

数字 PCR 和荧光定量 PCR 检测转基因番木瓜中外源基因拷贝数方法的建立及其应用

谢秀菊^{1,2}, 夏启玉^{1*}, 刘 帅⁴, 麦贤俊³, 贾瑞宗¹, 郭安平¹, 徐志胜²,
李 峰⁴, 孔祥义^{3**}, 赵 辉^{1**}

1. 中国热带农业科学院三亚研究院/中国热带农业科学院热带生物技术研究所/海南省南繁生物安全与分子育种重点实验室, 海南三亚 572024; 2. 南京农业大学, 江苏南京 210095; 3. 三亚市热带农业科学院, 海南三亚 572022; 4. 山东舜丰生物科技有限公司, 山东济南 250300

摘 要: 传统的检测转基因植物中外源基因拷贝数的方法是 Southern 杂交, 该方法成本高、周期长, 难以满足高通量检测外源基因拷贝数的育种需求, 因此, 本研究旨在建立快速且高通量检测转基因番木瓜中外源基因拷贝数的方法。本研究从番木瓜基因组中筛选出 2 个单拷贝基因 *Cpa03g018830* 和 *Cpa03g018770*, 以已知外源基因为单拷贝整合的转基因番木瓜为参照, 利用数字 PCR 鉴定其拷贝数, 进一步以其为内参基因, 以番木瓜转基因育种常用的筛选标记基因 *NPT II* 为外源目的基因, 建立利用数字 PCR 和荧光定量 PCR 技术检测转基因番木瓜中外源基因拷贝数的方法。结果表明: *Cpa03g018830* 和 *Cpa03g018770* 均为单拷贝基因; 建立的数字 PCR 方法对转基因番木瓜中的外源基因拷贝数的检测准确可靠, 而荧光定量 PCR 对转基因番木瓜中外源基因单低拷贝整合的检测准确度较高, 对外源基因多拷贝整合的检测准确度则较低, 因此, 荧光定量 PCR 适合用来在大量转基因植株中初筛出单低拷贝整合的植株。本研究鉴定的单拷贝基因 *Cpa03g018830* 和 *Cpa03g018770* 可作为转基因番木瓜中外源基因拷贝数检测的内参基因, 且建立的利用数字 PCR 和荧光定量 PCR 技术检测转基因番木瓜中外源基因拷贝数的方法, 操作简单, 速度快, 适合批量检测, 可为番木瓜转基因抗病育种中单低拷贝株系的选育提供新的方法。

关键词: 转基因番木瓜; 拷贝数; 内参基因; 数字 PCR; 荧光定量 PCR

中图分类号: S667.9 文献标志码: A

Establishment and Application of Digital PCR and Fluorescence Quantitative PCR for Detection of the Copy Numbers of Exogenous Gene in Transgenic Papaya

XIE Xiuju^{1,2}, XIA Qiyu^{1*}, LIU Shuai⁴, MAI Xianjun³, JIA Ruizong¹, GUO Anping¹, XU Zhisheng², LI Feng⁴,
KONG Xiangyi^{3**}, ZHAO Hui^{1**}

1. Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Hainan Key Laboratory for Biosafety Monitoring and Molecular Breeding in Off-Season Reproduction Regions, Sanya, Hainan 572024, China; 2. Nanjing Agricultural University, Jiangsu, Nanjing 210095, China; 3. Sanya Academy of Tropical Agriculture, Sanya, Hainan 572022, China; 4. Bellagen Biotechnology Co., Ltd., Jinan, Shandong 250300, China

收稿日期 2023-05-05; 修回日期 2023-08-30

基金项目 三亚市科技创新专项 (No. 2022KJCX21); 海南省重大科技计划项目“南繁育种区生物安全防控”(No. ZDKJ202002); 海南省院士创新平台资助项目。

作者简介 谢秀菊 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 果蔬遗传转化育种; *同等贡献作者: 夏启玉 (1983—), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 作物遗传育种。 **通信作者 (Corresponding author): 赵 辉 (ZHAO Hui), E-mail: zhaohui@itbb.org.cn; 孔祥义 (KONG Xiangyi): E-mail: kongxiangyi20@163.com。

Abstract: The traditional method for detecting the copy numbers of exogenous gene in transgenic plants is Southern hybridization, which is costly and time-consuming, and is difficult to meet the breeding needs of high-throughput detection of the copy numbers of exogenous gene. Therefore, this study aims to establish a fast and high-throughput method for detecting the copy numbers of exogenous gene in transgenic papayas. In this study, two single copy genes, *Cpa03g018830* and *Cpa03g018770*, were selected from the papaya genome. Using the known exogenous gene as a single copy integrated transgenic papaya as a reference, the copy numbers were identified by digital PCR. Further, using them as reference genes, and the commonly used screening marker gene *NPTII* in papaya transgenic breeding as an exogenous target gene, methods for detecting the copy numbers of exogenous gene in transgenic papaya using digital PCR and fluorescence quantitative PCR were established. The results showed that *Cpa03g018830* and *Cpa03g018770* were both single copy genes; the established digital PCR method was accurate and reliable in detecting the copy numbers of exogenous gene in transgenic papayas, while fluorescence quantitative PCR had a higher accuracy in detecting single or low copy integration of exogenous genes in transgenic papayas, and a lower accuracy in detecting multiple copy integration of exogenous genes. Therefore, fluorescence quantitative PCR is suitable for initially screening out single or low copy integration plants from a large number of transgenic plants. The single copy *Cpa03g018830* and *Cpa03g018770* identified in this study can be used as reference genes for detecting the copy numbers of exogenous gene in transgenic papayas. The established methods for detecting the copy numbers of exogenous gene in transgenic papayas using digital PCR and fluorescence quantitative PCR techniques are simple, fast and suitable for batch detection, providing new methods for selecting single or low copy lines in transgenic resistance breeding of papayas.

Keywords: transgenic papaya; copy number; reference gene; digital PCR; fluorescence quantitative PCR

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.04.002

番木瓜 (*Carica papaya* L.) 是世界四大热带、亚热带畅销水果之一。番木瓜环斑病毒 (*Papaya ringspot virus*, PRSV) 是危害番木瓜最严重的病毒, 其侵染番木瓜植株后, 造成番木瓜大面积减产甚至整片果园死亡。1986 年, ABEL 等^[1]发现将病毒基因转入寄主植物, 可以导致寄主植物对病毒产生抗性, 此后转基因技术被应用到番木瓜的抗病育种中。第一个转基因番木瓜品种是将夏威夷 PRSV 55-1 的外壳蛋白 (coat protein, CP) 基因转入 Sunset 品种中^[2], 田间抗性表现相当良好, 该转基因品种于 1997 年在夏威夷获得商业化应用。随后, 2009 年美国佛罗里达大学的转基因番木瓜 X17-2 品系^[3]也获得商业化应用。我国的番木瓜转基因育种是从 1996 年开始的, 华南农业大学研发出了抗病品系华农 1 号, 并且在 2010 年获得了国家颁发的番木瓜农业转基因生物安全证书。我国台湾中兴大学的 CHENG 等^[4]和 BAU 等^[5-6]也研发出了转基因番木瓜抗病品系 16-0-1、18-2-4 等。近些年来, 研究人员仍在不断进行新的番木瓜转基因育种研究。

