

邵改革, 闫伟, 夏蔚, 等. 转基因作物中常见 *Bt* 基因 PCR 检测方法的建立[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(12): 31–34.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.12.007

转基因作物中常见 *Bt* 基因 PCR 检测方法的建立

邵改革, 闫伟, 夏蔚, 李葱葱, 龙丽坤, 李飞武

(吉林省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 吉林长春 130033)

摘要:建立基于常见外源基因的转基因成分检测方法是开展转基因生物监测与检测活动的技术支撑, *Bt* 基因作为目前商业化应用最广泛的一类外源基因, 已成为转基因产品筛选检测的重要靶标。依据转基因作物中常见的 6 种 *Bt* 基因(*cry1F*、*cry1C*、*cry1Ie*、*cry34Ab*、*cry35Ab*、*vip3A*)的核苷酸序列设计特异性 PCR 引物, 并经过特异性、灵敏度等一系列测试, 建立上述 6 种 *Bt* 基因的定性 PCR 检测方法。结果显示, 应用这些方法均可从含有相应 *Bt* 基因的样品中正确检测出预期转基因成分, 方法的灵敏度可达 0.10%。上述方法具有特异性强、灵敏度高等特点, 适用于转基因作物中常见 *Bt* 基因的筛选检测。

关键词:转基因作物; *Bt* 基因; 定性 PCR 方法

中图分类号: Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)12-0031-04

与全球转基因作物商业化蓬勃发展相对应的是人们对于转基因技术产品的安全性越来越重视。加强转基因产品监管, 已成为世界各国管理转基因技术的一贯做法, 开发行之有效的检测技术则成了转基因监管技术支撑机构的一项重要工作^[1]。PCR 技术兼具特异性强、灵敏度高、结果稳定可靠等优点, 在转基因产品检测方法研究中被广泛应用, 根据检测靶标功能的不同, 又分为筛选 PCR 检测、基因特异性 PCR 检测、构建特异性 PCR 检测、转化体特异性 PCR 检测 4 类, 其中基因特异性 PCR 检测方法以转基因作物中的外源目的基因为检测靶标, 是一类常见的转基因产品成分检测方法^[2]。

在已商业化应用的转基因作物中, 抗虫性是仅次于抗除草剂的第二大性状, 2015 年抗虫转基因作物种植面积达到 8 370 万 hm^2 (包括单一抗虫性状和含有抗虫的复合性状), 占全球转基因作物总面积的 46.6%^[3]。此外, 从我国转基因作物研发进展来看, 抗虫性是第一大目标性状, 除了大规模商业化应用的抗虫棉花外, 也有多种抗虫转基因玉米、水稻、大豆新品系进入安全评价阶段^[4-6]。其中, *Bt* 基因是国内外应用最主要的抗虫外源基因, 包括 *cry1A*、*cry2Ab*、*cry1F*、*cry1C*、*cry1Ie*、*cry34Ab*、*cry35Ab*、*vip3A* 等。以 *Bt* 基因作为检测靶标的转基因检测方法已有诸多报道, Dinon 等开发了转基因玉米 MON89034 中 *cry1A.105*、*cry2Ab2* 基因的实时荧光 PCR 方法^[7]; 李飞武等报道了转基因作物中 *cry1Ab*、*cry2Ab*、*cry3A* 等常见 *Bt* 基因的单一和多重 PCR 检测方法^[8]; 吴孝槐等建立了转基因大米中 *Bt* 基因的实时荧光 PCR 方法^[9]; Liang 等建立了 MIR162 玉米及 COT102 棉花中 *vip3A* 基因的实时荧光

PCR 方法^[10]; 有些 *Bt* 基因的 PCR 检测方法已成为国家标准或行业标准^[11-12], 但未见 *cry1F*、*cry1C*、*cry1Ie* 等 *Bt* 基因检测方法的报道。

本研究以抗虫转基因作物中常见的 *cry1F*、*cry1C*、*cry1Ie*、*cry34Ab*、*cry35Ab*、*vip3A* 等 6 种 *Bt* 基因为对象, 建立每种基因的定性 PCR 检测方法, 为转基因生物安全监管提供有效的技术手段。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

