

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.00208

## 转 *CryIAb* 基因水稻分子特征及其特异性 PCR 检测方法

汪小福<sup>1</sup>, 陈笑芸<sup>1</sup>, 张小明<sup>2</sup>, 周育<sup>1</sup>, 张焕春<sup>3</sup>, 缪青梅<sup>1</sup>, 方敬<sup>1</sup>, 徐俊锋<sup>1</sup>

1. 浙江省农业科学院农产品质量标准研究所, 杭州 310021;
2. 浙江省农业科学院作物与核利用研究所, 杭州 310021;
3. 沈阳师范大学化学与生命科学学院, 沈阳 110034

**摘要:** 转 *CryIAb* 基因水稻 Bt01 为一种新型的转基因水稻, 文章首先利用 Southern blotting 验证了外源基因 *CryIAb* 转入了 Bt01 中, 且为单拷贝, 再利用 TAIL-PCR 方法获得了其插入位点信息, 根据获得的 Bt01 的 5'端插入位点序列, 设计了相应的定性与定量 PCR 检测体系的引物及探针, 实验结果显示, 定性 PCR 检测体系的最低检测极限(LOD)为 10 个拷贝, 定量 PCR 检测体系的 LOD 为 5 拷贝, 最低定量极限(LOQ)为 10 拷贝。同时为了验证建立的定量 PCR 体系的准确性, 利用该体系检测已知转基因水稻 Bt01 含量分别为 3%和 0.5%的样品, 定量结果分别为 2.7%和 0.47%。研究结果表明, 该转化体特异性定性与定量检测方法具有高度的特异性和良好的灵敏性, 为转基因水稻 Bt01 的身份识别和检测提供了有效的方法。

**关键词:** 分子特征; 转基因; *CryIAb*; 定性与定量 PCR; 特异性检测

## Molecular characteristics and specific PCR detection of transgenic rice containing *CryIAb*

WANG Xiao-Fu<sup>1</sup>, CHEN Xiao-Yun<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-Ming<sup>2</sup>, ZHOU Yu<sup>1</sup>, ZHANG Huan-Chun<sup>3</sup>, MIAO Qing-Mei<sup>1</sup>, FANG Jing<sup>1</sup>, XU Jun-Feng<sup>1</sup>

1. Institute of Agricultural Quality and Standard, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China;
2. Institute of Crop and Nuclear Technology Utilization, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China;
3. College of Chemistry and Life Science, ShenYang Normal University, Shenyang 110034, China

**Abstract:** Bt01 is a new type of rice that has been genetically modified to express *CryIAb* protein. This study confirmed that *CryIAb* was inserted into Bt01 as a single copy using Southern blotting analysis. TAIL-PCR method was further used to obtain its insertion site information. Specific PCR primers and TaqMan probes were designed based on the 5'-integration junction sequence of transgenic rice Bt01. The results showed that the limit of detection (LOD) was ten copies in qualitative PCR. The quantitative PCR assay showed that the LOD was five copies, and the limit of quantification (LOQ) was ten copies. In addition, the accuracy of the established quantitative PCR was verified by detecting two samples containing 3% and 0.5%Bt01, respectively. The quantitative PCR analysis showed the results were 2.7% and 0.47%, respectively. The above results indicated that the event-specific PCR methods developed have high specificity and good sensitivity, which could be effective methods for identifying and testing the genetically modified Bt01 rice.

收稿日期: 2011-05-24; 修回日期: 2011-06-29

基金项目: 浙江省重大项目(编号: 2008C12074)和浙江省自然科学基金项目(编号: Y3090252, Y3090577)资助

作者简介: 汪小福, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 转基因检测与安全评价。E-mail: yywxfl980@126.com

通讯作者: 徐俊锋, 博士, 副研究员, 研究方向: 转基因检测与安全评价。E-mail: njjfxu@yahoo.com.cn

网络出版时间: 2011-11-30 10:35:40

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20111130.1035.005.html>

**Keywords:** molecular characteristics; transgenic; *CryIAb*; qualitative and quantitative PCR; specific detection

自首例转基因番茄“FLAVR SAVR”于 1994 年在美国批准商业化生产以来, 随着转基因技术迅速发展, 许多有价值的外源基因导入了植物中, 越来越多的转基因作物被批准在不同国家和地区商业化种植<sup>[1,2]</sup>。转基因作物在产量、经济和环境等方面带来的持续、显著的效益, 2010 年有 29 个国家种植了 1.48 亿公顷的转基因作物, 比 2009 年增长了 10%, 即 1400 万公顷, 1996 年至 2010 年间转基因作物种植面积增长了 87 倍, 目前种植的主要转基因作物有 4 种: 转基因大豆(7330 万公顷), 转基因玉米(4680 万公顷), 转基因棉花(2100 万公顷)和转基因油菜(700 万公顷)<sup>[3]</sup>。转基因技术成为农业近代史上利用最快的技术。

