

耐除草剂转基因大豆质粒标准分子的构建

仇有文 张明辉 于艳波 甄贞 王傲雪 高学军*

(东北农业大学 生命科学与生物技术研究中心/农业部转基因生物产品成分监督检测测试中心, 哈尔滨 150030)

摘要 以 A2704-12、A5547-127、MON89788 和 GTS-40-3-2 等 4 种商品化耐除草剂转基因大豆为材料, 构建质粒标准分子用于解决转基因作物检测时标准物质缺乏现状。采用双酶切技术, 将扩增的大豆内参基因和耐除草剂转基因大豆转化体特异性片段克隆至 pMD18-T 载体上。结果显示, 质粒标准分子定性 PCR 特异性序列片段的 LOD 均为 20 copies/ μ L, 定量检测体系 Bias 最大值 \leq 9.89%, CV 最大值 \leq 5.96%, SD 最大值 \leq 0.06, 实验得到的所有偏差值均在允许范围之内, 构建的质粒标准分子适用于 4 种耐除草剂转基因大豆特异性检测。

关键词 大豆; 转基因大豆; 质粒标准分子; 实时荧光定量 PCR

中图分类号 S 565.1

文章编号 1007-4333(2014)03-0049-06

文献标志码 A

Construction of a calibration plasmid for detection of Genetically Modified herbicide resistance soybeans

QIU You-wen, ZHANG Ming-hui, YU Yan-bo, ZHEN Zhen, WANG Ao-xue, GAO Xue-jun*

(Life Science and Biotechnology Research Center/Testing and Inspecting Center for GMO,
Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract To find a solution to the lack of calibrator during GMO detection, four Genetically Modified soybean events GTS-40-3-2, MON89788, A2704-12 and A5547-127 were used to construct a calibration plasmid which was developed by combining endogenous reference gene and herbicide resistance specific DNA sequence to the clone vector pMD18-T. The results showed LOD (a limit of detection) value of calibrator plasmid DNA was 20 copies/ μ L by qualitative PCR detection. The max Bias value \leq 9.89%, max CV value \leq 5.96%, max SD value \leq 0.06 in the performance of this real-time Q-PCR system. The deviations were reasonable, thus the calibrator plasmid was suitable for the specific detection of the four Genetically Modified soybean events.

Key words soybean; Genetically Modified soybean; calibrator plasmid DNA; quantitative PCR (Q-PCR)

近年来, 由于转基因技术的发展和应用, 大批转基因植物新品种不断涌现。据国际农业生物技术应用服务组织 (ISAAA) 统计^[1], 截止 2012 年全球转基因作物的种植面积已达到 1.7 亿 hm^2 。转基因作物在解决全世界日益严重的粮食危机的同时, 也带来了食品安全和环境安全问题^[2-3], 因此, 世界各国政府和相关国际组织非常重视转基因作物及其产品的监督和管理。耐除草剂转基因大豆中的功能基因来源于农杆菌和链球菌, 是世界上商品化

早、推广应用速度快的转基因作物。转基因大豆品种主要是 A2704-12、A5547-127、MON89788 和 GTS-40-3-2。

标准分子是一种重组质粒分子, 一般包含转基因作物中待检测的外源基因、转基因作物转化体特异性片段以及该物种特异性片段, 质粒标准分子制备上操作简便、生产成本低、容易获得高纯度质粒标准分子 DNA 样品^[4]。近年来, 质粒标准分子被公认为是解决转基因作物检测标准物质缺乏的有效途

收稿日期: 2013-09-30

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项(2013ZX08004-002-002-004); 哈尔滨市科技局项目(2010RFQXN101)

