

# 转基因番木瓜“华农一号”事件特异性 定性 PCR 检测方法的建立

姜大刚\*, 周峰\*, 姚涓, 穆虹, 梅曼彤

(农业部转基因植物及植物用微生物环境安全监督检验测试中心(广州),  
华南农业大学, 广东 广州 510642)

**摘要:**以我国自主研发的转基因抗环斑病毒番木瓜“华农一号”为研究对象,应用 TAIL-PCR 技术,用载体中靠近右边界的 *Nos* 启动子序列设计特异引物,扩增插入的旁邻序列;根据测序结果,设计了产物长度分别为 753 和 298 bp 但均跨越转化载体和番木瓜基因组序列的 2 套特异引物,对“华农一号”进行检测,证明其可特异地把“华农一号”从转基因番木瓜品系中检测出来;2 对引物的检测灵敏度都可以达到 0.05% 的标准,高于欧盟 0.9% 的检测要求;利用 2 对特异引物对“华农一号”的果肉、果皮、种子进行检测,可得到特异性良好的扩增。

**关键词:**转基因番木瓜; TAIL-PCR; “华农一号”; 事件特异性检测

中图分类号:Q789

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2009)01-0037-05

## Establishment of Event-Specific Qualitative PCR Detection Method for Transgenic Papaya “Huanong No. 1”

JIANG Da-gang\*, ZHOU Feng\*, YAO Juan, MU Hong, MEI Man-tong

(Supervision and Inspection Center for Environmental Safety of GM Plant and GM Microorganism Used in  
Plant of MOA (Guangzhou), South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Event-specific qualitative PCR detection method has advantageous because of its specificity and hence be used in the Chinese detection standards. In this study, an event-specific transgenic detection method for ‘Huanong No. 1’, a transgenic papaya variety with high resistance to papaya ringspot virus, and widely planted in Guangdong Province, was established. By using the thermal asymmetric interlaced PCR (TAIL-PCR) technique, the flanking sequences of the exogenous integration in the genome of ‘Huanong No. 1’ were cloned and sequenced with the specific nested primers based on *Nos* promoter near the right border (RB). According to these sequences, two pairs of PCR primers were designed to amplify the fragments with sizes of 753 and 298 bp respectively, and spanning the exogenous integration and papaya genome. Hence, the qualitative PCR assays were established for ‘Huanong No. 1’. The detection sensitivity reached to 0.05%. Furthermore, this method can also be used in various organs of papaya, such as seeds, fruits, fruit skins etc.

**Key words:** transgenic papaya; TAIL-PCR; Huanong No. 1; event-specific detection

转基因作物从 1996 年在全球开始进入商品化生产,经过 12 年的发展,其种植的面积从当年的 170 万  $\text{hm}^2$  扩大到 2007 年的 1.14 亿  $\text{hm}^2$ <sup>[1]</sup>. 为保护消费者的知情权和选择权,多个国家和地区强制

收稿日期:2008-12-04

作者简介:姜大刚(1977—),男,助理研究员,硕士;周峰(1972—),男,助理研究员,博士;\*对本文具有同样贡献;通讯作者:梅曼彤(1942—),女,教授,E-mail: mtmei@scau.edu.cn

基金项目:农业转基因生物安全检测行业标准制定和修改项目“转基因植物及其产品成分检测——抗病毒番木瓜“华农 1 号”及其衍生品种定性 PCR 方法”

