

转基因玉米MON87411双重微滴式数字PCR定量检测方法的建立

闫邦奇, 水克娟, 黎财慧, 徐淼锋, 林伟, 廖力, 张卫东*
(拱北海关技术中心, 广东珠海 519001)

摘要: 基于微滴式数字PCR技术, 建立了转基因玉米MON87411双重微滴式数字PCR定量检测方法。试验结果显示, 该方法仅有玉米MON87411能特异性检出, 其他样品均无扩增反应。扩增稳定性试验, 3次平行扩增内外源基因拷贝数RSD分别为0.56%和3.93%, 均符合RSD小于25%的要求。线性相关性曲线显示, 当模板DNA质量浓度在50~0.08 ng/ μ L之间时, 目标序列拷贝数与模板DNA浓度具有良好的线性关系, 相关系数 R^2 均大于0.99, 品系特异性序列定量线性范围在26.6~17 086.6拷贝之间, 定量限(LOQ)为1.34拷贝/ μ L。准确度试验, 五个不同质量浓度模板DNA平均拷贝数含量分别为52.14%、63.09%、66.08%、60.50%、52.16%, 均在理论拷贝数含量范围内。综上所述, 该研究建立的双重微滴式数字PCR定量检测方法特异性强, 稳定性好, 定量范围广, 灵敏度和准确度高, 可以用于转基因玉米MON87411的定量检测。

关键词: 双重微滴式数字PCR; 转基因玉米; MON87411; 定量检测

文章编号: 1673-9078(2025)03-378-386

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.3.0135

Establishment of A Quantitative Duplex Droplet Digital PCR Detection Method for Genetically Modified Maize MON87411

YAN Bangqi, SHUI Kejuan, LI Caihui, XU Miaofeng, LIN Wei, LIAO Li, ZHANG Weidong*
(Technical Center of Gongbei Customs District, Zhuhai 519001, China)

Abstract: Based on the droplet digital PCR technology, a quantitative duplex droplet digital PCR detection method for genetically modified maize MON87411 was established. The results showed that only the maize MON87411 could be specifically detected by this method, with no amplification reaction being observed in other samples. In the amplification stability test, the copy number RSD of endogenous and exogenous genes in three parallel amplifications were 0.56% and 3.93%, respectively, which met the requirement of RSD less than 25%. The linear correlation curve showed that when the mass concentration of template DNA was between 50 ng/ μ L and 0.08 ng/ μ L, there was a good linear relationship between the copy number of target genes and the template DNA concentration, with correlation coefficients R^2 greater than 0.99. The quantitative linear range of MON87411-specific gene was between 26.6 and 17 086.6 copies with the limit of quantification

引文格式:

闫邦奇,水克娟,黎财慧,等.转基因玉米MON87411双重微滴式数字PCR定量检测方法的建立[J].现代食品科技, 2025,41(3):378-386.

YAN Bangqi, SHUI Kejuan, LI Caihui, et al. Establishment of a quantitative duplex droplet digital pcr detection method for genetically modified maize MON87411 [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(3): 378-386.

收稿日期: 2023-01-29

基金项目: 科技部科技基础资源调查专项(2023FY100402); 海关总署科研项目(2024HK044); 拱北海关科研项目(2021GK010)

作者简介: 闫邦奇(1991-), 男, 工程师, 研究方向: 植物检疫及转基因, E-mail: yanbangqi666@163.com

通讯作者: 张卫东(1979-), 男, 硕士, 研究员, 研究方向: 植物检疫及转基因, E-mail: 68724000@qq.com

(LOQ) being 1.34 copies/ μL . In the accuracy test, the average copy number content at the five different template DNA mass concentrations were 52.14%, 63.09%, 66.08%, 60.50% and 52.16%, respectively, which were all within the theoretical copy number content range. In summary, the quantitative duplex droplet digital PCR detection method established in this study had high specificity, good stability, wide quantification range, high sensitivity and accuracy, thus can be used for the quantitative detection of genetically modified maize MON87411.

Key words: duplex droplet digital PCR; genetically modified maize; MON87411; quantitative detection

随着生物技术的快速发展,转基因技术在农业上的应用规模迅速扩大^[1]。截至到2022年,全球种植的转基因作物面积高达2.022亿 hm^2 ,占全球农作物种植面积的12%,比1996年增长了118倍,多达71个国家或地区应用转基因作物,玉米 *Zea mays* L. 是应用最多的转基因作物之一,占全球玉米种植面积的32.9%^[2]。转基因作物商业化种植为全球带来了巨大的经济效益,但是,近年来,对于转基因作物潜在的食品安全、生态环境安全和社会风险^[3]等问题争议愈发激烈。许多国家为了兼顾保障转基因生物安全和国际贸易的利益,制定了转基因阈值标识制度^[4],欧盟设定阈值为0.9%,韩国为3%,日本为5%^[5],转基因阈值标识的设定,使转基因检测由定性向定量发展,为转基因检测监管体系提出了更高要求。为了解决转基因精准定量、转基因成分低水平混杂^[6]等问题,迫切需要建立稳定、准确的转基因作物定量检测方法。

