

## QuickGene-810 型自动核酸提取仪在转基因大豆检测中的应用研究

周广彪, 蔡颖, 陈文婉, 温尔英

(汕头出入境检验检疫局 检验检疫技术中心, 广东 汕头 515031)

**摘要:** 分别使用 QuickGene-810 型自动核酸提取仪法和手工试剂盒法, 提取 0.1%~100% 梯度的转基因大豆 GTS-40-3-2 和非转基因大豆的 DNA。使用核酸蛋白分析仪检测 DNA 浓度和纯度, 荧光定量 PCR 扩增大豆内源 *Lectin* 基因和转基因大豆 GTS-40-3-2 结构特异性基因, 对比 QuickGene-810 型自动核酸提取仪与手工方法的 DNA 提取效果。并用 QuickGene-810 型自动核酸提取仪法提取 100 份大豆样本 DNA 进行稳定性评价。结果表明: 自动核酸提取仪法耗时短、成功率较高、稳定性良好, 所得 DNA 的浓度和  $A_{260}/A_{280}$  比值均明显高于手工试剂盒法 ( $P < 0.001$ ), 荧光定量 PCR 扩增大豆内源 *Lectin* 基因的 Ct 值高于手工试剂盒法 ( $P < 0.001$ ), 但转基因大豆 GTS-40-3-2 结构特异性基因 Ct 值差别不明显 ( $P = 0.540$ )。

**关键词:** 核酸提取仪; 转基因大豆; 检测

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2014.03.0434

## Application of Quick Gene-810 Automated Nucleic Acid Extraction Instrument on Detection of Genetically Modified Soybean

ZHOU Guang-biao, CAI Ying, CHEN Wen-wan, Wen Er-ying

(Inspection and Quarantine Technology Center, Shantou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shantou 515031, China)

**Abstract:** To compare the DNA extraction effect between the two following methods, DNA was extracted from 0.1%-100% proportion gradient samples of genetically modified soybean GTS-40-3-2 and non GMO soybean, using QuickGene-810 automated nucleic acid extraction instrument method and manual DNA extraction kit method respectively. DNA concentration and purity were detected by the protein nucleic acid analyzer, and soybean endogenous *Lectin* gene and genetically modified soybean GTS-40-3-2 structure-specific gene were quantitatively amplified. In addition, DNA was extracted from 100 soybean samples employing QuickGene-810 automated nucleic acid extraction instrument method, so as to evaluate the stability of this method. Results indicated that, QuickGene-810 automated nucleic acid extraction instrument method took a short time, had a high success rate and good stability. The concentration and the  $A_{260}/A_{280}$  ratio of DNA extracted by QuickGene-810 automated nucleic acid extraction instrument method were significantly higher than the manual kit method ( $P < 0.001$ ). For soybean endogenous *Lectin* gene, the Ct value of nucleic acid extraction instrument method was higher than that of manual kit method ( $P < 0.001$ ). However, for genetically modified soybean GTS-40-3-2 structure-specific gene, the Ct values of the two methods had no significant difference ( $P = 0.540$ ).

**Key words:** Automated nucleic acid extraction instrument; Genetically modified soybean; Detection

近来转基因食品的安全问题备受争议, 其检测方法也逐渐为人知晓, 虽然有环介导等温扩增 (LAMP) 等新的应用技术, 但纵观现行转基因检测的国家及行业标准, PCR 技术或荧光 PCR 技术仍是主流<sup>[1-4]</sup>。对 PCR 检测而言, 获取相当数量且结构完整的 DNA 至关重要。现在大多 DNA 的提取方法都依赖人力进行操作, 相较手工 DNA 方法, 使用自动核酸提取仪操进行 DNA 提取, 具有操作简单、速度快、稳定性高等优势。本文从设计大豆 DNA 提取的比对实验入手, 比较日本富士 QuickGene-810 型自动核酸提取仪和手工提取方法的 DNA 提取效果, 再利用大样本的确证实验来测试该提取仪法的稳定性, 旨在为检测和研究机构提供另一可选的高效、稳定、可靠的 DNA 提取方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 材料 供试大豆为来自本实验室和广东出入境检验检疫局技术中心日常检测的部分留样, 共取 100 份最终确认为转基因大豆 GTS-40-3-2 的样品。

