

前 言

转基因作物的快速应用已经在诸多方面促进了社会的可持续发展,包括保障粮食安全、提高农民收入、保护生物多样性、减少农业的环境影响以及减缓气候变化等方面。越来越多的转基因作物被引入农业生态系统,引发公众对转基因作物对自然和农业生态系统产生负面影响的担忧。

土壤是农业生态系统中物质与能量交换的枢纽。转基因作物与土壤生态系统环境要素紧密相关。转基因作物的大面积种植是否会给土壤生态系统带来影响,已引起全世界的普遍关注,也成为转基因作物生态风险评估不可忽视的方面。加强转基因作物土壤生态风险研究,探明转基因作物与土壤生态系统环境要素之间的相互关系对评价转基因作物土壤环境安全具有重要意义。

近年来,农业部环境保护科研监测所农业生物多样性与生态农业团队在国家自然科学基金项目(31301855 和 31200424)、转基因生物新品种培育重大专项课题(2014ZX08012-005 和 2016ZX08012005-005)、农业部专项等项目资助下,继续围绕重要转基因作物土壤生态安全研究。

全书共分六章:第一章介绍转基因植物重组 DNA 在土壤环境中持留与分布,第二章介绍转基因棉花种植对农田生态系统的影响,第三章介绍转基因大豆种植对土壤生物多样性的影响,第四章介绍磷高效转基因水稻对土壤磷形态及微生物多样性的影响,第五章介绍转 *Bt* 基因作物对土壤动物系统的影响,第六章介绍环介导等温扩增技术在转基因成分检测中的应用。本书可供转基因生物风险评估、转基因生物安全检测和监测等相关领域的科研和管理人员参考。

由于作者水平有限,书中难免存在不妥之处,敬请读者批评指正。

作 者

2017 年 1 月于天津

目 录

前言

第一章 转基因植物重组 DNA 在土壤环境中持留与分布	1
第一节 研究进展	1
一、转基因植物重组 DNA 在土壤环境中的持留	2
二、转基因植物重组 DNA 在土壤环境中的水平转移	3
第二节 转基因抗虫棉花重组 DNA 在土壤中分布的实时定量 PCR 分析	7
一、材料和方法	7
二、结果与分析	10
三、讨论	13
四、结论	15
第三节 利用根箱法解析转基因抗虫棉花重组 DNA 在土壤中的分布	15
一、材料和方法	15
二、结果与分析	18
三、讨论	25
第二章 转基因棉花种植对农田生态系统的影响	27
第一节 研究方法	27
一、实验方法	27
二、数据分析方法	32
第二节 转基因抗虫棉花种植对土壤生物多样性的影响	34
一、转基因抗虫棉花种植对根际土壤酶活性和养分含量的影响	34
二、转基因抗虫棉花种植对土壤微生物的影响	43
三、转基因抗虫棉花种植对土壤线虫多样性的影响	70
第三节 转非抗虫基因棉花种植对农田生态系统的影响	75
一、转 <i>Bn-csRRM2</i> 基因高产棉花种植对土壤速效养分和酶活性的影响	75
二、3 种转非抗虫基因棉花种植对土壤细菌群落多样性的影响	79
三、3 种转非抗虫转基因棉田节肢动物群落的多样性和食物网结构	83
第三章 转基因大豆种植对土壤生物多样性的影响	90
第一节 研究方法	90
一、试验设计及样品采集	90
二、实验方法	91

三、数据分析方法	96
第二节 转基因大豆种植对土壤理化性质和酶活性的影响	97
一、转 <i>Pat</i> 基因和 <i>gm-hra</i> 基因耐除草剂基因大豆对土壤养分及酶活性的影响 ...	97
二、3 种转 <i>CP4 epsps</i> 基因大豆种植对土壤养分和土壤酶活性的影响	102
三、讨论	108
四、结论	109
第三节 转基因大豆种植对氮循环相关微生物多样性的影响	110
一、转 <i>Pat</i> 基因和 <i>gm-hra</i> 基因耐除草剂大豆种植对氮循环相关微生物多样性的影响	110
二、3 种转 <i>CP4 epsps</i> 基因大豆种植对固氮微生物多样性的影响	126
第四节 转基因大豆种植对土壤微生物和线虫多样性的影响	137
一、试验设计及样品采集	137
二、结果与分析	138
三、讨论	159
四、结论	161
第四章 磷高效转基因水稻对土壤磷形态及微生物多样性的影响	163
第一节 材料与分析方法	163
一、试验材料	163
二、数据分析方法	163
第二节 磷高效转基因水稻磷效率特征分析	165
一、试验方法	165
二、结果与分析	165
三、结论	168
四、讨论	168
第三节 磷高效转基因水稻全生育期根际土壤磷组分特征差异	169
一、试验设计与处理	169
二、结果与分析	170
三、讨论	174
四、结论	175
第四节 磷高效转基因水稻 OsPT4 种植对土壤细菌群落多样性的影响 ...	175
一、试验设计	175
二、结果与分析	176
三、讨论	179
四、结论	181