目前,各国研究人员普遍采用实时荧光PCR技术进行转基因定量分析,建立了诸如转基因大豆GTS40-3-2^[7],转基因玉米98140^[8]等转基因作物的实时荧光PCR定量检测方法,该方法依赖于标准物质或阳性质粒建立标准曲线。标准曲线的质量易受到核酸纯度、抑制因子等诸多因素影响,而且样品与标准物质或阳性质粒存在差异,PCR扩增效率可能不同^[9,10],因此采用qPCR方法进行转基因定量检测存在一定的局限性。

微滴式数字PCR(Droplet Digital Polymerase Chain Reaction, ddPCR)是一种绝对定量检测技术,通过极限稀释,将传统的PCR反应划分为数万个独立的PCR反应微滴,理论上达到大多数微滴单元中存在零或一个目标序列,每个微滴单元独立检测,通过泊松分布原理统计分析阳性和阴性微滴的数量来确定模板的起始浓度^[11]。与传统实时荧光PCR相比,ddPCR可以直接定量DNA分子,既不需要任

何标准曲线,也消除了对 C_t 值的依赖,减少了抑制物等因素对PCR反应的干扰,实验操作简便、灵敏度和精确度高^[12,13]。转基因玉米MON87411是孟山都公司研发的抗虫耐除草剂玉米转化体,2020年我国批准该品系进境,用于加工原料。目前我国尚无该品系定量检测的标准,未有采用数字PCR技术对转基因玉米MON87411定量检测研究的报道。本研究拟以转基因玉米MON87411为材料,建立转基因玉米MON87411双重微滴式数字PCR定量检测方法,推动相关数字PCR定量检测标准的建立,以期作为转基因监管体系提供技术支撑,为我国进出口贸易提供保障。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料

以转基因玉米MON87411品系为研究对象,另外选取7种其他转基因玉米品系,11种其他转基因植物标准物质以及5种非转基因植物作为试验材料。上述材料信息详见表1。

1.1.2 主要仪器与试剂

Eppendorf Centrifuge 5804R离心机,德国艾本德公司;ThermoMixer C恒温孵育器,德国艾本德公司;ESCO class II生物安全柜,新加坡艺思高科技有限公司;QX200 Droplet Digital PCR系统,美国伯乐公司;DanoDrop 3300微量分光光度计,美国赛默飞公司;2×Superstart Premix,珠海宝锐生物科技有限公司;ddPCR Droplet Generation Oil、ddPCR SuperMix、ddPCR Droplet Reader Oil、Droplet Generator DG8 Gasket、Droplet Generator DG8 Cartridge,美国伯乐公司;引物和探针由广州天一辉远基因科技有限公司合成。

表 1 试验材料信息
Table 1 Test materials list

序号	材料	来源	货号
1	转基因玉米 MON87411	美国油脂化学家协会	0215-B
2	转基因玉米 Bt11	欧盟标准局	ERM-BF-412ek
3	转基因玉米 MON810	欧盟标准局	ERM-BF-413gk
4	转基因玉米 MON863	欧盟标准局	ERM-BF-416d
5	转基因玉米 DP98140	欧盟标准局	ERM-BF427d
6	转基因玉米 MIR162	美国油脂化学家协会	1208-A
7	转基因玉米 MON88017	美国油脂化学家协会	0406-D
8	转基因玉米 GA21	美国油脂化学家协会	0407-B
9	转基因油菜 GT73	美国油脂化学家协会	0304-B
10	转基因油菜 RF1	美国油脂化学家协会	0711-B2
11	转基因油菜 RF2	美国油脂化学家协会	0304-C2
12	转基因油菜 MON88302	美国油脂化学家协会	1011-A
13	转基因水稻 Bt63	中国检科院	JKY-BZ-002
14	转基因大豆 GTS40-3-2	欧盟标准局	ERM-BF-410gk
15	转基因大豆 MON87769	美国油脂化学家协会	0809-B
16	转基因大豆 MON87701	美国油脂化学家协会	0809-A
17	转基因大豆 MON89788	美国油脂化学家协会	0906-B
18	转基因棉花 MON88913	美国油脂化学家协会	0906-D
19	转基因棉花 MON1445	美国油脂化学家协会	0804-B
20	非转基因玉米	美国油脂化学家协会	0411-C2
21	非转基因水稻	本实验室保存	/
22	非转基因大豆	本实验室保存	/
23	非转基因小麦	本实验室保存	/
24	非转基因油菜	本实验室保存	/

表 2 引物探针序列
Table 2 Primer probe sequence

目标序列	引物探针序列 (5'-3')	片段大小 /bp
MON87411	MON87411-F:CTCTGTAACAGAAAACACCATCTAGAG	109
	MON87411-R:ACAAAAGTGAAGTACTAGTTCTAGGGTAGAT	
	MON87411-P:FAM-CCGCGTTTAAACTATCAGTGTTTAGAGAAT-BHQ1	
HMG	HMG-F:TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA	79
	HMG-R:GCTACATAGGGAGCCTTGTCCT	
	HMG-P:HEX-CAATCCACACAAACGCACGCGTA-BHQ1	

