

大豆 DNA 提取方法及降落 PCR 检测转基因成分的研究

陈彦^{1,2}, 潘见^{1,*}, 王亚², 惠爱玲¹, 杨毅¹

(1. 合肥工业大学 农产品生物化工教育部工程研究中心, 安徽 合肥 230009;

2. 安徽大学生命科学学院, 安徽 合肥 230039)

摘要: 采用改良的 CTAB 法, 植物基因组 DNA 小量制备试剂盒, SDS 法和高盐低 pH 值法 4 种方法提取安徽省市场上 8 种大豆种子的基因组 DNA, 首次用降落 PCR(TD-PCR)检测转基因成分, 并对阳性产物进行酶切验证。结果表明改良的 CTAB 法是一种简单、高效的大豆 DNA 提取方法, 能够满足各种分子生物学分析; TD-PCR 显著提高了 PCR 扩增的特异性和效率, 可有效检测大豆转基因成分, 具有良好的应用前景。

关键词: 大豆; 转基因成分; 改良的 CTAB 法; 降落 PCR

DNA Extraction from Soybeans and Detection of Genetically-Modified Components by Touchdown PCR

CHEN Yan^{1,2}, PAN Jian^{1,*}, WANG Ya², HUI Ai-ling¹, YANG Yi¹

(1. Engineering Research Center of Bio-Process, Ministry of Education, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China;

2. School of Life Science, Anhui University, Hefei 230039, China)

Abstract: The DNA genome were extracted from 8 species of soybeans sold in commercial markets of Anhui province by Improved CTAB method, high salt and low pH method, plant genomic DNA mini-prep kit and SDS method. Touchdown polymerase chain reaction (TD-PCR) was applied to detect the genetically modified components in soybeans for the first time. The positive amplification productions were also analyzed by endonuclease. The experiment results showed that the improved CTAB method was suitable for all kinds of molecular analysis due to its simplicity and high efficiency. The TD-PCR was able to significantly improve the specificity and efficiency of PCR products. It would provide a new method for detection of genetically modified components.

Key words: soybean; genetically modified component; improved CTAB method; TD-PCR

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)24-0355-04

近年来转基因大豆的大量进口, 可能对我国粮食、生态及食品安全造成很大影响, 本土的非转基因大豆生产安全应引起我们的高度重视, 而建立有效的大豆转基因成分检测方法则是首要任务^[1]。目前转基因成分检测方法按检测物的不同主要分为 3 类, 即核酸、蛋白质和酶检测方法, 每一项技术皆有其特色, 应用范围及效率也各不相同。基于核酸检测的 PCR 技术以其特异性强、灵敏度高、对标本要求低、快速等特点而成为目前对植物进行转基因成分检测最常用的技术之一, 而高质量的基因组 DNA 则是该方法成功与否的关键因素^[2]。

本实验拟采用改良的 CTAB(cetyltrimethyl ammonium bromide, 十六烷基三甲基溴化铵)等 4 种 DNA 提取方法, 以期获得高质量的 DNA 产物, 并在普通 PCR 的基础上结合降落 PCR 检测方法, 用于大豆 DNA 中外源基因的检测。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

8 种大豆种子购自安徽省合肥、阜阳、淮北等地, 分别编号为 SS₁~SS₈; 转基因大豆 Roundup Ready 标准

收稿日期: 2008-12-25

基金项目: 农产品生物化工教育部重点实验室(合肥工业大学)开放基金项目(NKF2004004);

安徽省自然科学基金项目(070413143)

作者简介: 陈彦(1963—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品生物化学。E-mail: chenyan600@163.com

* 通讯作者: 潘见(1955—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品化学与生物化工。E-mail: panxie163@163.com

品 瑞士Fluka公司; DNA标准品 立陶宛MBI Fermentas公司; 植物基因组DNA提取试剂盒 杭州维特洁生化技术有限公司(V-gene), PCR反应试剂、引物序列 上海生物工程有限公司见表1^[3]; 琼脂糖 加拿大BBI公司; PCR产物纯化试剂盒、*Xma*I及*Hinf*I酶切试剂盒 大连宝生物工程有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