对水稻而言, 目前有许多抗虫、抗病、耐除草剂及营养成分改良的转基因水稻研发成功<sup>[4,5]</sup>, 考虑到水稻作为主要粮食作物的重要性及转基因作物在生物安全等方面的不确定因素, 各国对转基因水稻的商业化采取谨慎态度, 目前只有少数几个商业化转基因水稻品种, 如伊朗半商业化的 Bt 水稻, 美国的 LL62、LL06 和 LL601<sup>[3,6]</sup>。在过去的 10 年里, 我国转基因水稻研究发展迅速<sup>[7,8]</sup>。2009 年, 我国农业部颁发了转基因抗虫水稻华恢 1 号和转 *CryIAb*/*CryIAc* 基因抗虫水稻 Bt 汕优 63 在湖北省生产应用的安全证书<sup>[3]</sup>。

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<sup>[9-11]</sup>, 其中转化体特异性检测技术应用得最为广泛, 如在转基因棉花<sup>[12]</sup>、玉米<sup>[13]</sup>、油菜<sup>[14]</sup>和水稻<sup>[15]</sup>的定性定量检测中的应用。

Bt01 是利用农杆菌混合液介导的共转化法获得的抗虫水稻品系<sup>[16,17]</sup>, 在后代筛选过程中删除了抗生素筛选标记, 外源基因 *CryIAb* 的前端为组织特异性 Rubisco 启动子, 使得外源基因只在绿色组织如茎和叶中表达, 而不在花和种子中表达, 因而转基因水稻 Bt01 在食品与环境方面更加安全。该转基因水稻有较好的农艺性状和商业化种植潜力, 目前已经申请环境释放。本文研究了 Bt01 的分子特征, 并利用其 5' 端的侧翼序列建立了其转化体特异性定性与

定量 PCR 检测方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

转基因水稻 Bt01、Bt08 和 Bt10 及其受体品种 ZJ22 的种子由浙江省农业科学院张小明研究员提供, Bt01、Bt08 和 Bt10 是由同一载体转化体形成的不同转化体的转基因水稻。其他转基因水稻材料(TT51-1、KMD1、KF6)由农业部科技发展中心提供。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 DNA 提取

采用 CTAB 法<sup>[18]</sup>提取的基因组 DNA 用于 Southern blotting 及 TAIL-PCR<sup>[19]</sup>, 用试剂盒 Ver. 3.0 (宝生物工程(大连)有限公司)提取的基因组 DNA 用于定性与定量 PCR 及标准曲线的建立。DNA 试样的质量用琼脂糖凝胶电泳和核酸定量检测的方法进行评价。取一定量(3 ~ 5  $\mu$ L)DNA 溶液, 用含有溴乙锭的 1% 琼脂糖凝胶进行电泳分析, 判断其质量。同时用 GE 公司的 ultrospec 1100 核酸和蛋白定量分析仪对 DNA 试样进行浓度和纯度测定。

#### 1.2.2 Southern blotting 与 TAIL-PCR

用 *EcoR* 和 *Hind* (宝生物工程(大连)有限公司)分别酶切水稻基因组, KMD1 作为阳性对照, ZJ22 用作阴性对照, 杂交过程按 ECL 试剂盒(GE 公司)说明书进行。TAIL-PCR 技术的原理和扩增条件参照文献<sup>[19]</sup>。

#### 1.2.3 引物与探针

TAIL-PCR 的引物根据转化载体 pPZP201-Rubisco-Bt<sup>[16,17]</sup>的相关序列设计, 定性与定量引物及探针根据 Bt01 的外源基因的 5' 端的侧翼序列(图 1)和水稻内标准基因磷脂酶 D 基因(*PLD*)<sup>[20]</sup>的序列设计, 本研究所用的引物和探针利用美国 ABI 公司的 Primer Express 2.0 和加拿大 Premier 公司的 Primer Premier 5.0 软件设计。引物和探针由上海英俊生物科技有限公司合成, 其核苷酸序列和扩增片段长度见表 1。

