

# 转基因抗虫耐除草剂玉米 C0030.1.1 定性 PCR 检测方法的建立

董文凤, 梁晋刚\*, 李夏莹, 刘鹏程, 张旭冬, 王颢潜, 陈子言, 张秀杰\*

(农业农村部科技发展中心, 北京 100176)

**摘要:**转基因抗虫耐除草剂玉米 C0030.1.1 是由北京大北农生物技术有限公司自主研发的转 *cry1Ab* 基因和 *epsps* 基因抗虫耐除草剂玉米转化体。为了建立转基因抗虫耐除草剂玉米 C0030.1.1 的检测方法, 本研究在外源基因插入位点的左、右边界上设计引物, 通过引物筛选、特异性测试、引物浓度和退火温度测试、灵敏度测试等试验, 最终在右边界建立了抗虫耐除草剂玉米 C0030.1.1 的定性 PCR 检测方法, 灵敏度为 0.1%。8 家单位循环验证结果表明本方法具有很好的重复性和再现性, 可以特异性检测到转化事件。本研究建立的方法适用于产品中含有 C0030.1.1 玉米转基因成分的检测。

**关键词:**转基因玉米; 定性 PCR; C0030.1.1

中图分类号: S513

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2023)02-0049-06

## Development of Detection Method of Insect-Resistant and Herbicide-Tolerant Maize C0030.1.1

DONG Wenfeng, LIANG Jingang\*, LI Xiaying, LIU Pengcheng, ZHANG Xudong, WANG Haoqian, CHEN Ziyang, ZHANG Xiujie\*

(Development Center of Science and Technology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100176, China)

**Abstract:** Genetically modified (GM) maize (*Zea mays* L.) C0030.1.1 is developed by Beijing DaBeiNong Biotechnology Co., Ltd. The purpose of this study is to develop the event-specific qualitative detection method of this maize C0030.1.1. Based on the foreign inserted gene, a series of specific PCR primers were designed on the left and right of the flanking binding site. And then the PCR reaction systems were screened and optimized based on primer screening, specificity test, sensitivity test, differential primer concentration and a series of annealing temperatures. The maize C0030.1.1 events-specific qualitative PCR detection method was established finally on the right of the flanking binding site. The detection sensitivity was 0.1%. After validated by 8 external laboratories, results showed that this method could specifically detect the samples of C0030.1.1 event and had a good repeatability and reproducibility.

**Key words:** Genetically modified maize; Qualitative PCR; C0030.1.1

随着转基因技术的发展, 转基因作物种植面积不断增加, 转基因技术已成为目前农业领域生物技术的核心之一<sup>[1]</sup>。转基因作物 1996 年开始大规模商业化种植, 据国际农业生物技术应用服务组织 (ISAAA) 统计, 至 2018 年, 已有 26 个国家种

植了 1.917 亿公顷转基因作物<sup>[2]</sup>。在全球种植的四大主要转基因作物中, 玉米是转化体获批数量最多的作物<sup>[2]</sup>, 超过 1/3, 包括抗虫型、耐除草剂型和品质改良型等性状<sup>[3]</sup>。随着农业发展需求的日益提高, 仅靠单性状转基因作物无法满足现代农业的发展需求, 而复合性状转基因作物拓宽了转基因作物的功能, 具有广阔的应用前景<sup>[4-5]</sup>, 国内外目前大多为复合型转化体<sup>[6]</sup>。转基因作物的种植在带来巨大经济和生态效益的同时, 其潜在风险也一直饱受争议, 因此建立准确、标准化的转基因检测体系十分重要。

转基因抗虫耐除草剂玉米 C0030.1.1 是北京大北农生物技术有限公司利用农杆菌介导法在受体玉米中转入 *cry1Ab* 基因和 *epsps* 基因获得的抗虫

收稿日期: 2020-04-12

基金项目: 农业农村部转基因生物新品种培育科技重大专项 (2016ZX08012003、2019ZX08012-004)

作者简介: 董文凤 (1991-), 女, 助理农艺师, 硕士, 研究方向: 转基因生物安全检测。

通讯作者: 梁晋刚, 男, 博士, 高级农艺师, E-mail: liangjingang@agri.gov.cn

张秀杰, 女, 博士, 正高级农艺师, E-mail: zhxj7410@sina.com

耐除草剂玉米转化体,属于复合性状。为及时应对国际国内形势,对玉米C0030.1.1进行有效监管,制定抗虫耐除草剂玉米C0030.1.1的定性PCR检测方法,对开展转基因检测和评价是非常必要的。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

