

大豆精加工产品 DNA 提取方法及转基因检测

栾凤侠 张洪祥 白 月

(黑龙江出入境检验检疫局, 哈尔滨 150001)

摘要 针对大豆精加工产品提取 DNA 纯度和浓度不高的难题, 对传统的 CTAB 法、试剂盒法及改良试剂盒法进行了比较研究, 采用改良的试剂盒法快速提取了满足实时荧光定量 PCR 检测要求的高纯度和高产量 DNA, 并且利用实时荧光定量 PCR 定性检测出了大豆精加工产品中的内源基因和外源基因。

关键词 大豆; 精加工产品; DNA 提取

中图分类号 S 565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2005)03-0232-04

大豆是我国主要油脂原料, 油脂企业的副产品豆粕又是重要的饲料和植物蛋白工业原料, 近年来由于我国大豆进出口量很大, 其中大都是转基因大豆。据统计用转基因作物生产加工的食品和含有转基因成分的食品已达 4000 余种。而转基因食品的安全性更是全球社会普遍关注的问题。2002 年 3 月 20 日起, 凡是在中国境内销售的大豆、玉米及制品若属转基因生物, 必须进行标识。2004 年 2 月底农业部对农业转基因生物安全审批的放行, 使人们再次将目光集中在“生物安全性”, “强制标识”和“绿色壁垒”等词上^[2]。我国加入 WTO 后, 伴随进出口贸易的频繁往来, 有大量的大豆及大豆精加工产品的进出口。大豆油, 高温粕, 低温粕, 大豆分离蛋白, 大豆组织蛋白, 大豆低聚糖, 大豆异黄酮等产品远销俄罗斯, 土耳其, 意大利, 南非, 香港, 台湾, 韩国等世界各地。目前国外还没有转基因深加工食品的检测方法标准, 国内转基因检测方法标准只有国标 GB/T(2004 年) 和行标 SN(2003 年)^[3], 其中对深加工食品的 DNA 提取方法只是应用 CTAB 法^[4]。有关针对大豆精加工产品快速简便提取 DNA 和荧光 PCR 检测方法方面的研究至今未见报导。研究大豆精加工产品 DNA 的快速提取及荧光 PCR 检测技术的研究对实施转基因食品标识提供必要的技术支持, 对于保护我国人民身体健康和保护消费者的知情权和选择权具有重要意义。本研究针对快速简便试剂盒是否适用大豆精加工产品 DNA 提取和应

用实时荧光定量 PCR 检测技术做了进一步的研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品

转基因大豆粉, 大豆分离蛋白, 大豆组织蛋白, 大豆异黄酮, 豆酱。

1.1.2 主要试剂

DNA 提取试剂盒 High Pure GMO Sample Preparation Kit; GMO Screening Kit; GMO Soya Quantification Kit(Roche)。

1.1.3 仪器与设备

离心机(SORVAIL)、涡旋振荡器(IKA)、恒温水浴箱、核酸蛋白分析仪(Beckman)、天平(METTLER)、纯水器(Milli-Q)、微量移液器(Eppendorf)、实时荧光定量 PCR 仪(Roche)。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取与纯化(改良试剂盒法)

称取 0.2g 样品于 2mL 离心管中, 加入 1.5mL Buffer I, 混匀, 80℃ 水浴振荡保温 0.5h; 12000rpm/min 离心 10min; 取上清液(如果上清液中有微量悬浮物)加入装有过滤柱的 2mL 离心套管中进行过滤, 5000rpm/min 离心 1 min。其余按照 High Pure GMO Sample Preparation Kit DNA 提取试剂盒操

• 收稿日期: 2004-11-15

基金项目: 国家质检总局科技计划项目, 小麦和大豆中转基因成分定性和定量 PCR 检测方法的研究, 2004.1-2005.12

作者简介: 栾凤侠(1963-), 女, 高级工程师, 硕士, 研究方向为植物产品分子检测。Tel: 0451-82337601-8613。

作说明完成。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 检测大豆精加工产品内源基因(tRNA_{leu} 和 lectin)和外源基因(NOS,35S/CTP),所用引物由 GMO Screening Kit, GMO Soya Quantification Kit 试剂盒提供。PCR 反应体系和条件按照试剂盒提供说明操作。本研究 DNA 提取和 PCR 扩增实验均设阳性对照,空白对照。