在转基因植物育种研究中, 外源基因整合进入受体植物基因组的拷贝数会影响外源目的基因的表达及其遗传稳定性^[7]。当外源基因以 1~2 个拷贝数整合到受体基因组时, 一般能够稳定高效表达, 而当外源基因以多拷贝数整合到受体基因组时, 可能会出现表达水平较低甚至基因沉默,

从而无法得到表现目的性状的转基因植株^[8-9]。因此, 研究人员往往会选择单低拷贝整合的株系, 然而, 单低拷贝整合的转基因株系往往需要从大量 T₀ 代植株中筛选得到。此外, 纯合转基因植株的获得, 也需要从大量性状分离的 T₁ 代转基因植株中筛选。因此, 高效的外源基因拷贝数检测方法对转基因育种至关重要。

传统的检测转基因植株中外源基因拷贝数的方法为 Southern 杂交, 该方法特异性强、灵敏度高, 但其对样品 DNA 的质量和含量要求较高, 且成本高, 周期长, 难以满足高通量外源基因拷贝数检测的需求。因此, 亟需建立简单、快速、高效的检测转基因植株中外源基因拷贝数的方法。本研究以已知外源基因为单拷贝整合的转 CP 基因番木瓜为参照, 筛选出番木瓜基因组中的单拷贝基因; 进一步以其为内参基因, 建立基于绝对定量的数字 PCR 技术 (digital PCR, dPCR) 和荧光定量 PCR 技术 (fluorescence quantitative PCR, qPCR) 检测转基因番木瓜中外源基因拷贝数的方法, 为转基因番木瓜育种提供新的高通量拷贝数检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 转基因番木瓜株系来自中国热

带农业科学院三亚研究院，包含：21 株转入海南 PRSV 的 CP 基因的 T₁ 代番木瓜、55 株转入海南 PRSV 的辅助成分-蛋白酶基因（*HC-Pro*）发夹结构的 T₀ 代番木瓜苗和 28 株转入海南 PRSV 的复制酶基因（*Nib*）发夹结构的 T₀ 代番木瓜苗。

1.1.2 试剂 广谱植物基因组 DNA 快速提取试剂盒（CZ301-01）购自北京博迈德基因技术有限公司；QuantStudio™ 3D 数字 PCR 预混液 v2、QuantStudio 3D 数字 PCR 20K 芯片 v2、QuantStudio 3D 数字 PCR 芯片罩盖 v2、QuantStudio 3D 数字 PCR 上样刀片、注射器装浸液、浸液吸头等均购自赛默飞世尔科技（中国）有限公司；2X Q3 SYBR qPCR Master mix 购自吐露港生物科技有限公司，PCR 平盖八排管购自 Labselect 公司。引物均由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 番木瓜单拷贝内参基因的筛选及鉴定

（1）番木瓜单拷贝基因的筛选及 dPCR 引物与探针设计。在 phytozome（<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/blast-search>）网站的番木瓜基因组中，挑选出可能为单拷贝的 2 个基因 *Cpa03g018830* 和 *Cpa03g018770* 作为候选内参基因，下载这 2 个基因的 DNA 序列。使用 Premier 5.0 软件设计特异性引物（F/R）与探针（P），*Cpa03g018830* 和 *Cpa03g018770* 的探针 5'端连接 VIC 荧光基团，3'端连接 MGB 荧光猝灭基团，该基团散发红色荧光。转基因番木瓜外源基因 CP 和 *NPT II*（neomycin phosphotransferase）的探针 5'端连接 FAM 荧光基团，3'端连接 BHQ1 荧光猝灭基团，该基团散发绿色荧光。本实验使用的所有引物及探针序列见表 1。

表 1 引物及探针序列
Tab. 1 Primer and probe sequences

基因 Gene	引物名称 Primer name	引物序列（5'-3'）Primer sequence (5'-3')	大小 Size/bp
<i>Cpa03g018830</i>	830-F	TTCGAACGAGTCTGCAGTGG	91
	830-R	ACCACCTGAACCCAGGCTAA	
	830-P	VIC-ACGTGGCGGAGGGTGGTGAAGCTGATA-MGB	
<i>Cpa03g018770</i>	770-F	ATCCCAATTGCAGCTGGTGG	90
	770-R	GTGAACCCTGGTGATGCCAA	
	770-P	VIC-TCCAGTTGAGTTTGGTGGCGGCCACA-MGB	
CP	CP-F	GCCGTAAAGACTGGCGAACA	140
	CP-R	GCCCTTTGGTCTTCTGAGACTG	
	CP-P	FAM-TCGTCAACATGGTGGAGCACGACACGC-BHQ1	544
	CP-F1	TCACGAGCCCTATCAGGTGTCTTT	
	CP-R1	TCAACGCCGGAAGTGTGGAAGTT	
<i>NPT II</i>	NPT II -F	GGAGTTCATTACAGGGCACCG	139
	NPT II -R	TGGGTGGAGAGGCTATTTCGG	
	NPT II -P	FAM-ACAGCCGAAACACGGCGGCATCAGA-BHQ1	

（2）转 CP 基因番木瓜的 T₁ 代阳性植株的筛选。以 T₀ 代经过 Southern 杂交验证为单拷贝的转 CP 基因番木瓜的 T₁ 代阳性植株幼苗作为内参基因拷贝数鉴定的参照，首先通过 PCR 筛选出转 CP 番木瓜的 T₁ 代阳性植株。采集 21 株转 CP 基因番木瓜的 T₁ 代幼苗的叶片，提取其基因组 DNA，通过常规 PCR 筛选阳性幼苗。反应体系为：Green Master Mix 12.5 μL，CP-F1（10 μmol/L）1 μL，CP-R1（10 μmol/L）1 μL，DNA 模板 1 μL，Nuclease-free water 9.5 μL，总体积 25 μL。扩增程序为：94℃预变性 3 min；94℃变性 30 s，58℃

退火 30 s，72℃延伸 45 s，共 35 个循环；最后 72℃延伸 10 min，4℃保存。PCR 扩增反应结束后，取 10 μL PCR 产物在 2%琼脂糖凝胶上进行电泳检测。

（3）dPCR 鉴定候选内参基因的拷贝数。从上述转 CP 基因番木瓜的 T₁ 代阳性植株中随机选取 8 株，编号为 CP1~CP8。使用 QuantStudio™ 3D AnalysisSuite™ 数字 PCR 仪，通过 dPCR 检测候选内参基因 *Cpa03g018830* 在番木瓜基因组中的拷贝数。反应体系为：2×dPCR Master Mix 7.3 μL，CP 基因、*Cpa03g018830* 基因的正向引物和反向

