

袁磊^{1,2} 孙红炜¹ 赵蕾² 杨崇良¹ 尚佑芬¹ 路兴波^{1,*}

¹ 山东省农业科学院植物保护研究所, 山东济南 250100; ² 山东师范大学生命科学学院, 山东济南 250014

摘要: 采用基因组步移法和巢式 PCR 方法研究转基因玉米 MON 88017 外源基因插入位点旁侧序列特征, 获得了外源基因插入位点的左边界旁侧序列 504 bp, 包括 336 bp 的插入载体序列和 168 bp 的玉米基因组序列。根据此旁侧序列, 设计 MON 88017 转化事件特异性引物并进行定性 PCR 扩增, 扩增片段为 446 bp, 建立了转基因玉米 MON 88017 转化体特异性检测方法。该方法特异性强、灵敏度高(0.1%), 为转基因玉米品种 MON 88017 进出口检测和标识检测提供了技术基础。

关键词: 转基因生物; 事件特异性检测; 定性 PCR; MON88017 转化事件; 左边界旁侧序列

Analysis of Junction Sequence in the Transgenic Maize MON88017 and the Methods of Qualitative PCR Detection

YUAN Lei^{1,2}, SUN Hong-Wei¹, ZHAO Lei², YANG Chong-Liang¹, SHANG You-Fen¹, and LU Xing-Bo^{1,*}

¹ Institute of Plant Protection, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China; ² College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China

Abstract: The experiment was conducted to investigate the integration site of transgene in maize MON88017 and to establish event specific methods for qualitative detection of MON88017 based on the left border junction fragment, which was isolated with the amended GenomeWalker and Nested-PCR methods. Sequence alignment between the T-DNA sequence and isolated junction fragments showed a 504 bp junction fragment of MON88017 including 336 bp of T-DNA sequence and 168 bp of MON88017 genome DNA. MON88017 event-specific qualitative PCR method was established with the primers (MON88017-1F/R) targeting the junction regions to produce a 446 bp product. The limit of detection for qualitative PCR assay was 0.1%. The method developed in this work is highly specific, sensitive and suitable for MON88017 sample detection.

Keywords: GMO; Event-specific detection; Qualitative PCR; MON88017 event; Left border junction fragments

随着转基因玉米的大量种植及应用, 转基因产品开始大量进入我们的生活。由于转基因玉米及其产品对人类健康和生态环境可能存在潜在的不安全因素, 在转基因玉米及其产品是否有害没有定论之前, 转基因玉米及其产品的检测是非常重要的^[1]。为保障在农产品进出口贸易中的利益, 各国相继建立转基因标识制度, 对转基因检测技术的准确度和灵敏度提出了严格的要求, 各种转基因检测技术也成为研究热点^[2-3]。PCR检测主要包括筛选检测、基因特异性检测、载体特异性检测和事件特异性检测^[4-6]。PCR反应具有高灵敏度、高特异性和高效性的特点^[7], 是目前检测转基因农作物和食品中转基因成分最为成熟和广泛应用的方法^[8-9]。

美国Monsanto公司通过农杆菌介导转化方法, 将质粒载体PV-ZMIR39上构建的目的基因转到玉米Hi-II细胞中, 得到了转基因玉米MON88017。质粒载体PV-ZMIR39包含*cry3Bb1*和*cp4 epsps*两个基因表达盒。*cry3Bb1*基因来源于*Bacillus thuringiensis* subsp. *kumamotoensis* strain EG4691, 编码Cry3Bb1蛋白, 可以使转基因玉米MON88017抗玉米切根叶甲^[10]; *cp4 epsps*基因来源于农杆菌CP4菌株, 在MON88017中表达CP4 EPSPS蛋白(5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸合成酶), 由于CP4 EPSPS对草甘膦不敏感, 可以完成植物所需的芳香族氨基酸的新陈代谢, 因此能够起到抗草甘膦类除草剂的功能^[11]。对MON88017的分子生物学分析证实, 只有单一拷贝的*cp4 epsps*和*cry3Bb1*基因表达盒被整合到MON 88017的基因组中的单一点上; 各种表达元素完好无损; 没有任何细菌质粒骨架序列插入MON88017基因组^[12]。

本研究由国家转基因重大专项(2008ZX08012-001)和山东省农业科学院博士科研启动基金资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 路兴波, E-mail: luxb99@sina.com, Tel: 0531-83179095

Received (收稿日期): 2009-07-06; Accepted (接受日期): 2009-09-06.

