

转基因抗虫棉花重组 DNA 在土壤中分布的实时定量 PCR 分析

李 刚^{1,2}, 修伟明^{1,2}, 赵建宁^{1,2}, 王丽娟³, 王 慧^{1,2}, 刘红梅^{1,2}, 宋晓龙^{1,2}, 杨殿林^{1,2*}

(1.农业部环境保护科研监测所,农业部转基因生物生态环境安全监督检验测试中心,天津 300191;2.中国农业科学院武清转基因生物农田生态系统影响野外科学观测试验站,天津 301701;3.内蒙古师范大学生命科学与技术学院,呼和浩特 010022)

摘 要:根据转基因抗虫棉花 35S 启动子与 *CryIA(c)* 基因以及 35S 启动子与 *npt II* 基因之间的构建特异性序列分别设计引物和探针,建立荧光定量 PCR 检测方法,并对采集于 3 个生长期(播种后 40、50 d 和 60 d)的不同根区(根表、根际和非根际)土壤中 35S-*CryIA* 和 35S-*npt II* 片段进行定量分析。结果表明,所建立的荧光定量 PCR 方法最低能够检测到 10 个拷贝数的外源重组 DNA 片段,定量标准曲线相关系数均达到 0.998 以上,具有很好的重复性。实时定量 PCR 分析表明,同一生长期不同根区土壤中 35S-*CryIA* 和 35S-*npt II* 片段拷贝数变化情况均为根表土>根际土>非根际土,即转基因抗虫棉花重组 DNA 片段主要分布于根表土壤中,其次为根际土壤和非根际土壤。在 60 d 生长期,土壤中 35S-*CryIA* 和 35S-*npt II* 片段的拷贝数随生长时期的推进均呈现上升趋势,其分布范围逐渐扩大。土壤中 35S-*npt II* 片段拷贝数均高于同一生长期相应根区中 35S-*CryIA* 片段的拷贝数。转基因抗虫棉花对环境可能存在潜在影响。

关键词:转基因抗虫棉花;重组 DNA;实时定量 PCR;根盒法;分布

中图分类号:X53 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2012)10-1933-08

Real Time PCR Assays for the Distribution of Recombinant DNA of a Transgenic Insect-resistant Cotton in Soil

LI Gang^{1,2}, XIU Wei-ming^{1,2}, ZHAO Jian-ning^{1,2}, WANG Li-juan³, WANG Hui^{1,2}, LIU Hong-mei^{1,2}, SONG Xiao-long^{1,2}, YANG Dian-lin^{1,2*}

(1. Agro-Environmental Protection Institute, Eco-safety Supervision, Inspection and Testing Center of Genetically Modified Organisms, Ministry of Agriculture, Tianjin 300191, China; 2. Scientific Observing and Experimental Station of Agro-Ecosystem of Genetically Modified Organisms, Wuqing, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Tianjin 301701, China; 3. College of Life Science and Technology, Inner Mongolia Normal University, Hohhot 010022, China)

Abstract: During the growth process, genetically modified crops continuously release recombinant DNA to the soil environment. The uptake and integration of the recombinant DNA by soil microorganisms will alter the structure and function of the soil microbial community, and may cause long-term perturbation of the soil ecological system. Our objective is to establish quantitative PCR detection method to explore the distribution of the exogenous recombinant DNA in soil environment, to enrich the research contents of the environmental risks of transgenic insect-resistant cotton, and to provide important technical support for the scientific evaluation of ecological security of transgenic insect-resistant cotton. Primers and Taqman probes were designed according to the construct-specific sequences between 35S promoter and *CryIA(c)* gene and between 35S promoter and *npt II* gene respectively. The standard curves were prepared based on the linear relationship between the amount of input pGEMT-easy plasmid containing the construct-specific sequences(x) and cycle threshold(y) in 10-fold dilution mode. Three-room rhizobox method was used to collect the soil samples from different root zones of transgenic insect-resistant cotton. Total soil DNA was extracted by the PowerSoil DNA Isolation Kit. The quantity of exogenous recombinant DNA in soil samples was detected by the real time PCR method. The results showed that the established method could at least detect 10 copies of the recombinant DNA fragments, and the

收稿日期:2012-04-16

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08012-005, 2011ZX08011-002);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(农业部环境保护科研监测所)

作者简介:李 刚(1981—),男,辽宁辽阳人,硕士,助理研究员,主要从事转基因植物生态环境安全研究。E-mail:gangli1981@gmail.com

* 通信作者:杨殿林 E-mail:dlyang@caas.net.cn

correlation coefficients were above 0.998 with good repeatability. All the copy number of 35S-Cry1A and 35S-npt II fragments at the three growth stages showed the trend as follows: rhizoplane>rhizosphere>non-rhizosphere, which indicated that recombinant DNA fragments concentrated in the rhizoplane soil, followed by the rhizosphere soil and non-rhizosphere soil. During the 60 d growth period, the copy number of the 35S-Cry1A and 35S-npt II fragments increased with the growing stages, and the distribution areas gradually expanded. The copy number of 35S-npt II fragment was higher than 35S-Cry1A fragment in the same growth stage and in the corresponding root zone. Transgenic insect-resistant cotton may have potential impact on the environment.

