盒购自Axygen公司。引物合成和测序由北京华大基因有限公司完成。

高速离心机(上海安亭,TDL-40B)、PCR仪(德国Biometra,Biometra Tgradient)、核酸电泳仪(杭州大和热磁,GE-100)、紫外分光光度计(美国BECKMAN,DU® 640)、凝胶成像系统(美国UVP,G8000)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 DNA提取

称取100 mg研磨成粉末状的样品材料,按CTAB法提取样品总DNA<sup>[20]</sup>。提取的总DNA溶于100 μL ddH<sub>2</sub>O中,经核酸蛋白分析仪(DU 640, Beckman coulter)测定其质量浓度,最终稀释成100 ng/μL备用。用紫外分光光度计测定DNA溶液的OD<sub>260</sub>与OD<sub>280</sub>值,并计算OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>的比值来评价所提取DNA的质量,本研究中所用DNA其OD比值均在1.9左右。

#### 1.3.2 染色体步行测定外源基因与大豆基因组旁侧序列

外源基因与大豆基因组旁侧序列测定所用试剂盒为Clontech Genome Walker™ Universal Kit。

1)酶切。取2 μg的基因组DNA分别用100 U的*Pst* I、*Dra* I、*Pvu* I和*Eco*R V限制性内切酶酶切,总容积500 μL于1.5 mL管中37 °C过夜,直至基因组充分酶解;将酶切消化的DNA片段用酚:氯仿(1:1)抽提2次,70%酒精洗1次,沉淀后溶解在20 μL的重蒸水中,电泳检测酶切效果,酶切产物需弥散且均匀分布于构建文库进行染色体步行分析。

2)酶切产物与接头连接。将4 μL酶解DNA片段产物加入200 μL管中,然后加1.9 μL相对应的接头(序列见表1)和1.6 μL 10×连接缓冲液,接着加0.5 μL T4 DNA连接酶,16 °C连接过夜。最后,连接产物放置在70 °C中5 min以终止反应并加入72 μL的重蒸水稀释以形成带接头的基因组酶解DNA片段文库。

#### 1.3.3 染色体步行引物设计

根据试验需要,在pCM1301质粒5'端上游设计了GSP1和GSP2引物,引物相关信息见表2。

表1 染色体步行所用接头

Table 1 Adapters used in the chromosome walking

| 接头    | 引物序列(5'-3')                                      |
|-------|--|
| 长接头引物 | GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTCGACGGCCCGGGCTGGT |
| 短接头引物 | PO <sub>4</sub> -ACCAGCCC-NH <sub>2</sub>        |

表2 染色体步行所用所有引物

Table 2 Primers used in the chromosome walking

| 引物名称     | 引物序列(5'-3')                    |
|----------|--------------------------------|
| 通用引物-AP1 | GTAATACGACTCACTATAGGGC         |
| 通用引物-AP2 | ACTATAGGGCACGCGTGGT            |
| GSP1     | ACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTA |
| GSP2     | CCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTG |

### 1.3.4 染色体步行 PCR 扩增及测序

1) 巢式 PCR 反应条件。修饰接头连接 PCR 分为 2 轮巢式 PCR 反应。为了确保扩增的准确性和扩增长度,采用 Advantage 2 Polymerase Mix 聚合酶。

第 1 轮反应体系为 20  $\mu$ L,含 1 $\times$  Advantage 2 PCR Buffer,0.25 mmol/L dNTP mix,0.2  $\mu$ mol/L AP1 和 GSP1,1 $\times$  Advantage 2 Polymerase Mix,1  $\mu$ L 连接 DNA 产物。反应条件:7 个循环:变性 95  $^{\circ}$ C 25 s,退火 72  $^{\circ}$ C 3 min;32 个循环:变性 94  $^{\circ}$ C 25 s,退火 67  $^{\circ}$ C 3 min;后延伸延伸 67  $^{\circ}$ C 7 min。