抗虫耐除草剂玉米C0030.1.1样品和对应的

受体178玉米样品(阴性对照)由北京大北农生物技术有限公司提供,样品均为单一纯合体,纯度大于99%,未经过净化、杀虫、包衣、灭活等处理。方法研制过程中需用到以下样品:浓度百分比为1%的抗虫耐除草剂玉米C0030.1.1(C0030.1.1基因组与受体基因组混合),非转基因样品(包括大豆、玉米、棉花、水稻、苜蓿),转基因混合样品(参照表1制备),以上样品均由相关研发人提供。

表1 设计引物的序列信息

| 引物    | 引物序列(5'-3')                 | 引物    | 引物序列(5'-3')                |
|-------|-----------------------------|-------|----------------------------|
| 5'-1F | GCCGCGATTCCGTCGTA           | 3'-4F | GTCCCGGTCCCGTTTAAACC       |
| 5'-2F | CCGCGATTCCGTCGTA            | 3'-1R | AGAGGAAGGAGCCACTTGTTGC     |
| 5'-3F | CTCGTACGAACCGATCGTCG        | 3'-2R | ACAGTACAGATCCGTGAGAAAGAAGA |
| 5'-1R | GCCGTATCCGCAATGTGTT         | 3'-3R | CGTACAGTACAGATCCGTGAGAAAG  |
| 5'-2R | ATCGCGCGCGGTGTCATCTA        | 3'-4R | GTAATCATCGTTCTCACC GCACC   |
| 5'-3R | GCATGACGTTATTTATGAGATGGGT   | 3'-5R | GTGGTATGGCAGCGTCAAGT       |
| 3'-1F | TGAGGCTAGTGCCATCAATAAGTT    | 3'-6R | TCATCGTTCTCACC GCACC       |
| 3'-2F | GCTAGTGCCATCAATAAGTTATCAGTC | 3'-7R | ATGGTGGTATGGCAGCGTC        |
| 3'-3F | ACTAAAATCCAGATCCCCCGAATTA   | 3'-8R | AAATAATTTTGAATTCATGCTGTT   |

### 1.2 方法

#### 1.2.1 抗虫耐除草剂玉米C0030.1.1转化体特异性引物设计及筛选

抗虫耐除草剂玉米C0030.1.1新转入基因为*cry1Ab*和*epsps*,新转入基因已整合在玉米受体基因组的8号染色体上,并能稳定遗传和表达。利用引物设计软件Primer Premier 5在研发者提供

的抗虫耐除草剂C0030.1.1侧翼序列左边界(LB)、右边界(RB)分别设计引物,共设计引物32对,引物序列及组合见表1和表2。以浓度百分比为1%的抗虫耐除草剂玉米C0030.1.1样品测试所设计的引物,玉米内标准基因引物参照农业农村部1861号公告-3-2012(表3)。采用的反应体系和程序与已发布的玉米内标准基因一致<sup>[7]</sup>。

表2 引物组合

| 编号    | 引物       | 片段长度  | 编号    | 引物       | 片段长度  |
|-------|----------|-------|-------|----------|-------|
| 5'-1  | 5'-1F/1R | 159bp | 3'-17 | 3'-2F/4R | 181bp |
| 5'-2  | 5'-1F/2R | 211bp | 3'-18 | 3'-2F/5R | 120bp |
| 5'-3  | 5'-1F/3R | 314bp | 3'-19 | 3'-2F/6R | 177bp |
| 5'-4  | 5'-2F/1R | 158bp | 3'-20 | 3'-2F/7R | 123bp |
| 5'-5  | 5'-2F/2R | 210bp | 3'-21 | 3'-2F/8R | 140bp |
| 5'-6  | 5'-2F/3R | 313bp | 3'-22 | 3'-3F/2R | 265bp |
| 5'-7  | 5'-3F/1R | 142bp | 3'-23 | 3'-3F/3R | 268bp |
| 5'-8  | 5'-3F/2R | 194bp | 3'-24 | 3'-3F/5R | 305bp |
| 5'-9  | 5'-3F/3R | 297bp | 3'-25 | 3'-3F/7R | 308bp |
| 3'-10 | 3'-1F/1R | 242bp | 3'-26 | 3'-4F/2R | 164bp |
| 3'-11 | 3'-1F/4R | 185bp | 3'-27 | 3'-4F/3R | 167bp |
| 3'-12 | 3'-1F/5R | 124bp | 3'-28 | 3'-4F/4R | 265bp |
| 3'-13 | 3'-1F/6R | 181bp | 3'-29 | 3'-4F/5R | 204bp |
| 3'-14 | 3'-1F/7R | 127bp | 3'-30 | 3'-4F/6R | 261bp |
| 3'-15 | 3'-1F/8R | 144bp | 3'-31 | 3'-4F/7R | 207bp |
| 3'-16 | 3'-2F/1R | 238bp | 3'-32 | 3'-4F/8R | 224bp |

