

常丽娟, 宋 君, 雷绍荣, 等. 转基因玉米 MIR604 结构特异片段实时荧光定量检测方法的建立[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(5): 971-974.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.05.005

## 转基因玉米 MIR604 结构特异片段实时荧光定量检测方法的建立

常丽娟, 宋 君, 雷绍荣, 尹 全, 王 东, 刘文娟, 张富丽

(四川省农业科学院分析测试中心, 四川 成都 610066)

**摘要:** 根据转基因玉米 MIR604 外源载体序列, 设计引物和探针, 并优化反应体系和热循环条件, 建立了 MIR604 结构特异片段实时荧光定量 PCR 检测方法。采用该方法对 6 种非转基因作物、MIR604 及其他非目标转基因作物进行检测, 除 MIR604 外, 其余样品均未检测到 MIR604 分子片段的扩增信号; 对含量为 1% 的 MIR604 标准品进行定量检测, 测试样品平均含量为 1.05%; 灵敏度测试结果显示该方法能检测到仅 5 个拷贝的 MIR604 分子片段。因此, 本研究建立的方法具有较高的特异性、准确度及灵敏度, 能为中国转基因生物安全监管提供技术支持。

**关键词:** 转基因玉米; 结构特异性; 实时荧光定量 PCR; 灵敏度; 准确度

中图分类号: S634.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2015)05-0971-04

## A construct-specific real-time PCR for quantitative detection of genetically modified maize MIR604

CHANG Li-juan, SONG Jun, LEI Shao-rong, YIN Quan, WANG Dong, LIU Wen-juan, ZHANG Fu-li

(Analysis and Test Center, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China)

**Abstract:** A structure-specific quantitative PCR technique for the detection of genetically modified maize MIR604 was developed in this study to provide supports for genetically modified organism safety supervision in China by optimizing reaction system and thermal cycling condition. Six kinds of non-genetically modified crops, MIR604 and other non-target transgenic crops were detected. The fluorescent signal was only detected in MIR604. The measured value of 1% MIR604 was 1.05%. The sensitivity experiment revealed the method could detect only 5 copies of MIR604 molecular fragments. In conclusion, the structure-specific quantitative PCR detection method for genetically modified maize MIR604 is of high specificity, accuracy and sensitivity.

**Key words:** genetically modified maize MIR604; structure-specificity; sensitivity; accuracy

转基因玉米 MIR604 是瑞士先正达公司 2005 年研发的抗虫玉米, 该品系采用根瘤农杆菌介导法转入来自苏云金芽孢杆菌的 *Cry3A* 基因, 该基因编码的毒素蛋白由 3 个不连续的结构域组成, 对鞘翅

目昆虫具有特异毒性<sup>[1]</sup>。自 2007 年起, MIR604 先后在美国、菲律宾、俄罗斯、韩国和日本等多个国家被批准作为食品和饲料的加工原料。中国于 2008 年批准进口 MIR604 作为食品和饲料的加工原料。按照中国转基因标识管理办法规定, MIR604 及其加工产品必须进行标识。目前, 中国转基因生物安全检测体系中只有 MIR604 及其加工产品的定性检测标准<sup>[2]</sup>, 尚无相关的定量检测标准。欧盟曾经发布过基于 TaqMan 探针的实时荧光定量 PCR 检测标准<sup>[3]</sup>, 但国内尚未对该标准进行验证。为了研制适

收稿日期: 2015-01-15

基金项目: 四川省质监局标准化技术体系项目(ZYBZ2013-39)