第五章 转 <i>Bt</i> 基因作物对土壤动物系统的影响	182
第一节 转 <i>Bt</i> 基因作物对蚯蚓的影响	183
第二节 转 <i>Bt</i> 基因作物对土壤线虫的影响	183
第三节 转 <i>Bt</i> 基因作物对土壤跳虫的影响	184
第四节 转 <i>Bt</i> 基因作物对土壤螨类及其他土壤动物的影响	185
第六章 环介导等温扩增技术在转基因成分检测中的应用	187
第一节 LAMP 在转基因成分检测中的应用	187
一、LAMP 在通用元件筛查检测中的应用	187
二、LAMP 在基因特异性检测中的应用	189
三、LAMP 在事件特异性检测中的应用	191
第二节 LAMP 技术的改进	193
一、LAMP 检测效率的改进	193
二、LAMP 技术与其他技术的结合应用	195
三、LAMP 检测局限性的改进	195
参考文献	197

第一章 转基因植物重组 DNA 在土壤环境中持留与分布

第一节 研究进展

随着生物技术的不断发展与完善,转基因植物及其产业化取得了令人瞩目的成就。转基因植物自 1996 年开始商业化种植。2014 年,全球转基因作物 28 个国家的种植面积已达到 1.815 亿公顷,年增长率为 3%~4%,是 1996 年种植面积的 100 多倍(James,2014)。复合性状仍然是转基因作物发展的重点,2014 年复合性状转基因作物种植面积为 5100 万公顷,占总种植面积的 28%。2014 年,28 个国家 1800 万农户种植转基因作物,其中 90%以上是发展中国家的资源匮乏的小农户。美国仍是全球转基因作物第一种植国,种植面积达到 7310 万公顷,占全球种植面积的 40%,主要转基因作物的采用率在 90%以上(James,2014)。转基因技术成为现代农业史上应用最迅速的作物技术。转基因植物商品化进程的加快和种植面积的迅速增长,引发了公众对于转基因植物及其产品安全性的关注、忧虑和争论(陈洋等,2008;Lina et al.,2013)。

Snow 和 Moran-Palma(1997)最先将转基因植物种植存在的环境风险归类为非靶标生物及其多样性、基因漂移、靶标生物抗性进化等方面,此分类方式得到了国际上众多学者的支持,推动了转基因植物环境风险研究。随着科学的不断发展,人们对转基因植物的环境风险研究逐步深入。其中转基因植物重组 DNA 在土壤中的分布、持留及其向土壤微生物水平转移的风险,关系着转基因植物对生态系统的影响,是转基因植物环境风险评估的重要内容,已受到科学界的广泛重视。自转基因植物商业化种植以来,人们担忧转基因植物的外源重组 DNA 通过已知或未知的途径转移到新的生物体内(Bennett et al.,2004;Heritage,2005;Kleter et al.,2005;Paul,2008),对环境产生潜在的不利影响,进而威胁人类和动物的健康(Faguy,2003;Gophna et al.,2004)。近期,随着转基因植物的快速发展,人们对转基因植物通过 HGT 对环境造成影响的担忧与日俱增(Pontiroli et al.,2007;Ashbolt et al.,2013)。本书以转基因植物重组 DNA 在土壤环境中的持留及水平转移为核心,对其影响因素、发生机制及相关研究进展等进行论述,为深入了解转基因植物重组 DNA 土壤环境行为提供理论依据,进而为转基因植物环境风险评估提供指导。

