

- [19] FENG F Q, WANG Q F, ZHANG J, et al. Assessment of carotenoid and tocopherol level in sweet corn inbred lines during kernel development stages [J]. Indian Journal of Genetics and Plant Breeding, 2015, 75(2): 196-200.
- [20] STINCO C M, BENÍTEZ-GONZÁLEZ A M, MELÉNDEZ-MARTÍNEZ A J, et al. Simultaneous determination of dietary

isoprenoids (carotenoids, chlorophylls and tocopherols) in human faeces by rapid resolution liquid chromatography [J]. J Chromatogr A, 2019, 1583(11): 63-72.

- [21] 曾东慧. 柑橘果皮类胡萝卜素提取物对鸡蛋蛋黄中类胡萝卜素成分及其色泽影响的研究 [D]. 杭州: 浙江师范大学, 2013.

实验技术与方法

转基因甜菜 GTSB77 品系特异性实时荧光聚合酶链式反应检测方法建立

刘二龙¹, 卢丽², 吕英姿¹, 蒋湘¹, 李嘉琪¹, 夏柔菲¹

(1. 黄埔海关技术中心, 广东 广州 510730; 2. 广州海关技术中心, 广东 广州 510623)

摘要:目的 为实现转基因甜菜 GTSB77 的标识管理, 建立其品系特异性实时荧光聚合酶链式反应 (PCR) 检测方法。方法 针对 GTSB77 的 3' 端外源插入片段与甜菜基因组 DNA 之间的邻接区序列设计引物和探针, 建立 GTSB77 品系特异性实时荧光 PCR 检测方法, 并对该方法的特异性、灵敏度和重复性进行检测。结果 建立的 GTSB77 检测方法特异性强, 定量限 (LOQ) 为 16 拷贝, 扩增效率为 102%, 重复性测试结果相对标准偏差 (RSD) 介于 0.21%~1.66% 之间。结论 建立的实时荧光 PCR 方法可应用于 GTSB77 的鉴定检测。

关键词: 转基因甜菜 GTSB77; 实时荧光聚合酶链式反应; 品系特异性

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2020)01-0049-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2020.01.009

Establishment of event-specific quantitative real-time polymerase chain reaction for detecting genetically modified sugarbeet GTSB77

LIU Erlong¹, LU Li², LYU Yingzi¹, JIANG Xiang¹, LI Jiaqi¹, XIA Roufei¹

(1. Huangpu Customs Technology Center, Guangdong Guangzhou 510730, China;

2. Guangzhou Customs Technology Center, Guangdong Guangzhou 510623, China)

Abstract: Objective For implementation of labeling regulations, an event-specific real-time polymerase chain reaction (PCR) method for quantitative detection of sugarbeet GTSB77 was established. **Methods** The specific primer pairs and probe based on the 3' flanking sequence of GTSB77 were designed. The specificity, sensitivity and repeatability of the developed method were examined, respectively. **Results** The specificity test showed it specific for GTSB77 detection. The limit of quantification (LOQ) was 16 copies and the amplification efficiency was 102%. Repeatability of the established method was assessed and the relative standard deviation (RSD) ranged from 0.21%-1.66%. **Conclusion** This event-specific real-time PCR method is suitable for identification of GTSB77.

Key words: Sugarbeet GTSB77; real-time polymerase chain reaction; event-specific

甜菜是一种重要经济作物, 目前美国和加拿大 95% 以上种植的甜菜均为转基因甜菜。目前上市的转基因甜菜品系共有三个: GTSB77、T120-7 和 H7-1, 其中仅 H7-1 获得我国农业部批准用于糖、甜菜浆及加工原料。

转基因甜菜 GTSB77 (以下简称 GTSB77) 是由诺华公司和孟山都公司研发的具抗草甘膦除草剂特性的甜菜品系, 商品名为: InVigor™ sugarbeet。1998—2004 年间, 陆续在美国、日本、加拿大、澳大利亚、菲律宾被批准作为食品或饲料用途^[1]。

GTSB77 经农杆菌转入 *cp4-epsps*、*uidA* 和修饰过的 *gox* 三个外源基因研发而成, *uidA* 基因来自大肠埃希菌的 β -葡萄糖醛酸酶作为筛选标记, *cp4-epsps* 和 *gox* 基因均为草甘膦除草剂耐受基因, *cp4-epsps* 基因编码 5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合成酶, 对

