

文章编号:1009-038X(2004)06-0006-03

转基因食品的快速 PCR 鉴定

赵有玺, 饶志明*, 王正祥, 沈微, 方慧英, 诸葛健*

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要: 用十六烷基-二甲基-乙基-溴化铵(CTAB)法快速高效地从样品中提取了可供分析的基因组 DNA, 经 PCR 扩增, 鉴定了含有 35S 启动子和 NOS 终止子的转基因样品. 该方法的灵敏度可达 0.1%, 并且具有很好的稳定性.

关键词: 转基因食品检测; 食品 DNA 提取; PCR

中图分类号: TS 207.7

文献标识码: A

Quick Identification of Genetically Modified Food by PCR

ZHAO You-xi, RAO Zhi-ming*, WANG Zheng-xiang, SHEN Wei, FANG Hui-ying, ZHUGE Jian*

(Key Lab of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: CTAB method was used to extract DNA from the food samples. This method is simple, fast and can make the consistency of DNA higher. It is suitable to extract large quantity DNA. PCR method is used for assaying transgenic component 35S promoter derived from Cauliflower Mosaic Virus and NOS terminator derived from *Agrobacterium tumefaciens* in foods. The sensitivity can reach 0.1% and the stability is excellent.

Key words: detection of genetically modified food; DNA extraction from food samples; PCR

近年来,利用重组 DNA 技术研究开发的转基因食品得到了快速发展,有些商品已被批准商业化,并且开始进入普通百姓的餐桌. 尽管多数学者认为转基因食品的安全性并不比传统食品低^[1]. 但是,有关转基因食品的安全性不仅在过敏性、毒性、致癌性、食品营养品质改变以及环境等方面有争议,而且还有由标签问题引发的争议^[2]. 挪威是世界上第一个要求对转基因食品进行标识的国家,该国对转基因成分的限量为 2%^[3],欧盟和瑞士规定食品中的转基因成分超过 1%则必须进行标识,日本的限量标识为 5%^[4,5]. 我国政府规定凡是列入标识管理目录并用于销售的农业转基因生物,应当进

行标识;未标识和不按规定标识的,不得进口或销售^[6]. 因此,必须对转基因食品进行有效地检测.

作者根据转基因农作物中最常用的花椰菜叶病毒 35S 启动子和根癌农杆菌 NOS 终止子的序列设计并合成了两对不同的引物,并对从食品样品中提取的 DNA 进行常规的 PCR 扩增,旨在建立一种快速、简便、有效的鉴定转基因食品的方法.

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品 转基因大豆、玉米及非转基因大豆、

收稿日期:2003-12-25; 修回日期:2004-02-26.

基金项目:国家自然科学基金项目(30300027)资助课题.

作者简介:赵有玺(1979-),男,山东日照人,工业微生物硕士研究生;*为责任作者.

玉米样品:江苏省商检局提供;转基因水稻及非转基因水稻:中国水稻研究所提供。

1.1.2 主要试剂和药品 琼脂糖、Taq 酶、CTAB、DNTP:购自华美生物工程公司;Rnase、DNA Marker:宝生物工程(大连)有限公司生产。CTAB Buffer(20 g/L CTAB, 1.4 mol/L NaCl, 0.1 mol/L Tris-HCl, 20 mmol/L EDTA);CTAB 沉淀 Buffer(5 g/L CTAB, 0.04 mol/L NaCl);TE 溶液(10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0) 0.1 mmol/L EDTA)。

1.1.3 寡核苷酸引物的设计 根据已报道的 35S 启动子的序列,设计了上下游引物,具体序列如下: P1—GCTCCTACAAATGCCATCA; P2—GAT-AGTGGGATTGTGCGTCA。PCR 扩增产物为 35S 启动子的部分基因,长度应为 195 bp。根据已报道的 NOS 终止子的序列,设计了上下游引物,具体序列如下: P1—GAATCCTGTTGCCGCTTGT; P2—TTATCCTAGTTTGCGCGCTA。PCR 扩增产物为 NOS 终止子的部分基因,长度应为 185 bp。