一、转基因植物重组 DNA 在土壤环境中的持留

转基因植物重组 DNA 在土壤环境中的持留(存在时间、动态变化及分布特点)是外源基因在自然条件下发生水平转移的前提条件,其受到 DNA 的可利用性、土壤吸附 DNA 的能力等因素的影响。转基因植物的重组 DNA 可作为自由的 DNA 在环境中活动,同时,转基因植物通过根系分泌物、花粉、组织细胞脱落、残体等多种方式不断向土壤释放重组 DNA,丰富了土壤 DNA 库的种类(Ceccherini et al., 2003; de Vries et al., 2003)。土壤中丰富的 DNA 酶能够降解转基因植物所释放的重组 DNA,但是当重组 DNA 吸附到土壤矿物质、腐殖质和有机矿物复合物上后能够免受土壤 DNA 酶的降解(Crecchio et al., 2005; James et al., 2011)。研究表明,转基因植物向土壤释放的重组 DNA 不仅是土壤微生物的营养物质,又是新的遗传物质(Finkel et al., 2001)。细菌能够直接利用存在于自然环境中的外源重组 DNA(Pietramellara et al., 2009; Rizzi et al., 2012),因此,当转基因植物重组 DNA 进入土壤后,不仅会改变微生物的营养选择特性,而且很可能造成微生物群落结构和功能的改变(Levy-Booth et al., 2008)。以下将对转基因植物重组 DNA 在土壤环境中持留时间、影响因素及分布特点等进行论述。

1. 转基因植物重组 DNA 在土壤环境中的存在时间

转基因植物重组 DNA 可作为自由的 DNA 存在于土壤环境中,其对一些土壤微生物造成潜在的影响(Alvarez et al., 1998)。目前国际上主要以转基因烟草、玉米、大豆等为对象,研究了重组 DNA 在土壤中的存在时间。Widmer 等(1997)对农田土壤中转基因烟草重组 DNA 进行监测,发现重组 DNA 可以在土壤中持续存在 77 天。Gebhard 和 Smalla(1999)选取 3 对特异性引物扩增转基因甜菜重组 DNA,发现 2 年后仍可以在土壤中检测到重组 DNA。Lerat 等(2007)对转基因玉米和转基因大豆 *CP4-epsps* 基因在土壤中的动态变化进行研究,结果在转基因玉米和转基因大豆收获 7 个月后采集的土壤样品中检测到 *CP4-epsps* 基因。Zhu 等(2010)进行连续 3 年的转基因玉米大田试验,于第 2 年年初开始采集土壤样品,研究发现在第 2 年和第 3 年玉米种植前所采集的部分土壤样品中可以检测到 *NPTII* 基因的存在,说明转基因玉米的 *NPTII* 基因经过冬季后仍然存在于土壤中。由此可见,转基因植物重组 DNA 可作为自由的 DNA 存在于土壤环境中数月甚至是数年。

2. 转基因植物重组 DNA 持留的影响因素及分布特点

土壤中重组 DNA 持留时间的长短各不相同,这种现象的产生与多种因素相关,如生物活性、土壤类型、组成、温度、湿度、pH、矿化水平等(Levy-Booth et al.,

2007)。其次,重组 DNA 在土壤中的持留也受到转基因植物的生长期和季节变化的影响,Lerat 等(2007)对转基因玉米和转基因大豆 *CP4-epsps* 基因在土壤中的动态变化进行研究时发现,土壤中 *CP4-epsps* 基因的拷贝数随转基因植物的生长期和季节的变化呈现先上升后下降的趋势,Zhu 等(2010)对土壤中转基因玉米 *NPTII* 基因季节动态变化研究时也得到了相同的研究结果。再次,转基因植物重组 DNA 分布特征与土壤团聚体有关。Levy-Booth 等(2009)研究转基因大豆 *CP4-epsps* 基因在土壤中的分布特点时发现,在不同粒级的土壤团聚体中,直径 $>20\mu\text{m}$ 的土壤团聚体中 *CP4-epsps* 基因含量显著高于其他粒级的土壤团聚体,其所包含的 *CP4-epsps* 基因拷贝数占总拷贝数的 66.62%~99.18%,而其质量仅占总质量的 30%,说明土壤团聚体的形成增强了 *CP4-epsps* 基因的耐性,同时揭示了 *CP4-epsps* 基因在土壤中的分布规律。由此可以看出,转基因植物重组 DNA 在土壤环境中的持留受多种因素的影响(如温度、湿度、DNA 的稳定性、季节变化等),其在土壤环境中分布特点为水平转移的发生提供了可能性。

3. 转基因植物重组 DNA 持留的检测方法

目前转基因植物重组 DNA 在土壤中持留的检测以定量 PCR、定性 PCR 等方法为主。在 DNA 量比较少的情况下,可以应用实时定量 PCR 方法对重组 DNA 进行检测。Widmer 等(1997)最先用 PCR 方法对田间土壤中残留的植物基因组 DNA 进行了定量分析,Lutz 等(2006)利用 PCR 技术对非重组基因 *rubisco* 与重组 *cry1Ab* 基因在转基因玉米青贮时期的降解进行了比较。Zhu(2006)用高灵敏度的 SYBR Green I 作为荧光染料的实时定量 PCR 方法对转 *Bt* 基因玉米(MON 863)中的 *NPTII* 进行了定量分析,检测了 *NPTII* 基因的动态变化。Douville 等(2007)也利用实时荧光定量 PCR 技术对转基因玉米地周围的不同环境中 *Cry1Ab* 基因的存在和残留进行了研究,结果表明其在环境中可以存在一段时间。李刚等(2012)采用 TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法对转基因棉花重组 DNA 在土壤中的分布进行了分析。总体来看,实时荧光定量 PCR 是研究转基因植物重组 DNA 持留和分布的主要方法,具有快速、准确等特点,将在转基因植物重组 DNA 环境行为研究中发挥重要作用。