第 2 轮反应体系同第一轮反应体系为 20  $\mu$ L,

引物为 AP2 和 GSP2,取稀释 50 倍的第一轮反应产物 1  $\mu$ L 为模板。反应条件:5 个循环:变性 95  $^{\circ}$ C 25 s,退火 72  $^{\circ}$ C 3 min;25 个循环:变性 94  $^{\circ}$ C 25 s,退火 67  $^{\circ}$ C 3 min;后延伸 67  $^{\circ}$ C 7 min。

2) PCR 产物测序。PCR 产物纯化后,送于北京华大基因有限公司测序。

3) 品系特异性定性 PCR 和灵敏度检测。根据 OsDREB3 左侧旁侧序列,设计特异性引物 DREBF/ DREBR,其产物位于 DREB3 的 5'旁侧序列上,其扩增产物大小为 160 bp。同时以大豆内参基因 *lectin* 作为内源基因参照(表 3),建立转基因大豆 OsDREB3 品系特异性定性检测方法。

表3 品系特异性定性 PCR 体系所用引物

Table 3 Primers used in event-specific qualitative PCR system

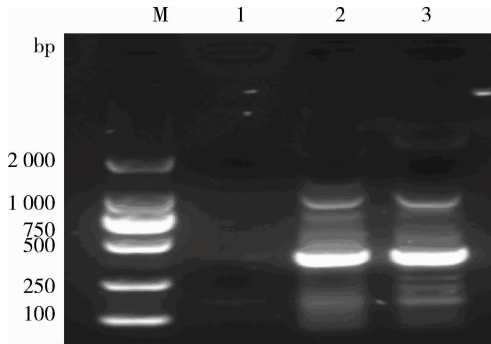
| PCR 方法     | 引物名称  | 引物序列(5'-3')            | 扩增基因                | 产物大小/bp |
|------------|-------|------------------------|---------------------|---------|
| OsDREB3 品系 | DREBF | AGGCATTTGAAGAAGGGTA    | OsDREB3 5'旁侧序列      | 160     |
| 特异性        | DREBR | CTGGCAGTGGCGATAAGT     |                     |         |
| 内参定性       | lec F | GCCCTCTACTCCACCCCATCC  | 内参 <i>lectin</i> 基因 | 118     |
|            | lec R | GCCATCTGCAAGCCTTTTTGTG |                     |         |

为了验证该定性体系的灵敏度,制备 8 种不同转基因大豆含量(10%、5%、2%、1%、0.5%、0.2%、0.1%和 0.05%)的 100 ng DNA 模板样品,将转基因大豆 OsDREB3 和非转基因大豆按质量百分比混合,制成上述 7 个不同转基因含量的样品。DNA 提取采用 CTAB 法,将 DNA 模板进行 PCR 扩增,确定检测下限。

## 2 结果与分析

### 2.1 确定旁侧序列

基因组 DNA 经 4 种限制性内切酶消化后,2 轮 PCR 分别用引物 GSP1 和 GSP2 进行扩增。结果表明基因组经酶 *Stu* I 酶切,引物 GSP1/GSP 扩增出的条带,电泳结果见图 2。



M 为 DL 20 001;1 为空白;2~3 为 OsDREB3。

图 1 OsDREB3 基因 5'端旁侧序列扩增结果

Fig. 1 Detection of insert site of OsDREB3 5' flanking sequence

```

1  TCTATAGGGGCACGCGTGGTTGACGCGCCGGGCTGGTAAATACCGCGACT AATCACATAA
                                ──────────▶ 大豆叶绿体基因组
61  AATTTGTGTT TTTTCTTTTT TTTGCTGTTT CAGCAAATTG TTGTCAGTCA TATCAAGAAG
                                大豆叶绿体基因组 ◀──────────
121 TTTCTGTAAG GCTTCTCCCC CCACCCCAAC ACCCCTTTTT GTTATTA AAA ATAGGCATTT
181 GAAGAAGGGT AGCAATGGAG AGTGGGTAGG TCGTTCGCTC CAAGCTGGGC TG TGTCACG
241 AACCCCCCGT TCAGCCCAGC CGCTGCGCCT TATCCGGTAA CTATCGTCTT GAGTCCAACC
301 CGGTAAGACA CGACTTATCG CCACTGCCAG CCAGCCCCTC CCTT
    
```

