

广州市农贸市场中转基因大豆的检测

芦春斌, 金庆敏, 杨冬宇

(暨南大学 生命科学技术学院 生殖免疫研究所, 广东 广州 510632)

摘要:对广州市农贸市场中销售的大豆进行转基因大豆的初步筛查,以检测在广州市场是否有转基因大豆流通和销售,为相关标识和监管提供实验依据。根据转基因大豆内参凝集素 *Lectin* 基因及外源基因 *CaMV35S*、*NOS* 及 *EPSPS* 基因序列设计 4 对引物,对收集的大豆样品提取其基因组 DNA 后进行 PCR 检测。结果在所收集的 14 份大豆样品中检测出 1 份转基因大豆,表明在广州农贸市场中存在转基因大豆,并在市场流通,提醒相关部门需根据国家规定需要加强监管力度。

关键词:转基因大豆;检测;聚合酶链式反应

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2012)04-0680-05

Detection of the Roundup Ready Soybean in the Market of Guangzhou

LU Chun-bin, JIN Qing-min, YANG Dong-yu

(Institute of Reproductive Immunology, College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China)

Abstract: In recent years, with the development of transgenic technology, more and more transgenic plants have been marketed. Among genetically modified plants, the planting area and yield of transgenic soybean ranked in the top in the world. GM soybean has also become the largest import crop in China. This study was aimed to monitor the presence of transgenic soybean in the market of Guangzhou city. In Guangzhou market, circulating soybeans were sampled to detect genetically modified soybeans. Four primer pairs of *EPSPS*, *lectin*, *CaMV35S* promoter and *NOS* terminator targeted the sequence of foreign genes and reference gene, *Lectin*, were designed. Genomic DNA of soybean samples were extracted and amplified by PCR, and the detection results showed the presence of one line of transgenic soybean among 14 samples. Therefore, it was strongly suggested that the supervision of circulation and sale of soybean in free-market must be strengthened by governmental reinforcement followed governmental regulations.

Key words: Transgenic soybean; Detection; PCR

随着分子生物学研究的深入,转基因技术也日趋成熟,转基因技术在动物、植物、微生物等领域的应用也日益增多,以转基因植物的研究最为广泛,转基因玉米、大豆、菜籽、棉花等转基因农作物不断问世。相比于传统农作物,转基因作物具有抗虫、抗病等优势。目前,如美国、巴西、阿根廷、印度等国已成为主要的转基因作物种植地区,大约有 20 多种转基因农作物的种子已经获准在美国播种^[1-2]。2010 年,巴西和阿根廷种植的耐草甘膦大豆,分别占本国大豆总面积的 75% 和 98%,全球抗除草剂转基因大豆总种植面积达到 7 300 万 hm^2 ,占全球转基因作物种植面积的 50%,成为全球种植面积最大的转基因作物^[3]。在国际上商业化种植和推广的转基因大豆中,以美国孟山都(Monsanto)公司开发的抗除草剂草甘膦大豆(GTS40-3-2,商品名农达)的种植范围最为广泛^[4-5]。

大豆原产于中国,但传统国产大豆产量和品质

都远逊于国外的转基因大豆,无法满足国内市场需求,因此转基因大豆被大量进口用于食用油的生 产。与传统大豆相比,进口转基因大豆无论是生产成本还是出油率都存在较大竞争力,对我国传统大豆生产形成了巨大的冲击^[6-7]。

广东省作为一个沿海省份,每年进口大量的转基因大豆,按规定进口的转基因大豆绝大多数用于食用油的生 产。根据卫生部颁布的《转基因食品卫生管理办法》,食品中含有转基因成分的,要在包装上标明“转基因标识”,但是现在市面销售的大豆或含有大豆成分的食品大多未进行转基因标识,侵害了消费者的知情权。同样由于市场中作为食品或食品原料销售的大豆种子大多数具有正常的活力,可以萌发生长和用于扩大种植,如果其中混杂有转基因种子,转基因大豆的种植会对我国的传统大豆造成污染,危害我国的种子安全。本文收集了广州市天河农贸市场销售的全部大豆种子样品,对其进