本实验室采用基因组步移法和巢式 PCR 方法测定出 MON88017 外源 DNA 导入位点旁侧序列,并根据旁侧序列设计转化体特异性(event specific)PCR 检测引物,进行定性 PCR 扩增,确定了引物的最佳反应条件,从而建立起该转基因玉米品系的转化事件特异性检测方法。为规范转基因产品标识制度和进出口产品检验提供有力的技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

转基因玉米 MON88017(美国孟山都公司提供)、MON810、MON863、NK603、T25、TC1507、Bt11、Bt176、GA21 等 9 种,非转基因玉米郑单 958,转基因棉花 MON531,非转基因棉花中 49,转基因大豆 GTS40-3-2,非转基因大豆 1138-2。

1.2 主要试剂

DNA 提取试剂盒购自杭州博日公司, *Taq* DNA 聚合酶及 dNTPs、DNA 分子量标记(100 bp DNA marker)购自北京天根生化公司, BD GenomeWalker 试剂盒购自美国 Clontech 公司。由上海生工生物工程有限公司合成引物,上海博尚公司测序。

1.3 DNA 提取与制备

用博日 Biospin 植物基因组 DNA 提取试剂盒,从全部试材的种子中提取基因组 DNA。用紫外分光光度计测定 DNA 纯度和浓度。将 MON88017 DNA 溶液稀释到 $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ 备用。

1.4 DNA 酶切

采用 Clontech 公司的 BD GenomeWalker 试剂盒,将 MON88017 DNA 用 4 种限制性内切酶 *Dra* I、*Eco*R V、*Pvu* II、*Stu* I 分别置于 37 °C 酶切过夜(16~18 h)。然后分别取 5 μL 用 0.6% 琼脂糖凝胶电泳检测,出现弥散状条带,说明酶切完全。

1.5 DNA 的纯化

对上述酶切产物分别加入等量的苯酚、氯仿进行离心抽提,取上清液加 95% 乙醇、NaOAc 进行沉淀、离心,用 TE 溶解 DNA。

1.6 DNA 连接试剂盒接头

利用 BD GenomeWalker 试剂盒提供的连接酶将接头连接到酶切纯化后的 DNA 片段上,16 °C 温浴过夜,70 °C 水浴 5 min 终止反应,用 TE 溶解 DNA。

1.7 巢式 PCR

根据插入片段图谱,查阅相关资料获得 P-ract1 序列。根据试剂盒提供的接头巢式引物 AP1 和 AP2,利用 Primer premier 5.0 引物设计软件在序列 P-ract1 上设计两条巢式引物 P-ractgsp1 和 P-ractgsp2。以转基因玉米 MON88017 为模板进行两轮 PCR 扩增,引物对 AP1 和 P-ractgsp1 用于第一轮 PCR 反应,扩增体系 20 μL 。PCR 程序为 94 °C 25 s, 72 °C 3 min, 6 个循环; 94 °C 25 s, 64 °C 30 s, 36 个循环; 64 °C 延伸 7 min, 1 个循环。引物对 AP2 和 P-ractgsp2 用于第二轮 PCR,在第二轮 PCR 中用 1 μL 第一轮扩增产物的 50 倍稀释液作为模板,PCR 扩增体系和反应程序与第一轮 PCR 相同。用琼脂糖凝胶电泳检测第二轮 PCR 产物,将扩增出的清晰条带进行切割、纯化,克隆到 TA 载体上测序。对测序获得的序列进行同源性分析。

