

大豆加工产品中转基因成分的定量检测

吴明生, 田 雷, 康俊梅, 贾希海, 律宝春

(北京市种子管理站检验科, 北京 100088)

摘要 根据转基因大豆的内源基因 Lectin 和外源基因 CaMV35S 的序列设计特异引物和探针, 利用这些引物和探针, 采用先定性后定量的方法对 6 份大豆加工产品转基因成分进行了定量检测。结果显示有两份样品含有转基因成分, 其转基因成分含量分别为 1.4% 和 0.4%。

关键词 转基因大豆; 定量检测; PCR

中图分类号 R155 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)06-0939-04

QUANTITATIVE DETECTION OF TRANSGENIC COMPONENTS IN PROCESSED SOYBEAN PRODUCTS

WU Ming-sheng, TIAN Lei, KANG Jun-mei, JIA Xi-hai, L Ü Bao-chun

(Beijing Seed Administration Station, Beijing 100088)

Abstract According to the DNA sequences of endogenous Lecin gene and exogenous CaMV35S gene, primers and probes was designed. Using the primers and probes, transgenic components of six unknown samples were qualitatively detected followed by quantitatively detected. The results showed only two samples of them were positive and the content of transgenic components was 1.4% and 0.4%, respectively.

Key words Transgenic soybean; Quantitative Detection; PCR

目前我国转基因产品的标识是实行定性标识制度, 但是为了使转基因产品的标识管理更加具有科学性和可操作性, 对其进行定量标识是今后转基因标识管理的发展趋势^[1-2]。转基因大豆是目前商业化的主要转基因作物之一, 被我国列入第一批实施标识管理的农业转基因生物之一, 也是我国目前主要的转基因食品或转基因食品加工原料^[3-4]。为此, 对大豆加工产品转基因成分含量进行了定量检测研究, 以期对转基因大豆产品实施定量标识提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

转基因大豆参照样品 (GTS 40-3-2) 购自 Fluka 公司, 共 6 个浓度, 转基因成分含量依次为 5%、2%、1%、0.5%、0.1%、0% (W/W)。待测豆粉和豆粕由本实验室收集。

1.2 生化试剂

DNA 提取试剂盒 Food Ex-plus 购自香港基因晶片有限公司, 定量反应应用配套试剂盒 TaqMan Universal PCR Master Mix 购自美国应用生物系统公司

收稿日期: 2007-03-20

作者简介: 吴明生 (1978 -), 男, 农艺师, 硕士, 主要从事转基因产品检测和检测技术研究。E-mail: wumish2002@yahoo.com.cn; Tel: 010-62382454

(ABI)。探针和引物由 ABI 公司合成。其余试剂由上海生工生物工程有限公司提供。

1.3 探针和引物设计

利用 Primer Express v2.0 软件(Applied Biosystems),根据大豆的内源基因 *Lectin* 和外源基因 *CaMV35S* 序列设计引物和探针,引物和探针序列见表 1,其中引物序列参照农业行业标准 NY/T 675 – 2003^[5]。探针 5 端用荧光报告基团 *FAM* 标记,3 端用荧光淬灭基团 *TAMRA* 标记。

1.4 DNA 提取

DNA 提取参照 DNA 提取试剂盒说明书。提取的 DNA 用紫外分光光度计进行分析。

1.5 定性 PCR

定性 PCR 扩增体系为:2.5 mmol L⁻¹ Mg²⁺,1U Taq 酶,1 × PCR 缓冲液,200 mmol L⁻¹ dNTPs,引物各 0.10 μmol L⁻¹,DNA 模板 50 ng,反应体积为 25 μL。PCR 扩增条件:95℃ 变性 5 min;95℃ 变性 30 s,60℃ 退火 35 s,72℃ 延伸 50 s,40 个循环;72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 定量 PCR

实时荧光定量 PCR 扩增采用 ABI 公司提供的试剂盒,反应在 ABI7300 上进行。反应总体积为

25μL,其中 DNA 模板 2 μL (50 ng μL),2 × TaqMan Universal PCR Master mix 12.5 μL,引物各 0.15 μL (20 μmol L⁻¹),探针 1μL(10 mmol L⁻¹)。扩增反应采用两步法,具体条件为:预变性 95℃ 10 min;变性 95℃ 20 s,退火 60℃ 1 min,40 个循环。

