

王恒波, 余泽怀, 肖乃衍, 等. 转基因番木瓜检测方法的建立[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(5): 1198-1200.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2018.05.032

## 转基因番木瓜检测方法的建立

王恒波<sup>1,2</sup>, 余泽怀<sup>3</sup>, 肖乃衍<sup>1,2</sup>, 张 华<sup>1,2</sup>, 陈平华<sup>1,2</sup>

(1. 福建农林大学国家甘蔗工程技术研究中心, 福建 福州 350002; 2. 农业部甘蔗及制品质量监督检验测试中心转基因检测室, 福建 福州 350002; 3. 福建农林大学金山学院, 福建 福州 350002)

**关键词:** 转基因番木瓜; 筛选; 定性聚合酶链式反应(PCR); 检测

**中图分类号:** S667.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2018)05-1198-03

## Establishment of detection method for transgenic papaya

WANG Heng-bo<sup>1,2</sup>, YU Ze-huai<sup>3</sup>, XIAO Nai-yan<sup>1,2</sup>, ZHANG Hua<sup>1,2</sup>, CHEN Ping-hua<sup>1,2</sup>

(1. National Engineering Research Center of Sugarcane, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. GMOs LAB of Quality Supervision Inspection & Testing Center for Sugarcane and Derived Products, Ministry of Agriculture, Fuzhou 350002, China; 3. Jinshan College of Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Key words:** transgenic papaya; screening; qualitative polymerase chain reaction (PCR); detection

番木瓜(*Carica papaya*)是一种有较高食用和药用价值的草本果树,番木瓜蛋白酶广泛应用于医药、美容、日化品等行业<sup>[1]</sup>。番木瓜环斑花叶病毒(PRSV)是危害番木瓜生产的一种世界性病毒,植株受到感染后,无法进行有效治疗,目前的化学杀菌剂不能有效控制其蔓延<sup>[2]</sup>。培育抗病品种是防治环斑花叶病毒最紧迫的任务之一,但番木瓜栽培品种中缺乏有效抗病基因资源<sup>[3]</sup>。直到1986年,Abel等<sup>[4]</sup>报道了病毒基因转入寄主植物,导致植物产生抗性的现象,受此启发,育种家们开始使用转基因技术解决番木瓜抗环斑花叶病毒问题,抗环斑病毒的转基因番木瓜应运而生。

目前,有3个转基因番木瓜转化事件存在。第一,20世纪90年代初夏威夷大学的Fitch等<sup>[5]</sup>,将一种环斑花叶病毒(PRSV)编码的外壳蛋白(CP)基因转入番木瓜,经过逐步杂

交育种,得到了转基因番木瓜Rainbow<sup>[6]</sup>,1998年5月在夏威夷正式投入商业化生产<sup>[7]</sup>。第二,利用PRSV优势毒株Ys的复制酶(RP)基因,获得高抗Ys、Vb、Sm等株系的转基因番木瓜华农一号,于2006年获得农业部的安全生产证书<sup>[8-9]</sup>。第三,将PRSV YK毒株的CP基因转入栽培品种台农2号,于2001年开始进行田间试验和生产安全评估试验<sup>[10-11]</sup>。

目前,针对番木瓜转基因成分筛查,还没有形成统一的检测方法,在检测相关标准中,关于胭脂碱合成酶基因启动子(NOS-P)和CP基因检测引物筛选和验证的相关报道较少。本研究拟针对世界上现有转基因番木瓜的CP基因和NOS-P,设计相应的检测引物,建立适合番木瓜转基因成分筛查的方法,为转基因标识制度的顺利执行提供技术支撑。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试验材料

转基因番木瓜(GMYK系列的16-0-1和Rainbow、华农一号)、转基因水稻(科丰6号、TT51-1)、转基因大豆(GTS40-3-2、MON89788、A2704、A5547-127)、转基因玉米(MON810、MON863、NK603、T25、TC1507、Bt11、Bt176、GA21)和非转基因番木瓜(红妃2号)等试验材料,均由农业部甘

收稿日期:2018-05-04

基金项目:国家标准化管理委员会标准制修订项目(20100644-T-326,20100643-T-326)

作者简介:王恒波(1982-),男,陕西乾县人,硕士,助理研究员,主要从事分子检测研究。(Tel)0591-83789177;(E-mail) wang-hengbo\_0354@126.com

通讯作者:陈平华,(Tel)0591-83789177;(E-mail)50088945@qq.com

蔗及制品质量监督检验测试中心保存。

## 1.2 试验方法

1.2.1 试剂 PCR 反应试剂 SYBR Premix、*ExTaq* 酶、dNTPs、Buffer 均购自 TaKaRa 公司,100 bp Ladder DNA marker 和植物基因组提取试剂盒(DP305)购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.2.2 PCR 检测引物 查阅 NCBI 网站上 GenBank 数据库中 *CP* 相关的核苷酸序列(编号为 FJ467933.1、AF196839.1 和 YK X78557.1),利用 Primer5.0 软件分别设计番木瓜环斑病毒 *CP* 基因和 NOS-P 的特异性检测引物。内源基因 *Papain* 检测引物采用文献[12]所述方法进行设计。试验中所用引物均由南京金丝瑞生物工程有限公司合成。