表1 PCR引物序列和扩增产物
Table 1 Primer DNA sequence and PCR products

引物	PCR扩增产物 大小(bp)
LectinF: 5'-GCCCTCTACTCCACCCCATCC-3'	118
LectinR: 5'-GCCCATCTGCAAGCCTTTTGTG-3'	
NOSF: 5'-GAATCCTGTGCGCGTCTTG-3'	180
NOSR: 5'-TTATCCTAGTTGCGCGCTA-3'	
CaMV35SF: 5'-GCTCCTACAAATGCCATCA-3'	195
CaMV35SR: 5'-GATAGTGGGATTGTGCGTCA-3'	

1.2 仪器与设备

3 K 1 5 高速冷冻离心机 德国Sigma公司; MycyclerTM PCR扩增仪、PowerPac Basic电泳仪、Gel DocTM XR凝胶成像系统 美国Bio-Rad公司; Ultrospec 3300 pro紫外分光光度计 瑞典Pharmacia公司。

1.3 方法

1.3.1 样品基因组DNA的提取及纯化

1.3.1.1 试剂盒法提取基因组DNA

植物基因组DNA小量制备试剂盒提取基因组DNA, 按V-gene公司试剂盒说明书操作。

1.3.1.2 改良的CTAB法提取基因组DNA

参照Lipp等^[4]的方法并做部分改进。取0.1g匀碎的样品至1.5ml离心管中, 加500μl CTAB提取液(2% CTAB, 1.4mol/L NaCl, 100mmol/L Tris-HCl、pH8.0, 20mmol/L EDTA、pH8.0), 65℃孵育30min; 加入等体积酚-氯仿-异戊醇(25:24:1, V/V), 混匀, 13000r/min离心10min, 取上清液, 重复上述步骤1~2次; 上清液加两倍体积的CTAB沉淀液(1% CTAB, 50mmol/L Tris-HCl、pH8.0, 10mmol/L EDTA、pH8.0), 室温孵育30min; 离心后用350μl NaCl(1.2mol/L)溶解沉淀, 加入氯仿, 混匀; 离心后将上清转移到另一新的离心管; 加0.6倍体积的异丙醇和1/10倍体积的3mol/L NH₄Ac (pH6.8), 充分混匀, 低温静置15min; 离心后用70%乙醇洗涤沉淀, 室温干燥, 将DNA溶解在50μl TE缓冲液(10mmol/L Tris-HCl、1mmol/L EDTA(pH8.0))中, 加入1μl的RNaseA(10mg/ml), 37℃温育15min, 置冰箱中保存。

1.3.1.3 SDS(十二烷基硫酸钠)法提取基因组DNA

参照Salah等^[5]的方法。

1.3.1.4 高盐低pH值法提取基因组DNA

参照Salah等^[5]的方法。

1.3.2 提取DNA的检测

为分析DNA的质量分数和纯度, 在260nm和280nm波长处测定DNA样品的吸光度。 A_{260} 测定法用来定量μg级相对纯的DNA样品, 1个 A_{260} 相当于50μg/ml的双链DNA质量浓度。波长260nm和280nm处的吸光度的比值 A_{260}/A_{280} 用来指示DNA的纯度, 高纯度DNA样品的 $A_{260}/A_{280}=1.8$ 左右, 当 $A_{260}/A_{280} > 1.8$ 时, 表明样品中混杂有RNA; 若 $A_{260}/A_{280} < 1.7$, 说明样品中存在蛋白质或酚的污染^[6]。此外, 用0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测DNA, 上样量为10μl。

1.3.3 TD-PCR检测内标基因及外源基因

以提取的大豆基因组DNA为模板, 进行PCR扩增。依据引物的理论 T_m 值, 设定TD-PCR反应循环参数, 并根据扩增结果进行调整优化, 最终确定TD-PCR的反应条件为预变性95℃、3min, 变性94℃、40s, 退火60℃、30s, 每次下降1℃直至50℃, 每下降一次进行两个循环反应, 最后在53℃(Lectin)、50℃(NOS和CaMV35S)循环20个反应; 延伸72℃、40s, 后延伸72℃、10min。同时, 设立阳性、阴性对照, 2%琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果, 上样量10μl。普通PCR和TD-PCR的反应体系及普通PCR的反应参数依据中华人民共和国出入境检验检疫行业标准设定^[7]。

