

数字 PCR 测量转基因玉米内标基因含量的方法

王迪¹ 刘圆圆² 费悦¹ 高运华¹

(1.中国计量科学研究院 前沿计量科学中心, 北京 100029; 2.山西大学, 生命科学学院 山西省 太原市 030000)

摘要: 转基因检测主要基于 PCR 技术, 测定转基因产品中转化体特异性片段和品种内标基因的拷贝数比值或质量分数, 因此品种内标基因的含量是影响定量检测结果的重要因素。建立了针对玉米三个单拷贝内标基因 *Adh1*, *zSSIb* 和 *Hmg* 的数字 PCR 精确定量方法, 比较三个内标基因在 MON87427 和 DBN9501 玉米单倍体基因组 DNA 中拷贝数的差异。从而为制订转基因定量检测标准时筛选品种内标基因, 分析不同检测方法的结果差异提供参考, 以提升转基因定量检测结果的有效可比性。

关键词: 数字 PCR 转基因产品 内标基因 拷贝数浓度

中图分类号: Q-331

文献标识码:

The Digital PCR Method for Quantification of Endogenous Reference Gene Contents in Genetically Modified Maize

WANG Di¹, LIU Yuanyuan², FEI Yue¹, GAO Yunhua¹

(1. Center for Advanced Measurement Science, National Institute of Metrology, Beijing 100029, China; 2. School of Life Sciences, Shanxi University, Taiyuan 030000, China)

Abstract: The detection of genetically modified content is based on the PCR technology, which measures the copy number ratio or mass fraction between event-specific fragments and taxon-specific endogenous reference genes. Thus, the DNA content of tested endogenous reference gene is a key factor affecting the determination of GM quantification results. Here, the precisely quantitative digital PCR methods targeting the single-copy *Adh1*, *zSSIb* and *Hmg* gene of maize were established, to compare the copy number variance of these three genes in the haploid genome of MON87427 and DBN9501 maize. This work can provide reference for selecting taxon-specific endogenous reference genes for the related detection standards setup, and analyzing the quantification discrepancy obtained by different detection methods, to improve the accuracy and comparability of quantification results..

Keywords: digital PCR genetically modified product endogenous reference gen copy number concentration

世界范围内转基因农作物的种植面积持续稳步增长, 商业化进程不断推进^[1]。为保护消费者的知情权和选择权, 世界各国普遍采用“定量标识”制度, 即根据是否含有转基因成分以及含量的多少对转基因产品(包括食品和饲料)进行标识管理^[1]。因此对转基因成分的准确定量是标识管理制度有效执行的关键^[1]。

当前转基因含量的检测主要基于 PCR 技术, 测定转基因产品的转化体特异性序列和品种内标基因的拷贝数比值或质量分数, 因此品种内标基因的含量是影响定量检测结果的重要因素^[1]。因具有定量准确、灵敏度高优势, 近些年来数字 PCR 技术越来越多的应用于转基因含量的定量检测^[1]。本研究将通过数字 PCR 技术对两种转基因玉米品种的三个内标基因 *Adh1*, *zSSIb* 和 *Hmg* 进行精确定量^[1], 比较分析三个基因在玉米单倍体基因组中的拷贝数差异, 从而为转基因检测时选择有效的品种内标基因, 分析不同检测方法的结果差异提供参考。

1. 仪器、材料和试剂

1.1 仪器: QX200 数字 PCR 仪、QX200 油滴生成仪和 Veriti96 PCR 仪

1.2 材料: 转基因玉米 MON87427 和 DBN9501 基因组 DNA

1.3 试剂: 微滴数字 PCR 预混液、引物和探针 (上海生工公司合成)。

2. 方法

根据欧盟转基因食品和饲料参考实验室(European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed, EURL GMFF)公布的参考测量方法和我国转基因检测国家标准, 选择了转基因玉米检测中常使用的三个单拷贝内标基因 *Adh1*, *zSSIb* 和 *Hmg*。根据上述标准中推荐的引物探针序列进行数字 PCR 的定量检测。引物探针序列如表 1 所示:

