

蜂蜜中转基因成分启动子和终止子的多重实时荧光 PCR 法检测

林碧莲, 张雅薇, 高宇, 何孟杭, 邱秀玉, 韩涛,
张芳, 傅德江, 陈思琪, 宋帆, 柯振华

(福建省产品质量检验研究院 国家加工食品质量监督检验检测中心(福州), 福建 福州 350002)

摘要: 为能高效率定位蜂蜜中的转基因可疑阳性样品,以 10 种转基因启动子和终止子(花椰菜花叶病毒 35S 启动子 (pCaMV35S)、农杆菌的胭脂碱合成酶基因终止子(tNOS)、玄参花叶病毒的 35S 启动子(pFMV35S)、农杆菌的胭脂碱合成酶基因启动子(pNOS)、玉米泛素基因的启动子(pUbi)、烟草的花蕊特异性 TA29 的基因发育调节启动子(pTA29)、豌豆二磷酸核酮糖羧化酶基因的终止子(tE9)、章鱼碱合成酶终止子(tOCS)、谷氨酰胺转移酶 7 终止子(tg7)、花椰菜花叶病毒终止子(tCaMV35S))为研究靶标,进行 10 种启动子和终止子的引物和探针组合筛选、反应条件优化、灵敏度测定、质控品测试比对应实验,建立 3 组多重实时荧光 PCR 反应体系,并将其应用于市售蜂蜜的检测。结果表明:建立的 3 组多重实时荧光 PCR 反应体系能精准检出目的基因,其灵敏度分别为 0.01、0.04、0.04 ng/ μ L;14 种转基因质控品的测试显示多重实时荧光 PCR 和单重实时荧光 PCR 的检测结果一致;40 份市售蜂蜜的筛查中,有两份蜂蜜检出 pCaMV35S 和 tNOS,其余未检出,该方法大大提高了检测效率。该方法为蜂蜜中转基因成分的检测提供了快筛快检技术,同时也适用其它产品转基因成分的检测。

关键词: 蜂蜜;转基因;启动子;终止子;多重实时荧光 PCR

中图分类号:TS 207.3 文章编号:1673-1689(2024)01-0069-09 DOI:10.12441/spyswjs.20220420001

Detection of Promoters and Terminators of Transgenic Components in Honey by Multiplex Real-Time Fluorescence PCR

LIN Bilian, ZHANG Yawei, GAO Yu, HE Menghang, QIU Xiuyu, HAN Tao, ZHANG Fang,
FU Dejiang, CHEN Siqi, SONG Fan, KE Zhenhua

(National Quality Supervision and Testing Center for Processed Food (Fuzhou), Fujian Inspection and Research Institute for Product Quality, Fuzhou 350002, China)

Abstract: In order to efficiently identify suspect transgenic positive samples in honey, ten transgenic promoters and terminators, i.e., CaMV35S promoter, NOS terminator, FMV35S promoter, NOS promoter, Ubi promoter, TA29 promoter, E9 terminator, OCS terminator, g7 terminator, CaMV35S

收稿日期: 2022-04-20

修回日期: 2022-05-18

基金项目: 福建省市场监督管理局科技项目(FJMS2020003)。

作者简介: 林碧莲(1985—),女,工程师,主要从事食品中致病菌、转基因成分、源性成分、奶粉中维生素检测等研究。

E-mail:390005160@qq.com

terminator, were used as research targets. A series of experiments were conducted for these ten promoters and terminators, including primers combination screening, reaction condition optimization, sensitivity determination, and test comparison of quality control products. Three groups of multiple real-time fluorescence PCR reaction systems were established and applied to the detection of commercial honey. The result showed that the established three groups of multiple real-time fluorescence PCR reaction system could accurately detect the target gene, with sensitivities of 0.01, 0.04, 0.04 ng/ μ L, respectively. The tests of 14 genetically modified quality control products showed that the detection results of multiplex real-time fluorescence PCR and single-plex real-time fluorescence PCR were consistent. The screening of 40 commercial honeys showed that two honeys contained pCaMV35S and tNOS, and the others were not detected, greatly improving the detection efficiency. This method could provide a fast screening and detection technology for the detection of genetically modified ingredients in honey, and meanwhile, it could also be applicable to the detection of genetically modified ingredients in other products.

Keywords: honey, transgenic, promoters, terminators, multiplex real-time fluorescence PCR

转基因作物具有产量大^[1]、利润多^[2-3]、抵抗力强^[4-7]及其他特性^[8]等优势,在全球种植面积不断扩大^[9]。对于转基因作物的安全性,一直存在激烈争议,目前还未有足够证据可以证明它对人体和环境无副作用,科技界也未有定论。人们对转基因作物的发展不断提出安全问题,如基因编辑过程中,由于无意的基因转移和环境释放,可能给环境和人类带来风险和不确定性^[10-16]。科学家也发现随着基因的流动,转基因作物基因流向非转基因作物^[17-18],并已逐渐渗透到食物中,如蜂蜜^[19-21]。