2 结果与分析

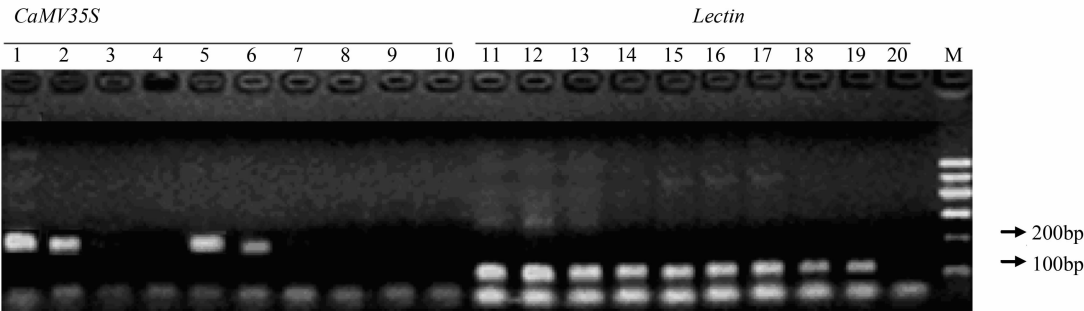
2.1 样品的定性检测

在转基因成分定量分析之前,利用普通 PCR 对转基因含量为 5.0%、0.5% 和 0 的参照样品以及 6 份未知样品进行定性检测,结果如图 1。含量为 5.0% 和 0.5% 参照样品两个基因 (*Lectin* 和 *CaMV35S*) 都被扩增出,含量为 0 的参照样品只有内源基因被扩增出,而空白对照两个基因都没有扩增出,说明定性 PCR 体系稳定,检测结果准确。对 6 份未知样品检测结果显示,只有两个样品 (S2 和 S3) 同时检出两个基因,而其余都只检出 *Lectin* 基因,说明 S2 和 S3 含有转基因成分,只需对两者进行定量分析。

表 1 用于转基因大豆产品检测的内外源基因引物和探针信息

Table 1 Oligonucleotide sequences of primers and probe used to detect control and transgenic DNA sequences in soybean products by PCR

序号 NO.	目的基因 Target gene	引物和探针序列 Oligonucleotide sequences of primers and probe		扩增片段长度(bp) Length
1	<i>Lectin</i>	Forward	5′- gccctctactccacccccatcc - 3′	118
		Reverse	5′- gcccatctgcgaagcctttttgtg - 3′	
		Probe	FAM - agcttcgcgcgtctccttcaacttcac - TAMRA	
2	<i>CaMV35S</i>	Forward	5′- gctectacaaatgccatcattgc - 3′	195
		Reverse	5′- gatag tggga ttgtg cgtca tccc - 3′	
		Probe	FAM - tgaagatgcctctgcgcacagtgtgc - TAMRA	



1,11;5% check sample;2,12;0.5% check sample;3,13;0% check sample;4,14;S1;5,15;S2;6,16;S3;
7,17;S4;8,18;S5;9,19;S6;10,20;Blank;M;100bp ladder

图 1 转基因大豆产品的定性检测

Fig. 1 Qualitative detection of transgenic components in processed soybean products

2.2 样品的定量检测

2.2.1 标准曲线制作 在同一 PCR 板上同时测定转基因大豆参照样品的内源基因和外源基因的 Ct 值(扩增曲线图见图 2),计算同一样品外源基因 Ct 值与内源基因 Ct 值之差(ΔCt 值),以每一样品 ΔCt 值与其转基因含量的对数值作标准曲线,获得标准曲线的回归方程,根据该回归方程就可以测出未知样品转基因含量^[6-7]。在本研究中,含量为

0.1%、0.5%、1%、2%、5% 大豆参照样品 *CaMV35S* 基因与 *Lectin* 基因的 ΔCt 值依次为 7.69、5.33、3.68、2.67 和 1.53,由此所作的标准曲线见图 3,该标准曲线的回归方程为 $y = -3.7314x + 3.9553$,其中 x 为参照样品中的转基因成分含量对数值, y 为对应样品 *CaMV35S* 基因和 *Lectin* 基因之间的 ΔCt 值, $R^2 = 0.9914$ 为方程的线性相关系数,显示两者极度相关。