要求对含有一定阈值以上转基因成分的产品进行标识,如欧盟规定转基因成分含量标识的阈值是0.9%,日本是5%等,而美国和加拿大则采用了推荐而非强制的标识制度.我国也从2002年3月开始,要求对大豆、玉米、棉花、番茄、油菜等5种作物的17种产品进行标识.为了适应对转基因产品的标识要求,已经建立了一系列的检测方法,以基于其中外源DNA检测的PCR方法应用最广泛<sup>[2]</sup>.然而,如果只根据其中外源基因序列设计引物作检测,则无法分辨使用同一基因的不同转基因品系的特异性,不能进行特异品系的鉴定.近年的研究表明,如能确定转基因植物新品种(品系)开发过程中,外源基因转化、插入到受体植物基因组的准确位置,即检测转化事件特异性,则可准确地检测特定品种(品系).近年来已建立了转基因玉米 Mon863<sup>[3]</sup>、Bt11<sup>[4]</sup>、油菜 oxy-235<sup>[5]</sup>、棉花 Mon531<sup>[6]</sup>等转化事件特异性的定量和定性PCR检测方法.

番木瓜是重要的热带、亚热带优质水果,在我国,主要在海南、广东、广西、福建、云南、台湾等省区种植,有较高的市场价值.近年来却由于病害严重、特别是大量发生番木瓜环斑病毒 *Papaya ringspot virus* (PRSV) 病,导致产量降低,品质下降,大大地影响了番木瓜生产的发展.20世纪90年代初,Fitch等<sup>[7]</sup>把编码PRSV衣壳蛋白(Coat protein, CP)基因转入番木瓜,获得了转CP基因的抗病品系,并于1997年获准进入商品化生产,在美国夏威夷广泛种植.但该品系对我国华南地区、台湾以及泰国等亚洲国家的PRSV株系无抗性效果.

华南农业大学李华平教授领导的课题组通过转入针对广东PRSV株系的病毒复制酶基因,选育出高抗病毒的转基因番木瓜“华农一号”,已于2006年获得农业部授予的环境安全证书,并在广东省广泛种植,产品已进入市场.为按照法规要求对该转基因产品进行监管,保证消费者的知情权,本研究应用TAIL-PCR技术,克隆、测序,获得了转基因番木瓜“华农一号”所用的转化载体右边界序列和番木瓜基因组的旁邻序列;再以此为基础,设计了2对特异引物,以定性PCR方法进行检测,结果显示特异性良好,检测的灵敏度可以达到0.05%,高于欧盟0.9%的检测要求.该检测方法适用于番木瓜的不同组织.本研究建立的方法可灵敏、特异、快捷地应用于转基因番木瓜“华农一号”及其产品的检测.

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

以转基因番木瓜“华农一号”和夏威夷转基因番

木瓜“SunUp”(由华南农业大学资源环境学院李华平教授提供)以及非转基因番木瓜“台农2号”(购自广东省农业科学院)的叶片作为主要材料.

### 1.2 总DNA的提取及定量

植物材料总DNA的提取和纯化参照农业部标准<sup>[8]</sup>进行.DNA的定量采用分光光度计法,同时参考电泳定量,通过稀释使DNA溶液的终质量浓度为25 ng/ $\mu$ L.按此计算、配制“华农一号”与总番木瓜DNA质量分数为0.05%、0.10%、0.50%、2.00%的溶液,以备检测灵敏度分析用.

### 1.3 TAIL-PCR引物及方法

应用刘耀光等<sup>[9]</sup>改良的TAIL-PCR技术,扩增“华农一号”中的T-DNA插入旁邻序列,扩增所用引物序列见表1.

表1 PCR反应所用引物

Tab.1 Primers used for PCR systems

PCR反应	引物名称	序列 <sup>1)</sup> (5'-3')	扩增片段长度/bp
TAIL-PCR	P1	AGATCCGCTGCAGATTATTTGGATTG	
	P2	TTGGATTGAGAGTGAATATGAGAC	
	P3	ACCTTAGCCGACTTTTGAACG	
	AD2	NGTCGA(G/C)(A/T)GANA(A/T)GTT	
普通PCR	HNF1	GCTGAGTGGCTCCTTCAACGT	753
	HNR1	CGACAAGTTGAGTTCGTGGGA	
	HNF2	TGACTCCCTTAATTCTCCGCT	298
	HNR2	TGACGAGTACAAGGAGACGCC	
	papain-F	GCGCATTCTCAGCTGTTGTA <sup>[10]</sup>	211
	papain-R	CGACAATAACGTTGCACTCC	

1)N代表A、T、C或G

第2轮的扩增产物经过回收试剂盒(广州杰顺生物科技有限公司)回收、克隆至pMD-18载体(宝生物工程(大连)有限公司),送测序公司(上海英俊生物技术有限公司)测序.所得序列经过网站(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)比对,确认已经得到番木瓜的旁邻序列.

