

转基因甜菜品系 H7-1 的数字 PCR 定量检测方法

刘二龙¹, 李婷², 高东微², 刘津²

(1. 黄埔出入境检验检疫局, 广东广州 510730)

(2. 广东检验检疫技术中心, 广东省动植物与食品进出口技术措施研究重点实验室, 广东广州 510623)

摘要: 为实现转基因甜菜品系 H7-1 的标识管理和精准定量, 根据 H7-1 的 5' 边界序列和甜菜谷氨酰胺合成酶基因 (glutamine synthetase, GS) 设计引物和探针建立双重数字 PCR 检测体系。该方法的特异性、灵敏度、精密度和准确度均进行了测试。结果显示: 建立的转基因甜菜 H7-1 数字 PCR 检测方法特异于 H7-1 品系检测, 在 20 μL 反应体系中 H7-1 品系特异性序列和内源基因 GS 的定量下限 (limit of quantitation, LOQ) 分别为 3.1 拷贝/ μL 和 6.3 拷贝/ μL , 检测下限 (limit of detection, LOD) 检出限分别为 0.6 拷贝/ μL 和 1.3 拷贝/ μL , 精密度和准确度在可接受范围内, 该定量方法不依赖于标准曲线建立, 可便捷的应用于转基因甜菜 H7-1 成分的精确定量检测。

关键词: 转基因甜菜; H7-1 品系; 数字 PCR

文章编号: 1673-9078(2017)7-261-269

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.7.037

Method for Quantitative Determination of Genetically Modified Sugar Beet Line H7-1 by Using Digital Polymerase Chain Reaction

LIU Er-long¹, LI Ting², GAO Dong-wei², LIU Jin²

(1. Huangpu Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510730, China) (2. Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center, Guangdong Key Laboratory of Import and Export Technical Measures of Animal, Plant and Food, Guangzhou 510623, China)

Abstract: In order to achieve labeling management and accurate quantification of genetically modified sugar beet H7-1, primer pairs and probes based on the 5' flanking sequence and glutamine synthetase (GS) of H7-1 were designed, and a duplex digital polymerase chain reaction (dPCR) detection method for H7-1 was established. The specificity, sensitivity, precision, and accuracy of the developed method were examined. The results showed that the developed dPCR method was specific for line H7-1 detection. The limits of quantitation (LOQs) of the specific sequence and endogenous GS gene of line H7-1 in a 20- μL reaction system were 3.1 copies/ μL and 6.3 copies/ μL respectively. The limits of detection (LODs) of the specific sequence and endogenous GS gene of line H7-1 in a 20 μL reaction system were 0.6 copies/ μL and 1.3 copies/ μL respectively. The precision and accuracy were all in the acceptable range. This quantitative method does not rely on the establishment of a standard curve, and can be easily applied for accurate quantification of sugar beet H7-1.

Key words: genetically modified sugar beet; line H7-1; digital polymerase chain reaction (dPCR)

转基因甜菜 H7-1 品系是美国孟山都公司研发的具有草甘膦除草剂抗性的转基因甜菜品系, 商品名为: Roundup ReadyTM sugar beet。2003 年~2015 年间, 日本、美国、加拿大、澳大利亚、哥伦比亚、菲律宾、

收稿日期: 2016-10-09

基金项目: 广东省科技计划项目 (2014A040401029); 出入境检验检疫行业标准计划项目 (2015B218k); 广东出入境检验检疫局科技计划项目 (2015GDK13)

作者简介: 刘二龙 (1978-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 微生物与分子生物学

通讯作者: 刘津 (1983-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品分子生物学检测

韩国和新加坡国家和地区相继批准甜菜 H7-1 品系作为食品或饲料用途, 中国于 2009 年批准用于食品和饲料^[1]。

近年来, 随着各国有关转基因标识法规的建立和不断完善, 很多国家要求对转基因含量进行定量检测, 以便进行相关标识, 其标识的阈值一般在 0.9%~5% 之间^[2]。建立转基因产品的定量检测技术标准尤其是精准定量检测技术是实施转基因产品标识的技术前提。

数字 PCR (digital PCR, dPCR) 是一种基于单分子扩增的精准核酸定量检测技术^[3]。dPCR 在进行扩增反应前, 将含有 DNA 模板的 PCR 溶液稀释后分布到大量的独立微滴或反应室, 样品的这种分配可以消除

本底信号的影响, 提高低丰度靶标的扩增灵敏度^[4]。它不同于传统的实时荧光 PCR, 因为采用直接计数目标分子数而不依靠任何校准物或外标, 通过计数单个分子从而实现绝对定量^[5]。国内目前对转基因甜菜 H7-1 及其衍生品种的检测方法包括普通 PCR 方法和 LAMP 方法进行定性检测^[6,7], 欧盟发布的官方检测方法^[8]为实时荧光 PCR 法, 尚未见转基因成分数字 PCR 定量检测方法报道。

本文拟采用双通道检测法, 将甜菜内源基因谷氨酰胺合成酶基因 (GS) 和 H7-1 品系特异性序列的探针分别标记为 VIC 和 FAM(甜菜谷氨酰胺合成酶基因和 H7-1 品系特异性序列在转基因甜菜 H7-1 基因组中均为单拷贝), 应用 QX 200 微滴式数字 PCR 通过在同一 PCR 反应体系中测得的内源基因 GS 和 H7-1 品系特异序列的拷贝数, 实现 H7-1 含量的精确定量检测, 并将本方法的引物和探针在 QuantStudio TM 3D 芯片式数字 PCR 仪上进行了初步的验证。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

甜菜 H7-1 品系标准品、甜菜 H7-1 阴性标准品、非转基因水稻、水稻 Bt63 品系、玉米 MIR604 品系、玉米 MIR162 品系、大豆 GTS40-3-2 品系、大豆 Mon89788 品系、大豆 A2704-12 品系、大豆 DAS68416-