我国是全球最大的蜂蜜生产国和出口国,约占全球蜂蜜出口量的 1/4,大部分蜂蜜生产者是个体养蜂者,蜂蜜的蜜源植物没有限定,随着转基因植物种类、数量的不断增加,蜜源植物中的转基因植物比例相应也会不断增加,蜜蜂采到转基因植物花粉的可能性也就越大。我国对转基因作物一直采取的是谨慎的态度和严格的管理,为了规范转基因作物对人们带来的潜在危险,国家相关部门出台了政策规范,也制定一些标准进行监测。但转基因技术发展迅猛,转基因成分越来越多样化,对应的检测技术也需不断提高。

至今,大多数转基因植株都含有 pCaMV35S 和 (或)tNOS。但在一些新的转基因结构中,pCaMV35S 和 tNOS 完全缺失。现已出现的其它启动子和终止子还有 pFMV35S、pNOS、pSSuAra、pTA29、pUbi、tCaMV35S、tE9、tOCS、tg7 等^[22],国家相关部门也出台了检测标准进行筛选^[23],均为单重实时荧光 PCR

法。若采用单重实时荧光 PCR 技术对蜂蜜开展上述所有启动子和终止子的检测,量大效率低,而多重实时荧光 PCR 技术一管多检,可实现高效率的检测,在转基因产品检测中已得到了广泛应用^[24-30],但专门针对蜂蜜中启动子和终止子的多重实时荧光 PCR 反应体系未见报道。

目前转基因作物中启动子和终止子主要以 pCaMV35S 和 tNOS 为主,含有至少两者之一的作物所占比例为 85% 以上^[29],据文献报道,启动子 pSSuAra 和 pTA29 一般同时出现,只需测试其中一种^[22]。基于此,本研究中先建立 pCaMV35S 和 tNOS 的双重实时荧光 PCR 反应体系,剩余 8 种启动子和终止子建立两组四重实时荧光 PCR 反应体系,双重实时荧光 PCR 进行初步筛选,未检出的样品再采用另外两组四重实时荧光 PCR 进行检测。由 10 次的检测变成 3 次检测,降低检测成本、扩大检测范围、提高工作效率,为蜂蜜中转基因成分的检测提供一种更为高效的检测技术手段。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 样品及试剂 40 份蜂蜜样品:市售;GoTaq qPCR Master MIX 预混液:普洛麦格(北京)生物技术有限公司;高效植物基因组 DNA 提取试剂盒:天根生化科技(北京)有限公司。

1.1.2 实验所用转基因质控品 转基因油菜 GT73/RT73 种子粉末(GT73/RT73)、转基因油菜 Ms1 叶子

组织的基因组 DNA(Ms1)、转基因玉米 MON88017 种子粉末(MON88017)、马铃薯转基因成分(EH92-527-1):AOCS (美国石油化学家学会);转基因棉籽、转基因大豆种子粉末(GTS-40-3-2):欧盟委员会联合研究中心;转基因玉米种子粉末(QC-GM-008)、转基因玉米 MON89034 种子粉末(MON89034)、转基因玉米 Bt11 品系种子粉末(Bt11)、非转基因大豆种子粉末(QC-GM-001)、转基因大豆 89788 种子粉末(89788)、转基因大米种子粉末(QC-GM-018):中国检验检疫科学研究院测试评价中心;转基因玉米酒糟粕 U862(U862)、非转基因玉米酒糟粕 J331(J331):作者所在实验室收集。

1.2 仪器与设备

ABI 7500 荧光 PCR 仪:美国 Life Tech 公司;Mini spin 小型离心机:德国 Eppendorf 公司;IKA MS3 basic 涡旋混合器:上海琪特分析仪器有限公司;CR22GⅢ落地式冷冻离心机:日本 Hitachi KoKi 公司;Ultrospec 2100pro 紫外可见分光光度计:美国 GE 公司。

1.3 方法

1.3.1 蜂蜜样品和转基因质控品 DNA 的提取 蜂蜜样品于 50 ℃水浴 20 min 至充分融化,上下颠倒

混匀。取 20 g 的蜂蜜至 50 mL 的离心管中,各 2 管,加 40 ℃的纯化水 30 mL,振荡混匀溶解,4 500 r/min 离心 10 min,去上清液,加 1 mL 的纯化水溶解沉淀,吸出至 2 mL 离心管中,4 500 r/min 离心 10 min,再用纯化水清洗后 4 500 r/min 离心 10 min,去上清液,所得沉淀根据试剂盒说明书提取 DNA。转基因质控品根据试剂盒说明书进行 DNA 提取。

1.3.2 引物、探针的筛选及配对测试 通过查阅文献及参考行业标准,以 pCaMV35S、tNOS、pFMV35S、pNOS、pUbi、pTA29、tE9、tOCS、tg7、tCaMV35S 为研究靶标,采用国家标准 GB/T 19495.4—2018^[23]中的引物、探针序列,选择吸光度差异比较大的 JOE、ROX、FAM、CY5 作为多种探针的发光基团,10 种引物、探针分成 3 组,pCaMV35S 和 tNOS 为一组,pFMV35S、pNOS、pUbi、pTA29、tE9、tOCS、tg7、tCaMV35S 的引物和探针进行组合测试,确定两组四重实时荧光 PCR 反应引物和探针的最佳组合,采用真核生物内参基因 18S rRNA 验证是否提取到试样 DNA,所用引物、探针的序列及最佳组合见表 1,引物、探针均委托上海生工生物工程有限公司合成。

