

不同加工工艺对大豆转基因成分及调控元件的影响

王 林^{1,2}, 韩 飞¹, 李爱科¹, 刘建学², 王瑛瑶¹

(1. 国家粮食局 科学研究院, 北京 100037; 2. 河南科技大学 食品学院, 河南 洛阳 471003)

摘 要:以转基因大豆为试验材料,运用定性 PCR 的方法研究了粉碎、湿热和膨化 3 种加工工艺对转基因大豆内源基因 *Lectin*、外源基因 *Cp4 epsps* 以及启动子和终止子的影响。结果表明:大豆经过 100℃ 湿热处理 15 min 后,内源基因降解到 407 bp 以下;经过 100℃ 湿热处理 15 min 后,外源基因降解到 408 bp 以下;在 100℃ 经 3 min 湿热处理后启动子和终止子都产生了降解。机械粉碎与液氮粉碎都未能使大豆基因产生降解,而膨化工艺使大豆内源基因降解到 836 bp 以下,外源基因降解到 1 512 bp 以下,但启动子与终止子并未产生降解。因此,粉碎、湿热和膨化加工工艺对大豆转基因成分及调控元件的降解都有不同程度的影响。

关键词:大豆;加工工艺;内源基因;外源基因;启动子;终止子;PCR 技术

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2011)01-0136-05

Effect of Different Processing on Transgenic Ingredients and Regulatory Elements of Soybean

WANG Lin^{1,2}, HAN Fei¹, LI Ai-ke¹, LIU Jian-xue², WANG Ying-yao¹

(1. Academy of State Administration of Grain, Beijing 100037; 2. Institute of Food, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, Henan, China)

Abstract: Based on generally modified soybeans as materials, used the qualitative research methods of PCR to study the effects to *Lectin* gene and exogenous gene of *Cp4 epsps* and promoter and terminator by crushing and sticky-heating and extrusion processing. Researches showed that endogenous gene degraded below to 407 bp through processing at 100℃ sticky-heating for 15 min. Exogenous gene degraded below to 408 bp after 100℃ sticky-heating for 15 min. Promoter and terminator turn to degrade by 100℃ sticky-heating for 3 min. The results also indicated that gene sections had no changes through mechanical disintegration and liquid nitrogen processings. While promoter and terminator showed no degrades through extrusion processing, on the contrary, endogenous gene degraded below to 836 bp and exogenous gene degraded below to 1 512 bp.

Key words: Soybean; Processing; Endogenous gene; Exogenous gene; Promoter; Terminator; PCR technology

随着转基因技术的飞速发展,近年来转基因产品开发研究不断深入,越来越多的转基因农产品商品化,相应的转基因农产品市场占有率也明显增加。转基因大豆及其制品日益增多,已经直接或间接地影响到人们的生活。转基因大豆及其制品对人体健康及生态环境的影响引起广泛关注。转基因大豆加工过程中 DNA 的量及降解程度都因其加工工艺而异,全面了解转基因大豆加工过程中内外源基因及调控元件的降解变化规律对规范转基因大豆生产工艺、提高其相关产品的管理力度具有重要的现实意义。

该试验以大豆凝集素基因 (*Lectin*) 为内标基因^[1-2],设计了不同引物来检测其外源基因 *Cp4 epsps*、启动子 *CaMv35s* 和终止子 *Nos*,从核酸定性分析

水平上,利用 PCR 技术研究湿热、粉碎以及膨化加工工艺对大豆中内外源基因、启动子及终止子片段长度的影响,旨在为转基因大豆的安全性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

转基因大豆:河北三河汇福粮油有限公司;液氮:北京城信顺兴气体原料销售有限公司;苯酚:上海源景化学品有限公司;氯仿、乙醇(分析纯):北京化工厂;TE 缓冲液:上海索莱宝生物科技有限公司;Taq 酶、DNA Marker:大连宝生物工程有限公司;Goldenview 核酸染料:北京天恩泽基因科技有限公司;琼脂糖:北京拜尔迪生物公司。