Keywords: transgenic insect-resistant cotton; recombinant DNA; real time PCR; rhizobox method; distribution

国际农业生物技术应用服务组织 (ISAAA) 公布的最新数据表明,到 2011 年,全球转基因作物的播种面积将达到 1.6 亿 hm^2 ,种植面积增长近 94 倍,种植转基因作物的国家从最初的 6 个将增加到 29 个^[1]。随着转基因作物的大面积推广和种植,农业生产方式产生了巨大变革,经济效益得到大幅度提高,但与此同时,转基因作物对生态环境的潜在安全风险引起了国际上的广泛关注^[2]。

目前研究发现转基因作物释放的外源重组 DNA 可能对生态系统造成潜在的影响,特别是土壤生态环境^[3]。转基因作物所转入的外源基因(如 *Bt* 基因、*ep-sps* 基因和 *npt II* 基因)与微生物所携带的相关基因具有近缘关系,它们可通过植物根系分泌物、花粉、残体等方式释放到土壤环境中^[4-5],并可能被具有自然感受能力的微生物通过同源重组方式整合到基因组中,尤其是抗性筛选标记基因片段,这种基因水平转移很可能造成微生物群体结构和功能的改变,甚至造成生态环境的改变,其生态安全性已经引起科学界的广泛关注^[6-10]。

转基因抗虫棉花是我国种植面积最广的转基因作物,2011 年种植面积达到 390 万 hm^2 ,占棉花总种植面积的 71.5%。我国所种植的转基因抗虫棉花是通过导入外源抗虫基因(*Bt* 基因等),并以 *npt II* 基因作为抗性筛选标记基因而选育的^[11]。随着转基因抗虫棉花的大面积环境释放,其环境风险日益受到人们的重视。目前已开展大量关于转基因抗虫棉花环境风险性的研究,主要在对农田非靶标害虫、天敌及其他种类昆虫的影响^[12],对土壤微生物多样性的影响^[13-14],外源蛋白的残留情况及动态变化^[15-19],向叶围微生物的基因转移^[11]及基因扩散^[20]等方面,但对土壤环境中转基因抗虫棉花重组 DNA 的分布与动态变化缺乏研究。

本研究针对转基因抗虫棉花中与苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白基因和新霉素磷酸转移酶基因具有近缘关系的 *CryIA(c)* 和 *npt II* 基因,根据其构建特异

性序列设计引物和探针,建立荧光定量 PCR 方法,并结合根盒法对 3 个生长时期不同根区土壤中 35S-Cry1A 和 35S-npt II 片段进行定量分析,首次对转基因抗虫棉花重组 DNA 在土壤中的时空分布变化进行探索,丰富转基因抗虫棉花环境风险研究内容,为科学评价转基因抗虫棉花的生态安全性提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 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 $5.72 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

1.2 根盒设计

试验中用于种植棉花的 3 室根盒由非透明有机玻璃加工制成,长 13 cm、宽 8 cm、高 12 cm,植物生长室宽度为 3 cm,2 个土壤室宽度均为 5 cm。植物生长室和 2 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)。播种前将取自试验站的新鲜土壤自然风干,过 1 mm 筛后装入各根室,每盒装土 1.2 kg。

1.3 试验设计及土壤样品采集

试验在网室内进行,于 2010 年 5 月 30 日播种,共 12 盒,每盒播种 3 粒,待出苗后定苗至 1 株。播种后第 10 d 以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 KH_2PO_4 混合液体的形式施一次肥,施氮 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、磷 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、钾 $188 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,日常管理过程中不喷洒农药,用称重法补充水分,使土壤含水量保持在 17% 左右。液体肥料与水均添加至植物生长室中。

于棉花 3 个生长期(播种后 40、50 d 和 60 d)采

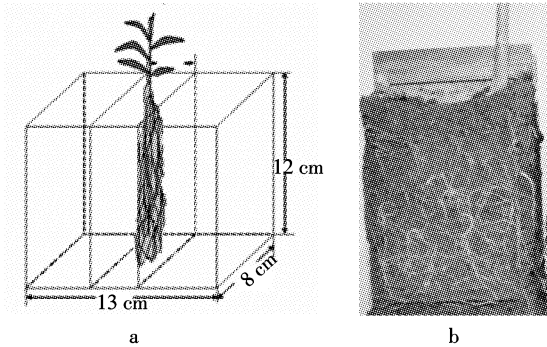


图 1 3 室根盒结构示意图(a)和根表轮廓示意图(b)
Figure 1 Diagram of the three-room rhizobox (a) and root surface profile(b)

集土壤样品,每个时期各取 4 盒。取样时,小心地拆除根盒中的各层有机玻璃板,轻轻分开植物生长室中棉花根系和土壤,将植物生长室中所得全部土壤混匀即得根表土^[21],用 GB 表示;准确量取 4 mm 距离,用灭菌刀片刮取两侧土壤室紧贴尼龙网一侧 4 mm 范围内全部土壤混匀后作为根际土^[22-23],用 GJ 表示,4 mm 区域外的全部土壤混匀后作为非根际土^[24],用 FGJ 表示。从每个已混匀的土壤样品中再分别称取 6 份重量为 0.25 g 土壤用于总 DNA 提取。