表 1 玉米内标基因引物探针序列

靶基因	引物/探针	序列 (5'-3')	产物长度
<i>zSSIb</i>	Primer Fw	ctccaatccttgacatctgc	151 bp
	Primer Rv	tcgatttctcttggtagacagg	
	Probe	HEX-agcaaagtcagagcgctgcaatgca-BHQ1	
<i>Adh1</i>	Primer Fw	cgtcgtttcccatctcttctcc	135 bp
	Primer Rv	ccactccgagaccctcagtc	
	Probe	HEX-aatcagggtcattttctcgtcctca-BHQ1	
<i>HMG</i>	Primer Fw	ttgactagaaatctcgtgctga	79 bp
	Primer Rv	gctacataggagccttgcct	
	Probe	HEX-caatccaacacaacgcacgcgta-BHQ1	

3. 结果与讨论

3.1 数字 PCR 反应条件的优化

以玉米 MON87427 的基因组 DNA 为模板, 分别选用 800、600、500、400 nmol/L 的引物终浓度和 400、300、250、200 nmol/L 的探针终浓度, 以及 54°C、56°C、58°C 和 60°C 的退火温度进行数字 PCR 反应, 筛选最佳反应条件。结果表明, 在上述浓度和退火温度下 *Adh1*, *zSSIb* 和 *Hmg* 三个基因的阳性与阴性微滴均明显分成两群且中间弥散的“雨滴”较少, 最终优选引物和探针终浓度为 500/250 nmol/L, 退火温度为 56°C 进行后续数字 PCR 反应。其中 *Adh1* 基因的数字 PCR 反应条件优化过程如图 1 所示。

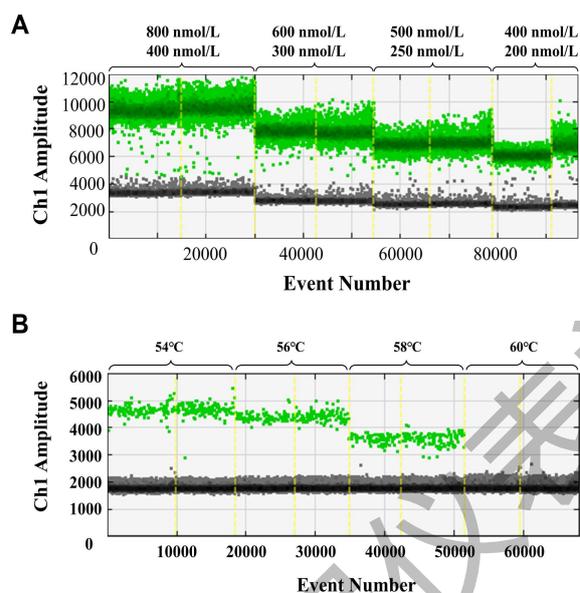


图 1 数字 PCR 反应 (*Adh1* 基因) 的条件优化
A, 引物和探针浓度的优化; B, 退火温度的优化

3.2 数字 PCR 定量线性关系的验证

基于上面确定的数字 PCR 反应条件, 以连续倍比稀释的玉米 MON87427 基因组 DNA 标准品为模板分别进行 *Adh1*, *zSSIb* 和 *Hmg* 三个内标基因拷贝数浓度的测量, 并建立定量的标准曲线。由图 2 可知, 上述三个数字 PCR 反应均具有良好的定量线性关系, 相关系数 R^2 分别为 0.9997、0.9998 和 0.9982; 并且对应的定量测量下限依次为 26 拷贝、22 拷贝和 18 拷贝。