收稿日期:2010-10-22

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项资助项目(2009ZX08012-012B)。

第一作者简介:王林(1985-),男,在读硕士,主要从事生物技术研究。E-mail:wangruilinwang@yahoo.com.cn。

通讯作者:韩飞(1973-),男,副研究员,博士,主要从事粮食(食品)营养与安全研究。E-mail:hf@chinagrains.org。

1.2 仪器与设备

PL403-IC 电子天平:梅特勒-托利多仪器有限公司;DK-8D 电热恒温水槽、DGG-9140AD 电热恒温鼓风干燥箱:上海森信实验仪器有限公司;温育机、PCR 扩增仪、离心机、震荡器:德国艾本德公司;DYY-8C 电泳仪:北京六一化工厂。

1.3 试验方法

1.3.1 引物设计 根据预试验结果,共设计不同大小的 8 对引物,均由上海英骏生物技术有限公司合成(表 1)。

表 1 引物序列及扩增产物长度

Table 1 Primers sequence and amplification product length

目的基因	模板	基因序列	扩增片段大小
Target gene	Template	Gene sequence	Amplification clips size/bp
<i>Lectin</i>	Lec1	GGCTGATAACACACTCTATTATTGT	1 060
	Lec1.	GGAAGCAAAAAGACCAAGAAAG-CACG	
	Lec2	GACTCCCCATGCATGCATCACAGT	836
	Lec2.	GGCAAATTGGAAGCAAAAAGA	
	Lec3	GAAGCAACCAACATGATCCTC	407
	Lec3.	ATGGATCTGATAGAATTGACGTTA	
<i>CP4 epsps</i>	Cp1	GGCGAGGACGTCATCAATAC	1 512
	CP1.	TCGATCCCCGATCTAGTAACA	
	Cp2	CGACATCGAAGTCATCAACC	408
	Cp2.	GTGACAGGGTTTTCCGACAC	
	Cp3	CGACATCGAAGTCATCAACC	190
	Cp3.	TTCTTCCAGACCGTTCATCA	
<i>CaMV35s</i>	Camv1	TCATCCCTTACGTCAGTGAG	165
	Camv1.	CCATCATTCGCGATAAAGGAAA	
<i>Nos</i>	Nos1	GAATCCTGTTGCCGCTCTTG	125
	Nos1.	CGCTATATTTTGTCTTCTATCGCGT	

1.3.2 样品制备与处理 大豆的湿热加工处理:将大豆置于高压灭菌锅内 70℃、80℃、90℃ 和 100℃ 各放置 3、9 和 15 min。大豆的粉碎作用对比:称取一定量的转基因大豆进行机械粉碎(28 000 r·min⁻¹, 粉碎后过 40 目的筛)与液氮粉碎的对比。大豆的膨化样品制备:购买市场上同类品种未膨化的转基因大豆粉与已膨化好的转基因大豆粉,检测比较其基因的变化。

1.3.3 大豆 DNA 的提取 称取 100 mg 试样在液氮中充分研磨成粉状,放至 1.5 mL 离心管中,加入 1 mL、65℃ 预热的 CTAB 抽提缓冲液,充分均匀混合后置恒温箱中 65℃ 温育 30 min,其间充分颠倒混

匀 2~3 次。12 000 r·min⁻¹ 室温下离心 10 min,取上清至新的离心管中,用等体积苯酚/氯仿溶液(1:1)抽提,充分混匀。12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清后再用等体积的氯仿抽提 1 次。12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。转移上清于 0.6 倍体积经 -20℃ 预冷的异丙醇中,并在 -20℃ 下静置 30 min,12 000 r·min⁻¹ 离心 20 min 以沉淀 DNA。弃上清,加入 1 mL -20℃ 预冷的 70% 乙醇清洗沉淀物,短时间离心后弃乙醇,重复洗涤过程 1 次。置至吸水纸巾上风干,直至乙醇挥发殆尽。干燥后加入 100 μL TE 缓冲液, -20℃ 保存备用。