1.1.2 主要试剂 手工试剂盒: Wizard Genomic DNA purified kit (Promega), 机器自动提取试剂盒: QuickGene-810 型自动核酸提取仪配套的 QuickGene DNA tissue kit S 试剂盒 (DT-S, Fujifilm)、无水乙醇、异丙醇、70% 乙醇等均为国产分析纯。

1.1.3 主要仪器和设备 QuickGene-810 型自动核酸提取仪 (Fujifilm), LightCycler<sup>®</sup> 480 型荧光定量 PCR 仪 (Roche), ND-1000 型核酸蛋白分析仪 (Nan-

收稿日期: 2013-10-25

第一作者简介: 周广彪 (1979-), 男, 硕士, 工程师, 主要从事食品安全检测研究。E-mail: zhgb2004@126.com。

oDrop), DNA 120 型核酸真空干燥机 (SAVAVNT), 高速离心机 (Beckman), 高速万能粉碎机 (泰斯特), 恒温干热器 (Eppendorf)。

1.2 方法

1.2.1 样品制备 首先将大豆粉碎为高度均一的豆粉, 将转基因大豆 GTS-40-3-2 和非转基因大豆粉按照一定质量比例混合, 分别制备 100% (+)、10% (+)、5% (+)、2.5% (+)、1.0% (+)、0.5% (+)、0.1% (+) 及 0% (-) 共 8 个梯度的测试样本。

1.2.2 DNA 提取 各样本及对照均称取 30 mg 置于 1.5 mL 离心管中, 每个试样 2 次重复。手工提取按照 Wizard Genomic DNA purified kit 的说明书进行, 最后置于核酸真空干燥机中干燥 8 min, DNA 定容到 50  $\mu$ L。仪器提取按照 DT-S 试剂盒说明书进行, DNA 洗脱定容体积为 50  $\mu$ L。

1.2.3 DNA 质量评估 首先使用 ND-1000 核酸蛋白分析仪进行 DNA 的  $A_{260}$ 、 $A_{280}$  吸光值检测、 $A_{260}/A_{280}$  比值和 DNA 浓度计算; 然后依据 DNA 的浓度, 取 200 ng DNA 使用 LightCycler<sup>®</sup> 480 荧光定量 PCR 仪检测大豆内源 *Lectin* 基因和 GTS-40-3-2 结构特异性基因。两种基因的引物和探针序列及扩增条件参照《GB/T 19495.5-2004 转基因产品检测核酸定量 PCR 检测方法》中的附录 A: 转基因大豆 GTS-40-3-2 实时荧光 PCR 检测方法<sup>[1]</sup>。

1.3 数据分析

使用 SPSS v19.0.0 进行配对  $t$  检验。

2 结果与分析

2.1 耗时与成功率

自动核酸提取仪法提取 8 个样品不到 1 h, 而采

用手工试剂盒法则要超过 2 h。自动核酸提取仪法提取 100 个样品和 8 个对照 (共计 216 个平行样) 一次成功, 成功率达 100%; 手工试剂盒法提取 8 个样品 (共计 16 个平行样) 时, 有 1 次提取失败, 成功率为 93.75%。

2.2 DNA 数据比较

2.2.1 核酸蛋白分析仪检测结果 自动核酸提取仪法所得 DNA 的  $A_{260}$  的吸收峰明显高于手工试剂盒法 (图 1)。由表 1 可知, 仪器提取所得 DNA 浓度和  $A_{260}/A_{280}$  的比值也均高于手工试剂盒法。相较手工试剂盒法, 仪器提取 DNA 的平均浓度高于手工法 35%, 而且提取 DNA 的浓度变化范围更小。两种方法所得 DNA 浓度和纯度配对  $t$  检验的  $P$  值均小于 0.001, 差异极显著。

