

## 利用双重数字 PCR 方法检测进口粮谷中携带地肤的 EPSPS 基因拷贝数

吴晶, 伏建国, 刘晓宇, 许忠祥, 李洋, 郭静, 杨晓军, 李井干\* (南京海关动植物与食品检测中心, 江苏南京 210014)

**摘要** 建立了双重数字 PCR 检测地肤 EPSPS 基因拷贝数的方法, 对进口粮谷中携带的 8 个地肤样品进行检测, 发现 2 个样品的 EPSPS 相对拷贝数小于 1, 6 个样品 EPSPS 相对拷贝数大于 5, 其中一个样品 EPSPS 相对拷贝数高达 45.67。由此可见, 进口北美粮谷携带抗草甘膦地肤的比例很高。

**关键词** 双重数字 PCR; 地肤; EPSPS 基因拷贝数; 进口粮谷

**中图分类号** S41-3 **文献标识码** A

**文章编号** 0517-6611(2022)09-0179-03

**doi**: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.09.044

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Application of Duplex Droplet Digital PCR for Detection of EPSPS Gene Copy Number of *Kochia scoparia* in Imported Grains

WU Jing, FU Jian-guo, LIU Xiao-yu et al (Nanjing Customs Animal Plant and Food Inspection Center, Nanjing, Jiangsu 210014)

**Abstract** A double digital PCR method was established to detect the EPSPS gene copy number of *Kochia scoparia*. Eight samples of *Kochia scoparia* carried in imported grains were detected. It was found that the relative copy number of EPSPS of 2 samples was less than 1, the relative copy number of EPSPS of 6 samples was greater than 5, and the relative copy number of EPSPS of one sample was as high as 45.67. It can be seen that the proportion of imported North American grains carrying glyphosate-resistant kochia is very high.

**Key words** Double digital PCR; *Kochia scoparia*; EPSPS gene copy number; Imported grain

草甘膦是一种非选择性的灭生除草剂, 由于其具有杀草谱广、毒性低、安全性好、低土壤残留等特点, 在全世界广泛应用, 为全球农业生产作出了巨大贡献<sup>[1]</sup>。随着抗草甘膦转基因农作物在世界范围内的推广应用, 全球农业生产者对草甘膦的依赖日益增加, 从而导致草甘膦的使用量迅猛增长。由于长期单一使用草甘膦, 对草甘膦产生抗药性的杂草不断出现, 目前已有 45 种杂草被报道对草甘膦产生了抗药性<sup>[2]</sup>, 对全世界的农业生产及生态环境安全都造成了巨大危害。

在北美地区, 地肤是一种外来杂草, 20 世纪 80 年代已经在加拿大和美国西部地区广泛分布<sup>[3]</sup>, 可对当地小麦及甜菜造成 30%~60% 的减产<sup>[4]</sup>。随着化学除草剂的长时间应用, 地肤已对多种除草剂产生抗药性<sup>[5]</sup>, 北美多地作物田已报道发现抗草甘膦地肤<sup>[6-8]</sup>。我国每年从北美进口大量的转基因粮谷, 其中携带大量的杂草籽, 包括地肤。在进口粮谷中很可能含有抗草甘膦的地肤种群, 一旦这些抗药性地肤在卸载、运输或加工的某个环节发生逃逸并在我国传播扩散, 势必会影响我国农业生产和生态环境安全。因此, 在进口过程中对地肤的抗药性进行检测, 有助于对草甘膦地肤进行监测和防控。

植物对除草剂的抗性有多种, 包括作用靶点抗性、非靶点抗性和代谢解毒等<sup>[1]</sup>。Wiersma 等<sup>[9]</sup>研究发现, 地肤的抗药性主要为靶标基因 5-烯醇式-丙酮酰莽草酸-3-磷酸合成酶(5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, EPSPS) 的扩增, EPSPS 基因的拷贝数与地肤的草甘膦抗性成正比, 拷贝数越高, 抗药性越强。因此, 通过检测 EPSPS 基因就可以