表 1 引物与探针

| 目的                | 引物名称                 | 序列 (5'→3')                   | 产物大小(bp) | 参考文献 |
|-------------------|----------------------|------------------------------|----------|------|
| Tail-PCR          | Prub1                | AACCACCACACCAGACATAAT        |          | 本文   |
|                   | Prub2                | CCAAGTTGCCATGGATTACCG        |          | 本文   |
|                   | Prub3                | CTCTCTAATTGTTGGTTGGCC        |          | 本文   |
|                   | AD6                  | CATCGNCNGANACGAA             |          | [19] |
| 水稻内源基因 <i>PLD</i> | KVM159               | TGGTGAGCGTTTTGCAGTCT         | 64       | [20] |
|                   | KVM160               | CTGATCCACTAGCAGGAGGTCC       |          |      |
|                   | TM013 <sup>a</sup>   | TGTTGTGCTGCCAATGTGGCCTG      |          |      |
| 转基因水稻 Bt01(定量)    | Bt01-2F              | CAGCCTGAATGGCGAATGA          | 122      | 本文   |
|                   | Bt01-2R              | TTGCGGACGTTTCCTGATAGT        |          |      |
|                   | Bt01-1P <sup>b</sup> | CCTTGCCAACAGTTGCCAATTCAAACAC |          |      |
| 转基因水稻 Bt01(定性)    | Bt01-1F              | ACAGTTGCGCAGCCTGAATGG        | 200      | 本文   |
|                   | Bt01-1R              | CTGTTGCATGCACACGGATGG        |          |      |

注：<sup>a</sup>探针 5'端和 3'端分别标记报告基因FAM和淬灭基团BHQ1；<sup>b</sup>探针 5'端和 3'端分别标记报告基因FAM和淬灭基团TAMRA。

#### 1.2.4 定性定量 PCR 体系及反应条件

定性PCR体系为：10×PCR缓冲液(Mg<sup>2+</sup> Plus), 200 mmol/L dNTPs, 0.5 mmol/L正向引物, 0.5 mmol/L反向引物, 1.25 U的*Taq* DNA聚合酶和DNA模板。PCR程序为：95 3 min; 94 30 s, 55 30 s, 72 30 s, 35 个循环; 72 延伸 7 min。PCR产物用 2%的琼脂糖凝胶进行电泳。

定量 PCR 反应体积为 25 μL, 12.5 μL 2×*Taq*Man 通用 Mix, DNA 模板(5 μL), 引物各 300 nmol/L, 100

nmol/L 探针和 5.2 μL 的水。定量 PCR 扩增的反应条件为：95 10 min; 95 10 s, 60 60s, 共 45 个循环。每个试样平行做 4 个反应, 重复实验 4 次。

#### 1.2.5 标准曲线与样品的制备

水稻单倍体基因组大小为 430 Mb, 相应的质量为 0.47 pg。以此来计算相应的标准品的拷贝数。用 0.1×TE 缓冲液稀释 Bt01 基因组 DNA, 用作外源基因和内源基因 *PLD* 标准曲线的样品分别为 50 000、10 000、1 000、100 和 10 拷贝。用非转基因受试品