收稿日期: 2019-12-22

基金项目: 广东出入境检验检疫局科技项目 (2018GDK50)

作者简介: 刘二龙 男 高级兽医师 研究方向为动植物检疫技术

E-mail: erlongliu@126.com

草甘膦除草剂不敏感; *gox* 基因编码草甘膦氧化还原酶(GOX)从而降解草甘膦除草剂,但由于其在翻译过程中被截断,与甜菜基因组融合形成嵌合基因,虽能进行 mRNA 转录,但没有新的蛋白产生,因此 GTSB77 没有草甘膦氧化还原酶活性^[2]。

目前多数国家对转基因产品均采用相应的标识管理制度,并且规定了 0.9%~5% 不等的阈值^[3],我国暂未规定其阈值^[4],标识管理制度的建立和实施依赖于准确灵敏的检测鉴定技术,品系特异性或转化事件特异性聚合酶链式反应(event-specific PCR)检测的目标序列是外源插入序列与植物基因组间连接区,相较于筛选 PCR(screening PCR)、基因特异性 PCR(gene-specific PCR)、结构特异性 PCR(construct-specific PCR)具有更高的特异性,能用于检测鉴定同质粒转化的转基因品系,是目前转基因品系鉴定检测中的主要方法^[5]。目前国内均尚无 GTSB77 品系特异性检测方法的报道。

本试验根据 GTSB77 的 3'端外源插入片段与甜菜基因组 DNA 之间的邻接区序列设计引物和探针,建立特异性强、灵敏度高、通量高的 GTSB77 品系特异性实时荧光 PCR 检测方法,从而解决进口甜菜及产品中 GTSB77 品系特异性检测的需求。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样 品

转基因甜菜 H7-1、非转基因甜菜荷兰 KUHN8060、非转基因甜菜吉甜 204、转基因油菜 MON88302、转基因苜蓿 J101、转基因苜蓿 J163、转基因玉米 MON810、转基因大豆 GTS 40-30-2、转基因玉米 BT11、转基因玉米 MIR162、转基因玉米 NK603、非转基因大麦、非转基因玉米和非转基因大豆均由本实验室购置和收集。

1.1.2 主要仪器与试剂

ABI 7500FAST 实时荧光 PCR 仪(美国应用生物系统),nanodrop2000c 微量分光光度计(美国 Thermo),控制型试管研磨机(德国 IKA)。

植物 DNA 提取试剂盒 DP305-3、质粒 DNA 提取试剂盒 DP103-03 均购自天根生化科技(北京)有限公司,Primex Ex *Taq* (2×) for qPCR(大连宝生物);引物和探针由闪晶生物公司合成,稀释为终浓度 10 μmol/L 的工作液使用。

1.2 方 法

1.2.1 DNA 提取

按照 DNA 纯化试剂盒说明书分离、纯化样品 DNA,每次 DNA 提取均设置提取空白对照,微量分

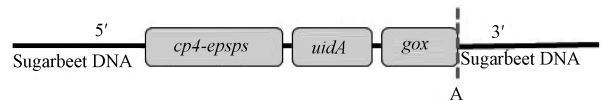
光光度计测定其浓度。

1.2.2 质粒构建

将甜菜内源基因谷氨酰胺合成酶(*glutamine synthetase*,GS)基因 160 bp 片段和 GTSB77 的 3'端邻接区序列 379 bp 片段克隆到氨苄青霉素抗性(AmpR)的 pUC57 载体上构建重组质粒(均为 1 个拷贝),将重组质粒转入受体菌 DH5α 后-70℃ 保存(以下简称 GS-GTSB77 质粒)。提取质粒 DNA 并经微量分光光度计测定浓度,进行梯度稀释,拷贝数浓度计算公式:质粒 DNA 拷贝数浓度(拷贝/μl)=6.02×10²³×质粒 DNA 浓度(ng/μl)×10⁻⁹/(质粒碱基数×660)。