4 品系和大豆 FG72 品系均由本室购置保存。

Premix Ex Taq TM, 大连宝生物; 植物基因组 DNA 提取试剂盒 DP302, 北京天根公司; MasterMix(2×)、ddPCR Droplet Generation Oil、GD8 Cartridge 均购自伯乐公司; 引物和探针由闪晶生物公司合成, 稀释为终浓度为 10 μmol/L 的工作液使用。

1.2 主要仪器

ABI 7500, ABI7500FAST 实时荧光定量 PCR 仪, 美国应用生物系统公司; 微量分光光度计 nanodrop 2000c, 美国 GE 公司; IKA 研磨机, 德国 IKA 公司; QX 200 微滴式数字 PCR 系统, 美国伯乐公司; QuantStudio TM 3D 数字 PCR 仪, 美国应用生物系统公司。

1.3 方法

1.3.1 DNA 的提取

使用天根植物基因组 DNA 提取试剂盒并按照其操作说明书提取 DNA, 用微量分光光度计 nanodrop 2000c 测定其浓度。4 °C 保存备用。

1.3.2 微滴式数字 PCR 体系及 H7-1 标准品扩增稳定性验证

转基因甜菜 H7-1 品系外源插入片段元件组成见图 1。引物探针序列及扩增体系见表 1。

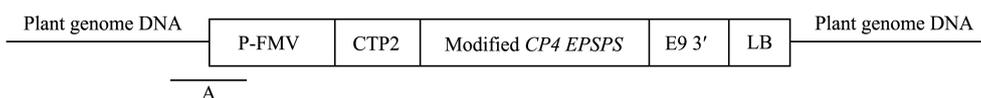


图 1 转基因甜菜 H7-1 品系外源插入片段示意图

Fig.1 Schematic diagram of inserted exogenous fragment in sugar beet H7-1

注: P-FMV 表示玄参花叶病毒(FMV35s)启动子; CTP2 表示叶绿体转运肽基因 2; Modified CP4 EPSPS 表示修饰过的来源于农杆菌 CP4 的莽草酸羟基乙酰转移酶基因; E9 3' 表示来源于豌豆核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶 3' 终止子; A 为引物和探针设计区域。

表 1 引物探针序列

Table 1 Primers and probes for dPCR

目标序列	引物探针序列	扩增片段大小	来源	备注
GS	GS-F: GACCTCCATATTACTGAAAGGAAG	118 bp	[8]	内源基因
	GS-R: AGTAATTGCTCCATCCTGTTCA			
	GS-P: VIC-TCTACGAAGTTTAAAGTATGTGCCGCTCTC-BHQ1			
H7-1 品系特异性序列	H7-1-F: GGGATCTGGGTGGCTCTAACT	107 bp	[8]	5' 边界序列
	H7-1-R: ACGAATGCTGCTAAATCCTGAG			
	H7-1-P: FAM-AAGGCGGAAACGAC-MGB			

QX200 数字 PCR 实验反应体系: MasterMix(2×) 10 μL, GS-F/GS-R/GS-P/H7-1-F/H7-1-R/H7-1-P(10 μmol/L)分别为 0.8 μL, DNA 模板 2 μL, 补水至 20 μL。反应参数: 95 °C、5 min (1 °C/s); 94 °C 15 s, 60 °C、

1 min (1 °C/s), 共 50 个循环; 98 °C、10 min(1 °C/s), 12 °C 保存反应产物。反应结束后将 96 孔反应板置微滴分析仪中读取数据, 应用 QuantaSoft V1.3.2 软件进行分析。

根据甜菜 H7-1 标准品证书介绍, 该标准品为杂合子, H7-1 品系特异性序列/内源基因 GS 的比例接近于 1/2, 为测试建立的微滴式数字 PCR 转基因甜菜 H7-1 品系的标准品的扩增稳定性, 以 9 ng/ μ L 转基因甜菜 H7-1 基因组 DNA 按照上述反应体系和参数进行检测, 设置 3 个平行同时对内源基因和 H7-1 品系特异性序列进行检测, 要求其结果的相对标准偏差 (Relative Standard Deviation RSD) 不超过 25%。

1.3.3 引物探针和特异性验证

本实验根据参考标准和文献选取甜菜谷氨酰胺合成酶 (glutamine synthetase, GS) 基因和甜菜 H7-1 品系特异性基因序列合成引物和探针 (见表 1), 并在实时荧光 PCR 仪上进行特异性验证, 扩增体系和程序为: Premix Ex TaqTM 10 μ L, GS-F/GS-R/GS-P/H7-1-F/H7-1-R/H7-1-P (10 μ mol/L) 分别为 0.8 μ L, DNA 模板 2 μ L, 补水至 20 μ L。反应参数: 反应程序为: Stage 1: 预变性 95 $^{\circ}$ C、30 s; Stage 2: 95 $^{\circ}$ C、5 s, 60 $^{\circ}$ C、34 s, 45 个循环, 并于 60 $^{\circ}$ C 收集荧光信号。

1.3.4 线性范围验证

将转基因甜菜 H7-1 标准品基因组 DNA 用 0.1 \times TE (Tris-HCl, EDTA-Na, pH 8.0) 缓冲液进行稀释成 9、1.8、0.36、0.072、0.014 和 0.007 ng/ μ L 共 6 个浓度 (在 20 μ L 体系中其稀释度分别为 700、140、28、5.6、1.12、0.56 拷贝/ μ L 甜菜内源基因 DNA, 350、70、14、2.8、0.56、0.28 拷贝/ μ L 甜菜 H7-1 品系特异性序列 DNA)。将 2 μ L 上述稀释度的 DNA 模板进行数字 PCR 检测, 每个稀释度 3 个平行。定量检测限 (Limit of Quantitation, LOQ) 为检测结果的 RSD 值小于等于 25% 的最低 DNA 样品用量或拷贝数/ μ L; 检测限 (Limit of Detection, LOD) 为阳性样品 100% 检出的样品最低 DNA 用量或拷贝数/ μ L。

