

邢宇俊, 陆丹丹, 吴季荣, 等. 用于检测转基因作物中调控元件的质粒标准分子的构建[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(6): 1392-1400.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2018.06.027

用于检测转基因作物中调控元件的质粒标准分子的构建

邢宇俊, 陆丹丹, 吴季荣, 徐剑宏, 王园园, 梁杰, 史建荣

(江苏省农业科学院农产品质量与安全营养研究所/江苏省食品质量安全重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地/农业部农产品质量安全控制技术与标准重点实验室/农业部农产品质量安全风险评估实验室/江苏省转基因安全评价公共服务中心/江苏省现代粮食流通与安全协同创新中心/中德农产品质量安全评估技术研发中心, 江苏 南京 210014)

摘要: 为解决转基因农产品检测中阳性标准物质匮乏的问题, 利用重叠 PCR 技术将检测过程中常用的调控元件 CaMV35S 启动子、FMV35S 启动子、PAT29 启动子、Ubiquitin 启动子、NOS 启动子、35S 终止子、NOS 终止子和 E9 终止子依次连接获得融合片段, 再利用分子克隆技术将融合片段转化到载体 pMD-19T 中, 获得含有调控元件的标准质粒 pMD-RG。PCR 和测序结果验证了标准分子构建的正确性, 并且标准质粒的均匀性和稳定性比较好, 符合标准物质候选物的要求, 可代替阳性标准物质用于转基因成分的检测和研究。该质粒可用于大多数已经批准的转基因作物的检测和监管工作中。

关键词: 转基因作物; 质粒标准分子; 调控元件

中图分类号: TS207.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2018)06-1392-09

Construction of standard plasmid molecules of regulatory elements to detect genetically modified crop

XING Yu-jun, LU Dan-dan, WU Ji-rong, XU Jian-hong, WANG Yuan-yuan, LIANG Jie, SHI Jian-rong
(Institute of Food Safety and Nutrition, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Laboratory for Food Quality and Safety-State Key Laboratory Cultivation Base of Ministry of Science and Technology/Key Laboratory of Control Technology and Standard for Agro-product Safety and Quality, Ministry of Agriculture/Key Laboratory of Agro-product Safety Risk Evaluation, Ministry of Agriculture/Jiangsu Center for GMO Evaluation and Detection/Collaborative Innovation Center for Modern Grain Circulation and Safety/The Sino-German R&D Center for Agro-product Safety and Quality Control, Nanjing 210014, China)

Abstract: In order to solve the problem of the lack of positive standard material for PCR detection of genetically modified (GM) crops, common regulatory elements during the detection process, such as CaMV35S promoter, FMV35S promoter, PAT29 promoter, Ubiquitin promoter, NOS promoter, 35S terminator, NOS terminator and E9 terminator, were selected and connected successively by overlapping PCR technology to obtain the fusion gene fragments. The fragments were fused to pMD-19T vector to get the standard plasmid pMD-RG by the molecular cloning technology. The accuracy of standard molecular construction was verified by PCR and sequencing. The uniformity and stability of reference molecules were

very well, and the reference molecule could be used as the candidate of reference material. The constructed plasmids can be used in the detection and supervision of most approved GM crops.

Key words: genetically modified crop; standard plasmid molecules; regulatory element

收稿日期: 2018-01-11

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项 (2016ZX08011-003); 国家自然科学基金项目 (31301488); 江苏省农业科技自主创新基金项目 [CX(14)5065]

作者简介: 邢宇俊 (1977-), 女, 山东莱芜人, 博士, 副研究员, 主要从事转基因产品检测技术研究; (E-mail) xingyujun106@126.

com

通讯作者: 史建荣, (E-mail) shiji@jaas.ac.cn

自从首例转基因产品被批准商业化生产以来,

转基因作物在不同的国家和地区开始大规模地商业化种植,截至 2017 年,全球 24 个国家转基因作物种植面积达到 $1.898 \times 10^8 \text{ hm}^2$ ^[1]。越来越多的已批准的转基因农产品出现在市场上,比如:转基因玉米、大豆、油菜、苜蓿、木瓜、棉花、甜菜、马铃薯等^[1]。但随着转基因作物在全球范围内迅速发展,其环境和食品安全性问题一直受到人们的关注,因此,对转基因农产品的检测有利于政府职能部门对其进行监管和监督。

目前,转基因作物检测的常用方法是提取检测样品的 DNA,进行定性 PCR^[2]或定量 PCR 检测^[3]。在 PCR 检测过程中,必须设置阴性对照和阳性对照,确保检测结果的可比性、溯源性,标准物质的作用十分重要^[4-5]。检测结果的可靠性、准确性、有效性需要阳性标准物质(包括标准质粒)作对照,因此阳性标准物质在转基因农产品检测中是不可缺少的。

虽然现在转基因的转化体比较多,但市场上销售的标准物质种类有限,价格比较高,很多标准品来自欧盟标准物质与测量研究所(IRMM-CRL)和美国油料化学家协会(AOCS),种类主要包括转基因玉米、大豆、油菜、水稻、棉花、甜菜等 60 余种^[6]。而国内这些标准物质主要依赖于进口,而且以植物原材料制备标准物质非常复杂,不仅需要精密的仪器设备,而且对环境要求也比较高。虽然国内也有部分转基因标准物质商业化,例如由中国计量科学研究院研制的 Bt63,但种类有限。这些标准物质针对的是特定品系。根据转基因产品的特征,检测方法等,建立了相关的数据库,例如由上海交通大学建立的 GMDD(<http://gmdd.shgmo.org/>),以及欧盟转基因实验室建立的 ENGL(<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/engl/engl.html>)。通过比较转基因品系外源基因的信息,发现它们自身包含 1 种或几种特定的启动子或终止子,并不涵盖多个启动子或终止子。玉米中常使用的调控元件是 CaMV35S 启动子(35S)、NOS 启动子(PNOS)、FMV35S 启动子(FMV35S)、PTA 29 启动子(PTA29)、Ubiquitin 启动子(Ubiquitin)、35S 终止子(t35S)、nos 终止子(tNOS)、E9 终止子(tE9)。因此,选择这些调控元件构建阳性质粒,可以更好地用于农产品中转基因成分的检测。