1.2.3 引物探针设计和品系特异性实时荧光 PCR 体系

针对 GTSB77 的 3'端邻接区(GTSB77 外源插入片段结构见图 1)应用 Primer 5.0 软件设计引物和探针,并将设计的引物、探针经美国生物技术中心(NCBI)网站上使用 BLAST 比对确定引物和探针的理论特异性。扩增的 GTSB77 品系特异性片段如图 2 所示,选择 GS 内源基因引物 GS-F/R 和探针 GS-P 用于检测提取的甜菜样品基因组 DNA 浓度是否适于进行实时荧光 PCR 扩增(扩增的片段见图 3)及转基因成分的相对定量,具体引物探针信息见表 1。



注:A 为扩增的邻接区位置

图 1 GTSB77 外源插入片段示意图

Figure 1 Schematic diagram of exogenous fragment in GTSB77

```
1  gaacgtggat accacatcgt gatcgcaaac ccagaagctg ctccacgtat tccaactcc
61  gatgcttctg gaaagtccg gtccaaattt gtttacattg tgtccaatt tcgctgatt
121tggacttccc
```

注:阴影部分依次为上游引物 GTSB77-F,探针 GTSB77-P,下游引物 GTSB77-R

图 2 GTSB77 特异性序列

Figure 2 Specific nucleotide sequence of GTSB77

```
1  cacgcaccca cccaccatg catctctctc tgtctcccac aggggagcca ggatggcgta
61  ctgagcctgg atgacaatga ctctcagcat ctgctccctc acgggaaacta ctaccagaa
121ctggggggcg atggcaacat caggagaactacgaactgt
```

注:阴影部分依次为上游引物 GS-F,探针 GS-P,下游引物 GS-R

图 3 GS 基因部分扩增序列

Figure 3 Nucleotide sequence for GS gene detection

品系特异性实时荧光 PCR 扩增反应体系(25 μl):Premix Ex *Taq*TM 12.5 μl,ROX Reference Dye II 0.2 μl,10 μmol/L 上下游引物各 0.5 μl,

表 1 品系特异性实时荧光 PCR 的引物、探针
Table 1 Sequence of primer pair/probes used in this study

检测目标	引物/探针	序列(5'-3')	产物长度/bp	来源
GTSB77 品系特异性序列	GTSB77-F	AACGTGGATACCACATCGTGATC	127	本试验
	GTSB77-R	GAAGTCCAAATCAGCCGAAATTT		
	GTSB77-P	FAM-CCCAGAAGCTGCTCCACGTATTCCAA-BHQ1		
GS 基因	GS-F	CACAGGGGAGCCAGGATG	86	[6]
	GS-R	CAGGTTCTGCTAGTAGTTCCCGTAG		
	GS-P	VIC-TGAGCCTGGATGACAATGACTCTCAG-BHQ1		

10 $\mu\text{mol/L}$ 检测探针 0.5 μl , DNA 模板 2 μl , ddH₂O 8.3 μl 。反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 34 s,40 个循环,于 60 $^{\circ}\text{C}$ 收集荧光信号。

1.2.4 品系特异性实时荧光 PCR 方法特异性测试

提取样品 DNA,应用 1.2.3 中品系特异性实时荧光 PCR 体系对内源基因 GS 和 GTSB77 进行特异性测试。

1.2.5 检测线性范围测试及标准曲线建立

将提取 GS-GTSB77 质粒 DNA 溶液加 TE 缓冲液分别稀释至 800 000、80 000、8 000、800、80、40、8 和 4 拷贝/ μl (上样量 2 μl ,对应 1 600 000、160 000、16 000、1 600、160、80、16 和 8 拷贝)作为 DNA 模板,进行 GS 和 GTSB77 实时荧光 PCR 检测的线性范围测试及可重复性测试,每个浓度 3 个平行,水为空白对照,品系特异性实时荧光 PCR 检测反应体系和反应程序按 1.2.3。以模板量的对数值与循环数(Ct 值)建立标准曲线。