表 1 3 组多重实时荧光 PCR 反应体系引物、探针序列

Table 1 Three groups of multiple real-time fluorescent PCR systems primers and probes sequence

| 实时荧光 PCR 反应体系 | 检测靶标 | 引物、探针序列 |
|---------------|-----------------|---|
| 单重 | 18S rRNA (内参基因) | 18S rRNA-F:CCTGAGAAACGGCTACCAT |
| | | 18S rRNA-R:CGTGTCAGGATTGGGTAAT |
| | | 18S rRNA-P:FAM-TGCGCGCCTGCTGCCTTCCT-BHQ1 |
| 双重 | pCaMV35S | pCaMV35S-F:GCCTCTGCCGACAGTGGT |
| | | pCaMV35S-R:AAGACGTGGTTGGAACGTCTTC |
| | | pCaMV35S-P:FAM-CAAAGATGGACCCCCACCCACG-BHQ1 |
| | tNOS | tNOS-F:ATCGTTCAAACATTTGGCA |
| | | tNOS-R:ATTGCGGGACTCTAATCATA |
| | | tNOS-P:JOE-CATCGCAAGACCGGCAACAGG-BHQ1 |
| A 组四重 | pTA29 | pTA29-F:GAAGCTGTGCTAGAGAAGATGTTTATTC |
| | | pTA29-R:GCTCGAAGTATGCACATTTAGCAA |
| | | pTA29-P:FAM-AGTCCAGCCACCCACCTTATGCAAGTC-BHQ1 |
| | pUbi | pUbi-F:GAGTAGATAATGCCAGCCTGTAAAC |
| | | pUbi-R:ACGCGACGCTGCTGGTT |
| | | pUbi-P:CY5-CGTGACGAGTCTAACGGACACCAAC-MGB |
| | pFMV35S | pFMV35S-F:CGAAGACTTAAAGTTAGTGGGCATCT |
| | | pFMV35S-R:TTTTGTCTGGTCCCCACAA |
| | | pFMV35S-P:JOE-TGAAAGTAATCTTGTCAACATCGAGCAGCTGG-BHQ1 |

续表 1

| 实时荧光 PCR 反应体系 | 检测靶标 | 引物探针序列 |
|---------------|----------|---|
| A 组四重 | tOCS | tOCS-F:CGGTCAAACCTAAAAGACTGATTACA |
| | | tOCS-R:CGCTCGGTGTCGTAGATACT |
| | | tOCS-P:ROX-TCTTATTCAAATTTCAAAAGTGCCCCAGGG-MGB |
| B 组四重 | tg7 | tg7-F:ATGCAAGTTTAAATTCAGAAATATTTCAA |
| | | tg7-R:ATGTATTACACATAATATCGCACTCAGTCT |
| | | tg7-P:FAM-ACTGATTATATCAGCTGGTACATTGCCGTAGATGA-BHQ1 |
| | pNOS | pNOS-F:GTGACCTTAGGCGACTTTTGAAC |
| | | pNOS-R:CGCGGGTTTCTGCGAGTTTAA |
| | | pNOS-P:ROX-CGCAATAATGGTTTCTGACGTATGTGCTTAGC-MGB |
| | tCaMV35S | tCaMV35S-F:GGGGTTTCTTATATGCTCAACACATG |
| | | tCaMV35S-R:TCACCAGTCTCTCTCTACAAATCTATCAC |
| | | tCaMV35S-P:CY5-AAACCCTATAAGAACCCTAATTCCTTATCTGGGA-MGB |
| | tE9 | tE9-F:TGAGAATGAACAAAAGGACCATATCA |
| | | tE9-R:TTTTATTGCGTTTTTCGCTATCG |
| | | tE9-P:JOE-TCATTAACCTCTTCTCCATCCATTTCCATTTACAGT-BHQ1 |

1.3.3 多重实时荧光 PCR 反应条件的优化 根据前期筛选测试情况,对 3 组多重实时荧光 PCR 反应体系进行优化(见表 2)。反应体系总体积 25 μL , GoTaq qPCR Master MIX 预混液 12.5 μL ,模板 DNA 2 μL ,引物对(10 $\mu\text{mol/L}$)和探针(10 $\mu\text{mol/L}$)根据

表 2 中的加量进行测试,水补足至 25 μL 。多重实时荧光 PCR 扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 60 s,共进行 45 个循环,每个循环结束后收集荧光信号。先优化引物、探针体积,再进行退火温度的测试,测试温度为 58、60、62 $^{\circ}\text{C}$ 。