1.3.5 定量检测限和检测限的验证

取 1.3.4 线性范围下限且 RSD \leq 25% 的 DNA 样品用量或拷贝数/ μ L 进行 LOQ 验证, 所得 10 个平行的结果的 RSD \leq 25% 为符合要求; 取 1.3.4 线性范围验证中可以稳定扩增的最低 DNA 样品用量或拷贝数/ μ L 进行 LOD 的验证, 要求阳性率为 100%。LOQ 和 LOD 验证均采用 10 个平行的检测。

1.3.6 精密度的验证

在重复性的条件下, 用相同的方法, 相同的测试项目, 在同一实验室, 由同一人员在很短的时间间隔内, 使用相同的仪器设备对取内源基因 GS 和 H7-1 品系特异性序列的 LOQ 对应 DNA 样品量或拷贝数/ μ L

和 LOQDNA 样品量 5 倍的 DNA 样品量或拷贝数/ μ L 进行精密度验证, 每个样品 5 个平行。将得到的检测结果计算 RSD, 要求 RSD \leq 25%。

1.3.7 准确度实验

准确度的定义为分别取内源基因 GS 和 H7-1 品系特异性序列 LOQ、LOQ 值 5 倍、LOQ 值 25 倍的 3 组 DNA 样品量来进行检测, 每组三个平行, 验证检测结果与该理论值之间的相符程度, 要求其偏差小于等于 25%。

1.3.8 芯片式数字 PCR 验证数据

为测试在 QX 200 微滴式数字 PCR 的方法所采用的引物和探针在 QuantStudioTM 3D 芯片式数字 PCR 上实验的准确性和精密度, 对内源基因 GS 和 H7-1 品系特异性序列的 LOD、LOQ、LOQ5 倍和 LOQ10 倍稀释度按照以下数字 PCR 程序和 PCR 体系进行检测, 每个样品进行 3 次平行检测, 根据结果计算拷贝数百分比、拷贝数 RSD 和偏差。

数字 PCR 实验反应体系: MasterMix(2 \times)7.5 μ L, GS-F/GS-R/GS-P/H7-1-F/H7-1-R/H7-1-P (10 μ mol/L) 分别为 0.6 μ L, DNA 模板 1.5 μ L, 补水至 15 μ L。反应参数: 96 $^{\circ}$ C、10 min; 60 $^{\circ}$ C、2 min, 98 $^{\circ}$ C、30 s, 49 cycles; 60 $^{\circ}$ C、2 min; 10 $^{\circ}$ C 保存的应产物。

2 结果与讨论

2.1 甜菜 H7-1 微滴式数字 PCR 体系及标准品

扩增稳定性验证

采用 1.3.2 中数字 PCR 体系和参数, 对甜菜 H7-1 标准品的内源基因 GS 和 H7-1 品系特异性序列进行检测的数据分析表 2 所示, 热点图如图 2 所示。内参基因 GS 三次扩增重复的实际检测拷贝数浓度分别为 565、607、618 copies/ μ L 即在 20 μ L 反应体系中拷贝数为 11300、12140 和 12360, 平均检测拷贝数为 11940, 相对标准偏差 (Relative Standard Deviation, RSD) 为 4.69%, 处于可接受的范围内 (小于等于 10%); H7-1 品系特异序列的三次扩增重复的实际检测拷贝数浓度分别为 311、319 和 316 copies/ μ L 即在 20 μ L 反应体系中拷贝数为 6220、6380 和 6320, 平均检测拷贝数为 6300, RSD 为 1.28%, 处于可接受的范围内 (小于等于 10%)。说明本文的内参基因 GS 和 H7-1 品系特异性序列的引物探针、数字 PCR 体系和参数对 H7-1 阳性标准品、扩增稳定性良好。

表 2 甜菜 H7-1 标准品扩增稳定性验证

Table 2 Stability test of H7-1 by dPCR

转基因品系	目标基因	模板上样量	拷贝数/ μL	平均拷贝数/ μL	RSD/%
甜菜 H7-1	品系特异性基因	18 ng	565	597	4.69
			607		
			618		
			311		
			319		
			316		

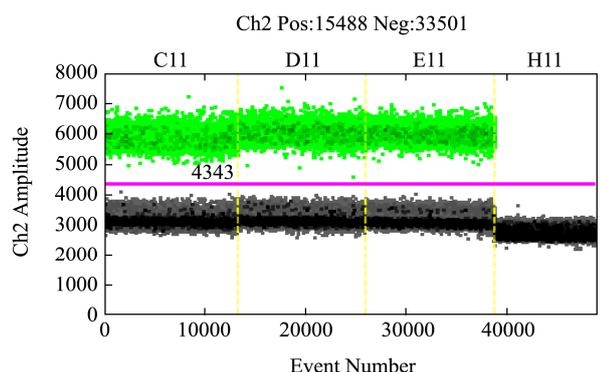
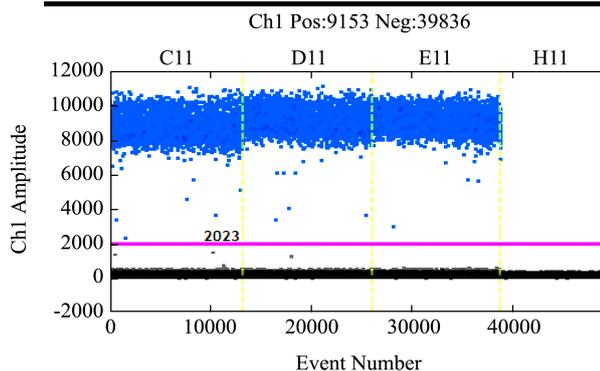