引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1.3 μL , 探针(10 $\mu\text{mol/L}$) 0.36 μL , DNA 模板(10 $\text{ng}/\mu\text{L}$) 1 μL , Nuclease-free water 0.28 μL , 总体积 14.50 μL 。扩增程序为: 96 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min; 60 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 98 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 39 个循环; 60 $^{\circ}\text{C}$ 2 min。反应结束后, 将芯片放入 dPCR 读取仪中读取 FAM 和 VIC 荧光信号, 并使用对应软件进行荧光数据分析, 得到检测样品 DNA 中 CP 基因和 *Cpa03g018830* 基因的拷贝数 (copy/ μL), 计算样品中 CP 基因与 *Cpa03g018830* 基因的拷贝数比值, 通过比值判断 *Cpa03g018830* 基因在番木瓜基因组中的拷贝数。

选取已确认为单拷贝杂合的植株 CP7 作为 *Cpa03g018770* 基因在番木瓜基因组中拷贝数鉴定的参照, 通过数字 PCR 检测 *Cpa03g018770* 基因在番木瓜基因组中的拷贝数; 同时以 *Cpa03g018830* 基因为单拷贝对照来进一步验证 *Cpa03g018770* 基因的拷贝数。*Cpa03g018770* 基因和 *Cpa03g018830* 基因的 dPCR 实验各设 3 个重复。

1.2.2 dPCR 检测转基因番木瓜 T_0 代的外源基因拷贝数 以转番木瓜 PRSV 病毒 *HC-Pro* 基因的 T_0 代阳性番木瓜苗为待测样品, 编号为 HC-Pro-1~HC-Pro-11, 采集 11 株幼苗的叶片, 提取其基因组 DNA。以 *Cpa03g018770* 基因和 *Cpa03g018830* 基因为内参基因, 以番木瓜转基因常用的筛选基因 *NPT II* 为外源目的基因, 通过 dPCR 检测外源基因在转 *HC-Pro* 基因番木瓜基因组中的拷贝数。其中, 以 *Cpa03g018770* 基因为内参基因, 检测 6 株转 *HC-Pro* 基因番木瓜苗 (HC-Pro-1~HC-Pro-6); 以 *Cpa03g018830* 基因为内参基因, 检测全部 11 株转 *HC-Pro* 基因番木瓜苗。数字 PCR 仪反应体系和扩增程序同 1.2.1。反应结束后, 将芯片放入 dPCR 读取仪中读取 FAM 和 VIC 荧光信号, 并使用对应软件进行荧光数据分析, 得到检测样品 DNA 中 *NPT II* 基因、*Cpa03g018830* 基因、*Cpa03g018770* 基因的拷贝数 (copy/ μL), 计算样品中 *NPT II* 基因与 *Cpa03g018830* 基因、*Cpa03g018770* 基因的拷贝数比值, 通过比值判断 *NPT II* 基因在番木瓜基因组中的拷贝数。

1.2.3 荧光定量 PCR 检测转基因番木瓜 T_0 代植株的外源基因拷贝数 (1) 引物验证。荧光定量 PCR 引物同数字 PCR 引物一样, 且不需要探针。以 2 份已知拷贝数的转基因番木瓜的基因组 DNA 为模板, 进行荧光定量 PCR 实验, 验证内参

Cpa03g018830、*Cpa03g018770* 基因和外源基因 *NPT II* 的引物有效性。反应在 LightCycler® 96 荧光分析仪中进行, 反应体系为: 2X Q3 SYBR qPCR Master Mix (Universal) 10 μL , 正向引物和反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.4 μL , Template DNA (50 $\text{ng}/\mu\text{L}$) 1 μL , ddH₂O 8.2 μL , 总体积为 20 μL 。扩增程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 40 个循环; 熔解曲线 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。实验设置 3 个重复, 反应结束后, 通过扩增曲线及溶解曲线判定引物是否有效。

(2) qPCR 检测待测样品的外源基因拷贝数。以转 *HC-Pro* 基因的 T_0 代阳性番木瓜苗为待测样品, 编号为 HC-Pro-12~HC-Pro-55。以转 *Nib* 基因的 T_0 代阳性番木瓜苗为待测样品, 编号为 Nib-1~Nib-28。分别采集番木瓜幼苗的叶片, 提取其基因组 DNA。此外, HC-Pro-1~HC-Pro-11 和 CP1~CP8 也作为待测样品通过 qPCR 再次验证其拷贝数, 待测样品共 91 份。以 *Cpa03g018770* 基因和 *Cpa03g018830* 基因为内参基因, 以 *NPT II* 基因为外源目的基因, 以单拷贝纯合的转基因番木瓜株系作为对照, 通过 qPCR 检测所有待测样品的外源基因在转基因番木瓜基因组中的拷贝数。qPCR 反应体系及扩增程序同引物验证, 每个样品重复 3 次。反应结束后, 使用 LightCycler® 96 SW 1.1 系统对数据进行分析, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法分析转基因植株中 *NPTII* 基因的相对拷贝数。

2 结果与分析

2.1 番木瓜单拷贝内参基因的筛选及鉴定

2.1.1 CP 基因阳性植株的 PCR 鉴定 PCR 产物经电泳检测后, 若出现 500 bp 左右的目的条带则为转基因阳性植株, 可能为 CP 基因纯合或 CP 基因杂合, 若无目的条带则为非转基因植株。21 株 T_1 代幼苗的 PCR 检测结果见图 1, 其中, 有 17 株为 CP 基因阳性植株, 这 17 株番木瓜植株可作为内参基因拷贝数鉴定的参照。



图 1 转基因番木瓜 T_1 代幼苗的 PCR 鉴定
Fig. 1 PCR identification of T_1 generation seedlings of transgenic papaya

2.1.2 dPCR 鉴定候选内参基因的拷贝数 由于番木瓜属于二倍体植物, 转 CP 基因番木瓜单拷贝株系的 T₁ 代阳性植株的 CP 基因与 *Cpa03g018830* 基因的拷贝数比值为 1 或 0.5 时, *Cpa03g018830* 基因为单拷贝基因。且根据 CP 基因与目的基因的拷贝数比值, 可得出转 CP 基因番木瓜的 T₁ 代阳性植株为纯合或杂合, 拷贝数比值为 1 时为单拷贝纯合 CP 植株, 拷贝数比值为 0.5 时为单拷贝杂合 CP 植株。8 个样品的数字 PCR 散点图见图 2, 其中, 蓝色散点为 CP 基因荧光孔数; 红色散点为 *Cpa03g018830* 基因荧光孔数; 绿色散点为 CP 基因和 *Cpa03g018830* 基因荧光孔数, 黄色散点为无信号孔数。dPCR 实验的拷贝数结果(表 2)显示, 7 个样品的 CP 基因与 *Cpa03g018830* 基因的拷贝数比值接近为 1 或 0.5, CP8 样本的拷贝数比值为 0.12, 结果异常, 将其排除。因此, *Cpa03g018830* 基因在番木瓜基因组中为单拷贝