1.2 方法

1.2.1 引物探针及其特异性验证

本研究选择内参基因玉米高速泳动蛋白基因 *HMG* 和转基因玉米 MON87411 品系特异性序列, 引物探针序列均参照欧盟转基因食品和饲料参考实验

室公布的 MON87411 qPCR 检测方法^[14], 详细信息见表 2。以转基因玉米 MON87411 品系为研究对象, 选取 7 种其他转基因玉米品系, 11 种其他转基因植物标准物质以及 5 种非转基因植物材料, 在实时荧光 PCR 仪上, 对引物探针的特异性进行验证, 实时荧光 PCR 反应体系 (25 μL): 2×Superstart Premix (含

dNTP, Mg^{2+}) 12.5 μL , 上下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.75 μL , 探针 (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , DNA 模板 5 μL , 加入 ddH_2O 补足 25 μL ; PCR 反应条件: 95 $^\circ\text{C}$, 10 min; 95 $^\circ\text{C}$, 15 s; 60 $^\circ\text{C}$, 60 s, 45 个循环。

1.2.2 双重微滴式数字PCR 反应体系和反应条件的优化与建立

本研究对 ddPCR 反应体系中的引物和探针浓度、退火温度等进行了优化, 建立了 ddPCR 反应体系 (20 μL): 2 \times ddPCR SuperMix 10 μL , 上下游引物各 0.8 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), 探针各 0.4 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), DNA 模板 2 μL , 加入 ddH_2O 补足体积至 20 μL 。

反应条件: 95 $^\circ\text{C}$ 预变性 10 min; 94 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s, 58 $^\circ\text{C}$ 退火 1 min, 40 个循环; 98 $^\circ\text{C}$ 保持 10 min; 12 $^\circ\text{C}$ 保存。

扩增结束后使用 QuantaSoft Version 1.7.4.0917 软件进行微滴信号读取和数据分析。

1.2.3 扩增稳定性验证

对转基因玉米 MON87411 品系标准品进行 ddPCR 扩增稳定性验证。以 10 ng/ μL 转基因玉米 MON87411 品系基因组 DNA 为模板, 按照 1.2.2 节反应体系和反应条件进行 ddPCR 反应, 同时设置 3 个平行反应, 要求 3 个平行实验结果的相对标准偏差 (Relative Standard Deviations, RSD) 不超过 25%。

1.2.4 灵敏度试验

将提取的转基因玉米 MON87411 品系标准品基因组稀释至 50 ng/ μL , 再用 ddH_2O 依次进行 5 个梯度的稀释, 最终分别稀释成 10、2、0.4、0.08、0.016 ng/ μL 。以上述梯度稀释的基因组为模板, 取样 2 μL 进行 ddPCR 反应, 每个质量浓度做 3 次重复。计算各质量浓度 3 次重复扩增反应结果的 RSD 值, 以结果 RSD 小于 25% 的最低样品用量或样品拷贝数为定量检测限 (Limit of Quantitation, LOQ)。

1.2.5 定量检测限验证

根据 1.2.4 灵敏度实验结果, 取相应质量浓度的核酸样品, 进行 LOQ 的验证。相应质量浓度的 DNA 均进行 10 个平行的 ddPCR 检测试验。LOQ 验证要求 10 个平行结果的 RSD 小于 25%。

1.2.6 准确性验证

以 1.2.4 节中定量数据为基础, 取其中 RSD 小于 25% 的实验数据, 计算不同浓度模板 DNA 样品的拷贝数含量、平均拷贝数含量和 RSD 值, 来验证定量结果准确性。

2 结果与讨论

2.1 引物探针及其特异性验证

应用实时荧光 PCR 方法对转基因玉米 MON87411 品系、7 种其他转基因玉米品系, 11 种非转基因植物标准物质以及 5 种非转基因植物材料进行特异性验证, 结果如表 3 所示。MON87411 品系特异性序列扩增结果显示, 转基因玉米 MON87411 样品的 C_t 值为 23.78, 说明该样品有特异性扩增, 检出 MON87411 品系, 其他样品 C_t 值均大于等于 45.00, 表明无扩增反应; 内参基因 *HMG* 扩增结果显示, 玉米样品的扩增 C_t 值均小于 30.00, 说明有检出玉米内参基因, 其他样品 C_t 值均大于等于 45.00, 无扩增反应, 结果表明该引物探针对特异性良好。