1.2.3 PCR 反应体系与程序 定性和定量 PCR 反应体系以及扩增程序参照文献[13]的方法进行设计。退火温度的优化:在梯度 PCR 仪上设置 10 个退火温度,分别为 50.2 °C、50.7 °C、51.6 °C、52.7 °C、54.0 °C、55.4 °C、56.8 °C、58.1 °C、59.2 °C、60.0 °C。

## 2 结果与分析

### 2.1 内源基因 *Papain* 的特异性 PCR 扩增

番木瓜果实中富含多糖、果胶、酚类等物质,极易对 *Taq* 酶的活性产生影响。通过对番木瓜内源基因 *Papain* 的检测,来判断提取 DNA 的质量。所有番木瓜样品均能获得与预期大小(211 bp)相符的扩增产物,表明番木瓜 DNA 适合 PCR 检测。

### 2.2 利用定量 PCR 染料法对 *CP* 基因和 NOS-P 检测引物进行验证

基于 *CP* 基因的保守序列,设计 5 对检测引物,在相同反应条件下,依据 *Ct* 值的大小、熔解曲线形状及熔解曲线高度,筛选出转基因番木瓜最佳的检测引物。*CP*-4 引物起峰最早,*Ct* 值为 24.87,*CP*-2 引物、*CP*-1 引物、*CP*-3 引物、*CP*-5 引物的 *Ct* 值分别为 28.60、27.02、26.62、25.76。分析 5 对引物熔解曲线的形状,只有引物 *CP*-4 是典型的单峰型曲线,最适合作为 *CP* 基因的检测引物,其他引物都存在多峰现象,表明存在多个非特异性扩增片段。同时,基于 NOS-P 序列,设计了 1 对检测引物,进行定量 PCR 扩增,NOS-P 引物的熔解曲线也是典型的单峰型曲线,适合作为 NOS-P 的检测引物。

### 2.3 不同退火温度下 *Papain*、*CP* 基因和 NOS-P 的 PCR 检测条件优化

同种引物在不同退火温度下产生的条带间存在强弱变化。随着温度的逐渐升高,*Papain* 基因产生的特异性目的条带没有发生任何变化,说明该引物设计合理且扩增效率高。NOS-P 检测引物产生的特异性条带,随着温度的逐渐升高,目的条带逐渐减弱,当退火温度达到 58.1 °C 时,目的条带消失,说明该引物退火温度范围窄,扩增效率低。*CP* 基因检测

引物产生的特异性目的条带,随着温度的升高逐渐增强,当退火温度为 56.8~60.0 °C 时,产生的目的条带亮度最强。为了防止低含量的转基因番木瓜在实际检测过程中漏检,本研究经过筛选得出,*Papain* 基因、*CP* 基因和 NOS-P 的最佳退火温度分别为 54.0 °C、58.0 °C、54.0 °C。

### 2.4 *CP* 基因和 NOS-P 检测引物特异性的 PCR 验证

针对 *CP* 基因的特异性检测,只有转基因番木瓜 16-0-1 和 Rainbow 出现了预期的 368 bp 的目的片段,华农一号未检测出目的条带。针对 NOS-P 的特异性检测,转基因番木瓜 16-0-1、Rainbow 和华农一号均出现了预期的 173 bp 的目的片段,其他测试材料均未检测到任何片段。本研究的检测结果与韩建勋等<sup>[14]</sup>的结果相符,表明本研究设计与筛选的引物在不同转基因材料中具有较高的特异性。

### 2.5 检测引物的灵敏度

将转基因番木瓜 16-0-1 和非转基因番木瓜红妃 2 号的 DNA 溶液(初始浓度均为 100 ng/μl)按不同比例混合,配制成转基因番木瓜 DNA 相对含量为 20.0%、5.0%、1.0%、0.5%、0.1% 的样品,在 *CP* 基因和 NOS-P 已经优化好的退火温度 58.0 °C、54.0 °C 下进行 PCR 扩增。本研究筛选出的检测引物具有很高的灵敏度,在相对含量为 0.1% 以上的样品中均能检测出特异性目的条带。