表 2 3 组多重实时荧光 PCR 体系引物探针的优化

Table 2 Optimization of primers /probes for three groups of multiple real-time fluorescent PCR systems

| 实时荧光 PCR 反应体系 | 设置 | 体积/ μL | | | |
|---------------|----|-------------------|---------|---------|--------------|
| | | FAM | JOE | CY5 | ROX |
| 双重 | 1 | 1+1+0.5 | 1+1+0.5 | 0 | 0 |
| | 2 | 1+1+0.5 | 1+1+1 | 0 | 0 |
| | 3 | 0.5+0.5+0.25 | 1+1+1 | 0 | 0 |
| 四重 | 1 | 0.5+0.5+0.25 | 1+1+0.5 | 1+1+0.5 | 0.5+0.5+0.25 |
| | 2 | 1+1+0.5 | 1+1+0.5 | 1+1+0.5 | 0.5+0.5+0.25 |
| | 3 | 1+1+1 | 1+1+1 | 1+1+1 | 0.5+0.5+0.25 |
| | 4 | 1+1+0.5 | 1+1+1 | 1+1+1 | 0.5+0.5+0.25 |

注:表中数值为上游引物体积、下游引物体积、探针体积相加。

1.3.4 多重实时荧光 PCR 反应体系灵敏度的测试 以质量浓度为 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 的 QC-GM-008 DNA 为原液,用纯化水进行梯度稀释,获得质量浓度分别为 100、10、1.0、0.1、0.01、0.001 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 的灵敏度测试样品,进行双重实时荧光 PCR 扩增,每个样品 4 个平行,以确定双重实时荧光 PCR 反应体系的灵敏度。因找不到同时含有 10 种目的基因的阳性对照样,本研究中以转基因油菜 Ms1 叶子组织的基因组

DNA、转基因油菜 GT73/RT73 种子粉末提取的 DNA 和转基因棉籽提取的 DNA,分别稀释到 120 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 后,各取相同量混匀,再用纯化水进行梯度稀释,获得质量浓度分别为 40、4.0、0.4、0.04、0.004 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 的灵敏度测试样品,进行四重实时荧光 PCR 扩增,每个样品 4 个平行,以确定两组四重实时荧光 PCR 反应体系的灵敏度。

1.3.5 多重实时荧光PCR反应体系质控品测试对比 选取国内外权威机构的12份转基因质控品和2份作者所在实验室自备的转基因样品,提取其基因组DNA为模板,分别进行单重实时荧光PCR扩增和多重实时荧光PCR扩增,验证这3组多重实时荧光PCR反应体系的准确性。

1.3.6 40份市售蜂蜜样品转基因启动子和终止子的多重实时荧光PCR法检测 提取40份市售蜂蜜样品的DNA,进行真核生物内参基因18S rRNA的检测,确认提取到DNA后,进行双重实时荧光PCR初步筛选,阴性样品采用A组四重实时荧光PCR进行检测,再次阴性样品采用B组四重实时荧光PCR进行检测。

2 结果与分析

2.1 多重实时荧光PCR反应条件的优化

为实现快速筛选蜂蜜中是否含有转基因成分,选用10种启动子和终止子进行多重实时荧光PCR扩增。为实现同一管中检测多对目的基因,调整反应条件和反应程序,最终结果为:3组多重实时荧光PCR的退火温度均为60℃,反应体系总体积25μL,其中GoTaq qPCR Master MIX预混液12.5μL、模板DNA 2μL。双重实时荧光PCR引物和探针的添加体积最优组为第3种组合:发光基团为FAM的上下游引物各为0.5μL、探针为0.25μL,发光基团为JOE的上下游引物各为1μL、探针为1μL,共4.25μL;加水6.25μL。两组四重实时荧光PCR引物和探针的添加体积最优组为第4种组合:发光基团为FAM的上下游引物各为1μL、探针为0.5μL,发光基团为JOE和CY5的上下游引物各为1μL、探针为1μL,发光基团为ROX的上下游引物各为0.5μL、探针为0.25μL,共9.75μL;加水0.75μL。3组多重实时荧光PCR的10种靶基因均能扩增,CK为空白试剂,扩增曲线如图1~3所示,曲线无重叠,辨识度高,荧光强度到达设定的域值时所经历的循环数(CT值)差异最小,CT值均小于28,符合国内转基因国家标准^[23]和行业标准^[31-32]阳性对照的要求。

2.2 3组多重实时荧光PCR反应体系灵敏度的测试

将含目的基因的阳性样品进行一系列稀释,进行3组多重实时荧光PCR反应体系灵敏度的测试,结果为:双重实时荧光PCR在DNA质量浓度为100、10、1.0、0.1、0.01 ng/μL时,两条曲线均扩