基因。且 CP3 与 CP4 样品为单拷贝纯合植株, CP1、CP2、CP5、CP6、CP7 样品为单拷贝杂合植株。

由于 CP7 为单拷贝杂合植株, 其 CP 基因与目的基因的拷贝数比值为 0.5 时, 则目的基因为单拷贝基因。CP7 的 dPCR 实验的结果(表 3)显示, CP 基因与 *Cpa03g018770* 基因和 *Cpa03g018830* 基因的拷贝数比值均接近 0.5。因此, *Cpa03g018770* 基因和 *Cpa03g018830* 基因在番木瓜基因组中均为单拷贝基因, 可作为内参基因应用于转基因番木瓜中外源基因拷贝数的检测。

2.2 dPCR 法检测转基因番木瓜 T₀ 代植株的外源基因拷贝数

番木瓜是二倍体植物, 因此单拷贝整合的外源基因片段与内参基因的拷贝数比值约为 0.5, 双拷贝整合的外源基因片段与内参基因的拷贝数比值约为 1, 三拷贝整合的外源基因片段与内参基

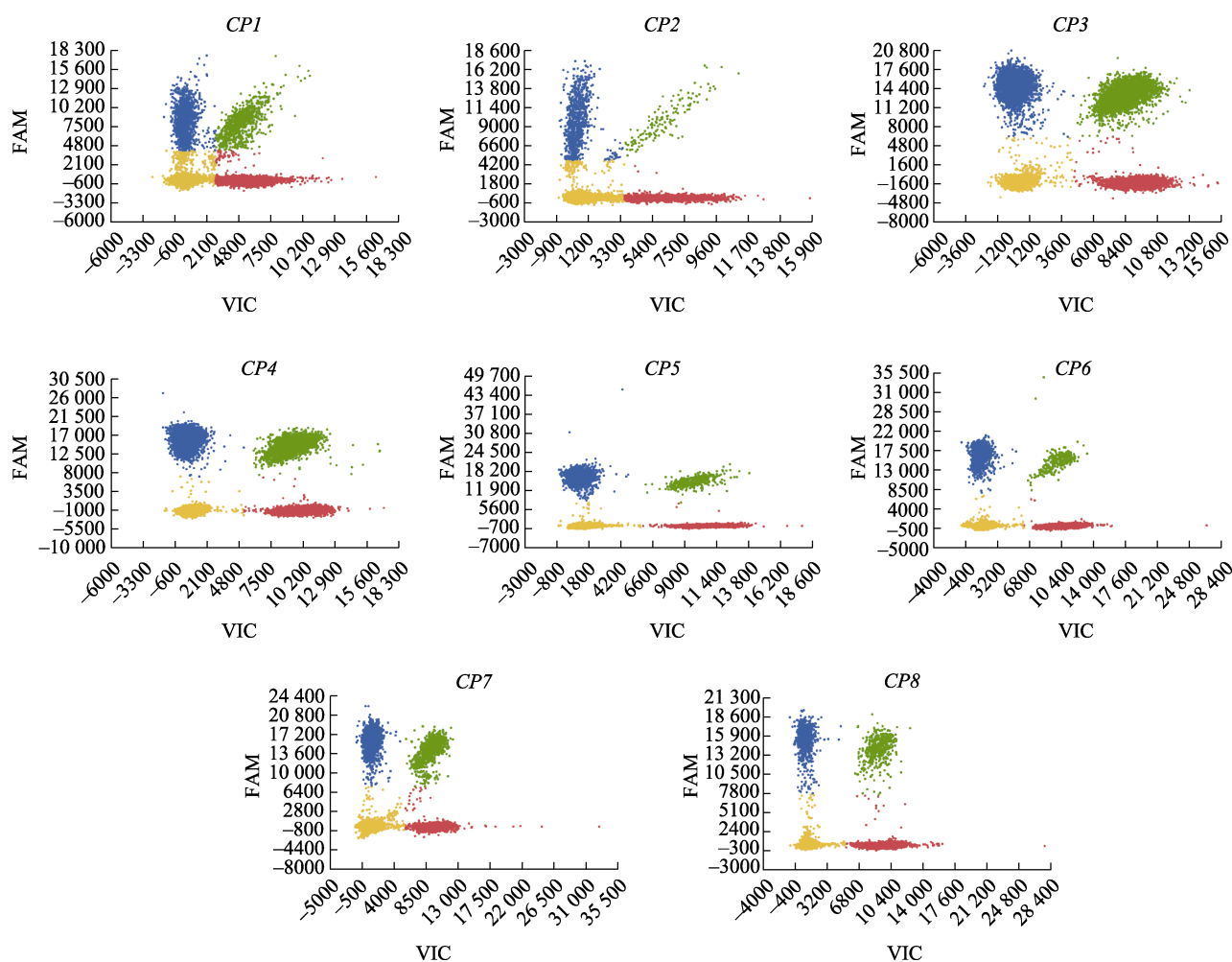


图 2 *Cpa03g018830* 基因和 CP 基因的 dPCR 散点图

Fig. 2 Digital PCR scatter map of *Cpa03g018830* and CP gene

表 2 *Cpa03g018830* 基因的 dPCR 鉴定
Tab. 2 Digital PCR identification of *Cpa03g018830 gene*

样品 Sample	基因名称 Gene name	拷贝数 Copy number/(copy·μL ⁻¹)	比值 (<i>CP/Cpa03g018830</i>) Ratio(<i>CP/Cpa03g018830</i>)	基因型 Genotype
CP1	<i>Cpa03g018830</i>	532.16	0.47	杂合
	<i>CP</i>	252.48		
CP2	<i>Cpa03g018830</i>	228.74	0.59	杂合
	<i>CP</i>	134.43		
CP3	<i>Cpa03g018830</i>	810.00	0.96	纯合
	<i>CP</i>	780.90		
CP4	<i>Cpa03g018830</i>	522.80	1.07	纯合
	<i>CP</i>	556.82		
CP5	<i>Cpa03g018830</i>	257.12	0.51	杂合
	<i>CP</i>	130.79		
CP6	<i>Cpa03g018830</i>	226.13	0.49	杂合
	<i>CP</i>	111.10		
CP7	<i>Cpa03g018830</i>	441.80	0.49	杂合
	<i>CP</i>	218.34		
CP8	<i>Cpa03g018830</i>	626.80	0.12	
	<i>CP</i>	72.56		

表 3 *Cpa03g018830* 基因和 *Cpa03g018770* 基因的 dPCR 分析
Tab. 3 Digital PCR identifications of *Cpa03g018830* and *Cpa03g018770 gene*