收稿日期:2011-11-09

基金项目:转基因生物新品种培育项目(2011ZX08012-005);广东省科技计划项目(2010B031600108)。

第一作者简介:芦春斌(1964-),男,副研究员,博士,硕士生导师,研究方向为转基因与生物安全。E-mail:tcblu@jnu.edu.cn。

行外源转基因检测,以调查农贸市场是否有转基因大豆流通,为加强农贸市场上转基因大豆种子的监管提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验样品及试剂

1.1.1 样本收集 阳性转基因大豆为本实验室保存的美国孟山都公司研制的转基因大豆农达 GTS40-3-2,非转基因大豆为东北产大豆 W28544。从广州市天河的一些超市及农贸市场中随机收集了大豆样品 14 份,并随机编号为 1~14。将收集的大豆种子粉碎,过 70 目筛,烘干至恒重备用。

1.1.2 主要试剂 DNA 提取试剂:CTAB、EDTA、Tris、氯仿、Tris 饱和酚、乙醇、异丙醇、蛋白酶-K 等购自北京鼎国生物技术有限公司;Premix Taq、6 × Loading Buffer 购自大连宝生物技术有限公司;100 bp DNA Marker 等购自天根生物技术有限公司。

1.1.3 仪器 种子粉碎机购自九阳股份有限公司,凝胶成像系统、PTC-100 型 PCR 仪购自美国 Bio-

Rad 公司,低温冷冻离心机购自安徽中科中佳科学仪器有限公司,移液器、高速离心机购自 Eppendorf 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 大豆基因组 DNA 的提取 将大豆用粉碎机充分粉碎成粉状,过 70 目筛后称取 50 mg 粉末试样于 1.5 mL Ep 管中,具体操作办法参见农业部行标中的方法^[8]并略作改进,将原行标方法的裂解水浴时间由 30~90 min 延长至 120 min,每间隔 10 min 充分颠倒混匀,离心时间由 2 min 延长至 10 min,重复酚/氯仿/异戊醇(25/24/1)抽提蛋白操作 1 次,保证蛋白被抽提干净。以 0.7% 琼脂糖凝胶电泳对提取的基因组 DNA 进行鉴定,并用分光光度计测定基因组浓度和纯度。

1.2.2 引物设计 根据 NCBI 上公布的 *Lectin* (登录号 K00821.1), *CaMV35S* (GQ497217.1), *NOS* (AB524019.1), *CP4-EPSPS* (AB209952.1) 序列分别设计 4 对引物,由博尚生物公司合成,引物序列如表 1 所示。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

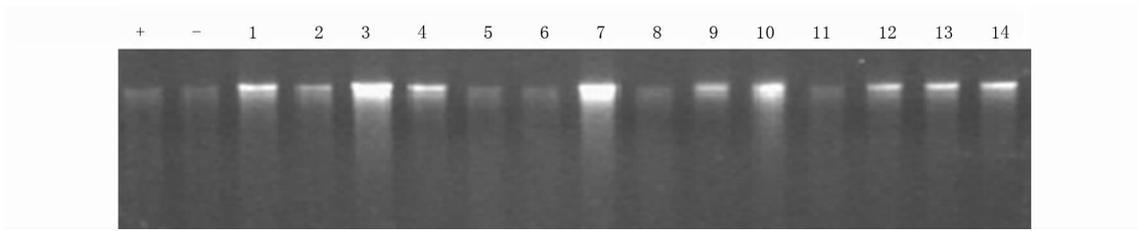
基因 Gene	引物名称 Name of primer	引物序列 Primer sequence	Tm 值 Tm value/°C	产物大小 The size of the product/bp
<i>Lectin</i>	<i>Lectin-F</i>	5'-ATCCTCCAAGGAGACGCTATTG-3'	68.8	
	<i>Lectin-R</i>	5'-ACCCACTCGGGAAGAGAAGTC-3'	73.6	557
<i>Cp4-Epsps</i>	<i>Epsps-F</i>	5'-CCTTCATGTTGCGCGTCTCG-3'	70.1	
	<i>Epsps-R</i>	5'-GCGTCATGATCGGCTCGATG-3'	70.7	498
<i>NOS</i>	<i>NOS-F</i>	5'-TGAATCCTGTGCGCGTCTT-3'	71.3	
	<i>NOS-R</i>	5'-AAATGTATAATTGCGGACTCTAATC-3'	68.2	138
<i>CaMV35S</i>	<i>CaMV35S-F</i>	5'-ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT-3'	69.3	
	<i>CaMV35S-R</i>	5'-CCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCT-3'	71.3	101