表3 玉米内标准基因引物信息表

| 引物名称     | 序列(5'--3')                   | 目的片段大小 |
|----------|------------------------------|--------|
| zSSIb-1F | 5'-CTCCCAATCCTTTGACATCTGC-3' | 151bp  |
| zSSIb-2R | 5'-TCGATTCTCTCTTGGTGACAGG-3' |        |

1.2.2 特异性测试

以浓度百分比为 1% 的抗虫耐除草剂玉米 C0030.1.1、非转基因样品和转基因混合样品(见表 4)为测试样品,对 1.2.1 筛选到的不同引物进行测试。采用的反应体系和程序与已发布的玉米内标准基因一致<sup>[7]</sup>。

表4 特异性样品测试分类组成

| 转基因混合样品    | 每种转化体含量为 1%(质量百分比)                                                                                                               |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 转基因大豆混合样品  | GTS40-3-2、MON89788、A5547-127、A2704-12、356043、305423、CV127、MON87701、MON87708、MON87769、MON87705、FG72、DAS68416-4、SHZD32-1           |
| 转基因棉花混合样品  | MON1445、MON531、MON15985、LLCOTTON25、MON88913、GHB614、COT102                                                                        |
| 转基因水稻混合样品  | TT51-1、KF-6、KMD-1、M12、KF-8、KF-2、G6H1、T1C-19                                                                                      |
| 转基因油菜混合样品  | MS1、MS8、RF1、RF2、RF3、T45、Oxy235、Topas19/2、MON88302、73496                                                                          |
| 其他转基因玉米混合物 | Bt11、Bt176、MON810、MON863、GA21、NK603、T25、TC1507、MON89034、MON88017、59122、MIR604、3272、MON87460、MIR162、DAS40278-9、4114、MON87427、5307 |

1.2.3 引物浓度和退火温度的优化

以浓度百分比为 1% 的 C0030.1.1 基因组 DNA 为模板,设置 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 μmol/L 6 个引物浓度梯度,54℃、56℃、58℃和 60℃ 4 个退火温度进行正交组合,对引物进行退火温度和引物浓度测试,其他条件与内标准基因一致。

1.2.4 灵敏度测试

设置 10 ng、1 ng、0.5 ng、0.1 ng、0.05 ng 和 0 ng,6 个不同含量的 C0030.1.1 基因组样品 2 次重复,反应体系和程序参照 1.2.3 测试得到的退火温度和引物浓度,其他条件与内标准基因一致。

1.2.5 检出限测试

为了进一步测试检测方法的检出限,设置含量为 0.1 ng 的 C0030.1.1 基因组样品 20 份,每份 3 次重复,共进行 60 次测试,测试检出限,反应体系和程序参照 1.2.3 测试得到的退火温度和引物浓度,其他条件与内标准基因一致。

1.2.6 再现性测试

两名试验人员利用两台不同 PCR 仪器,分别对含量为 10、1、0.5、0.1、0.05 ng 抗虫耐除草剂玉米 C0030.1.1 样品进行测试,反应体系和程序参照 1.2.3 测试得到的退火温度和引物浓度,其他条件与内标准基因一致。

1.2.7 循环验证

组织 8 家具备检测条件和能力的技术检测机构进行验证,验证单位分别为:农业农村部植物生态环境安全监督检验测试中心(北京)、农业农村部植物生态环境安全监督检验测试中心(天津)、农业农村部农作物生态环境安全监督检验测试中心(太原)、农业农村部谷物及制品质量监督检验测试中心(哈尔滨)、农业农村部农作物生态环境安全监督检验测试中心(合肥)、农业农村部转基因植物环境安全监督检验测试中心(杭州)、农业农村部农产品及加工品质量安全监督检验测试中心(杭州)、农业农村部农产品及加工品质量监督检验测试中心(长春)。

验证样品为:质量分数分别为 1% 的 C0030.1.1、抗虫耐除草剂玉米 ZZM030、耐除草剂玉米 C0010.2.2、抗虫耐除草剂玉米 C0030.2.3;质量分数为 0.1% 的 C0030.1.1;其他转基因玉米混合样、转基因大豆混合样、转基因水稻混合样、转基因棉花混合样、转基因油菜混合样(表 3);非转基因玉米混合样;阳性对照为 C0030.1.1,阴性对照为 C0030.1.1 受体。