图 2 甜菜 H7-1 品系标准品扩增稳定性实验结果热点图

Fig.2 Heat map of the amplification stability test for sugar beet line H7-1

注: Ch1 为 FAM 荧光通道; Ch2 为 VIC 荧光通道; C11、D11 和 E11 为 H7-1 标准品 3 个重复; H11 为提取空白对照。

2.2 引物探针和特异性验证

采用表 1 中的品系特异性引物和探针进行实时荧光 PCR 检测, 11 种农作物仅甜菜 H7-1 标准品应用品系特异性引物探针有典型扩增, 如图 3 所示。

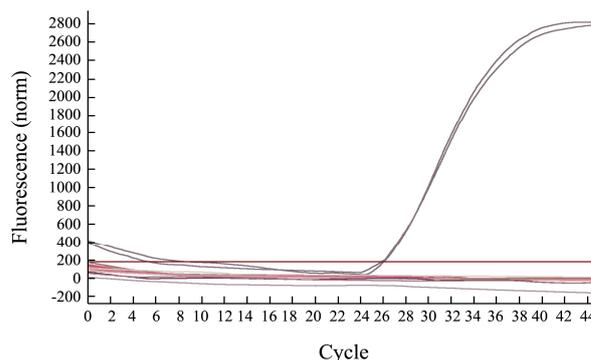


图 3 甜菜 H7-1 品系特异性实时荧光 PCR 实验结果

Fig.3 Specificity test of the event-specific detection method for H7-1 by real-time PCR

注: 阳性信号为甜菜 H7-1 品系标准品, 阴性信号包括: 甜菜 H7-1 阴性标准品、非转基因水稻、水稻 Bt63 品系、玉米 MIR604 品系、玉米 MIR162 品系、大豆 GTS40-3-2 品系、大豆 Mon89788 品系、大豆 A2704-12 品系、大豆 DAS68416-4 品系、大豆 FG72 品系标准品标准品和提取空白和试剂空白。

2.3 线性范围验证

样品的线性范围验证结果如表 3 所示, 体系为 20 μL 。以模板 DNA 量为横坐标, 目标序列拷贝数/ μL 为纵坐标, 在模板 DNA 量在 0.014~18 ng 区间内测定内源基因 GS 拷贝数/ μL 和 H7-1 品系特异性序列拷贝数/ μL , 所得到线性关系图如图 4 所示, 其 r^2 分别为 0.9971 和 1 (大于等于 0.98), 说明其线性相关性良好。在相应拷贝数/ μL RSD \leq 25%情况下, 可知本方法内源基因 GS 可以定量下限可达 6.3 拷贝/ μL 、H7-1 品系特异性序列的定量下限可达 3.1 拷贝/ μL 。

表 3 dPCR 线性范围验证实验

Table 3 Test of the dynamic range of the dPCR method

模板 DNA 量 /(ng/20 μL)	目的序列	理论拷贝数 / μL	平行组(拷贝/ μL)			平均值 (拷贝/ μL)	RSD /%
			1	2	3		
18	GS	700	678	669	736	694	5.24
	H7-1	350	390	373	395	386	2.99
3.6	GS	140	146	148	163	152	6.10

转下页

接上页

	H7-1	70	76.9	71.9	78.6	75.8	4.59
0.72	GS	28	28.7	29.5	33.8	30.7	8.94
	H7-1	14	15.8	16.8	15	15.9	5.68
0.144	GS	5.6	6.5	5.8	6.5	6.3*	6.45
	H7-1	2.8	3.6	2.3	3.4	3.1*	22.6
0.029	GS	1.12	1	1.2	1.7	1.3	27.7
	H7-1	0.56	0.7	0.6	0.4	0.6	25.5
0.014	GS	0.56	0.8	0.8	0.4	0.7	33.6
	H7-1	0.28	0.3	0.2	0.3	0.3	31.6

注: *分别表示 RSD≤25%时内源基因 GS 和 H7-1 品系特异性序列最低拷贝数/μL。

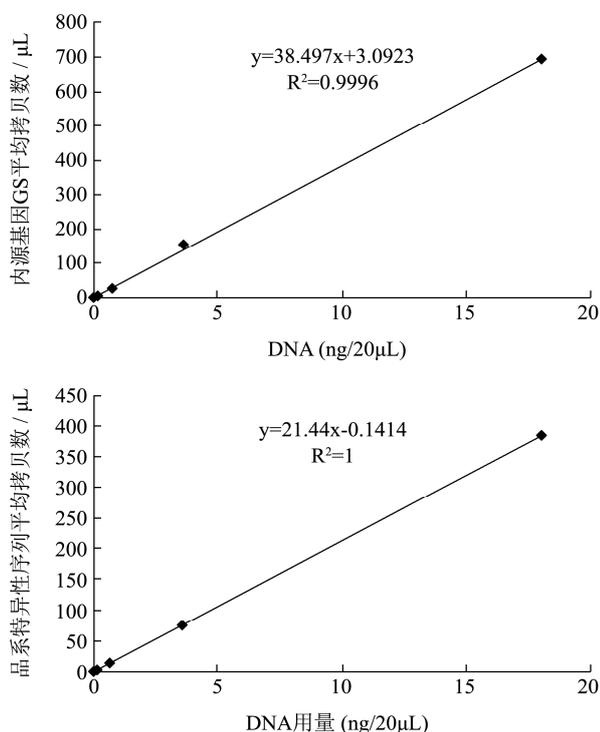


图4 甜菜 H7-1 数字 PC 方法线性范围拟合标准曲线

Fig.4 Standard curves in the linear range of the H7-1 dPCR assay

2.4 定量检测限和定性检测限的验证

从表 3 中选择 GS/H7-1 平均拷贝数分别为 6.3 和 3.1/μL (RSD≤25%) 的样品 DNA 进行内源基因 GS 和 H7-1 品系特异性序列的 LOQ 验证, 检测结果见表 4 和图 5。由表 4 可知, 该稀释度内源基因 GS 检测