表 3 引物探针特异性验证结果
Table 3 Primer probe specific validation results

序号	样品	目标序列 C_t 值	
		MON87411	<i>HMG</i>
1	转基因玉米 MON87411	23.78	23.93
2	转基因玉米 Bt11	≥ 45.00	24.55
3	转基因玉米 MON810	≥ 45.00	24.37
4	转基因玉米 MON863	≥ 45.00	25.43
5	转基因玉米 DP98140	≥ 45.00	24.83
6	转基因玉米 MIR162	≥ 45.00	26.93
7	转基因玉米 MON88017	≥ 45.00	23.27
8	转基因玉米 GA21	≥ 45.00	24.97
9	转基因油菜 GT73	≥ 45.00	≥ 45.00
10	转基因油菜 RF1	≥ 45.00	≥ 45.00
11	转基因油菜 RF2	≥ 45.00	≥ 45.00
12	转基因油菜 MON88302	≥ 45.00	≥ 45.00
13	转基因水稻 Bt63	≥ 45.00	≥ 45.00
14	转基因大豆 GTS40-3-2	≥ 45.00	≥ 45.00
15	转基因大豆 MON87769	≥ 45.00	≥ 45.00
16	转基因大豆 MON87701	≥ 45.00	≥ 45.00
17	转基因大豆 MON89788	≥ 45.00	≥ 45.00
18	转基因棉花 MON88913	≥ 45.00	≥ 45.00
19	转基因棉花 MON1445	≥ 45.00	≥ 45.00
20	非转基因玉米	≥ 45.00	23.90
21	非转基因水稻	≥ 45.00	≥ 45.00
22	非转基因大豆	≥ 45.00	≥ 45.00
23	非转基因小麦	≥ 45.00	≥ 45.00
24	非转基因油菜	≥ 45.00	≥ 45.00

2.2 反应体系和反应条件的优化和确定

2.2.1 反应体系确定

双重 ddPCR 反应体系中同时含有内参基因和品系特异性序列两对引物探针，两者之间可能存在相互干扰，影响试验数据分析，因此需要对反应体系进行优化验证。本研究选取引物浓度 $0.4 \mu\text{mol/L}$ ，探针浓度 $0.2 \mu\text{mol/L}$ 进行 ddPCR 反应体系优化试验，结果如图 1 所示，a 和 b 图分别为 MON87411 品系和 *HMG* 基因的反应体系试验热点图，图中灰色微滴代表阴性微滴，蓝色及绿色微滴分别代表 MON87411 品系特异性序列和内参基因阳性微滴。结果显示，MON87411 品系特异性序列和内参基因均有扩增反应，品系特异性序列和内参基因的扩增荧光强度高，阳性微滴与阴性微滴之间分界明显，表明两对引物和探针之间无干扰或相互干扰影响低^[15]，当引物和探针的终浓度分别为 0.4 和 $0.2 \mu\text{mol/L}$ 时，扩增效果良好。

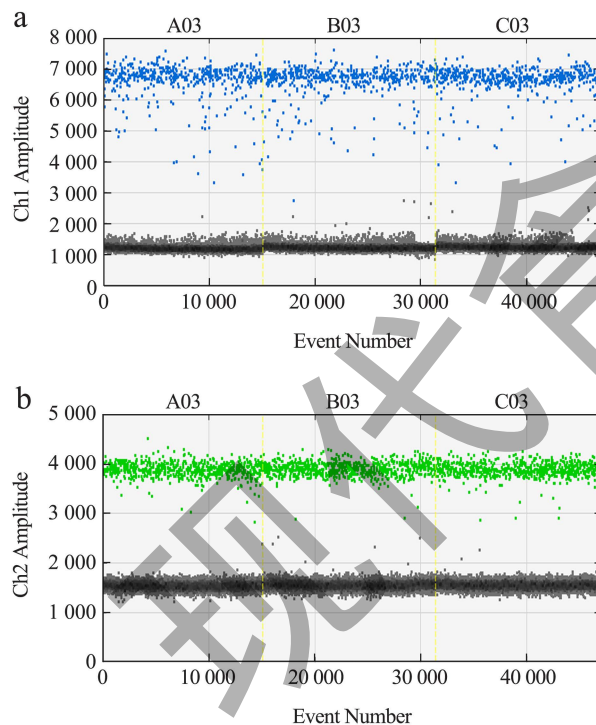


图 1 反应体系优化结果

Fig.1 Reaction system optimization results

2.2.2 退火温度的优化和确定

ddPCR 是将传统 PCR 的指数数据转换成数字信号，结果以阳性和阴性微滴数目表示。阳性微滴与阴性微滴需要一定的荧光强度差，图谱界线区分明显，便于反应结果数据的读取分析，所以反应条件的优化尤为重要^[16]。本研究选取 $65\sim 50 \text{ }^\circ\text{C}$ 设置