1.3.4 PCR 的扩增 PCR 反应体系:5 μL PCR 缓冲液,2 mmol Mg²⁺,1.25 U Taq 酶,dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 0.2 mmol·L⁻¹,0.4 μmol·L⁻¹ 引物,5 μL 模板 DNA,灭菌超纯水补齐至 50 μL。

Lectin 基因 PCR 反应条件:95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 30 s,62.1℃ (60.8℃、58.1℃) 退火 90 s (50 s、50 s),72℃ 延伸 90 s (50 s、50 s),40 次循环,72℃ 延伸 5 min。

Cp4 epsps 基因 PCR 反应条件:95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 30 s,60.3℃ (57℃、60℃) 退火 90 s (50 s、50 s),72℃ 延伸 90 s,40 次循环,72℃ 延伸 5 min。

CaMv 基因 PCR 反应条件:95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 30 s,54.5℃ 退火 50 s,72℃ 延伸 90 s,40 次循环,72℃ 延伸 5 min。

Nos 基因 PCR 反应条件:95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 30 s,45.5℃ 退火 50 s,72℃ 延伸 90 s,40 次循环,72℃ 延伸 5 min。

1.3.5 PCR 产物检测 引物 Lec3/Lec3.、引物 Cp2/Cp2.、引物 Cp3/Cp3.、引物 CaMv1/CaMv1.、引物 Nos1/Nos1. 在 2.0% 的琼脂糖凝上 100 V 恒压条件下,电泳 35 min。

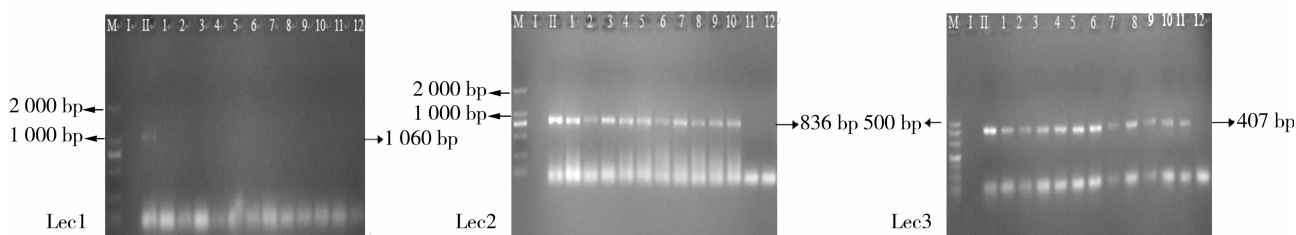
引物 Lec1/Lec1.、引物 Lec2/Lec2.、引物 Cp1/Cp1. 在 1.0% 琼脂糖凝胶上 100V 恒压条件下,电泳 35 min,完毕后置凝胶成像仪中记录结果。

2 结果与分析

2.1 湿热处理对大豆基因及调控元件的影响

2.1.1 湿热处理对内源基因 *Lectin* 的影响 图 1 表示的是湿热处理下内源基因 *Lectin* 的 PCR 电泳扩增图,将大豆置于蒸汽高压锅中,不同温度各放置 3、9、15 min,70℃ 处理 3 min 时 1 060 bp 的片段就不能检测到(图 1-Lec1),1 060 bp 的片段只能在大豆原料中存在;当条件达到 100℃,9 min 时 *Lectin*