### 1.4 事件特异性PCR引物及方法

根据测序得到的插入位点及番木瓜旁邻序列,设计2对转化事件特异性引物(表1中HN1、HN2):预期扩增片段大小分别为753和298 bp;内标基因引物见表1,预期扩增片段大小为211 bp.

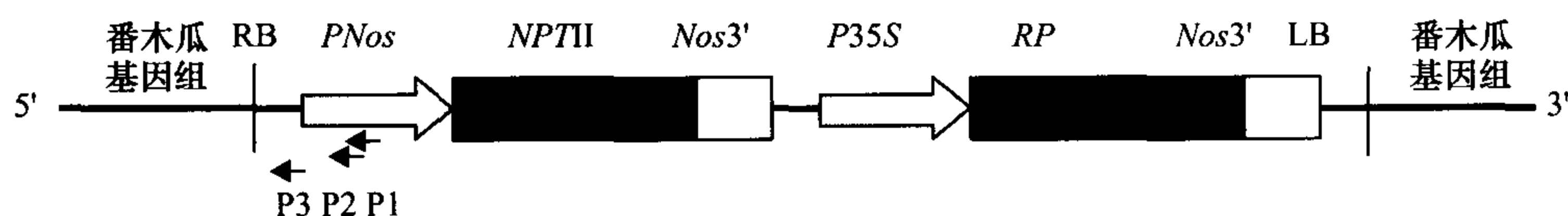
普通PCR扩增条件如下:95℃变性3 min;进行35次循环扩增反应(94℃变性30 s,57℃退火30 s,72℃延伸30 s);72℃延伸7 min;PCR反应体系中dNTPs、上下游引物浓度分别为0.1 mmol/L、0.3  $\mu$ mol/L,模板终质量浓度为2 ng/ $\mu$ L,每25  $\mu$ L