快速检测进口粮谷中携带地肤的草甘膦抗性。Wiersma 等<sup>[9]</sup>建立了地肤 EPSPS 基因的荧光定量 PCR 检测方法, 由于该方法只是相对定量, 受扩增效率、反应体系、计算方法等多方面因素影响, 精确性并不高。近年来, 数字 PCR 技术快速发展, 相对于荧光定量 PCR 技术, 其具有准确度和灵敏度高、绝对定量等优点<sup>[10]</sup>。为了加强对进口粮谷中携带地肤的草甘膦抗性的检测, 该研究建立了快速、准确的双重数字 PCR 检测方法, 实现对地肤抗药性 EPSPS 基因的精准检测。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 试验材料均来自进口粮谷中截获, 详细信息见表 1。

表 1 试验材料信息

Table 1 Test material information

样品编号 Sample No.	种子粒数 Number of seeds	粮谷种类 Grain type	来源国 Country of origin	截获年份 Year of interception
201800470	1	大豆	美国	2018
2111001496	5	高粱	美国	2021
2011000282	5	大豆	美国	2020
2111001502	5	大豆	加拿大	2021
201800469	10	大豆	美国	2018
2111000266	5	小麦	法国	2021
201801628	5	大豆	美国	2018
2111000832	5	大豆	美国	2021

## 1.2 方法

**1.2.1 DNA 提取。** 挑取地肤种子 1~10 粒, 放置于 2 mL 的 EP 管中, 加入少许石英砂和 2 颗直径 5.55 mm 的钢珠, 放入振动研磨仪(Retsch MM400)中研磨 1 min。研磨后的样品使用 DNeasy Plant Mini Kit(Qiagen)进行 DNA 提取, 提取方法参照试剂盒使用说明。DNA 浓度和质量使用 NanoDrop 1000 进行检测。

**1.2.2 引物及探针合成。** 目标基因 EPSPS 引物和探针的设

**基金项目** 南京海关科研项目(2019KJ13); 江苏省“333 工程”科研项目(BRA2019320)。

**作者简介** 吴晶(1981—), 女, 云南昆明人, 高级农艺师, 硕士, 从事进境杂草鉴定方面的研究。\* 通信作者, 农艺师, 硕士, 从事进境杂草鉴定方面的研究。

**收稿日期** 2021-09-07; **修回日期** 2021-12-21

计根据 GenBank 上发布的地肤 EPSPS 序列 (KJ374721.1), 正反向引物和探针序列分别为 DF-EPSPS-FP: AACATTTGCGTGCCATTGAT; DF-EPSPS-RP: ACCGTCTCTGATAGCTGTGGG; DF-EPSPS-P: VIC-CGATGACTCTTGCTGTTGTCCTA-BHQ1。内参基因 ALS 引物和探针的设计根据 GenBank 上发布的地肤 ALS 基因序列 (EU517498.1), 正反向引物和探针序列分别为 DF-ALS-FP: CTTCTTGAGCAGATTGTGAGGTT; DF-ALS-RP: CCCAGTCAACTCGACGA-ATT; DF-ALS-P: FAM-ACCCGCCTCCACATACAACACA-BHQ1。

### 1.2.3 数字 PCR 扩增。

**1.2.3.1 数字 PCR 探针法体系 (20  $\mu$ L)。** ddPCR supermix 10  $\mu$ L、2 对引物和 2 个探针各 0.5  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu$ L、DNA 模板 1  $\mu$ L。

**1.2.3.2 数字 PCR 微滴生成。** 使用 QX200 Droplet Digital PCR 系统 (Bio-Rad), 将 20  $\mu$ L 样品反应体系加至 DG8 cartridge 中间一排 8 个孔内, 在 DG8 cartridge 最底下一排 8 个孔中各加入 70  $\mu$ L 微滴生成油, 盖上胶垫, 平稳放置于微滴生成仪中, 开始生成微滴于 DG8 cartridge 最上面一排孔内; 将微滴液体移至 96 孔板内 (约 40  $\mu$ L), 在 96 孔板上盖封口膜, 红色标记线朝上, 在预热好的 PX1 热封仪内进行封膜 (180  $^{\circ}$ C, 10 s), 封好膜之后的 96 孔板放入 PCR 仪中进行扩