1.4 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 Wizard® Genomic DNA Purification Kit(Promega, USA)按照操作说明提取棉花基因组 DNA。

采用 PowerSoil® DNA Isolation Kit(Mo Bio Laboratories, Solana Beach, CA, USA)按照操作说明提取土

壤总 DNA。最后用 50 μL Nuclease-Free Water 洗脱获得土壤总 DNA 溶液。

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。

1.5 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 *npt II* 基因之间的构建特异性序列设计引物(表 1)。

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 2)。

1.6 质粒分子样品设置

将所获得的 35S 启动子与 *CryIA(c)* 基因以及 35S 启动子与 *npt II* 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^[25]。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 3291 bp (35S-*CryIA*)和 3490 bp(35S-*npt II*)计算得到每个阳性质粒的质量分别为 $6.88\times10^{-18}\text{ g}\cdot\text{分子}^{-1}$ 和 $7.30\times10^{-18}\text{ g}\cdot\text{分子}^{-1}$,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)分别稀释至 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 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。

1.7 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:

表 1 质粒标准分子构建用引物

Table 1 Primers for building plasmid standard molecular

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

表 2 实时荧光定量 PCR 用引物和探针序列

Table 2 Primers and probes for real time quantitative PCR

引物/探针	引物序列(5'至3')	靶定目标	片段大小/bp
35S-Cry1A-1F	CATTCTTGATGTTTGGGTTGTTG	35S 启动子与 <i>CryIA(c)</i> 基因	109
35S-Cry1A-1R	TCGCAAGACCTTCCTCTATATAAG		
35S-Cry1A-P	FAM-AGTCAGCTTGTCAGCGTGTCTCTCCAA-BHQ1		
35S-NPT-1F	TCCTTCGCAAGACCTTCCTC	35S 启动子与 <i>npt II</i> 基因	210
35S-NPT-1R	AGCAGCCGATTGCTGTGTGTG		
35S-NPT-P	HEX-CCAGTCATAGCCGAATAGCCTCTCCACC-BHQ1		

1×Premix Ex Taq™(Perfect Real Time)Buffer(Takara), 200 nmol·L⁻¹ 每种引物, 400 nmol·L⁻¹ TaqMan Probe, 1×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×Premix Ex Taq™(Perfect Real Time) Buffer (Takara), 200 nmol·L⁻¹ 每种引物, 400 nmol·L⁻¹ TaqMan Probe, 1×ROX reference dye II (Takara), 20 ng·μL⁻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 ℃, 30 s; 95 ℃, 5 s; 60 ℃, 30 s (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用 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:

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

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

2 结果与分析

2.1 定量标准曲线的构建与重复性分析

由图 2 可见, C_t 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 C_t 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-npt II 质粒标准分子拷贝数与 C_t 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%。

对 35S-Cry1A 和 35S-npt II 质粒标准分子进行重复性测试, 结果见表 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。

2.2 转基因抗虫棉花 35S-Cry1A 片段在土壤中的定量分析

从图 3 可见, 3 个生长期 (第 40、50 d 和 60 d) 根表土壤中检测到 35S-Cry1A 片段的样品数目分别为 5、6 个和 6 个, 根际土壤中检测到 35S-Cry1A 片段的样品数目分别为 2、4 个和 5 个, 非根际土壤中检测到

35S-Cry1A 片段的样品数目分别为 1、3 个和 5 个。定量分析结果表明, 3 个生长期土壤样品中 35S-Cry1A 片段的拷贝数变化情况均为根表土>根际土>非根际土, 各根区土壤样品中 35S-Cry1A 片段的拷贝数随生长时期的推进均呈现上升趋势。各个时期采集的根表土壤样品中 35S-Cry1A 片段的拷贝数均显著高于相应时期的根际和非根际土壤样品 ($P < 0.05$), 根际和非根际土壤样品之间差异不显著。第 50 d 和 60 d 根表土壤样品中 35S-Cry1A 片段的拷贝数之间差异不显著, 但均显著高于第 40 d ($P < 0.05$)。3 个生长期的根际土壤样品中 35S-Cry1A 片段的拷贝数之间没有显著差异。非根际土壤样品中 35S-Cry1A 片段的拷贝数之间差异不显著。

35S-Cry1A 片段在土壤中主要分布在根表土壤中, 其次为根际土壤中, 非根际土壤中最少, 在试验所设置的生长期其分布范围随棉花生长期的推进而不断扩大。各根区土壤样品中 35S-Cry1A 片段的拷贝数随棉花生长期的推进均呈现上升趋势, 说明随生长期的推进, 转基因抗虫棉花代谢增强, 根系分泌物和根表组织细胞脱落等增加, 其释放到土壤环境中的重组 DNA 的数量也相应增加。各生长时期在根表土壤样品中检测到 35S-Cry1A 片段的样品数量和拷贝数均高于根际和非根际土壤样品, 说明 35S-Cry1A 片段首先吸附到根表土壤或游离于根表土壤环境中, 在水分等液体的添加所产生的驱动力作用下部分重组 DNA 片段穿过尼龙网向根际和根表土壤迁移, 同时造成此结果的原因很可能是由于采集的根表土壤样品中含有棉花根系组织所造成。