反应体系加入 1 U Taq 酶。

## 2 结果与分析

### 2.1 转基因番木瓜“华农一号”插入位点右边界旁邻序列的扩增和确认

根据该转基因品系的构建特点,首先分别在 35S

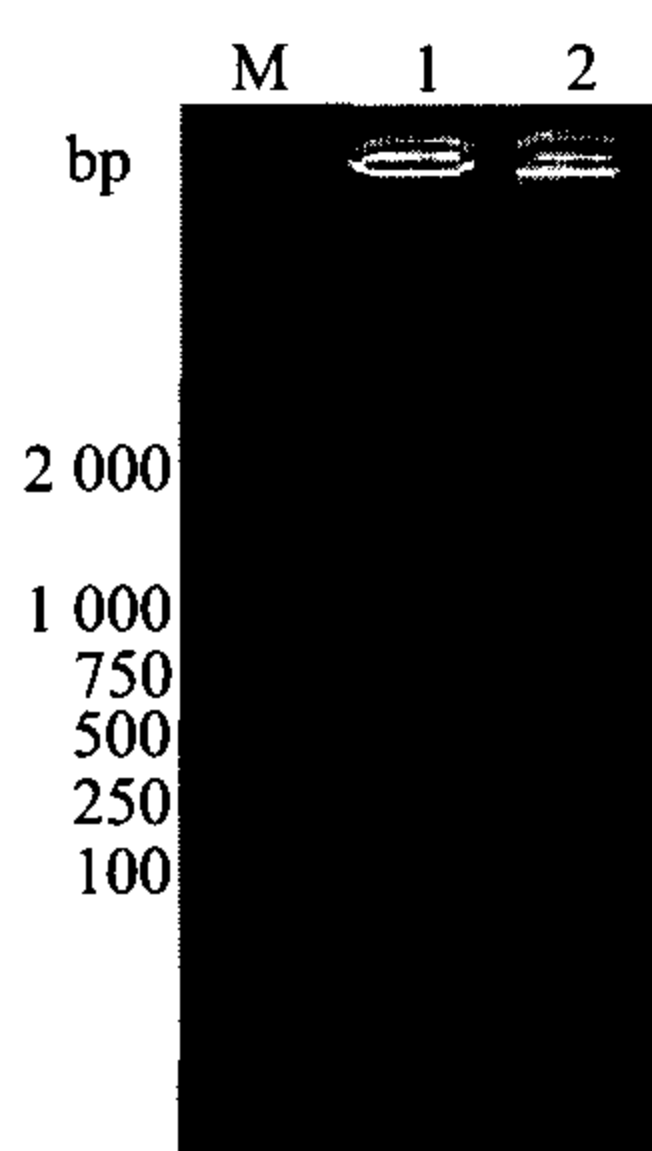


RB:右边界;LB:左边界;PNos:Nos 启动子;NPTII:新霉素磷酸转移酶 II 基因;Nos3':Nos 终止子;  
P35S:35S 启动子;RP:复制酶基因;P1、P2、P3:位于 Nos 启动子的 TAIL-PCR 巢式引物

图1 “华农一号”中插入的外源 DNA 片段结构图

Fig. 1 Schematic diagram of integrated heterologous DNA in “Huanong No. 1”

根据插入的外源 DNA 片段结构图,在右边界 Nos 启动子上设计 3 条巢式引物用于旁邻序列的扩增。其中第 1、2 轮巢式引物部分重叠,第 2、3 轮引物之间相隔 76 bp,因第 1 轮产物是非特异扩增,无法根据电泳结果进行判断,对第 2、3 轮的 PCR 产物进行电泳检测,如果是特异性扩增,则第 2、3 轮扩增条带之间能够检测到差别。从第 2、3 轮 PCR 产物电泳检测结果(图 2)可知,第 3 轮的 PCR 产物比第 2 轮的产物小 100 bp 左右,为 600 ~ 700 bp,这与设计引物的预期结果一致,初步证明此条带不是随机扩增,而是特异性扩增。



M:DNA Marker DL2000; 1:TAIL-PCR 第 2 轮扩增产物; 2:TAIL-PCR 第 3 轮扩增产物

图2 “华农一号”中 T-DNA 右边界两侧旁邻序列的扩增

Fig. 2 Amplification of flank fragments near right border from “Huanong No. 1”

通过对第 2 轮的 PCR 产物进行回收、克隆、测序,对得到的 2 个克隆的测序结果利用互联网资源 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行比对,经分析发现,这 2 个克隆大小都为 669 bp。这段序列分为 3 个部分,其中,第 1 部分(1 ~ 351 bp)包含了 Nos 启动子的部分序列和部分载体的骨架序列;

启动子和 NPTII 基因的上游设计巢式引物,用于 TAIL-PCR 的扩增,以确定转化载体 T-DNA LB 与 RB 之间的构架。通过进行序列比对和拼接,测出转入的外源基因区域的序列(数据未列出),并据此绘出插入的外源片段结构图(图 1)。

第 2 部分(352 ~ 438 bp)为标记基因 NPTII 的部分序列;第 3 部分(438 ~ 609 bp)和番木瓜基因组序列(克隆号 ABIM01008858.1)的 6 429 ~ 6 243 bp 同源率为 100%。证明这段序列既包含有转入的外源基因序列,也包含有番木瓜的基因组序列,可据此设计引物,进行特异事件的检测。