增反应。

**1.2.3.3 数字 PCR 扩增程序。** 95  $^{\circ}$ C, 10 min 预变性; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58  $^{\circ}$ C 退火 60 s, 40 个循环; 98  $^{\circ}$ C 热失活 10 min。

**1.2.4 基因拷贝数检测。** PCR 扩增结束后将 96 孔板置入 QX200 Droplet Reader 微滴读取仪中, 打开 QuantaSoft 软件, 先做一次 Prime 后再做 Flush System, 之后对 96 孔板中样品信息进行设定, 完成后进行自动分析, 人工核实后保存结果。

## 2 结果与分析

**2.1 DNA 提取** 受样品量限制, 用于提取 DNA 的地肤种子粒数、大小、成熟度、来源、保存时间等均存在差异, 获得的 DNA 浓度也存在差异, 最低为 0.73 ng/ $\mu$ L, 最高为 9.72 ng/ $\mu$ L (表 2)。

**2.2 EPSPS 基因拷贝数** 20  $\mu$ L 的数字 PCR 反应体系中, 每份样品的 DNA 用量及检测出的 EPSPS 和 ALS 基因的拷贝数见表 2。根据数据结果可以看出, 样品的重复性较好。由于不同样品的 EPSPS 基因扩增量不同, 样品之间 EPSPS 拷贝数差异较大, 20  $\mu$ L 的反应体系中, EPSPS 最高拷贝数为 7 360, 最低拷贝数为 14, 平均拷贝数为 2 978, 而内参基因 ALS 的一致性相对较好, 最高拷贝数为 532, 最低拷贝数为 22, 平均拷贝数为 260。

表 2 8 份地肤样品 DNA 浓度及 EPSPS 和 ALS 基因拷贝数

Table 2 DNA concentration and copy number of EPSPS and ALS genes in 8 *Kochia scoparia* samples

样品编号 Sample No.	DNA 浓度 DNA concentration ng/ $\mu$ L	PCR 中 DNA 用量 DNA dosage in PCR/ng	EPSPS 拷贝数 EPSPS copy number			ALS 拷贝数 ALS copy number		
			重复 1 Repetition 1	重复 2 Repetition 2	重复 3 Repetition 3	重复 1 Repetition 1	重复 2 Repetition 2	重复 3 Repetition 3
201800470	0.73	0.073	38	14	42	134	22	164
2111001496	1.41	0.141	2 340	2 720	2 500	210	242	196
2011000282	3.37	0.337	2 960	3 240	3 720	260	274	256
2111001502	2.71	0.271	5 140	5 960	5 220	330	446	388
201800469	9.72	0.972	3 500	3 820	4 200	264	532	508
2111000266	2.23	0.223	438	262	194	432	256	226
201801628	2.83	0.283	1 260	1 390	1 420	184	226	230
2111000832	2.12	0.212	6 660	7 360	7 080	152	146	164

利用 EPSPS 的拷贝数除以 ALS 的拷贝数, 就可以获得地肤抗药性基因 EPSPS 的相对拷贝数 (图 1)。从图 1 可以看出, EPSPS 相对拷贝数的重复性较好, 201800470 和 2111000266 这 2 份地肤样品的 EPSPS 相对拷贝数小于 1, 而其他 6 份地肤样品的 EPSPS 相对拷贝数均大于 5, 其中 2111000832 美国大豆中的地肤 EPSPS 相对拷贝数高达 45.67。

**2.3 数字 PCR 的灵敏度** 选取样品 2111001496 的 DNA 原液进行梯度稀释, 调整数字 PCR 反应体系中 DNA 终浓度分别为 0.100 00、0.050 00、0.025 00、0.010 00、0.001 00、0.000 10 和 0.000 01 ng/ $\mu$ L, 数字 PCR 的结果见图 2 和图 3。从图 2 可以看出, 数字 PCR 的灵敏度很高, 在 20  $\mu$ L 浓度为 0.000 01 ng/ $\mu$ L 样品 DNA 中也可以检测出 EPSPS 基因的拷贝数为 2。