1.8 PCR 特异性检测

根据插入位点旁侧序列设计 3 对转基因玉米 MON88017 的品系特异性引物 MON88017-1F/R、MON88017-2F/R、MON88017-3F/R,对 3 对引物进行筛选和反应条件优化,确定最佳引物对。用优化好的引物对 MON88017、MON810、MON863、NK603、T25、TC1507、Bt11、Bt176、GA21 等 9 种转基因玉米、非转基因玉米郑单 958、转基因棉花 MON531、非转基因棉花中 49、转基因大豆 GTS40-3-2、非转基因大豆 1138-2 等 14 种 DNA 进行定性 PCR 扩增。PCR 程序为 95 °C 5 min 预变性; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s, 36 个循环; 72 °C 延伸 7 min。

1.9 MON88017 转化特异性定性 PCR 检测灵敏度

用郑单 958 DNA 对 MON88017 DNA 进行梯度稀释,DNA 浓度依次为 50%、10%、5%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、0。用优化好的特异性引物进行 PCR 检测。

2 结果与分析

2.1 测序结果分析

序列共 504 bp,绘于图 1。

5'-AAATTTTGTCTGAACCCCTAAAATCCCAGGACCGCCACCTATCATATACATACATGATCTTCTAAATACCCGATCAGAGCGCTAAGCAGCAGAATCGTGTGACAACGCTAGCAGCTCTCTCCAACACATCATCGACAAGCACCTTTTTTGGCCGGAGTATGACGGTGACGATATATTCAATTGTAAATGGCTTCATGTCGGGAAATCTACATGGATCAGCAATGAGTATGGTGGTCAATATGGAGAAAAAGAAAGAGTAATTA CCAATTTTTTTTCAATTCAAAAATGTAGATGTCCGCAGCGTTATTATAAAATGAAAAGTACATTTTGATAAAACGACAAATTACGATCCGTCGTATTTATAGGCGAAAAGCAATAAACAAATTATTCTAATTCGAAATCTTTATTTTCGACGTGTCTACATTCACGTCCAAATGGGGGCTTAGATGAGAAACTTCACGATTTGGCGCGCCAAAGCTTACTCGAGGTCATTCATATGCTTGA-3'

图 1 DNA 序列

Fig. 1 The sequence of DNA

序列同源性分析表明，从 5'端开始前 168 bp 为玉米基因组序列，从第 169 bp 至 3'末端为插入到玉米中的载体序列，其中从第 169 bp~479 bp 为间插序列，从第 480 bp 至 3'末端为水稻中 P-ract1 部分序列，P-ract1 是 *actin1* 基因启动子，驱动 *cp4 epsps* 基因表达。根据以上序列设计 3 对特异性引物(表 1)。

表 1 扩增所用引物

Table 1 Primer pairs used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'-3')	扩增片段长度 Fragment size(bp)
MON88017-1	Forward: TCCTGAACCCCTAAAATCCC Reverse: TTTCTCATCTAAGCCCCCAT	446
MON88017-2	Forward: GCTCTCTCCAACACATCAT Reverse: ACTCTTTCTTTTTCTCCATA	146
MON88017-3	Forward: ATTTGTCTGAACCCCTAA Reverse: TTTCTCCATATTGACCACCA	248

2.2 DNA 提取结果

利用 DNA 提取试剂盒提取和纯化 DNA。分别用玉米内参照基因(*zSSIb*)、棉花内参照基因(*Sad1*)、大豆内参照基因(*Lectin*)对提取的总 DNA 进行 PCR 扩增，结果玉米材料中能扩增出 88 bp 的目标片段，棉花材料中能扩增出 108 bp 的目标片段，大豆材料中能扩增出 118 bp 的目标片段，空白中不能扩增出任何片段(图 2)。表明提取的 DNA 质量较好，符合转基因植物 PCR 检测的要求。