第一作者: 仇有文, 助理研究员, 博士研究生, 主要从事转基因作物检测技术研究, E-mail: yw12_630@126.com

通讯作者: 高学军, 教授, 博士生导师, 主要从事分子生物学研究, E-mail: gaouxj5390@sina.com

径之一,在已经开展的质粒分子标准物质的研究上主要是检测转基因大豆 356043^[5] (ERM-AD425)、转基因玉米 MON810^[6] (ERM-AD413)、转基因玉米 NK603^[7] (ERM-AD415),其中部分已作为新型 DNA 标准物质用于转基因作物检测和定量分析^[8-9]。

本研究采用双酶切技术,将扩增的大豆内参基因和耐除草剂转基因大豆转化体特异性片段克隆至 pMD18-T 载体上,构建适用于 4 种耐除草剂转基因大豆特异性检测的质粒标准分子,以便解决日益复杂的耐除草剂转基因大豆产品的成分检测中标准物质缺乏问题。

1 材料与方法

1.1 研究用的主要材料、仪器和试剂

转基因大豆 A2704-12、A5547-127、MON89788、GTS40-3-2 和非转基因大豆由农业部转基因生物产品成分监督检验测试中心(哈尔滨)提供。

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、pMD18-T 载体、感受态细胞 Top10、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Perfect Real Time)试剂盒购自大连宝生物工程有限公司。DNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒来自 Axygen 公司。特异引物由上海英俊

生物公司合成。

PCR 仪(德国 Biometra, Biometra Tgradient)、核酸电泳仪(杭州大合,GE-100)、凝胶成像系统(美国 UVP, G8000)、实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI, ABI Prism[®] 7500 型)。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取

耐除草剂转基因大豆和非转基因大豆按质量百分比混合,制成 5 个不同转基因含量 10%、5%、1%、0.5%、0.1%的样品,将待测样品、阳性对照和阴性对照根据试剂盒操作说明进行 DNA 提取,并用紫外分光光度计将 DNA 溶液稀释至同一质量浓度 100 ng/ μ L。

1.2.2 PCR 引物设计

引物设计以 NCBI GenBank 序列为基础,利用 Primer Premier V5.0 软件设计大豆内参基因 *Lectin* 基因(GenBank 序列号:K00821),转基因大豆 A2704-12(GenBank 序列号:CS447634.1),转基因大豆 A5547-127(GenBank 序列号:DM079061.1),转基因大豆 MON89788(GenBank 序列号:x00806),转基因大豆 GTS40-3-2(GenBank 序列号:AB209952.1)引物,由 Invitrogen 公司合成,研究所用引物见表 1。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Oligonucleotide primers used in the event-specific detection

PCR 方法 Target	引物名称 Name	引物序列 5'-3' Sequence 5'-3'	扩增基因 Amplified gene	片段大小/bp Amplicon
质粒标准分子构建 Calibrator plasmid DNA construction	LEC BF	<u>CGGAATTCTG</u> ACTAAGCCACAAAC	<i>Lectin</i>	350+15
	LEC BR	GGGGTACCTCTCTGCTGCCACGGGAC		
	A27 BF	GGGGTACCCCTCCTGGCACAACCCTA	<i>PAT</i>	191+16
	A27 BR	TCCCCCGGGCCGACCGACATAAGAA		
	A55 BF	TCCCCCGGGGAGGCACCTATCTCAGCG	<i>PAT</i>	338+17
	A55 BR	TCCCCCGGGGAAGCCATACCAAACGAC		
	M89 BF	TCCCCCGGGTGTTGGTAACGGTGGACT	<i>CP4-EPSPS</i>	450+19
	M89 BR	CGGGATCCCGACCTTCAAGACGGATG		
	GTS BF	CGGGATCCTTATCAGGGTCATTTGTTG	<i>CP4-EPSPS</i>	358+18
	GTS BR	GCTCTAGACTACCTTCTCACCGCATT		
实时荧光定量 PCR Quantitative PCR/real-time PCR	A27 QF	GGAAAAAGTTTGGACGAGGGTG	<i>PAT</i>	150
	A27 QR	GTATTCTTCTTATCTTACGAACCGACTA		