## 3 讨论

杂草对草甘膦产生抗药性的机理有多种, EPSPS 基因拷

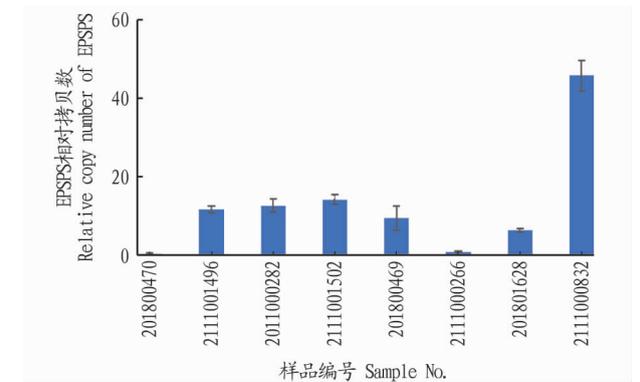


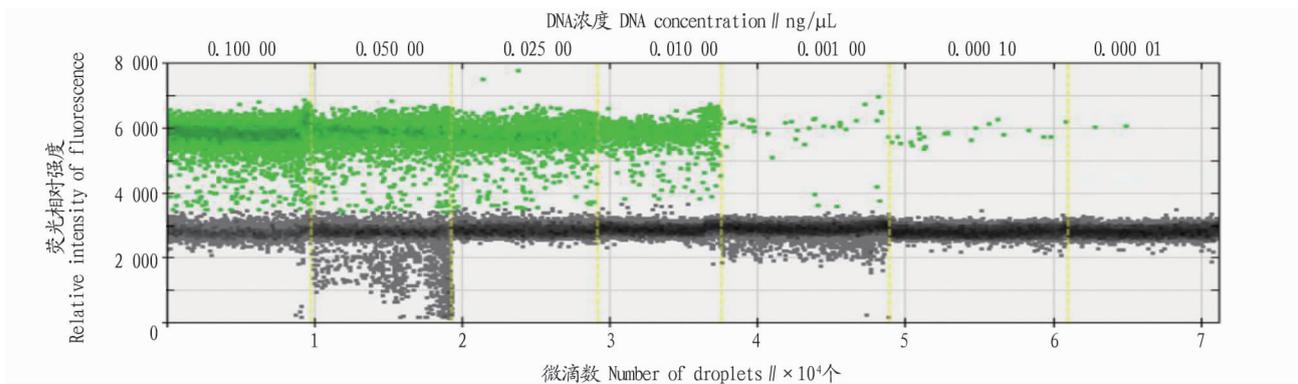
图 1 8 份地肤样品 EPSPS 相对拷贝数

Fig. 1 Relative copy number of EPSPS in 8 *Kochia scoparia* samples

贝数的增加是其中最为重要的一种形式。目前已发现地肤、长芒苋、牛筋草等杂草对草甘膦产生抗药性与 EPSPS 的扩增

相关<sup>[11]</sup>。Vila-Aiub 等<sup>[12]</sup>研究发现,EPSPS 与 ALS 相对拷贝数为 53 的长芒苋种群,在 2 000 g/hm<sup>2</sup> 高剂量草甘膦处理后,仍然有 95% 的存活率。Gaines 等<sup>[13]</sup>建立了地肤 EPSPS