1.2.6 可重复性测试

将 1.2.5 中不同浓度模板 3 个平行扩增结果计算标准偏差(SD)和相对标准偏差(RSD)进行可重

复性分析。

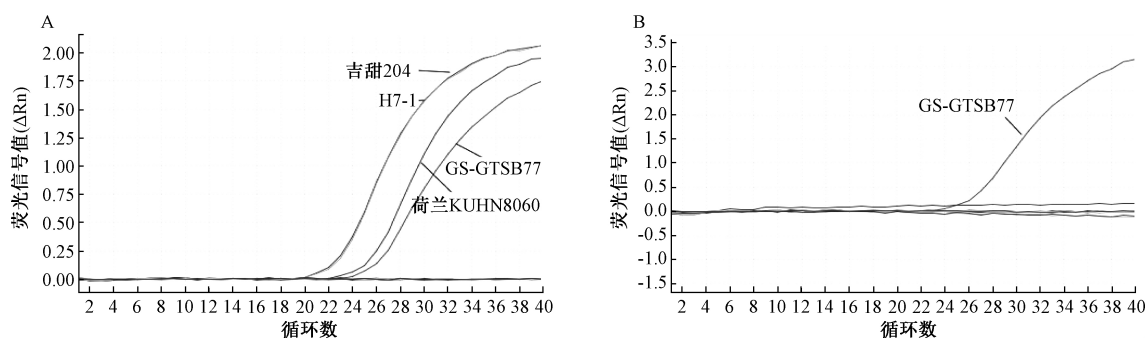
2 结果与分析

2.1 质粒构建

将 GS 和 GTSB77 片段克隆到 pUC57 质粒中构建 GS-GTSB77 质粒,长度为 3 249 bp,测序结果表明与目的序列完全一致。

2.2 品系特异性实时荧光 PCR 特异性测试

采用表 1 中的引物和探针对样品的 DNA 进行实时荧光 PCR 检测,对于 GS-F、GS-R 和 GS-P 引物探针组,只有转基因甜菜 H7-1、非转基因甜菜荷兰 KUHN8060、非转基因甜菜吉甜 204 样品和 GS-GTSB77 质粒有扩增曲线,其他样品无典型扩增曲线,表明甜菜内源基因 GS 扩增结果正确,提取的 DNA 模板质量符合品系特异性实时荧光 PCR 要求(图 4A)。GTSB77-F、GTSB77-R 和 GTSB77-P 引物和探针组只有 GS-GTSB77 质粒的 DNA 模板有典型荧光扩增曲线,其他样品 DNA 均无典型扩增曲线(图 4B),表明本试验建立的检测方法对 GTSB77 的检测具有特异性。



注:A为GS-F、GS-R和GS-P引物探针组;B为GTSB77-F、GTSB77-R和GTSB77-P引物和探针组

图 4 品系特异性实时荧光 PCR 特异性测试

Figure 4 Specificity test of the established method

2.3 检测线性范围测试及标准曲线建立

将提取 GS-GTSB77 质粒 DNA 溶液加 TE 缓冲液分别稀释至 800 000、80 000、8 000、800、80、40、8 和 4 拷贝/ μl 作为 DNA 模板,实时荧光 PCR 检测反应体系和反应程序见 1.2.3。

测试结果显示见表 2,在 16~1 600 000 拷贝范围内 7 个浓度梯度的 3 个平行组均能有典型扩增曲线,在最低浓度 16 拷贝时 GS 和 GTSB77 的 RSD 分别为

0.57% 和 1.66%,小于 25%,所以设定本试验建立的检测方法的定量限(LOQ)为 16 拷贝。以模板量的对数值与所得 Ct 值建立标准曲线,GTSB77 的线性方程为 $y = -3.279x + 41.461$,相关系数(R^2)为 0.998 9,扩增效率为 102%;GS 的线性方程为 $y = -3.1681x + 40.996$, R^2 为 0.997 4,扩增效率为 106%,均介于 90%~110%之间,表明其线性相关性良好,扩增效率高,均符合欧洲转基因检测网络实验室(ENGL)中定量检测方

法的相关要求^[7],可应用于 GTSB77 的定量检测。

2.4 可重复性测试

由表 2 可知,16~1 600 000 拷贝浓度范围内

RSD 介于 0.12%~1.66% 之间,均小于 25%,在可接受的范围之内^[7],表明本试验建立的 GTSB77 品系特异性实时荧光 PCR 方法可重复性良好。

表 2 品系特异性实时荧光 PCR 方法的灵敏度及可重复性测试

Table 2 Sensitive tests and repeatability tests for the established real-time PCR method