的片段就降解到 836 bp 以下(图 1-Lec2);在 100℃ 处理 15 min 时 Lectin 片段降解到 407 bp 以下(图



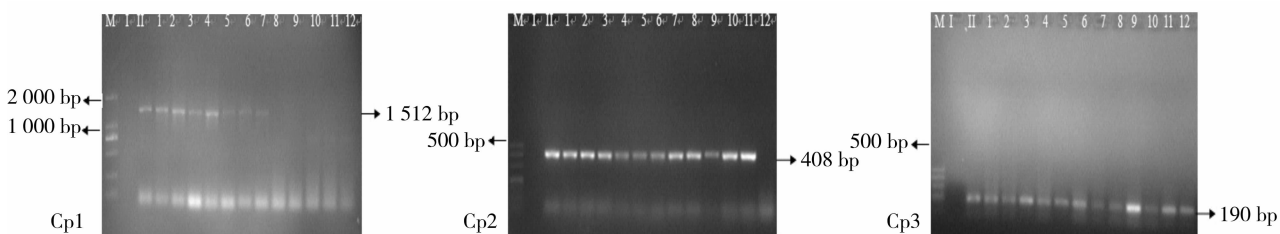
Lec1:1 060 bp 片段;Lec2:836 bp 片段;Lec3:407 bp 片段;M:DL2000 marker(图 1-Lec3 为 DL500 marker);I:空白对照;II:未加工大豆;1~3:70℃ 分别处理 3、9、15 min;4~6:80℃ 分别处理 3、9、15 min;7~9:90℃ 分别处理 3、9、15 min;10~12:100℃ 分别处理 3、9、15 min。
Lec1:1 060bp fragment;Lec2:836 bp fragment;Lec3:407 bp fragment;M:DL500 marker(Fig1-Lec3:DL500 marker) I: Blank control;II: Unprocessed soybean;1~3:70℃ processed for 3、9 and 15 min, respectively;4~6:80℃ processed for 3、9 and 15 min, respectively;7~9:90℃ processed for 3、9 and 15 min, respectively;10~12:100℃ processed for 3、9 and 15 min, respectively.

图 1 大豆经过湿热处理后不同片段内源基因 *Lectin* 的 PCR 扩增电泳图

Fig. 1 Gel electrophoresis of PCR products obtained with *Lectin* gene after moist heat

2.1.2 湿热处理对外源基因 *Cp4 epsps* 的影响 图 2 为将大豆置于蒸汽高压锅中 70℃、80℃、90℃、100℃,各放置 3、9、15 min 得到 *cp4 epsps* 基因不同片段的扩增结果图,1 512 bp 片段在 90℃ 湿热处理

9 min 已经不能检测到;经过 100℃ 湿热 15 min 处理后 408 bp 的片段不能被检测到,190 bp 的小片段经所有处理后仍能检测到(图 2-Cp3)。



Cp1:1 512 bp 片段;Cp2:408 bp 片段;Cp3:190 bp 片段;M:DL500 marker(图 2-Cp1 为 DL2000 marker);其余图注同图 1。

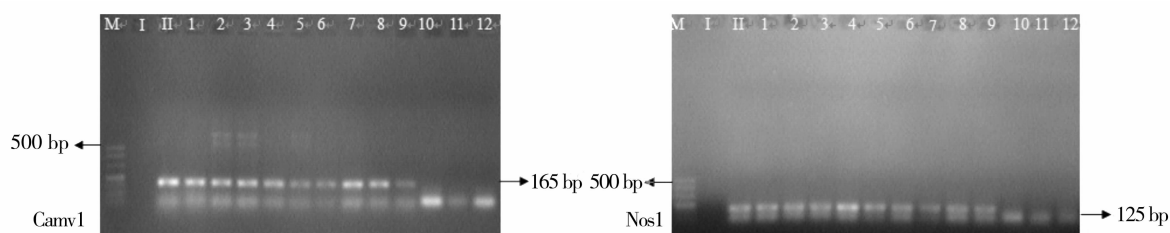
Cp1:1 512 bp fragment;Cp2:408 bp fragment;Cp3:190 bp fragment;M:DL500 marker(Fig. 2-Cp1:DL2000 marker);The remaining figure note were same with figure 1.

图 2 大豆经过湿热处理后外源基因 *Cp4 epsps* 的 PCR 扩增电泳图

Fig. 2 Gel electrophoresis of PCR products obtained with *Cp4 epsps* gene after moist heat

2.1.3 湿热处理对启动子 *CaMV35S* 与 *Nos* 终止子的影响 如图 3 所示,当加工条件达到 100℃ 湿热处理 3 min 时,启动子 *CaMv35S* 165 bp 片段已降