作者简介: 常丽娟(1982-), 女, 四川成都人, 硕士, 助理研究员, 从事转基因生物安全监管研究。(Tel)18908186732; (E-mail)

juanjuanclj@126.com

通讯作者: 宋 君, (Tel)028-84504557; (E-mail) drsjn@126.com

合中国实验室的定量检测方法,本研究拟探索建立转基因玉米 MIR604 结构特异片断实时荧光定量 PCR 的检测方法,并对该方法的特异性、准确度及灵敏度进行分析,为中国转基因生物安全监管提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 植物材料 含量为 1% 和 10% 的转基因玉米 MIR604 标准物质 (Certified reference material, CRM) 及其他转基因作物粉末材料均购自欧盟联合研究中心测量与标准物质研究所 (IRRM, Institute for Reference Materials and Measurements, Joint Research Centre, Belgium); 非转基因玉米、水稻、大豆、棉花、油菜、甜菜材料由本实验室保存。

1.1.2 试剂与仪器 植物基因组 DNA 纯化试剂

和实时聚合酶链式反应试剂购自 TIANGEN® 天根生化科技(北京)有限公司。超微量分光光度计 Nanodrop® 1000, 由 Thermo Fisher Scientific Corporation 生产。实时荧光 PCR 系统 Real Time PCR System 7500, 由美国 Applied Biosystem Corporation 生产。

### 1.2 试验方法

1.2.1 DNA 的分离与纯化 按照植物基因组 DNA 纯化试剂盒 [ (TIANGEN®, 天根生化科技(北京)有限公司) ] 说明书分离、纯化转基因玉米 MIR604 基因组 DNA。

1.2.2 引物和探针设计 玉米内标基因 *zSSIb* 采用国家标准 GB19495.4-2004 中的引物序列<sup>[4]</sup>; 根据 MIR604 的载体序列 (<http://www.shgmo.org/welcome.html>) 设计引物和探针构建 MIR604 特异性片断(表 1)。

表 1 转基因玉米 MIR604 定量检测的引物和探针

Table 1 The primers and probes used for the quantitative detection of genetically modified maize MIR604

基因	引物和探针序列	扩增产物大小 (bp)
内源基因 <i>zSSIb</i>	<i>zSSIb</i> -F: 5'-CTCCCAATCCTTTGACATCTGC-3'	151
	<i>zSSIb</i> -R: 5'-TCGATTCTCTCTTGGTGACAGG-3'	
	<i>zSSIb</i> -P: 5'-FAM-AGCAAAGTCAGAGCGCTGCAATGCA-TAMRA-3'	
MIR604 分子片段	MIR604-F: 5'-GACGACTGTTTCATTGATTCTTCA-3'	87
	MIR604-R: 5'-GGGCCTCGGTGTTGTTGTC-3'	
	MIR604-P: 5'-FAM-ATCGAGCTTCTTTTCACCA-TAMARA-3'	

1.2.3 反应体系及条件 取 4.0 μl DNA 加入到 20.0 μl 反应体系 [TaqMan Master mix (2×) 10.0 μl, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 1.0 μl, 探针 (10 μmol/L) 0.5 μl, 补水至 20.0 μl], 运行程序如下: 95 °C 预变性 10 min, 1 个循环; 95 °C 变性 15 s, 59 °C 退火 60 s, 45 个循环。

1.2.4 方法的特异性、准确度和灵敏度检测

1.2.4.1 特异性 对非转基因玉米、水稻、大豆、棉花、油菜、甜菜以及 17 个转基因玉米转化体、5 个转基因水稻转化体、5 个转基因大豆转化体、3 个转基因棉花转化体、3 个转基因油菜转化体和 1 个转基因甜菜转化体进行了特异性检测, 确定方法的特异性。

1.2.4.2 准确度 分别提取 1% 和 10% 的转基因玉米 MIR604 基因组 DNA, 将 10% MIR604 基因组

DNA 按照 1 : 5 梯度稀释成 42.00 ng、8.40 ng、1.68 ng、0.34 ng、0.07 ng, 作标准曲线。以 1% MIR604 基因组 DNA 为检测样品进行定量检测, 检测样品重复 24 次扩增反应, 计算 1% MIR604 标准物质的测量值。