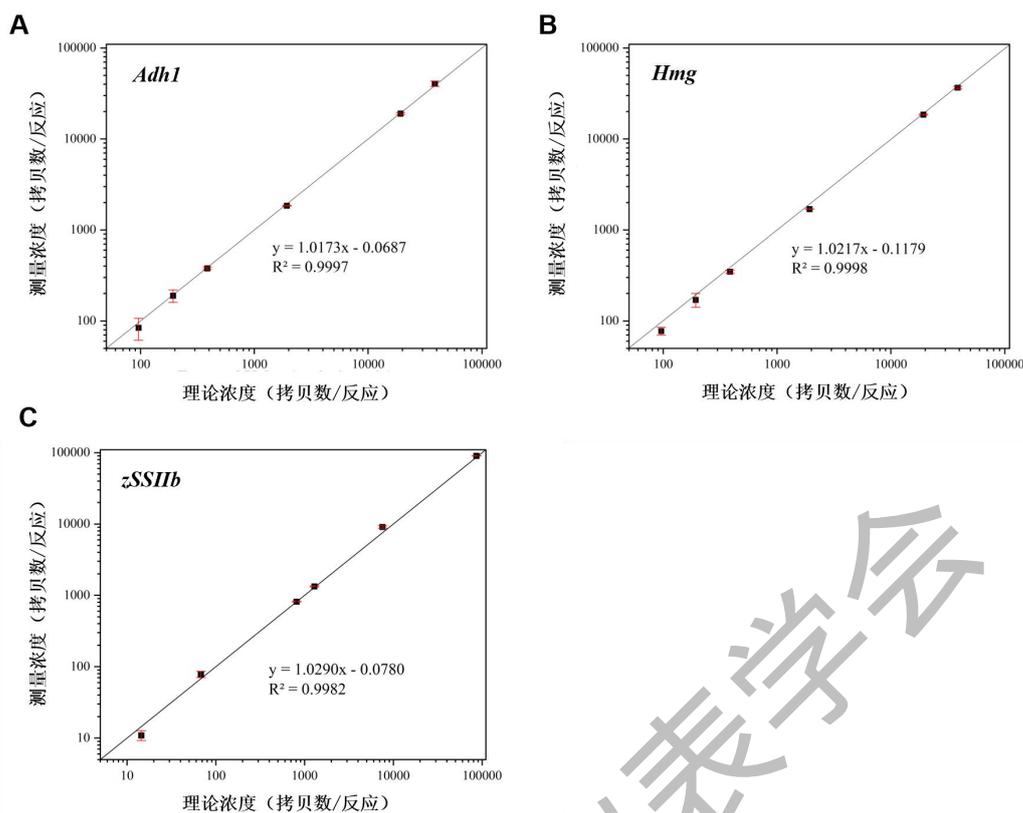


图2 数字PCR反应定量线性关系

3.3 内标基因定量测量结果

将 MON87427 和 DBN9501 玉米基因组 DNA 样本稀释到合适的浓度后，分别对 *Adh1*，*zSSIb* 和 *Hmg* 三个内标基因的拷贝数浓度进行定量测量。每个样本连续测量 4 组，每组包含 4 个重复。结果如表 2、图 3 所示，在 MON87427 和 DBN9501 两个玉米品种中，*Adh1*，*zSSIb* 和 *Hmg* 的拷贝数含量是很接近，这与文献报道三者玉米单倍体基因组中均为单拷贝一致。并且在上述两个品种中，三个内标基因的拷贝数浓度差异呈相同的趋势，即 *Adh1* 含量略高，*Hmg* 居中，*zSSIb* 相对较低。当然在其他玉米品种中，这三个内标基因含量是否存在相同趋势，还需进一步的实验验证。同时由表 2 可知，本次实验中基于数字 PCR 技术对三个基因定量检测结果的 RSD 位于 1.53-3.68 之间，测量的重复性很好。

表2 数字PCR定量结果

样本	靶标	重复				均值	SD	RSD (%)
		1	2	3	4			
DBN9501 (100%)	<i>Adh1</i>	11550	11925	11925	12025	11856	181.47	1.53
	<i>HMG</i>	11800	11575	11525	10900	11450	334.01	2.92
	<i>zSSIb</i>	10800	10900	10975	11825	11125	408.89	3.68
MON87427 (100%)	<i>Adh1</i>	11000	11000	10800	10600	10850	165.83	1.53
	<i>HMG</i>	10600	10300	10100	10700	10425	238.48	2.29
	<i>zSSIb</i>	9740	10340	9600	9900	9895	277.98	2.81