阳性标准质粒分子的构建是采用目的外源基因

片段进行特异性扩增,重组于质粒分子上,转入微生物中进行大量培养。优点是质粒 DNA 容易提取且纯度高,稳定性好,并且一个质粒分子中可以包含多个外源目的基因^[7]。可以有效解决阳性标准品缺乏和阳性标准品制备困难的问题,因此被称为“金标准物质”^[8]。

随着国内外对转基因检测要求的不断提高,检测方法开始从定性 PCR 向定量 PCR 转变,用质粒分子作为定量标准物质易于操作。现阶段,国内质粒分子标准物质已经在玉米^[9-10]和大豆^[11]转基因检测中得到很大的发展,并且已有质粒分子标准物质(MON810)申请了有证标准物质^[12]。但是这些研究是针对一种转化体或一类作物,而在没有标准物质的经济作物、蔬菜、未知材料的检测时,需要通用型标准物质。因此,本研究根据转基因品种调控基因的特性,将多个启动子和终止子整合到质粒分子中,构建标准质粒分子,用于大多数已经批准的转基因作物的检测和监管。

1 材料与方法

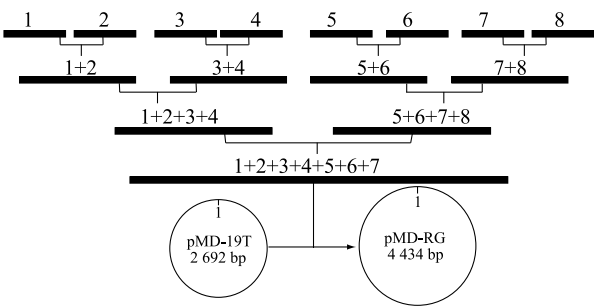
1.1 植物样品与试剂

Taq DNA 聚合酶购自 Promega 生物技术(美国)有限公司,植物基因组提取试剂盒购自 Axygen 生物技术有限公司,质粒提取试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司, DNA marker、dNTPs、pMD-19T 购自 TaKaRa 生物工程(大连)有限公司。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。大肠杆菌 DH5a 菌株本实验室保存。转基因大豆品系 GTS 40-3-2、MON87705、MON89788 和 A5547-127,转基因玉米品系 Bt11、MON810、Bt176、NK603 和 TC1507,转基因油菜品系 GT73、MS1、RF1 和 Oxy235,购于美国 AOCS 公司和上海佑隆生物有限公司。转基因水稻 KF6 和 TT51-1 由农业部科技发展中心提供。

1.2 质粒 pMD-RG 的设计

针对国内外检测标准中通用元件基因,构建含有一批启动子(花椰菜花叶病毒 35S 启动子 CaMV35S、玄参花叶病毒 35S 启动子 FMV35S、烟草花药组织特异基因 TA29 启动子 PTA29、玉米泛素蛋白基因启动子 Ubiquitin、胭脂碱合成酶基因 NOS 的启动子 PNOS)和终止子(花椰菜花叶病毒的 35S 终止子 t35S、胭脂碱合成酶基因 NOS 终止子 tNOS、

豌豆 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶 *E9* 基因终止子 *tE9*) 的多靶标调控原件标准质粒分子,命名为 *pMD-RG*。设计的质粒图谱及大小见图 1。



1、2、3、4、5 分别代表启动子 *CaMV35S*、*FMV35S*、*PTA29*、*Ubiquitin*、*PNOS*,6、7、8 分别代表终止子 *t35S*、*tNOS*、*tE9*。

图 1 重叠 PCR 法构建标准质粒的示意图

Fig.1 Diagram of standard plasmid constructed by overlapping PCR

1.3 质粒 *pMD-RG* 的构建

根据 *CaMV35S*、*FMV35S*、*PTA29*、*Ubiquitin*、*PNOS*、*t35S*、*tNOS*、*tE9* 的相关序列信息以及国家标准中使用的引物序列,添加合适的引物互补接头(表 1),利用重组 PCR 技术将相邻片段连接起来,

表 1 重组 PCR 引物

Table 1 Overlapping PCR primers

启动子和终止子	引物名称	引物序列(5'→3')	扩增片段大小(bp)
<i>CaMV35S</i>	35S-F	GCTCCTACAAATGCCATCATTGC	195
	35S-FMV35S-R	ggtggatgtcttGATAGTGGGATT GTGCGTCATCCC	
<i>FMV35S</i>	FMV35S-F	AAGACATCCACCGAAGACTTA	210
	FMV35S-PTA29-R	ccacccaccttaAGGACAGCTCTTTTCCACGTT	
<i>PTA29</i>	PTA29-F	TAAGGTGGGTGGCTGGACTA	266
	PTA29-Ubiquitin-R	cttgccagtgttACTTGCACCACAAGGGCATA	
<i>Ubiquitin</i>	Ubiquitin-F	AACACTGGCAAGTTAGCAAT	314
	Ubiquitin-PNOS-R	acgtaaaacggcCCGTAATAAATAGACACCC	
<i>PNOS</i>	PNOS-F	GCCGTTTTACGTTTGGAAGTG	183
	PNOS-t35S-R	catgagcgaaacTTATGGAACGTCAGTGGAGC	
<i>t35S</i>	t35S-F	GTTTCGCTCATGTGTTGAGC	121
	t35S-tNOS-R	gcaacaggattcGGGGATCTGGATTTTACTACTG	
<i>tNOS</i>	tNOS-F	GAATCCTGTTGCCGGTCTTG	180
	tNOS-tE9-R	ccaatgccataaTTATCCTAGTTTGC GCGCTA	
<i>tE9</i>	tE9-F	TTATGGCATTGGGAAAAGTGT	273
	tE9-R	ATATATCTCTCGGTCATTAGAGGC	