1.2.3 目的片段 PCR 扩增

将提取的总 DNA 用大豆内参基因和 4 种耐除草剂转基因大豆用转化体特异性引物(增加酶切位点和保护碱基,见表 1)进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 20 μ L,含 1 \times PCR 缓冲液,0.25 mM dNTP mix,0.2 μ mol/L 的 LECBF/BR、A27BF/BR、A55BF/BR、M89BF/BR、GTSBF/BR 上游引物和下游引物,1 U *rTaq* DNA 聚合酶,50 ng DNA 模板。反应程序:预变性 95 $^{\circ}$ C 3 min;35 个循环:变性 95 $^{\circ}$ C 30 s,退火 58 $^{\circ}$ C 30 s,延伸 72 $^{\circ}$ C 30 s;后延伸 72 $^{\circ}$ C 3 min。1.5%琼脂糖凝胶电泳检测结果,胶回收得到特异性的目的基因片段。

1.2.4 质粒标准分子的构建和鉴定

PCR 扩增得到特异性片段与 pMD18-T 载体连接,连接产物全部转化感受态细胞 Top10,涂布含 Amp 的 LB 固体培养基,37 $^{\circ}$ C 倒置培养过夜,随机挑取单菌落于配制好的 PCR 反应体系中,进行 PCR 反应,利用 1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定。根据鉴定结果继续扩大培养阳性克隆菌,并提取质粒送华大基因公司进行测序。

1.2.5 定性 PCR 的 LOD 测定

本研究选用质粒标准分子梯度稀释 20 000~2 copies/ μ L 共 5 个浓度的标准溶液进行定性 PCR 的 LOD 测定,条件同 1.2.3。

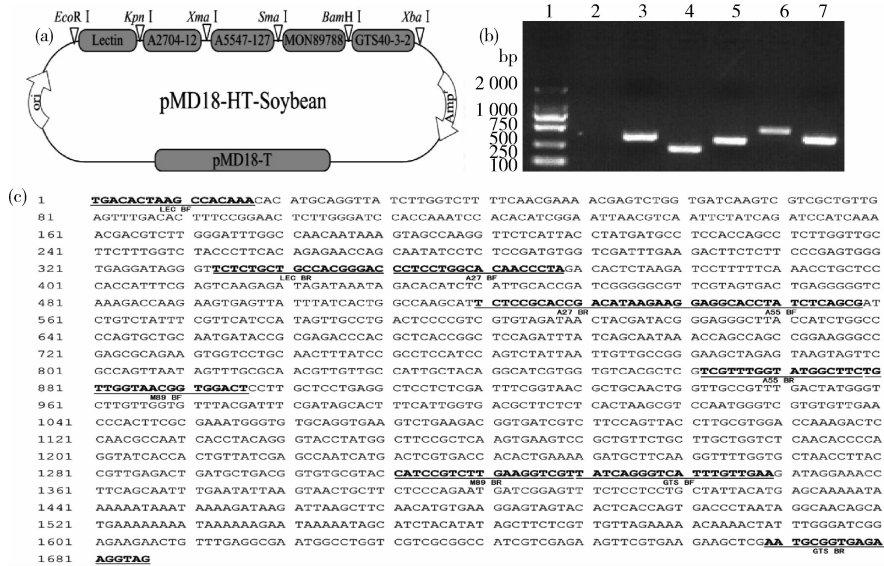
1.2.6 标准曲线的建立

利用样品 C_t (threshold cycle)值与其初始拷贝数的对数值的线性关系建立曲线图,本研究选用同上梯度的标准溶液建立转基因大豆 A2704-12 实时荧光定量 PCR 检测标准曲线,反应条件同 1.2.3,利用曲线结果检测 5 个已知含量的 A2704-12 转基因大豆(10%、5%、1%、0.5%、0.1%(m/m)),验证质粒标准分子的适用性。

