论著

食品中转基因成分的 PCR 快速检测研究

冯家望　吴小伦　王小玉　黄云君　薄清如　陈静静
(珠海出入境检验检疫局,广东　珠海　519015)

摘　要:为建立食品中转基因成分的快速检测方法,针对转基因大豆、玉米、油菜的多个相对稳定的转基因元件,包括 35*S*、*NOS*、*EPSPS*、*Cry*1*A*、*NPT* II等基因,同时选定植物本身固有的基因:大豆 *Lectin*、玉米 *IVR*、油菜 *Napin* 基因作为内源参照指示基因,设计、筛选出 9 对引物分别组成多重 PCR,结合高灵敏度的聚丙烯酰胺凝胶电泳组成快速检测体系对转基因食品进行检测,1～2 d 能完成整个检测过程。经测试:该检测体系稳定可靠、灵敏准确、特异性好,且操作简便、成本低廉,是一种进行转基因食品检测的良好技术模式。

关键词:食品,转基因;聚合酶链反应;食品分析

Study of rapid detection using PCR on genetically modified food

FENG Jia-wang, WU Xiao-lun, WANG Xiao-yu, HUANG Yun-jun, BO Qing-ru, CHEN Jing-jing
(Zhuhai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of the P. R. C, Guangdong Zhuhai 519015, China)

Abstract: According to the stable in the genetical modified soybeen, corn, cole specific genes (35*S*, *NOS*, *EPSPS*, *Cry*1*A*, *NPT* II), and the inherent control genes in plants: soybeen *Lectin*, corn *IVR*, cole *Napin*, nine primer pairs for multiplex-PCR were designed and screened out. Combining with the high sensitive polyactylamide gel eletrophoresis (PAGE), we developed a rapid detection system for the transgenic food, which will take only 1～2 d for the total detection and was proved to be a good technology model with simple operation, low cost and good credibility, accuration, and specificity.

Key word: Food, Transgenes; Polynerase Chain Reaction; Food Analysis

随着转基因农作物的增多以及转基因动物、微生物研究的逐渐深入和逐步商品化,人类将越来越多地食用由此衍生出的转基因食品(genetically modified food)。食品与人类健康息息相关,转基因食品的安全性问题不容忽视。世界各国都在加强对转基因食品的管理,欧盟、日本、加拿大等国都已制定了对转基因食品进行标签标识管理的法规。我国也制定了《农业转基因生物安全管理条例》,并考虑对转基因食品进行标签标识。这就要求从技术上首先能鉴别出转基因农产品、食品。因此对转基因食品进行管理,当务之急是解决转基因食品的快速检测问题。

国内外许多学者致力于转基因食品的快速检测方法的研究,其中 PCR 技术较为成熟,检验灵敏性高、特异性好且操作简便、出结果快。我们针对转基因大豆、玉米、油菜的多个相对稳定的特异性基因(包括 35*S*, *NOS*, *EPSPS*, *Cry*1*A*, *NPT* II基因),同时选定植物本身固有的基因:大豆 *Lectin*、玉米 *IVR* (maize invertase)、油菜 *Napin* 基因作为参照指示基因,在基因库上查到相应序列,根据引物设计的原则[1,2],并考虑到复合扩增的动力学和反应条件的要求,在 Primer 5.0 软件的辅助下,设计并筛选出 9 对引物分别组成多重 PCR,结合高灵敏度的聚丙烯酰胺凝胶电泳,建立了从食品中检测转基因大豆、玉米、油菜成分的 PCR 检测方法。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　PCR 引物　由上海博亚生物技术有限公司合成,序列、产物长度等见表 1。

1.1.2　转基因材料　转基因大豆 Roundup Ready® Soybean、玉米 Bt11 和 MON80100、油菜 Basta™ 和 HCN92 的标准品购自 Fluka 公司或来自口岸采样。

1.1.3　非转基因材料　购自 Fluka 公司或由华南农

基金项目:珠海市科技攻关项目(2002 - 32)
作者简介:冯家望　男　硕士　工程师

This work was supported by the Science and Technology Plan of Zhuhai of Guangdong, China. (2002 - 32)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 1　PCR 引物详情表