引物中小写部分为接头。

构建示意图见图 1。首先用引物 35S-F/35S-FMV35S-R 扩增 *CaMV35S* 启动子,用引物 FMV35S-F/FMV35S-PTA29-R 扩增 *FMV35S* 启动子,将两部分扩增产物作为模板,用引物 35S-F/FMV35S-PTA29-R 进行重组 PCR,从而将 *CaMV35S* 启动子和 *FMV35S* 启动子 2 个片段连接在一起,以 *CaMV35S*+*FMV35S* 表示;同样的方法获得 *PTA29*+*Ubiquitin*、*PNOS*+*t35S* 和 *tNOS*+*tE9*。再以 *CaMV35S*+*FMV35S* 和 *PTA29*+*Ubiquitin* 扩增产物为模板,用引物 35S-F/*Ubiquitin*-*PNOS*-R 进行重组 PCR 扩增,获得 *CaMV35S* + *FMV35S* + *PTA29* + *Ubiquitin* 片段;以 *PNOS*+*t35S* 和 *tNOS* +*tE9* 的扩增产物为模板,利用引物 *PNOS*-F/*tE9*-R 进行重组 PCR 扩增,获得 *PNOS*+*t35S* +*tNOS*+*tE9*,最后以 *CaMV35S* + *FMV35S* + *PTA29* + *Ubiquitin* 和 *PNOS* + *t35S*+*tNOS*+*tE9* 的扩增产物为模板,利用引物 35S-F/*tE9*-R 进行重组 PCR 扩增,获得 *CaMV35S*+*FMV35S*+*PTA29*+*Ubiquitin* +*PNOS*+*t35S* +*tNOS*+ *tE9* 的整体序列,用于质粒分子调控元件的构建。将构建好的质粒转入大肠杆菌感受态细胞 *DH5a* 中,挑选单克隆在 LB 培养基(含有 Amp)中培养,培养条件 200 r/min, 16 h。提取质粒进行验证。

1.4 重叠 PCR 扩增

用添加互补接头的特异性引物分别扩增出含有接头的基因片段。PCR 体系:10×PCR buffer 2.500 μl, Mg²⁺ 2.500 μl, dNTPs (2.5 mmol/L) 2.000 μl, 上游引物 0.750 μl, 下游引物 0.750 μl, DNA 模板 (50~100 ng) 1.250 μl, *Taq* DNA 聚合酶 0.125 μl, 补水至 25.000 μl。反应程序:94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 58 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 40 s, 循环 35 次; 72 ℃ 延伸 7 min。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳分析, 将获得的正确片段条带进行切胶回收。

将含有互补接头的胶回收产物进行连接, 进行重叠 PCR。PCR 体系:10×PCR buffer 2.50 μl, Mg²⁺ 2.50 μl, dNTPs (2.5 mmol/L) 2.00 μl, DNA 模板各 1.00 μl, *Taq* DNA 聚合酶 0.25 μl, 补水至 25.00 μl。反应程序:94 ℃ 预变性 2 min; 94 ℃ 变性 30 s, 58 ℃ 退火 10 min, 72 ℃ 延伸 3 min, 循环 15 次; 72 ℃ 延伸 10 min。反应体系中添加第 1 段基因的正向引物和第 2 段基因的反向引物, 其他反应体系和条件不变。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳分析, 将获得的大小正确的条带进行切胶回收。胶回收产物即为 2 个片段的连接产物。

1.5 重组片段克隆与验证

PCR 扩增得到的特异性片段与 pMD19-T 载体连接, 连接产物转化大肠杆菌感受态细胞 DH5a, 涂布含 Amp 的 LB 固体培养基, 37 ℃ 培养 12 h。挑取单菌落, 进行 PC 扩增验证和测序验证。

PCR 扩增验证:利用表 2 中不含接头的引物对标准质粒 pMD-RG 的外源插入基因进行验证, 检验所构建的质粒是否能够扩增预期的所有片段。PCR 反应体系和反应条件同方法 1.4 中含有接头的基因片段的扩增, 利用 2% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物, 比较目的基因扩增产物同预期片段大小是否一致。

测序验证:由生工生物工程(上海)股份有限公司完成质粒分子的测序验证。测序结果分别同 NCBI 进行 blast, 验证载体中序列的准确性。

1.6 pMD-RG 质粒分子检验及应用

按照标准物质的国家标准 JJG 1006-1994^[13], 对构建的标准质粒 pMD-RG 进行均匀性和稳定性检验。

均匀性检验:取样方法按国家标准 JJG 1006-1994 技术规范进行。将稀释至 1 μl 1×10⁶ 拷贝的质粒溶液以 500 μl 分装至冻存管中, 共分装 300 管。从中随机取 10 管, 分别标记为 1~10, 对各管质粒分