表 1 CTAB 法、改良试剂盒法与试剂盒法 DNA 提取的比较结果
Table 1 Comparing the method for CTAB ,optimizing kit and kit

方法 Methods	DNA 纯度 Hellmark (OD _{260nm} /OD _{280nm})	DNA 浓度 Concentration (ng/μl)	提取时间 Times (h)	备注 Note
CTAB 法	1.7—2.0	因含担体 DNA,所以无法确定 DNA 浓度	2.5—3	需要加入担体共沉淀
改良试剂盒法	1.7—2.0	500—1000	1	不需要加入担体
试剂盒法	1.2—1.7	200—800	1	不需要加入担体

三种方法提取 DNA 纯度和浓度均用核酸蛋白分析仪检测。从以上结果看出,CTAB 法较其它两种方法提取时间长,未知 DNA 浓度,需要加入担体共沉淀。试剂盒法由于提取纯度不够不适用于大豆精加工产品的 DNA 的提取。改良试剂盒法不仅提取时间短,DNA 提取浓度和纯度高,而且不需要加入担体。

2.2 改良试剂盒法提取大豆精加工产品中的

2 结果与分析

2.1 CTAB 法^[4]、试剂盒法与改良试剂盒法 DNA 提取的结果比较(见表 1)。

DNA,用 GMO Soya quantification Kit 试剂盒检测样品中的内源基因(lectin)和外源基因(35S/CTP)的结果(见图 1,2)。图 1 中阳性对照扩增曲线扬起,空白对照扩增曲线水平,说明样品 DNA 内源基因提取正常。图 2 中阳性对照扩增曲线扬起,空白对照扩增曲线水平,转基因大豆粉扩增曲线扬起,其余样品未出现扩增现象,说明转基因大豆粉检测到了 35S/CTP 外源基因。

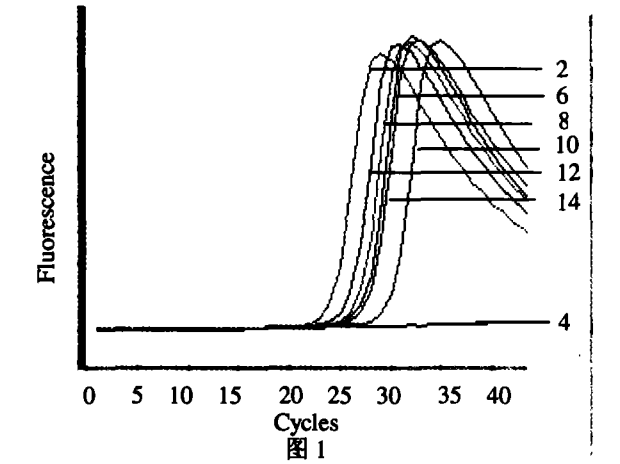


图 1 Lectin 内源基因扩增曲线。基线下方:4 空白对照;基线上方:2 阳性对照,6 转基因大豆粉,8 大豆分离蛋白,10 大豆组织蛋白,12 豆酱,14 大豆异黄酮

Fig.1 Amplified curves of lectin gene. Under the level: 4) Blank control. Above the level: 2) Masculine control, 6) GMO soya powder, 8) Soya separate protein, 10) Tissue protein of soya, 14) Soya catsup, 16) Soya isoflavones

2.3 改良试剂盒法提取大豆精加工产品中的 DNA,用 GMO Screening Kit 试剂盒检测内源基因(tRNA_{leu})和外源基因(NOS)的结果(见图 3,4)。

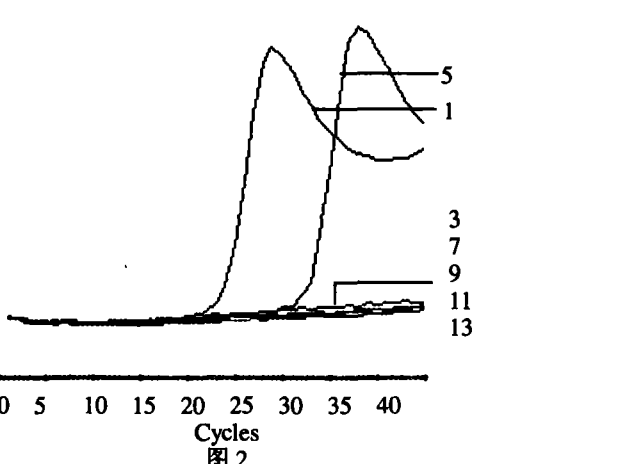


图 2 35S/CTP 外源基因扩增曲线。基线下方:3 空白对照,7 大豆分离蛋白,9 大豆组织蛋白,11 豆酱,13 大豆异黄酮;基线上方:1 阳性对照,5 转基因大豆粉