图 2 旁侧序列测序结果及分析

Fig. 2 Sequencing results and analysis of flanking sequences

表 4 品系特异性检测所用内参基因

Table 4 Internal reference gene used in event specific detection

| 作物种类 | 内参基因          | 片段大小/bp |
|------|---------------|---------|
| 大豆   | <i>lectin</i> | 118     |
| 玉米   | <i>zSSIb</i>  | 88      |
| 水稻   | SPS           | 277     |

## 2.2 测序结果与分析

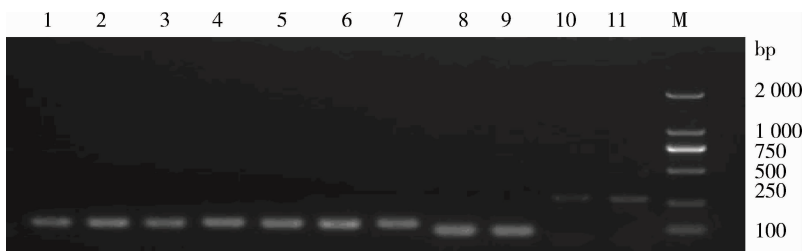
得到的 344 bp 序列通过 DNAMAN 软件和 NCBI 数据比对可知,210 bp 之前的序列其中 50 bp 来源于大豆叶绿体基因组,210 bp 之后的序列来源于不同载体的骨架序列。测序结果及分析见图 2。

## 2.3 转基因大豆 OsDREB3 品系特异性定性检测方法的建立

### 2.3.1 检测方法特异性的确定

选择品系特异性检测中的植物模板对应的内参基因(表 4)进行扩增,结果显示所有模板都能扩增出目的条带(图 3),说明模板正常工作,PCR 反应体系未受抑制。

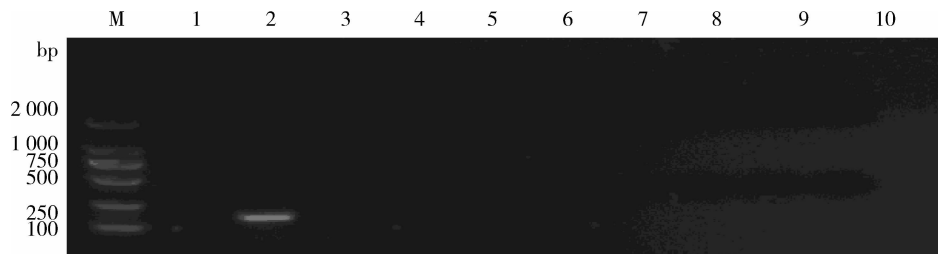
为了检测体系的特异性,本试验同时以非转基因大豆、转基因玉米 Bt176、MON810、转基因大豆 OsDREB3、GTS40-3-2、MON89788、A2704-12、A5547-127,抗虫水稻科丰 6 号和转基因水稻 TT51 为模板进行品系特异性 PCR 检测。结果显示,大小为 160 bp 的转化事件特异性扩增产物仅在以转基因大豆 OsDREB3 为模板时出现,而以其他转基因品种为模板时没有扩增出现该特异性扩增产物(见图 4),这说明该引物具有品系特异性。



M 为 DL 2 000 DNA marker;1 为非转基因大豆;2~3 为转基因大豆 OsDREB3;4~7 为转基因大豆 GTS40-3-2、MON89788、A2704-12、A5547-127;8~9 为转基因玉米 Bt176、转基因玉米 MON810;10~11 为抗虫水稻科丰 6 号、转基因水稻 TT51。