2 结果与分析

2.1 质粒标准分子的构建与鉴定

将大豆 *Lectin* 基因片段和 4 种耐除草剂转基因大豆特异性序列片段克隆至 pMD18-T 载体中,命名为 pMD18-HT-Soybean,对构建的质粒标准分子进行定性 PCR 特异性片段扩增,结果表明质粒标准分子构建成功,质粒标准分子插入序列见图 1。



(a)质粒标准分子结构示意图:*EcoR* I 和 *Kpn* I 之间插入 *lectin*、*Kpn* I 和 *Xma* I 之间插入 A2704-12、*Xma* I 和 *Sma* I 之间插入 A5547-127、*Sma* I 和 *Bam*H I 之间插入 MON89788、*Bam*H I 和 *Xba* I 之间插入 GTS40-3-2;(b)质粒标准分子 PCR 验证:1,DL2000 DNA marker,2,空白对照,3~7,大豆内参基因、转基因大豆 A2704-12、A5547-127、MON89788、GTS40-3-2;(c)质粒标准分子插入序列:下划线表示质粒标准分子构建中所用的引物位置。

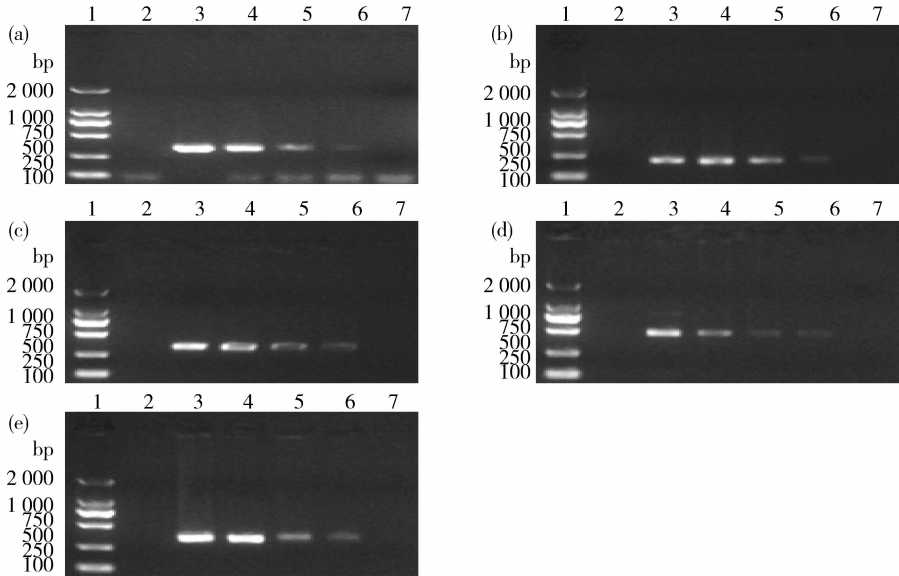
(a) the construction of calibrator plasmid;*lectin* between *EcoR* I and *Kpn* I , A2704-12 between *Kpn* I and *Xma* I , A5547-127 between *Xma* I and *Sma* I , MON89788 between *Sma* I and *Bam*H I ,GTS40-3-2 between *Bam*H I and *Xba* I ; (b) PCR detection on calibrator plasmid;lane 1,DL2000 DNA marker;lane 2,blank control;lane 3-7,soya endogenous lectin,GM soybean A2704-12, A5547-127, MON89788, GTS40-3-2;(c) the inserted sequences in calibrator plasmid, the underlined part presents the primers of events specific genes used for the construction of calibrator plasmid.