Fig.2 Amplified curves of 35S/CTP. Under the level: 3) Blank control. Above the level: 2) Masculine control, 6) GMO soya powder, 8) Soya separate protein, 10) Tissue protein of soya, 14) Soya catsup, 16) Soya isoflavones

图 3 说明只有空白对照未出现内源基因扩增现象曲线在基线下方,样品和阳性对照内源基因 tRNA_{leu} 出现扩增现象曲线在基线上方。图 4 说明只有阳性

对照出现外源基因 NOS 扩增现象曲线在基线上方, 样品和空白对照外源基因未出现扩增现象曲线在基

线下方。

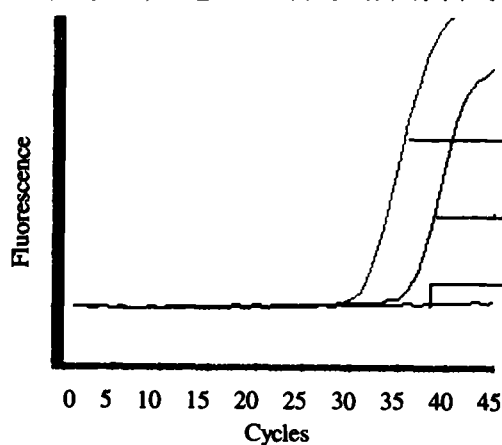


图 3

图 3 tRNA_{leu} 内源基因扩增曲线。基线下方: 4 空白对照, 基线上方: 2 阳性对照, 6 大豆异黄酮

Fig. 3 Amplified curves of tRNA_{leu} gene. Under the level: 4) Blank control. Above the level: 2) Masculine control, 6) Soya isoflavones

以上结果表明: 当基因出现扩增时, 曲线在基线上方上扬, 反之, 当基因未出现扩增时, 曲线在基线下方。通过大豆精加工产品中内源基因 (tRNA_{leu} 和 lectin) 的检测, 可以判定是否成功地提取到 DNA, 所提取的 DNA 是否适用于 PCR 的扩增, 以防止假阴性结果的存在。本研究改良试剂盒法快速简便提取了转基因大豆粉, 大豆分离蛋白, 大豆组织蛋白, 大豆异黄酮, 豆酱等产品中的 DNA, 通过实时荧光定量 PCR 仪检测到内源基因, 说明本研究改良的试剂盒法可以成功的提取 DNA, 而且提取 DNA 的纯度和产量 (不加担体) 完全可以满足实时荧光定量 PCR 扩增检测的需要。通过外源基因 (NOS, 35S/CTP) 的检测, 除了阳性对照和转基因大豆粉样品检测出外源基因以外, 其余大豆精加工产品样品均未检测出外源基因。

3 讨论

大豆精加工产品中由于大豆分离蛋白的加工工艺最为复杂, 它是以低温豆片为原料, 通过浸出一分离—酸沉—水洗—老化—中和—喷雾干燥等生产工艺精加工而成的高科技产品^[5]。大豆分离蛋白有 A 型属凝胶型, D 型属分散型, E 型属注射型, 具有持油性、持水性、凝胶性、分散稳定性、乳化性。不仅经过浓酸和高温的过程使 DNA 破坏严重, 而且又添加了改变其剂型的复杂成分, 在 DNA 提取过程中

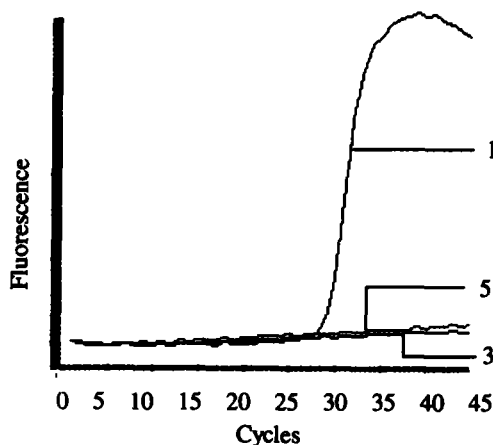


图 4

图 4 NOS 外源基因扩增曲线。基线下方: 3 空白对照, 5 大豆异黄酮, 基线上方: 1 阳性对照

Fig. 4 Amplified curves of NOS. Under the level: 3) Blank control, 5) Soya isoflavones. Above the level: 1) Masculine control