2.3 转基因抗虫棉花 35S-nptII 片段在土壤中的定量分析

从图 4 可见, 3 个生长期 (第 40、50 d 和 60 d) 根表土壤中检测 35S-npt II 片段的样品数目分别为 5、6 个和 6 个, 根际土壤中检测到 35S-npt II 片段的样品数目分别为 2、4 个和 6 个, 非根际土壤中检测到 35S-npt II 片段的样品数目分别为 3、3 个和 4 个。定量分析结果表明, 与 35S-Cry1A 片段在土壤环境中的变化趋势相同, 3 个生长期的土壤样品中 35S-npt II 片段的拷贝数变化情况均为根表土>根际土>非根际土, 根表、根际和非根际土壤中 35S-npt II 片段的拷贝数均呈现上升趋势。除第 40 d 根表土壤中 35S-npt II 片段的拷贝数与根际和非根际土壤差异不显著外, 其他 2 个时期的根表土壤中 35S-npt II 片段的拷贝数均显著高于根际和非根际土壤 ($P < 0.05$), 而根际和非根际土壤样

品中 35S-npt II 片段的拷贝数差异不显著。对比采自同一时期同一根区的土壤样品中 35S-npt II 片段拷贝数与 35S-Cry1A 片段拷贝数发现, 35S-npt II 片段拷贝数均大于 35S-Cry1A 的拷贝数。

35S-npt II 片段在土壤环境中的分布与 35S-Cry1A 片段具有相似的特点, 即主要分布在根表土壤中, 其次为根际土壤中, 非根际土壤中最少, 在试验所

设置的生长期其分布范围同样随棉花生长期的推进而不断扩大。各根区土壤样品中 35S-npt II 片段的拷贝数随棉花生长期的推进均呈现上升趋势, 这同样与棉花的生长代谢增强有关。各生长时期根表土壤样品中检测到的 35S-npt II 片段的拷贝数同样均高于相应的根际和非根际土壤 (其中第 50 d 和 60 d 达到显著差异), 说明转基因抗虫棉花向土壤环境中释放的