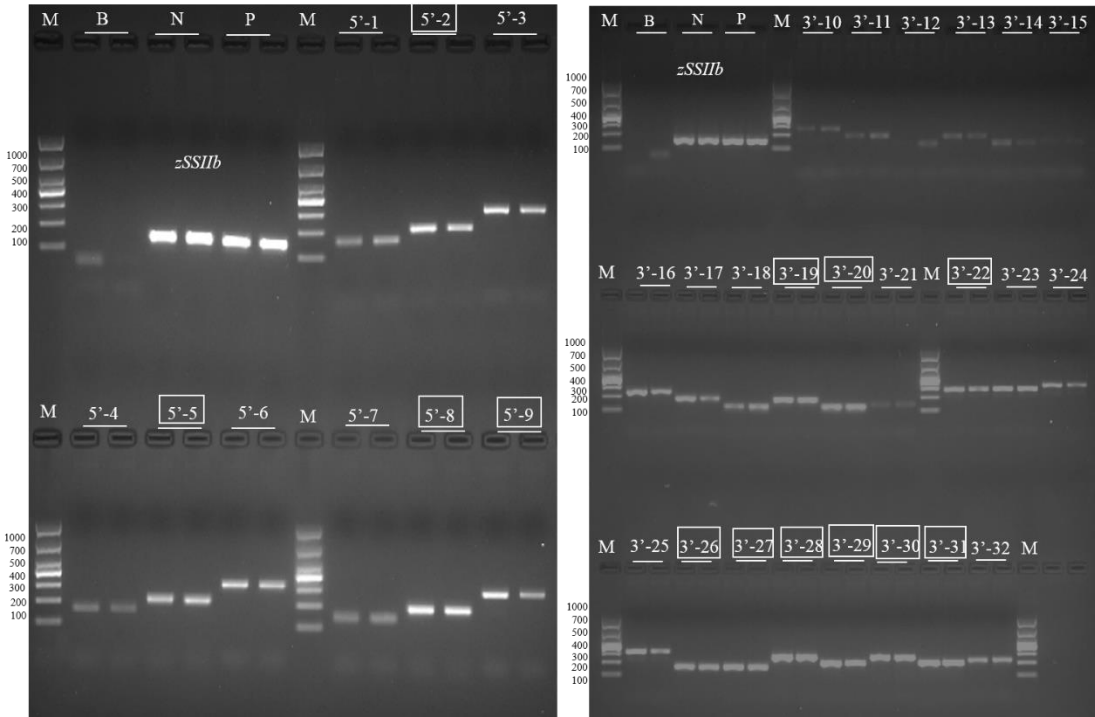
2 结 果

2.1 抗虫耐除草剂玉米 C0030.1.1 转化体特异性引物筛选

对 32 对引物进行 PCR 扩增,以筛选出重复性好、扩增条带清晰的作为方法建立的候选引物。结果表明,引物组合 5'-2、5'-5、5'-8、5'-9、3'-19、3'-20、3'-22、3'-26、3'-27、3'-28、3'-29、3'-30、3'-31 条带清晰,无引物二聚体,具有很好的扩增效率,符合《转基因植物及其产品成分检测定性 PCR 方法制定指南》的要求<sup>[8]</sup>(见图 1)。