### 2.2 “华农一号”事件特异性的 PCR 检测

为了对“华农一号”事件特异性进行 PCR 检测,根据上述确定外源插入旁邻序列,设计了扩增片段大小不同的 2 对引物,第 1 对引物(HN1)的上游引物位于转入的载体序列 Nos 启动子上,下游引物位于番木瓜基因组,扩增片段大小为 753 bp;第 2 对引物(HN2)的上游引物位于 Nos 启动子较 HNF1 更靠近 RB 位置,下游引物位于番木瓜基因组,扩增的特异片段长 298 bp(图 3)。

#### 2.2.1 事件特异引物 HN1、HN2 的 PCR 扩增结果

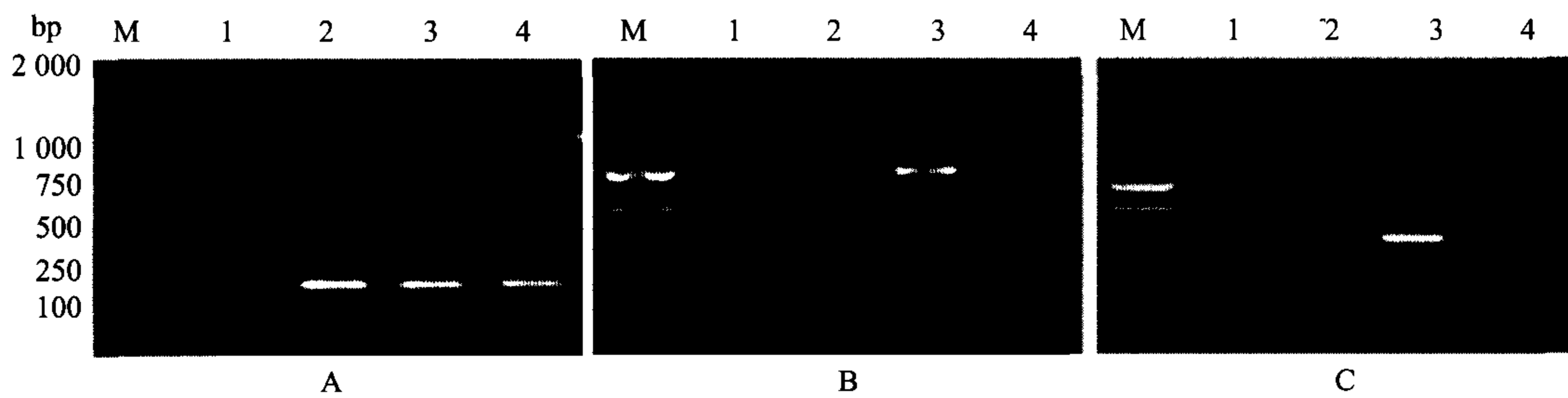
抽提“华农一号”、“SunUp”以及“台农 2 号”基因组 DNA,以其为模板,进行 PCR 反应。扩增内标基因 *papain* 的结果见图 4A,3 个样品的内标基因都能扩增到 211 bp 的条带,证明其 DNA 可以用于 PCR 检测。对于特异性引物 HN1,只有“华农一号”能够扩增到 753 bp 的条带,而“SunUp”及“台农 2 号”都没有扩增到目的条带(图 4B),说明这对引物特异性良好,可以用于“华农一号”的特异性检测。为了更有利于对深加工材料的检测,提高不同来源 DNA 检测的灵敏度,本研究设计了扩增片段低于 300 bp 的另一对引物 HN2。与前一对引物相比,扩增获得的目标片段长度由 753 bp 减小为 298 bp。以与扩增 HN1 相同的模板进行 PCR 检测,结果(图 4C)显示,只有用来自“华农一号”基因组的 DNA 为模板,才能扩增得到 298 bp 的特异性条带,而“SunUp”和“台农 2