图 1 质粒标准分子结构示意图、PCR 验证和插入序列

Fig.1 Description of pMD18-HT-Soybean multiple-target plasmid as calibrator

2.2 定性 PCR 的 LOD 测定

在 DNA 样品 5 个浓度标准溶液进行定性 PCR 的 LOD 测定时,结果显示(图 2),5 对引物定性 PCR 目的条带清晰度随 5 个浓度标准溶液递减而减弱,至 2 copies/ μL 浓度样品几乎看不见目的条带,说明 5 对引物的定性 PCR 的 LOD 均为 20 copies/ μL 。



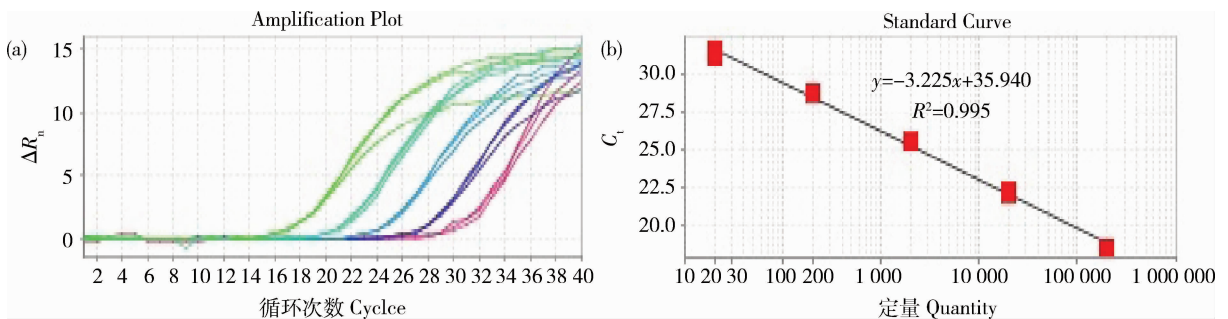
(a)~(e), Lectin, A2704-12, A5547-127, MON89788, GTS40-3-2; 1, DL2000 DNA marker; 2, 空白对照; 3~7, DNA 样品为 20 000~2 copies/ μL 拷贝数浓度质粒标准分子溶液。
(a)~(e), Lectin, A2704-12, A5547-127, MON89788, GTS40-3-2; lane 1, DL2000 DNA marker; lane 2, blank control; lane 3-7, 20 000~2 copies/ μL contents.

图 2 质粒标准分子应用在定性 PCR 的 LOD 测定

Fig. 2 LOD assessment of calibrator plasmid

2.3 标准曲线的建立

应用建立的标准曲线,转基因大豆 A2704-12 进行 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法扩增,得到的该标准曲线的回归方程为: $y = -3.225x + 35.940$, $R^2 = 0.995$, 扩增效率为 104.215%^[10], 在正常范围内,说明构建的标准曲线可用于转基因产品绝对定量的分析(图 3)。



(a) 定量 PCR 扩增曲线; (b) 定量 PCR 标准曲线

(a) Amplification curves; serial DNA dilution from left to right; 20 000~2 copies/ μL

(b) Parameters of the regression line through data points are indicated within the standard curve

图 3 质粒标准分子为标准品建立的定量 PCR 标准曲线和扩增曲线

Fig. 3 Amplification plots and standard curve event-specific real-time PCR assay

2.4 质粒标准分子为标准品定量检测样品中转基因大豆 A2704-12 含量

为验证以构建的质粒标准分子为标准品建立的定量检测体系的准确性和精确性,本研究检测了5个已知转基因大豆 A2704-12 含量的混合样品,准确性采用 Bias 衡量,精确性采用 SD 和 CV 衡量。实验测的5个样品的转基因成分含量分别为

0.091%、0.483%、1.09%、4.95%、9.97%,对应的 CV 值分别为 4.39%、2.62%、5.96%、0.62%、0.51%,Bias 值分别为 9.89%、3.51%、8.25%、1.01%、0.31%,SD 最大值小于 0.06(表 2),试验得到的所有偏差值小于 25%,在可接受范围之内^[11]。因此,本研究构建的质粒标准分子适用于耐除草剂转基因大豆的定量检测。