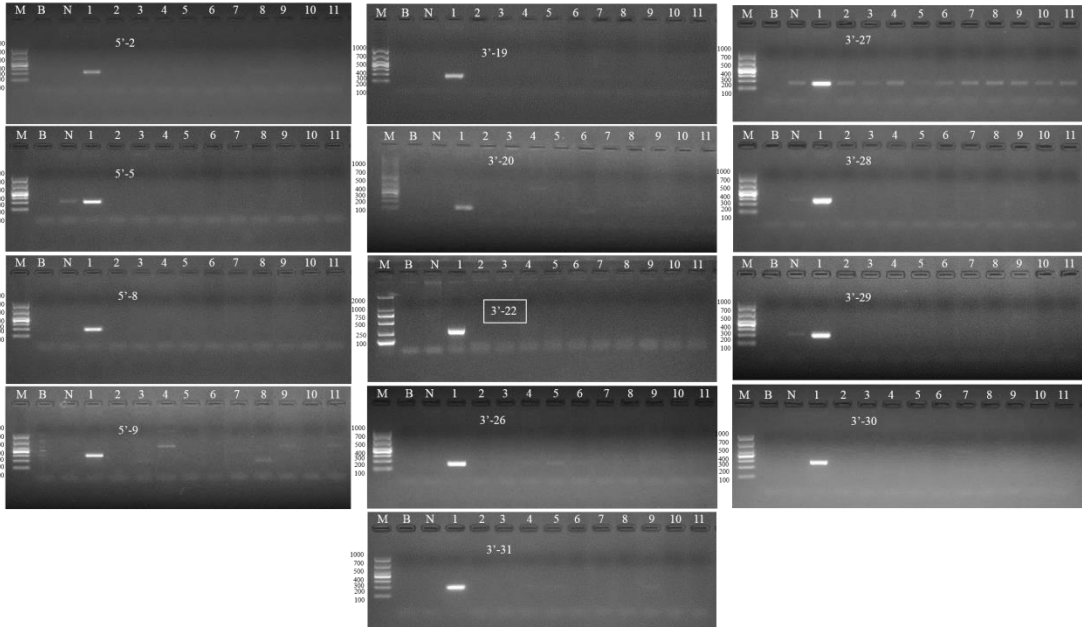
2.2 特异性测试

对 2.1 中获得的引物进行特异性进一步测试表明,引物组合 5'-2、5'-5、5'-8、5'-9、3'-19、3'-20、3'-26、3'-27、3'-28、3'-29 不仅在 C0030.1.1 中扩增出目的条带,在其他转基因或非转基因样品中也出现非特异性扩增,舍弃;引物组合 3'-30、3'-31 仅在转基因玉米 C0030.1.1 中有条带,但是



注:M为DL1000分子量标准;B为空白对照;N为阴性对照;P为1%的C0030.1.1

图1 引物组合筛选



注:M为DL1000或DL2000分子量标准;B为空白对照;N为阴性对照;1为1% C0030.1.1;2为非转基因大豆;3为其他非转基因玉米;4为非转基因棉花;5为非转基因水稻;6为非转基因苜蓿;7为转基因大豆混合样;8为其他转基因玉米混合样;9为转基因棉花混合样;10为转基因水稻混合样;11为转基因油菜混合样

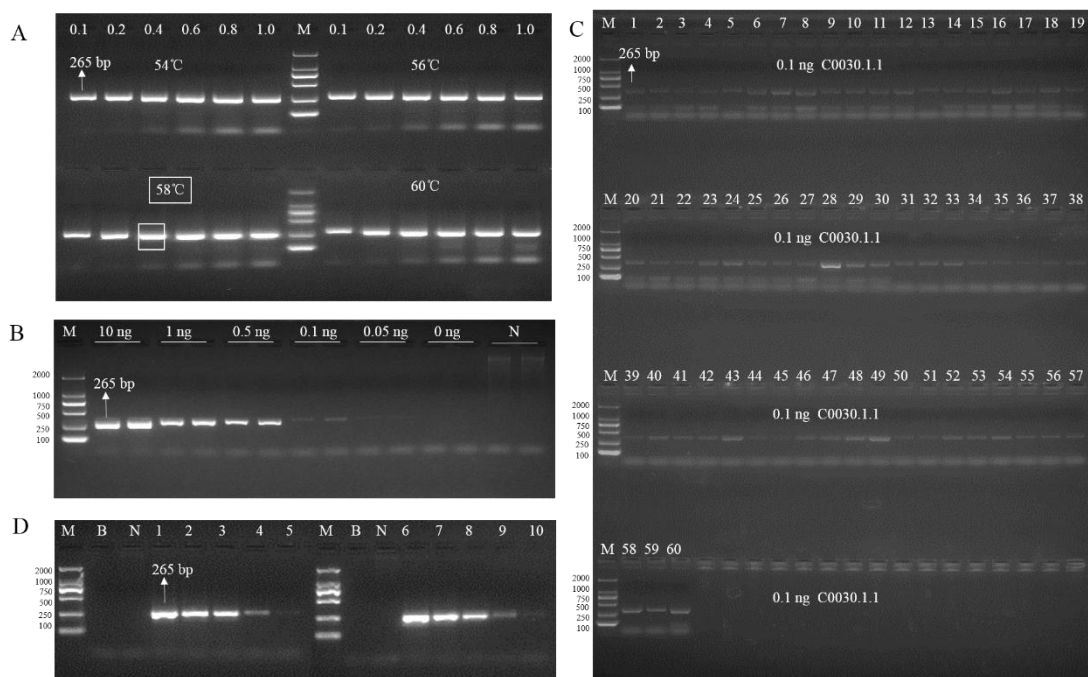
图2 引物组合的特异性扩增筛选

条带较弱,舍弃;只有引物组合3'-22仅从抗虫耐除草剂玉米C0030.1.1中扩增到265 bp大小的预期DNA片段,扩增条带清晰,而在其他样品中均未扩增到预期片段(图2),可以满足试验要求,所以选择引物组合3'-22进行下一步灵敏度测试。