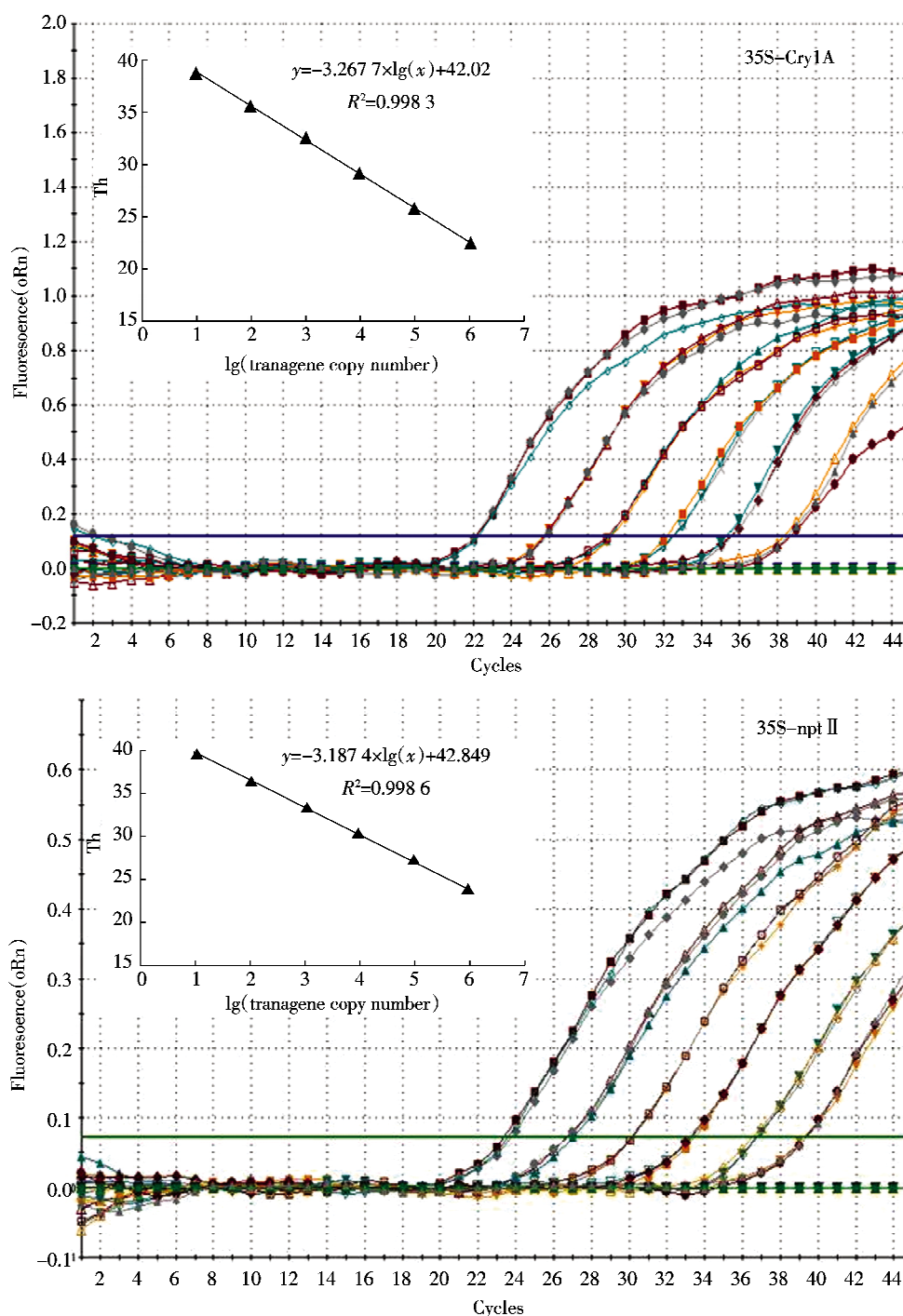


图2 质粒标准样品荧光扩增曲线和定量标准曲线

Figure 2 Fluorescent amplification curve of plasmid standard samples and quantitative standard curve

表 3 35S-Cry1A 与 35S-npt II 质粒标准分子的荧光定量 PCR 重复性分析

Table 3 Reproducibility of 35S-Cry1A and 35S-npt II plasmid molecules with qPCR assay

35S-Cry1A				35S-npt II			
拷贝数	Ct	SD	RSD/%	拷贝数	Ct	SD	RSD/%
Copy number				Copy number			
1 000 000	22.17	0.11	0.50	1 000 000	23.64	0.19	0.78
100 000	25.87	0.08	0.31	100 000	26.84	0.17	0.62
10 000	29.15	0.10	0.34	10 000	30.17	0.03	0.08
1000	32.41	0.21	0.64	1000	33.41	0.13	0.38
100	35.50	0.13	0.37	100	36.74	0.12	0.34
10	38.52	0.18	0.46	10	39.36	0.07	0.18

注:Ct 是 3 次重复试验所获得数值的平均值;SD 是标准偏差;RSD 是相对标准偏差。

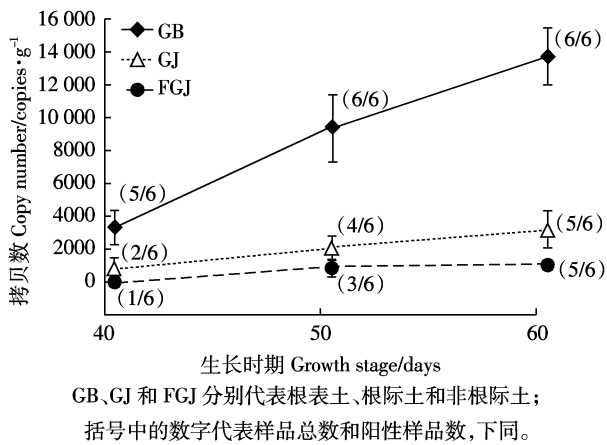


图 3 不同生长期转基因抗虫棉花 35S-Cry1A 片段在土壤中的定量分析

Figure 3 Quantitative analysis for the distribution of the 35S-Cry1A fragment in soil at different growth stage

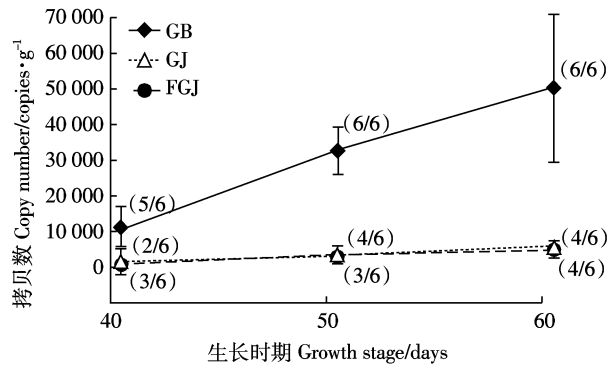


图 4 不同生长期转基因抗虫棉花 35S-npt II 片段在土壤中的定量分析

Figure 4 Quantitative analysis for the distribution of the 35S-npt II fragment in soil at different growth stage

35S-npt II 片段同样主要存于根表土壤,其分布范围的扩大受到液体驱动的影响,并与土壤样品中残留有植物根系组织有关。对比同一时期同一根区的土壤样品中 35S-npt II 片段拷贝数与 35S-Cry1A 片段拷贝数发现 35S-npt II 片段拷贝数均大于 35S-Cry1A 的拷贝数,可能与不同基因片段其自身性质如在转基因棉花中的拷贝数、分子片段大小、分子活性等各不相同,在土壤颗粒上吸附能力、在土壤中的迁移能力及被土壤 DNA 酶降解水平等不相同相关。