表 2 实时荧光定量 PCR 检测转基因大豆 A2704-12

Table 2 Quantitative analysis of the A2704-12 blind samples

含量/% True value	数值 Sample	A2704-12				质粒标准分子 Calibrator plasmid		测量值/% Content	平均/% Mean	SD	CV/%	Bias/%
		平均 C _t		拷贝数		平均 C _t	拷贝数					
		Mean	Copy number	Mean	Copy number							
10.0	S1	23.09	4 050	24.62	3 809	9.97	9.97	0.05	0.51	0.31		
		23.19	3 989	24.58	3 993	10.03						
		23.12	4 030	24.65	3 760	9.93						
5.0	S2	25.46	1 909	24.53	3 715	4.98	4.95	0.03	0.62	1.01		
		25.69	1 852	24.57	3 668	4.92						
		25.53	1 883	24.44	3 755	4.96						
1.0	S3	28.21	890	24.13	3 527	1.16	1.09	0.06	5.96	8.25		
		28.29	865	24.18	3 479	1.10						
		28.23	876	24.23	3 433	1.03						
0.5	S4	30.48	339	24.22	3 682	0.49	0.48	0.01	2.62	3.51		
		30.49	325	24.48	3 514	0.49						
		30.56	316	24.36	3 621	0.47						
0.1	S5	32.19	117	24.23	3 527	0.10	0.09	0.01	4.39	9.89		
		32.35	109	24.29	3 482	0.09						
		32.48	102	24.15	3 552	0.09						

3 讨论

随着转基因产品在市场上所占份额的不断增加,这给转基因作物的检测带来了挑战,对有效的转基因检测方法提出了巨大需求^[12]。如何快速、准确、科学地对样品进行转基因鉴定,是当前转基因检测行业所面临的一个关键问题^[13],转基因检测标准物质是转基因作物检测的基础,建立更为快速、简单、低成本、高通量、自动化、精确定量的方法^[14]及相应的转基因检测标准物质是今后的发展趋势^[15]。

目前,已有多篇论文对以质粒为标准物质在大

豆、玉米 GMO 定量检测的应用进行了讨论^[5-8,16],有研究人员对以质粒为检测标准物质的影响进行了连续研究^[17-18],通过开展实验室间合作,开发了一种可以用于 GTS-40-3-2 转基因大豆检测的双标靶质粒 pJANUSTM-02-001^[4]。这些研究表明,质粒标准分子是一种很好的 GMO 定量检测标准物质,但是倍数性问题仍然没有解决。另外,质粒标准分子在应用作为检测标准物质检测前,首先要做质粒标准分子的质量分析,并作替代性研究,对其稳定性,均匀性都需要重点解决。

本研究构建了适于耐除草剂转基因大豆品系特

异性检测的质粒标准分子 pMD18-TH-Soybean, 以其为标准品的定性 PCR 扩增中, 特异性序列片段的 LOD 均是 20 copies/ μL , 标准分子 DNA, 相当于含有约 0.01% 转基因大豆成分 (100 ng 基因组 DNA)。在以构建的质粒标准分子为标准品建立的定量检测体系的准确性和精确性研究中, Bias 最大值 $\leq 9.89\%$, CV 最大值 $\leq 5.96\%$, SD 最大值 ≤ 0.06 , 实验得到的所有偏差值均在可接受范围之内^[19]。目前, 欧盟、美国和日本等国家对转基因产品规定的标签阈值分别为 0.9%、5.0% 和 5.0%, 本研究构建的质粒标准分子在检测低限上完全可以满足对未知转基因成分的检测, 代替阳性标准物质, 解决标准物质缺乏问题。综上所述, 本研究构建的质粒标准分子适用于耐除草剂转基因大豆的定性、定量检测分析。