1.2.3 PCR 的反应体系及扩增条件 根据 Premix Taq Version 2.0 使用说明书,向 50 μL 反应体系中加入 Premix Taq 酶 25 μL,正反向引物各为 1 μL(浓度 20 μmol·L⁻¹),所加引物终浓度均为 0.4 μmol·L⁻¹,模板 DNA 2 μL(DNA 浓度为 100 ng·μL⁻¹),加 ddH₂O 补足至 50 μL。PCR 扩增程序:95℃ 5 min,95℃ 40 s,60℃ 50 s,72℃ 50 s,35 个循环,72℃ 5 min,4℃ 30 min。取 5 μL PCR 产物,经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,观察是否有 *Lectin*, *CaMV35S*, *NOS*, *CP4-EPSPS* 等基因相对应的目的条带,利用凝胶成像系统进行观察和记录结果。

2 结果与分析

2.1 大豆基因组的提取

常规的植物 DNA 提取方法需要进行抽提蛋白步骤,但大豆中蛋白含量较高,常影响 PCR 检测、Southern 杂交等分析结果,为保证提取的 DNA 较纯净并防止残存的蛋白对后续的检测造成影响,重复酚/氯仿/异戊醇抽提蛋白操作 1 次,经紫外分光光度计对提取的 DNA 进行检测,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值为 1.6~1.9,得到的大豆基因组 DNA 纯度高,几乎再无蛋白质污染。经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳观察,提取的基因组条带清晰可见,提取的 DNA 质量较好(图 1)。



+ :转基因大豆; - :非转基因大豆 W28544; 1~14:市场上收集大豆样本
 + :Transgenic soybean GTS40-3-2; - :Non-transgenic soybean W28544; 1-14: Fourteen soybean samples collected from market

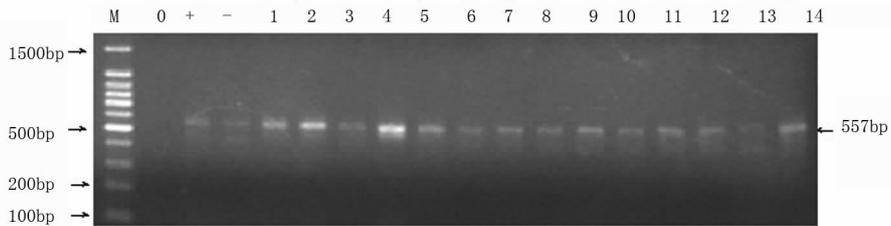
图1 大豆基因组 DNA 提取电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis for DNA extracted from soybean

2.2 大豆内参基因 *Lectin* 检测

Lectin 编码植物凝集素,为大豆本身含有内源基因。对提取的基因组 DNA 以 *Lectin* 引物进行 PCR 检测,所有样品皆能得到目的产物(图 2),说

明所提取的 DNA 质量能满足 PCR 反应要求,且实验建立的 PCR 体系可以正常扩增出大豆内参基因 *Lectin*。



M: DNA 标准分子量; 0: 空白对照(以双蒸水为模板); + : 阳性对照;
 - : 阴性对照; 1~14: 市场上收集大豆样本参检测

M: DNA molecular marker; 0: Blank control (Double-distilled water as template); + : Positive control; - : Negative control; 1-14: Soybean samples

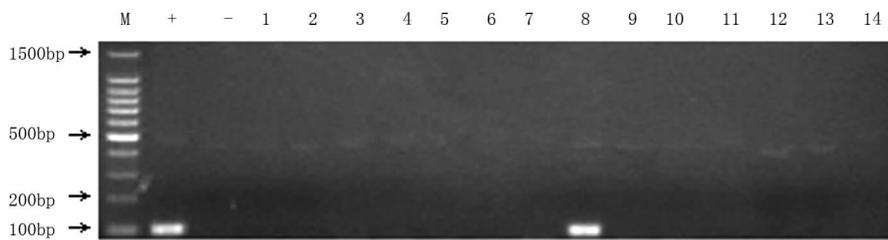
图2 大豆内参基因 *Lectin* 检测

Fig. 2 The internal reference *Lectin* detection of soybean

2.3 外源基因 DNA 检测

对所有样品进行外源基因检测,分别以 GTS-40-2 和 W28544 为阳、阴性对照,分别扩增 *CaMV35S*, *NOS*, *EPSPS* 基因片段,PCR 扩增结果显示 8 号样品的外源基因检测结果与阳性对照组结