二、转基因植物重组 DNA 在土壤环境中的水平转移

1928 年 Fred 首次报道细菌间存在基因转移现象,1946 年科学家将个体间的非生殖基因的转移定义为结合、转导、重组、重排和连锁等(Bushman, 2002)。20 世纪 80 年代,人们将这些不同类型的基因转移叫做基因水平或者横向转移(Arber, 2000)。基因水平转移(HGT)一般是指发生在没有亲缘关系的个体之间,或是单个细胞器之间所进行的遗传物质的交流(Doolittle, 1999; Ochman et al. ,

2000)。HGT 是生物进化的重要动力,其进化历程被称为“生命之网”(Williams et al., 2011; Keen, 2012; Syvanen, 2012)。

1. 基因水平转移的机制

由于 HGT 是一种单向的供体细胞向受体细胞转移的过程,因此基因由植物向细菌转移时,有一定的生态学需求,主要是植物与细菌间的转化和联系(Heinemann, 1991),即细菌要有能力吸收植物 DNA 同时能够保持基因组的稳定性。因此,HGT 发生时,需要有可利用的 DNA, DNA 吸附于土壤颗粒上得以稳定,以此保持或者提高转化能力(Paul, 2008)。

相对真核生物而言,原核生物中 HGT 的发生频率更高(Dunning, 2011; McGinty et al., 2011),原核生物主要有接合(Conjugation)、转化(Transformation)和转导(Transduction)三种方式(Hacker et al., 2001; Burrus et al., 2004; Frost et al., 2005; Kelly et al., 2009a, 2009b)。自然界中,大多数的细菌之间发生 HGT 都是以接合的方式进行的(Kelly et al., 2009a)。为保证基因的成功转移,这三种机制都要求 DNA 没有被降解且复制到宿主基因组中并确保能在宿主后代中有效的保留(Thomas et al., 2005)。真核生物发生 HGT 的机制与原核生物有所不同,单细胞真核生物和微生物间的 HGT 有报道,即宿主生物和与其寄生的生物通过相互接触,或者是借助病毒等载体来实现 HGT(Andersson, 2005),但多细胞真核生物的 HGT 机制尚不明确(Gao et al., 2014)。Yin 等(2014)首次发现在持家基因的参与下 *Cytb* 基因由真菌向假菌界发生 HGT 的现象,这一研究结果为 HGT 的研究提供新的认知。

2. 基因水平转移的限制因素及存在的风险

HGT 可以丰富物种遗传的多样性,HGT 的发生频率受相关物理、生物及化学因素的影响(Matic et al., 1996; Kurland, 1998; Nielsen, 1998; Smalla et al., 2000; Thomas et al., 2005)。HGT 的限制因素包括:细胞核的完整性、在细菌中识别、水解外源基因序列及自我识别的修复系统(Ambur et al., 2007)。一般而言,HGT 的限制因素与亲缘关系的远近呈反比,因此亲缘关系较远的物种间其 HGT 发生的频率更高(Fraser et al., 2007)。HGT 发生的限制因素还包括被细菌吸收且稳定存在于细菌内的基因是否可以正确地表达,因为大部分细菌注入转基因植物中的启动子活性较低(de Vries et al., 2003)。当细菌吸收转基因植物的外源 DNA 后,通过同源重组方式就可以发生 HGT。

生物体通过 HGT 获得新的基因,加速基因组的革新和进化(Jain, 2003),尽管许多研究表明,HGT 对多细胞受体生物的生化系统进化有显著贡献(Dunning, 2011),但在目前的研究水平下,要准确且完整地对此作出评述是几乎不可能的(王

