

大豆和玉米加工产品中外源转基因成分检测技术的建立

吴家林, 张敬平, 胡 遴, 钮伟民, 尤凤兴

(江苏省无锡市疾病预防控制中心, 无锡 214002)

摘要 采用PCR技术检测CaMV 35S启动子,并进一步通过PCR检测RoundUp Ready Soybean (RRS)和Bt176 Maximaizer的特异性DNA片段,判断大豆和玉米加工产品中是否含相应转基因成分。在1份豆粕和豆腐样品中检测到了RoundUp Ready大豆特异性的498 bp片段,而在玉米粒样品中检测到了Bt176特异性转基因成分。PCR检测的灵敏度达到0.1%,稳定性良好。结果表明,PCR技术检测外源基因是灵敏和准确的,可以广泛地应用到转基因作物及其加工产品的转基因成分检测中。

关键词 大豆;玉米;加工产品;PCR检测;转基因成分

中图分类号 S 565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)01-0084-05

DETECTION OF GENETICALLY MODIFIED COMPONENTS IN PRODUCTS DERIVED FROM SOYBEAN AND MAIZE

WU Jia-lin, ZHANG Jing-ping, HU Lin, NIU Wei-min, YOU Feng-xing

(Wuxi Center for Disease Control and Prevention, Wuxi 214002)

Abstract The purpose of this study was to establish detection method on genetically modified components in products derived from soybean and maize using PCR technology. The presence of processed products were investigated by PCR detection of CaMV 35S promoter, and the presence of Round up Ready Soybean (RRS), Bt176 Maximaizer in products derived from soybean and maize were further determined to detect their specific DNA fragments respectively by PCR. One bean cake sample and one bean curd sample were verified a 498bp RRS specific DNA fragment by PCR detection, Bt176 Maximaizer specific PCR products were obtained with the corn grain DNA samples used as PCR templates. The research also succeeded in settling 0.1% precision degree of genetically modified organisms which ensured its stable property. The results showed that PCR analysis for the transgene was feasible and reliable. The PCR analysis of transgenic components could be widely used in various transgenic plants and their products.

Key words Soybean; Maize; Processed products; Qualitative PCR; Genetically modified Components

收稿日期:2006-07-18

基金项目:江苏省预防医学科研基金资助项目(YZ200418)

作者简介:吴家林(1973-),男,硕士,主管技师,研究方向为转基因食品检测研究;张敬平(1957-),男,副主任医师,研究方向为预防医学与公共卫生管理。吴家林、张敬平为共同第一作者。

目前全球转基因生物(genetically modified organisms, GMO)商品化生产迅猛发展,自 1996 年生物技术作物首次商业性种植以来,10 年间其种植面积每年都以两位数的速度增长,参与种植的国家从 6 个增至 21 个。转基因作物的全球种植面积增加了 50 多倍^[1]。就作物种类而言,Bt 大豆面积占转基因作物全球种植面积的 60%(5440 万 hm^2);其次为玉米 24%(2120 万 hm^2);就导入的外源基因性状而言,耐除草剂性状种植面积第一,其次是抗虫和多性状。耐除草剂的大豆、玉米和油菜占全球转基因作物总种植面积的 71%(6370 万 hm^2)。转基因农作物的大规模种植和消费流通引起了世界各国政府和民众对其安全性的担忧,各国纷纷出台相关法律法规进行监督管理,2001 年,国务院发布了《农业转基因生物安全管理条例》,明确规定了在中华人民共和国境内销售列入农业转基因生物目录的农业转基因生物,应当有明显的标识。由于缺乏系统的、完整的、统一的转基因农产品检测技术标准体系,在一定程度上影响了我国转基因农产品强制标识制度的实施。建立规范、准确、快速的转基因成分检测技术,是维护消费者知情同意权和在国际贸易中维护国家利益的重要保障。

转基因大豆 40-3-2 (Roundup ready) 是 Monsanto 公司产品。1994 年在美国被批准商品化生产,是目前最多被用于生产食品和饲料的转基因产品。该品系性状为耐除草剂(草甘膦)。所转的外源基因为耐除草剂基因 CP4 EPSPS,由 CaMV35S 启动子和 NOS 终止子调控。转基因玉米 Bt176 是 Syngenta Seeds, Inc. 公司产品。1995 年在美国、加拿大被批准商品化生产。该品系性状为抗虫(欧洲玉米螟)。转入的外源基因为抗虫基因 CryIA(b),由 CaMV35S 启动子和 CaMV35S 终止子调控。本文以上述两种转基因作物的加工产品为试验材料,采用定性 PCR 方法检测其中的外源转基因成分,以期建立快速、灵敏、有效的转基因产品检测技术。