解。在 100℃ 湿热处理 3 min 时,终止子 *Nos* 125 bp 的片段已经降解,相比干热处理,湿热加工更能使启动子和终止子产生降解。



Camv1:165 bp 片段;Nos1:125 bp 片段;M:DL500 marker;其余图注同图 1。

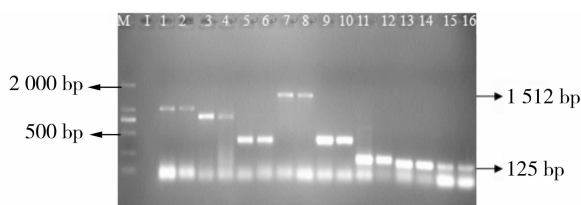
Camv1:165 bp fragment;Nos1:125 bp fragment;M:DL500 marker;The remaining figure note were same as figure 1.

图 3 大豆经过湿热处理后启动子 *CaMV35S* 与 *Nos* 终止子的 PCR 扩增电泳图

Fig. 3 Gel electrophoresis of PCR products obtained with *CaMV35S* and *Nos* gene after moist heat

2.2 不同粉碎方法对基因及调控元件的影响

图 4 为转基因大豆经过 2 种不同提取 DNA 前处理的粉碎方法(机械和液氮粉碎)后所得出的各基因条带 PCR 电泳扩增图。结果表明,样品在经过 2 种粉碎处理后所检测基因及调控元件片段均未产生降解,这 2 种常用的粉碎方法的处理都不能有效地降解转基因大豆的 DNA,且 2 种方法提取后的 PCR 效果趋于一致。



M. DL2000 marker; I. 空白对照; 1. 机械粉碎 *Lectin1* 060 bp 片段; 2. 液氮粉碎 *Lectin1* 060 bp 片段; 3. 机械粉碎 *Lectin836* bp 片段; 4. 液氮粉碎 *Lectin836* bp 片段; 5. 机械粉碎 *Lectin407* bp 片段; 6. 液氮粉碎 *Lectin407* bp 片段; 7. 机械粉碎 *Cp4 epsps1* 512 bp 片段; 8. 液氮粉碎 *Cp4 epsps1* 512 bp 片段; 9. 机械粉碎 *Cp4 epsps408* bp 片段; 10. 液氮粉碎 *Cp4 epsps408* bp 片段; 11. 机械粉碎 *Cp4 epsps190* bp 片段; 12. 液氮粉碎 *Cp4 epsps190* bp 片段; 13. 机械粉碎 *Camv165* bp 片段; 14. 液氮粉碎 *Camv165* bp 片段; 15. 机械粉碎 *Nos125* bp 片段; 16. 液氮粉碎 *Nos125* bp 片段。

M. DL2000 marker; I. Blank control; 1. Mechanical crushing *Lectin1* 060 bp fragment; 2. LN crushing *Lectin1* 060 bp fragment; 3. Mechanical crushing *Lectin836* bp fragment; 4. LN crushing *Lectin836* bp fragment; 5. Mechanical crushing *Lectin407* bp fragment; 6. LN crushing *Lectin407* bp fragment; 7. Mechanical crushing *Cp4 epsps1* 512 bp fragment; 8. LN crushing *Cp4 epsps1* 512 bp fragment; 9. Mechanical crushing *Cp4 epsps408* bp fragment; 10. LN crushing *Cp4 epsps408* bp fragment; 11. Mechanical crushing *Cp4 epsps190* bp fragment; 12. LN crushing *Cp4 epsps190* bp fragment; 13. Mechanical crushing *Camv165* bp fragment; 14. LN crushing *Camv165* bp fragment; 15. Mechanical crushing *Nos125* bp fragment; 16. LN crushing *Nos125* bp fragment。