了 8 个 (65 、 63.8 、 62 、 59.1 、 55.7 、 52.9 、 51 、 $50 \text{ }^\circ\text{C}$) 不同的退火温度，按 1.2.2 节配制 ddPCR 反应体系进行扩增测试，以此来确定引物探针的最佳退火温度，实验结果如图 2 所示，a 和 b 图分别为 MON87411 品系特异性序列和内参基因 *HMG* 的退火温度优化实验热点图。结果显示，随着退火温度的降低，品系特异性序列和内参基因阳性微滴荧光强度均逐渐增强，当温度低至 $55.7 \text{ }^\circ\text{C}$ 时阳性微滴荧光强度达到最大。在 $55.7\sim 50 \text{ }^\circ\text{C}$ 之间时，阳性微滴荧光强度一致，随着温度的降低，品系特异性序列阳性微滴拖尾现象越来越明显，阳性微滴与阴性微滴界限模糊。因此退火温度在 $59.1\sim 55.7 \text{ }^\circ\text{C}$ 之间时，品系特异性序列和内参基因阳性微滴与阴性微滴荧光强度差达到最大，ddPCR 系统能够准确读取阳性微滴和隐性微滴的数目^[17]。退火温度过低，会降低引物结合的特异性^[18]，导致非特异性 PCR 产物的扩增，加重阳性微滴拖尾现象，拟选择 $58 \text{ }^\circ\text{C}$ 作为最佳退火温度。以 $58 \text{ }^\circ\text{C}$ 作为退火温度，ddPCR 结果如图 3 所示，二维热点图中有 a、b、c、d 四个分界清晰的微滴团簇，对应于阴性、内参阳性、品系特异性序列阳性和双阳性微滴群，阴性微滴与阳性微滴之间分离效果较好，表明 $58 \text{ }^\circ\text{C}$ 可以作为最佳退火温度。

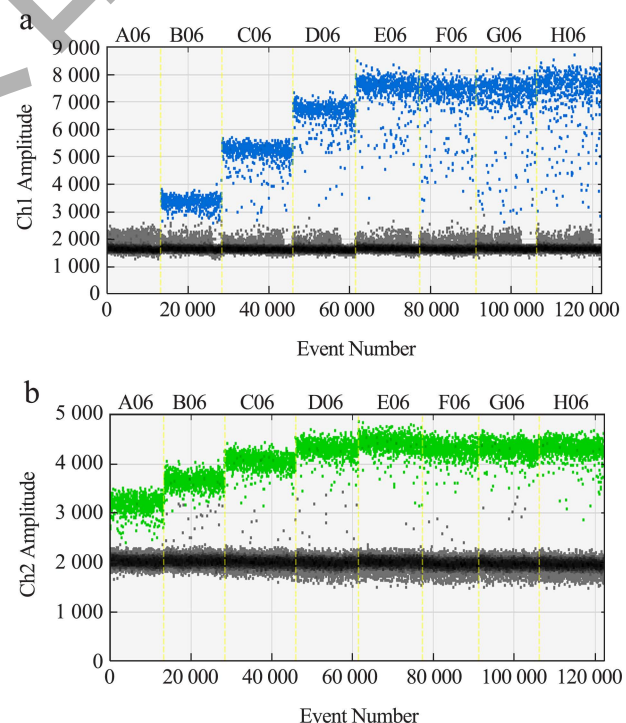


图 2 退火温度优化结果

Fig.2 Annealing temperature optimization results

注: A06 : $65 \text{ }^\circ\text{C}$; B06 : $63.8 \text{ }^\circ\text{C}$; C06 : $62.0 \text{ }^\circ\text{C}$; D06 : $59.1 \text{ }^\circ\text{C}$; E06 : $55.7 \text{ }^\circ\text{C}$; F06 : $52.9 \text{ }^\circ\text{C}$; G06 : $51 \text{ }^\circ\text{C}$; H06 : $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

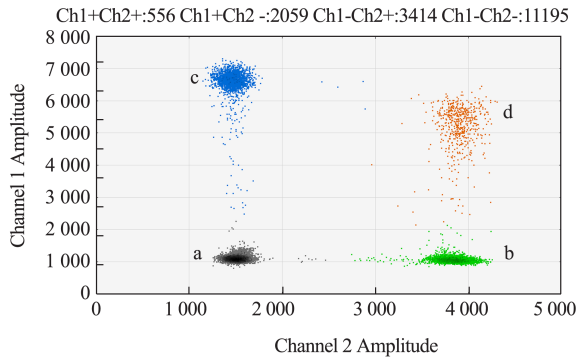


图 3 58 °C 时双重 ddPCR 二维热点图

Fig.3 2D hot plot of duplex ddPCR at 58 °C

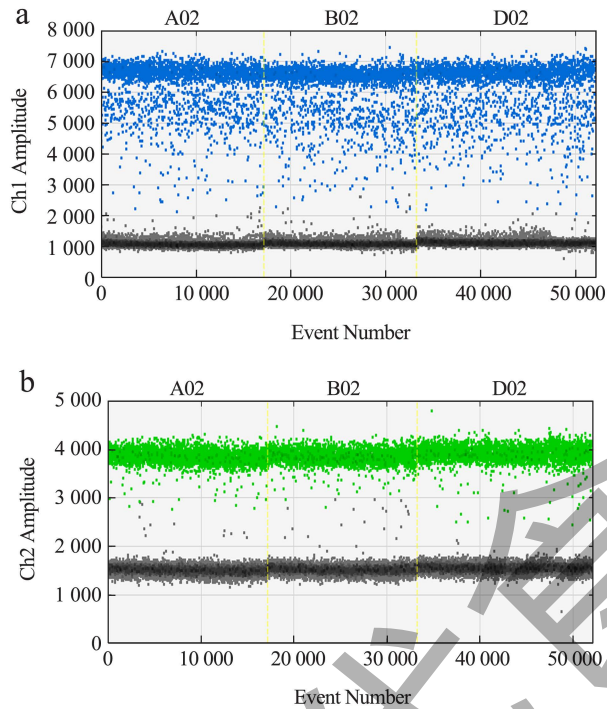


图 4 MON87411 品系特异性序列和内参基因 *HMG* 扩增稳定性数字 PCR 图谱

Fig.4 MON87411 strain specific sequence and internal reference gene *HMG* amplification stability digital PCR map