样品 Sample	基因名称 Gene name	拷贝数 Copy number/(copy·μL ⁻¹)	比值 (<i>CP/Cpa03g018830</i> or <i>Cpa03g018770</i>) Ratio(<i>CP/Cpa03g018830</i> or <i>Cpa03g018770</i>)	基因型 Genotype
CP 7-1	<i>Cpa03g018830</i>	378.30	0.56	杂合
	<i>CP</i>	210.22		
CP7-2	<i>Cpa03g018830</i>	391.92	0.53	杂合
	<i>CP</i>	206.88		
CP7-3	<i>Cpa03g018830</i>	393.13	0.56	杂合
	<i>CP</i>	219.44		
CP7-4	<i>Cpa03g018770</i>	364.92	0.58	杂合
	<i>CP</i>	209.92		
CP7-5	<i>Cpa03g018770</i>	404.51	0.58	杂合
	<i>CP</i>	235.15		
CP7-6	<i>Cpa03g018770</i>	272.35	0.52	杂合
	<i>CP</i>	142.88		

因的拷贝数比值约为 1.5，四拷贝、五拷贝等多拷贝外源基因片段整合拷贝数以此类推。

以 *Cpa03g018770* 基因为内参基因，以 *NPT II* 基因为外源目的基因，11 株转 *HC-Pro* 基因的 *T₀* 代阳性番木瓜苗的 dPCR 检测结果表明，*HC-Pro-1*、*HC-Pro-2*、*HC-Pro-3*、*HC-Pro-4*、*HC-Pro-5* 检测为单拷贝，*HC-Pro-6* 检测为五拷贝（表 4）。以 *Cpa03g018830* 基因为内参基因的数字 PCR 结果表明，*HC-Pro-1*、*HC-Pro-2*、*HC-Pro-3*、*HC-Pro-4*、*HC-Pro-5* 检测为单拷贝，*HC-Pro-6* 检

测为五拷贝，*HC-Pro-7*、*HC-Pro-8* 和 *HC-Pro-10* 检测为四拷贝，*HC-Pro-9* 和 *HC-Pro-11* 检测为六拷贝。其中，*HC-Pro-1*~*HC-Pro-6* 经 2 个内参基因检测的结果一致（表 5）。

2.3 qPCR 检测转基因番木瓜 *T₀* 代植株的外源基因拷贝数

2.3.1 qPCR 引物的验证 3 对引物的扩增曲线及融解曲线表明，3 对引物均有明显的扩增曲线，且融解曲线均具有唯一的吸收峰，可作为 qPCR 检测引物（图 3）。

表 4 以 *Cpa03g018770* 为内参基因检测外源基因拷贝数
Tab. 4 Detection of copy numbers of exogenous gene with *Cpa03g018770* as reference gene

样品 Sample	基因名称 Gene name	拷贝数 Copy number/(copy·μL ⁻¹)	比值 (<i>NPT II</i> / <i>Cpa03g018770</i>) Ratio(<i>NPT II</i> / <i>Cpa03g018770</i>)	外源基因拷贝数 Copy numbers of exogenous gene
HC-Pro-1	<i>Cpa03g018770</i>	392.73	0.27	1
	<i>NPT II</i>	107.71		
HC-Pro-2	<i>Cpa03g018770</i>	608.19	0.27	1
	<i>NPT II</i>	163.93		
HC-Pro-3	<i>Cpa03g018770</i>	371.22	0.25	1
	<i>NPT II</i>	91.99		
HC-Pro-4	<i>Cpa03g018770</i>	434.97	0.27	1
	<i>NPT II</i>	117.75		
HC-Pro-5	<i>Cpa03g018770</i>	290.16	0.52	1
	<i>NPT II</i>	149.96		
HC-Pro-6	<i>Cpa03g018770</i>	348.34	2.37	5
	<i>NPT II</i>	823.91		

表 5 以 *Cpa03g018830* 为内参基因检测外源基因拷贝数
Tab. 5 Detection of copy numbers of exogenous gene with *Cpa03g018830* as reference gene

样品 Sample	基因名称 Gene name	拷贝数 Copy number/(copy·μL ⁻¹)	比值 (<i>NPT II</i> / <i>Cpa03g018830</i>) Ratio(<i>NPT II</i> / <i>Cpa03g018830</i>)	外源基因拷贝数 Copy numbers of exogenous gene
HC-Pro-1	<i>Cpa03g018830</i>	474.90	0.28	1
	<i>NPT II</i>	130.75		
HC-Pro-2	<i>Cpa03g018830</i>	347.80	0.24	1
	<i>NPT II</i>	84.87		
HC-Pro-3	<i>Cpa03g018830</i>	355.52	0.33	1
	<i>NPT II</i>	115.80		
HC-Pro-4	<i>Cpa03g018830</i>	387.24	0.27	1
	<i>NPT II</i>	105.22		
HC-Pro-5	<i>Cpa03g018830</i>	248.03	0.50	1
	<i>NPT II</i>	123.88		
HC-Pro-6	<i>Cpa03g018830</i>	294.92	2.22	5
	<i>NPT II</i>	654.67		
HC-Pro-7	<i>Cpa03g018830</i>	1823.70	2.02	4
	<i>NPT II</i>	3679.70		
HC-Pro-8	<i>Cpa03g018830</i>	601.45	2.02	4
	<i>NPT II</i>	1214.90		
HC-Pro-9	<i>Cpa03g018830</i>	1314.40	2.92	6
	<i>NPT II</i>	3840.90		
HC-Pro-10	<i>Cpa03g018830</i>	437.93	2.22	4
	<i>NPT II</i>	973.12		
HC-Pro-11	<i>Cpa03g018830</i>	762.58	2.75	6
	<i>NPT II</i>	2100.70		

2.3.2 qPCR 检测待测样品的外源基因拷贝数采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法分析转基因植株中 *NPTII* 基因的相对拷贝数，定义已知单拷贝纯合转基因植株对照为参照因子，即为 1，各样本相对于参照因子拷贝数的倍数为 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 。由于 T_0 代植株的插入为杂合型，因此单拷贝植株的相对定量值（RQ）应为纯合单拷贝参照的 1/2，相对表达量约为 0.5；而双拷贝植株的 RQ 值与纯合单拷贝对照相等，相