引物名称	靶基因	引物序列	产物长度(bp)
35*S*	35*S*	I 5′- GCTCCTACAAATGCCATCA - 3′ II 5′- GATAGTGGGATTGTGCGTCA - 3′	195
35*S*3	35*S*	I 5′- CCTACAAATGCCATCATTGCG - 3′ II 5′- GGGTCTTGCGAAGGATAGTG - 3′	205
NOS	*NOS*	I 5′- GAATCCTGTTGCCGGTCTTG - 3′ II 5′- TTATCCTAGTTTGCGCGCTA - 3′	180
*LE*1	*Lectin*	I 5′- GCCCTCTACTCCACCCCCATCC - 3′ II 5′- GCCCATCTGCAAGCCTTTTTGTG - 3′	118
*EP*3	*EPSPS*	I 5′- TGGCGCCCAAAGCTTGCATGGC - 3′ II 5′- CCCCAAGTTCCTAAATCTTCAAGT - 3′	355
*CR*3	*Cry*IA(b)	I 5′- AGTTTCCTTTTTGTTGCTCTCCT - 3′ II 5′- GATGTTTGGGTTGTTTGTCCAT - 3′	194
*IV*1	*IVR*	I 5′- CCGCTGTATCACAAGGGCTGGTACC - 3′ II 5′- GGAGCCCGTGTAGAGCATGACGATC - 3′	225
*NA*1	*Napin*	I 5′- GAATGGCGAACAAGCTCTTCCTCG - 3′ II 5′- CGGCTGAGTCTGTGGCATCATCTTC - 3′	120
NPT II	*NPT* II	I 5′- GAACAAGATGGATTGCACGC - 3′ II 5′- GAAGAACTCGTCAAGAAGGC - 3′	785

业大学分子病毒学实验室提供。共 10 种种子:普通大豆、玉米、油菜、豌豆、高粱、芝麻、小麦、水稻、番茄、木瓜。

1.1.4　试剂　DNA 裂解提取液、5 ×反应混合液(含 PCR buffer、dNTP、Mg^{2+} 等)、HS-Taq DNA 聚合酶、DNA Marker 为珠海科登生物有限公司产品;克隆试剂盒 pMD18 - T Vector 为 TaKaRa 公司产品;DNA 提纯试剂盒 High Pure GMO Sample Preparation Kit、High Pure PCR Template Preparation Kit 为 Roche 公司产品,Wizard Genomic DNA Purification Kit、Wizard Magnetic DNA purification system for Food 为 Promega 公司产品,大豆油、酱油、蜂蜜 DNA 提取试剂盒为中国农科院生物所产品。

1.1.5　仪器设备　PCR 仪、高速台式离心机、凝胶图像分析管理系统,珠海黑马公司;ND - 1000 型 DNA 浓度测定仪,美国 NanoDrop 公司;微量连续进样器,德国 Eppendorf 公司;气浴恒温摇床,美国 ENVIRON 公司;MS1 型旋涡混合器,德国 IKA 公司;电泳仪及电泳槽,北京六一仪器厂。

1.2　方法

1.2.1　模板 DNA 制备

1.2.1.1　CTAB 法　参照薛保国的方法[3]。

1.2.1.2　试剂盒法　所有试剂盒操作均参照试剂盒说明书进行。

1.2.1.3　DNA 裂解提取液直接提取　取少量试样到 0.5 ml 离心管中,加适量提取液,室温下作用 10 min,100 ℃保温 10 min,然后 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液用于 PCR 扩增反应。

1.2.2　DNA 浓度测定　提取的模板 DNA、克隆用 PCR 产物用 DNA 浓度测定仪确定浓度。控制模板 DNA 浓度在 100 ng/μl 左右,产物 DNA 浓度 200 ng/μl。

1.2.3　多重 PCR 反应体系　设 25 μl 反应体积,每一反应含 5 ×PCR 反应混合液 5 μl,每个靶基因的 5 μm 上、下游引物各 0.5 μl,各引物的浓度比为 1∶1,模板 DNA 1 μl,HS-Taq DNA 聚合酶 0.5 μl(2 U/μl),用无菌双蒸水补足到 25 μl。引物为:大豆:35*S*、*NOS*、*EP*3、*LE*1;玉米:35*S*3、*NOS*、*CR*3、*IV*1;油菜:35*S*、*NOS*、*NPT* II、*NA*1。