拷贝数	检测目标	Ct 值			平均值	RSD/%
		1	2	3		
1 600 000	GTSB77	21.15	21.03	20.95	21.04	0.48
	GS	21.65	21.67	21.70	21.67	0.12
160 000	GTSB77	24.46	24.52	24.28	24.42	0.51
	GS	24.20	24.18	24.40	24.26	0.50
16 000	GTSB77	27.75	27.44	27.67	27.62	0.58
	GS	27.44	27.37	27.27	27.36	0.31
1 600	GTSB77	31.13	31.02	30.82	30.99	0.51
	GS	30.56	30.89	30.83	30.76	0.57
160	GTSB77	34.69	34.31	34.51	34.50	0.55
	GS	34.62	33.57	34.35	34.18	1.60
80	GTSB77	35.41	35.29	35.43	35.38	0.21
	GS	35.35	35.12	35.63	35.37	0.72
16	GTSB77	37.87	36.79	36.82	37.16	1.66
	GS	37.15	36.91	36.73	36.93	0.57
8	GTSB77	—	—	38.89	38.89	—
	GS	—	38.72	—	38.72	—

注:—表示未检出

3 讨论

目前转基因甜菜上市的三个品系 GTSB77、T120-7 和 H7-1,仅欧盟建立了 H7-1 品系特异性实时荧光 PCR 方法(QT-EVE-BV-001)^[5],另外两个品系国内外均尚未有品系特异性检测方法。农业部 1485 号公告—3—2010《转基因植物及其产品成分检测 耐除草剂甜菜 H7-1 及其衍生品种定性 PCR 方法》^[8]和 SN/T 3959—2014《甜菜中转基因成分检测 普通 PCR 方法和实时荧光 PCR 方法》^[9]均引用 QT-EVE-BV-001 方法的引物、探针及体系建立转基因甜菜 H7-1 品系特异性检测方法。由于 GTSB77 和已获得我国农业部批准的转基因甜菜 H7-1 均为美国孟山都公司研发的抗草甘膦品系(主要外源基因均为 *epsps*),常规筛查来源于农杆菌 CP4 的 *cp4-epsps* 基因的思路无法区分这两个品系。目前检测 GTSB77 一般采用筛查 *uidA* 报告基因或 *gox* 基因,但由于 *uidA* 或 *gox* 也同样应用于其他转基因作物中,目前常见进境的甜菜产品大部分为加工后的甜菜粕,应用该类筛查的方法无法确定其是否夹带其他非法转基因作物,给监管非法转基因品系带来困难。本试验建立的 GTSB77 品系特异性实时荧光 PCR 检测方法特异性良好,扩增效率为 102%,GTSB77 最低定量检测下限为 16 拷贝,有效解决了目前国内外无 GTSB77 品系特异性检测方法的问题,通过调整优化扩增体系和反应参数还可建立 GS 和 GTSB77 双重实时荧光

PCR,可进一步降低检测成本和提高检测通量,本方法的建立可应用于海关检验检疫、国内农产品等监管中 GTSB77 及其产品的标识性检测。

参考文献

- [1] ISAAA's GM Approval Database [DB/OL]. <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/>.
- [2] Food Standards Australia New Zealand [Z/OL]. <http://www.foodstandards.gov.au/Pages/default.aspx>.
- [3] 卓勤.各国转基因食品标识制度概况分析[J].中国食品学报,2014,14(8):16-20.
- [4] 中华人民共和国农业部.农业转基因生物标识管理办法:农业部第 10 号令[Z].2002.
- [5] 刘二龙,卢丽,吕英姿,等.转基因苜蓿草 J101 品系特异性实时荧光 PCR 检测方法的建立[J].植物检疫,2015,29(3):77-82.
- [6] MAZZARA M, FOTI N, SAVINI C, et al. Quantitative PCR method for detection of sugar beet event H7-1: QT-EVE-BV-001 [S].2013.
- [7] European Network of GMO laboratories (ENGL). Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing [EB/OL]. (2008-10-13) [2019-06-25]. http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/Min-Perf-requirements_Analytical_methods.pdf.
- [8] 中华人民共和国农业部.转基因植物及其产品成分检测 耐除草剂甜菜 H7-1 及其衍生品种定性 PCR 方法:农业部 1485 号公告—3—2010[S].北京:中国农业出版社,2010.
- [9] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.甜菜中转基因成分检测 普通 PCR 方法和实时荧光 PCR 方法:SN/T 3959—2014[S].北京:中国标准出版社,2014.