仍保持较好的凝胶性和分散稳定性, 是目前大豆精加工产品中 DNA 最难提取的产品。

本研究使用的 DNA 提取试剂盒, 由于提取时间短, 提取质量 (纯度和浓度) 高, 操作简便, 又避免了配试剂批次之间差异经常被实验者使用。但应用中发现有许多产品并不适用, 经过本试验研究认为, 该 DNA 提取试剂盒由于提取纯度不够而无法进行定性和定量 PCR 扩增, 不适用于大豆分离蛋白等精加工产品的 DNA 的提取 (DNA 提取试剂盒说明书中应用范围是适用于植物原料和加工过的产品)。

本研究通过对传统的 CTAB 法、试剂盒法及改良试剂盒法进行了比较研究后认为, 改良后的 DNA 提取试剂盒完全适用于大豆精加工产品的 DNA 的提取。传统的 CTAB 方法中为提高 DNA 产量需要加入担体, 担体的纯度和浓度也会影响 DNA 提取质量, 如果 DNA 浓度不够或担体的纯度和质量不高就不能满足实时荧光定量 PCR 仪对核酸纯度和浓度的要求, 而且提取时间一般为 2.5—3h; 而改良试剂盒法提取过程中由于采用柱过滤和柱纯化法 DNA 的丢失很少, 提取时间一般为 1h, 既提高了 DNA 的纯度和浓度, 还缩短了提取时间, 完全满足实时荧光定量 PCR 仪对核酸纯度和浓度的要求是此改良试剂盒方法最大的优点。由此可见, 本研究所采用的改良的 DNA 快速简便提取方法, 不仅适用于大豆精加工产品 DNA 提取, 而且完全满足实

时荧光定量 PCR 仪对核酸纯度和浓度的要求,同时应用实时荧光定量 PCR 定性检测出了大豆精加工产品中的内外源基因。

参 考 文 献

1 李新华. 我看大豆市场[J]. 新农业, 2005(2), 4-5.

2 赵乐. 转基因大豆进口的“中国概念”[J]. 新经济导刊, 2004(7):

58-59.

3 朱水芳, 覃文, 曹际娟等. 植物及其加工产品中转基因成分实时荧光 PCR 定性检测方法[S]. 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准 SN/T 1204-2003.

4 覃文, 董洁. 食品中转基因成分的检测[J]. 食品科学, 2001, 22(7), 59-62.

5 豆粕的生产加工、自然属性及用途, <http://www.sinoswine.com/yyjs/yyjs0007014.htm>

DNA EXTRACTION AND THE GMO DETECTION IN SOYBEAN FINISH MACHINING PRODUCTS

Luan Fengxia Zhang Hongxiang Bai Yue

(Heilongjiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Detection for Genetically
Modified Room, 150001, Harbin)

Abstract It is difficulty to extract high purify and output DNA of soybean. It was discussed to compare with kit, optimized kit and the traditional CTAB method in this paper. Results showed that the High Pure GMO Sample Preparation Kit was optimized, and the endogenesis and extragenesis in the soya finish machining products by weae dated Realtime-PCR.

Key words Soybean; Finish machining products; DNA extraction

欢迎订阅《大豆通报》

《大豆通报》杂志,是由国家大豆工程技术研究中心、中国作物学会大豆专业委员会与全国大豆科技推广协调指导小组联合主办,为国内外公开发行的综合性双月期刊。主要刊登与大豆行业相关的政策、科研、开发、生产、市场、产品等方面的规划建议、研究成果、阶段性试验、种植与深加工技术、国内外科技动态、科技信息、知识资料、经贸市场、学术活动以及科研院所、大专院校、农场、企业介绍等。

本刊为大 16 开本,单月 25 日出版。国内邮发代号 14-228,国外发行代号 BM 4836。邮局订阅:每册定价 5.00 元,全年 6 册,共计 30.00 元;编辑部订阅:全年 6 册共计 35.4 元(含邮寄费)。本刊合订本定价每本 56 元(含邮寄费)。

地址:哈尔滨市道外区南通大街 23 号,《大豆通报》编辑部邮编:150050

电话:0451-82553178

传真:0451-82553658

Email: soytb@163.com / soy2005@163.com