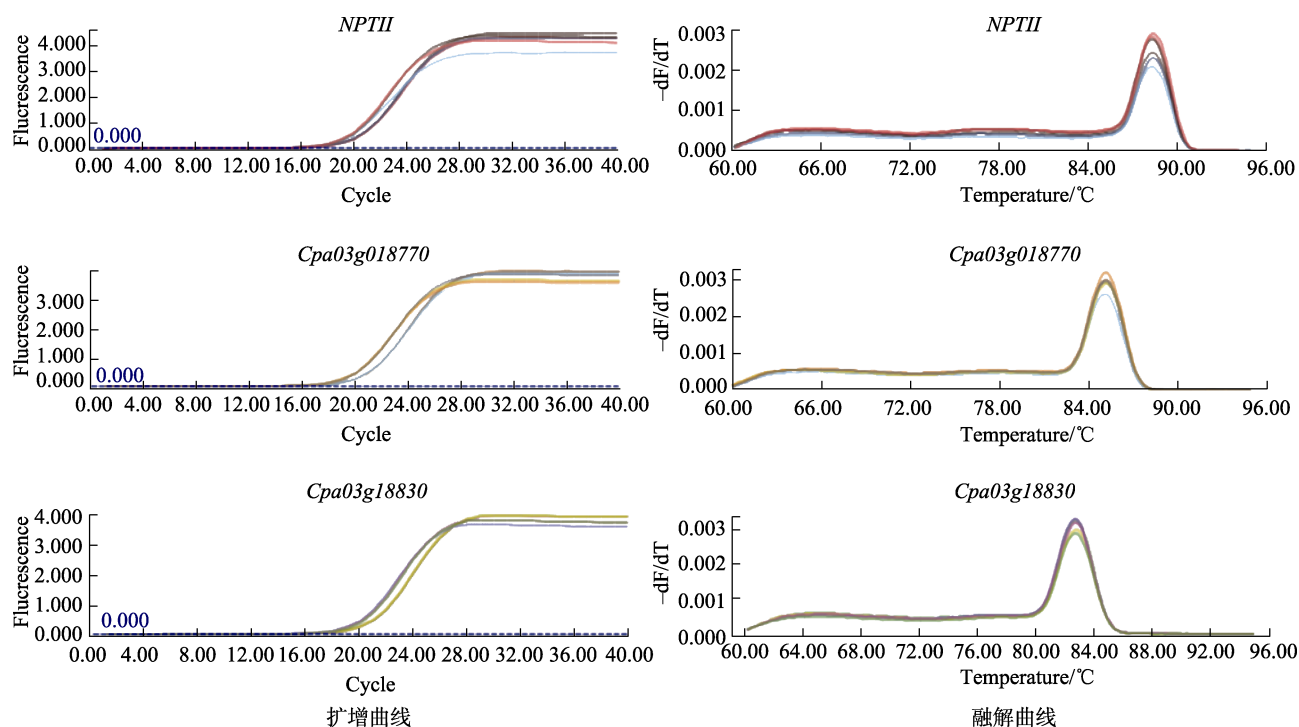


图 3 qPCR 引物的验证
Fig. 3 Validation of qPCR primers

对表达量约为 1；三拷贝植株的相对定量值 RQ 应该为纯合单拷贝对照的 $3/2$ ，相对表达量约为 1.5；多拷贝外源基因整合拷贝数以此类推。样品 HC-Pro-12~HC-Pro-55 的 qPCR 检测拷贝数的结果见图 4，其中，有 25 个是单拷贝转基因植株，有 1 个是双拷贝转基因植株，有 2 个是三拷贝转基因植株，其余均为三拷贝以上转基因植株。样品 Nib-1~Nib-28 的 qPCR 检测拷贝数的结果见图 5，有 5 个是单拷贝转基因植株，有 2 个是双拷贝转基因植株，有 6 个是三拷贝转基因植株，其余均为三拷贝以上转基因植株。样品 CP1~CP8 和 HC-Pro-1~HC-Pro-11 的 qPCR 检测拷贝数的结果见图 6，CP1、CP2、CP5、CP6 和 CP7 样品为单拷贝杂合植株，CP3、CP4 和 CP8 样品为单拷贝纯合植株，除 CP8 号的 dPCR 结果异常，其余均与 dPCR 检测的拷贝数结果一致。HC-Pro-1、HC-Pro-2、HC-Pro-3、HC-Pro-4 和 HC-Pro-5 均为单拷贝转基因植株，HC-Pro-7、HC-Pro-8 和 HC-Pro-10 为四拷贝转基因植株，HC-Pro-6 为五拷贝转基因植株，以上植株的拷贝数检测结果与 dPCR 的检测结果一致；HC-Pro-9 和 HC-Pro-11 经 qPCR 检测为十五拷贝和五拷贝，然而 dPCR 的检测结果均为六拷贝，结果不一致，这可能是由于荧光定量对外源基因单低拷贝整合的检测

灵敏度较高，而对多拷贝整合的检测灵敏度低的缘故。

3 讨论

在转基因番木瓜检测中，外源基因的拷贝数检测是不可缺少的一环，因此获得一种简便、高效、精准的检测方法至关重要。传统的 Southern 杂交的结果准确可信，但其成本高，耗时长，一次检测样品少，操作要求高。qPCR 也常用于转基因植株中外源基因拷贝数的检测，可分为荧光染料法和探针法，探针法相比于染料法，能更精确地对低拷贝的目的 DNA 片段进行定量分析，但探针价格较昂贵，成本高。染料法虽然相较于探针法精准度稍有降低，但在检测外源基因的单低拷贝整合时的准确性也足以满足育种工作需求，且其成本较低，更适宜高通量检测。目前，qPCR 测定外源基因拷贝数已成功应用于转基因水稻^[10-11]和棉花^[12]等作物的拷贝数检测。dPCR 技术是在 qPCR 技术基础上的一次技术革新，其分析结果可直接得出 DNA 分子的个数，对起始样品进行绝对定量。相比 qPCR，dPCR 无需任何校准物，具有更高的灵敏度、特异性和准确性。dPCR 在基因表达研究^[13]、miRNA 研究^[14-16]、基因组拷贝数鉴定^[17-18]等方面具有广阔前景。HINDSON 等^[19]研