1.3.4 PCR产物的酶切验证^[8]

用试剂盒回收PCR产物, 所得DNA片段分别用不同的限制性核酸内切酶处理, 将产生特异的酶切片段(表2)。酶切反应体系包括: 10μl PCR纯化产物, 1μl内切酶(10U/μl), 2μl酶切缓冲液, 7μl超纯水, 总反应体积为20μl。37℃温育过夜, 2%琼脂糖凝胶电泳检测。

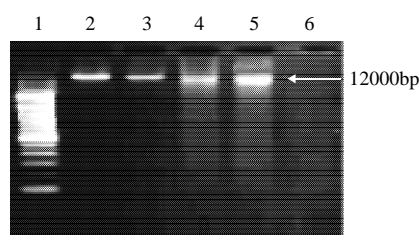
表2 限制性内切酶的酶切特性
Table 2 Digested characteristics by restriction endonuclease

目的基因	扩增片段大小(bp)	限制性内切酶	酶切片段大小(bp)
CaMV35S	195	<i>Xma</i> I	80
NOS	180	<i>Hinf</i> I	62

2 结果与分析

2.1 DNA提取结果比较

4种方法都可以从大豆中提取出较高质量的基因组DNA, 结果见图1。其中试剂盒法提取的DNA量最高, 平均达到74.3μg/100mg($n > 3$)大豆, 但是其 A_{260}/A_{280} 值仅为1.453, 表明有蛋白质或者酚类污染, 部分DNA被降解; 高盐低pH值法和SDS法提取的DNA量较低, 其中SDS法提取的部分DNA被降解; 改良的CTAB法所提取的DNA量平均为51.6μg/100mg($n > 3$)大豆, A_{260}/A_{280} 值为1.762, 平均试剂消耗也低于其他3种DNA提取方法。



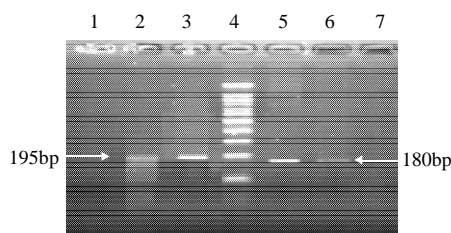
1.DNA 分子质量标准; 2.改良的 CTAB 法; 3.高盐低 pH 值法; 4.SDS 法; 5.试剂盒法; 6.空白。

图1 不同方法提取的大豆基因组 DNA

Fig.1 Comparison of different extraction methods for genomic DNA from soybean

2.2 TD-PCR 与普通 PCR 的比较

分别用 TD-PCR 与普通 PCR 对含 0.01% 转基因大豆的基因组 DNA 进行扩增, 结果见图 2, TD-PCR 能够扩增出高浓度的目的片段, 而普通 PCR 仅能扩增出低浓度的目的片段或非特异性产物。



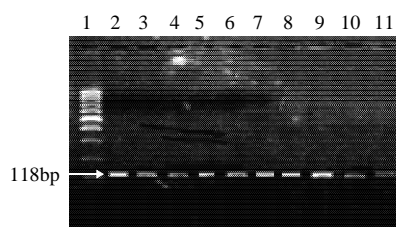
1、7. 阴性对照; 2. CaMV35S 启动子的 PCR 扩增结果; 3. CaMV35S 启动子的 TD-PCR 扩增结果; 4. 分子质量标准; 5. NOS 终止子的 TD-PCR 扩增结果; 6. NOS 终止子的 PCR 扩增结果。