10 个平行的检测结果 RSD 为 7.71%, H7-1 品系特异性序列 10 个平行的检测结果的 RSD 为 18.3%, 均符合要求 (≤25%)。

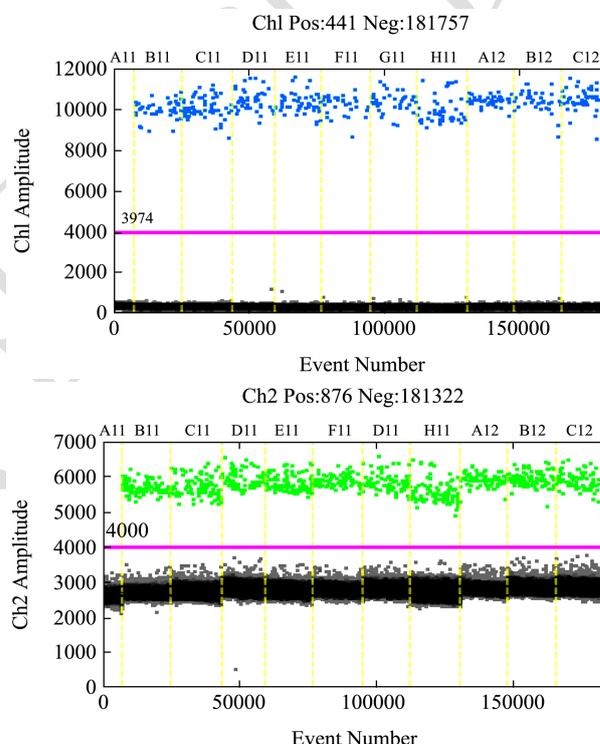


图5 甜菜 H7-1 数字 PCR 标准的 LOQ 验证实验热点图

Fig.5 Heat map of LOQ verification test of the H7-1 dPCR method

注: Ch1 为 FAM 荧光通道; Ch2 为 VIC 荧光通道; A11 为提取空白对照; B11、C11、D11、E11、F11、G11、H11、A12、B12 和 C12 为 LOQ 的 10 个重复。

表 4 甜菜 H7-1 数字 PCR 标准的 LOQ 验证实验

Table 4 Verification test of the LOQ of the H7-1 dPCR assay

模板量/ng	目标序列	平行组 (拷贝/μL)										平均值 (拷贝/μL)	RSD/%
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
0.144	GS	6.3	6.2	5.7	6.7	5.2	5.6	6.2	5.4	6	5.8	5.91	7.7
	H7-1	2.7	3.9	2.9	3.4	2.1	2.8	2.8	3.1	2.5	3.7	2.99	18.3

表 5 甜菜 H7-1 数字 PCR 方法的 LOD 验证实验

Table 5 LOD verification test of the H7-1 dPCR assay

模板量/ng	目的基因	平行组 (拷贝/μL)										平均值 (拷贝/μL)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
0.029	GS	1.1	1	1.1	1.4	1	1	1.6	1.5	1.6	1.2	1.25
	H7-1	0.69	0.62	0.94	1.02	0.45	0.59	0.79	1.23	0.81	0.67	0.78

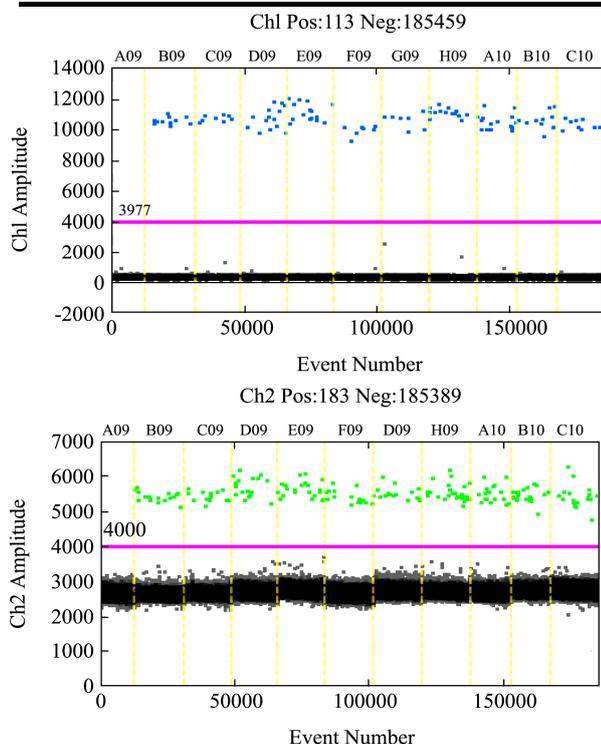


图 6 甜菜 H7-1 数字 PCR 方法的 LOD 验证实验热点图

Fig.6 Heat map of the LOD verification test of the H7-1 dPCR assay

注: Ch1 为 FAM 荧光通道; Ch2 为 VIC 荧光通道; A09 为提取空白对照; B09、C09、D09、E09、F09、G09、H09、A10、B10 和 C10 为 LOD 的 10 个重复。

从表 3 中选择 GS/H7-1 平均拷贝数 0.7 和 0.3/μL (RSD>25%) 进行 10 个平行检测时, 有一个样品未检出 (数据略), 故采用 GS/H7-1 平均拷贝数 1.3 和 0.6/μL (RSD>25%) 的样品 DNA 进行 10 个平行的内源基因 GS 和 H7-1 品系特异性序列的 LOD 验证, 结