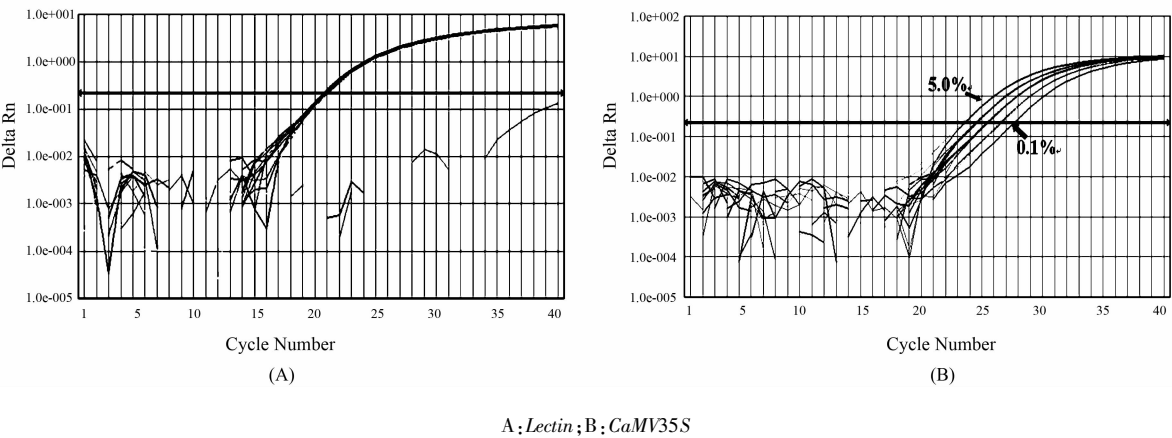


图2 转基因大豆参照样品定量扩增曲线

Fig. 2 Quantitative PCR plot of transgenic check material of soybean

而两个阳性样品的转基因成分的含量与定性扩增结果(带型亮度)也符合,说明定量检测和定性检测结果具有一致性。

3 讨论

目前,国际上欧盟的转基因标识域值最低(0.9%)^[8-10],因此对于普通转基因样品的定量检测,如果在定性灵敏度足够低(小于0.5%)情况下可以分两步进行,首先采用外源的调控元件(如 *CaMV35S* 启动子、*NOS* 终止子等)进行定性筛选,如果检测结果是阳性,则采用实时荧光 PCR 对其进行定量检测,这样既可以节省时间和费用,又能确保检测结果准确可靠。

由于 PCR 仪的稳定性以及操作方法随机性,经常会造成同一样品不同批次扩增出现不同的结果。因此,在做定量检测时,尽量将被检测的样品与参照样品放在同一 PCR 板上进行扩增,同时每个样品必须设置多个重复,这样可以最大程度消除仪器、操作方法等带来的误差,从而提高检测结果的准确性。

2.2.2 样品检测 采用定量 PCR,对定性检测阳性的两份样品(S2 和 S3)以及一份阴性样品(S1)进行定量检测,每个样品各设置 3 个重复,检测结果如表 2。对于同一基因,每个样品三个重复之间的 Ct 值基本一致,说明定量 PCR 结果稳定。另外,对于定性检测未检出 *CaMV35S* 的样品(S1),除了 *Lectin* 基因 Ct 值正常外,*CaMV35S* 的 Ct 都大于 40,

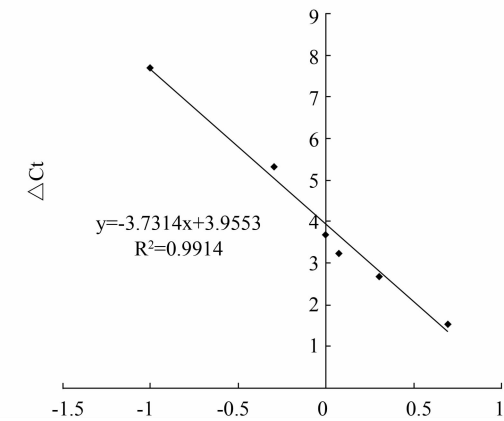


图3 *CaMV35S* 基因定量检测标准曲线图

Fig. 3 Standard curve for quantitative detection of *CaMV35S*

表 2 未知样品转基因定量检测结果

Table 2 Result of quantitative detection of transgenic component of unknown samples

样品名称 Sample name	检测基因 Target gene	Ct 值(Ct value)			Ct Mean of Ct	ΔCt DetalCt	转基因含量 GMO/%
		1	2	3			
S2	<i>lectin</i>	22.75	22.89	22.96	22.87	3.38	1.4
	<i>CaMV35S</i>	26.30	26.15	26.29	26.25		
S3	<i>lectin</i>	22.98	22.56	22.68	22.74	5.33	0.4
	<i>CaMV35S</i>	27.96	28.09	28.17	28.07		
S1	<i>lectin</i>	21.98	22.06	21.84	21.96	—	—
	<i>CaMV35S</i>	>40	>40	>40	>40		

参 考 文 献

[1] 农业部农业转基因生物标识管理办法[M]. 北京:农业部,2002.