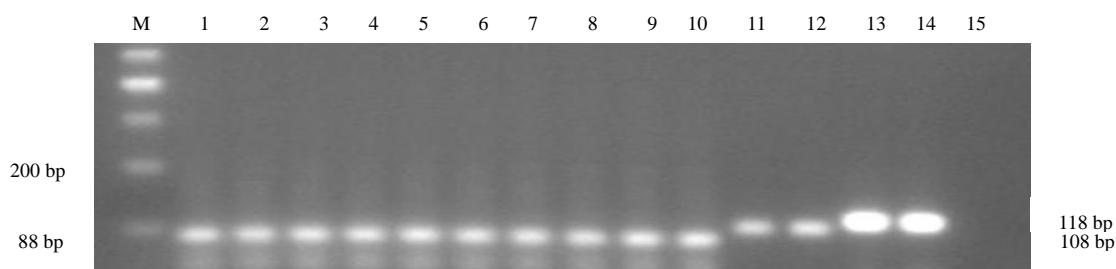


图 2 内参照基因(*zSSIb*, *Sad1*, *Lectin*)的扩增

Fig. 2 Amplification of endogenous reference gene

M: 100 bp DNA 分子量标记 ; 1: MON88017 ; 2: MON810 ; 3: MON863 ; 4: NK603 ; 5: T25 ; 6: TC1507 ; 7: Bt11 ; 8: Bt176 ; 9: GA21 ; 10: 非转基因玉米郑单 958 ; 11: 转基因棉花 Mon531 ; 12: 非转基因棉花中 49 ; 13: 转基因大豆 GTS40-3-2 ; 14: 非转基因大豆 1138-2 ; 15: 空白对照。

M: 100 bp DNA marker; 1: MON88017; 2: MON810; 3: MON863; 4: NK603; 5: T25; 6: TC1507; 7: Bt11; 8: Bt176; 9: GA21; 10: non-GM maize; 11: GM cotton Mon531; 12: non-GM cotton; 13: GM soybean GTS 40-3-2; 14: non-GM soybean1138-2; 15: Blank control.

2.3 转化体特异性 PCR 检测

对表 1 中 3 对特异性引物进行筛选和反应条件优化，确定最适的特异性引物 MON88017-1F/R，其最适退火温度为 56。用该引物对全部试材进行定性 PCR 扩增，只有 MON88017 出现 446 bp 的目的片段，其他均未出现任何扩增片段(图 3)，说明该引物 MON88017-1F/R 具有较高的特异性和准确性。

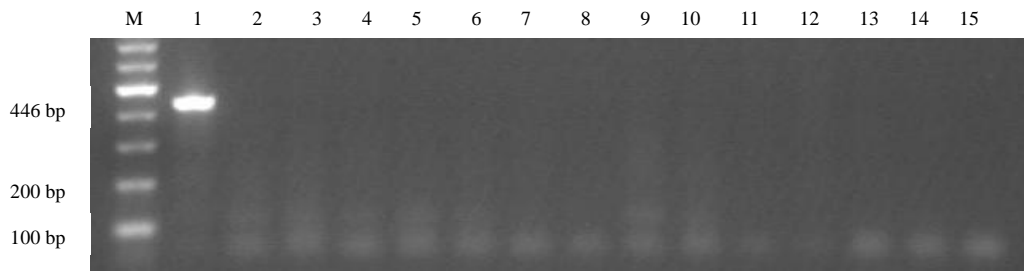


图3 特异性引物 MON88017-1F/R 的 PCR 检测

Fig. 3 Detection for event-specific primer pair MON88017-1F/R using PCR

M: 100 bp DNA 分子量标记 ; 1: MON88017 ; 2: MON810 ; 3: MON863 ; 4: NK603 ; 5: T25 ; 6: TC1507 ; 7: Bt11 ; 8: Bt176 ; 9: GA21 ; 10: 非转基因玉米郑单 958 ; 11: 转基因棉花 Mon531 ; 12: 非转基因棉花中 49 ; 13: 转基因大豆 GTS40-3-2 ; 14: 非转基因大豆 1138-2 ; 15: 空白对照。