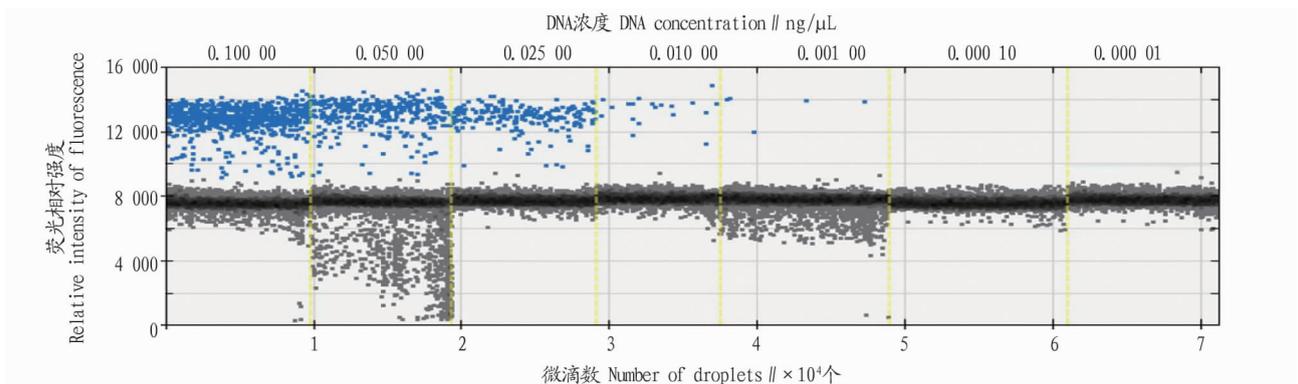
基因拷贝数与草甘膦抗性的相关性模型,利用 EPSPS 基因拷贝数检测方法来替代生物学检测方法,既快速又节省费用。



注:绿色为阳性微滴,灰色为阴性微滴

Note: Green is positive droplet, gray is negative droplet

图 2 EPSPS 数字 PCR 微滴  
Fig. 2 EPSPS digital PCR droplets



注:蓝色为阳性微滴,灰色为阴性微滴

Note: Blue is positive droplet, gray is negative droplet

图 3 ALS 数字 PCR 微滴  
Fig. 3 ALS digital PCR droplet

从现有文献来看,对 EPSPS 相对拷贝数的检测均使用实时荧光定量 PCR 方法,利用 EPSPS 基因和内参基因 ALS 的  $C_T$  值的差异 ( $C_T = C_T^{EPSPS} - C_T^{ALS}$ ) 来计算 EPSPS 的相对拷贝数<sup>[14]</sup>。由于荧光定量 PCR 通常会受到扩增效率的影响,EPSPS 和 ALS 是在不同的反应体系中扩增,2 个反应体系中模板浓度或其他条件只要有微小差异,就会对  $C_T$  值的精确性和重复性造成影响。因此,利用荧光定量 PCR 检测基因拷贝数并不十分精确。而该研究利用双重数字 PCR 技术,解决了上述不足,既可以在同一 PCR 体系中扩增,又可以直接检测出目标基因和内参基因的绝对拷贝数,检测的精确性和重复性好于荧光定量 PCR 方法。另外,数字 PCR 的灵敏度也特别高,浓度为 0.000 01 ng/μL 也可以检测到 EPSPS 阳性拷贝。

Wiersma 等<sup>[9]</sup>检测地肤抗性种群中基因 EPSPS 和 ALS 相对拷贝数为 3.1~8.5, Gaines 等<sup>[13]</sup>报道的抗性地肤种群的 EPSPS 和 ALS 相对拷贝数为 15~20。该研究检测出地肤 EPSPS 的相对拷贝数最高为 45.67,如果按照抗药性水平与

EPSPS 拷贝数正相关来推测,目前所测进口粮谷中地肤的抗药性水平比之前报道的抗性种群高很多。该研究仅挑取了 8 批次粮谷中的地肤进行试验,其中就有 6 批次中地肤的 EPSPS 相对拷贝数大于 5,分别来自美国大豆、美国高粱和加拿大大豆,说明抗药性地肤已经在北美农作物田广泛分布。因此,应关注和重视进口粮谷中抗药性杂草的检测。