子中的每个目标片段进行检测。

稳定性检验:对质粒样品进行短期稳定性比较。将质粒溶液稀释至 1 μl 1×10⁶ 拷贝, 以每管 50 μl 分装至 0.2 ml 的 PCR 管内, 分别将样品置于 25 ℃、4 ℃、-20 ℃、-70 ℃ 存放, 在第 1 d、第 7 d、第 14 d、第 21 d 和第 28 d 时对质粒样品进行 PCR 检测, 对样品的稳定性进行比较。

pMD-RG 质粒分子的应用:分别以构建的标准质粒分子 pMD-RG 和基质标准品中提取的 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 比较质粒分子中各调控元件的扩增和稳定性与基质标准品是否一致。PCR 体系及扩增程序同方法 1.4 中含有接头的基因片段的扩增。

2 结果与分析

2.1 重叠 PCR 扩增获得的启动子和终止子重组片段

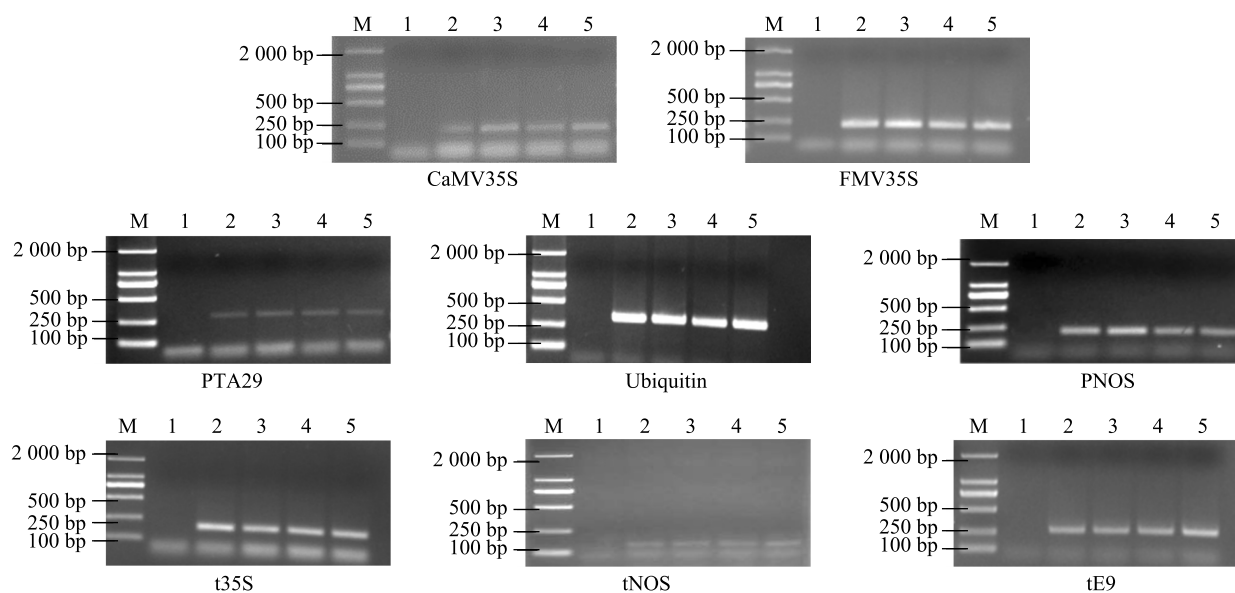
根据图 1 所示, 进行载体构建。利用表 1 中各基因的上游和带有互补接头的下游引物分别扩增, PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳分析, 结果见图 2。正确的片段切胶回收后, 将含有互补接头的胶回收产物进行连接, 以此作为模板进行重叠 PCR, 电泳后切胶回收获得连接产物, 即为 2 个片段的连接产物(图 2)。

确定条带大小正确后, 进行切胶回收, 再将 2 个片段连接起来。分别为 CaMV35S+FMV35S (405 bp)、PTA 29+Ubiquitin (580 bp)、PNOS+t35S (304 bp)、tNOS+tE9 (453 bp) (图 3A、图 3B、图 3C、图 3D)。之后再拼接上述片段, 即 CaMV35S+FMV35S+PTA 29+Ubiquitin (985 bp) 和 PNOS+t35S+tNOS+tE9 (757 bp) (图 3E、图 3F)。最后, 将 2 个大片段整合起来, 得到完整的 8 个调控元件的片断 (1 742 bp) (图 3G)。

2.2 转基因筛查阳性质粒的鉴定

利用分子克隆方法, 将重叠 PCR 扩增获得的重组片段连接到质粒载体 pMD-19T 上, 构建转基因筛查阳性质粒 pMD-RG。对重组质粒进行鉴定和验证。

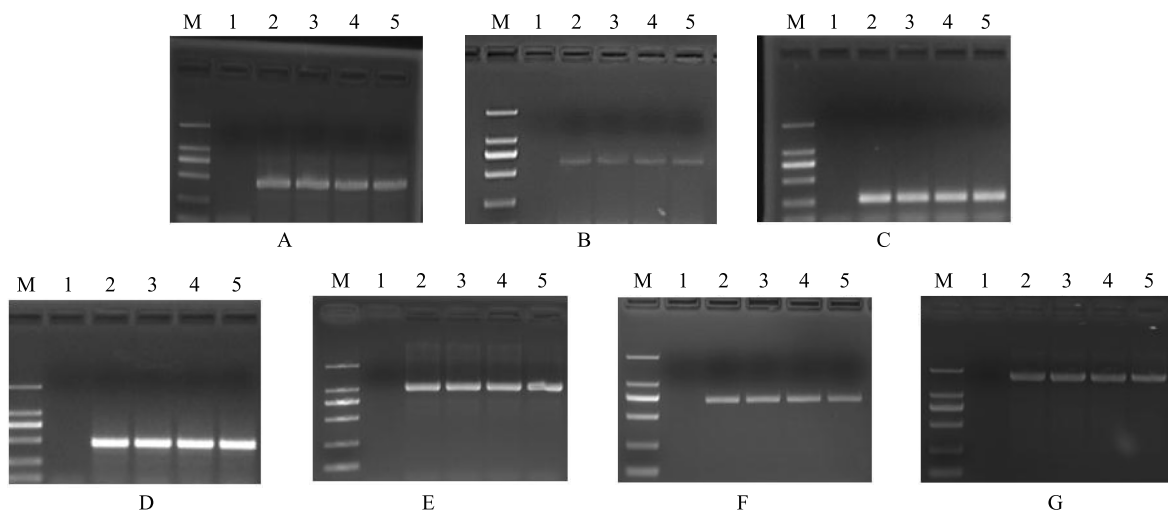
通过紫外分光光度计测量 DNA 纯度及质量浓度, 测定其在 260 nm、280 nm 处的紫外光吸收值, 将质量浓度稀释为 50 ng/μl。测定结果表明, 260 nm 与 280 nm 处的吸光值比值在 1.80 至 2.00 之间, 260 nm 与 230 nm 处的吸光值比值在 2.0 至 2.3 之间, 说明 DNA 纯度符合质粒标准分子要求。