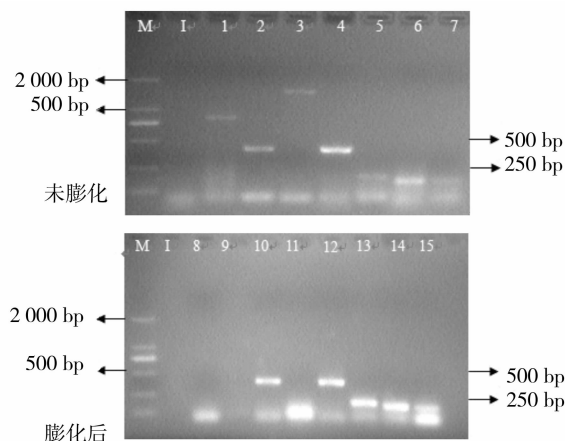
图 4 不同粉碎方法对大豆基因及调控元件影响的比较 PCR 扩增电泳图

Fig. 4 Gel electrophoresis of PCR products obtained with the comparition of different crushing methods for soybean and non-target gene regulation

2.3 膨化工艺对基因及调控元件的影响

图 5 为同类品种转基因大豆粉膨化前后的基因 PCR 电泳扩增图,膨化后的大豆粉中检测到 *Lectin407* bp 片段、*Cp epsps408* bp、*Cp epsps190* bp 片段、启动子 *CaMv165* bp 片段、终止子 *Nos125* bp 片段,说明膨化工艺使大豆内源基因降解到 407 bp,外源基因降解到 408 bp 以下,且检测到启动子和终止

子,表明样品原料中含有转抗草甘膦基因大豆成分。



M. DL2000 marker; I. 空白对照; 1. *Lectin836* bp 片段; 2. *Lectin407* bp 片段; 3. *Cp4 epsps1* 512 bp 片段; 4. *Cp4 epsps408* bp 片段; 5. *Cp4 epsps190* bp 片段; 6. *CaMv165* bp 片段; 7. *Nos125* bp 片段; 8. *Lectin1* 060 bp 片段; 9. *Lectin836* bp 片段; 10. *Lectin407* bp 片段; 11. *Cp4 epsps1* 512 bp 片段; 12. *Cp4 epsps408* bp 片段; 13. *Cp4 epsps190* bp 片段; 14. *CaMv165* bp 片段; 15. *Nos125* bp 片段。

M. DL2000 marker; I. Blank control; 1. *Lectin836* bp fragment; 2. *Lectin407* bp fragment; 3. *Cp4 epsps1* 512 bp fragment; 4. *Cp4 epsps408* bp fragment; 5. *Cp4 epsps190* bp fragment; 6. *Camv165* bp fragment; 7. *Nos125* bp fragment; 8. *Lectin1* 060 bp fragment; 9. *Lectin836* bp fragment; 10. *Lectin407* bp fragment; 11. *Cp4 epsps1* 512 bp fragment; 12. *Cp4 epsps408* bp fragment; 13. *Cp4 epsps190* bp fragment; 14. *Camv165* bp fragment; 15. *Nos125* bp fragment。

图 5 膨化处理对大豆基因及调控元件影响的 PCR 扩增电泳图

Fig. 5 Gel electrophoresis of PCR products obtained with the influence of extrusion processing to soybean genes and regulatory elements

3 讨论

目前市场上大多数的大豆为转基因大豆,从理论上讲,转基因产品经过若干的加工程序,例如物理、化学或者酶因子都会使 DNA 受到破坏^[3]。Gawienowski 等^[4]研究表明,经浸泡、湿磨等加工过程能使玉米基因和质粒 DNA 降解,135℃ 加热 2 h 后, DNA 几乎完全降解。Kharazmi 等^[5]认为,浸泡后又经过物理破碎处理而做成的豆奶、豆腐和热加工做成的玉米糊和马铃薯,没有检测出大于 1.1 kb 的 DNA 片段。Chiter 等^[6]对饲料中的一些植物性原料,如油菜籽、小麦粉、亚麻籽、大豆、新鲜的玉米粉和玉米粒、甜菜及甜菜浆中 DNA 的稳定性进行了研究。结果表明,对作物原料至少进行 5 min 不低于 95℃ 的热处理是降解 DNA 所必需的,但对作物