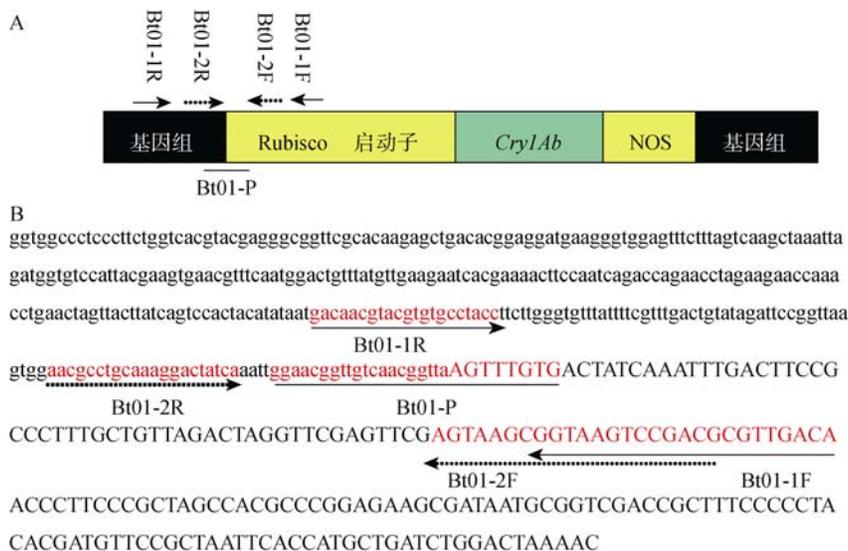


图 1 转基因水稻 Bt01 旁侧序列

A : Bt01 旁侧序列载体及引物设计位置; B : Bt01 其 5'端侧翼序列, 其中小写字母的序列为水稻基因组序列, 大写字母的为载体启动子序列, 所有引物和探针显示红色, 其中定性引物下划线为带箭头实线, 定量引物下划线为带箭头虚线, 探针下划线为不带箭头的实线。

种 ZJ22 的基因组 DNA 稀释 Bt01 基因组 DNA, 获得转基因含量分别为 3.0% 和 0.5% 的样品, 用于验证定量 PCR 的准确性。

## 2 结果与分析

### 2.1 杂交分析

杂交探针用外源基因 *CryIAb* 的部分序列, KMD1 转有相同的基因<sup>[21]</sup>, 因此用作阳性对照, 转基因水稻 Bt01 的受体 ZJ22 用作阴性对照, Bt01 每个酶切体系 3 个平行, 分别用 *EcoR* 和 *Hind* 酶切水稻基因组(图 2), 实验结果表明, 外源基因 *CryIAb* 转入了 Bt01 中, 并且为单拷贝。

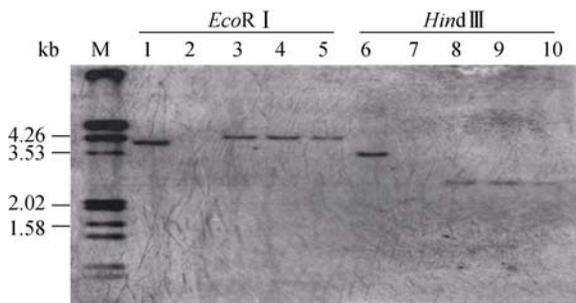


图 2 Southern blotting 结果

*EcoR* 和 *Hind* 两个酶切系统。M: Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* Marker; 1, 6: 阳性对照 KMD1; 2, 7: 阴性对照 ZJ22; 3~5、8~10: 转基因水稻 Bt01。

### 2.2 外源基因插入位点分析

利用 TAIL-PCR 我们获得了 Bt01 的 5' 端的侧翼序列, 去载体序列后利用 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)对序列进行比对, 表明外源基因位于水稻第 11 号染色体, 同时我们扩增了其全部外源插入序列, 并提交到 GenBank, 登录号为 HQ154128。

### 2.3 特异性定性 PCR 检测

为了建立特异性的定性 PCR 检测体系, 本研究设计了一对引物(Bt01-1F/1R), 其中 Bt01-1F 位于水稻基因组上, 而 Bt01-1R 则在启动子 Rubisco 上, 用不同的转基因水稻和非转基因水稻基因组作为模板, 首先对内源基因进行扩增, 结果显示, 所有的水稻品种中都能扩增出内源基因 *PLD*, 而特异性扩增只有在 Bt01 中能扩增出 200 bp 的目的片段, 其他转基因水稻(Bt08、Bt10、TT51-1、KMD1 和 KF6)没有扩

增出相应片段(图 3: A, B)。进一步用这对特异性引物扩增其他植物如拟南芥、油菜、甘蓝、芥菜、玉米和棉花, 均没有目的片段得到扩增(图略)。

为了确定定性 PCR 检测的灵敏度, 用特异性引物分别扩增 Bt01 含量不同的基因组, 从 23 500 ~ 0.47 pg, 实验结果显示在 Bt01 的基因组含量 4.7 pg 约 10 个拷贝及高于这个量时均能扩增出目的片段(图 3 C), 说明该转化体特异性定性 PCR 检测体系的最低鉴定极限为 10 个拷贝。