2.3 引物浓度和退火温度测试

对引物组合3'-22进行退火温度和引物浓度

测试。结果显示,在不同温度下,扩增效率并没有明显差异,在引物浓度为0.1、0.2、0.4 μmol/L时引物二聚体不明显,随着引物浓度增加,引物二聚体较明显。综合考虑特异性和扩增效率,兼顾内标准基因的反应程序,确定退火温度为58℃,引物浓度为0.4 μmol/L,此时特异性条带清晰,引物二聚体较少(图3A)。



注: M 为 DL2000 分子量标准; B 为空白对照; N 为阴性对照。A 为退火温度和引物浓度测试, 引物浓度分别为 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0  $\mu\text{mol/L}$ , 退火温度分别为 54  $^{\circ}\text{C}$ 、56  $^{\circ}\text{C}$ 、58  $^{\circ}\text{C}$  和 60  $^{\circ}\text{C}$ ; B 为灵敏度测试, 测试样品含量分别为 10、1、0.5、0.1、0.05、0 ng; C 为检出限测定, 含量为 0.1 ng 的 DNA 进行 60 次测试; D 为再现性测试, 含量分别为 1, 6:10 ng; 2, 7:1 ng; 3, 8:0.5 ng; 4, 9:0.1 ng; 5, 10:0.05 ng

图3 引物组合 3'-22 的引物浓度和退火温度、灵敏度、检出限和再现性测试

## 2.4 灵敏度测试

为了进一步测试引物组合扩增低含量样品的能力, 对设置的 6 个浓度样品进行 PCR 扩增, 由图 3B 看出, 随着体系中 DNA 含量降低, 扩增效果随之降低, 但在含量大于等于 0.1 ng 的样品中可获得稳定的预期扩增, 表明在 PCR 反应体系中加入 100 ng DNA 模板时, 本方法的灵敏度为 0.1%。

## 2.5 检出限测试

图 3C 结果表明, 60 个平行均能获得预期扩增产物, 本方法的检出限为 0.1 ng, 在 PCR 反应体系中加入 100 ng DNA 模板时, 本方法的检出限为 0.1%。

## 2.6 再现性测试

两位试验人员在含量 0.1 ng 及以上的样品中均能扩增到 265 bp 的目的条带, 且全部测试样品的测试结果一致, 表明方法具有很好的再现性 (图 3D), 将扩增获得的 PCR 产物回收测序验证, 测序结果和研发公司提供的序列比对一致。通过一系列测试, 证明筛选出的引物组合 3'-22 能特异性检测出抗虫耐除草剂玉米 C0030.1.1, 将此引物作为标准化方法的引物, 命名为 C0030.1.1-F、C0030.1.1-R。

综合以上, 反应体系设置为: 10 $\times$ PCR 缓冲液总体积 2.5  $\mu\text{L}$ , 25 mmol/L 氯化镁溶液 1.5  $\mu\text{L}$ , dNTPs 混合液 (2.5 mmol/L) 2  $\mu\text{L}$ , 上下游引物终浓度

为 0.4  $\mu\text{mol/L}$ , Taq DNA 聚合酶终浓度 0.025 U/ $\mu\text{L}$ , 50 mg/L DNA 模板加 2  $\mu\text{L}$ 。反应程序为 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 共进行 35 次循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min, 10  $^{\circ}\text{C}$  保存。

## 2.7 循环验证

8 家循环验证结果显示, 在特异性检测中, 本方法仅从含有 C0030.1.1 玉米的样品中扩增到预期 DNA 条带, 在其他转基因玉米、大豆、油菜、水稻、棉花和非转基因阴性对照中未扩增到预期片段; 在灵敏度测试中, 此方法从大于等于 0.1% 的 C0030.1.1 玉米样品中稳定扩增出预期产物 (见表 5)。经过 8 家实验室验证, 本研究建立的 C0030.1.1 玉米特异性定性 PCR 检测方法可以特异性的将 C0030.1.1 玉米与其他转基因玉米、大豆、油菜、棉花区分开, 具有高度的特异性, 方法检出限可达到 0.1%, 8 家验证单位的多次重复试验均获得一致性结果, 表明方法具有很好的再现性, 且引物浓度和反应程序比较理想, 能够满足检测的需要。

## 3 讨论

转基因产品相继进入国际市场, 其安全性问题引起全世界的广泛关注和高度重视, 许多国家也因此建立了转基因法律法规和标签政策来保证

表5 8家单位验证结果汇总表

| 样品名称 / 编号          | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|--------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 阳性对照               | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 阴性对照               | - | - | - | - | - | - | - | - |
| C0030.1.1 玉米(1%)   | + | + | + | + | + | + | + | + |
| ZZM030 玉米(1%)      | - | - | - | - | - | - | - | - |
| C0010.2.2 玉米(1%)   | - | - | - | - | - | - | - | - |
| C0030.2.3 玉米(1%)   | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 其他转基因玉米混合样         | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 转基因大豆混合样           | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 转基因水稻混合样           | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 转基因油菜混合样           | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 转基因棉花混合样           | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 非转基因玉米混合样          | - | - | - | - | - | - | - | - |
| C0030.1.1 玉米(0.1%) | + | + | + | + | + | + | + | + |