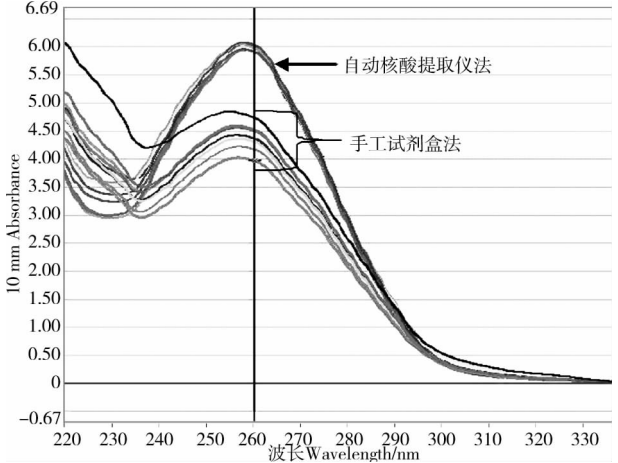


图 1 两种方法提取 DNA 的吸收光谱图比较  
Fig. 1 Comparing the absorption spectra of two extracting DNA methods

表 1 DNA 核酸蛋白分析仪检测情况  
Table 1 DNAspectrophotometer testing results

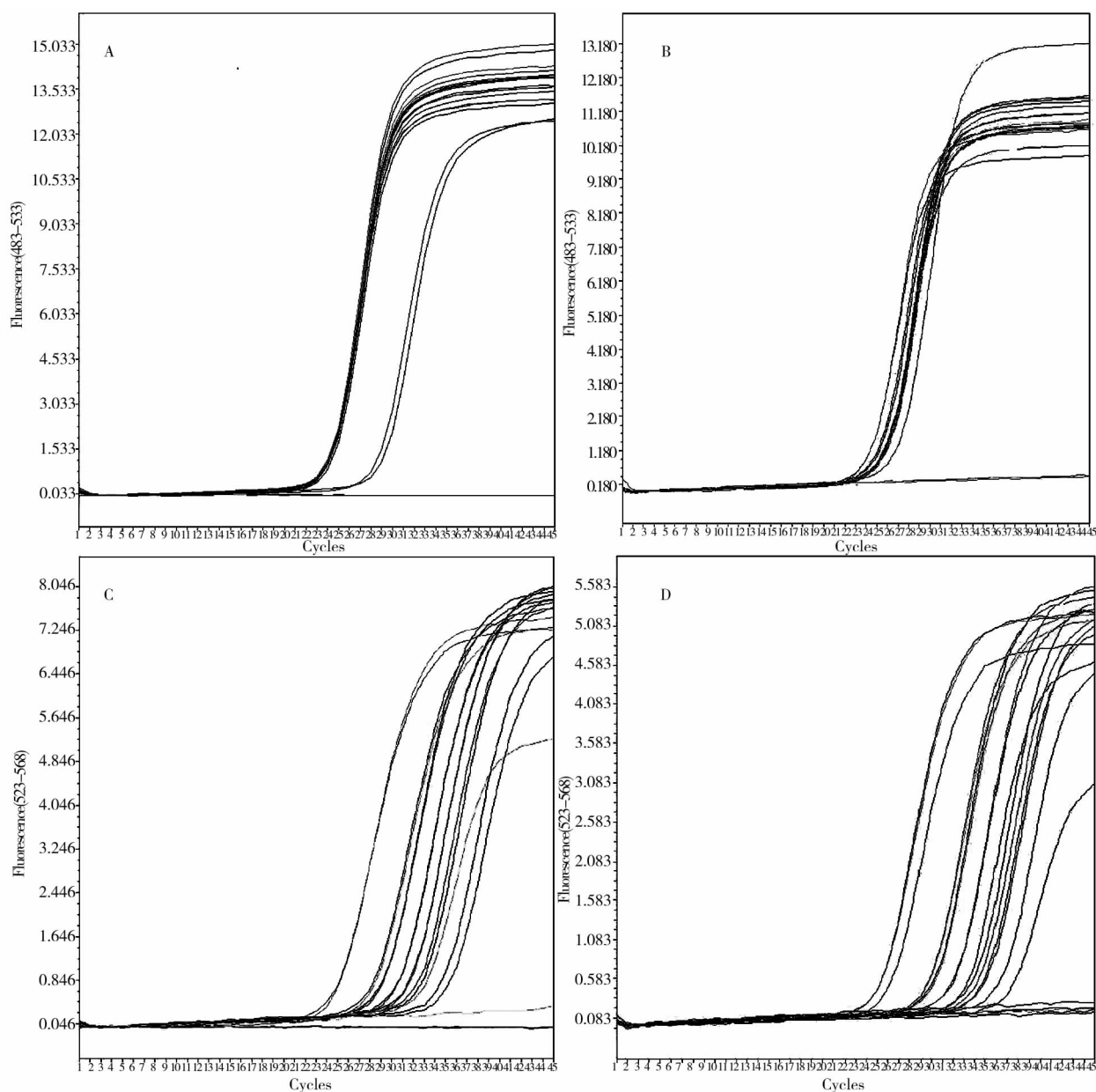
Testing sample 试验样本	DNA 浓度 DNA concentration/ $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$		$A_{260}/A_{280}$	
	手工 Manual method	仪器 Extraction method	手工 Manual method	仪器 Extraction method
100% (+)	236.94	295.61	1.83	2.02
10% (+)	227.78	301.80	1.87	2.00
5% (+)	224.94	294.84	1.89	1.99
2.5% (+)	208.62	299.11	1.92	1.98
1.0% (+)	215.47	300.06	1.89	2.04
0.5% (+)	198.64	295.33	1.90	2.05
0.1% (+)	218.36	294.76	1.90	2.07
0% (-)	226.24	295.00	1.90	2.01
平均值 $\pm$ SD	219.62 $\pm$ 12.06	297.06 $\pm$ 2.81	1.89 $\pm$ 0.03	2.02 $\pm$ 0.03