M:DL 2000 bp marker;1:阴性对照;2~5:模板为含有目标基因的转基因材料;启动子 CaMV35S 和终止子 tNOS 以转基因大豆 GTS40-3-2 为模板;启动子 FMV35S、终止子 tE9 以转基因油菜 GT73 为模板;启动子 PTA29 以转基因油菜 MS1 为模板;启动子 PNOS 以转基因油菜 RF1 为模板;终止子 t35S 以转基因玉米 Bt176 为模板;启动子 Ubiquitin 以转基因玉米 MON810 为模板。

图 2 转基因作物中启动子和终止子的扩增

Fig.2 Amplification of promoter and terminator of transgenic crops



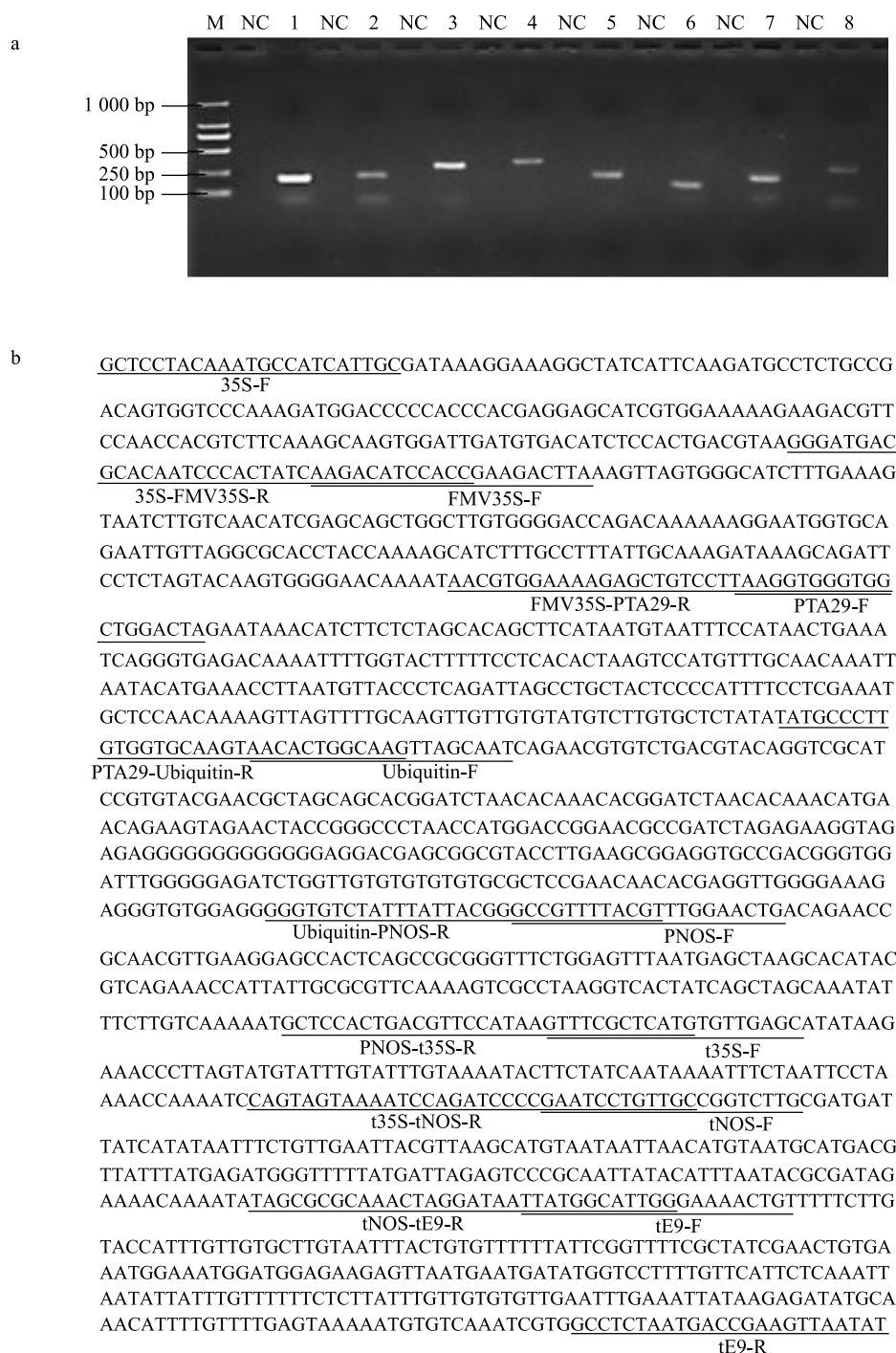
M:DL 2000 bp marker;1:阴性对照;2~5:连接后的片段。A: CaMV35S + FMV35S; B: PTA29 + Ubiquitin; C: PNOS + t35S; D: tNOS + tE9; E: CaMV35S + FMV35S + PTA29 + Ubiquitin; F: PNOS + t35S + tNOS + tE9; G: CaMV35S + FMV35S + PTA29 + Ubiquitin + PNOS + t35S + tNOS + tE9。