注：“+”表示阳性结果，“-”表示阴性结果，1~8 表示 8 家检测机构

市场上转基因产品的可追溯性以及消费者的知情权<sup>[9-10]</sup>,我国政府对转基因安全性问题也非常重视,制定了相应的法律法规,同时对转基因产品实行按目录定性强制标识制度<sup>[10-11]</sup>,转基因检测技术是生物安全评价的关键技术<sup>[12]</sup>,因此制定本转基因的标准化检测方法有其必要性。目前转基因产品成分检测技术主要分为两类,一类是基于外源核酸的检测技术,基于外源核酸的检测技术准确性高、特异性强、灵敏度高、稳定性好、操作简便、成本低,目前应用较广泛<sup>[13-15]</sup>,包括等温扩增技术、定性 PCR 技术、定量 PCR 技术<sup>[16]</sup>、多重 PCR 技术<sup>[17]</sup>、数字 PCR 技术<sup>[18]</sup>、基因芯片技术等;另一类是基于外源蛋白的检测技术,如酶联免疫吸附技术、Western blot 检测技术和试纸条技术<sup>[12]</sup>。目前国际上有关转基因产品的检测方法中以 PCR 检测方法应用最广<sup>[10]</sup>。

4 结 论

在本试验中主要采用了定性 PCR 方法。首先通过软件设计了一系列引物,通过试验筛选得到能检测出目的条带的特异性良好的引物,正向引物命名为 C0030.1.1-F: 5'-ACTAAAATCCAGATCCCCGAATTA-3',反向引物命名为 C0030.1.1-R: 5'-ACAGTACAGATCCGTGAGAAAGAAGA-3',扩增条带大小为 265 bp,其次进一步测试表明灵敏度和检出限均可达到 0.1%,通过 8 家机构循环验证,仅从 C0030.1.1 中扩增获得特异性条带,其他样品中均未扩增出此条带,检出限可稳定达到 0.1%,说明本实验设计的引物符合要求,能够满

足定性 PCR 检测的需要。  
该方法具有操作简单、成本低等优点,但是要实现准确定量,需要进一步建立转化体实时荧光 PCR 和数字 PCR 方法,同时也亟须开发田间快速试纸条检测方法。

参考文献:

[ 1 ] 展进涛,邓鹏程,谢 锐.中国转基因玉米生物技术创新及其产业化经济效应研究[J].农业经济问题,2017,38(10):18-26.

[ 2 ] 国际农业生物技术应用服务组织.2018 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势[J].中国生物工程杂志,2019,39(8):1-6.

[ 3 ] 朱鹏宇,黄昆仑,商 颖,等.全球复合性状转基因作物监管制度的比较分析[J].食品安全质量检测学报,2014,8(5):2538-2543.

[ 4 ] 柳晓丹,许文涛,黄昆仑,等.复合性状转基因植物安全性评价的研究进展[J].生物技术通报,2016,32(6):1-6.

[ 5 ] 王旭静,张 欣,刘培磊,等.复合性状转基因植物的应用现状与安全评价[J].中国生物工程杂志,2016,36(4):18-23.

[ 6 ] 温洪涛,李夏莹,杨 洋,等.玉米转基因成分筛查策略[J].生物技术通报,2020,36(5):14-22.

[ 7 ] 杨立桃,刘 信,张大兵,等.农业农村部 1861 号公告-3-2012 转基因植物及其产品成分检测玉米内标准基因定性 PCR 方法[S].北京:中国农业出版,2012.

[ 8 ] 李飞武,沈 平,李葱葱,等.农业农村部 2259 号公告-4-2015 转基因植物及其产品成分检测定性 PCR 方法制定指南[S].北京:中国农业出版社,2015.

[ 9 ] Marie-Alice F, Philippe H, Isabel T, et al. Current and New Approaches in GMO Detection: Challenges and Solutions [J]. BioMed Research International, 2015, 4(1): 1-22.

[ 10 ] 李葱葱,王青山,李飞武,等.用实时荧光 PCR 方法定量检测 Bt176 转基因玉米[J].吉林农业科学,2007,32(5):24-27.