Mean $\pm$ SD				

以上均为各测试样本 2 个平行样的均值。

The above are average of two parallel testing sample.

2.2.2 荧光定量 PCR 仪检测结果 相较自动核酸提取仪法, 手工试剂盒法提取 DNA 的大豆内源 *Lectin* 基因扩增曲线比较集中; 观察平行设置测试样本的 GTS-40-3-2 特异性基因扩增曲线, 均很难看出理论上的梯度浓度差异。从表 2 可知, 提取仪法的大

豆内源 *Lectin* 基因 Ct 值高于手工法, 差异具有显著性 ( $t = 9.723, P < 0.001$ )。直观上提取仪法检测 GTS-40-3-2 特异性基因 Ct 值高于手工法, 但经统计分析, 二者并无显著性差异 ( $t = 0.631, P = 0.540$ )。



A 和 B 分别为手工法和提取仪法所得 DNA 的大豆内源 *Lectin* 基因扩增图/C 和 D 分别为手工法和提取仪法所得 DNA 的转基因大豆 GTS-40-3-2 结构特异性基因扩增图。

A and B were soybean endogenous *Lectin* gene amplification figures for the manual method and the extraction method, respectively; C and D were GTS-40-3-2 structure-specific gene amplification figures for the manual method and the extraction method, respectively.