图2 TD-PCR 与普通 PCR 扩增结果对比

Fig.2 Comparisons of TD-PCR and common PCR amplification

2.3 降落 PCR 扩增结果

2.3.1 大豆凝集素 Lectin 基因扩增



1. 分子质量标准; 2. 转基因大豆; 3~10.8 份大豆样品; 11. 阴性对照。

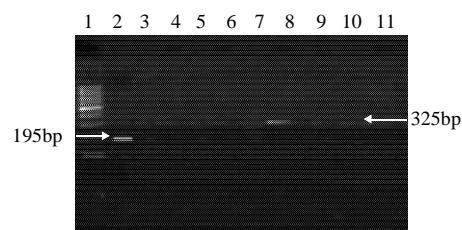
图3 内源基因 Lectin 的 TD-PCR 扩增

Fig.3 Comparisons of TD-PCR and common PCR amplification of lectin

Lectin 基因存在于所有品种的大豆中, 因此通常被用作内标基因, 用该基因的 PCR 检测来确证 DNA 的模

板质量和可扩增性^[4]。对 8 份样品都做了 Lectin 基因扩增, 图 3 显示样品检测结果, 除阴性对照外, 阳性对照与待检样品都扩增出与预期大小一致的特异性条带 (118bp)。结果表明所提取 DNA 模板符合进一步 PCR 检测的要求。

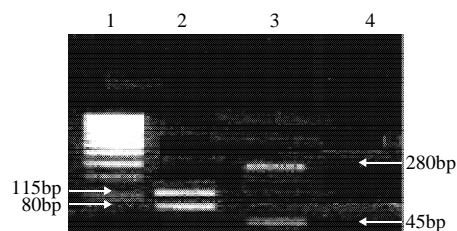
2.3.2 CaMV35S 启动子的 TD-PCR 扩增及阳性产物的酶切检测



1. 分子质量标准; 2. 转基因大豆; 3~10.8 种大豆种子样品; 11. 阴性对照。

图4 CaMV35S 启动子的 TD-PCR 扩增

Fig.4 TD-PCR amplification for CaMV35S promoter



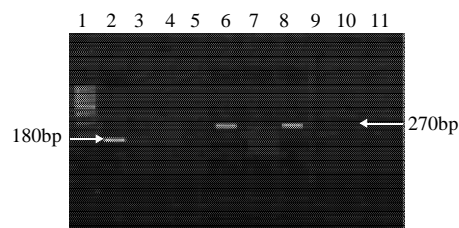
1. 分子质量标准; 2. 转基因大豆; 3. 样品 SS₅; 4. 阴性对照。

图5 CaMV35S 启动子的 TD-PCR 阳性扩增产物酶切结果

Fig.5 Results of restriction enzyme digestion of TD-PCR positive products for CaMV35S promoter

除阳性对照外, 仅有一种样品 (SS₅) 有扩增产物, 但大小为 325bp (图 4)。用 *Xma*I 酶切, 阳性对照样品的扩增产物得到预期大小的 DNA 片段, 而检测样品 SS₅ 的扩增产物则得到大小为 280bp 和 45bp 酶切片段 (图 5)。以上结果说明, 样品 SS₅ 的扩增产物不是 CaMV35S 启动子片段, 可确定为假阳性。

2.3.3 NOS 终止子的 TD-PCR 扩增及阳性产物的酶切验证结果



1. 分子质量标准; 2. 转基因大豆; 3~10.8 种大豆种子样品; 11. 阴性对照。

图6 NOS 终止子的 TD-PCR 检测结果

Fig.6 TD-PCR amplification for NOS terminator

在该扩增中除阳性对照外还有2个样品(SS₄和SS₆)有扩增产物,但扩增片段为270bp(图6)。用HinfI酶切,样品SS₄和SS₆的产物不能被消化(结果未显示)。以上结果说明,样品SS₄和SS₆的扩增产物不是NOS终止子片段,可确定为假阳性。

3 讨论

由于植物组织中的糖类、酚类、蛋白质等都可能影响DNA的后续操作,获得高质量的DNA也就成了进行这些操作的先决条件^[9]。在本研究中,针对大豆富含蛋白质和脂类的特点,提出用变性剂反复变性蛋白及同时用异丙醇和NH₄Ac共沉淀DNA等方法对传统的CTAB法进行改良。对4种方法制备的大豆基因组DNA比较结果显示,虽然改良的CTAB法操作较繁琐,但所得DNA溶液浓度和纯度都较高,所需试剂价格低廉,同时Lectin基因扩增的PCR扩增结果表明PCR抑制物的去除比较彻底,对CTAB法的改良达到了预期效果,DNA产物完全能够满足后续操作的需要。