图 3 启动子和终止子的连接片段

Fig.3 The segment connection of promoters and terminators

利用表 1 中各基因的上、下游引物,对标准质粒 pMD-RG 的外源插入片段进行验证^[14-15]。结果显示,扩增条带片段大小与预期片段大小一致(图 4),各片段大小分别为 CaMV35S 195 bp、FMV35S 210 bp、PTA29 266 bp、Ubiquitin 314

bp、PNOS 183 bp、t35S 121 bp、tNOS 180 bp、tE9 273 bp,表明载体构建成功。同时对质粒分子进行测序验证(图 4)。BLAST 分析结果表明:pMD-RG 克隆序列长 1 742 bp,与实际碱基序列完全吻合。



a 图中, M 为 DL 2000 bp marker, NC 为空白对照, 1~8 依次为 CaMV35S、FMV35S、PTA29、Ubiquitin、PNOS、t35S、tNOS、tE9; b 图中, 下划线表示质粒标准分子构建中所用的引物位置。

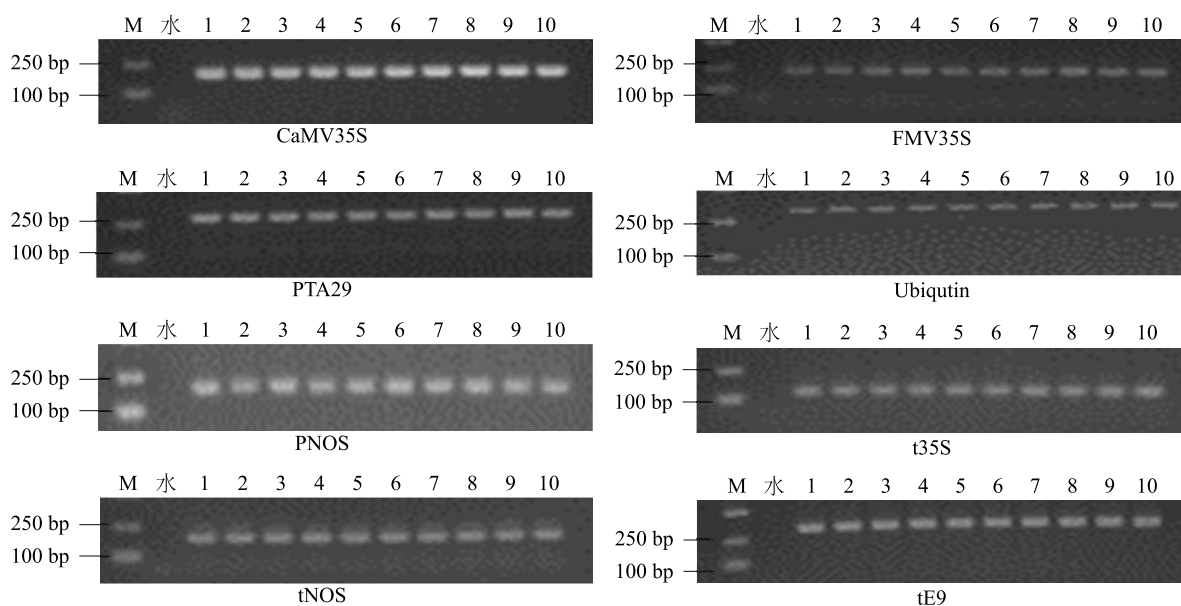
图 4 标准质粒 pMD-RG 的 PCR 扩增验证 (a) 和测序验证 (b)