转 *Bt* 基因玉米 TC1507、IE034、59122、MIR162、MON89034、MON810、Bt11、Bt176、Bt38、SK12-5、MON863、MON88017、MIR604, 转 *Bt* 基因大豆 MON87701, 转 *Bt* 基因棉花 MON531、MON15985, 转 *Bt* 基因水稻 T1c-19、G6H1、KF6、KMD、T2a-1、TT51-1, 及非转基因玉米、水稻、大豆、棉花均为笔者所在实验室保存样品。将 TC1507、IE034、59122、MIR162、T1c-19 等量混合后作为阳性对照样品, 将非转基因玉米、水稻、大豆、棉花等量混合后作为阴性对照样品。

植物基因组 DNA 提取试剂盒: 北京天根生物技术有限公司; *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs 等 PCR 反应试剂: 大连宝生物工程公司。

1.2 仪器与设备

C1000 型 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司); GelDoc XR+ 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司); ND1000 紫外/可见分光光度计(美国 Thermo Fisher 公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 基因组 DNA 提取 按照植物基因组 DNA 提取试剂盒的操作说明, 提取所有样品的基因组 DNA, 并使用 ND1000 分光光度计测定 DNA 浓度和纯度, 用 $1 \times \text{TE}$ 缓冲液稀释至 25 $\mu\text{g/mL}$, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.3.2 *Bt* 基因核苷酸序列分析及引物设计 根据 *cry1F*、*cry1C*、*cry1Ie*、*cry34Ab*、*cry35Ab*、*vip3A* 等 6 种不同 *Bt* 基因的核苷酸序列, 使用 Primer Premier 5.0(加拿大 Premier 公司)设

收稿日期: 2016-12-12

基金项目: 吉林省农业科技创新工程项目(2013)。

作者简介: 邵改革(1984—), 女, 陕西富平人, 硕士, 助理研究员, 主要从事农业转基因生物安全评价与分子检测技术研究。E-mail: shaogaige163@163.com。

通信作者: 李飞武, 硕士, 副研究员, 主要从事转基因生物安全研究。E-mail: lifeiwu3394@sina.com。

计每种基因的特异性 PCR 检测引物。引物信息详见表 1,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成和纯化,用纯水配制成 10 μmol/L 溶液备用。

1.3.3 PCR 扩增 在 200 μL PCR 管中加入 2.5 μL 10 × PCR buffer[10 mmol/L Tris – HCl(pH 值为 8.3)、50 mmol/L KCl、1.5 mmol/L MgCl₂], 2 μL dNTPs 混合溶液(每种 dNTP

的浓度为 2.5 mmol/L), 1 μL 上游引物(10 μmol/L), 1 μL 下游引物(10 μmol/L), 0. 2 μL HS – Taq DNA 聚合酶(5 U/μL), 100 ng DNA 模板,用 ddH₂O 补齐至 25 μL 反应体系。PCR 扩增程序:95 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,65 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共 35 个循环;72 ℃ 7 min,4 ℃ 保存。PCR 扩增结束后,取 5 μL 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。

表 1 引物序列信息

| 检测靶标 | 引物名称 | 序列 (5′ – 3′) | 扩增产物大小 (bp) |
|----------------|------------|-------------------------------------|----------------|
| <i>cry1F</i> | Cry1F – F | 5′ – GGAAGCCAATCCTAACAATGCCC – 3′ | 201 |
| | Cry1F – R | 5′ – AGTCCCCAACCTTGCCCAAACGA – 3′ | |
| <i>cry1C</i> | Cry1C – F | 5′ – TTCTAACTTTGTGCCAGGAGGAG – 3′ | 128 |
| | Cry1C – R | 5′ – CAGCGATTCTTTTCGTTGATGAG – 3′ | |
| <i>cry1Ie</i> | Cry1Ie – F | 5′ – CCAACAGCATCACCCAGATCCCA – 3′ | 585 |
| | Cry1Ie – R | 5′ – CGTCCAGGTAGAACTCGTCGCTCA – 3′ | |
| <i>cry34Ab</i> | Cry34A – F | 5′ – CGAGGGCACCATCTACTACTCAATT – 3′ | 187 |
| | Cry34A – R | 5′ – GTAGCGGGAGGAGGTGCTCGG – 3′ | |
| <i>cry35Ab</i> | Cry35A – F | 5′ – TCCGCCCGCACGAGAAGAAGTC – 3′ | 111 |
| | Cry35A – R | 5′ – TCATGCCCGCTGTCGATGTTGAT – 3′ | |
| <i>vip3A</i> | Vip3A – F | 5′ – TACGAGGTGACCGCCAACCTTCTAC – 3′ | 319 |
| | Vip3A – R | 5′ – CGTTCCTCCACGATGTTGCTGATG – 3′ | |