洽等,2014)。然而通过分析发生在不同生物类群中 HGT 发现,其所带来的影响不可忽视。转基因植物发生 HGT 现象对环境存在着潜在的影响(Nielsen et al., 2004)。土壤环境中自然感受微生物很可能利用自由存在的 DNA,将其整合到基因组中,特别是重组 DNA 中的抗性筛选标记基因片段,这种 HGT 的生态安全性已经引起科学界的广泛关注(Miki et al., 2004; Weinert et al., 2010)。有研究表明,HGT 是抗生素抗性基因传播的重要方式,是造成抗性基因环境污染日益严重的原因之一(杨凤霞等,2013)。同时,由于转基因生物技术的使用导致基因组的不稳定性增强,一些真核细胞容易发生突变,更易发生 HGT(Woese, 2004)。对原核生物来说,其在自然条件下,转基因植物发生 HGT 的成功率为 7×10^{-23} (Brigulla et al., 2010)。尽管原核生物转移率很低,但仍不能忽略其所带来的潜在影响。转基因植物中的外源基因通过水平转移到其他生物体内,改变受体细胞的生物学特性,例如转移到受体内,改变了受体的生态位和生态潜力(Heuer et al., 2007),或是通过未知的方式改变受体的结构和功能(Prescott et al., 2005)。同时,受体生物内引入的新基因会干扰其内源基因,进而也有可能产生不可预知的影响(Paul, 2008)。

3. 转基因植物重组 DNA 水平转移发生频率

土壤中细菌间的基因交流(信息交流)是普遍存在的(Davison, 1999),而转基因植物中携带的源于土壤微生物的重组 DNA,如抗生素筛选基因(*NPTII* 基因和 *aadA* 基因)向自然感受态细菌转移只有在特定的试验条件下才能够发生,且转化成功率很低(Pontiroli et al., 2010)。Rizzi 等(2008)构建了一种能够表达绿色荧光蛋白的 *Acinetobacter baylyi* BD413 缺失菌,使用 pCLT 质粒作为 DNA 供体(pCLT 质粒在 *Acinetobacter baylyi* BD413 中不能复制,其序列中包含 *rbcL-aadA-accD* 基因序列),采用激光共聚焦显微镜镜检对自然转化下发生的 HGT 进行研究,结果表明转化效率达到 $6.3 \times 10^{-3} \pm 1.0 \times 10^{-3}$ 。Demaneche 等(2011)以含有 *accD-aadA-rbcL* 序列的广谱宿主质粒 Pbb1MCS-3、叶绿体转基因烟草 DNA 和 PCR 产物为供体材料,通过自然转化和电击转化方法对分离筛选的 16 种细菌进行转化试验,结果说明具有高外源重组 DNA 拷贝数的叶绿体转基因植物发生 HGT 的几率处于较低的水平。

田间种植试验能够真实反映转基因植物对土壤生态系统的影响。Lee 等(2010)采用大田土壤包埋试验调查了重组 DNA 从转基因西瓜组织向土壤细菌水平转移的发生,结果发现在土壤样品中仅能检测到 35S 启动子,却未发生 35S 启动子向土壤细菌的水平转移。Ma 等(2011)对连续 3 年种植转基因玉米(携带 *NPTII* 基因)大田土壤中卡那霉素抗性(KmR)和新霉素抗性(NmR)细菌群落进行分析,发现转基因玉米和非转基因亲本玉米田中均存在具有 KmR 或 NmR 的土

壤细菌,结果说明具有 KmR 或 NmR 的土壤细菌数量仅占细菌总数的 2.3%~15.6%,在对从转基因玉米和非转基因亲本玉米田所分离的 3000 个抗性细菌菌株进行特异性 PCR 未检测到 *NPTII* 基因的存在,说明土壤中 KmR 或 NmR 细菌的抗性并非来自 *NPTII* 基因,转基因玉米的 *NPTII* 基因未向土壤细菌转移。王振等(2010)对转基因抗虫棉根际卡那霉素抗性细菌的种群动态进行监测,同时检测转基因抗虫棉卡那霉素抗性基因向根际土壤细菌转移,结果 21 株卡那霉素抗性细菌菌株中 18 株发现有阳性片段,但序列比对结果与对照卡那霉素抗性基因的同源性未达到 100%,不能判断 *NPTII* 基因是否发生了转移。到目前为止,研究表明 HGT 只在特定实验室条件下低频率地发生,并没有证据直接表明其在大田试验条件下的发生(Nicolia et al., 2014)。