Don等^[10]于1991年提出了TD-PCR技术,最初设计TD-PCR是为了降低普通PCR中出现的假阳性^[11],因此TD-PCR常用于存在假阳性的临床检测。本实验采用把TD-PCR和热启动相结合的检测方法,对含0.01%转基因成分的大豆基因组DNA的外源基因CaMV35S和NOS都扩增出高浓度的目标片段,相对于普通PCR,虽然TD-PCR的程序设计更繁琐、操作费时,但该方法明显提高了PCR扩增的特异性和效率。若通过对TD-PCR扩增条件的进一步优化,可提供一种比普通PCR更可靠灵敏的转基因成分定性检测方法。

以大豆内源基因Lectin为内对照对其进行扩增,如果内对照基因扩增成功,则表明模板DNA质量、数量及PCR体系工作正常;如果扩增失败,则表明扩增体系中含有抑制成分,需对模板质量、数量进行优化以消除抑制因子。显然,内对照的设立是衡量模板DNA质量,从而排除由模板中杂质造成的假阴性结果的一个有力措施^[12]。ISAAA在2000年的调查研究显示商品化转基因大豆的品种有7种,其中具有CaMV35S启动子和(或)NOS终止子的有6种,覆盖转基因大豆的85.7%^[13],因此在无法同时检测所有外源基因的情况下,对它们进行PCR检测具有覆盖率高的优势。对8种大豆种子检测结

果显示,虽然没有发现转基因成分,但无论是对CaMV35S启动子还是对NOS终止子的扩增都出现了假阳性,说明大豆在栽培过程和检测过程中是易于被污染的,因此控制外源基因污染和对阳性产物的进一步验证是保证PCR法检测结果准确性的重要举措。

4 结论

本实验结果表明,所检测的大豆种子中没有转基因成分,说明安徽省的野生型大豆生产尚未受到进口转基因大豆的影响。本研究建立的稳定、高效的DNA提取和转基因成分TD-PCR检测方法,在植物产品的转基因成分检测上具有重要的应用价值。

参考文献:

- [1] 王国英. 转基因植物的安全性评价[J]. 农业生物技术学报, 2001, 9(3): 205-207.
- [2] LIN H Y, CHANG J W, SHIH D Y C. Detection of genetically modified soybeans by PCR method and immunoassay kits[J]. Food Drug Anal, 2001, 9(3): 160-166.
- [3] 邓平建, 赵锦, 刘建军, 等. 转基因食品安全性检验的核酸检测技术研究[J]. 卫生研究, 2002, 31(1): 37-40.
- [4] LIPP M, BRODMANN P, PIETSCH K, et al. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soybeans and maize in dried powder[J]. J AOAC Int, 1999, 82: 923-928.
- [5] SALAH M, ALJANABI N, MARLINEX L, et al. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques[J]. Nucl Acids Res, 1997, 22: 4692-4693.
- [6] 喻红, 彭芳芳, 刘芳. 医学生物化学与分子生物学实验技术[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 2003: 173-174.
- [7] 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准. SN/T 1203—2003 食用油脂中转基因植物成分定性PCR检测方法[S].
- [8] 姜海燕, 王建华, 武鹏, 等. 我国大豆主产区黑龙江省田间种植大豆的转基因成分检测[J]. 科学通报, 2005, 50(10): 987-991.
- [9] 周建嫦, 杨明杰, 杨杏芬, 等. 植物源食品DNA制备方法的比较研究[J]. 食品科学, 2005, 26(2): 29-32.
- [10] DON R H, COX P T, WAINWRIGHT B J, et al. "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification[J]. Nucl Acids Res, 1991, 19(14): 4008-4015.
- [11] PIRAE M, VING L C. Use of degenerate primers and touch down-PCR to amplify a halogenase gene fragment from *Streptomyces venezuelae* ISP5230[J]. Ind Microbiol Biotechnol, 2002, 29(1): 1-12.
- [12] 权洁霞, 张艺兵, 陈长法, 等. 植物转基因成分PCR检测内对照系统的建立[J]. 云南植物研究, 2002, 24(3): 333-340.
- [13] JAMES C. The global review of commercialized transgenic crops[J]. ISAAA (International Service for the Acquisition of Agribiotech Applications) Briefs, 2000, 21: 1-2.