CAGATCCGGTGCAGATTATTGGATTGAGAGTGAATATGAGACTCTAATTGGATACCGAGGGGAATT  
 P1 P2  
 TATGGAACGTCAGTGGAGCATTGTTGACAAGAAATATTTGCTAGCTGATAGTGACCTTAGGCGACTTT  
 P3  
 TGAACGCGCAATAATGGTTTCTGACGTATGTGCTTAGCTCATTAACTCCAGAAACCCGCGGCTGAG  
 TGGCTCCTTCAACGTTGCGGTTCTGTCAGTTCCAAACGTAAAACGGCTTGTCGCCGTCATCGGCGG  
 HNF1  
 GGGTCATAACGTGACTCCC TTAA TTC TCCGCTCATGATCAGATTGTCGTTCCCGCCTTC .....  
 HNF2  
 TGTCACCTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAATCAACTACTTTTTAGAAAATA .....  
 TTAACAAATTAAGGCGTCTCCTTGACTCGTCAATTTTGGAGGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTC  
 HNR2  
 ..... GATTCTCGTCTTTTGGCATTCCCACGAACCTCAACTGTCGGTCTAAAAAAAAGTAAACCG  
 HNR1

斜体代表转化载体序列;正体代表番木瓜序列

图3 “华农一号”中转化载体与番木瓜基因组相邻序列(示所用引物的位置)

Fig. 3 Sequences spanning the integrated heterologous DNA and papaya genome in “Huannong No. 1” (positions of primers designed were shown)



A:内标基因 *papain* 的扩增;B:特异性引物 HN1 的扩增;C: 特异性引物 HN2 的扩增  
M: DNA Marker DL2000; 1:空白对照;2:“台农2号”;3:“华农一号”;4:SunUp

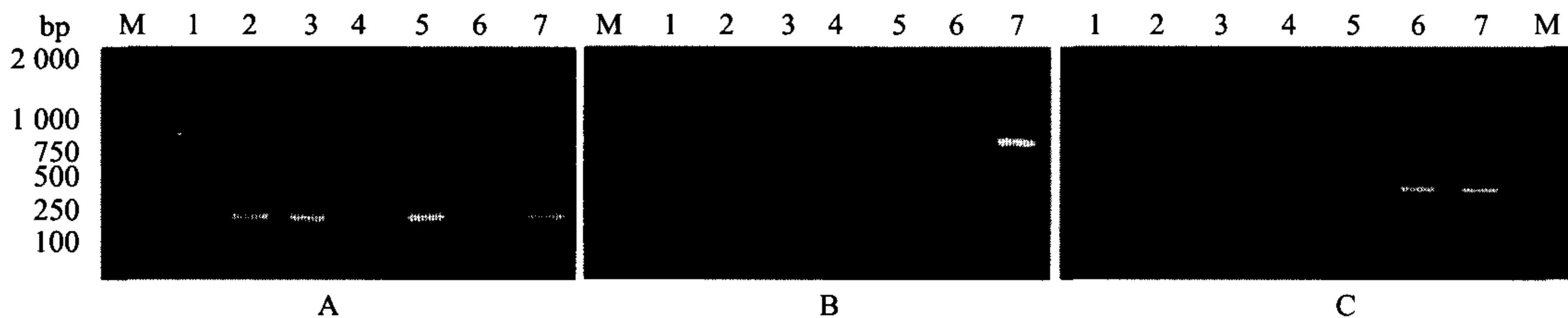
图4 “华农一号”的事件特异性检测

Fig. 4 Event-specific detection of “Huanong No. 1”

号”都无扩增产物,说明这对引物特异性良好,可以用于“华农一号”的转基因特异性检测。

2.2.2 事件特异引物 HN1、HN2 用于 PCR 扩增检测的灵敏度 为了解这 2 对引物检测的灵敏度,分别比较了转基因成分含量不同的 DNA 作为模板进

行扩增的结果(图 5 B、C)。结果均显示,对于“华农一号”的 DNA 质量分数为 0.05% 的样品,分别在 753 和 298 bp 处均能够扩增到条带,且随着阳性 DNA 含量的增加,扩增条带的亮度增加。说明这 2 对引物的特异性较好,灵敏度较高。