图 2 两种方法提取 DNA 的实时 PCR 扩增谱图

Fig. 2 Real-time PCR Amplification image of two extracting DNA methods

表 2 测试样本两个基因的 PCR 扩增结果

Table 2 Testing sample PCR amplification result of two genes

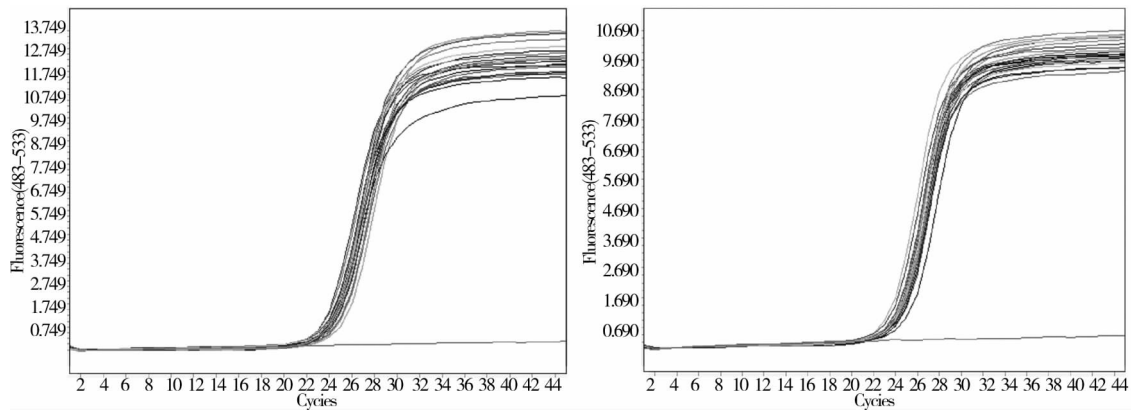
样本 Sample	LectinCt 值 Ct value		GTS-40-3-2 Ct 值 Ct value	
	手工 Manual method	仪器 Extraction method	手工 Manual method	仪器 Extraction method
100% ( + )	24.10	24.74	24.89	25.12
10% ( + )	24.03	25.42	28.30	29.67
5% ( + )	24.04	24.82	29.21	30.21
2.5% ( + )	24.04	25.58	30.61	32.08
1% ( + )	24.00	25.80	31.76	34.00
0.5% ( + )	24.08	25.60	32.96	34.78
0.1% ( + )	23.99	25.54	35.73	36.14
0% ( - )	24.03	25.62	—	—
平均值 $\pm$ SD Mean $\pm$ SD	24.04 $\pm$ 0.04	25.39 $\pm$ 0.39	30.49 $\pm$ 3.49	31.71 $\pm$ 3.75

以上均为各对照 2 个平行样的均值。

The above are the two parallel sample average.

2.2.3 自动核酸提取仪稳定性检测结果 使用自动核酸提取仪法提取 100 份黄大豆样品,进行内源 *Lectin* 基因扩增检测,所得 Ct 值均在 23.91 ~

25.87,均值  $\pm$  标准差为  $24.67 \pm 1.49$ ,变异系数为 0.06,说明该方法具有较好的稳定性。图 3 为其扩增谱图。



左右各含 50 份样品。  
Each containing 50 samples.

图 3 100 份大豆样品的内源 *Lectin* 基因实时 PCR 扩增谱图

Fig. 3 Real-time PCR Amplification image of endogenous *Lectin* gene for 100 soybean samples