(下转第 63 页)

胞器构成清晰可辨、结构完整、排列均匀有序。但随着处理的  $\text{HgCl}_2$  浓度的提升,花生幼苗茎叶细胞内各细胞器都呈现出明显的损伤,但耐受性略有不同。在  $\text{HgCl}_2$  浓度为  $10\ \mu\text{mol/L}$  时,各细胞器结构表现正常; $100\ \mu\text{mol/L}$  时,除花生幼苗茎细胞核表现正常外,叶细胞核、茎叶的叶绿体和线粒体都开始出现异常。高于  $100\ \mu\text{mol/L}$  时,膜结构开始破坏,细胞质清晰度下降,细胞核的核质界限模糊、核内物质趋于无序状态;叶绿体的膜结构出现不同程度损伤,基质出现淀粉粒,位于叶绿体中的类囊体基粒和片层扭曲;线粒体嵴随着  $\text{HgCl}_2$  浓度的增加,排列逐渐混乱,膜结构破坏,线粒体基质也扩散到线粒体外。

$\text{HgCl}_2$  对花生幼苗茎、叶细胞的细胞核、线粒体、叶绿体等细胞器造成不可逆性的损伤,汞胁迫对于细胞整体的膜结构系统破坏较为明显,导致细胞层面上各个结构及生理生化的失衡及紊乱,影响到细胞正常的生命活动,从而影响到整个花生植株的生长,重则导致花生植株死亡。

#### 参考文献:

- [1] 厉广辉,王兴军,石 素,等.我国鲜食花生研究现状及展望[J].中国油料作物学报,2018,40(4):604-607.
- [2] 栾天浩,翟 季,孙祎龙,等.密度与氮、磷、钾用量对花生吉花1号产量的影响[J].东北农业科学,2017,42(4):23-26.
- [3] 吕建伟,胡廷会,成良强,等.高油酸花生遗传选育的研究进展[J].贵州农业科学,2019,47(11):10-17.
- [4] 刘海龙,周玉萍,王绍伦,等.高油花生新品种吉花20选育报告[J].东北农业科学,2018,43(5):11-12.
- [5] 王义超.硅对镉和汞胁迫下大蒜生理生化代谢的影响及机理研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2014.
- [6] 杜建雄,李剑峰,张淑卿,等.汞胁迫对4个草坪草品种幼苗生理特性及养分积累的影响[J].西南农业学报,2019,32(8):1767-1772.
- [7] 徐小蓉,周 敏,时艳龙,等.汞胁迫对辣椒种子萌发和幼苗生长的影响[J].安徽农业科学,2008,36(2):420-422.
- [8] 李春龙.汞胁迫对萝卜种子萌发、幼苗根际土壤酶活性及土壤微生物的影响[J].江苏农业科学,2018,46(7):142-144.
- [9] 孙永娣,巢建国,谷 巍,等.汞胁迫对茅苍术光合特性及生理指标的影响[J].南方农业学报,2018,49(3):448-453.
- [10] 齐文靖,于 晗,张佳慧,等.不同重金属胁迫对绿豆种子萌发和幼苗部分生理指标的影响[J].北方园艺,2018(21):1-5.
- [11] 王学奎.植物生理生化实验原理和技术[M].北京:高等教育出版社,2006:134-136.
- (责任编辑:刘洪霞)
- =====
- (上接第54页)
- [11] 徐琳杰,刘培磊,李文龙,等.国际转基因标识制度变动趋势分析及对我国的启示[J].中国生物工程杂志,2018,38(9):94-98.
- [12] 金永梅,马 瑞,于志晶,等.转基因水稻吉生梗2号的外源基因旁侧序列分离及事件特异性PCR检测方法[J].东北农业科学,2016,41(1):14-19.
- [13] 王颢潜,陈 锐,李夏莹,等.转基因产品成分检测技术研究进展[J].生物技术通报,2018,34(3):31-38.
- [14] 易小平,贺萍萍,夏启玉,等.定性PCR方法检测转基因玉米MON810转化事件的研究[J].热带作物学报,2014,35(12):2384-2390.
- [15] 李葱葱,谢 苹,董立明,等.抗虫耐除草剂玉米GH5112E-117C定性PCR检测方法[J].生物技术通报,2020,36(5):1-5.
- [16] 辛 艳,刘 何,常雪艳,等.农作物种子转基因成分实时荧光PCR盲检技术要点与应用[J].天津农林科技,2018(1):35-38.
- [17] Nelly D, Tamara K, Inga G, et al. New multiplex PCR methods for rapid screening of genetically modified organisms in foods [J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 1-8.
- [18] 王 永,兰青阔,赵 新,等.数字PCR在转基因水稻拷贝数鉴定中的应用[J].生物技术通报,2018,34(3):53-58.
- (责任编辑:刘洪霞)