A:番木瓜内标基因 *papain* 的扩增;B:用特异性引物 HN1 对不同含量转基因成分的扩增; C:用特异性引物 HN2 对不同含量转基因成分的扩增; M:DNA marker DL2000; 1:空白对照; 2:“台农2号”;3~7:“华农一号”的 DNA 质量分数分别为 0.05%、0.10%、0.50%、2.00%、100.00%

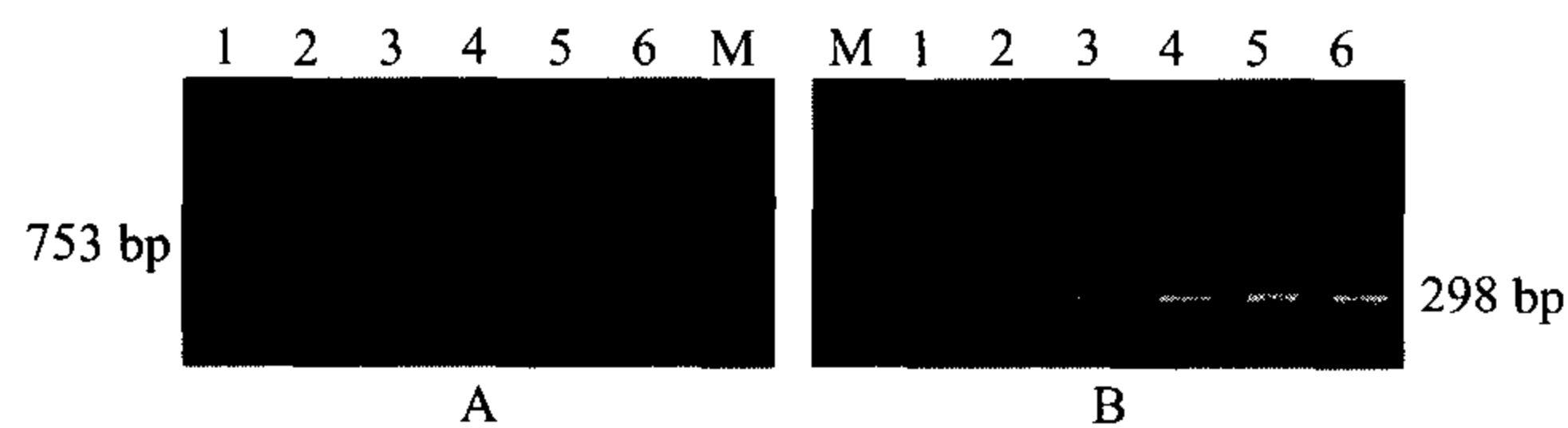
图5 对“华农一号”不同含量转基因成分的检测

Fig. 5 Sensitivity test of “Huanong No. 1” event-specific assay

2.2.3 事件特异引物用于“华农一号”不同组织的检测 为了进一步证明 2 对特异性引物适合于对“华农一号”的特异性检测,分别抽提“华农一号”番

木瓜果肉、果皮、种子等组织的 DNA,进行 PCR 检测,结果(图 6)显示,都能够得到明显的特异性扩增条带,说明本研究建立的“华农一号”的特异性检测

方法特异性好,可广泛应用于其各种组织的 PCR 检测.



A:以 HN1 为引物的检测;B:以 HN2 为引物的检测;M: DNA marker DL2000; 1:空白对照;2:“台农 2 号”;3:“华农一号”叶片;4:“华农一号”果肉;5:“华农一号”果皮;6:“华农一号”种子

图 6 “华农一号”植株不同组织的 PCR 检测

Fig. 6 Event-specific detection in various organs of “Huanong No. 1”