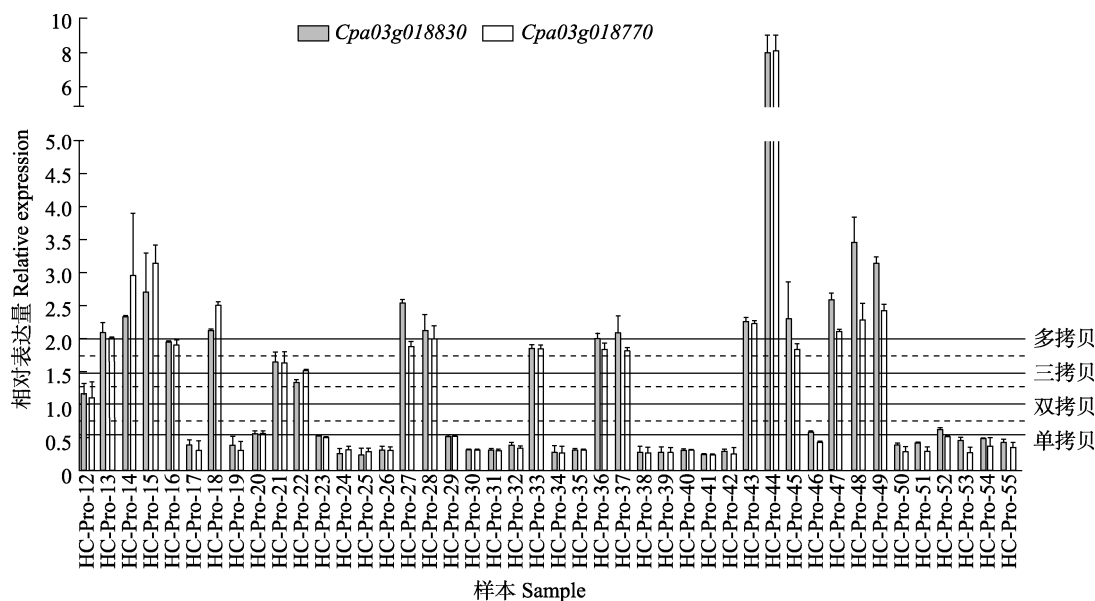


图 4 HC-Pro-12~HC-Pro-55 的拷贝数检测结果

Fig. 4 Copy number detection results of HC-Pro-12 – HC-Pro-55

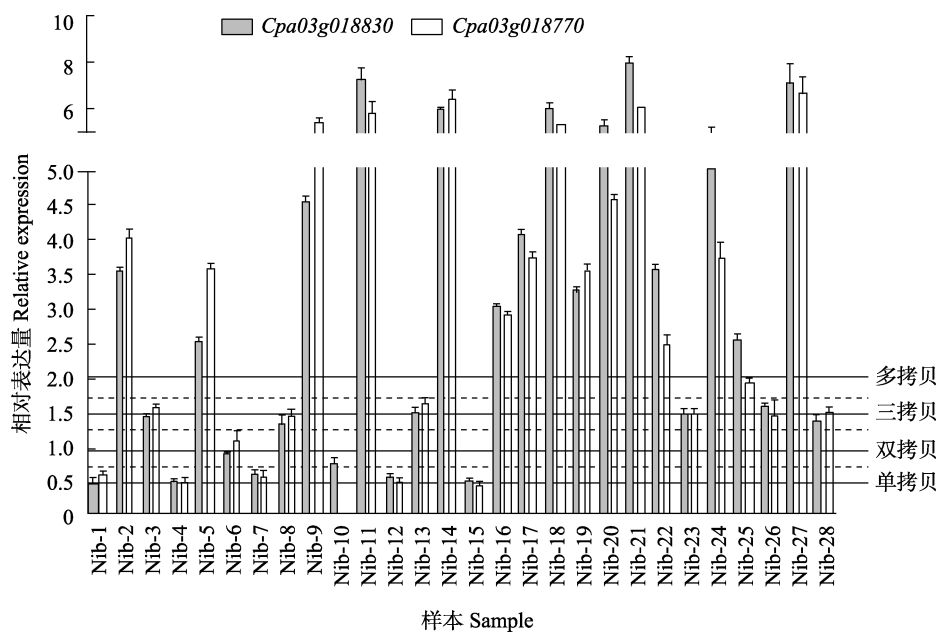


图 5 Nib-1~Nib-28 的拷贝数检测结果

Fig. 5 Copy number detection results of Nib-1 – Nib-28

究表明,dPCR 能够简单而准确地测定水稻、柑橘、马铃薯、玉米、番茄和小麦中的外源基因拷贝数。NARANCIO 等^[20]比较了 qPCR 和 dPCR 方法在白三叶中外源基因拷贝数检测中的优劣,结果表明,dPCR 在白三叶中的拷贝数检测上具有更高的准确性。

要建立 qPCR 和 dPCR 检测转基因植株中外源基因拷贝数的方法,需要拷贝数明确的单拷贝基因作为内参基因。XUE 等^[21]通过对甘蔗多个基

因的检测发现, *APRT* 基因最适合作为甘蔗 DNA 含量定量的内源参考基因,可应用于转基因甘蔗中外源基因拷贝数的鉴定。本研究筛选出了 2 个番木瓜单拷贝基因 *Cpa03g018830* 与 *Cpa03g018770*,验证了其作为内参基因准确可用,且可将 2 个内参基因同时使用,若 2 个内参结果相一致,则结果更准确,因此,这 2 个基因可作为内参基因应用于 qPCR 或 dPCR 鉴定转基因番木瓜中外源基因拷贝数的研究。

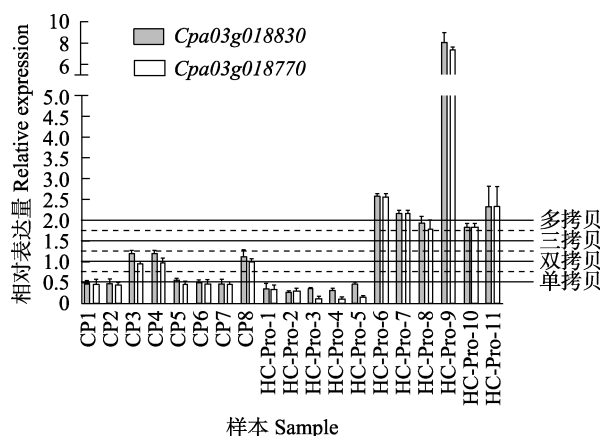


图 6 CP1~CP8 和 HC-Pro-1~HC-Pro-11 的拷贝数检测结果

Fig. 6 Copy number detection results of CP1~CP8 and HC-Pro-1~HC-Pro-11

本研究中, 利用 dPCR 与 qPCR 方法分别测定了转基因番木瓜中外源基因的拷贝数, HC-Pro-9 和 HC-Pro-11 经 qPCR 检测为十五拷贝和五拷贝, 然而 dPCR 的检测结果均为六拷贝, 可能是因为 qPCR 对外源基因单的低拷贝整合的检测灵敏度较高, 而对外源基因多拷贝整合的检测灵敏度低较低。相比较来说, 数字 PCR 不依赖标准曲线定量, 并不受 PCR 扩增效率影响, 具有更高的灵敏度和检测准确度, 基于阵列式的 QuantStudio 3D dPCR 系统等商业平台也已成为临床应用的关键设备, dPCR 的结果对外源基因拷贝数的检测更准确。qPCR 成本较低, 简单快速, 适合用来在大量转基因植株中初筛出单低拷贝整合的植株, 经 qPCR 初步筛选到的单低拷贝整合的株系可进一步用 Southern 杂交进行验证, 不仅进一步提高实验结果的准确性与权威性, 还节省成本。本研究建立的利用 dPCR 和 qPCR 技术高通量检测转基因番木瓜中外源基因拷贝数的方法, 可为番木瓜转基因抗病育种中单低拷贝株系的选育提供新的方法。