2.3 扩增稳定性验证

采用优化的反应体系和反应条件，以 10 ng/μL 的转基因玉米 MON87411 标准物质基因组 DNA 为模板对内参基因 *HMG* 和 MON87411 品系特异性序列进行 ddPCR 扩增稳定性验证，结果如图 4 所示，其中图 a 和 b 分别为 MON87411 品系特异性序列和内参基因 *HMG* 扩增稳定性试验热点图，验证数据见表 4。ddPCR 扩增反应热点图显示，3 次扩增反应微滴数均大于 15 000，完全满足泊松分布统计学（有效微滴数大于 10 000）的要求^[19]，总的微滴数目越多，定量结果更加准确。MON87411 品系特异性序列的 3 次扩增拷贝数每微升分别为 193、

199、184 拷贝，RSD 为 3.93%；内参基因 *HMG* 的 3 次扩增拷贝数每微升分别为 309、309、306 拷贝，RSD 为 0.56%。品系特异性序列和内参基因 3 次扩增的拷贝数 RSD 均小于 25%，符合定量要求。

表 4 扩增稳定性验证

Table 4 Amplification stability verification

目标序列	拷贝数/ (拷贝/μL)	平均拷贝数/ (拷贝/μL)	标准偏差/ SD	RSD/%
	193			
MON87411	199	192	7.54	3.93
	184			
<i>HMG</i>	309	308	1.73	0.56
	306			

2.4 灵敏度试验

灵敏度试验结果如表 5 所示，当模板 DNA 质量浓度低至 0.08 ng/μL 时，MON87411 品系特异性序列和内参基因 *HMG* 3 次重复扩增的 RSD 仍均小于 25%，玉米内参基因 *HMG* 浓度为 2.57 拷贝/μL，MON87411 品系特异性序列浓度为 1.33 拷贝/μL，结果表明，本方法灵敏度高于 Li 等^[18]、刘津等^[20]、Xu 等^[21] 和 Deng 等^[22] 建立的数字 PCR 定量方法。以模板 DNA 浓度为横坐标，目标序列拷贝数浓度为纵坐标绘制相关曲线，结果如图 5 所示。模板 DNA 质量浓度在 50~0.08 ng/μL 之间时，目标序列拷贝数与模板 DNA 浓度具有良好的线性关系，相关系数 R^2 均大于 0.99。内参基因 *HMG* 定量线性范围在 51.4~32 780 拷贝之间，品系特异性序列定量线性范围在 26.6~17 086.6 拷贝之间。

2.5 定量检测限验证

取在线性范围验证中可以稳定扩增的最低 DNA 质量浓度进行 LOQ 验证。由 2.4 节可知，线性范围下限的模板 DNA 质量浓度为 0.08 ng/μL，以该质量浓度的样品 DNA 为模板进行 10 个平行的数字 PCR 扩增反应，LOQ 验证结果如表 6 所示，内参基因 *HMG* 的平均拷贝数为 2.2 拷贝/μL，RSD 为 15.3%；MON87411 品系特异性序列的平均拷贝数为 1.34 拷贝/μL，RSD 为 17.74%，RSD 都小于 25%，符合试验方法要求。因此，本方法可以稳定定量 1.34 拷贝/μL（26.8 拷贝）的品系特异性序列，低于李凌燕等^[23] 建立的转基因玉米 MON87411 实时荧光 PCR 定量检测方法定量限（40 拷贝）。

表 5 灵敏度验证
Table 5 Sensitivity verification

模板 DNA 质量浓度 / (ng/μL)	目标序列	拷贝数 / (拷贝/μL)			平均拷贝数 / (拷贝/μL)	RSD/%
		1	2	3		
50	MON87411	862	829	872	854.33	2.63
	HMG	1 637	1 580	1 700	1 639	3.66
10	MON87411	194	199	213	202	4.88
	HMG	309	309	343	320.33	6.13
2	MON87411	36.5	37	37.4	36.97	1.22
	HMG	57.9	55.8	54.3	56	3.23
0.4	MON87411	6.1	6.7	6.6	6.47	4.97
	HMG	10.6	12.3	9.5	10.8	13.06
0.08	MON87411	1.6	1.3	1.1	1.33	18.87
	HMG	2.7	2.9	2.1	2.57	16.22
0.016	MON87411	0.08	0.19	0.17	0.15	39.95
	HMG	0.4	0.28	0.42	0.37	20.65