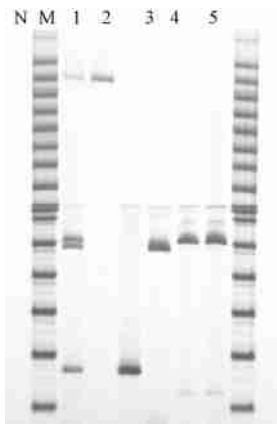
1.2.4　多重 PCR 反应条件　95 ℃预变性 2 min;然后 94 ℃40 s,59 ℃50 s,72 ℃60 s,35 个循环;然后 72 ℃延伸 7 min。每次扩增,设阳性模板对照、阴性模板对照和空白对照各 1 管。

1.2.5　PCR 产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳　用 6 %聚丙烯酰胺凝胶,600 V 电泳 1 h,经固定、染色、显色,而后置于普通光透射仪观察电泳结果,摄影记录。

1.2.6　PCR 产物克隆、测序　用大肠杆菌 JM109 进行感受态细胞的制备[4,5],连接、转化等参照说明书进行。测序委托上海博亚生物技术有限公司进行。

2　结果

2.1　转基因大豆成分的多重 PCR 检测结果　引物 35*S*、*NOS*、*EP*3、*LE*1 在同一 PCR 反应体系中对转基因大豆成分能扩增出长度(bp) 195、180、355、118 的 4 条片段(见图 1),对普通大豆(非转基因)能扩增出大豆特有的参照基因 *Lectin* 的 118 bp 长度片段(引物 *LE*1),其它非转基因材料均不能扩增出上述的 4 条特异性片段,也无其它非特异性条带。



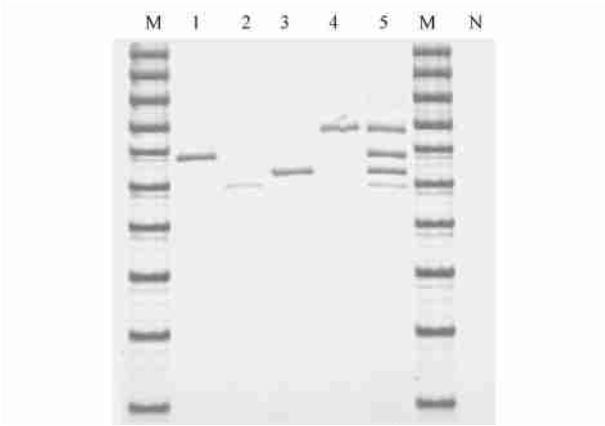
N:阴性对照(豌豆);M:DNA Marker;1:多重 PCR;2:*EP*3;3 - *LE*1;4:*NOS*;5:35*S*;DNA Marker 最下端为 100 bp,间隔为 20 bp。

图 1　转基因大豆成分多重 PCR 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

2.2　转基因玉米成分的多重 PCR 检测结果　引物 35*S*3、*NOS*、*CR*3、*IV*1 在同一 PCR 反应体系中对转基因玉米成分能扩增出长度(bp) 205、180、194、225 的 4 条片段(见图 2),对普通玉米(非转基因)能扩增出玉米特有的参照基因 IVR 的 225 bp 长度片段

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

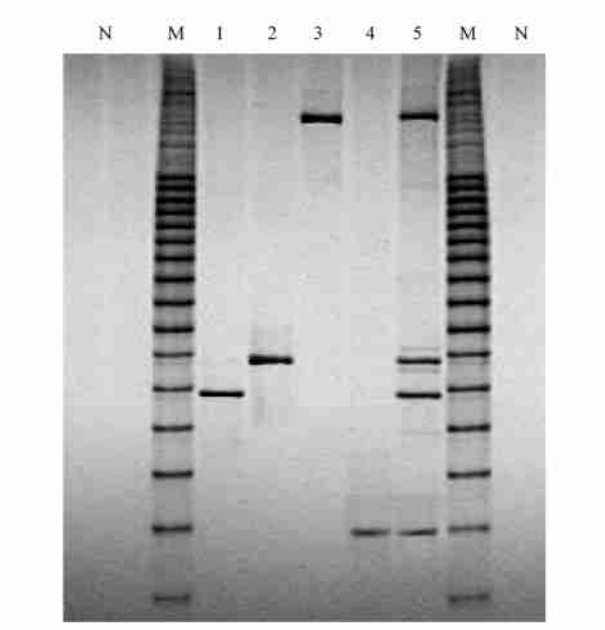
(引物 *IV*1) ,其它非转基因材料均不能扩增出上述的 4 条特异性片段 ,也无其它非特异性条带。