Fig.4 PCR amplification and sequencing validation of standard plasmid pMD-RG

2.3 pMD-RG 质粒分子的均匀性和稳定性

将 pMD-RG 质粒标准分子同一稀释到 $1 \mu\text{l}$ 1×10^6 拷贝, 分装, 随机抽取其中的 10 管进行均匀性检

验。PCR 扩增结果(图 5)显示 10 管质粒标准分子都扩增出对应的 8 个调控基因片段, 说明质粒标准分子各管间均匀性良好。



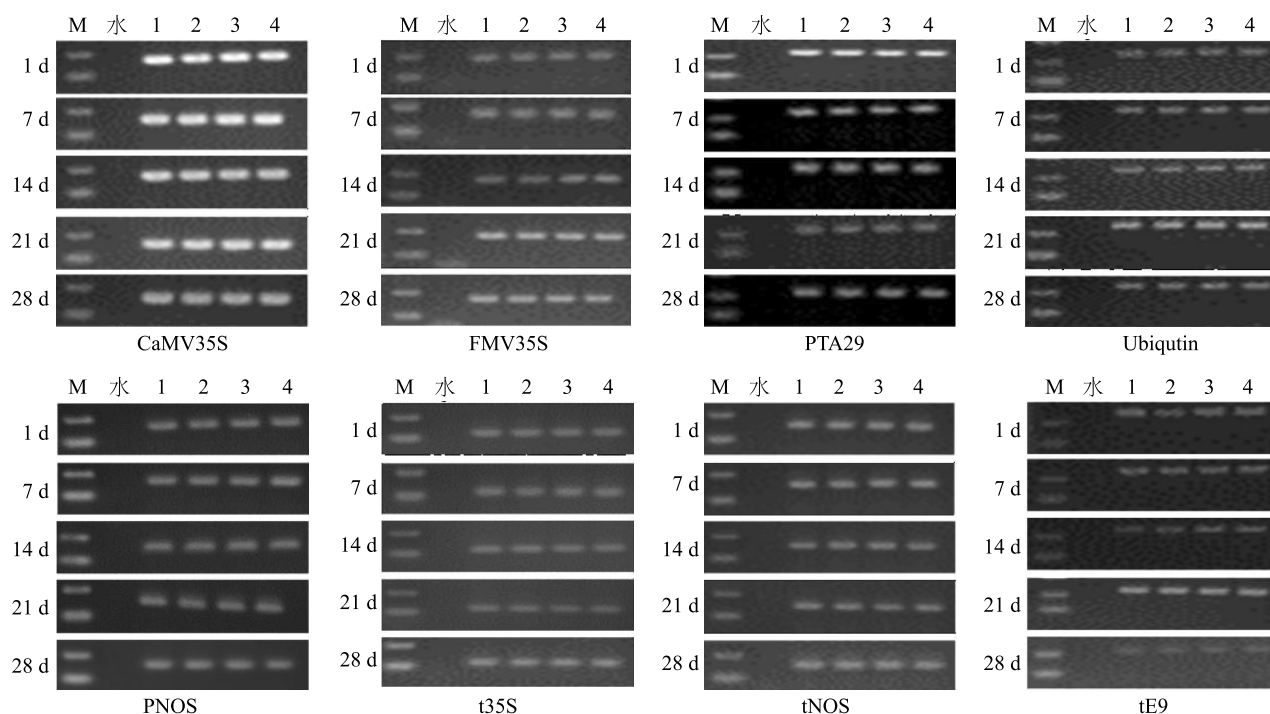
M: DL 2000 bp marker; 1~10: 随机抽取的 10 管质粒分子。

图 5 pMD-RG 质粒标准分子均匀性验证

Fig.5 Verification of uniformity of standard plasmid molecules of pMD-RG

对 pMD-RG 质粒分子进行短期内稳定性检验。PCR 扩增结果(图 6)表明, pMD-RG 质粒分别在 25 °C、4 °C、-20 °C、-70 °C 温度下存放 1 d、7 d、14 d、

21 d、28 d, 扩增结果均很好。说明短期内 pMD-RG 标准质粒稳定性好, 扩增结果可靠。



M: DL 2000 bp marker; 1: 25 °C; 2: 4 °C; 3: -20 °C; 4: -70 °C。

图 6 pMD-RG 质粒标准分子的稳定性验证

Fig.6 Verification of stability of standard plasmid molecules of pMD-RG

2.4 pMD-RG 质粒分子的应用分析

对构建的质粒 pMD-RG 进行 PCR 扩增鉴定。从表 2 可以看出,质粒 pMD-RG 中各调控元件均得

到了扩增并与基质标准品的结果一致,证明构建的含调控元件的筛查质粒分子 pMD-RG 可以作为转基因作物检测的阳性标准品用于转基因成分检测。

表 2 转基因作物筛查质粒 pMD-RG 的 PCR 扩增鉴定
Table 2 PCR identification of screening plasmid pMD-RG for transgenic crop

转基因作物品种	CaMV35S	FMV35S	PTA29	Ubiquitin	PNOS	t35S	tNOS	tE9
Bt11	+	N	N	+	N	N	+	N
Bt176	+	N	N	+	N	+	N	N
MON810	+	N	N	+	N	N	N	N
NK603	+	N	N	+	N	N	+	N
TC1507	+	N	N	+	N	+	N	N
A5547-127	+	N	N	N	N	+	N	N
GT73	N	+	N	N	N	N	N	+
TT51-1	N	N	N	N	N	N	+	N
KF6	+	N	N	N	N	+	+	N
MS1	N	N	+	N	+	N	+	N
RF1	N	N	+	N	+	N	+	N
GTS40-3-2	+	N	N	N	N	N	+	N
MON89788	N	N	N	N	N	N	N	+
OXY235	+	N	N	N	N	N	+	N

+:检测出相应条带;N:没有检测出。

3 讨论

转基因作物的种植面积在逐年扩大。在中国,每年都有转基因品种获得进口证书,2017 年农业部发布转基因生物安全证书(进口)清单,批准孟山都、拜耳、先正达等公司的 16 个转基因生物安全证书(进口),涉及的转基因生物为大豆、玉米、油菜、棉花、甜菜,用途皆为“加工原料”^[16]。截至目前,中国进口的转基因产品扩大到 46 种,对这些获得进口证书的转基因产品的监管比较严格。然而,对进口产品中混杂的非法进口的转基因品种或实验室产品扩散的监管更为重要。对于未知产品的检测,当前采用的主要方法是通用元件基因检测,之后对转化体系进行分析。在检测过程中,阳性标准物质是检测过程中的标尺,然而由于来源于植物原材料本身的标准物质的制备过程非常复杂,需要精度很高的设备,生产成本较高,保存环境要求高等因素,获得所有不同转基因植物的标准样品难度比较大^[17]。而标准质粒分子是一种重组质粒分子,根据需要可组合转基因作物的内源基因,待检测的外源基因,转

化体特异性片段,该物种特异性片段,也可插入多组外源基因,并且制备上操作简便,生产成本低,容易获得高纯度质粒标准分子 DNA 样品^[18]。因此含有通用元件的质粒作为阳性对照在检测中使用比较便捷。