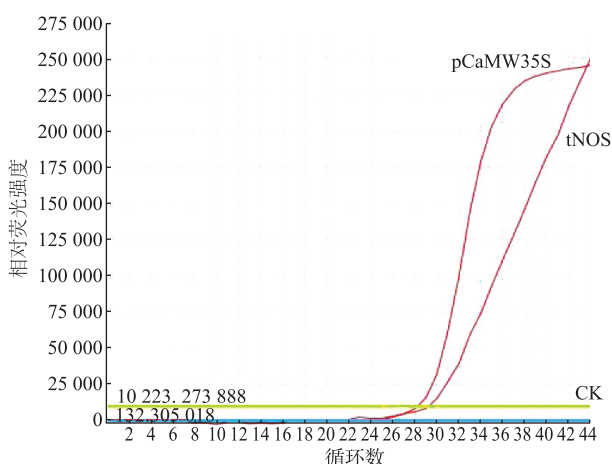


图1 双重实时荧光PCR扩增曲线

Fig. 1 Amplification curves of dual real-time fluorescence PCR

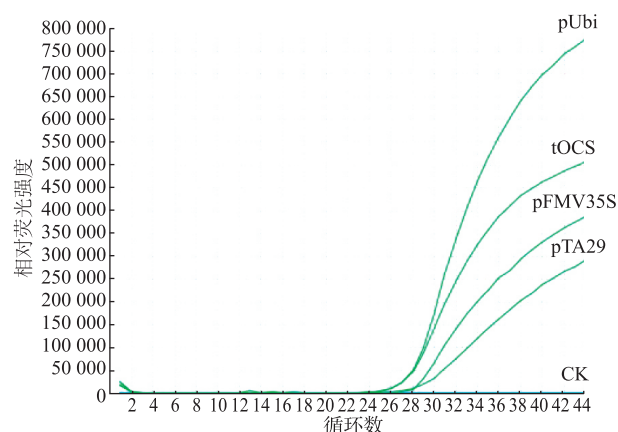


图2 A组四重实时荧光PCR扩增曲线

Fig. 2 Amplification curves of group A with quadruple real-time fluorescence PCR

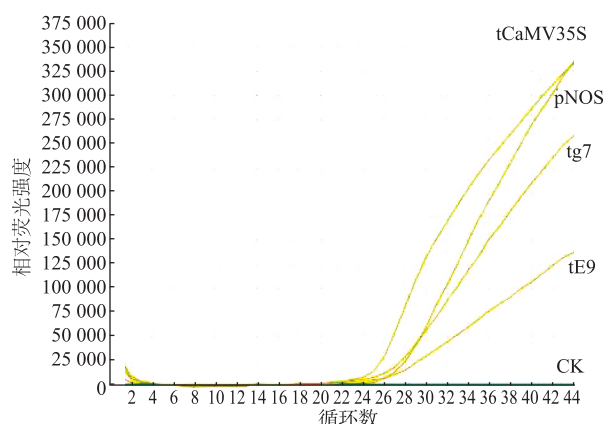


图3 B组四重实时荧光PCR扩增曲线

Fig. 3 Amplification curves of group B with quadruple real-time fluorescence PCR

增正常;A 组四重实时荧光 PCR 在 DNA 质量浓度为 40、4.0、0.4、0.04 ng/μL 时,4 条曲线扩增正常,当阳性样品 DNA 质量浓度为 0.004 ng/μL 时只有 pFMV35S 和 pUbi 有扩增;B 组四重实时荧光 PCR 在 DNA 质量浓度为 40、4.0、0.4、0.04

ng/μL 时,4 条曲线扩增正常,当阳性样品 DNA 质量浓度为 0.004 ng/μL 时只有 tCaMV35S 有扩增,所以 3 组多重实时荧光 PCR 反应体系的灵敏度分别是 0.01、0.04、0.04 ng/μL,扩增 CT 值见表 3 和表 4。

表 3 双重实时荧光 PCR 双重实时荧光 PCR 反应体系的灵敏度
Table 3 Sensitivity of dual real-time fluorescence PCR system

| 实时荧光 PCR 反应体系 | 检测靶标 | CT 值 | | | | | |
|---------------|----------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|
| | | 100 ng/μL | 10 ng/μL | 1.0 ng/μL | 0.1 ng/μL | 0.01 ng/μL | 0.001 ng/μL |
| 双重 | pCaMV35S | 18.64±0.06 | 21.99±0.02 | 25.48±0.35 | 28.61±0.44 | 31.58±0.28 | — |
| | tNOS | 18.97±0.31 | 22.05±0.07 | 25.64±0.08 | 28.46±0.35 | 31.52±0.15 | — |

注:—代表未扩增。

表 4 两组四重实时荧光 PCR 反应体系的灵敏度
Table 4 Sensitivity of two groups of quadruple real-time fluorescence PCR systems

| 实时荧光 PCR 反应体系 | 检测靶标 | CT 值 | | | | |
|---------------|----------|------------|------------|------------|------------|-------------|
| | | 40 ng/μL | 4.0 ng/μL | 0.4 ng/μL | 0.04 ng/μL | 0.004 ng/μL |
| A 组四重 | pTA29 | 26.49±0.12 | 29.43±0.26 | 32.43±0.06 | 35.05±0.06 | — |
| | pUbi | 24.41±0.06 | 27.81±0.03 | 30.98±0.17 | 33.96±0.05 | 36.59±0.95 |
| | pFMV35S | 26.64±0.06 | 29.69±0.19 | 32.80±0.08 | 34.98±0.10 | 37.84±1.02 |
| | tOCS | 25.12±0.14 | 28.19±0.18 | 31.26±0.01 | 34.05±0.06 | — |
| B 组四重 | tg7 | 24.55±0.09 | 27.62±0.05 | 31.05±0.05 | 34.07±0.10 | — |
| | pNOS | 24.71±0.19 | 28.04±0.11 | 31.28±0.12 | 34.14±0.14 | — |
| | tCaMV35S | 24.30±0.07 | 27.10±0.12 | 30.36±0.06 | 33.98±0.10 | 37.02±0.89 |
| | tE9 | 25.33±0.06 | 28.20±0.06 | 31.39±0.04 | 34.37±0.18 | — |