M:DNA marker ;1 :35*S*3 ;2 : *NOS* ;3 : *CR*3 ;4 : *IV*1 ;
5 :多重 PCR ;N :阴性对照(高粱)

图 2 转基因玉米成分多重 PCR 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

2.3 转基因油菜成分的多重 PCR 检测结果 引物 35*S*3、*NOS*、*NA*1、*NPT* Ⅱ在同一 PCR 反应体系中对转基因油菜成分能扩增出长度(bp) 205、180、120、785 的 4 条片段(见图 3) ,对普通油菜(非转基因) 能扩增出油菜特有的参照基因 *Napin* 的 120 bp 长度片段(引物 *NA*1) ,其它非转基因材料均不能扩增出上述的 4 条特异性片段 ,也无其它非特异性条带。



M:DNA marker ;1 : *NOS* ;2 :35*S*3 ;3 : *NPT* Ⅱ;4 : *NA*1 ;
5 :多重 PCR ;N :阴性对照(芝麻)

图 3 转基因油菜成分多重 PCR 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

2.4 测序结果 对 35*S*、35*S*3、*NOS*、*LE*1 、*EP*3 、*IV*1、*NA*1、*NPT* Ⅱ的 PCR 产物进行克隆测序 ,测序结果与基因库中的 35*S* 启动子(M74305. 1) 、*NOS* 终止子 (AF465641. 1) 、*Lectin* (K00821. 1) 、*EPSPS* (AY125353. 1) 、*IVR* (U16123. 1) 、*Napin* (J02798. 1) 、*NPT* Ⅱ (AY18092. 1) 的基因序列进行比对 ,相关序列分别错 1、0、0、1、3、2、0、0 个 bP ,符合率分别为 99. 48 %、100 %、100 %、99. 15 %、99. 15 %、99. 11 %、100 %、100 %; *CR*3 的 PCR 产物涉及相邻的 *Hsp*70 (X03697. 1) 和 *Cry*1*A* (a) (M60856. 1) 2 段基因序列。比对结果显示相关的 194 bP 序列中有 183 bP 相符 ,错 11 个 bP ,符合率 94. 33 %。

3 讨论

对转基因食品进行检测有多种方法 ,可分别对表达蛋白、次级代谢产物、核酸等进行检测 ,目前 PCR 方法较为成熟。普通 PCR、荧光 PCR 主要针对单基因 ,较为繁琐 ,复合扩增多重 PCR 能在同一体系中一次有效检测出多个基因 ,方便易行。本研究选定转基因大豆、玉米、油菜的多个相对稳定的特异性基因 ,包括 35*S*、*NOS*、*EPSPS*、*Cry*1*A*、*NPT* Ⅱ基因 ,同时选定植物本身固有的基因 :大豆 *Lectin*、玉米 *IVR*、油菜 *Napin* 基因作为参照指示基因 ,设计、筛选出 9 对引物分别组成多重 PCR ,并结合高灵敏度的聚丙烯酰胺凝胶电泳对转基因食品进行检测 ,该方法操作简单、灵敏度高、特异性好 ,检测效果良好 ,提供了一种进行转基因食品检测的良好的技术模式。

食品的成分复杂 ,食品中的某些成分对 PCR 反应有明显的干扰 ,且食品中的转基因成分含量低 ,因而从食品中获得高纯度的 DNA 就显得特别重要且比较困难。一般而言 ,用 DNA 裂解提取液直接从食品中提取 DNA 的方法效果不佳 ,对不同的食品应采用不同的提取方法。CTAB 法针对不同的食品 ,其所用各种试剂的量要有所调整才会取得较好效果 ,由于食品品种繁杂 ,具体调整量另文讨论。建议采用针对不同食品提取 DNA 的专用试剂盒 ,如中国农科院生产的大豆油 DNA 提取试剂盒、蜂蜜 DNA 提取试剂盒等以及其它公司的相关产品 ,以取得良好效果 ,获得较纯的转基因 DNA 模板。