### 3 讨论与结论

本文以我国具有自主知识产权的转基因番木瓜“华农一号”为材料,建立了适于事件特异性检测的定性 PCR 方法. 结果表明,此方法特异性强,可以用于“华农一号”的特异性检测;检测的灵敏度高,可达到 0.05% 的检测限,高于对转基因要求极严的欧盟的要求标准(0.9%). 当特异性扩增引物 HN1 扩增片段稍长,其检测的特异性相对更高,有利于减少在检测过程中形成的交叉污染,提高检测的准确性. 然而,在植物产品中,DNA 会被破坏,抽提得到的 DNA 片段较小,从而影响了长片段成功扩增的可能性. 特异性扩增引物 HN2 正是考虑到这方面的检测需求而设计的,其扩增片段更短,只有不到 300 bp 的长度,从试验的结果看,检测的灵敏度更高,在检测 DNA 的质量分数为 0.05% 时,依旧可以得到明显的扩增条带,灵敏度高于 HN1,因而更适合于对加工产品的检测. 在实际检测过程中,可以根据检测的需要,选择合适的引物.

本文所建立的为定性 PCR 检测方法,虽其检测的灵敏度相当高,但无法取代能确定检测样品中转基因成分的准确含量的定量 PCR 法. 目前,已经有越来越多的关于对转基因事件特异性定量 PCR 检测的报道<sup>[3-6]</sup>,随着对转基因生物监管要求的提高,定量 PCR 法应为重要的发展方向. 目前,本测试中心正在开发适合定量检测的引物,完善定量检测的方法,以满足未来监管的需求.

致谢:感谢华南农业大学资源环境学院李华平教授提供“华农一号”与“SunUp”的实验材料!感谢华南农业大学生命科学学院庄楚雄研究员对本研究的热情指导和帮助!

#### 参考文献:

- [1] JAMES C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2007, ISAAA brief No. 37, executive summary [M]. New York: International Service for the Acquisition of Agribiotech Applications (ISAAA), 2007.
- [2] AHMED F E. Detection of genetically modified organisms in foods[J]. Trends Biotechnol, 2002, 20, 215-223.
- [3] PAN Ai-hu, YANG Li-tao, XU Song-ci, et al. Event-specific qualitative and quantitative PCR detection of MON863 maize based upon the 3'-transgene integration sequence[J]. J Cereal Sci, 2006, 43, 250-257.
- [4] ZIMMERMANN A, LÜTHY J, PAULI U. Event specific transgene detection in Bt11 corn by quantitative PCR at the integration site[J]. Lebensm-Wiss Technol, 2001, 33, 210-216.
- [5] YANG Li-tao, GUO Jin-chao, ZHANG Hai-bo, et al. Qualitative and quantitative event-specific PCR detection methods for oxy-235 canola based on the 3' integration flanking sequence [J]. J Agric Food Chem, 2008, 56, 1804-1809.
- [6] YANG Li-tao, PAN Ai-hu, ZHANG Ke-wei, et al. Qualitative and quantitative PCR methods for event-specific detection of genetically modified cotton Mon1445 and Mon53 [J]. Transgenic Research, 2005, 14: 817-831.
- [7] FITCH M M, MANSARDT M R, GONSALVES D, et al. Transgenic papaya plants from agrobacterium-mediated transformation of somatic embryos[J]. Plant Cell Rep, 1993, 12: 245-249.
- [8] 中华人民共和国农业部. NY/T 674-2003 中华人民共和国农业行业标准:转基因植物及其产品检测——DNA 提取和纯化[S]. 北京:中华人民共和国农业部, 2003.
- [9] LIU Yao-guang, CHEN Yuan-ling, ZHANG Qun-yu. Amplification of genomic sequence flanking T-DNA by thermal asymmetric interlaced polymerase chain reaction [M]// PENA L. Transgenic plants: methods and protocols. Totowa: Humana Press, 2005: 341-348.
- [10] WALL E M, LAWRENCE T S, GREEN M J, et al. Detection and identification of transgenic virus resistant papaya and squash by multiplex PCR[J]. Eur Food Res Technol, 2004, 219:90-96.

【责任编辑 李晓卉】