在质粒构建过程中,如果选择常规的质粒载体构建方法,一般利用酶切位点进行重组克隆,而有时酶切的选择和位点引入存在一定难度,同时在构建过程中要进行多次酶切和连接操作,这使得构建过程繁杂而且构建成本也较高^[19]。本研究中选择的重叠 PCR 技术比较方便快捷。重叠 PCR 最初是用于基因定点突变中^[20],后来被扩展应用到 2 个片段的拼接^[21]。该技术也曾其他质粒分子的构建中使用,设计的引物中有 18~25 个碱基重叠,重叠序列能将相邻的 8 个目标 DNA 片段连接^[22]。本研究将 8 个调控元件单独扩增后,利用重叠 PCR 技术将这些调控元件片段融合在一起,进行克隆,构建了含有 8 个调控元件的质粒载体,相对于引入酶切位点的重组克隆,该技术更便捷快速。

本研究构建的含有调控元件的标准质粒均匀性

一致,短期稳定性好。已构建好的标准质粒分子可以在低温环境下(4℃、-20℃、-70℃)保存3个月,对检测结果没有影响^[23-24]。用标准质粒作为标准物质,可以避免在检测过程中阳性物质的多次提取,减少阳性物质对实验室的污染。通过分析国外已批准商业化和国内处于环境释放阶段材料的插入元件信息,以及国内检测标准的需要,选择转化体中通用调控元件构建筛查质粒,构建的筛查质粒可以覆盖绝大多数转基因转化体,可作为转基因产品检测和监管的对照标准物质。

参考文献:

- [1] JAMES C. 2016年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势[J].中国生物工程杂志, 2017, 37(4):1-8.
- [2] INNIS M A, GELFLAND D H, SNINSKY J J, et al. PCR protocols: a guide to methods and applications[M]. San Diego: Academic press, 1990.
- [3] WISEMAN G. State of the art and limitations of quantitative polymerase chain reaction[J]. J AOAC Int, 2002, 85(3):792-796.
- [4] JACCAUD E, HÖHNE M, MEYER R. Assessment of screening methods for the identification of genetically modified potatoes in raw materials and finished products[J]. J Agric Food Chem, 2003, 51(3): 550-557.
- [5] FRÉDÉRIC D, ALINE M, ERIC J, et al. Design of multiplex calibrant plasmids, their use in GMO detection and the limit of their applicability for quantitative purposes owing to competition effects[J]. Anal Bioanal Chem, 2010, 396(6): 2151-2164.
- [6] 安娜,董美,李凯,等.转基因马铃薯检测用质粒标准分子研制[J].中国农业科技导报, 2017, 19(2): 124-130.
- [7] 沈平,李昂,章秋艳,等.转基因产品标准物质概述[J].中国生物工程杂志, 2015, 35(4): 107-111.
- [8] 徐俊锋,汪小福,陈笑芸,等.四种主要作物转基因筛查检测用标准质粒分子的构建及应用[J].农业生物技术学报, 2015, 23(9):1167-1177.
- [9] TAVERNIERS I, VAN BOCKSTAELE E, DE LOOSE M. Use of cloned DNA fragments as reference materials for event specific quantification of genetically modified organisms (GMOs) [J]. Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwk Toegep Biol Wet, 2001, 66(3b):469-472.
- [10] CHARELS D, BROEDERS S, CORBISIER P, et al. Toward metrological traceability for DNA fragment ratios in GM quantification. 2. Systematic study of parameters influencing the quantitative determination of MON 810 corn by real-time PCR [J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(9):3268-3274.
- [11] 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.
- [12] 李亮,王晶,隋志伟,等.转基因定量检测用质粒分子标准物质研究进展[J].生物技术通报,2012(2):48-52.
- [13] 国家标准物质研究中心.中华人民共和国国家计量技术规范—一级标准物质:JJG 1006-1994[S]. 北京:中国标准出版社, 1994:1452-1468.
- [14] MALCOLM B, PHILIPPE C, GORDON W, et al. Comparison of plasmid and genomic DNA calibrate for the quantification of genetically modified ingredients[J]. Eur Food Res Tech, 2006, 224(2): 249-258.
- [15] 高宏伟,陈长法,董道峰.转基因马铃薯PCR检测方法[J].山东农业大学学报(自然科学版), 2002, 33(4): 428-433.
- [16] 农业部. 16个转基因生物安全证书获批[J].中国农药, 2017(6):17-18.
- [17] HUANG C, PAN T. Event-specific real-time detection and quantification of genetically modified Roundup Ready soybean[J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(10):3833-3839.
- [18] LIEVENS A, BELLOCCHI G, DE B D, et al. Use of pJANUS-02-001 as a calibrator plasmid for Roundup ready soybean even GTS-40-3 detection; an interlaboratory trial assessment[J]. Anal Bioanal Chem, 2010, 396(6):2165-2173.
- [19] 金荣愉,崔海峰,俞晓平,等.含多个基因元件的质粒标准分子的构建与分析[J].农业生物技术学报, 2013, 21(10): 1249-1260.
- [20] HIGUCHI R, KRUMMEL B, SAIKI RK. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions [J]. Nucleic Acids Res, 1988, 16:7351-7367.
- [21] YOLOV A A, SHABAROVA Z A. Constructing DNA by polymerase recombination[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18: 3983-3986.
- [22] WANG X M, TENG D, YANG Y L, et al. Construction of a reference plasmid molecule containing eight targets for the detection of genetically modified crops[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 90: 721-731.
- [23] 金荣愉,安欣欣,崔海峰,等.不同插入片段长度对质粒储存稳定性的比较研究[J].农业生物技术学报, 2012, 20(12): 1359-1368.
- [24] 亨利,孔梅,杨冬铭.反复冻融质粒标准品对荧光实时定量PCR实验的影响[J].中国热带医学, 2010, 10(12): 1440-1442.

(责任编辑:张震林)