1 材料与方法

1.1 试验材料

Fluka 公司转基因成分含量分别为 5%、2%、1%、0.5%、0.1%、0 的转基因大豆 Roundup Ready 标准品和转基因玉米 Bt176 标准品;非转基因大豆和玉米购自超市;检测样品豆粕、豆腐、豆奶、酱油、

玉米粒、速溶玉米片均购自超市。

1.2 试剂

DNA 提取试剂盒 (DNA Extriction Kit for GMO Detection Ver. 2.0) 购自宝生物工程(大连)有限公司,DNA 聚合酶、琼脂糖、三羟甲基氨基甲烷、DNA 分子量 marker、CTAB 等均购自上海生工。

1.3 仪器

GeneAmp2400 型 PCR 扩增仪 (PE 公司), Tanon 4100 型凝胶成像分析系统(上海天能科技公司), EPS-300 型电泳仪(上海天能科技公司)。

1.4 检测方法

1.4.1 试样的预处理 待检测的固体试样研磨成细粉状。非油脂类液态试样,如粘稠状食品可直接用于 DNA 的提取。酱油等液态加工品可取 50mL 以上试样,经 10000r/min 离心 10min,弃去上清液,保留沉淀用于 DNA 的抽提;或者 80℃ 加热蒸发水分后,取干物质用于 DNA 提取;或者在冷冻干燥后,取干物质用于 DNA 提取。

1.4.2 基因组 DNA 的提取与纯化 大豆和玉米原料及标准品采用宝生物工程(大连)有限公司生产的 GMO DNA 提取试剂盒并按其操作说明书进行。加工品采用 CTAB 法提取 DNA^[2]:将 100mg 经预处理的试样,在液氮中充分研磨成粉末后加入 400 μL 冰上预冷的 CTAB 提取缓冲液 I 中。加入 500 μL 65℃ 预热的 CTAB 提取缓冲液 II,1 μL 2-巯基乙醇,混匀,65℃ 保温 30min~90min,其间不时轻缓颠倒混匀。待冷却至室温后加入 5 μL LRNase A 贮液,室温下放置 30min。加入 450 μL 三氯甲烷+异戊醇,轻缓颠倒混匀溶液。12000r/min 离心 2min 至分相。将上清液转移至干净的离心管中,依次加入 600 μL 异丙醇及 60 μL 乙酸钠溶液,轻缓颠倒混匀。12000r/min 离心 10min。弃上清液,加入 800 μL 76%乙醇,12000r/min 离心 5min,弃上清液后,再加入 100 μL 70%乙醇洗涤沉淀。12000r/min 离心 5min,弃上清液。除去残留的乙醇,待沉淀干燥后,DNA 沉淀溶解于 100 μL TE 缓冲液中, -20℃ 保存备用。

1.4.3 PCR 扩增反应

1.4.3.1 PCR 引物设计合成 所用引物由宝生物工程(大连)有限公司合成,引物信息如表 1 所示。

1.4.3.2 PCR 反应条件和反应体系 2.5 μL PCR 反应缓冲液(10X),dNTP 各 0.2mmol/L,引物

(各 0.5umol/L) 0.5μL, Taq DNA 聚合酶 1U, DNA 模板 5uL,用灭菌超纯水补齐至 25μL。

表 1 PCR 引物序列和扩增产物

Table 1 Primer sequences and amplified products

引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence	基因 Gene	扩增产物大小 Length of PCR product
CaMV35S ^[3]	GCTCCTACAAATGCCATCA GATAGTGGGATTGTGCGTCA	花椰菜花叶病毒 35S 启动子	195bp
大豆:Soybean Lectin ^[4]	GCCCTCTACTCCACCCCATCC GCCCATCTGCAAGCCTTTTTGTG	大豆内源凝集素基因	118bp
CP4-EPSPS ^[8]	CCTTCATGTTTCGGCGGTCTCG; GCGTCATGATCGGCTCGATG	5-烯醇丙酮酸莽草酸 -3-磷酸合成酶基因	498bp
玉米:Maize Zein	TGAACCCATGCATGCAGT GGCAAGACCATTTGGTGA	玉米内源醇溶蛋白基因	173bp
CryIA(b)	CTCTCGCCGTTCATGTTTCGT GGTCAGGCTCAGGCTGATGT	苏云金芽孢杆菌杀虫 毒蛋白基因	211bp