2 结果与分析

2.1 转 Bt 基因作物及其外源基因检测引物筛选

商业化转基因作物数据库(ISAAA GM Approval Database)、美国农业部动植物卫生检验局网站(USDA APHIS)及国内外专利库等渠道发布的数据显示,Bt 基因是当前全球抗虫转基因作物中应用最为广泛的一类外源基因,包

含 *cry1F*、*cry1C*、*cry1Ie* 等在内的 10 余种基因。本研究收集了我国已批准的国外抗虫转基因作物及国内自主研发的重要抗虫转基因作物转化体共 22 种,包括转基因玉米、大豆、棉花、水稻,各个转化体的 Bt 基因种类详见表 2。针对 *cry1F*、*cry1C*、*cry1Ie*、*cry34Ab*、*cry35Ab*、*vip3A* 等 6 种 Bt 基因的序列,分别设计了一系列 PCR 检测引物,进行适用性测试,最终确定了每种 Bt 基因的 PCR 检测引物(表 1)。

表 2 转 Bt 基因作物信息

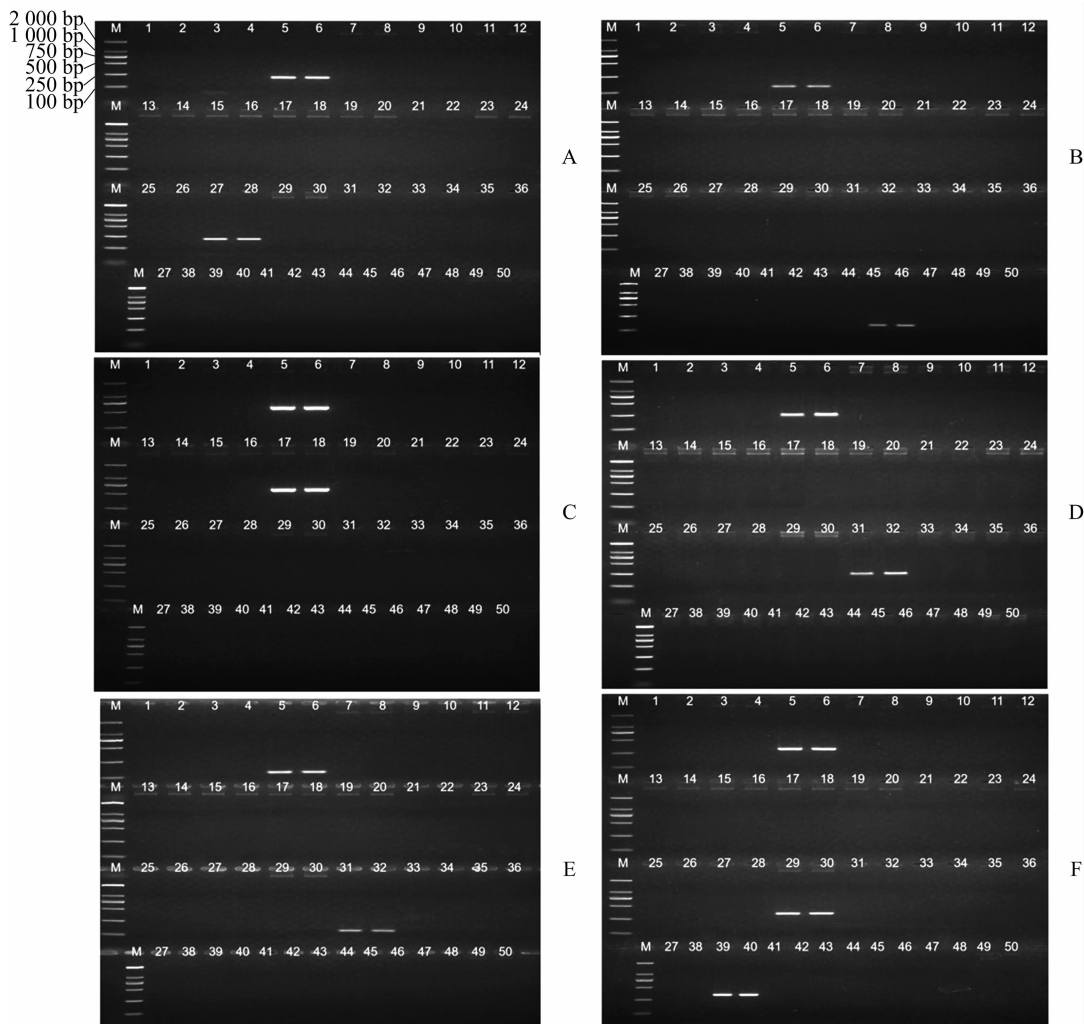
| 物种 | 转化体名称 | <i>cry1F</i> | <i>cry1C</i> | <i>cry1Ie</i> | <i>cry34Ab</i> | <i>cry35Ab</i> | <i>vip3A</i> | <i>cry1A</i> | <i>cry2A</i> | <i>cry3A</i> | <i>cry3Bb</i> |
|----|----------|--------------|--------------|---------------|----------------|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| 玉米 | TC1507 | √ | | | | | | | | | |
| | IE034 | | | √ | | | | | | | |
| | 59122 | | | | √ | √ | | | | | |
| | MIR162 | | | | | | √ | | | | |
| | MON89034 | | | | | | | √ | √ | | |
| | MON810 | | | | | | | √ | | | |
| | Bt11 | | | | | | | √ | | | |
| | Bt176 | | | | | | | √ | | | |
| | Bt38 | | | | | | | √ | | | |
| | SK12 – 5 | | | | | | | √ | √ | | |