M: 100 bp DNA marker; 1: MON88017; 2: MON810; 3: MON863; 4: NK603; 5: T25; 6: TC1507; 7: Bt11; 8: Bt176; 9: GA21; 10: non-GM maize; 11: GM cotton Mon531; 12: non-GM cotton; 13: GM soybean GTS 40-3-2; 14: non-GM soybean 1138-2; 15: Blank control.

2.4 转化体特异性 PCR 扩增灵敏度验证

用特异性引物 MON88017-1F/R 对不同浓度的 DNA 进行检测表明,在 MON88017 DNA 稀释至 0.1% 时,仍能扩增出 446 bp 的特异性目的片段(图 4),说明该转基因玉米的最低检测极限(即灵敏度)较高,为 0.1%。

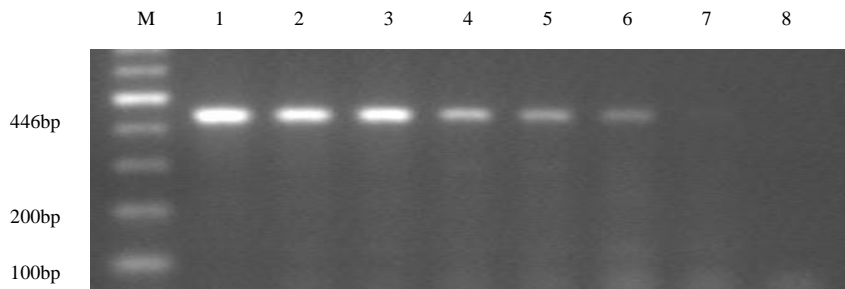


图4 特异性引物 MON88017-1F/R 的灵敏度检测

Fig 4 Sensitivity detections for event-specific primer pair MON88017-1F/R

M: 100 bp DNA marker; MON88017 DNA 浓度分别是 : 1: 50%; 2: 10%; 3: 5%; 4: 1%; 5: 0.5%; 6: 0.1%; 7: 0.05%; 8: 0.

M: 100 bp DNA marker; 1: 50%; 2: 10%; 3: 5%; 4: 1%; 5: 0.5%; 6: 0.1%; 7: 0.05%; 8: 0.

3 讨论

研究外源基因插入位点旁侧序列特征有多种方法,如反向PCR方法、TAIL-PCR方法、基因组步移法和随机引物PCR方法等。本实验采用基因组步移法和巢式PCR结合的方法,有效地消除了非特异性扩增,极大地提高了对特异靶标的扩增,具有简便、快速、特异性强、灵敏性高等优点^[13]。

PCR 反应中,最影响结果判断的是假阳性和假阴性的出现,本实验对所设计的引物反应条件如引物及模板浓度、退火温度等反应条件进行了反复摸索、优化,确定了最佳引物对及最适反应条件。内标基因(*zSSIIb*、*Sad1*、*Lectin*)的设定,排除了由于 DNA 质量以及实验操作等因素对检测结果可靠性的影响,避免了假阴性结果的发生。此外还设立了阳性、阴性及空白对照,并采取无菌操作等必要的预防措施,以防止样品及操作过程中的交叉污染等问题。根据 MON88017 左边界旁侧序列设计特异性引物进行定性 PCR 的检测方法具有可操作性强、稳定性好、特异性高和灵敏度高优点,适用于转基因玉米 MON88017 的定性检测。