#### 参考文献

- [1] 陈世国,强胜,毛婵娟. 草甘膦作用机制和抗性研究进展[J]. 植物保护,2017,43(2):17-24.
- [2] 俞蕴馨,伏建国,李井干,等. 全球抗草甘膦杂草的发生概况与检疫思考[J]. 植物检疫,2020,34(5):21-27.
- [3] FORCELLA F. Final distribution is related to rate of spread in alien weeds [J]. Weed research,1985,25(3):181-191.
- [4] FRIESEN L F, BECKIE H J, WARWICK S I, et al. The biology of Canadian weeds. 138. *Kochia scoparia* (L.) Schrad. [J]. Canadian journal of plant science,2009,89(1):141-167.
- [5] VARANASI V K, GODAR A S, CURRIE R S, et al. Field-evolved resistance to four modes of action of herbicides in a single kochia (*Kochia scoparia* L. Schrad.) population [J]. Pest management science,2015,71(9):1207-1212.

(下转第 184 页)

于定量限,质控样品中的回收率等指标均达到分析要求。

表 2 阿奇霉素保留时间和质谱参数

Table 2 Retention time and MS parameters of azithromycin

通道 Channel	保留时间 Retention time//min	前体离子 Precursor ion( <i>m/z</i> )	产物离子 Product ion( <i>m/z</i> )	Q1Pre 偏差 Q1Pre deviation//V	碰撞能量 CE V	Q3Pre 偏差 Q3Pre deviation//V
通道 1 Channel 1	2.034	749.2	591.30	-20.0	-31.0	-40.0
通道 2 Channel 2	2.034	749.2	158.10	-20.0	-43.0	-30.0

### 3 结论

该研究采用高效液相色谱-串联质谱法,建立了鸡肉中阿奇霉素兽药残留的快速分析方法。与传统的三重四级杆串联质谱法相比,该方法前处理方法简便,大大提高了检测效率,极大提高了方法定性的准确性和定量水平。综上所述,该研究建立的方法快速、准确、灵敏度高,适用于鸡肉中阿奇霉素兽药残留的快速测定,为鸡肉进行风险监控提供了一种有力的技术手段,也为食品安全监管提供有效保障。

### 参考文献

- [1] DAVIS J L, GARDNER S Y, JONES S L, et al. Pharmacokinetics of azithromycin in foals after i. v. and oral dose and disposition into phagocytes [J]. *J Vet Pharmacol Ther*, 2002, 25(2): 99-104.
- [2] 余立, 王俊秋, 王国兰, 等. 薄层色谱法检测阿奇霉素及其有关物质 [J]. *中国抗生素杂志*, 2001, 26(3): 227-229.
- [3] 侯金凤, 寇晋萍, 王光裕, 等. 乳糖酸阿奇霉素注射液质量评价 [J]. *中国抗生素杂志*, 2019, 44(3): 320-326.
- [4] 李传响, 汪玉萍. HPLC 法测定注射用阿奇霉素的含量 [J]. *安徽医药*, 2015, 19(6): 1082-1083.
- [5] 吴青一, 瞿燕萍, 周旭如. 阿奇霉素片含量的 HPLC 法测定 [J]. *上海医药*, 2018, 39(17): 76-79.
- [6] 陈雅莉, 陈刚, 刘哲鹏. 复方阿奇霉素颗粒剂的含量测定 [J]. *华西药理学杂志*, 2018, 33(4): 410-412.
- [7] 吴献花, 周小华, 侯霞, 等. 微柱高效液相色谱法测定阿奇霉素含量 [J]. *云南民族大学学报(自然科学版)*, 2006, 15(1): 42-44.
- [8] 王宇驰, 唐克慧, 张春然, 等. UPLC 法测定阿奇霉素分散片的含量 [J].

*中国抗生素杂志*, 2015, 40(10): 756-759.