| | MON863 | | | | | | | | | | √ |
| | MON88017 | | | | | | | | | | √ |
| | MIR604 | | | | | | | | | √ | |
| 大豆 | MON87701 | | | | | | | √ | | | |
| 棉花 | MON531 | | | | | | | √ | | | |
| | MON15985 | | | | | | | √ | √ | | |
| 水稻 | T1c – 19 | | √ | | | | | | | | |
| | G6H1 | | | | | | √ | √ | | | |
| | KF6 | | | | | | | √ | | | |
| | KMD | | | | | | | √ | | | |
| | T2a – 1 | | | | | | | | √ | | |
| | TT51 – 1 | | | | | | | √ | | | |

注:“√”表示测试样品中含有对应的 Bt 基因。

2.2 6 种 *Bt* 基因的 PCR 检测方法特异性测试

以 22 种转 *Bt* 基因作物和 1 种非转基因作物混合物(含有非转基因玉米、大豆、水稻、棉花)作为试验材料,分别对 6 种 *Bt* 基因的 PCR 检测方法进行特异性测试,结果如图 1 所示。应用 *cry1F* 基因检测方法仅能从阳性对照及 TC1507 玉

米样品中获得与预期大小一致的扩增产物(泳道 27~28),同样应用其他 5 种基因检测方法也仅能从含有相应基因的样品中获得预期扩增产物,而在其他转基因试验材料、非转基因作物阴性样品、空白对照中均未出现扩增产物,说明这 6 种 *Bt* 基因检测方法均表现出对靶标基因的严格特异性。



M—DL2000 DNA marker; 1、2—空白对照; 3、4—阴性对照; 5、6—阳性对照; 7、8—MON89034; 9、10—MON810; 11、12—Bt11; 13、14—Bt176; 15、16—Bt38; 17、18—IE034; 19、20—SK12-5; 21、22—MON863; 23、24—MON88017; 25、26—MIR604; 27、28—TC1507; 29、30—MIR162; 31、32—59122; 33、34—MON87701; 35、36—MON531; 37、38—MON15985; 39、40—G6H1; 41、42—KE6; 43、44—KMD; 45、46—T1c-19; 47、48—T2a-1; 49、50—TT51-1。