3 讨论

目前商业化种植的多种转基因作物所携带的外源基因(如抗虫、抗除草剂以及筛选标记基因等)均源于微生物,经过人工改造后通过表达载体导入植物受体。转基因植物在生长过程中向土壤释放重组 DNA,其丰富了土壤 DNA 库的种类^[4-5]。土壤中的 DNA 酶能够降解重组 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降解^[26-27]。Finkel 和 Kolter 研究认为转基因植物向土壤释放的重组 DNA 对于土壤微生物不仅是营养物质,而且是新的遗传物质^[28]。由于重组 DNA 与微生物所携带的基因具有近缘关系,一旦发生同源重组,微生物很可能获得新的遗传性状,这将对土壤生态环境造成影响,因此急需开展此方面的研究^[29]。

本实验室通过前期的研究发现,采用根据 *Bt* 基因和 *npt II* 基因序列设计引物进行 PCR,在种植转基因抗虫棉花和亲本非转基因棉花的土壤中均能够扩增得到相应的片段,通过克隆测序和序列比对,所获得的片段分别与苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白基因和新霉素磷酸转移酶基因具有同源性(结果未列出),说明土壤环境中存在含有 *Bt* 基因和 *npt II* 基因的土著微生物。为避免因假阳性产生,本研究根据已获得的重组 DNA 中的构建特异性序列设计引物和探针。荧光定量 PCR 方法是检测土壤中转基因植物重组 DNA 的高效方法,能够较为全面且直观地反映重组 DNA 在土壤中的分布和变化特点。如 Lerat 等采用荧光定量 PCR 法对土壤中转基因抗除草剂玉米和大豆的外源重组 DNA 含量进行检测^[30],Zhu 等采用荧光定量 PCR 法研究土壤中转基因抗虫玉米外源重组 DNA 的分布特点^[31]。本研究前期条件摸索过程中,以种植非转基因棉花的土壤为检测对象对所设计的引物和探针的特异性进行验证,未在种植亲本非转基因棉花的土壤中检测到重组 DNA,可以排除可能的土壤背景值

干扰(结果未列出),并且所建立的荧光定量 PCR 检测方法,检测下限达到 10 个拷贝数,具有很好的重复性。

本研究结合根盒法对 3 个生长时期不同根区土壤中 35S-Cry1A 和 35S-npt II 片段进行了定量分析,结果发现 35S-Cry1A 和 35S-npt II 片段均主要分布于根表土壤中,其次为根际土壤中,非根际土壤中最少,在试验所设置的生长期其分布的范围随着棉花生长期的推进也不断扩大。各根区土壤中 35S-Cry1A 和 35S-npt II 的数量均随生长期的推进而上升,这与 Lerat 等^[26]和 Zhu 等^[27]的研究结果一致,即在转基因作物生长的前期阶段,土壤中重组 DNA 的数量呈上升趋势。然而 Lerat 等^[30]和 Zhu 等^[31]进一步研究发现在作物生长的后期阶段,土壤中重组 DNA 的数量逐渐降低,由于本试验受到根盒装置生长空间的限制,未能对转基因抗虫棉花生长的后期阶段土壤中重组 DNA 的数量变化进行研究。各生长时期根表土壤中 35S-Cry1A 和 35S-npt II 片段拷贝数均明显高于根际和非根际土壤,这很可能是由于根表土壤样品中含有未降解的根系组织所造成。

通过对 35S-Cry1A 片段与 35S-npt II 片段拷贝数对比分析发现,同一时期采集的不同根区的土壤样品中 35S-npt II 片段拷贝数均高于相应根区中 35S-Cry1A 片段的拷贝数。康保珊等研究发现在同一品种的双价转基因抗虫棉(SGK321)中两个抗虫基因的拷贝数及整合位点不完全一致,串联在双价抗虫基因载体上的两个抗虫基因表达盒,很多情况下并不是作为一个整体整合进入植物基因组的,而是在整合之前就发生了断裂,继而分别进行整合^[32]。从这一研究结果可以推测在转基因抗虫棉 SGK321 中 *CryIAc* 基因与 *npt II* 基因的拷贝数是不相同的,这很可能直接导致土壤中这两种基因片段拷贝数的差异。Levy-Booth 等总结前人的研究时发现,不同的基因片段在土壤中的存留时间具有明显的差异,*npt II* 基因的半衰期显著长于 *cryIA(b)* 基因,这说明不同的基因片段其分子片段大小、分子活性不同,致使在土壤环境中的半衰期不同^[9]。同时 Pietramellara 等研究认为胞外 DNA 能够吸附在土壤中的活性颗粒物上,Saekid 等研究发现土壤中的腐植酸成分具有非常强的 DNA 吸附能力,说明土壤自身的结构特点也是造成不同基因片段半衰期差异显著的重要因素^[33-34]。本研究中 *CryIA(c)* 基因的片段较 *npt II* 基因片段大几千个碱基,致使其吸附在土壤颗粒上的能力低于 *npt II* 基因,自由的 *CryIA(c)* 分子更易为土壤 DNA 酶降解。综上认为转基因棉花

中的外源基因拷贝数、分子片段大小、分子活性等各不相同,在土壤颗粒上吸附能力、在土壤中的迁移能力及被土壤 DNA 酶降解程度等的不同造成土壤中 35S-Cry1A 片段与 35S-npt II 片段拷贝数差异明显,具体机制还有待进一步研究。