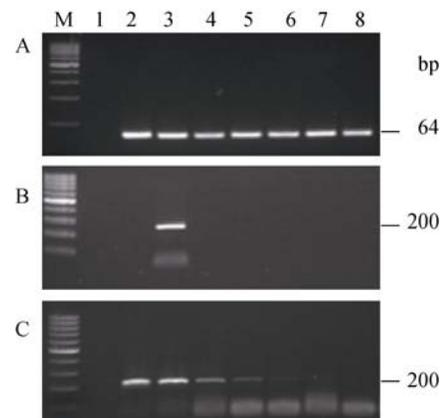


图 3 Bt01 特异性定性 PCR 检测

A: 内源基因 *PLD* 扩增; B: 特异性定性 PCR 扩增。M: 100 bp marker; 1: 空白对照; 2~8: TT51-1、Bt01、KMD1、KF6、Bt08、Bt10、ZJ22。C: Bt01 特异性定性 PCR 灵敏度检测, 1: 空白对照; 2~8: Bt01 基因组含量分别为: 23 500、4 700、470、47、4.7、2.35 和 0.47 pg。

### 2.4 特异性定量 PCR 检测体系的建立

从转化体特异性序列和内源基因 *PLD* 的扩增曲线及标准曲线来看, 不同浓度的模板与其扩增循环数(*Ct*值)有很好的—致性, 但各梯度模板之间的 *Ct* 值与理论值(10 倍梯度为 3.32, 5 倍梯度为 2.32)还是有一定的偏差(表 2), 理论值要求 PCR 的扩增效率为 100%, 而实际实验过程中由于非目的片段的干扰、反应的条件及操作等原因都很难使扩增效率达到 100%, 实验过程中可以增加平行样品及重复数来提高实验准确性。本研究中 *PLD* 基因和转化体特异性序列的定量 PCR 的扩增效率分别为 98.4% 和 105%, *PLD* 基因和转化体特异性序列的标准曲线的相关性系数( $R^2$ )的值分别为 0.988 和 0.987, 模板的量 and *Ct* 值有很好的相关性, 满足定量 PCR 的要求<sup>[22]</sup>。

同时我们研究了定量 PCR 体系的重演性, 分析

表 2 *PLD* 基因及 *Bt01* 转化体定量扩增

| 基因组含量<br>(pg)        | 拷贝数   | <i>Ct</i> 值 |         |         |         | <i>Ct</i> 平均值 | 标准偏差   | 相对标准偏<br>差 (%) |
|----------------------|-------|-------------|---------|---------|---------|---------------|--------|----------------|
|                      |       | 1           | 2       | 3       | 4       |               |        |                |
| 内源基因 <i>PLD</i> 实验   |       |             |         |         |         |               |        |                |
| 23500                | 50000 | 24.5426     | 24.8179 | 24.8382 | 25.0000 | 24.7997       | 0.1898 | 0.7653         |
| 4700                 | 10000 | 27.2646     | 27.0986 | 27.1716 | 26.8593 | 27.0985       | 0.1733 | 0.6395         |
| 470                  | 1000  | 30.6885     | 30.754  | 30.9275 | 30.9924 | 30.8406       | 0.1429 | 0.4634         |
| 47                   | 100   | 34.2441     | 34.3712 | 33.945  | 33.8699 | 34.1076       | 0.2388 | 0.7001         |
| 4.7                  | 10    | 38.9622     | 38.5642 | 37.6917 | 37.2803 | 38.1246       | 0.7735 | 2.0289         |
| <i>Bt01</i> 转化体特异性实验 |       |             |         |         |         |               |        |                |
| 23500                | 50000 | 27.6012     | 27.1997 | 26.9436 | 26.5019 | 27.0616       | 0.4609 | 1.7032         |
| 4700                 | 10000 | 29.0351     | 29.3976 | 29.3023 | 29.6756 | 29.3527       | 0.2643 | 0.9004         |
| 470                  | 1000  | 32.843      | 32.4909 | 32.1653 | 32.3241 | 32.1558       | 0.2903 | 0.9028         |
| 47                   | 100   | 35.9737     | 35.6522 | 36.6534 | 36.1716 | 36.1127       | 0.4192 | 1.1608         |
| 4.7                  | 10    | 39.9297     | 40.0000 | 39.0566 | 39.8349 | 39.7053       | 0.4377 | 1.1024         |