图 3 种属特异性扩增结果

Fig. 3 Result of event specific amplification



M 为 DL 2 000 DNA marker;1 为空白对照;2 为转基因大豆 OsDREB3;3~6 为转基因大豆 GTS40-3-2、MON89788、A2704-12、A5547-127;7~8 为转基因玉米 Bt176、MON810;9~10 为抗虫水稻科丰 6 号、转基因水稻 TT51。

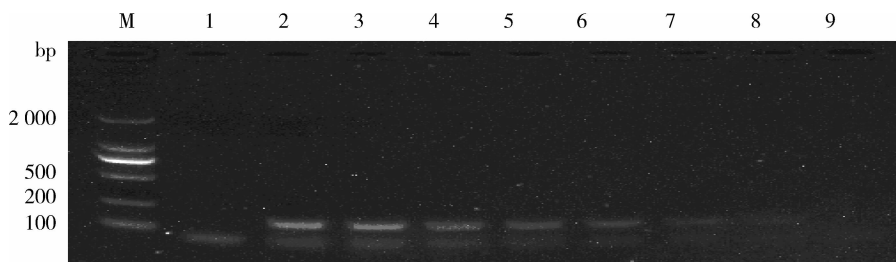
图 4 OsDREB3 品系特异性定性检测体系的特异性

Fig. 4 Specificity of OsDREB3 event specific qualitative detection

### 2.3.2 检测方法灵敏度的确定

检测下限 PCR 结果发现,测试的含量为 0.1%

以上(包括 0.1%)的样品都可以被检测到(图 5),这说明检测低限为 0.1%。



M 为 DL 2 000 DNA marker;1 为空白;2~9 为转基因大豆 OsDREB3 含量为 10%、5%、2%、1%、0.5%、0.2%、0.1% 和 0.05% 的样品。

图 5 OsDREB3 品系特异性定性检测体系的灵敏度

Fig. 5 Sensitivity of OsDREB3 event specific qualitative detection

## 3 讨论

随着转基因标签制度的实施,对转基因产品不仅要做出有或无的定性检测,还要对供试样品中转基因成分进行精确定量检测。由于定性 PCR 方法具有操作简便、灵敏度高、特异性强、无污染和准确性等特点,已成为转基因检测的重要工具<sup>[21]</sup>。本试验根据载体信息及酶切图谱选择了接头连接介导染色体步行方法获得旁侧序列。其特异性引物 DREBF/DREBR,仅在以转基因大豆 OsDREB3 为模板时产生特异性扩增产物,其他模板未见特异性产物。灵敏度检测结果该引物检测低限为 0.1%,与 Wei-Xia Wang<sup>[22]</sup>在检测转基因水稻 Kefeng-6 得到检测灵敏度 0.1% 相同,比欧盟转基因产品最低标识阈值(0.9%)低,灵敏度高。结果显示引物 OsDREBF/OsDREBR 用于鉴定转基因大豆 OsDREB3 品系特异性是有效的。

本试验建立的针对转基因大豆 OsDREB3 的品

系特异性 PCR 检测体系,将为我国建立即将商业化的转基因大豆 OsDREB3 及其产品检测标准提供技术支持。

## 参 考 文 献

- [1] 吴乃虎. 基因工程原理[M]. 北京:科学出版社,2001
- [2] Anklam E, Klam E, Cadani F, et al. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products [J]. European Food Research and Technology, 2002, 214: 3-26
- [3] Yang L T, Pan A H, Zhang K W, et al. Qualitative and quantitative PCR methods for event specific detection of genetically modified cotton MON1445 and MON531 [J]. Transgenic Research, 2005, 14: 817-831
- [4] Wu G, Wu Y H, Xiao L, et al. Event-specific qualitative and quantitative PCR methods for the detection of genetically modified rapeseed Oxy-235 [J]. Transgenic Research, 2008, 17: 851-862
- [5] Knut G, Berdal, Holst-Jensen. Roundup Ready soybean event-specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the