参考文献

- [1] ABEL P P, NELSON R S, DE B, HOFFMANN N, ROGERS S G, FRALEY R T, BEACHY R N. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene[J]. Science, 1986, 232(4751): 738-743.
- [2] FITCH M M, MANSHARDT R M, GONSALVES D, SLIGHTOM SL, SANFORD J C. Virus resistant papaya plant derived from tissues bombarded with the coat protein of papaya ringspot virus[J]. Nature Biotechnology, 1992, 10: 1466-1472.
- [3] DAVIS M, YING Z. Development of papaya breeding lines with transgenic resistance to papaya ringspot virus[J]. Plant Disease, 2004, 88: 352-358.
- [4] CHENG Y H, YANG J S, YEH S D. Efficient transformation of papaya by coat protein gene of papaya ringspot virus mediated by *Agrobacterium* following liquid-phase wounding of embryogenic tissues with caborundum[J]. Plant Cell Reports, 1996, 16: 127-132.
- [5] BAU H J, CHENG Y H, YU T A, YANG J S, YEH S D. Broad-spectrum resistance to different geographic strains of papaya ringspot virus in coat protein gene transgenic papaya[J]. Phytopathology, 2003, 93(1): 112-120.
- [6] BAU H J, CHENG Y H, YU T A, YANG J S, HSIAO C H, LIN C Y, YEH S D. Field evaluation of transgenic papaya lines carrying the coat protein gene of papaya ringspot virus in Taiwan[J]. Plant Disease, 2004, 88(6): 594-599.
- [7] COLLIER R, DASGUPTA K, XING Y P, HERNANDEZ B T, SHAO M, ROHOZINSKI D, KOVAK E, LIN J, DE OLIVEIRA M L P, STOVER E, MCCUE K F, HARMON F G, BLECHL A, THOMSON J G, THILMONEY R. Accurate measurement of transgene copy number in crop plants using droplet digital PCR[J]. The Plant Journal, 2017, 90(5): 1014-1025.
- [8] STAM M, MOL J N M, KOOTER J M. The silence of genes in transgenic plants[J]. Annals of Botany, 1997, 79(1): 3-12.
- [9] MASON G, PROVERO P, VAIRA A M, ACCOTTO G P. Estimating the number of integrations in transformed plants by quantitative real-time PCR[J]. BMC Biotechnology, 2002, 2(1): 20.
- [10] 杨立桃, 赵志辉, 丁嘉羽, 张承妹, 贾军伟, 张大兵. 利用实时荧光定量PCR方法分析转基因水稻外源基因拷贝数[J]. 中国食品卫生杂志, 2005, 17(2): 140-144.
- [11] YANG L T, ZHAO Z H, DING J Y, ZHANG C M, JIA J W, ZHANG D B. Estimating copy number of transgenes in transformed rice by real-time quantitative PCR[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2005, 17(2): 140-144. (in Chinese)
- [12] 王育花, 赵森, 陈芬, 肖国樱. 利用实时荧光定量 PCR 法检测转基因水稻外源基因拷贝数的研究[J]. 生命科学研究, 2007, 11(4): 301-305.
- [13] WANG Y H, ZHAO S, CHEN F, XIAO G Y. Estimation of the copy number of exogenous gene in transgenic rice by real-time fluorescence quantitative PCR[J]. Life Science Research, 2007, 11(4): 301-305. (in Chinese)
- [14] 闫喜中, 张锐, 孟志刚, 孙国清, 周涛, 郭三堆. 实时荧光定量 PCR 法检测抗虫棉 *Bt* 基因拷贝数方法的建立[J]. 安

- 徽农业科学, 2008, 36(26): 11376-11377.
- YAN X Z, ZHANG R, MENG Z G, SUN G Q, ZHOU T, GUO S D. Establishing of a real-time fluorescence quantitative PCR assay for detecting the copy number of *Bt* gene in transgenic insect-resistant cotton[J]. Journal of Anhui Agricultural Science, 2008, 36(26): 11376-11377. (in Chinese)
- [13] 唐静, 贾俊涛, 赵丽青, 王静, 张健, 姜英辉, 徐彪, 王昌军, 马云. 四种基因定量方法对实时荧光 PCR 与微滴式数字 PCR 检测霍乱弧菌基因表达量的分析[J]. 现代食品科技, 2017, 33(3): 93-98.
- TANG J, JIA J T, ZHAO L Q, WANG J, ZHANG J, JIANG Y H, XU B, WANG C J, MA Y. Real-time and droplet digital PCR analyses for detection of *Vibrio cholerae* gene expression by four gene quantification methods[J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(3): 93-98. (in Chinese)
- [14] ZHANG L, LI W, PARVIN R, WANG X, FAN Q, YE F. Screening prostate cancer cell-derived exosomal microRNA expression with photothermal-driven digital PCR[J]. Advanced Functional Materials, 2022, 32(48): 2207879.
- [15] CIRILLO P D R, MARGIOTTI K, MESORACA A, GIORLANDINO C. Quantification of circulating microRNAs by droplet digital PCR for cancer detection[J]. BMC Research Notes, 2020, 13: 351.
- [16] 朱杰, 李招云, 王攀, 陈文举, 徐友文. 肝癌患者血清中 4 种 miRNAs 的表达研究[J]. 医学研究杂志, 2018, 47(7): 63-67.
- ZHU J, LI Z Y, WANG P, CHEN W J, XU Y W. Four kinds of miRNAs in hepatocellular carcinoma patients serum expression research[J]. Journal of Medical Research, 2018, 47(7): 63-67. (in Chinese)
- [17] 张明明, 肖剑, 林秀敏, 尹玮璐, 梁美丹, 周露, 孙雪奇. 多重微滴数字 PCR 同时定量检测三种食源性致病菌 DNA 拷贝数[J]. 农业生物技术学报, 2022, 30(3): 606-618.
- ZHANG M M, XIAO J, LIN X M, YIN W L, LIANG M D, ZHOU L, SUN X Q. Simultaneous quantification method of DNA copy number for three food-borne pathogens by multiplex droplet digital PCR[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2022, 30(3): 606-618. (in Chinese)
- [18] 赵新, 刘双, 刘娜, 李瑞环, 曹英芳, 兰青阔, 王永. 利用微滴数字 PCR 技术分析转基因大豆‘GE-J12’中外源基因的拷贝数[J]. 中国农业大学学报, 2022, 27(1): 58-66.
- ZHAO X, LIU S, LIU N, LI R H, CAO Y F, LAN Q K, WANG Y. Analysis of the copy number of exogenous gene in transgenic soybean ‘GE-J12’ with droplet digital PCR[J]. Journal of China Agricultural University, 2022, 27(1): 58-66. (in Chinese)
- [19] HINDSON B J, NESS K D, MASQUELIER D A, BELGRADER P, HEREDIA N J, MAKAREWICZ A J, BRIGHT I J, LUCERO M Y, HIDDESEN A L, LEGLER T C, KITANO T K, HODEL M R, PETERSEN J F, WYATT P W, STEENBLOCK E R, SHAH P H, BOUSSE L J, TROUP C B, MELLE J C, WITTMANN D K, ERNDT N G, CAULEY T H, KOEHLER R T, SO A P, DUBE S, ROSE K A, MONTESCLAROS L, WANG S, STUMBO D P, HODGES S P, ROMINE S, MILANOVICH F P, WHITE H E, REGAN J F, KARLIN-NEUMANN G A, HINDSON C M, SAXONOV S, COLSTON B W. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number[J]. Analytical Chemistry, 2011, 83(22): 8604-8610.
- [20] NARANCIO R, JOHN U, MASON J, GIRALDO P, SPANGENBERG G. Digital PCR (dPCR) and qPCR mediated determination of transgene copy number in the forage legume white clover (*Trifolium repens*) [J]. Molecular Biology Reports, 2021, 48(4): 3069-3077.
- [21] XUE B T, GUO J L, QUE Y X, FU Z W, WU L G, XU L P. Selection of suitable endogenous reference genes for relative copy number detection in sugarcane[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(5): 8846-8862.