1.4.3.3 对照的设置 为避免实验污染而造成 PCR 扩增结果出现假阳性或假阴性,进行 PCR 检测时必须设置阳性对照、阴性对照和空白对照。阳性对照用阳性材料提取的 DNA 作为模板。阴性对照用阴性材料提取的 DNA 作为模板。空白对照用 ddH₂O 代替 DNA 模板。

1.4.4 PCR 结果观察分析 2%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,凝胶成像分析系统观察记录电泳结果。

表 2 PCR 反应条件

Table 2 PCR conditions

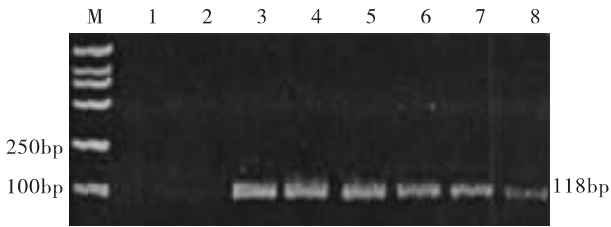
扩增基因(序列) Genes to be amplified	预变性 Initial denaturalization	循环 Cycle	循环数 Cycle amounts	末次延伸 Final extension
CaMV35S 启动子	94℃,3min	94℃,30s 54℃,40s 72℃,1min	40	72℃,3min
Lectin	95℃,5min	95℃,30s 60℃,30s 72℃,1min	35	72℃,3min
CP4-EPSPS	95℃,5min	94℃,30s 58℃,1min 72℃,1min	40	72℃,10min
Zein	95℃,5min	95℃,30s 64℃,30s 72℃,1min	40	72℃,5min
CryIA(b)	94℃,2min	94℃,40s 55℃,1min 72℃,1min	35	72℃,5min

2 结果与讨论

2.1 大豆和玉米加工产品的 DNA 提取

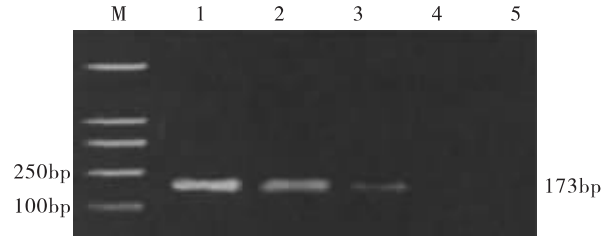
提取到高质量的总 DNA 是后续 PCR 扩增反应获得成功的前提条件,而加工产品尤其是深加工产品的 DNA 提取是转基因产品检测的瓶颈之一。食品原料在加工过程中往往要经历高温、高压、化学

反应和机械研磨等容易破坏核酸完整性的步骤,导致所转基因片段出现不同程度的断裂降解^[5],因而难以提取或检测到由转基因原料加工制成的产品中的转基因成分,容易造成假阴性。本文采用大豆内源凝集素基因 Lection 和玉米内源醇溶蛋白基因 Zein 作为内参照基因进行 PCR 扩增来检验 DNA 提取的质量。图 1 和 2 显示均扩增出了相应条带,表明所提取的 DNA 能够满足检测需要。



M. DL2000 DNA marker;1. 空白对照;2. 阴性对照,以玉米 DNA 为模板;3. 0%转基因大豆标准品;4. 5%转基因大豆标准品;5. 豆粕;6. 豆腐;7. 豆奶;8. 酱油

图 1 大豆加工产品中内源 Lc 基因 PCR 扩增结果
Fig. 1 Amplification results of endogenous Lc gene in DNA samples of products derived from soybean



M. DL2000 DNA marker;1. 5%转基因玉米标准品;2. 玉米粒;3. 速溶玉米片;4. 空白对照;5. 阴性对照,以大豆 DNA 为模板

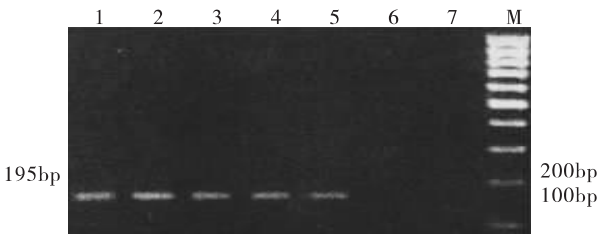
图 2 玉米加工产品中内源 Zein 基因 PCR 扩增结果
Fig. 2 Amplification results of endogenous Zein gene in DNA samples of products derived from maize