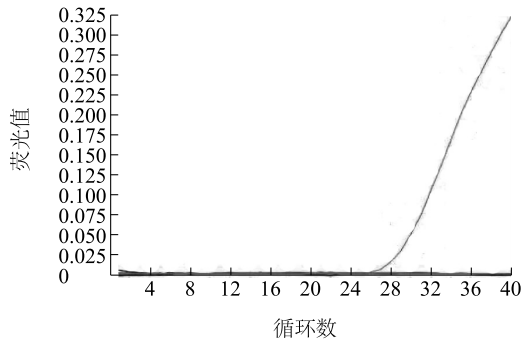
1.2.4.3 灵敏度 将转基因玉米 MIR604 的基因组 DNA 模板按照 1 : 2 梯度稀释成 0.22 ng、0.11 ng、0.06 ng、0.03 ng、0.01 ng, 每个梯度重复 8 次扩增反应。根据玉米基因组大小, 计算出每个梯度反应体系中 MIR604 分子片段的拷贝数。

## 2 结果与分析

### 2.1 方法的特异性

采用本方法设计的引物和探针对 6 种非转基因作物、转基因玉米 MIR604 及其他非目标转基因作

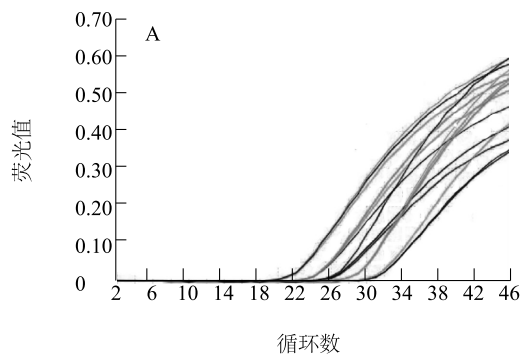
物进行检测,只有 MIR604 检测到扩增信号(图 1),其他非转基因作物和非目标转基因作物均未检测到扩增信号,显示本研究建立的检测方法具有很高的特异性。



S 型曲线为转基因玉米 MIR604 的扩增曲线;水平直线为非转基因作物及其他非目标转基因作物的扩增曲线。

图 1 转基因玉米 MIR604 扩增的特异性

Fig. 1 The specificity of the method for detection of genetically modified maize MIR604



A: 玉米内源基因 *zSSIb*; B: MIR604。

图 2 特异性定量 PCR 方法扩增曲线

Fig. 2 The amplification curves for the construct-specific quantitative PCR method

## 2.2 方法的准确度

为了验证方法的准确度,用 10% 转基因玉米 MIR604 的标准物质建立标准曲线,对 1% MIR604 进行定量检测,并连续重复 24 个平行样品。玉米内源基因 *zSSIb* 的标准曲线方程为  $Y = -3.40x + 31.72$ ,  $R^2$  为 0.996,扩增效率为 96.76% (图 2A); MIR604 分子片段的标准曲线方程为  $Y = -3.29x + 33.08$ ,  $R^2$  为 0.997,扩增效率为 101.49% (图 2B)。说明设计的引物和探针扩增效率高,建立标准曲线方程的数据对之间的线性关系好。采用本研究建立的方法对 1% MIR604 标准物质进行定量检测,测试样品平均相对含量为 1.05%,测量值与真实值的相对偏差为 5%,方法具有较高的准确度。

## 2.3 方法的灵敏度

为了确认方法的灵敏度,分别以不同拷贝数的 DNA 为模板进行实时扩增,8 次重复都有扩增信号的最低外源片段分子拷贝数为本方法的检测下限。试验结果表明本方法最低能检测到约为 5 个拷贝的 MIR604 核酸分子片段(表 2)。