由于定性 PCR 检测技术易受污染,而极微量的 PCR 产物污染,就有可能造成假阳性的结果,并且在 PCR 反应后期,由于 DNA 聚合酶活性减弱,引物与靶序列的结合几率变小和合成材料减少等因素影响,使 PCR 产物的终止拷贝数与样品中的起始靶序列浓度之间不可能建立线性关系,因此无法对转基因玉米进行准确定量。而目前国际上普遍采用实时荧光定量 PCR 检测方法对转基因产品进行准确定量检测,它具有特异性强、灵敏度高、重复性好、定量准确、速度快、全封闭反应等优点。笔者下一步将设计特异性的引物和探针,对转基因产品进行实时荧光定量 PCR 检测。

References

- [1] Jin W-J(金芫军), Hao Y(郝晔), Cheng H-M(程红梅), Lu X-B(路兴波), Peng Y-F(彭玉发), Jia S-R(贾士荣). Specific detection of Alien DNA sequences in six transgenic maize by using Multiplex PCR method. *J Agric Biotechnol* (农业生物技术学报), 2005, 13 (5): 562–567 (in Chinese with English abstract)
- [2] Knut J H. Genetically Engineered Food: Methods and Detection. Weinheim: Wiley-VCH, 2003. pp 28–40
- [3] Jin W-J(金芫军), Jia S-R(贾士荣), Peng Y-F(彭于发). Comparison of labeling policy of genetically modified products in different countries and territories. *J Agric Biotechnol* (农业生物技术学报), 2004, 12 (1): 1–7 (in Chinese with English abstract)
- [4] Gachet E, Martin G G, Vigneau F, Meyer G. Detection of genetically modified organism (GMOs) by PCR: a brief review of methodologies available. *Trends in Food Science and Technology*, 1999, 9: 380–388
- [5] Forte V T, Di Pinto A, Martino C, Tantillo G M, Grasso G, Schena F P. A general multiplex-PCR assay for the general detection of genetically modified soy and maize. *Food Control*, 2005, 16: 535–539
- [6] Tavemiers I, Windels P, Vaitilingom M, Milcamps A, Van Bockstaele E, Van den Eede G, De Loose M. Event-specific plasmid standards and real-time PCR methods for transgenic Bt11, Bt176, and GA21 maize and transgenic GT73 canola. *J Agric Food Chem*, 2005, 53: 3041–3052
- [7] Xu M-J(徐茂军). Detection of transgenic foods. *Food and Fermentation Industries* (食品与发酵工业), 2002, 27(12): 69–71 (in Chinese with English abstract)
- [8] Zimmermann A, Luthy J, Pauli U. Event specific transgene detection in Bt11 corn by quantitative PCR at the integration site. *Lebensm-Wissu-Technol*, 2000, 33: 210–216
- [9] Lee S H, Min D M, Kim J K. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction analysis for genetically modified maize MON863. *J Agric Food Chem*, 2006, 54: 1124–1129
- [10] Yang L, Xu S, Pan A, Yin C, Zhang K, Wang Z, Zhou Z, Zhang D. Event-specific qualitative and quantitative PCR detection of genetically modified MON863 maize based on the 5'-transgene integration sequence. *J Agric Food Chem*, 2005, 53: 9312–9318
- [11] Nielsen C R, Berdal K G, Holst-Jensen A. Characterisation of the 5'-integration site and development of an event-specific real-time PCR assay for NK603 maize from a low starting copy number. *Eur Food Res Technol*, 2004, 219: 421–427
- [12] Food Safety Commission of Japan. Maize Line MON88017 Tolerant to the Herbicide Glyphosate and Resistant to Coleopteran Pests. Safety Assessment of Genetically Modified Food, 2005. pp 7–10
- [13] Jiang G-Z(姜国忠), Xie H(谢华), Guo Y-Z(郭玉忠), Fan T-L(范天黎), Xue L-X(薛乐勋). The comparison between two techniques in isolating 3' flanking region of *Dunaliella salina* actin gene. *J Zhengzhou Univ (Med Sci)*(郑州大学学报·医学版), 2004, 39(1): 41–44 (in Chinese with English abstract)