参 考 文 献

- [1] James C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2012[C]//ISAAA brief no. 2012. 44. ISAAA: Ithaca, 2012
- [2] WHO. Project to update the principles and methods for the assessment of chemicals in food[EB/OL]. (2009-12-22)[2012-09-17] <http://www.who.int/food/safety/chemprinciples/en/index.html>
- [3] OECD. Consensus document on molecular characterisation of plants derived from modern biotechnology[EB/OL]. (2010-09-20) [2012-09-17] <http://www.oecd.org/dataoecd/16/291/46815346.pdf>
- [4] Lievens A, Bellocchi G, De B D, et al. Use of pJANUS-02-001 as a calibrator plasmid for Roundup Ready soybean event GTS-40-3-2 detection: an interlaboratory trial assessment[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 396(6): 2165-2173
- [5] Broeders S, Meeus N, Mazoua S, et al. Certification of plasmid DNA containing 356043 soybean DNA fragments [C]//European Commission, Joint Research Centre. Institute for Reference Materials and Measurements, 2011
- [6] Corbisier P, Broeders S, Charels D. DNA containing MON 810 maize DNA fragments [C]//European Commission, Joint Research Centre. Institute for Reference Materials and Measurements, DNA containing MON 810 maize, 2007
- [7] Jeynov B, de Andrade E, Broothaerts W, et al. Certification of plasmid DNA containing NK603 maize DNA fragments[C]//European Commission, Joint Research Centre. Institute for Reference Materials and Measurements, 2011
- [8] Caprioara-Buda M, Corbisier P, Gancberg D, et al. Certification of plasmid DNA containing 98140 maize DNA fragments[C]//European Commission, Joint Research Centre. Institute for Reference Materials and Measurements, 2011
- [9] Zhang H B, Yang L T, Guo J C, et al. Development of one novel multiple-target plasmid for duplex quantitative PCR analysis of RoundupReady soybean[J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(1): 5514-5520
- [10] Bar T, Stahlberg A, Muszta A, et al. Kinetic outlier detection (KOD) in real-time PCR[J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(17): 105-115
- [11] Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing-ENGL[EB/OL]. [2013-09-30] http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/Min_Perf_Requirements_Analytical_methods.pdf
- [12] Van B M, Lievens A, Barbau-piednoir E, et al. A theoretical introduction to "Combinatory SYBR Green qPCR Screening", a matrix-based approach for the detection of materials derived from genetically modified plants[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 396(6): 2113-2123
- [13] Zel J, Cankar K, Ravnikar M, et al. Accreditation of GMO detection laboratories: Improving the reliability of GMO detection [J]. *Accredit Qual Assur*, 2006, 10(10): 531-536
- [14] Dobnik D, Morisset D, Gruden K. NAIMA as a solution for future GMO diagnostics challenges[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 396(6): 2229-2233
- [15] Zhang D, Guo J. The Development and standardization of testing methods for Genetically Modified Organisms and their derived products[J]. *J Integr Plant Biol*, 2011, 53(7): 539-551
- [16] Burns M, Corbisier P, Wiseman G, et al. Comparison of plasmid and genomic DNA calibrants for the quantification of genetically modified ingredients[J]. *Eur Food Res Technol*, 2006, 224: 249-258
- [17] Corbisier P, Trapmann S, Gancberg D, et al. Quantitative determination of Roundup Ready soybean (Glycine max) extracted from highly processed flour[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2005, 383(2): 282-290
- [18] Charels D, Broeders S, Corbisier P, et al. Toward metrological traceability for DNA fragment ratios in GM quantification. 3. Suitability of DNA calibrants studied with a MON 810 corn model[J]. *J Agr Food Chem*, 2007, 55(9): 3268-3274
- [19] European Network of GMO Laboratories. Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing [C]//Ispra, Italy: Biotechnology and GMOs Unit-Commol/Lunity Reference Laboratory, Institute for Health and Consumer Protection, Joint Research Center, European Commol/Lission, 2008