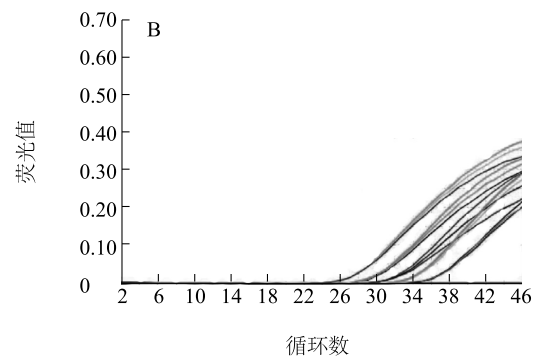


表 2 转基因玉米 MIR604 结构特异片段检测的灵敏度

Table 2 The sensitivity of the method for detection of construct-specific fragment of genetically modified maize MIR604

核酸量 (ng)	外源片段 分子拷贝数	平均 $C_t$ 值	标准偏差	相对标准 偏差 (%)
0.22	80	34.477	0.351	1.009
0.11	40	35.390	0.930	2.628
0.06	20	36.495	0.468	1.282
0.03	10	37.448	0.514	1.373
0.01	5	38.876	0.992	2.552

## 3 讨论

荧光定量 PCR 技术是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。实时荧光定量 PCR 可分为 SYBR Green I 染料法和 TaqMan 探针法。转基因成分定量检测普遍采用 TaqMan 探针法。与 SYBR Green I 染料法相比<sup>[5]</sup>,TaqMan 探针法由于要求引物和探针都要与 DNA 模板配对,在扩增反应过程中,通过外切核酸

酶切断与探针连接的荧光蛋白而产生荧光信号,排除了引物二聚体和非特异性扩增 DNA 片段所产生的荧光信号对试验结果的干扰,在对数扩增期收集的荧光信号只来源于目的基因的扩增,所以 TaqMan 探针法具有更高特异性和更可靠的检测结果。

转基因玉米 MIR604 投放市场后,欧盟、日本和韩国等先后建立了其实时荧光定量 PCR 检测方法,欧盟还在此基础上建立起了 MIR604 荧光定量检测标准。日本和韩国<sup>[6-7]</sup>建立了 MIR604 品系特异荧光定量检测方法,通过对方法特异性、准确度、灵敏度的评估,确认了方法的可行性。目前,中国尚无 MIR604 的定量检测标准。本研究建立的方法标准曲线斜率在-3.6 至-3.1 之间,扩增效率在 90% 至 110% 的范围内,决定系数大于 0.99,符合 TaqMan 探针法要求<sup>[8]</sup>;检测的最低含量为 5 个拷贝的 MIR604 分子片段。表明,该方法具有特异性好、准确度高和灵敏度高的特点,可作为转基因玉米 MIR604 的定量检测方法。

#### 参考文献:

[1] 袁美玲,邓日强,胡晓晖,等. 苏云金芽孢杆菌 cry1Aa 和 cry3A

结构域编码区的融合[J]. 农业生物技术学报,2002,10(3): 287-290.

[2] 农业部 1485 号公告-16-2010. 抗虫玉米 MIR604 及其衍生品种定性 PCR 方法[S].

[3] CRLVL04/05VP. Event-specific method for the quantification of maize line MIR604 using real-time PCR[S].

[4] GB19495.5-2004. 转基因产品检测核酸定量 PCR 检测方法[S].

[5] ROTT M E, LAWRENCE T S, WALL E M. Development of real-time PCR systems based on SYBR Green I amplifluore and Taqman technologies for specific quantitative detection of the transgenic maize event GA21[J]. Cereal Science, 2004, 39: 99-107.

[6] JUNICHI M, SATOSHI F, KAORI T, et al. Development and validation of event-specific quantitative PCR method for genetically modified maize MIR604[J]. Food Hyg Saf Sci, 2012, 53(4): 166-171.

[7] KIM J H, KIM H Y. Event-specific detection methods for genetically modified maize MIR604 using real-time PCR[J]. Food Science and Biotechnology, 2009, 18(5): 1118-1123.

[8] 张广远,孙红炜,李 凡,等. 转基因玉米 MIR162 转化事件特异性检测方法及其标准化[J]. 作物学报,2013,39(7):1141-1147.

(责任编辑:孙 宁)