A~F分别为*cry1F*、*cry1C*、*cry1Ie*、*cry34Ab*、*cry35Ab*、*vip3A*基因的检测结果

图1 *Bt* 基因 PCR 检测方法的特异性

2.3 6 种 *Bt* 基因的 PCR 检测方法灵敏度测试

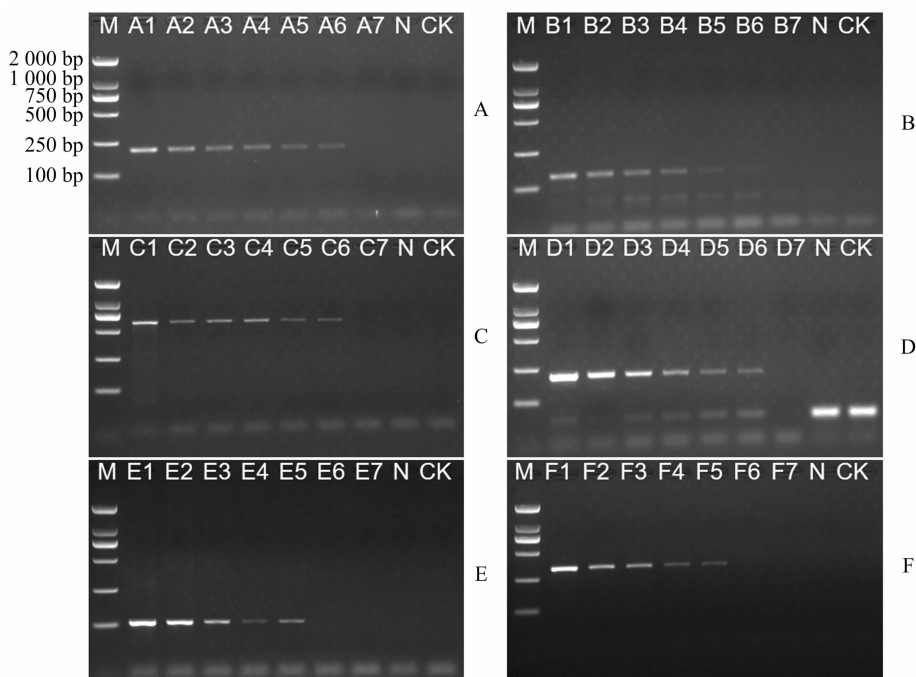
分别将 TC1507 玉米、T1c-19 水稻、IE034 玉米、59122 玉米、MIR162 玉米与非转基因作物样品按质量比进行混合,制备成相应转化体的质量分数分别为 10.00%、5.00%、1.00%、0.50%、0.10%、0.05%、0.01% 的梯度样品,提取 DNA 进行对应 *Bt* 基因检测方法的灵敏度测试,结果如图 2 所示。应用 *cry1F*、*cry1C*、*cry1Ie*、*cry34Ab* 基因的 PCR 检测方法均可从转基因含量为 0.05% 的样品中扩增出与预期大小一致的特异性产物,而应用 *cry35Ab*、*vip3A* 基因的 PCR 检测方法可从 0.10% 转基因样品中获得预期扩增,表明针对 6 种 *Bt* 基因检测方法的检出限均可达到 0.10%,能够进行相应转基因

产品的高灵敏检测。

3 结论与讨论

转基因作物及其产品种类的不断增多给转基因检测工作带来了一定的挑战,选择代表性高、覆盖面广的检测靶标,并建立精准高通量的检测方法,成为转基因检测技术研究的重要方向^[13]。*Bt* 基因作为一类应用广泛的外源基因,非常适合作为筛选检测的靶标,*cry1Ab*、*cry2Ab*、*cry3A* 等基因的检测方法也已经被开发出来^[14-16],而针对 *cry1F*、*cry1C*、*cry1Ie* 等 *Bt* 基因的检测方法尚未见报道。