本研究以在我国大面积种植的转基因抗虫棉花为试验对象,成功建立土壤环境中转基因抗虫棉花重组 DNA 的荧光定量 PCR 检测方法,首次对重组 DNA 在土壤中的分布特点进行探索,丰富转基因抗虫棉花环境风险研究内容。但由于受到根盒装置生长空间所限,仅能研究短期内土壤样品中重组 DNA 的分布变化,在今后的研究中要结合大田试验,长期系统地研究重组 DNA 在自然环境条件下的动态变化、分布规律等,为转基因植物生态风险评价体系的建立提供理论依据。

4 结 论

本研究成功建立了土壤中转基因抗虫棉花重组 DNA 检测的荧光定量 PCR 方法,检测限达到 10 个拷贝数,定量标准曲线相关系数均达到了 0.998 以上,具有很好的重复性。

转基因抗虫棉花重组 DNA 片段集中分布于根表土壤中,其次为根际土壤和非根际土壤中。在 60 d 生长期,随着棉花生长期的推进,土壤中外源重组 DNA 片段的数量不断增加,分布范围逐渐扩大。土壤中 35S-npt II 片段拷贝数均高于同一生长期相应根区中 35S-Cry1A 片段的拷贝数,表明转基因抗虫棉花对环境可能存在潜在影响。

参考文献:

- [1] James C. Global status of commercialized biotech/GM crops[R]. ISAAA Brief No. 42, ISAAA: Ithaca, NY, 2011.
- [2] Wolt J D, Peterson R K D. Prospective formulation of environmental risk assessment: Probabilistic screening for *CryIA(b)* maize risk to aquatic insects[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2010, 73(6): 1182-1188.
- [3] Levy-Booth D J, Campbell R G, Gulden R H, et al. Cycling of extracellular DNA in the soil environment[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39(3): 2977-2991.
- [4] Ceccherini M T, Pote J, Kay E, et al. Degradation and transformability of DNA from transgenic leaves[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(1): 673-678.
- [5] de Vries J, Heine M, Harms K, et al. Spread of recombinant DNA by roots and pollen of transgenic potato plants, identified by highly specific biomonitoring using natural transformation of an *Acinetobacter* sp. [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(8): 4455-4462.
- [6] Marcus D, Alfred P, Werner S. Horizontal gene transfer as a biosafety issue: A natural phenomenon of public concern[J]. *Journal of Biotech-*