2. 2 大豆和玉米加工产品中的转基因成分检测

2. 2. 1 CaMV35S 启动子 PCR 扩增结果 CaMV35S 启动子是植物基因工程中最常使用的外源基因表达调控序列,本研究所使用的转基因大豆 Roundup Ready 和转基因玉米 Bt176 均含有该成分。一般把 CaMV35S 启动子的检出作为转基因产品初筛的步骤,当然如果转基因作物曾遭受过花椰菜花叶病毒侵染,也会出现 CaMV35S 启动子阳性结果,因此要确证是否真含有转基因成分,还需要进一步对外源目的基因进行检测。图 3 显示市售大豆加工品中可以检测到 CaMV35S 启动子 195bp 片段,初步判断其原料含有转基因成分;同时各样品 PCR 扩增条带的清晰程度不同也表明加工过程影响了外源基因片段的完整性。图 4 可见在玉米粒中检测到预期大小的扩增片段,而速溶玉米片中则没有,表明速溶玉米片不含有转基因成分。

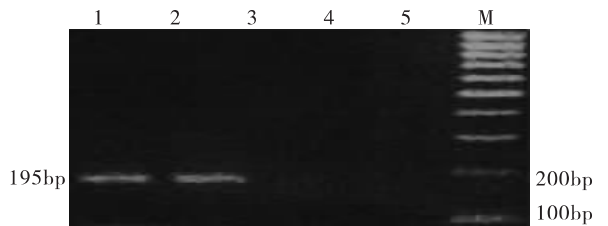
2. 2. 2 外源目的基因 PCR 检测

2. 2. 2. 1 大豆加工产品中 CP4 EPSPS 基因的检测 草甘膦抗性基因 CP4 EPSPS 来源于农杆菌 CP4 菌株(Agrobacterium sp. strain CP4),是转基因大豆 Roundup Ready 的外源目的基因,赋予大豆



M. 100bp DNA marker;1. 阳性对照,5%转基因大豆标准品;2. 豆粕;3. 豆腐;4. 豆奶;5. 酱油;6. 阴性对照,非转基因大豆标准品;7. 空白对照

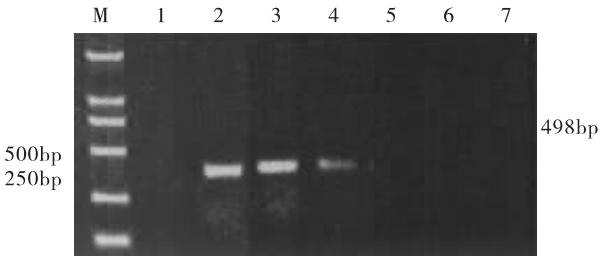
图 3 大豆加工产品中 CaMV 35S 启动子 PCR 扩增结果
Fig. 3 Amplification results of CaMV 35S promoter in DNA samples of products derived from soybean



M. 100bp DNA marker;1. 阳性对照,5%转基因玉米标准品;2. 玉米粒;3. 速溶玉米片;4. 阴性对照,非转基因玉米标准品;5. 空白对照

图 4 玉米加工产品中 CaMV 35S 启动子 PCR 扩增结果
Fig. 4 Amplification results of CaMV 35S promoter in DNA samples of products derived from maize

抗除草剂特性,检测该基因可作为鉴定特异性的有效方法。在转基因阳性大豆标准品、豆粕和豆腐中均扩增出预期的 498bp 片段,而在转基因阴性大



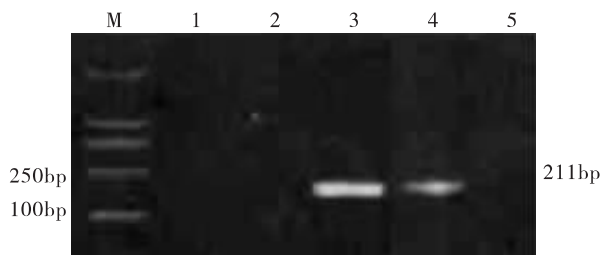
M. DL2000 DNA marker;1. 空白对照;2. 阳性对照,5%转基因大豆标准品;3. 豆粕;4. 豆腐;5. 豆奶;6. 酱油;7. 阴性对照,非转基因大豆标准品