### 3 结论与讨论

使用自动核酸提取仪提取 DNA 的成功率较高、浓度较高,相较 CTAB 法、酚-三氯甲烷法、SDS 裂解法等传统手工提取方法<sup>[5-6]</sup>,该法稳定性好、省时、便捷,可避免接触有机溶剂并显著减少工作量。本实验中,自动核酸提取仪法所得 DNA 的大豆内源 *Lectin* 基因 Ct 值明显高于手工试剂盒法,但转基因大豆 GTS-40-3-2 结构特异性基因两种方法 Ct 值无统计学差异。造成该现象的原因可能是:第一,两组数据离散程度差别大时,配对 *t* 检验易得出有差别的结论,反之则不易得出有差别的结论。手工法和提取仪法所得两组 *Lectin* 基因的 Ct 值的标准差分别为 0.04 和 0.39,二则相差约 10 倍;而 GTS-40-3-2 结构特异性基因 Ct 值的标准差分别为 3.49 和 3.75,基本相同。这可能是造成统计学结论不同的主要原因。第二,核酸提取仪所得 DNA 中可能含有微量 PCR 反应抑制物。因为二者所用的消化液完全不同,且核酸提取仪法没有蛋白沉淀步骤,估计所得 DNA 中含有蛋白类 PCR 反应抑制物,造成相同的样品检测相同的基因时,提取仪法的 Ct 值总比手工法大 1.0 左右。这一点也和核酸蛋白分析仪检测的  $A_{260}/A_{280}$  比值较高的结果一致。

虽然通过 100 份转基因黄大豆样本的检测,证实了该方法的稳定性,但由于人力所限,仅对 8 个设置的原材料对照样本进行了细致比较。该方法是否适用于其他类型样本(如加工类产品或食品等)的 DNA 提取尚待验证。但毫无疑问,该自动核酸提取仪法仍不失为当前检测或科研机构进行转基因等 PCR 检测时,可选的 DNA 提取方法之一。

### 参考文献

- [1] 覃文,朱永芳,曹际娟.等. GB/T 19495.5-2004,转基因产品检测核酸定量 PCR 检测方法[S]. 北京:中国标准出版社,2004. (Tan W, Zhu Y F, Cao J J, et al. GB/T 19495.5-2004, Detection of genetically modified organisms and derived products-quantitative PCR methods based on nucleic acid[S]. Beijing: Standards Press of China, 2004.)
- [2] 朱永芳,覃文,曹际娟.等. SN/T 1204-2003,植物及其加工产品转基因成分实时荧光 PCR 定性检验方法[S]. 北京:中国标准出版社,2003. (Zhu Y F, Tan W, Cao J J, et al. SN/T 1204-2003, Protocol of the real-time PCR for detecting genetically modified plants and their derived products[S]. Beijing: Standards Press of China, 2003.)
- [3] 蔡颖,周广彪,刘津.等. 转基因大豆 A5547-127 品系成分 LAMP 快速检测方法的建立[J]. 食品研究与开发,2013,36(17):69-73. (Cai Y, Zhou G B, Liu J, et al. Development of loop-mediated isothermal amplification(LAMP) method for rapid detection of transgenic soybean A5547-127 component[J]. Food Research and Development, 2013, 36(17): 69-73.)
- [4] 闫兴华,许文涛,商颖.等. 环介导等温扩增技术(LAMP)快速检测转基因玉米 LY038[J]. 农业生物技术学报,2013,21(5):621-626. (Yan X H, Xu W T, Shang Y, et al. Loop-mediated isothermal amplification method (LAMP) for the rapid detection of transgenic maize (*Zea mays* L.) LY038[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2013, 21(5): 621-626.)
- [5] 刘欣,祝长青,王毅谦.等. 大豆转基因检测中 DNA 提取方法的比较研究[J]. 食品科学,2013,34(4):199-203. (Liu X, Zhu C Q, Wang Y Q, et al. Methodology comparison of DNA extraction from soybean for detection of genetically modified organism[J]. Food Science, 2013, 34(4): 199-203.)
- [6] 陈笑芸,汪小福,周育.等. 转基因大豆深加工食品 DNA 鉴定技术研究[J]. 中国食品学报,2013,13(4):156-162. (Chen X Y, Wang X F, Zhou Y, et al. DNA diagnostic technology of the deeply processed food from genetic modified soybean[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(4): 156-162.)