- nology, 1998, 64(1):75-90.
- [7] 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.
- [8] Miki B, McHugh S. Selectable marker genes in transgenic plants—applications, alternatives and biosafety[J]. *Journal of Biotechnology*, 2004, 107(3):193-232.
- [9] Weinert N, Meincke R, Schlöter M, et al. Effects of genetically modified plants on soil microorganisms[M] // Mitchell R, Gu J D. Environmental Microbiology, Second Edition. New Jersey: John Wiley and Sons press, 2010, 10:235-257.
- [10] 王 振, 邓 欣, 赵廷昌, 等. 转基因抗虫棉根际卡那霉素抗性细菌种群动态及 *npt II* 基因漂移检测 [J]. 中国农业科学, 2010, 43(21):4401-4408.
- WANG Zhen, DENG Xin, ZHAO Ting-chang, et al. Dynamics in kanamycin-resistant bacterial population and detection of *npt II* gene flow in the rhizosphere of insect-resistant Transgenic Cotton [J]. *Agricultural Science in China*, 2010, 43(21):4401-4408.
- [11] 邓 欣, 赵廷昌, 高必达. 转基因抗虫棉叶围卡那霉素抗性细菌种群动态及 *npt II* 基因漂移研究[J]. 中国农业科学, 2007, 40(11):2488-2494.
- DENG Xin, ZHAO Ting-chang, GAO Bi-da. Dynamics in kanamycin-resistant bacterial population and shift of *npt II* gene in the phyllosphere of insect-resistant transgenic cotton[J]. *Agricultural Science in China*, 2007, 40(11):2488-2494.
- [12] Han P, Niu C Y, Lei C L, et al. Quantification of toxins in a *CryIAC* + *CpTI* cotton cultivar and its potential effects on the honey bee *Apis mellifera* L.[J]. *Ecotoxicology*, 2010, 19(8):1452-1459.
- [13] 李永山, 范巧兰, 陈 耕, 等. 利用 PLFA 方法研究转 *Bt* 基因棉花对土壤微生物群落结构变化的影响[J]. 棉花学报, 2009, 21(6):503-507.
- LI Yong-shan, FAN Qiao-lan, CHEN Geng, et al. Soil microbial community structure change analysis of transgenic *Bt* cotton based on phospholipid fatty acid method[J]. *Cotton Science*, 2009, 21(6):503-507.
- [14] 叶 飞, 宋存江, 陶 剑, 等. 转基因棉花种植对根际土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. 应用生态学报, 2010, 21(2):386-390.
- YE Fei, SONG Cun-jiang, TAO Jian, et al. Effects of planting transgenic cotton on functional diversity of rhizosphere soil microbial community[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2010, 21(2):386-390.
- [15] Rui Y K, Yi G X, Guo J, et al. Transgenic cotton could safely be grown since *CpTI* toxin rapidly degrades in the rhizosphere soil[J]. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B*, 2007, 57(2):122-125.
- [16] Helassa N, Quiquampoix H, Noinville S, et al. Adsorption and desorption of monomeric *Bt*(*Bacillus thuringiensis*)*CryIAa* toxin on montmorillonite and kaolinite[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41(3):498-504.
- [17] Miethling-Graff R, Dockhorn S, Tebbe C C. Release of the recombinant *Cry 3Bb1* protein of *Bt* maize MON88017 into field soil and detection of effects on the diversity of rhizosphere bacteria[J]. *European Journal of Soil Biology*, 2010, 46(1):41-48.
- [18] Chen Z H, Chen L J, Zhang Y L, et al. Microbial properties, enzyme activities and the persistence of exogenous proteins in soil under consecutive cultivation of transgenic cottons (*Gossypium hirsutum* L.)[J]. *Plant Soil and Environment*, 2011, 57(2):67-74.
- [19] Chen Z H, Chen L J, Wu Z J. Relationships among persistence of *Bacillus thuringiensis* and Cowpea trypsin inhibitor proteins, microbial properties and enzymatic activities in rhizosphere soil after repeated cultivation with transgenic cotton[J]. *Applied Soil Ecology*, 2012, 53(1):23-30.
- [20] Heuberger S, Ellers-Kirk C, Tabashnik B E, et al. Pollen- and seed-mediated transgene flow in commercial cotton seed production fields[J]. *Plos One*, 2010, 5(11):e14128.
- [21] Li Y L, Fan X R, Shen Q R. The relationship between rhizosphere nitrification and nitrogen-use efficiency in rice plants[J]. *Plant, Cell and Environment*, 2008, 31(1):73-85.
- [22] Yang X E, Li H, Kirk G J D, et al. Room induced changes of potassium in the rhizosphere of lowland rice[J]. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 2005, 36(13-14):1947-1963.
- [23] Carrasco L, Caravaca F, Álvarez J R, et al. Microbial processes in the rhizosphere soil of a heavy metals contaminated Mediterranean salt marsh: A facilitating role of AM fungi[J]. *Chemosphere*, 2006, 64(1):104-111.
- [24] 石 英, 沈其荣, 菲泽圣, 等. 旱作水稻根际土壤铵态氮和硝态氮的时空变异[J]. 中国农业科学, 2002, 35(5):520-524.
- SHI Ying, SHEN Qi-rong, MAO Ze-sheng, et al. Time and horizontal spatial variations of NH_4^+-N and NO_3^--N of rhizospheric soil with rice cultivation on upland condition mulched with half-decomposed rice straw[J]. *Agricultural Science in China*, 2002, 35(5):520-524.
- [25] 李正国, 付晓红, 邓 伟, 等. 传统分离培养结合 DGGE 法检测榨菜腌制过程的细菌多样性[J]. 微生物学通报, 2009, 36:371-376.
- LI Zheng-guo, FU Xiao-hong, DENG Wei, et al. Analysis of bacterial diversity during the processing of *Brassica juncea* coss var. tsatsai by the culture-independent and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) methods[J]. *Microbiology China*, 2009, 36:371-376.
- [26] Crecchio C, Ruggiero P, Curci M, et al. Binding of DNA from *Bacillus subtilis* on montmorillonite-humic acids-aluminum or iron hydroxy-polymers[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2005, 69(3):834-841.
- [27] James C, Ellen C P, Caroline M J, et al. The adsorption of short single-stranded DNA oligomers to mineral surfaces[J]. *Chemosphere*, 2011, 83(11):1560-1567.
- [28] Finkel S E, Kolter R. DNA as a nutrient: Novel role for bacterial competence gene homologs[J]. *The Journal of Bacteriology*, 2001, 183(21):6288-6293.
- [29] Levy-Booth D J, Campbell R G, Gulden R H, et al. Real-time polymerase chain reaction monitoring of recombinant DNA entry into soil from decomposing Roundup Ready Leaf Biomass[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(15):6339-6347.
- [30] Lerat S, England L S, Vincent M L, et al. Real-time polymerase chain reaction quantification of the transgenes for Roundup Ready corn and Roundup Ready soybean in soil samples[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(5):1337-1342.
- [31] Zhu B, Ma B L, Blackshaw R E. Development of real time PCR assays for detection and quantification of transgene DNA of a *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) corn hybrid in soil samples[J]. *Transgenic Research*, 2010, 19(5):765-774.
- [32] 康保珊, 张 锐, 潘登奎, 等. 转基因双价抗虫棉中 *CryIAC* 基因与 *CpTI* 基因的共表达[J]. 棉花学报, 2005, 17(3):131-136.
- KANG Bao-shan, ZHANG Rui, PAN Cheng-qiu, et al. Synchronous expression of the *CryIAC* and *CpTI* genes in transgenic cotton[J]. *Cotton Science*, 2005, 17(3):131-136.
- [33] Pietramellara G, Ascher J, Borgogni F, et al. Extracellular DNA in soil and sediment: Fate and ecological relevance[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2009, 45:219-235.
- [34] Saeki K, Ihyo Y, Sakai M, et al. Strong adsorption of DNA molecules on humic acids[J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2011, 9:505-509.