4. 转基因植物重组 DNA 水平转移的检测方法

目前有关转基因植物重组 DNA 在土壤环境中是否发生了水平转移主要是将常规微生物学技术和分子生物学技术相结合,采用平板培养与 PCR 克隆测序相结合,菌落 PCR 和菌落 Southern 杂交技术研究。Ma 等(2011)利用平板稀释筛选抗性基因,采用 *NPTII* 基因特异性引物,以 pBI121 质粒作为阳性对照对抗生素抗性的菌落进行 PCR 检测,判断 *NPTII* 基因是否在土壤环境中发生了 HGT。邓欣等(2007)也利用此方法进行了转基因抗虫棉花叶围卡那霉素抗性细菌检测及 *NPTII* 基因漂移研究,结果认为转基因抗虫棉花中的 *NPTII* 能够向叶围细菌漂移。Lee 等(2010)采用大田土壤包埋试验调查重组 DNA 从转基因西瓜组织向土壤细菌水平转移,利用菌落 Southern 杂交试验分析,以细菌菌落和 DNA 探针杂交,结果土样中未检测到 35S 启动子的转移。Kim 和 Jae(2010)检测大田土壤中转基因马铃薯基因是否向土壤细菌发生水平转移也采用菌落 Southern 杂交的方法。任少华等(2012)利用系统发育树的方法研究种植转 *Bt* 水稻对固氮酶铁蛋白基因 *nifH* 水平转移的影响。

然而,相对于其他形式的基因转移,HGT 是一种较难辨别的过程,短时间内难以确定它的发生(Townsend et al., 2012)。所有用于检测 HGT 的方法中都会发现新的基因(Ragan, 2001),不同的检测方法只能确定 HGT 发生的相对时间(Ragan et al., 2006)。因此,探索复合方法用于鉴定和确认 HGT 发生的同时(Eisen, 2000; Ragan, 2001; Lawrence et al., 2002),可以有效地将系统发育树等方法相结合,全面考虑生物地理学等其他方面的研究以期提供辅助证据。近期, Nielsen 等(2014)利用建立数据模型的方法来检测细菌中 HGT 的现象,伴随这一时代的到来,土壤环境中转基因植物重组 DNA 是否会发生 HGT 将会越来越明晰。随着基因组测序时代的到来,在多细胞真核生物中将有更多的 HGT 被发现,这无疑将推动 HGT 研究向更深层次发展。

HGT 作为转基因植物重组 DNA 向土壤环境转移的重要途径,在实验室特定条件下存在发生的可能,然而,目前田间试验研究尚未发现调控元件、抗生素筛选基因等在自然条件下向土壤微生物的水平转移。随着转基因植物种植面积的扩大以及转基因植物新品种的释放,田间种植转基因植物对土壤环境的影响越来越复杂(孙彩霞等,2006)。特别是在转基因植物长期种植下,重组 DNA 在土壤环境中是否发生转移还有待大田试验的长期监测和进一步验证。常规的检测技术已不能满足对于转基因植物外源重组 DNA 水平转移及持留的检测要求,多种分析方法的综合运用(如定性 PCR、荧光定量 PCR、多重 PCR、菌落 PCR、克隆技术和菌落 Southern 杂交等)将成为今后进行检测的主要技术手段,特别是近几年兴起的数字 PCR 技术和高通量测序技术也将为转基因植物重组 DNA 持留及水平转移研究提供有力的技术支撑。转基因植物种植的生态安全性要依靠长期、科学、全面的监测,以此才能做出正确的判断。加强对重组 DNA 向土壤微生物水平转移的研究,科学回答转基因生物的生态安全性(储成才,2013),及时让公众了解转基因技术研究和应用的重要性。

第二节 转基因抗虫棉花重组 DNA 在土壤中分布的实时定量 PCR 分析

一、材料和方法

1. 供试材料

供试棉花品种为转基因抗虫棉花 SGK321,由中国农业科学院植物保护研究所提供。供试土壤为潮土,取自中国农业科学院武清转基因生物农田生态环境影响野外科学观测试验站,试验前种植玉米和小麦。部分理化性质如下:有机质含量 $10.69\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,全氮含量 $0.63\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,全磷含量 $1.35\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,硝态氮含量 $36.38\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,铵态氮含量 $5.72\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

2. 根箱设计

试验中用于种植棉花的 3 室根箱由非透明有机玻璃加工制成,长 13cm、宽 8cm、高 12cm,植物生长室宽度为 3cm,两个土壤室宽度均为 5cm。植物生长室和两个土壤室之间用 $30\mu\text{m}$ 孔径的尼龙网相隔,将根系限制在植物生长室中生长,采集土壤样品时便于将植物根系与土壤分离开(图 1.1)。播种前将取自试验站的新鲜土壤自然风干,过 1mm 筛后装入各根室,每盒装土 1.2kg。