表 6 甜菜 H7-1 数字 PCR 方法的精密度实验

Table 6 Precision test of the H7-1 dPCR assay

模板量/ng	目的基因	平行组 (拷贝/μL)					平均值 (拷贝/μL)	RSD/%
		1	2	3	4	5		
0.144	GS	6.3	6.2	5.7	6.7	5.2	6.02	9.6
	H7-1	2.7	3.9	2.9	3.4	2.1	3.00	22.9
0.72	GS	38.4	36.9	37.1	27.7	35.1	35.0	12.2
	H7-1	18.8	20	16.8	15.4	17.2	17.6	10.2

取 H7-1 品系特异性序列 LOQ 临界值和 LOQ 临界值 5 倍稀释度的 DNA 样品进行精密度验证, 每个

果如表 5 和图 6 所示, 阳性检出率为 100%, 符合质控要求。

2.5 甜菜 H7-1 数字 PCR 方法的精密度实验

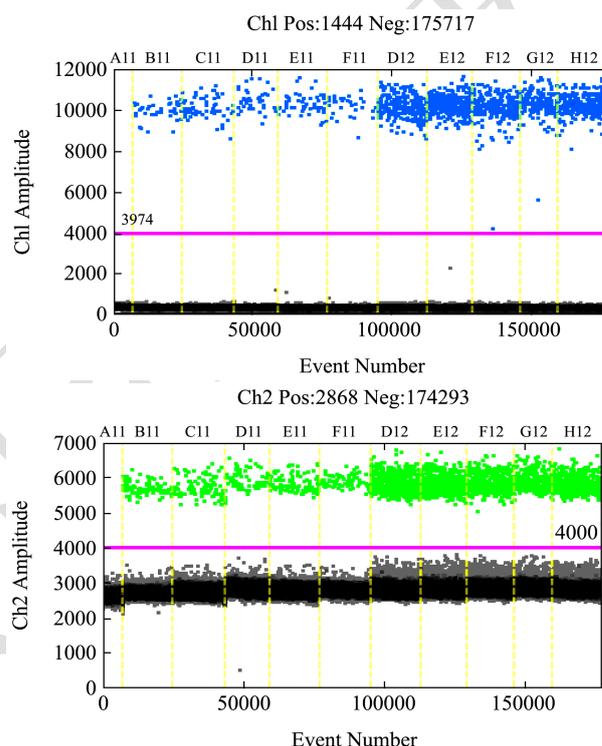


图 7 甜菜 H7-1 数字 PCR 方法精密度实验热点图

Fig.7 Heat map of the precision test of the H7-1 dPCR assay

注: Ch1 为 FAM 荧光通道; Ch2 为 VIC 荧光通道; A11 为提取空白对照; B11、C11、D11、E11 和 F11 为 LOQ 的 5 个重复, D12、E12、F12、G12 和 H12 为 5 倍 LOQ 的 5 个重复。

样品 5 个平行, 检测结果见表 6 和图 7。两组稀释度的 DNA 样品所得到的内参基因 GS 组内 RSD 值分别

为 9.6%和 12.2%，H7-1 品系特异性序列组内 RSD 值分别为 22.9%和 10.2%，符合方法对于精密度的要求 ($RSD \leq 25\%$)。

2.6 甜菜 H7-1 数字 PCR 方法的准确度实验

取 H7-1 品系特异性序列 LOQ、LOQ5 倍和 LOQ25 倍稀释度的 3 组阳性样品，每组 3 个平行，进行 H7-1 品系特异性序列和和内源基因 GS 拷贝数百分比的准

确度验证，结果如表 7 所示。所测得拷贝数百分比的平均值分别为 49.1%、52.1%和 49.8%，DNA 标准样品理论拷贝数百分比为 50%，计算得到浓度为 LOQ 值、LOQ5 倍、LOQ 值 25 倍的 DNA 样品的检测偏差分别为-0.88%、2.13%和-0.18%，三组偏差均符合要求（在 $\pm 25\%$ 范围内）。因此本方法可以比较准确的对甜菜 H7-1 品系进行相对定量检测。

表 7 甜菜 H7-1 数字 PCR 标准的准确度实验

Table 7 Accuracy test of the H7-1 dPCR assay

稀释度	平行	拷贝数 (外源/内参)	拷贝数百分比/%	平均拷贝数百分比/%	理论拷贝数百分比/%	偏差 Bias/%
LOQ	1	3.6/6.5	55.4	49.1	50	-0.88
	2	2.3/5.8	39.7			
	3	3.4/6.5	52.3			
LOQ5 倍	1	15.8/28.7	55.1	52.1	50	2.13
	2	16.8/29.5	56.9			
	3	15/33.8	44.4			
LOQ25 倍	1	76.9/146	52.7	49.8	50	-0.18
	2	71.9/148	48.6			
	3	78.6/163	48.2			

2.7 芯片式数字 PCR 初步验证

为测试在微滴式数字 PCR 平台上引物和探针在芯片式数字 PCR 上实验效果，采用 H7-1 品系特异性序列和内源基因 GS 的 LOD、LOQ、LOQ 临界值 5

倍和 LOQ 临界值 10 倍的 DNA 稀释度样品按照 1.3.8 的芯片式数字 PCR 程序和体系进行检测，每个样品进行 3 次平行检测，计算拷贝数百分比，组内 RSD 和偏差（见表 8）。