- practical detection and quantification limits in GMO analyses [J]. *Eur Food Res Technol*, 2001, 213: 432-438
- [6] Yang L T, Xu S C, Pan A H, et al. Event-specific qualitative and quantitative PCR detection of genetically modified MON863 maize based on the 5-Rmmgene integration sequence [J]. *Asric Food Chem*, 2005, 53: 9312-9318
- [7] 韩志勇, 沈革志. 基于 PCR 的染色体步行技术 [J]. *高技术通讯*, 2000(11): 102-105
- [8] Liu Y G, Whitter R F. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragment from P1 and YAC clones for chromosome walking [J]. *Genomics*, 1995, 25(3): 674-681
- [9] 王新国, 肖成祖, 张国华, 等. 用衔接头 PCR 克隆新的胡萝卜 II 型转化酶基因启动子 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2001, 17(1): 61-65
- [10] 李飞武, 李葱葱, 董立明, 等. 转基因大豆 MON89788 转化体特异性定性 PCR 检测 [J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(13): 6679-6682
- [11] 郭娜娜, 吴辉, 于晓惠, 等. 转基因大豆插入位点分析及特异性 PCR 检测方法的建立 [J]. *热带作物学报*, 2011, 32(8): 1527-153
- [12] 霍楠, 张明辉, 刘营, 等. 转基因小麦 B73-6-1 品系特异性定性 PCR 检测方法的建立 [J]. *中国生物工程杂志*, 2011, 31(10): 100-105
- [13] 瞿勇, 武玉花, 吴刚, 等. 转基因玉米 MON88017 转化事件特异性定性 PCR 检测方法及其标准化 [J]. *农业生物技术学报*, 2010, 18(6): 1208-1214
- [14] Askild H, Marc V, Luc D, et al. 5'-Nuclease PCR for quantitative event-specific detection of the genetically modified Mon810 MaisGard maize [J]. *Eur Food Res Technol*, 2002, 214: 449-453
- [15] Gachet E, Martin G G, Vigneau F, et al. Detection of genetically modified organisms (GMOs) by PCR: A brief of methodologies available [J]. *Trend in Food Science and Technology*, 1999(9): 380-388
- [16] 中华人民共和国农业部. NY/T 675—2003 转基因植物及其产品成分检测大豆定性 PCR 方法 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2010
- [17] 农业部. 转基因植物及其产品成分检测耐除草剂大豆 MON89788 及其衍生品种定性 PCR 方法 (1485 号公告-6-2010) [S]. 北京: 中国农业出版社, 2010
- [18] 农业部. 中华人民共和国农业行业标准: 耐除草剂大豆 A2704-12 及其衍生品种定性 PCR 方法 (1485 号公告-7-2010) [S]. 北京: 中国农业出版社, 2010
- [19] 农业部. 中华人民共和国农业行业标准: 耐除草剂大豆 A5547-127 及其衍生品种定性 PCR 方法 (1485 号公告-8-2010) [S]. 北京: 中国农业出版社, 2010
- [20] 农业部. 中华人民共和国农业行业标准: 转基因植物及其产品成分检测 DNA 提取和纯化 (1485 号公告-4.-2010) [S]. 北京: 中国农业出版社, 2010
- [21] 李鹏, 潘爱虎, 贾军伟, 等. 转基因香石竹 Moonlite 品系特异性定性 PCR 检测方法的建立 [J]. *中国农业科技导报*, 2010, 12(6): 109-113
- [22] Wang Wei-xia, Zhu Ting-heng, Lai Feng-xiang. Event-specific qualitative and quantitative detection of transgenic rice Kefeng-6 by characterization of the transgene flanking sequence [J]. *Eur Food Res Technol*, 2011, 232: 297-305

责任编辑: 王燕华