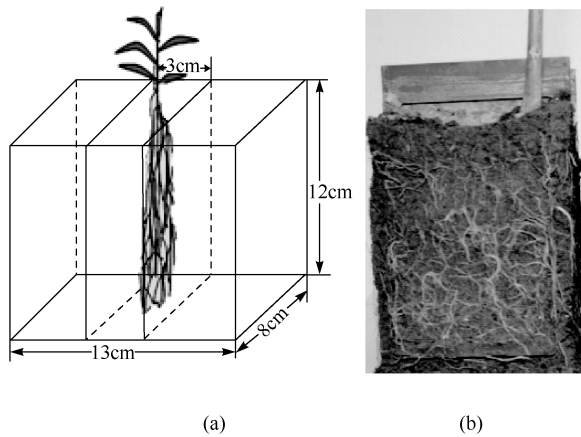


图 1.1 3 室根箱结构示意图(a)和根表轮廓示意图(b)

3. 植物和土壤样品 DNA 提取

取脱壳的转基因抗虫棉花种子于液氮中充分研磨至粉末状,采用商品化试剂盒提取棉花基因组 DNA。

采用商品化试剂盒按照操作说明提取土壤总 DNA。上述所获得的全部植物和土壤 DNA 均经 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测样品质量。

4. 引物设计

为构建用于检测转基因抗虫棉花重组 DNA 的质粒标准分子,试验根据 35S 启动子与 *CryIA(c)* 基因以及 35S 启动子与 *NPTII* 基因之间的构建特异性序列设计引物(表 1.1)。

表 1.1 质粒标准分子构建用引物

引物	引物序列(5'~3')	靶定目标	片段大小
35S-Cry1A-F	CGTAAGGGATGACGCACAA	35S 启动子与 <i>Cry1A(c)</i> 基因	274bp
35S-Cry1A-R	CAGCACCTGGCAGGAACT		
35S-NPT-F	CGTAAGGGATGACGCACAA	35S 启动子与 <i>NPTII</i> 基因	473bp
35S-NPT-R	GGCAGGAGCAAGGTGAGATG		

试验根据上述构建特异性序列利用 Beacon Designer 7.91 (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA) 软件分别设计 3 对引物和探针,从中各筛选 1 对最佳的引物和探针(表 1.2)。

表 1.2 实时荧光定量 PCR 用引物和探针序列

引物/探针	引物序列(5'~3')	靶定目标	片段大小
35S-Cry1A-1F	CATTCGTTGATGTTTGGGTTGTTG	35S 启动子与 <i>Cry1A(c)</i> 基因	109bp
35S-Cry1A-1R	TCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAG		
35S-Cry1A-P	FAM-AGTCAGCTTGTCAGCGTGTCTCTCCAA-TARMA		
35S-NPT-1F	TCCTTCGCAAGACCCTTCCTC	35S 启动子与 <i>NPTII</i> 基因	210bp
35S-NPT-1R	AGCAGCCGATTGTCTGTTGTG		
35S-NPT-P	HEX-CCAGTCATAGCCGAATAGCCTCTCCACC-TARMA		

5. 质粒分子样品设置

将所获得的 35S 启动子与 *Cry1A(c)* 基因以及 35S 启动子与 *NPTII* 基因之间的构建特异性片段分别连入 pGEM[®]-T Easy Vector (Promega, USA) 后转化 *E. coli* JM109, 用菌落 PCR 方法检测阳性克隆。将鉴定正确的阳性克隆于 37℃ 条件下培养菌液, 离心收集细菌并提取质粒 DNA。按照每个阳性质粒含 3291bp(35S-Cry1A) 和 3490bp(35S-NPTII) 计算得到每个阳性质粒的质量分别为 $6.88 \times 10^{-18} \text{ g} \cdot \text{分子}^{-1}$ 和 $7.30 \times 10^{-18} \text{ g} \cdot \text{分子}^{-1}$, 分别制备成含有 10^8 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 质粒分子溶液, 并用 Easy dilution (Takara) 稀释至 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 和 10^1 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$, 每个浓度均设置 3 次重复, 检测扩增的重复性。

6. 荧光定量 PCR 扩增和反应条件

质粒标准分子定量 PCR 反应体系 (25 μL), 包括 $1 \times$ Premix Ex *Taq*TM (Perfect Real Time) Buffer (Takara), 200nM^① 每种引物, 400nM *Taq*Man Probe, $1 \times$ ROX reference dye II (Takara), 1 μL 模板 DNA, 灭菌水; 土壤样品中外源重组 DNA 定量 PCR 反应体系 (25 μL), 包括 $1 \times$ Premix Ex *Taq*TM (Perfect Real Time) Buffer (Takara), 200nM 每种引物, 400nM *Taq*Man Probe, $1 \times$ ROX reference dye II (Takara), 20ng $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ T4 gene 32 protein (Roche, Laval, Quebec, Canada), 2 μL 模板 DNA, 灭菌水。PCR 扩增均采用两步法, 反应条件为 95℃, 30s; 95℃, 5s, 60℃, 30s (45 个循环), 于 60℃ 复性和延伸时收集荧光信号。所有荧光定量 PCR 扩增设阴性和空白对照, 采用 MxPro-Mx 3005P v 4.00 (Stratagene, USA) 软件收集数据, 同时应用 Excel 2010 进行标准差、相对标准偏差计算及绘制定量标准曲线和 SPSS 16.0 软件进行方差分析 (One-Way ANOVA)。