1.2 实验方法

1.2.1 样品预处理 将样品磨成粉末状待用。

1.2.2 不同转基因成分、含量的大豆样品的制备 取 1 g 转基因大豆粉与 9 g 非转基因大豆粉混合均匀,制成转基因大豆质量分数为 10% 的样品。取 1 g 转基因大豆粉与 99 g 非转基因大豆粉混合均匀,制成含转基因大豆质量分数为 1% 的样品。取转基因大豆质量分数为 1% 的样品 5 g 与 5 g 非转基因大豆粉混合均匀,制成转基因大豆质量分数为 0.5% 的样品。取转基因大豆质量分数为 1% 的样品 1 g,与 9 g 非转基因大豆粉混合均匀,制成转基因质量分数为 0.1% 的样品。

1.2.3 DNA 的提取 取 100 mg(若样品为液体,则取 100 μ L)已研磨好的样品粉末放入 1.5 mL Eppendorf 管中,加入 50 μ L CTAB Buffer;混匀,65 $^{\circ}$ C 水浴加热 30 min;8 000 r/min 离心 15 min,上清液移至一新管,加入 200 μ L 氯仿;混匀后于 8 000 r/min 离心 15 min;上清液移至一新管,加入 2 倍体积的 CTAB 沉淀缓冲液;室温放置 60 min 后,8 000 r/min 离心 5 min;弃上清液,沉淀部分溶解于 350 μ L NaCl (1.2 mol/L);加入 350 μ L 氯仿,混匀后,8 000 r/min 离心 10 min;将上清液转移至一新管中,加入 0.6 倍体积异丙醇;混匀后 8 000 r/min 离心 15 min;弃上清液,沉淀部分以 500 μ L 体积分数 70% 乙醇洗涤;8 000 r/min 离心 15 min;弃上清液,干燥 DNA 沉淀,室温放置 1 h,DNA 沉淀溶解

于 100 μ L TE 中,于 -20 $^{\circ}$ C 保存^[7]。

总 DNA 琼脂糖电泳分析条件:琼脂糖质量浓度为 0.8 g/dL,电压为 7 V/cm。

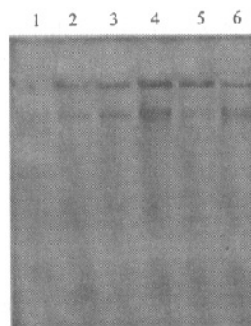
1.2.4 PCR 扩增的反应体系和反应条件 反应在 20 μ L 体系中进行,其中 PCR 反应缓冲液 2 μ L,脱氧核苷酸三磷酸 dNTP(2.5 mmol/L)2 μ L,引物(10 μ mol/L)各 2 μ L,模板 DNA(100 ng/ μ L)1 μ L,Taq 聚合酶(5 U/ μ L)0.5 μ L,扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,56 $^{\circ}$ C 退火 90 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,后延伸 10 min,35 个循环。

PCR 产物的琼脂糖电泳分析条件:琼脂糖质量浓度为 2 g/dL,电压为 7 V/cm。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 的提取

提取出一定数量的高质量基因组 DNA 是进行转基因成分 PCR 检测的前提条件。利用上述方法从转基因水稻、转基因大豆、转基因玉米以及非转基因的大豆、水稻中提取了 DNA。从图 1 可以看出,提取的 DNA 经琼脂糖电泳后,在点样孔中以及在 20 Kb 左右有很亮的条带。经核酸分析仪分析,所得到的总 DNA 的质量浓度在 300 μ g/mL 左右,DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.6~1.7。根据 DNA 的 $\lambda_{OD260/OD280}$ 可以判断 DNA 样品的纯度。纯的 DNA 的 $\lambda_{OD260/OD280}$ 的比值应为 1.8,故提取的样品 DNA 的浓度和纯度较高。



1. λ DNA/Hand III; 2~6. 分别为非转基因大豆、转基因大豆、非转基因大豆水稻、转基因水稻、转基因玉米的总 DNA

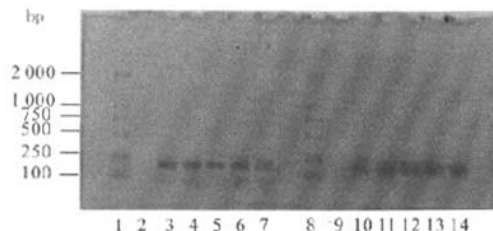
图1 样品总 DNA 琼脂糖电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of sample's total DNA

2.2 定性检测

对提取的样品 DNA 进行 PCR 扩增。从图 2 可以看出,对样品 DNA 进行 35S 启动子部分基因进行扩增后,经琼脂糖电泳,发现转基因水稻、转基因大豆、转基因玉米扩增产物在 195 bp 处可见一条明显条带,与 35S 启动子的部分基因的预计大小吻