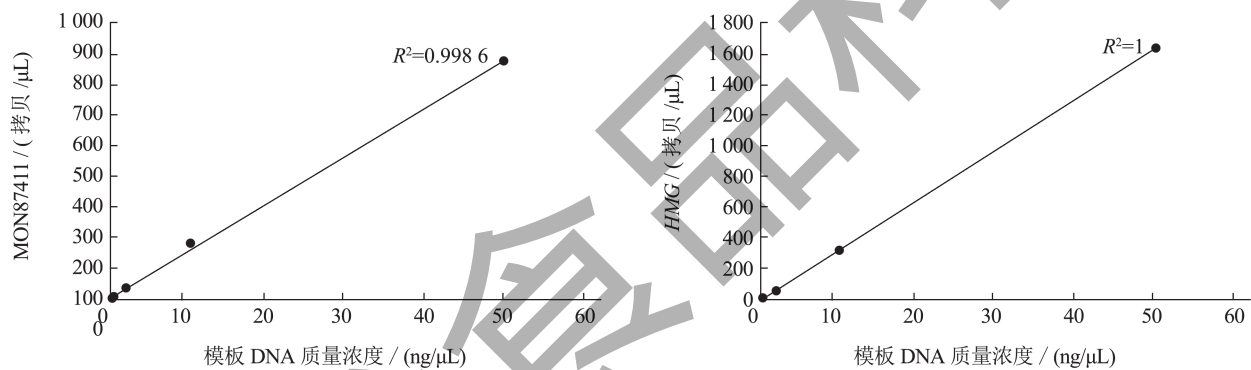


图 5 线性相关性曲线

Fig.5 Linear correlation curve

表 6 LOQ 验证

Table 6 LOQ verification

质量浓度 / (ng/μL)	目的基因	拷贝数 / (拷贝/μL)										平均拷贝数 / (拷贝/μL)	RSD/%
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
0.08	MON87411	1.30	1.60	1.20	1.30	1.40	1.80	1.30	1.13	1.40	0.95	1.34	17.74
	HMG	2.3	2.3	2.4	2.8	2.3	1.9	2.2	2.1	2.2	1.5	2.2	15.3

2.6 准确性验证

本研究实验材料 AOCS 0215-B 标准品证书显示, 转基因玉米 MON87411 品系标准品 (100% 质量百分含量) 是由孟山都公司提供的玉米种子的粉末, 该种子是外源基因来源于母本的杂合型种子。通常采用已知转基因含量的标准物质或阳性质粒进行定量准确性验证, 但是玉米种子胚乳为三倍体, 对于外源基因来源于母本的杂合性玉米种子, 胚乳细胞三分之二的基因组含有外源基因, 拷贝数含量取决于胚乳

所占的比例。根据以往研究, 外源基因来源于父本的杂合型转基因玉米标准品拷贝数含量在 33%~50% 之间^[24-26], 反之这种外源基因来源于母本的杂合型转基因玉米标准品, 其拷贝数含量理论上在 50%~67% 之间。如表 7 所示, 五个不同质量浓度模板 DNA 平均拷贝数含量分别为 52.14%、63.09%、66.08%、60.50%、52.16%, 均在理论拷贝数含量范围内, 且 RSD 均小于 25%, 结果表明本研究建立的转基因玉米 MON87411 品系定量检测方法准确性高。

表 7 准确性验证
Table 7 Accuracy verification

质量浓度/ (ng/ μ L)	拷贝数含量/%			平均值 /%	RSD /%
	1	2	3		
50	52.66	52.47	51.29	52.14	1.42
10	62.78	64.40	62.10	63.09	1.87
2	63.04	66.31	68.88	66.08	4.43
0.4	57.55	54.47	69.47	60.50	13.10
0.08	59.26	44.83	52.38	52.16	13.84

3 结论

为了平衡转基因生物安全和国际贸易利益，转基因阈值标识管理是未来的发展趋势。因此，迫切需要建立稳定、精准的转基因定量检测方法，以满足阈值标识监管的要求。本研究在国内首次建立了转基因玉米 MON87411 双重微滴式数字 PCR 定量检测方法。该方法引物探针特异性强，ddPCR 反应体系引物和探针的最佳终浓度分别为 0.4 μ mol/L 和 0.2 μ mol/L，最佳退火温度为 58 $^{\circ}$ C；稳定性和重复性良好，3 次扩增内参基因和品系特异性序列拷贝数 RSD 分别为 0.56% 和 3.93%，均符合 RSD 小于 25% 的要求；模板 DNA 质量浓度在 50~0.08 ng/ μ L 之间时，目标序列拷贝数与模板 DNA 质量浓度具有良好的线性关系，内参基因定量线性范围在 51.4~32 780 拷贝之间，品系特异性序列定量线性范围在 26.6~17 086.6 拷贝之间，定量限 (LOQ) 为 1.34 拷贝/ μ L；五个不同质量浓度模板 DNA 平均拷贝数含量分别为 52.14%、63.09%、66.08%、60.50%、52.16%，均在理论拷贝数含量范围内，且相对标准偏差均小于 25%，表明方法准确度高。综上所述，本研究建立的转基因玉米 MON87411 双重微滴式数字 PCR 定量检测方法能够满足转基因玉米 MON87411 品系精准定量的要求。