了 4 个平行反应的 4 个重复的标准偏差(SD)和相对标准偏差(RSD), 反应模板量从 23.5 ng 减少到 4.7 pg, *PLD* 基因的平均 *Ct* 值从 24.8 增加到 38.1, 而转化体 *Bt01* 的平均 *Ct* 值从 27.1 增加到 39.7, *PLD* 基因的 SD 在 0.14 ~ 0.77 之间, RSD 在 0.46% ~ 2.02% 之间, 转化体 *Bt01* 的 SD 在 0.26 ~ 0.46 之间, RSD 在 0.9% ~ 1.7% 之间(表 2)。这些实验数据表明本实验建立的转化体 *Bt01* 和 *PLD* 基因的定量标准曲线适用于转基因产品定量的检测。

## 2.5 定量 PCR 的最低检测极限和最低定量极限的确定

为了判断定量 PCR 检测体系的最低检测极限(LOD)和最低定量极限(LOQ), 我们扩增了拷贝数分别为 10、5 和 1 拷贝的标准样品, 每个样品扩增了 16 次, 从实验结果来看, 模板量在 10 拷贝时, 16 个反应均检测到荧光信号, 当模板量为 5 拷贝时, 16 个反应中有一个反应未能检测到荧光信号, 当模板量是 1 拷贝时, 16 个反应中有 5 个反应未能检测到荧光信号(图略)。定量 PCR 扩增的这种符合泊松分布, 基因的拷贝数达到 4.6 拷贝时能使得扩出率在 99%, 所以我们确定转化体 *Bt01* 的 LOD 为 5 拷贝。为了获得可靠的定量结果, 我们把转化体 *Bt01* 的 LOQ 定在 10 拷贝, 即在 20 ng 水稻基因组中可以

定量检测转基因水稻 *Bt01* 的最低含量为 0.023%。

## 2.6 定量 PCR 检测体系的验证

为了验证定量 PCR 检测体系的可行性与准确性, 用此体系检测已知转基因水稻 *Bt01* 百分比含量的样品, 两个样品(S1、S2)的转基因含量分别为 3.0%和 0.5%, 每个样品每个反应总基因组 DNA 含量为 20 ng, 每个样品 3 个平行反应, 3 次重复(表 3)。定量 PCR 体系的准确性用偏差来分析。样品 S1 的转化体 *Bt01* 的拷贝数为 1276 ~ 1428(平均值为 1363, SD 为 78.35), 水稻总基因组拷贝数为 47756 ~ 50124(平均值为 48844, SD 为 1195.6), 测得的百分含量为 2.7%, 与原始值 3.0%偏差为 10%。S2 的转化体 *Bt01* 的拷贝数为 213 ~ 276(平均值为 242, SD 为 31.79), 水稻总基因组拷贝数为 49554 ~ 50326(平均值 49815.6, SD 为 442), 计算的百分含量为 0.48%, 偏差 4%(表 3)。

从实验的数据来看, 每个测试样品测得的百分含量与原始的百分比都有一定的偏差, 这可能与水稻基因组 DNA 在提取后纯化及定量有关, 同时在定量 PCR 反应中, 低浓度的模板也会引起反应的不确定性, 而两个样品的相对标准差分别为 5.74%和 13.13%(表 3), 说明定量 PCR 反应具有很好的准确性, 综上所述此定量 PCR 体系获得的定量结果是稳定和可信的。

表 3 定量检测体系验证

| 样品            | 实验 (拷贝数) |       |       | 平均值(拷贝数) | 标准偏差 (拷贝数) | 相对标准偏差(%) | 转基因含量 (%) | 偏差 (%) |
|---------------|----------|-------|-------|----------|------------|-----------|-----------|--------|
|               | 1        | 2     | 3     |          |            |           |           |        |
| 内源基因 PLD 实验   |          |       |       |          |            |           |           |        |
| S1 (3%)       | 47756    | 50124 | 48652 | 48844    | 1195.62    | 2.44      |           |        |
| S2 (0.5%)     | 50326    | 49567 | 49554 | 49815.66 | 442.01     | 0.88      |           |        |
| Bt01 转化体特异性实验 |          |       |       |          |            |           |           |        |
| S1 (3%)       | 1428     | 1276  | 1385  | 1363     | 78.35      | 5.74      | 2.7       | -10    |
| S2 (0.5%)     | 213      | 237   | 276   | 242      | 31.79      | 13.13     | 0.48      | -4     |