果一致, *CaMV35S*, *NOS*, *EPSPS* 基因片段都被扩增出。在所有被检测的 14 份未知大豆样品中只有 8 号样品为转基因大豆,相应的其余样品检测结果皆为阴性,为非转基因大豆(图 3~5)。



M: DNA 标准分子量; + : 阳性对照; - : 阴性对照;
 1~14: 市场上收集大豆样本

M: DNA molecular marker; + : Positive control; - : Negative control; 1-14: Soybean samples

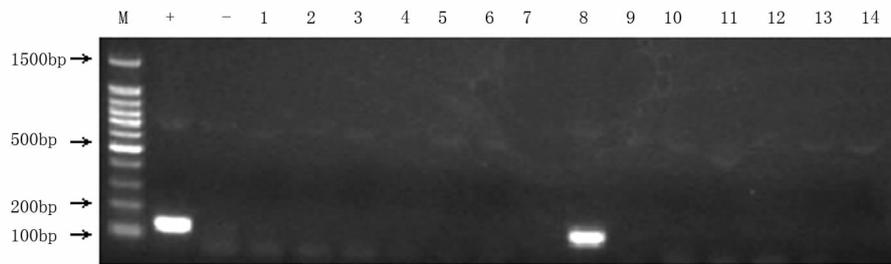
图3 外源基因 *CaMV35S* 检测

Fig. 3 Detection of foreign gene *CaMV35S*

3 结论与讨论

东北是我国大豆的主产区,然而受地理位置的约束及产量不稳定等因素的影响,每年国内的大豆产需出现严重的不均衡,与此同时,由于国外转基因大豆存在成本低,出油率高等优势,对国内的大

豆种植市场产生严重冲击^[6-7],因此中国每年从国外进口大量的转基因大豆,国内 90% 以上大豆油源于进口转基因大豆^[9]。进口转基因大豆一般只用于油料的生产,但其一旦流入种子市场将会对国内传统大豆造成基因污染^[10]。因此本实验对广州市农贸市场中是否存在转基因大豆进行初步筛查。



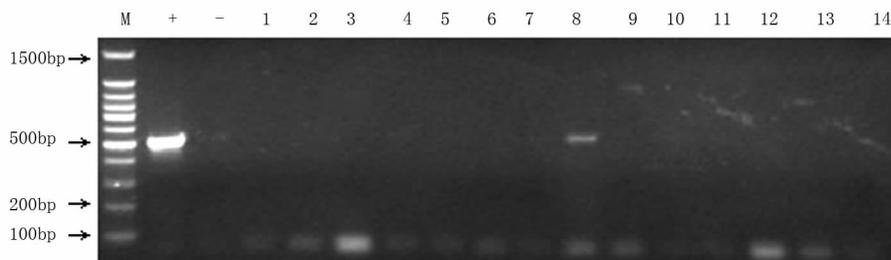
M: DNA 标准分子量; + : 阳性对照;

- : 阴性对照; 1~14: 市场上收集大豆样本

M: DNA molecular marker; + : Positive control; - : Negative control; 1-14: Soybean samples

图4 外源基因 *NOS* 检测

Fig.4 Detection of foreign gene *NOS*



M: DNA 标准分子量; + : 阳性对照; - : 阴性对照;

1~14: 市场上收集大豆样本

M: DNA molecular marker; + : Positive control; - : Negative control; 1-14: Soybean samples

图5 外源基因 *EPSPS* 检测

Fig.5 Detection of foreign gene *EPSPS*

目前转基因食品的检测方法主要有2种^[2],一是针对转基因食品中外源基因的表达产物—蛋白质的检测,如酶联免疫吸附法、蛋白质印记法、“侧流”型免疫测定法,二是针对转基因食品中的外源DNA的检测,如DNA的定性、定量PCR法检测。相比于蛋白质的检测,基于DNA的检测方法灵敏度更高,应用也更加广泛,因此本实验采用定性PCR的方法对收集的样品进行检测。