参考文献

- [1] 耿宁洁.中国转基因作物产业化现状及法规问题[J].分子植物育种,2022,20(17):5675-5679.
- [2] 农民日报·中国农网记者.转基因技术,给世界多一种选择[N].农民日报,2023-12-12(8).
- [3] 杜孟盈,马宗琪,焦来正,等.转基因食品的潜在危害[J].现代农业科技,2022,16:184-187.
- [4] 焦悦,王智,张振民,等.基于转基因产品成分低水平混杂问题探究我国转基因阈值制度[J].中国农业科技导报,2022,24(3):20-27.
- [5] LI J, LI L, ZHANG L, et al. Development of a certified genomic DNA reference material for detection and quantification of genetically modified rice KMD [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2020, 412: 7007-7016.
- [6] DEMEKE T, PERRY D J. Low level presence of unapproved biotech materials: Current status and capability of DNA-based detection methods [J]. Canadian Journal of Plant Science, 2014, 94(3): 497-507.
- [7] KITTA K, TAKABATAKE R, MANO J. Real-Time PCR-based quantitation method for the genetically modified soybean line GTS 40-3-2 [J]. Recombinant Proteins from Plants, 2016, 1385: 249-257.
- [8] ZHANG F L, SONG J, NIU B, et al. An event-specific qualitative and real-time PCR detection of 98140 maize in mixed samples [J]. Food Control, 2015, 57: 1-8.
- [9] KOSIR A B, DEMSAR T, STEBIH D, et al. Digital PCR as an effective tool for GMO quantification in complex matrices [J]. Food Chemistry, 2019, 294: 73-78.
- [10] YUAN D D, CUI M, YU S P, et al. Droplet digital PCR for quantification of *PML-RAR α* in acute promyelocytic leukemia: a comprehensive comparison with real-time PCR [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2019, 411(4): 895-903.
- [11] DONG S S, ZHANG D N, YU C G, et al. Using droplet digital PCR to detect plant DNA in tissues of zebrafish (*Danio rerio*) fed genetically modified maize [J]. Aquaculture Research, 2021, 52(9): 1-8.
- [12] COTTENET G, BLANCPAIN C, CHUAH P F. Performance assessment of digital PCR for the quantification of GM-maize and GM-soya events [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2019, 411: 2461-2469.
- [13] 赵新,刘双,刘娜,等.耐除草剂大豆‘DBN9004’精准定量检测方法的建立[J].农业生物技术学报,2022,30(12):2446-2455.
- [14] European Commission. GMO Methods: EU database of reference methods-Quantitative PCR method for detection of maize event MON87411 [OL]. (2016-07-11)[2024-01-19]. <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/docs/QT-EVE-ZM-024.pdf>. 2016.
- [15] 潘广,章桂明,黄新,等.应用双重数字PCR对转基因玉米成分进行定量方法研究[J].植物检疫,2016,30(3):65-71.
- [16] DOBNIK D, SPILSBERG B, KOSIR A B, et al. Multiplex droplet digital PCR protocols for quantification of GM maize events [J]. Methods in Molecular Biology, 2018, 1768: 69-98.
- [17] 姜羽,胡佳莹,杨立桃.利用微滴数字PCR分析转基因生物外源基因拷贝数[J].农业生物技术学报,2014,22(10): 1298-1305.
- [18] LI J, ZHAI S S, GAO H F, et al. Development and assessment of a duplex droplet digital PCR method for quantification

- of GM rice Kemingdao [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2021, 413(16): 4341-4351.
- [19] 梁美丹,宋安华,张明明,等.基于双重微滴数字PCR对转基因玉米Bt11品系定量检测[J].农业生物技术学报, 2020,28(3):543-552.
- [20] 刘津,李婷,洗钰茵,等.转基因大豆MON89788双重数字PCR通用定量检测方法的建立[J].食品科学,2018,39(4): 312-319.
- [21] XU J Y, LI X, BAI J L, et al. Absolute quantitative detection of genetically modified soybean MON87708×MON89788 with stacked traits by digital polymerase chain reaction [J]. Oil Crop Science, 2022, 7: 180-188.
- [22] DENG T T, HUANG W S, REN J A, et al. Verification and applicability of endogenous reference genes for quantifying GM rice by digital PCR [J]. Analytical Biochemistry, 2019, 587(15): 113442.
- [23] 李凌燕,张旭冬,陈子言,等.转基因抗虫耐除草剂玉米MON87411精准定量检测方法的建立[J].生物安全学报,2023,32(1):38-45.
- [24] 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 and Bioanalytical Chemistry, 2010, 396: 2143-2150.
- [25] 张佳玲,潘广,章桂明,等.微滴式数字PCR定量检测转基因玉米品系VCO-01981-5 [J].食品科学,2017,38(12):246-252.
- [26] ZHANG D, CORLET A, FOUILLOUX S. Impact of genetic structures on haploid genome-based quantification of genetically modified DNA: theoretical considerations, experimental data in MON 810 maize kernels (*Zea mays* L.) and some practical applications [J]. Transgenic Research, 2008, 17(3): 393-402.