图 5 大豆加工产品中 CP4 EPSPS 基因 PCR 扩增结果
Fig. 5 Amplification results of CP4 EPSPS gene in DNA samples of products derived from soybean

豆、豆奶和酱油中未扩增出该序列(图 5)。这表明所检测的豆粕和豆腐样品是由转基因 Roundup Ready 大豆加工制成的,而豆奶和酱油中不含有外源目的基因 CP4 EPSPS,要判断具体含何种转基因成分,需要做进一步检测分析。

2.2.2.2 玉米加工产品中 CryIA(b) 基因的检测

转基因玉米 Bt176 品系的特异性外源基因是 CryIA(b) 基因,其编码合成可杀死欧洲玉米螟的毒蛋白。本文设计的引物可扩增出 CryIA(b) 基因 211bp 片段,可以达到对转基因玉米 Bt176 品系的准确鉴定。图 6 中玉米粒扩增出阳性条带,而速溶玉米片呈阴性,表明玉米粒为 Bt176 玉米加工制成,速溶玉米片中不含有相应转基因成分。



M, DL2000 DNA marker; 1. 空白对照; 2. 阴性对照, 非转基因玉米标准品; 3. 阳性对照, 5% 转基因玉米标准品; 4. 玉米粒; 5. 速溶玉米片

图 6 玉米加工产品中 CryIA(b) 基因 PCR 扩增结果

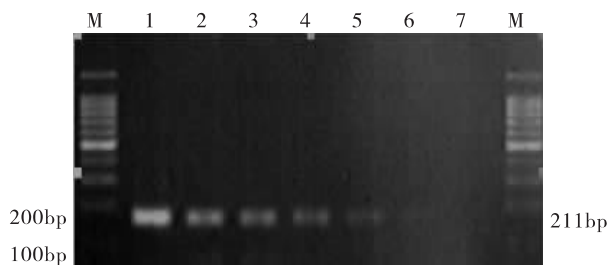
Fig. 6 Amplification results of CryIA(b) gene in DNA samples of products derived from maize

2.3 PCR 检测的灵敏度

本研究采用已知梯度含量 (5%、2%、1%、0.5%、0.1%) 的转基因玉米 Bt176 品系阳性标准样品为例,进行 PCR 检测,从而确定检测的灵敏度。如图 7 所示为 CryIA(b) 基因 (211bp) 的 PCR 检测的灵敏度结果。结果表明,PCR 检测的灵敏度可以达到 0.1%。

2.4 PCR 检测的稳定性

以转基因大豆 Roundup Ready 2% 阳性标准品为例,对 CaMV35S 启动子进行连续 8 次的重复试验,以确定 PCR 检测的稳定性。结果表明,PCR 检测转基因大豆 Roundup Ready 的稳定性良好。



M, 100bp DNA marker; 1. 5% 转基因玉米标准品; 2. 2% 转基因玉米标准品; 3. 1% 转基因玉米标准品; 4. 0.5% 转基因玉米标准品; 5. 0.1% 转基因玉米标准品 6. 阴性对照, 0% 转基因玉米标准品; 7. 空白对照

图 7 转基因玉米 CryIA(b) 基因的 PCR 检测灵敏度

Fig. 7 Sensitivity of PCR analysis for CryIA(b) gene in genetically modified maize

参 考 文 献

- [1] Clive James. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops; 2005, <http://www.isaaa.org>.
- [2] Lipp M, Brodmann P, Pietsch K, et al. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soybeans and maize in dried powder[J]. J AOAC Int, 1999, 82 (4): 923-928.
- [3] Hurst CD, Knight A, Bruce IJ. PCR detection of genetically modified soya and maize in food stuffs [J]. Molecular Breeding, 1999, (5): 579-586.
- [4] Jankiewicz A, Broll H, Zagon J. The official method for the detection of the genetically modified soybeans (German food act LMBG 35). A semi-quantitative study of sensitivity limits with glyphosate-tolerant soybeans (Roundup Ready) and insect-resistance Bt maize (Maximizer) [J]. European Food Research and Technology, 1999, 209: 77-82.
- [5] 陈颖, 王媛, 徐宝梁, 等. 食品加工工艺对大豆内源基因降解变化规律的影响[J]. 中国粮油学报, 2005, 20(4): 60-64.