表 8 甜菜 H7-1 芯片式数字 PCR 实验验证结果

Table 8 Verification test by QuantStudio™ 3D digital PCR

稀释度	平行	内源基因 拷贝数/ μ L	外源基因 拷贝数/ μ L	内源基因 拷贝数/ μ L 平均值	外源基因 拷贝数/ μ L 平均值	内源基因 拷贝数 RSD/%	外源基因 拷贝数 RSD/%	拷贝数 百分比/%	偏差/%
LOD	1	1.86	0.6	2.08	0.76	101.86	43.26	36.54	-13.82
	2	4.30	1.13						
	3	0.08	0.53						
1LOQ	1	6.2	3.96	6.64	3.63	10.38	8.20	54.64	4.64
	2	6.24	3.39						
	3	7.43	3.53						
5LOQ	1	35.6	18.38	40.04	20.12	9.65	11.55	50.24	0.24
	2	41.93	19.21						
	3	42.61	22.76						
10LOQ	1	83.08	38.47	81.25	39.93	5.26	6.17	49.15	-0.85
	2	76.36	38.5						
	3	84.3	42.7						

从上表可知，LOD 稀释度的 DNA 样品的内源基因 GS、H7-1 品系特异性序列均检出。稀释度为 LOQ、5 倍 LOQ 和 10 倍 LOQ 的样品定量结果与理论值的偏

差都在 $\pm 25\%$ 以内，拷贝数 RSD 的值都小于 25%，表明在芯片式数字 PCR 仪上对甜菜 H7-1 品系样品进行定量方法精密度和准确性符合要求。图 9 为在芯片式

数字 PCR 平台检测图,其扩增效果良好,阴性点和阳性点能截然分开。

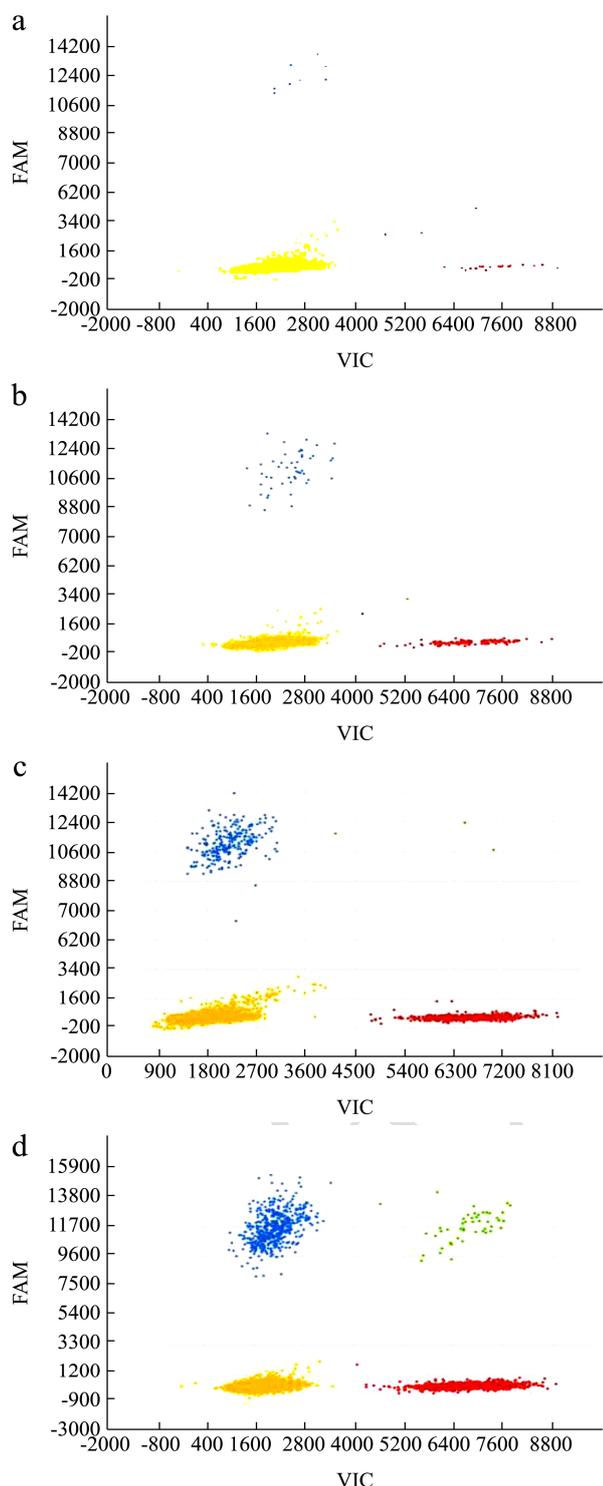


图8 甜菜 H7-1 芯片式数字 PCR 实验验证结果图

Fig.8 Plot of the verification test by QuantStudio™ 3D digital PCR

注: a 为 LOD; b 为 LOQ; c 为 5 倍 LOQ; d 为 10 倍 LOQ。

3 结论与讨论

3.1 多数国家对转基因产品均强制规定转基因成分

高于某一阈值时须进行标识。基于标准曲线的实时荧光 PCR 定量方法曾被称之为转基因分析的金标准。但随着获批的转基因产品大量出现,此类定量方法操作繁琐且检测成本增高^[9]。此外,在实时荧光定量转基因的分析中,制定标准曲线及实验对照所用的参考物质的稳定性和来源有限也限制了其应用;更加困难的方面是对于转基因与非转基因品系的混合样品,采用重量比例混合进行检测可能带来检测结果的偏差^[10,11],这是由于不同来源的参考物质(如种子和叶片),由于成分不同,其各部分的定量检测结果可能出现差异^[12]。

3.2 数字 PCR 技术在不依赖外部标准物质进行定量方面具有巨大的潜力,在避免实时荧光 PCR 扩增中体系的扩增效率、引物和探针的浓度、退火温度和 PCR 抑制因子效应对检测结果带来的影响方面更加有潜力,对于微量拷贝的样品的定量检测更加高效,应用前景广阔^[8,12-15]。不少学者采用数字 PCR 针对转基因成分定量检测进行了研究^[16-21]。这无疑将极大推动未来转基因作物精确定量检测技术的发展。