### 3 讨 论

目前对转基因作物及其产品的检测主要有蛋白质水平检测和核酸水平检测, 而由于核酸的提取、保存及稳定性等方面的优势, 使得基于核酸检测的转基因检测技术得到快速发展, 其中以聚合酶链式反应(PCR)技术发展得最快, 转基因作物PCR检测方法又分为 4 个层次, 分别为筛查检测、基因检测、构建特异性检测和转化体特异性检测, 它们的检测的特异性则由低到高<sup>[23]</sup>。筛查检测对象为外源插入序列中的通用元件和标记基因, 而通用元件和标记基因普遍存在于转基因作物的转化载体中, 只能用作初筛; 基因检测对象为转入的目的基因, 但不能区分同一基因转化形成的不同转化体; 构建特异性检测也存在这样的局限性, 这 3 种检测方法均能检测出作物是否有外源基因, 但不能确定转基因作物的身份, 而转化体特异性检测针对每个转化体的外源基因与作物基因组连接区域进行检测, 因而它的特异性最高, 能准确判断转基因作物的来源<sup>[24]</sup>。本文在 Southern blotting 确定外源基因插入水稻基因组且为单拷贝的基础上, 利用 TAIL-PCR 技术获得了其 5' 端的侧翼序列, 并根据此序列建立针对转基因水稻 Bt01 的转化体特异性 PCR 定性定量检测体系。

相对基因表达分析方法多采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法, 然而这种方法的条件是目标基因和内参基因扩增效率都接近 100%, 并且相互间的效率偏差在 5% 以内<sup>[25]</sup>, 而在实际实验过程中很难使目标基因和内参基因的扩增效率保持一致且达到 100%。本研究利用分别建立转化体特异性序列和内源基因标准曲线的方法计算转基因水稻 Bt01 的含量, 双标准曲线方法操作简

单, 而且每次扩增带入标准品利用标准曲线校正了目标基因和内参基因的扩增效率, 从实验来看 PLD 基因和转化体特异性序列的标准曲线的相关性系数 ( $R^2$ ) 的值分别为 0.988 和 0.987, 模板的量和 Ct 值有很好的相关性, 满足定量分析的要求<sup>[22]</sup>。而定性 PCR 特异性的验证, 只有转基因水稻 Bt01 能扩增出目的片断, 而别的转基因水稻及其它植物都未能扩增出目的片段, 同时定性 PCR 的灵敏度达到 10 拷贝, 而定量 PCR 检测体系的 LOD 为 5 拷贝, LOQ 为 10 拷贝, 实验结果表明本研究建立的转基因水稻 Bt01 事件特异性定性定量检测方法具有稳定性好、特异性强和灵敏度高的特点, 适用于转基因水稻 Bt01 定性和定量检测, 该方法的建立一方面补充和加强了转基因检测体系, 同时该方法的建立也可以为其他转基因作物的检测提供参考。

### 参考文献(References):

- [1] U. S. Food and Drug Administration. Secondary food additives permitted in food for human consumption; Food additives permitted in feed and drinking water of animals; Aminoglycoside 3'-Phosphotransferase II; Final rule. *Federal Register*, 1994, 59: 26700-26711.
- [2] Einspanier R. Quantifying genetically modified material in food: searching for a reliable certification. *Eur Food Res Technol*, 2001, 213(6): 415-416. DOI
- [3] James C. Global status of commercialized Biotech/GM Crops: 2010. *ISAAA Brief 42*. DOI
- [4] Shao CG, Wu JH, Zhou GY, Sun G, Peng BZ, Lei JL, Jin DD, Chen SX, Upadhyaya NM, Waterhouse P, Gong ZX. Ectopic expression of the spike protein of rice ragged stunt *Oryzavirus* in transgenic rice plants inhibits transmission of the virus to insects. *Mol Breed*, 2003, 11(4):