注:—代表未扩增。

2.3 3 组多重实时荧光 PCR 反应体系质控品测试对比

对 14 份转基因质控品进行单重和多重实时荧光 PCR 检测比较分析,结果表明两种方法检测的结果一致(见表 5)。12 份转基因阳性质控品中检出 pCaMV35S 有 9 份,检出 tNOS 有 9 份,检出 pFMV35S

有 4 份,检出 pTA29 有 1 份,检出 tOCS 有 1 份,检出 pUbi 有 6 份,检出 tCaMV35S 有 3 份,检出 tg7 有 1 份,检出 tE9 有 2 份,检出 pNOS 有 2 份,含单一启动子和(或)终止子的质控品有 1 份,不含 pCaMV35S 和 tNOS 的质控品有 2 份。阴性质控品均未检出启动子和终止子。

表 5 多重实时荧光 PCR 反应体系适用性验证结果

Table 5 Applicability verification results of multiple real-time fluorescence PCR reaction systems

| 测试样品 | 检测靶标 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|----------|---|------|---|---------|---|-------|---|------|---|------|---|----------|---|-----|---|-----|---|------|---|
| | pCaMV35S | | tNOS | | pFMV35S | | pTA29 | | tOCS | | pUbi | | tCaMV35S | | tg7 | | tE9 | | pNOS | |
| | C | D | C | D | C | D | C | D | C | D | C | D | C | D | C | D | C | D | C | D |
| GT73/RT73 | √ | √ | — | — | √ | √ | — | — | — | — | — | — | √ | √ | — | — | √ | √ | — | — |
| Ms1 | — | — | √ | √ | — | — | √ | √ | √ | √ | — | — | — | — | √ | √ | — | — | √ | √ |
| 转基因棉籽 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | √ | √ | — | — | — | — | — | — | — | — |
| QC-GM-008 | √ | √ | √ | √ | √ | √ | — | — | — | — | √ | √ | √ | √ | — | — | | | — | — |
| MON89034 | √ | √ | √ | √ | — | — | — | — | — | — | √ | √ | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Bt11 | √ | √ | √ | √ | √ | √ | — | — | — | — | √ | √ | √ | √ | — | — | — | — | — | — |
| MON88017 | √ | √ | √ | √ | — | — | — | — | — | — | √ | √ | — | — | — | — | — | — | — | — |

续表 5

| 测试样品 | 检测靶标 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|----------|---|------|---|---------|---|-------|---|------|---|------|---|----------|---|-----|---|-----|---|------|---|
| | pCaMV35S | | tNOS | | pFMV35S | | pTA29 | | tOCS | | pUbi | | tCaMV35S | | tg7 | | tE9 | | pNOS | |
| | C | D | C | D | C | D | C | D | C | D | C | D | C | D | C | D | C | D | C | D |
| U862 | √ | √ | √ | √ | — | — | — | — | — | — | √ | √ | — | — | — | — | — | — | — | — |
| J331 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| QC-GM-001 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| GTS-40-3-2 | √ | √ | √ | √ | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 89788 | — | — | — | — | √ | √ | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | √ | √ | — | — |
| QC-GM-018 | √ | √ | √ | √ | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| EH92-527-1 | √ | √ | √ | √ | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | √ | √ |

注:C 代表单重实时荧光 PCR,D 代表多重实时荧光 PCR,√代表检出,—代表未检出。

2.4 40 份市售蜂蜜样品转基因启动子和终止子的检测结果

40 份市售蜂蜜样品提取的 DNA 经 18S rRNA 内参基因检测均为阳性,经 3 组启动子和终止子的多重实时荧光 PCR 法检测,有两份样品检出 pCaMV35S 和 tNOS,其余未检出。至今我国实现大规模商业化生产的转基因作物只有抗虫棉和抗病番木瓜,蜂农养的蜜蜂受到指引,采到这些植物的可能性低,而本文中测试的蜂蜜样品为市面上流通产品,不是专门的抗虫棉和抗病番木瓜蜂蜜,阳性样品检出率低属正常现象。

3 结 语

启动子是位于基因 5' 端上游的 DNA 序列,能活化 RNA 聚合酶,使之与模板 DNA 准确的结合并具有转录起始的特异性,没有启动子的目的基因就无法在细胞中启动复制。终止子是指终止 RNA 转录的 DNA 序列。插入的外源基因在细胞中要正常表达均需要有启动子和(或)终止子。