## 3 讨论

中国对转基因生物及产品实行强制标识制度,因此,需要检测机构对市场上的番木瓜进行转基因成分例行监测,以维护中国消费者的选择权和知情权<sup>[15]</sup>。根据检测的靶序列差异、外源基因与质粒载体上的组合以及植物基因组上的整合位点,检测方法分为筛选检测、基因特异性检测、结构特异性检测、转化事件特异性检测<sup>[9]</sup>。一般情况下,筛选检测以启动子、终止子等通用元件为检测对象,初步判断是否含有外源基因。番木瓜转基因成分筛查通常以 CaMV35S 启动子、NOS-P、NOS 终止子等元件为靶序列。基因特异性检测以转入的外源基因为靶基因,例如常见的目的基因、标记基因和抗性基因(*CP*、*RP*、*GUS*、*NPT II*)。对于转基因番木瓜,除了华农一号转入的是 *RP* 基因外,其他转基因番木瓜转入的都是 *CP* 基因,未见关于 NOS-P 和 *CP* 基因检测引物筛选和验证的相关报道。因此,本研究对转基因番木瓜 *CP* 基因和 NOS-P 分别进行序列比对,在其保守序列上设计引物,扩大检测的覆盖范围,更好地执行转基因生物标识制度。

目前,中国的转基因检测方法大部分是通过定性 PCR 方法对转基因生物进行判定,部分检测引物存在特异性差、灵敏度低的问题。加之,琼脂糖凝胶电泳分离技术的局限性,这就要求制定检测标准和筛选 PCR 检测引物的科研人员,不能仅停留在原有的筛选定性 PCR 引物上,需要向科学化、实用化的方向进行验证。本研究通过定量 PCR 染料法,对 *CP* 基因和 NOS-P 的定性检测引物进行熔解曲线分析,对

筛选到的引物进行特异性验证,检测结果与姜大刚等<sup>[9]</sup>、Wall等<sup>[12]</sup>、韩建勋等<sup>[14]</sup>描述的质粒载体结构相同。同时,以5种不同相对含量的转基因番木瓜为对照,检测灵敏度可以达到0.1%水平。

综上所述,本研究建立的转基因番木瓜检测引物筛选方法,为现有商业化转基因番木瓜的外源基因和元件筛查检测奠定了基础。同时,也构建了转基因番木瓜的基础检测体系与方法,为转基因番木瓜标识制度的顺利执行提供了技术支撑。但是,随着转基因番木瓜转化事件的逐渐增多,现有检测方法也存在着检测参数多、操作繁琐、灵敏度低等缺点。因此,需要逐步建立起各种转基因番木瓜转化事件定性和定量的检测体系,满足未来监管的需要。

### 参考文献:

- [1] 高艳梅,翟金玲,徐远峰,等. 抗 PRSV 转基因番木瓜研究进展[J]. 安徽农学通报, 2009, 15(3):36-38.
- [2] 张雨良,黄启星,朱丽娣,等. 海南地区番木瓜花叶病病原的分子鉴定与多样性分析[J]. 植物研究, 2014, 34(5):694-699.
- [3] 饶雪琴,李华平. 转基因番木瓜研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(6):38-42.
- [4] ABEL P P, NELSON R S, DE B, et al. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene[J]. Science, 1986, 232(4751): 738-743.
- [5] FITCH M M M, MANSHARDT R M, GONSALVES D, et al. Transgenic papaya plants from *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos[J]. Plant Cell Reports, 1993, 12(5): 245-249.
- [6] 方静平. 基因枪遗传转化对番木瓜基因组结构和功能的影响[D].福州:福建农林大学, 2016.
- [7] TENNANT P, FERMIN G, FITCH M M, et al. Papaya ringspot virus resistance of transgenic Rainbow and SunUp is affected by gene dosage, plant development, and coat protein homology[J]. European Journal of Plant Pathology, 2001, 107(6): 645-653.
- [8] RUAN X, LI H, ZHOU G. Evaluation of PRSV resistance of T2 transgenic papaya with replicase gene[J]. Journal of South China Agricultural University, 2004, 25(4):12-15.
- [9] 姜大刚,周峰,姚涓,等. 转基因番木瓜“华农一号”事件特异性定性 PCR 检测方法的建立[J]. 华南农业大学学报, 2009, 30(1):37-41.
- [10] CHENG Y H, YEH S D. Construction and evaluation of transgenic tobacco plants expressing the coat protein gene of papaya ringspot virus with different translation leaders[J]. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 2000, 41:1-10.
- [11] BAU H J, CHENG Y H, YU T A, et al. Field evaluation of transgenic papaya lines carrying the coat protein gene of Papaya ringspot virus in Taiwan[J]. Plant Disease, 2004, 88(6): 594-599.
- [12] WALL E M, LAWRENCE T S, GREEN M J, et al. Detection and identification of transgenic virus resistant papaya and squash by multiplex PCR[J]. European Food Research and Technology, 2004, 219(1): 90-96.
- [13] 王恒波,陈平华,陈如凯. 转基因植物及其产品 PCR 检测引物的筛选研究[J]. 热带农业科学, 2010, 30(11):10-14.
- [14] 韩建勋,陈红运,邓婷婷,等. 抗病毒转基因番木瓜的实时 PCR 检测[J]. 检验检疫学刊, 2010, 20(1):15-20.
- [15] 王立平,王东,龚熠欣,等. 国内外转基因农产品食用安全性研究进展与生产现状[J]. 中国农业科技导报, 2018, 20(3): 94-103.

(责任编辑:王妮)