3.3 本文建立的转基因甜菜 H7-1 的数字 PCR 检测方法可对转基因甜菜 H7-1 进行精确定量,精密度和准确度均符合相关要求,实现真正意义上的绝对定量,相较实时荧光 PCR 方法依赖于标准曲线的定量方法,本方法更适合转基因产品的含量分析,满足相关部门对转基因及制品的监控、安全评价和风险预警等对转基因精准定量的需求。

参考文献

- [1] ISAAA's GM Approval Database [DB/OL]. <http://www.isaaa.org/gmaprovaldatabase/>
- [2] 刘二龙,卢丽,吕英姿,等.转基因苜蓿草 J101 品系特异性实时荧光 PCR 检测方法的建立[J].植物检疫,2015,29(3):77-82
LIU Er-long, LU Li, LV Ying-zi, et al. Event-specific Real-time PCR detection of genetically modified alfalfa events J101 [J]. Plant Quarantine, 2015, 29(3): 77-82
- [3] Vogelstein B, Kinzler K W. Digital Pcr [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999, 96(16): 9236-41
- [4] Sanders R, Huggett J F, Bushell C A, et al. Evaluation of digital PCR for absolute DNA quantification [J]. Analytical Chemistry, 2011, 83(17): 6474-84
- [5] 李亮,隋志伟,王晶,等.基于数字PCR的单分子DNA定量技术研究进展[J].生物化学与生物物理进展,2012,10:1017-1023
LI Liang, SUI Zhi-wei, WANG Jing, et al. Progress of digital

- PCR for single DNA quantification [J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2012, 10: 1017-1023
- [6] 农业部 1485 号公告-3-2010,转基因植物及其产品成分检测 耐除草剂甜菜 H7-1 及其衍生品种定性 PCR 方法[S] Ministry of Agriculture of the People's Republic of China.2010.Order 1485-3. Detection of genetically modified plants and derived products-qualitative PCR method for herbicide-tolerant sugar beet H7-1 and its derivatives [S]
- [7] SN/T 3767.29-2014,出口食品中转基因成分环介导等温扩增(LAMP)检测方法 第 29 部分 甜菜 H7-1 品系[S] SN/T 3767.29-2014, Loop-mediated isothermal amplification method for detection of herbicide-tolerant sugar beet h7-1 in exported foods [S]
- [8] QT-EVE-BV-001, Quantitative PCR method for detection of sugar beet event H7-1 [S]
- [9] Dobnik D, Spilberg B, Bogožalec K A, et al. Multiplex quantification of 12 European union authorized genetically modified maize lines with droplet digital polymerase chain reaction [J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(16): 8218-26
- [10] Scholdberg T A, Norden T D, Nelson D D, et al. Evaluating precision and accuracy when quantifying different endogenous control reference genes in maize using real-time PCR [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2009, 57(7): 2903-11
- [11] 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 & Technology, 2010, 231(3): 353-362
- [12] Köppel R, Bucher T. Rapid establishment of droplet digital PCR for quantitative GMO analysis [J]. European Food Research & Technology, 2015, 241(3): 1-13
- [13] 胡伟,陈荣华,张晨,等.微滴式数字 PCR 技术用于生物样品种属鉴定和绝对定量[J].法医学杂志,2014,30(5):342-345 HU Wei, CHEN Rong-hua, ZHANG Chen, et al. Species Identification and absolute quantification of biological samples by droplet digital PCR [J]. Journal of Forensic Medicine, 2014, 30(5): 342-345
- [14] Pinheiro L B, Coleman V A, Hindson C M, et al. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification [J]. Anal. Chem., 2012, 84(2): 1003-1011
- [15] 朱鹏宇.利用微滴数字 PCR 定量检测食品或饲料样品[J].农业生物技术学报,2013,12:1472-1472 ZHU Peng-yu. Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR [J]. Journal of Agrocultural Biotechnology, 2013, 12: 1472-1472
- [16] Dube S, Qin J, Ramakrishnan R. Mathematical analysis of copy number variation in a DNA sample using digital PCR on a nanofluidic device [J]. Plos One, 2008, 3(8): e2876
- [17] Corbisier P, Bhat S, Partis L, et al. Absolute quantification of genetically modified MON810 maize (*Zea mays*, L.) by digital polymerase chain reaction [J]. Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2010, 396(6): 2143-50
- [18] Morisset D, Milavec M, Gruden K, et al. Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR [J]. Plos One, 2013, 8(5): e62583-e62583
- [19] Köppel R, Bucher T, Frei A, et al. Droplet digital PCR versus multiplex real-time PCR method for the detection and quantification of DNA from the four transgenic soy traits MON87769, MON87708, MON87705 and FG72, and lectin [J]. European Food Research & Technology, 2015, 241(4): 521-527
- [20] Moser D A, Braga L, Raso A, et al. Transgene detection by digital droplet PCR [J]. Plos One, 2013, 9(11): e111781-e111781
- [21] Morisset D, Milavec M, Gruden K, et al. Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR [J]. Plos One, 2013, 8(5): e62583-e62583
-
- (上接第 307 页)
- [14] 王志杰,冷凯良,孙伟红,等.高效液相色谱-串联质谱内标法同时测定水产品中 15 种喹酮类药物残留量[J].分析科学学报,2010,26(4):409-414 WANG Zhi-jie, LENG Kai-liang, SUN Wei-hong, et al. Simultaneous determination of 15 quinolone residues in aquatic products by HPLC-MS/MS with Internal standard method [J]. Journal of Analytical Science, 2010, 26(4): 409-414