合,而非转基因的大豆、玉米、水稻,以及在超市中购得的豆腐和豆浆的 DNA 的扩增产物中,没有条带;对样品 DNA 进行 NOS 终止子基因的扩增后,经琼脂糖电泳,发现转基因水稻、转基因大豆、转基因玉米扩增产物在 185 bp 处可见一条明显条带,与 NOS 终止子的部分基因预计大小吻合,而非转基因的大豆、玉米、水稻,以及在超市中购得的豆腐和豆浆的 DNA 的扩增产物中,没有条带.对中国水稻所提供的 100 份不同的转基因水稻样品进行了验证,均扩增出了 35S 启动子和 NOS 终止子的部分基因,说明这种方法可以有效地验证含有 35S 启动子和 NOS 终止子的部分基因的转基因食品.



1. DL2000; 2~7. 为非转基因大豆、转基因大豆、质量分数为 10% 的转基因大豆、质量分数为 1% 的转基因大豆、质量分数为 0.5% 的转基因大豆、质量分数为 0.1% 的转基因大豆 35S 启动子部分基因的 PCR 产物; 8. DL2000; 9~14. 为非转基因大豆、转基因大豆、质量分数为 10% 的转基因大豆、质量分数为 1% 的转基因大豆、质量分数为 0.5% 的转基因大豆、质量分数为 0.1% 的转基因大豆 NOS 终止子部分基因的 PCR 产物.

图 3 转基因食品检测的定量分析

Fig. 3 Quantitative analysis of genetically modified food

3 讨 论

通过转基因样品和非转基因样品的对照,成功地鉴定了含有 35S 启动子和 NOS 终止子的基因的转基因食品.通过转基因大豆样品和非转基因样品的混和,成功地测定了该方法对转基因大豆检测的灵敏度,并对大量的转基因水稻样品及对转基因大豆质量分数为 0.1% 的样品 DNA 进行了多次重复检验.作者根据 35S 启动子和 NOS 终止子的部分基因设计的 PCR 引物,可以防止由于食品加工过程 35S 启动子和 NOS 终止子基因的断裂而造成的假阴性结果的出现.结果表明,用本方法检测的转基因大豆灵敏度小于 0.1%,重现性很高,能满足转基因检测的需要.该方法是一种快速、简便、有效的鉴定转基因食品的方法.

当然本研究仍然存在一些不足.由于没有准确地鉴定转基因食品中外源基因的种类及转基因成分的准确含量.文献[2]报道,可以用实时荧光定量 PCR 技术准确鉴定转基因成分含量.基因芯片技术,可以准确鉴定导入基因的种类.再次,对于没有采用 35S 启动子和 NOS 终止子的基因的转基因食品,本方法无法鉴定.

1. DL2000; 2~9 为转基因大豆、非转基因大豆、转基因水稻、非转基因水稻、转基因玉米、非转基因玉米、豆浆、豆腐的 35S 启动子部分基因的扩增产物; 10. DL2000; 11~18 为转基因大豆、非转基因大豆、转基因水稻、非转基因水稻、转基因玉米、非转基因玉米、豆浆、豆腐的 NOS 终止子部分基因的扩增产物.

图 2 转基因食品检测的定性分析

Fig. 2 Qualitative analysis of genetically modified food

2.3 定量检测

为了验证本方法在实际应用中的可行性,作者对它的灵敏性进行了验证.将不同质量分数转基因大豆的样品的基因组 DNA 进行 PCR 扩增.从图 3 可以看出,从转基因大豆质量分数为 100%, 10%, 1%, 0.5%, 0.1% 样品的基因组 DNA 中,仍能有效地扩增出 35S 启动子和 NOS 终止子的基因.对转基因大豆质量分数为 0.1% 的样品 DNA 进行了 5 次重复检验,每次都能扩增出 35S 启动子和 NOS 终止子的基因.该方法的灵敏度是欧盟和瑞士设定的转基因最低标识限量的 10 倍,是日本设定的转基因最低标识限量的 50 倍,而且实验的重现性较好,已经能够满足转基因检测的需要.

参考文献:

- [1] Macilwain C. US academy study finds GM foods are safe[J]. *Nature*, 2000, 13: 404-493.
- [2] 陈乃用. 生物技术与转基因食品安全性的争论[J]. *食品与发酵工业*, 2001, 27(4): 53-59.