本研究针对抗虫转基因作物中 *cry1F*、*cry1C*、*cry1Ie*、



M—DL2000 DNA marker; N—阴性对照; CK—空白对照; A1~A7—质量分数为10%、5%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、0.01%的TC1507玉米样品; B1~B7—质量分数为10%、5%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、0.01%的T1c-19水稻样品; C1~C7—质量分数为10%、5%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、0.01%的IE034玉米样品; D1~D7和E1~E7—质量分数为10%、5%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、0.01%的59122玉米样品; F1~F7—质量分数为10%、5%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、0.01%的MIR162玉米样品。A~F分别为*cry1F*、*cry1C*、*cry1Ie*、*cry34Ab*、*cry35Ab*和*vip3A*基因的检测结果

图2 *Bt* 基因 PCR 检测方法的灵敏度

cry34Ab、*cry35Ab*、*vip3A* 等 6 种常见 *Bt* 基因,通过引物设计与筛选、特异性测试、灵敏度测试等步骤,建立了能准确检测上述 *Bt* 基因的 PCR 检测方法,上述方法的检测灵敏度均可达到 0.10%,为转基因作物的筛选检测提供了方法支持。此外,将这些方法与预制 PCR、多重 PCR 等技术结合,还可建立更加快速、便捷、高效的转基因检测方法,更好地应用于转基因产品成分检测工作。

参考文献:

- [1] 刘培磊,徐琳杰,叶纪明,等. 我国农业转基因生物安全管理现状[J]. 生物安全学报,2014,23(4):297-300.
- [2] 张大兵,郭金超. 转基因生物及其产品检测技术和标准化[J]. 生命科学,2011,23(2):195-204.
- [3] Clive J. 20th Anniversary (1996 to 2015) of the global commercialization of biotech crops and biotech crop highlights in 2015 [R]. Ithaca, NY: ISAAA, 2016.
- [4] 吕霞,王慧,曾兴,等. 转基因抗虫玉米研究及应用[J]. 作物杂志,2013(2):7-12.
- [5] 徐秀秀,韩兰芝,彭于发,等. 转基因抗虫水稻的研发与应用及在我国的发展策略[J]. 环境昆虫学报,2013,35(2):242-252.
- [6] 刘贤雯,王彪,姚陆铭,等. 大豆高代抗虫转基因后代分子检测与抗蚜虫鉴定分析[J]. 大豆科学,2011,30(3):455-458.
- [7] Dinon A Z, Prins T W, van Dijk J P, et al. Development and validation of real-time PCR screening methods for detection of *cry1A*. 105 and *cry2Ab2* genes in genetically modified organisms [J]. Anal Bioanal Chem, 2011, 400(5):1433-1442.
- [8] 李飞武,闫伟,龙丽坤,等. 应用多重 PCR 技术筛选检测转 *Bt* 基因作物[J]. 现代食品科技,2014,30(5):262-266.
- [9] 吴孝槐,路勇. 利用实时荧光 PCR 方法检测转 *Bt* 基因大米[J]. 现代食品科技,2009,25(2):211-216,220.
- [10] Liang C J, van Dijk J P, Scholtens I M J, et al. Detecting authorized and unauthorized genetically modified organisms containing *vip3A* by real-time PCR and next-generation sequencing[J]. Anal Bioanal Chem, 2014, 406(11):2603-2611.
- [11] 曹际娟,徐君怡,赵昕,等. 转基因成分检测玉米检测方法: SN/T 1196—2012[S]. 北京:中国标准出版社,2012.
- [12] 全国农业转基因生物安全管理标准化技术委员会转基因植物及其产品成分检测抗虫转 *Bt* 基因棉花定性 PCR 方法:农业部 1485 号公告—11—2010[S]. 北京:中国农业出版社,2010.
- [13] Fraiture M A, Herman P, Taverniers I, et al. Current and new approaches in GMO detection: challenges and solutions[J]. Biomed Res Int, 2015:392872.
- [14] 王东,宋君,雷绍荣,等. SYBR® Green I 实时 PCR 检测转 *cry1Ab/c* 基因水稻[J]. 中国测试,2009,35(3):84-86.
- [15] Kamle S, Kumar A, Bhatnagar R K. Development of multiplex and construct specific PCR assay for detection of *cry2Ab* transgene in genetically modified crops and product[J]. GM Crops, 2011, 2(1):74-81.
- [16] Smith D S, Maxwell P W, Boer S H, et al. Method for the detection of synthetic *cry3A* in transgenic potatoes[J]. J Agric Food Chem, 2004, 52(4):809-815.