多重实时荧光 PCR 已是国内常用检测技术,据文献报道,现有多重实时荧光 PCR 主要针对某种或某类植物,检测同一品系的转基因成分或常见转基

因成分的组合,比如董立明等建立的 CaMV35S 启动子、NOS 终止子、*CryIAb/Ac* 基因、*HPT* 基因和 *SPS* 水稻内标基因的组合,用于检测水稻转基因成分^[33];邢珍娟等基于 DAS40278-9、BLVA430101、pCaMV35S、tNOS、*CryIAb/Ac* 基因、*pat* 基因和内源基因 *zSSIIb* 建立的五重实时荧光 PCR 和双重实时荧光 PCR 检测玉米转基因成分^[34];邵彪等基于 pCaMV35S、tNOS 和 *NPTII* 基因建立的多重实时荧光 PCR,用于检测肉制品转基因成分^[35]。而蜂蜜中的蜜源植物多样,难以定位到它可能含有的某种转基因植物花粉,筛选难度大,该研究以启动子和终止子为研究对象,建立多重实时荧光 PCR 反应体系进行初筛,实现大范围快速检测,以精准定位转基因可疑阳性样品,提高检测效率。

本研究中建立的 3 组多重实时荧光 PCR 反应体系,能准确地检测 14 份转基因质控品的启动子和终止子,具有很好的适用性,灵敏度分别为 0.01、0.04、0.04 ng/μL,可对大批量、未知转基因成分的蜂蜜进行检测。这种高效的检测手段,可为我国蜂蜜中转基因成分的检测提供一定的技术支撑,同时也适用于其它产品转基因成分的检测。

参考文献:

[1] KADER M A R A,ALI R,YUNUS N K M,et al. Genetically modified organism (GMO) in food supply chain:consumer perception,Islamic perspective and supplier corporate social responsibility[J]. **Advanced Science Letters**,2016,22(5):1431-1434.

[2] BROOKES G,BARFOOT P. Environmental impacts of genetically modified (GM) crop use 1996—2016:impacts on pesticide use and carbon emissions[J]. **GM Crops & Food**,2018,9(3):109-139.

[3] MARTIN H M,DURR D,SMITH L M,et al. Analysis of GMO food products companies:financial risks and opportunities in the global agriculture industry[J]. **African Journal of Economic and Sustainable Development**,2017,6(1):1.

[4] LI Y H,HALLERMAN E M,WU K M,et al. Insect-resistant genetically engineered crops in China:development,application,

- and prospects for use[J]. **Annual Review of Entomology**, 2020, 65:273-292.
- [5] NGUYEN Q H, VU L T K, NGUYEN L T N, et al. Overexpression of the *GmDREB6* gene enhances proline accumulation and salt tolerance in genetically modified soybean plants[J]. **Scientific Reports**, 2019, 9(1):19663.
- [6] KAWASHIMA C G, GUIMARÃES G A, NOGUEIRA S R, et al. A pigeonpea gene confers resistance to Asian soybean rust in soybean[J]. **Nature Biotechnology**, 2016, 34(6):661-665.
- [7] TRIPATHI L, NTUI V O, TRIPATHI J N. CRISPR/Cas9-based genome editing of banana for disease resistance[J]. **Current Opinion in Plant Biology**, 2020, 56:118-126.
- [8] GONZÁLEZ M N, MASSA G A, ANDERSSON M, et al. Reduced enzymatic browning in potato tubers by specific editing of a polyphenol oxidase gene via ribonucleoprotein complexes delivery of the CRISPR/Cas9 system[J]. **Frontiers in Plant Science**, 2019, 10:1649.
- [9] KNOX O, HALL C, MCVITTIE A, et al. A systematic review of the environmental impacts of GM crop cultivation as reported from 2006 to 2011[J]. **Food and Nutrition Sciences**, 2013, 4(6):28-44.
- [10] BOCCIA F, SARNACCHIARO P. Genetically modified foods and consumer perspective[J]. **Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture**, 2015, 7(1):28-34.
- [11] DE SANTIS B, STOCKHOFF N, WAL J M, et al. Case studies on genetically modified organisms (GMOs): potential risk scenarios and associated health indicators[J]. **Food and Chemical Toxicology**, 2018, 117:36-65.
- [12] HODGSON J. Scientists avert new GMO crisis[J]. **Nature Biotechnology**, 2000, 18(1):13.
- [13] BAK A, EMERSON J B. Cauliflower mosaic virus (CaMV) biology, management, and relevance to GM plant detection for sustainable organic agriculture[J]. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, 2020, 4:21.
- [14] NIELSEN K M, BONES A M, SMALLA K, et al. Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria: a rare event?[J]. **FEMS Microbiology Reviews**, 1998, 22(2):79-103.
- [15] RIEGER M A, LAMOND M, PRESTON C, et al. Pollen-mediated movement of herbicide resistance between commercial canola fields[J]. **Science**, 2002, 296(5577):2386-2388.
- [16] SPÖK A, GAUGITSCH H, LAFFER S, et al. Suggestions for the assessment of the allergenic potential of genetically modified organisms[J]. **International Archives of Allergy and Immunology**, 2005, 137(2):167-180.
- [17] KIM C G, LEE B, KIM D I, et al. Detection of gene flow from GM to non-GM watermelon in a field trial[J]. **Journal of Plant Biology**, 2008, 51(1):74-77.
- [18] BAIN C, SELFA T, DANDACHI T, et al. 'Superweeds' or 'survivors'? Framing the problem of glyphosate resistant weeds and genetically engineered crops[J]. **Journal of Rural Studies**, 2017, 51:211-221.
- [19] VILLANUEVA-GUTIÉRREZ R, ECHAZARRETA-GONZÁLEZ C, ROUBIK D W, et al. Transgenic soybean pollen (*Glycine max* L.) in honey from the Yucatán peninsula, Mexico[J]. **Scientific Reports**, 2014, 4:4022.
- [20] 张秀杰, 刁青云, 宛煜嵩, 等. 蜂蜜中转基因成分的 PCR 检测[J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(3):584-587.
ZHANG X J, DIAO Q Y, WAN Y S, et al. PCR detection method for genetically modified ingredient in honey[J]. **Genomics and Applied Biology**, 2010, 29(3):584-587. (in Chinese)
- [21] CHENG H, JIN W, WU H, et al. Isolation and PCR detection of foreign DNA sequences in bee honey raised on genetically modified Bt(Cry1Ac) cotton[J]. **Food and Bioproducts Processing**, 2007, 85(2):141-145.
- [22] DEBODE F, JANSSEN E, BERBEN G. Development of 10 new screening PCR assays for GMO detection targeting promoters (pFMV, pNOS, pSSuAra, pTA29, pUbi, pRice actin) and terminators (t35S, tE9, tOCS, tg7)[J]. **European Food Research and Technology**, 2013, 236(4):659-669.
- [23] 国家市场监督管理总局, 中国国家标准化管理委员会. 基因产品检测 实时荧光定性聚合酶链式反应(PCR)检测方法: GB/T 19495.4—2018[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.
- [24] WEI S, WANG C G, ZHU P Y, et al. A high-throughput multiplex tandem PCR assay for the screening of genetically modified maize[J]. **LWT-Food Science and Technology**, 2017, 87(1):169-176.
- [25] 李忆, 尹全, 刘勇. 利用多重 PCR 技术同时检测 6 种棉花转化体的方法研究[J]. 棉花学报, 2017, 29(5):487-494.
LI Y, YIN Q, LIU Y. Development of a multiplex polymerase chain reaction method for simultaneous detection of six events in genetically modified cotton[J]. **Cotton Science**, 2017, 29(5):487-494. (in Chinese)