大豆中蛋白含量比普通植物材料高,本实验中采用行标的方法对大豆基因组进行抽提,通过两步蛋白抽提,充分去除DNA中的蛋白质。结果发现最终提取的基因组DNA条带清晰单一,OD₂₆₀/OD₂₈₀均为1.6~1.9,纯度较高,无蛋白质和RNA污染。

大豆凝集素 *Lectin* 基因是大豆特有的内源基因,常作为PCR检测的内参基因,本实验中以之为靶基因进行PCR检测,在转基因阳性和阴性样品以及14份未知样品中都检测到 *Lectin* 条带,表明通过改进的方法提取的大豆基因组DNA的纯度较高,可用于PCR检测,且最终的PCR反应体系和条件也满足PCR反应要求。

采用3对外源基因引物进行外源基因的检测,分别扩增调控元件 *CaMV35S*、*NOS* 以及功能元件 *EPSPS* 基因,由于西兰花、卷心菜、花椰菜、甘蓝等

十字花科植物在自然条件下很容易感染花椰菜花叶病毒 (*CaMV*),因此在大豆DNA中检测到 *CaMV35S* 不能确定其为转基因大豆^[11],而另外一个筛选基因为 *NOS* 终止子, *NOS* 终止子一般只存在于用于转化植物使用的农杆菌中,其检测阳性不能确定是转基因大豆。当某样品检测到 *CaMV35S* 启动子和 *NOS* 终止子皆为阳性时,便可以初步判定为转基因作物,而对功能元件 *EPSPS* 等基因作为植物转化所转入的目的外源基因,对其检测可与 *CaMV35S*、*NOS* 的检测结果共同作为转基因大豆检测的标准,当对样品进行检测的3个外源基因皆为阳性时即可确认该样品为转基因大豆。

本实验从广州农贸市场中收集了14份大豆,经检测有1份样品为转基因大豆,说明转基因大豆已进入流通领域和日常食品生产中,未达到有效的监管。我国目前并没有批准转基因大豆种子的种植和生产,在广州市场上转基因大豆不仅没有按要求进行转基因标识,也没有合法来源,违反了国家关于转基因种子生产和销售的相关法律法规,其非法流通和违规种植就可能对国内的传统大豆造成污染,影响我国的大豆种植安全并可能对物种多样性造成严重威胁,需要引起有关部门和研究机构的关注。