[2] 金红. 转基因农产品标识管理和检测技术研究进展[J]. 天津农业科学,2002,8(4):48-53.

[3] 王林山,杨振刚,李应华. 转基因食品的安全性评价与管理[J]. 粮油加工与食品机械,2004,(5):37-41.

[4] 宋林,杨昌举,胡品洁. 转基因食品标识与管理[J]. 中国食物与营养,2005,6:9-12.

[5] 转基因植物及其产品检测大豆定性 PCR 方法[S]. 中华人民共和国农业行业. NY/T675-2003.

[6] 陈颖,徐宝梁,苏宁,等. 实时荧光定量 PCR 技术在转基因玉米检测中的应用研究[J]. 作物学报,2004,30(6):602-607.

[7] 潘良文,陈家华,罗达,等. 玉米粉中转基因 Bt176 玉米的定量检测[J]. 植物生理与分子生物学学报,2002,28(6):463-467.

[8] 金芜军,贾士荣,彭于发. 不同国家和地区转基因产品标识管理政策的比较[J]. 农业生物技术学报,2004,(12):7-12.

[9] 石英,吴广枫,余庆辉. 转基因产品的标识管理[J]. 新疆农业科学,2005,42(增):167-170.

[10] European Commission. Regulation (EC) No. 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labeling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC. Official Journal of the European Union,2003/10/18:L268/24-L268/28.

(上接 938 页)

工酶。农药抑制试验结果表明,三种大豆酯酶同工酶对农药的敏感性不同,酯酶 E₂ 的敏感性最好,可作为农残检测用植物酯酶新酶原。

在此基础上,进一步详细的研究大豆酯酶的特性、结构及有机磷和氨基甲酸酯类农药对各酯酶的抑制机理,可以为大豆酯酶在农残检测中的应用提供更多的理论依据。

参 考 文 献

[1] 张宁. 两种酶快速检测有机磷农药残留条件优化研究[J]. 江苏农业科学,2006,1:135-136.

[2] 韩承辉,谷巍,王乃岩,等. 快速测定水中有机磷农药方法的研究[J]. 环境化学,2000,19(2):187.

[3] 张叔平,经媛元,单联刚. 氨基甲酸酯类农药的快速检测[J]. 粮油食品科技,2006,14(3):48-50.

[4] 阮长青,杨娟,贾伟. 有机磷农药与小麦酯酶作用关系研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报,2006,18(1):61-62.

[5] 温艳霞,李建科. 有机磷农残检测用植物酯酶的研究[J]. 食品科学,2006,27(4):123-125.

[6] 温艳霞,李建科,张晓敏,等. 植物酯酶法检测有机磷农药的

敏感性和检测限的研究[J]. 食品科学,2006,27(9):186-187.

[7] 虞京藏,夏文胜,黄伟英,等. 大豆酯酶同工酶的初步研究[J]. 大豆科学,1983,2(1):104-107.

[8] 刘丽君,尹田夫,苗永山,等. 大豆不同品种(系)及 F₂ 代各生育期酯酶过氧化物酶同工酶分析[J]. 中国油料,1988,3:21-24.

[9] 卢翠华,雷勃钧,李希臣,等. 外源 DNA 导入大豆其后代的同工酶酶谱分析[J]. 大豆科学,1994,13(2):167-170.

[10] Bocquene G, Roig A, Fournier D. Cholinesterases from the common Oyster(*Crassostrea gigas*): Evidence for the presence of a soluble acetyl-cholinesterase insensitive to organophosphate and carbamate inhibitors[J]. Federation of European Biochemical Societies,1997,407:261-266.

[11] 余冰宾. 生物化学实验指导[M]. 北京:清华大学出版社,2004:136-140.

[12] 杨建雄. 生物化学和分子生物学实验技术教程[M]. 北京:科学出版社,2002:153-155.

[13] 余冰宾. 生物化学实验指导[M]. 北京:清华大学出版社,2004:151-156.

[14] 董登峰,杨杰,江立庚,等. 大豆磷酸烯醇式丙酮酸磷酸酯酶研究 III、非专一性酸性磷酸酯酶的纯化与特性[J]. 广西植物,2005,25(5):472-476.