(下转第 12 页)

3 结论

作者介绍的透明圈筛选方法是一种进行高产中性纤维素酶突变株初筛的有效方法,并对菌株的酶活力的对数值 $\lg E$ 与该菌落的透明圈直径与菌落直径之比 (D/d) 具有近似的线性关系进行了分析。因菌株在平板上生长与摇瓶生长的条件不同等

因素,实际情况与理想状态的线性关系与还有差距。作者在使用筛选平板进行诱变育种,以木霉 ZC 为出发菌株,经过紫外线和 γ 射线几次诱变,筛选到的一株突变株 BE40-39 比出发菌株酶活力提高了 1.5 倍。高产突变菌株与出发菌株在性状上有明显区别,突变菌株的孢子颜色比出发菌株的稍浅,两者的摇瓶发酵性状有很大的差异。

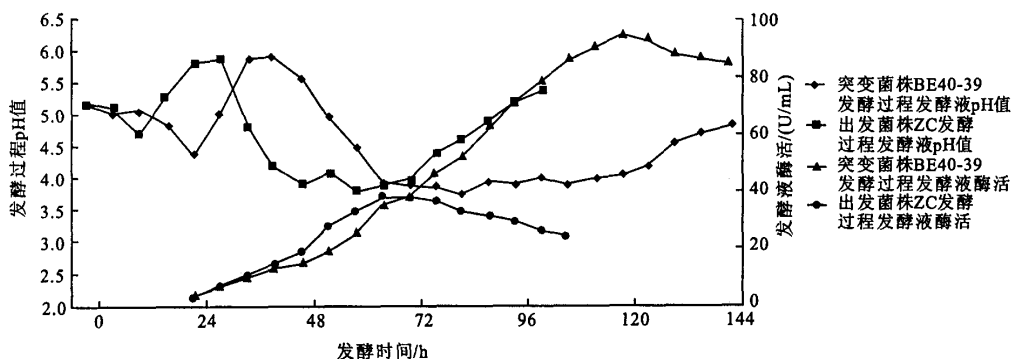


图3 突变株 BE40-39 与出发菌株 ZC 发酵曲线的比较

Fig. 3 The comparison for fermentation performance between the mutant and initial strain

参考文献:

- [1] 任大明,刘昭壮. 浅谈饲料用纤维素酶的生产与应用[J]. 饲料工业,1995,16(3):1-3.
- [2] 肖春玲,徐常新. 微生物纤维素酶的应用研究[J]. 微生物学杂志,2002,22(2):33-55.
- [3] 王静. 牛仔布纤维素酶“洗旧”整理工艺参数的研究[J]. 安徽农业大学学报,1997,24(1):84-87.
- [4] 曾文青,刘蓉,曾勤. 纤维素酶系高产菌株的选育[J]. 四川省卫生管理干部学院学报,2000,19(1):4-6.
- [5] Gandii N J. Enhanced cellulase production by a mutant of *Trichoderma reesei*[J]. *Enzyme Microbiol Technol*,1995,17:942-946.
- [6] 管斌,丁友昉,谢来苏,等. 还原糖测定方法的规范[J]. 无锡轻工大学学报,1998,18(3):74-78.
- [7] 胡学智. 酶制剂生产技术[M]. 北京:化学工业出版社,1994.
- [8] Ryu U D. The cellulase of *Trichoderma viride*[J]. *Enzyme Microbiol Technol*,1980,(2):91-96.

(责任编辑:杨萌)

(上接第8页)

- [3] Mayer R. Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food[J]. *Food Control*, 1999, 10:391-399.
- [4] Swiss Federal Office of Public Health Department of Food Science. Eidgenossische Drucksachen und Materialzentrale[Z]. Switzerland,1995.
- [5] Council Regulation (EC). Concerning the Compulsory Indication of the Labeling of Certain Foodstuffs Produced from Genetically Modified Organisms of Particulars other than Those Provides for in D 79/112/EEC[Z]. Brussels,Belgium,1998.
- [6] 中华人民共和国农业部. 农业转基因生物标识管理办法[Z]. 北京:新华社,2002. 1-2.
- [7] Clark C G. DNA purification from polysaccharide-rich cells[J]. *Protocols in Protozoology*,1992,(3):31-32.

(责任编辑:李春丽)