参考文献

- [1] 徐俊锋,孙彩霞,陈笑芸.转基因食品现状及贸易措施分析[J].中国农学通报,2009,25(22):42-46. (Xu J F, Sun C X, Chen X Y. Status of genetically modified food and analysis of trade measures [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2009, 25(22):42-46.)
- [2] 张洪瑞,朱其松,宋克勤,等.转基因食品的安全性评价与检测技术[J].河北农业科学,2008,12(9):101-105. (Zhang H R, Zhu Q S, Song K Q, et al. Study on the safety evaluation and detection techniques of transgenic foods [J]. Journal of Hebei Agricultural Sciences, 2008, 12(9):101-105.)
- [3] 李云河,李香菊,彭于发.转基因耐除草剂作物的全球开发与利用及在我国的发展前景和策略[J].植物保护,2012,37(6):32-37. (Li Y H, Li X J, Peng Y F. Global development of herbicide tolerant transgenic crops and a strategic prospect for China [J]. Plant Protection, 2012, 37(6):32-37.)
- [4] 蒋亦武,黄明,王保战,等.转基因大豆及其制品中转基因成分检测技术研究进展[J].江苏农业科学,2011(1):345-348. (Jiang Y W, Huang M, Wang B Z, et al. Progress on detection technology of transgenic soybean and its products [J]. Jiangsu Agricultural Science, 2011(1):345-348.)
- [5] 李建平,肖琴,周振亚,等.转基因作物产业化现状及我国的发展策略[J].农业经济问题,2012(1):23-29. (Li J P, Xiao Q, Zhou Z Y, et al. The industrialization status of GM crops and the development strategy of China [J]. Issues in Agricultural Economy, 2012(1):23-29.)
- [6] 庾晋.进口大豆对国内市场影响[J].西部粮油科技,2003,28(6):3-4. (Yu J. Influence of importing soybean on domestic market [J]. China Western Cereals & Oils Technology, 2003, 28(6):3-4.)
- [7] 张兴敏,于洪敏,魏健,等.转基因食品中外源DNA降解和代谢的研究进展[J].中国农业科技导报,2008(10):52-57. (Zhang X M, Yu H M, Wei J, et al. research progress on degradation and metabolism of foreign dna in genetically modified food (GMF) [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2008(10):52-57.)
- [8] GB/T19495.3-2004,转基因产品检测-基因芯片检测方法[S].北京,2004. (GB/T19495.3-2004, Detection of genetically modified organisms and derived products nucleic acid extraction [S]. Beijing, 2004.)
- [9] 谭涛,陈超.我国转基因农产品生产,加工与经营环节安全监管:政策影响与战略取向[J].南京农业大学学报(社会科学版),2011,11(3):132-137. (Tan T, Chen C. Safety supervision of genetically modified agricultural production, processing and management: Policy implications and strategic orientation [J]. Journal of Nanjing Agricultural University (Social Science), 2011, 11(3):132-137.)
- [10] Zhou X, Liu W, Lian J, et al. Monitoring of Roundup (TM) Ready Soybean in Guangdong province in China [J]. Food Control, 2007: 1219-1222.
- [11] 吴宏中,高东微,董洁,等. PCR-GeneScan 法检测转基因产品 [J]. 生物技术, 2001, 11(5):1-4. (Wu H Z, Gao D W, Dong J, et al. Detection of genetically modified soya and maize by PCR-GeneScan [J]. Biotechnology, 2001, 11(5):1-4.)
- (上接第 679 页)
- [5] 王萍,吴颖,季静,等.大豆组织培养的研究进展[J].大豆科学,2003,22(2):142-145. (Wang P, Wu Y, Ji J, et al. Current progress on tissue culture of soybean [J]. Soybean Science, 2003, 22(2):142-145.)
- [6] 王萍,张艳君,管娟娟,等.大豆胚尖不定芽诱导影响因子的研究[J].作物杂志,2011(1):17-20. (Wang P, Zhang Y J, Guan J J, et al. Induction of adventitious buds from embryonic tip in soybean [J]. Crops, 2011(1):17-20.)
- [7] 邱承祥,武天龙.6-BA 对大豆茎尖诱导再生植株的研究[J].大豆科学,2003,22(1):32-35. (Qiu C X, Wu T L. Study on 6-BA to the regeneration of tip shoot of soybean [J]. Soybean Science, 2003, 22(1):32-35.)
- [8] 林树柱,曹越平,卫志明,等.6-BA 诱导大豆子叶节和茎尖出芽的研究[J].上海交通大学学报(农业科学版),2005,23(2):138-142. (Lin S Z, Cao Y P, Wei Z P, et al. Studies on shoots induced by 6-BA from cotyledonary nodes and embryonic tips of soybean [J]. Journal of Shanghai Jiaotong University (Agriculture Science) 2005, 23(2):138-142.)
- [9] 卜云萍,李明春,胡国武,等.大豆子叶节组培再生系统与农杆菌介导的基因转化系统的比较研究[J].南开大学学报(自然科学版),2003,36(1):103-108. (Bu Y P, Li C M, Hu G W, et al. The study of comparing the transformation system of *Agrobacterium*-mediated and regeneration system of cotyledon node of soybean culture [J]. Journal of Nankai University (Nature Science Edition), 2003, 36(1):103-108.)
- [10] 王岚, Clemente T, 王连铮,等.大豆品种的再生性能及对 EHA101 农杆菌的敏感性[J].作物学报,2003,29(5):664-669. (Wang L, Clemente T, Wang L J, et al. Regeneration study of soybean cultivars and their susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 [J]. Acta Agronomica Sinica, 2003, 29(5):664-669.)
- [11] 王萍,张淑珍,李文滨,等.大豆不同基因型胚尖不定芽的诱导及对抗生素的敏感性[J].作物杂志,2010(2):50-53. (Wang P, Zhang S Z, Li W B, et al. Induction of adventitious shoots from embryonic tip of different soybean genotype and their sensibility to antibiotics [J]. Crops, 2010(2):50-53.)