从食品中提取 DNA 的方法对检测灵敏度有一定影响 ,如含有 2 %转基因大豆粉的食品 ,不同的提取方法其提取到的最终 DNA 模板浓度相差较大 ,对整个检测的灵敏度与准确性有一定影响 ,具体影响情况正在研讨之中。

聚丙烯酰胺凝胶电泳比琼脂糖凝胶电泳的灵敏度高 10 倍左右[6] ,能更有效地分辨阳性结果 ,特别是当转基因 DNA 模板浓度低时 ,优点更为明显。一般而言 ,食品中的转基因成分含量都较低 ,用聚丙烯酰胺凝胶电泳能有效提高灵敏度 ,获得更准确的结果。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参考文献

[1] C W 迪芬巴赫,G S 德维克斯勒,著. 黄培堂,汪嘉玺,朱厚础,等译. PCR 技术实验指南[M]. 北京: 科学出版社,2002,88-94,380-393.

[2] 卢圣栋,主编. 现代分子生物学实验技术 [M]. 第 2 版. 北京:中国协和医科大学出版社,1999,458-459.

[3] 李永明,赵玉琪,著. 实用分子生物学方法手册[M]. 北京:科学出版社,2001,176-178.

[4] F 奥斯伯,R E 金斯顿,R 布伦特,等著. 颜子颖,王海林,译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京:科学出版社,2001,22-23,104-105.

[5] J 萨姆布鲁克,D W 拉塞尔,著. 黄培堂,汪嘉玺,朱厚础,等译. 分子克隆实验指南 [M]. 第 3 版. 北京:科学出版社,2002,68-105,618-628.

[6] 杨素. 聚丙烯酰胺凝胶电泳在转基因食品检测中的应用研究[J]. 食品科技,2002,11:61-63.

[收稿日期:2005 - 01 - 04]

中图分类号:R15;Q78　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1004 - 8456(2005)05 - 0412 - 04

《中国药品标准》杂志 2006 年征订启事

《中国药品标准》(CN11 - 4422/R)杂志是经国家科学技术部批准、国家食品药品监督管理局主管、由国家药典委员会主办的我国第一部在药品标准领域进行报道和交流的学术性期刊。创刊于 2000 年 4 月 18 日,双月刊,80 页,国内外公开发行,邮发代号:2 - 509。

《中国药品标准》杂志设立的栏目有:综述、论著、标准管理与法规、标准论坛、实验与研究、辅料与包装、标准与临床、专家访谈、标准发布、国外药典信息。适合药品生产企业、药品监督与检验机构、医疗机构、相关仪器设备制造企业、医院药房与社会药店、医药院校与科研机构等领域的从业人员订阅。

《中国药品标准》杂志 2006 年起正文改为 80 页码(原 64 页),全年订价 72 元。欢迎单位和个人在当地邮局或中国药品标准杂志社订阅。编辑部尚存有部分 2000 年 - 2001 年合订本、2002 年、2003 年、2004 年合订本及 2005 年全套期刊,欢迎补购。

邮局汇款:

单位:中国药品标准杂志社　　**邮编**:100061

地址:北京市崇文区法华南里 11 号楼　　**联系电话**:(010)67157647　**传真**:(010)67157648

《中国药物滥用防治杂志》2006 年征订启事

《中国药物滥用防治杂志》(CN11 - 3742/R)是经国家科学技术部批准、由卫生部主管、中国药物滥用防治协会、宁波戒毒研究中心主办的,我国在药物滥用防治领域进行报道和交流的学术性期刊。创刊于 1995 年,双月刊,大 16 开本,64 页,国内外公开发行,邮发代号:82 - 768。

《中国药物滥用防治杂志》设有法规、论著、综述、专题讲座、专论述评、论坛、临床报道、案例报道、基层园地及其他等栏目。面向全国医疗卫生、公安、部队等戒毒机构,社会医学及健康教育研究、宣传单位,各级卫生行政管理机构及大中专医学院校。

《中国药物滥用防治杂志》2006 年全年订价 48 元。欢迎单位和个人在当地邮局或中国药物滥用防治杂志社订阅。

邮局汇款:

单位:中国药物滥用防治杂志社　　**邮编**:100061

地址:北京市崇文区法华南里 11 号楼　　**联系电话**:(010)67157647　**传真**:(010)67157648

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net