- [9] MIGUEL L, BARBAS C. LC determination of impurities in azithromycin tablets [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2003, 33(2): 211-217.
- [10] AL-RIMAWI F, KHAROUF M. Analysis of azithromycin and its related compounds by RP-HPLC with UV detection [J]. *J Chromatogr Sci*, 2010, 48(2): 86-90.
- [11] 曹建中. 阿奇霉素的高效液相色谱法测定 [J]. *北方药学*, 2019, 16(10): 1-2.
- [12] 许卓妮, 李悦, 沈舜义. 阿奇霉素中有关物质的 LC-MS 法检测 [J]. *中国医药工业杂志*, 2013, 44(12): 1262-1267.
- [13] 陈江飞, 张典瑞, 卜凡龙, 等. 小鼠血清及组织中阿奇霉素的 HPLC-MS 测定 [J]. *中国医药工业杂志*, 2006, 37(3): 181-183.
- [14] 武峰, 赵秀丽, 杨波, 等. LC-MS/MS 法测定人泪液中阿奇霉素浓度 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2018, 34(21): 2550-2553.
- [15] 谭亚亚, 李博, 杨欣, 等. 高效液相色谱-质谱联用法测定血浆中阿奇霉素浓度 [J]. *中国药业*, 2012, 21(19): 11-12.
- [16] 葛庆华, 康修远, 马欢, 等. LC-MS/MS 生物样品分析方法的应用与评价 [J]. *中国医药工业杂志*, 2019, 50(1): 93-98.
- [17] 康健, 王丹. 高效液相色谱-质谱联用法测定人体内阿奇霉素血药浓度 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2013, 12(17): 1366-1367.
- [18] 汪金菊, 曾明华, 许世富, 等. 高效液相色谱荧光法检测鸡肌肉中阿奇霉素残留 [J]. *中国家禽*, 2010, 32(9): 25-28.
- [19] 徐广伟, 黄春贵, 王震, 等. 高效液相-紫外法检测肉鸡组织中的阿奇霉素残留 [J]. *食品科学*, 2009, 30(10): 195-198.
- [20] 韦何雯. HPLC-MS/MS 法检测家禽鸡可食组织中阿奇霉素的残留量 [J]. *食品研究与开发*, 2014, 35(13): 115-118.
- [21] 栗有志, 刘绪斌, 齐鑫, 等. QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法测定动物原食品中阿奇霉素残留 [J]. *分析实验室*, 2014, 33(12): 1425-1429.

(上接第 181 页)

- [6] BECKIE H J, BLACKSHAW R E, LOW R, et al. Glyphosate-and acetolactate synthase inhibitor-resistant kochia (*Kochia scoparia*) in western Canada [J]. *Weed science*, 2013, 61(2): 310-318.
- [7] WAITE J, THOMPSON C R, PETERSON D E, et al. Differential kochia (*Kochia scoparia*) populations response to glyphosate [J]. *Weed science*, 2013, 61(2): 193-200.
- [8] GODAR A S, STAHLMAN P W, JUGULAM M, et al. Glyphosate-resistant kochia (*Kochia scoparia*) in Kansas: EPSPS gene copy number in relation to resistance levels [J]. *Weed science*, 2015, 63(3): 587-595.
- [9] WIERSMA A T, GAINES T A, PRESTON C, et al. Gene amplification of 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase in glyphosate-resistant *Kochia scoparia* [J]. *Planta*, 2015, 241(2): 463-474.
- [10] BHARUTHRAM A, PAXIMADIS M, PICTON A C P, et al. Comparison of

a quantitative Real-Time PCR assay and droplet digital PCR for copy number analysis of the *CCL4L* genes [J]. *Infection, genetics and evolution*, 2014, 25: 28-35.

- [11] SAMMONS R D, GAINES T A. Glyphosate resistance: State of knowledge [J]. *Pest manag science*, 2014, 70(9): 1367-1377.
- [12] VILA-AIUB M M, GOH S S, GAINES T A, et al. No fitness cost of glyphosate resistance endowed by massive EPSPS gene amplification in *Amaranthus palmeri* [J]. *Planta*, 2014, 239(4): 793-801.
- [13] GAINES T A, BARKER A L, PATTERSON E L, et al. EPSPS gene copy number and whole-plant glyphosate resistance level in *Kochia scoparia* [J]. *PLoS One*, 2016, 11(12): 1-11.
- [14] GAINES T A, ZHANG W L, WANG D F, et al. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri* [J]. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 2010, 107(3): 1029-1034.