叶片和种子采用如研磨、粉碎等物理方法处理不能有效地降解其 DNA。陈颖等^[7]研究了大豆在加工为豆腐、豆奶和豆粉过程中各项加工工艺对 *CaMv* 启动子和 *Nos* 终止子调控元件的影响,发现调控元件在食品加工过程中的降解变化与其所处位置有较大关系,大豆基因组 DNA 序列片段受加工过程的影响较小,在 3 种豆制品的加工过程中均能测到,原料经过加工后片段大小降解至 200 bp 以下;*Nos* 终止子受食品加工工艺影响较小,在被检测的每个食品加工过程中均能检测到。

该试验的目的在于如何利用加工环节破坏转基因成分,降低转基因粮食的食用和使用安全风险,以转基因大豆为原料对其内外源基因及调控元件进行扩增,发现大豆在经过粉碎、湿热、膨化的工艺后,其内源基因 *Lectin*、外源基因 *Cp4 epsps*、启动子 *CaMv*、终止子 *Nos* 都会引起不同程度的降解。研究表明,大豆经过 100℃ 湿热处理 15 min 后,内源基因降解到 407 bp 以下;经过 100℃ 湿热处理 15 min 后,外源基因降解到 408 bp 以下;而 100℃ 下 3 min 湿热处理后启动子和终止子都产生了降解。此外,液氮粉碎法与机械粉碎法的效果趋于一致。膨化处理后,基因片段也产生了不同程度的降解。值得提出的是加工后的食品中含有多种添加剂,与普通原料相比,成分更为复杂,加工工艺更为繁琐,对其基因的影响可能是多方面的^[8-9],因此对加工后产品中基因的降解变化还需要进行深入研究,以进一步明确外源基因以及调控元件造成的潜在风险。

参考文献

- [1] 郑文杰,刘火豆,刘伟,等. 转基因大豆加工产品的定性 PCR 检测[J]. 农业生物技术学报,2003,11(5):467-471. (Zheng W J, Liu H G, Liu W, et al. Qualitative analysis of the processed genetically modified soybean products by PCR-based methods[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2003, 11(5):467-471.)
- [2] 朱元招,尹靖东,李德发,等. 抗草甘膦转基因大豆 PCR 定量检测研究[J]. 中国农业大学学报,2005,10(3):5-29. (Zhu Y Z, Yin J D, Li D F, et al. Quantitative PCR method for detecting glyphosate tolerant gene transfer in soybeans[J]. Journal of China Agricultural University, 2005, 10(3):5-29.)
- [3] Hagen M. Detection of genetically modified soy (Roundup-Ready) in processed food products[J]. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 2000, 113(11-12):454-458.
- [4] Gawienowski M C, Eckhoff S R, Ping Y, et al. Fate of maize DNA during steeping wet milling and processing[J]. Cereal Chemistry, 1999, 76(3):371-374.
- [5] Kharazmi M, Bauer T, Hammes W P, et al. Effect of food processing on the fate of DNA with regard to degradation and transformation capability in *Bacillus subtilis*[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2003, 26(4):495-501.
- [6] Chiter A, Michael J, Forbes M, et al. DNA stability in plant tissues; implications for the possible transfer of genes from genetically modified food[J]. Federation of European Biochemical Societies Letters, 2000, 481:164-168.
- [7] 陈颖,王媛,徐宝梁,等. Roundup Ready 大豆外源基因在食品加工过程中的降解变化[J]. 中国油料作物学报,2005,27(2):10-14. (Chen Y, Wang Y, Xu B L, et al. Degradation of exogenous gene in Roundup Ready soybean during different manufacturing process of soybean foods[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2005, 27(2):10-14.)
- [8] 王媛. 转基因大豆内、外源基因在食品加工过程中变化规律的研究[D]. 北京:中国农业大学,2005. (Wang Y. Degradation of endogenous and exogenous genes of transgenic roundup ready soybean during its processing[D]. Beijing: China Agricultural University, 2005.)
- [9] 朱元招. 抗草甘膦大豆转基因 PCR 检测及其饲用安全研究[D]. 北京:中国农业大学,2004. (Zhu Y Z. Study on transgenic detection with PCR and feeding safety of glyphosate tolerant soybeans[D]. Beijing: China Agricultural University, 2004.)