- 295–301. [DOI](#)
- [5] Bajaj S, Mohanty A. Recent advances in rice biotechnology-towards genetically superior transgenic rice. *Plant Biotechnol J*, 2005, 3(3): 275–307. [DOI](#)
- [6] Potrykus I, Burkhardt PK, Datta SK, Fütterer J, GhoshBiswas GC, Klöti A, Spangenberg G, Wünn J. Genetic engineering of Indica rice in support of sustained production of affordable and high quality food in developing countries. *Euphytica*, 1995, 85(1–3): 441–449. [DOI](#)
- [7] APHIS (Animal and Plant Health Inspection Service) (2007). [DOI](#)
- [8] Shu QY, Ye GY, Cui HR, Cheng XY, Xiang YB, Wu DX, Gao MW, Xia YW, Hu C, Sardana R, Altosaar I. Transgenic rice plants with a synthetic *CryIAb* gene from *Bacillus thuringiensis* were highly resistant to eight lepidopteran rice pest species. *Mol Breeding*, 2000, 6(4): 433–439. [DOI](#)
- [9] State Council of China. Regulation on the administration of the safety of agricultural genetically modified organism. 2001, Order No. 304.
- [10] European Commission. Commission Regulation (EC) No. 1829/2003 of September 22, 2003, concerning on genetically modified food and feed. Official Journal of the European Communities. 2003, L268: 1–23.
- [11] Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Measures in the administration of labeling agricultural genetically modified organisms. 2002, Order No. 10.
- [12] Yang LT, Pan AH, Zhang KW, Yin CS, Qian BJ, Chen JX, Huang C, Zhang DB. Qualitative and quantitative PCR methods for event-specific detection of genetically modified cotton MON1445 and MON531. *Transgenic Res*, 2005, 14(6): 817–831. [DOI](#)
- [13] Xu WT, Yuan YF, Luo YB, Bai WB, Zhang CJ, Huang KL. Event-specific detection of stacked genetically modified maize Bt11 × GA21 by UP-M-PCR and real-time PCR. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(2): 395–402. [DOI](#)
- [14] Yang LT, Pan AH, Zhang HB, Guo JC, Yin CS, Zhang DB. Event-specific qualitative and quantitative polymerase chain reaction analysis for genetically modified Canola T45. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(26): 9735–9740. [DOI](#)
- [15] Wu G, Wu YH, Nie SJ, Zhang L, Xiao L, Cao YL, Lu CM. Real-time PCR method for detection of the transgenic rice event TT51-1. *Food Chem*, 2010, 119(1): 417–422. [DOI](#)
- [16] 祁永斌, 叶胜海, 陆艳婷, 雷树凡, 陶跃之, 张小明. 转 *CryIA(b)* 基因抗虫水稻的获得及鉴定. 浙江农业学报, 2007, 19(4): 264–267. [DOI](#)
- [17] Qi YB, Ye SH, Lu YT, Jin QS, Zhang XM. Development of marker-free transgenic *CryIAb* rice with *Lepidopteran pest* resistance by *Agrobacterium* mixture-mediated co-transformation. *Rice Sci*, 2009, 16(3): 181–186. [DOI](#)
- [18] Porebski S, Bailey LG, Baum BR. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol Biol Rep*, 1997, 15(1): 8–15. [DOI](#)
- [19] Liu YG, Mitsukawa N, Oosumi T, Whittier RF. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J*, 1995, 8(3): 457–463. [DOI](#)
- [20] CRL-GMFF. Event-specific method for the quantitation of rice line LLRICE62 using real-time PCR protocol. <[http://gmo-crl.jrc.it/summaries/LLRICE62\\_validated\\_Protocol.pdf](http://gmo-crl.jrc.it/summaries/LLRICE62_validated_Protocol.pdf)>. Cited 26, Jun 2008. [DOI](#)
- [21] Cheng XY, Sardana R, Kaplan H, Altosaar I. *Agrobacterium*-transformed rice plants expressing synthetic *CryIA(b)* and *CryIA(c)* genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(6): 2767–2772. [DOI](#)
- [22] Taverniers I, Van Bockstaele E, De Loose M. Cloned plasmid DNA fragments as calibrators for controlling GMOs: Different real-time duplex quantitative PCR methods. *Anal Bioanal Chem*, 2004, 378(5): 1198–1207. [DOI](#)
- [23] Holst-Jensen A, Rønning SB, Løvseth A, Berdal KG. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Anal Bioanal Chem*, 2003, 375(8): 985–993. [DOI](#)
- [24] Berdal KG, Holst-Jensen A. Roundup Ready<sup>®</sup> soybean event-specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analyses. *Eur Food Res Technol*, 2001, 213(6): 432–438. [DOI](#)
- [25] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C<sub>T</sub> method. *Nat Proto*, 2008, 3(6): 1101–1108. [DOI](#)