土壤中转基因抗虫棉花外源重组 DNA 拷贝数计算公式:

① 1M=1mol/L。

外源重组 DNA 拷贝数 $x(\text{copies} \cdot \text{g}^{-1}) = 4 \times 25 \times 10^{(B-y)/A}$

式中, B 和 A 代表系数; y 代表荧光定量 PCR 反应的循环阈值(Ct 值)。

二、结果与分析

1. 定量标准曲线的构建与重复性分析

由图 1.2 可见,Ct 值与模板的起始拷贝数的对数具有很好的线性关系。计算得出相应的标准曲线方程,分别为:35S-Cry1A 质粒标准分子拷贝数与 Ct 值的关系为 $y = -3.2677 \times \lg(x) + 42.02$,相关系数为 $R^2 = 0.9983$,扩增效率为 102.3%; 35S-NPTII 质粒标准分子拷贝数与 Ct 值的关系为 $y = -3.1874 \times \lg(x) + 42.849$,相关系数为 $R^2 = 0.9986$,扩增效率为 106.0%。

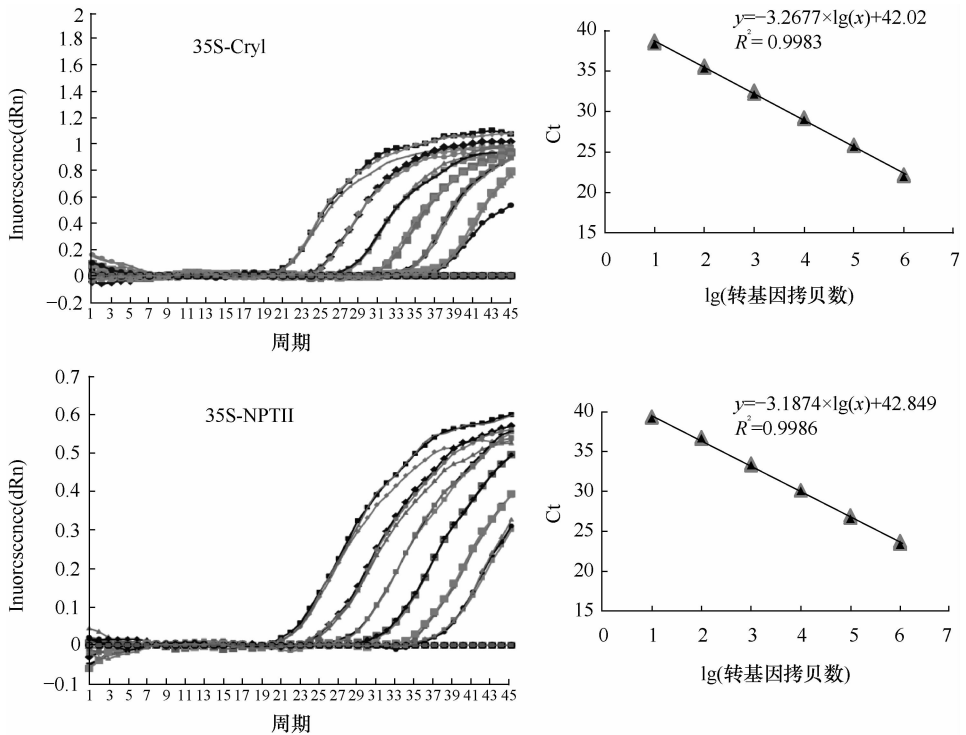


图 1.2 质粒标准样品荧光扩增曲线和定量标准曲线

对 35S-Cry1A 和 35S-NPTII 质粒标准分子进行重复性测试,结果见表 1.3, SD 范围分别在 0.08~0.21 和 0.03~0.19 之间,而 RSD 范围在 0.31%~0.64% 和 0.08%~0.78% 之间。以上定量 PCR 检测的标准曲线相关系数均达到了 0.998 以上,具有较好的线性关系和可接受范围内的 SD 值。