- [26] WANG F J, FENG J L, YE S D, et al. Development of a multiplex fluorescence quantitative PCR for detection of genetically modified organisms[J]. **Biologia**, 2018, 73(1): 21-29.
- [27] GUERTLER P, GROHMANN L, NAUMANN H, et al. Development of event-specific qPCR detection methods for genetically modified alfalfa events J101, J163 and KK179[J]. **Biomolecular Detection and Quantification**, 2019, 17: 100076.
- [28] 闫伟, 龙丽坤, 李葱葱, 等. 三种转基因大豆品系的多重荧光 PCR 检测体系建立[J]. 大豆科学, 2019, 38(5): 712-718.
YAN W, LONG L K, LI C C, et al. Establishment of detection system for three genetically modified soybean lines[J]. **Soybean Science**, 2019, 38(5): 712-718. (in Chinese)
- [29] 邵改革, 闫伟, 董立明, 等. 四重 PCR 结合全自动电泳系统检测食品转基因成分[J]. 食品工业科技, 2014, 35(5): 133-136.
SHAO G G, YAN W, DONG L M, et al. Detection of genetically modified food by quadruplex PCR and automated electrophoresis system[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2014, 35(5): 133-136. (in Chinese)
- [30] 董立明, 邢珍娟, 李葱葱, 等. 应用多重 PCR 技术快速筛查食品中的转基因成分[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(1): 56-61.
DONG L M, XING Z J, LI C C, et al. A multiplex PCR assay for the rapid screening of genetically modified components in food[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2017, 36(1): 56-61. (in Chinese)
- [31] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 植物及其加工产品中转基因成分实时荧光 PCR 定性检验方法: SN/T 1204—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [32] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 水稻及其产品中转基因成分实时荧光 PCR 检测方法: SN/T 2584—2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [33] 董立明, 杨帆, 邢珍娟, 等. 一种五重 real-time PCR 筛查转基因水稻方法的建立[J]. 食品科学, 2021, 42(24): 329-334.
DONG L M, YANG F, XING Z J, et al. Establishment of a pentaplex real-time PCR for screening of genetically modified rice[J]. **Food Science**, 2021, 42(24): 329-334. (in Chinese)
- [34] 邢珍娟, 董立明, 龙丽坤, 等. 应用多重荧光 PCR 快速筛查作物中转基因成分研究[J]. 玉米科学, 2021, 29(4): 35-42.
XING Z J, DONG L M, LONG L K, et al. Rapid screening of genetically modified ingredient in crops by multiplex real-time PCR[J]. **Journal of Maize Sciences**, 2021, 29(4): 35-42. (in Chinese)
- [35] 邵彪, 周小兰, 王琳琳, 等. 肉制品中植源性转基因成分多重荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 肉类研究, 2018, 32(1): 41-45.
SHAO B, ZHOU X L, WANG L L, et al. Development of a multiplex fluorescence quantitative polymerase chain reaction assay for detecting added genetically modified ingredients derived from plants in meat products[J]. **Meat Research**, 2018, 32(1): 41-45. (in Chinese)