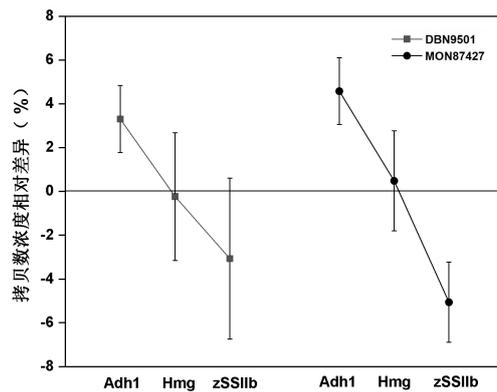


图3 *Adh1*, *Hmg* 和 *zSSIb* 三个内标基因的拷贝数浓度相对差异

4. 结论

数字 PCR 作为核酸定量测量的潜在基准方法，具有定量准确、重复性好和灵敏度高等优点。本研究基于该技术对转基因玉米 MON87427 和 DBN9501 基因组 DNA 的内标基因进行精确定量，发现三个基因的拷贝数浓度是非常接近的但仍存在一定差异，且在上述两个品种中存在的浓度差异趋势一致。因此对转基因玉米含量进行定量检测时，应该制订统一的检测标准来确定检测内标基因的种类，从而消除或减小内标基因间拷贝数含量的差异对定量测量结果的影响，保障转基因“定量标识”制度的有效实施。

参考文献

- [1] 于滔, 曹士亮, 张建国, 等. 全球转基因作物商业化种植概况(1996-2018 年)[J]. 中国种业, 2020(01): 13-16.
- [2] Xiao Z H, William A K. Biotechnology in China-regulation, investment, and delayed commercialization[J]. GM Crops Food, 2022, 13(1): 86-96.
- [3] 农业部 10 号公告, 农业转基因生物标识管理办法[S].
- [4] 黄耀辉, 樊殿峰, 焦悦, 等. 浅谈多国转基因产品标识制度对我国的启示[J]. 生物技术进展, 2022, 12(04): 516-522.
- [5] 付仲文. 一些国家和地区转基因生物标识制度概况[J]. 世界农业, 2009, (11): 37-42.
- [6] Travis R, Benjamin R, Isabelle C, et al. Ethical aspects of GMO regulation in the EU: Regulating new plant breeding techniques as GM has negative effects on sustainability, diversity and inclusion: Regulating new plant breeding techniques as GM has negative effects on sustainability, diversity and inclusion[J]. EMBO reports, 2022, 23(9): 1-5.
- [7] Castellari E, Soregaroli C, Venus J T, et al. Food processor and retailer non-GMO standards in the US and EU and the driving role of regulations[J]. Food Policy, 2018, 78: 26-37.

- [8] Borges B J P, Arantes O M N, Fernandes A A R, *et al.* Genetically Modified Labeling Policies: Moving Forward or Backward? [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2018,6:181.
- [9] Moghissi A A, Jaeger L M, Shafei D, *et al.* Regulatory science requirements of labeling of genetically modified food [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2018, 38(3): 386-393.
- [10] 兰青阔,李文龙,孙卓婧,等.国内外转基因检测标准体系现状与启示[J].农业科技管理, 2020, 39(03): 27-32.
- [11] Fu Z W. Overview of GMO labeling systems in some countries and regions[J]. *World Agriculture*, 2009, (11): 37-42.
- [12] 张忠民.转基因食品标识阈值问题研究[J].食品科学, 2015, 36(09): 254-263.
- [13] 杨冬燕, 杨永存, 李浩. 转基因成分定量检测数据分析及不确定度评估现状概述[J].食品安全质量检测学报, 2016, 7(08): 3025-3033.
- [14] 范宏博, 蔡永洪, 李月玥, 等. 数字 PCR 法在食品检测标准物质研制中的应用[J]. 计量学报, 2023, 44(03): 472-478.
- [15] Burns M J, Burrell A M, Foy C A. The applicability of digital PCR for the assessment of detection limits in GMO analysis[J]. *European Food Research and Technology*, 2010, 231(3): 353-362.
- [16] 农业部 1782 号公告-8-2012, 转基因植物及其产品成分检测基体标准物质制备技术规范 [S].
- [17] GB/T 19495.4-2018, 转基因产品检测实时荧光定性聚合酶链式反应(PCR)检测方法[S].