

粉丝类产品中转基因成分的检测

孙 敏¹, 栗志平², 梁成珠¹, 郑小龙¹, 高宏伟¹, 徐 彪¹, 朱来华¹

(1. 山东出入境检验检疫局, 山东 青岛 266002; 2. 烟台出入境检验检疫局, 山东 烟台 264000)

摘 要: 本实验采用改良的简易 CTAB 法从深加工产品粉丝中获得高纯度和高浓度的 DNA。以 *CaMV35S*、*FMV35S*、*nos*、*npt II*、*pat*、*bar* 6 个外源基因作为筛选基因, 优化反应条件和反应参数, 建立了粉丝类产品中转基因成分的实时荧光 PCR 检测方法。该方法灵敏、特异, 其推广应用对于促进粉丝类产品出口和加强转基因食品监管工作, 具有重要意义。

关键词: 粉丝; 转基因食品; DNA 提取; 实时荧光 PCR

Detection of Genetically Modified Ingredient in Vermicelli

SUN Min¹, SU Zhi-ping², LIANG Cheng-zhu¹, ZHENG Xiao-long¹, GAO Hong-wei¹, XU Biao¹, ZHU Lai-hua¹

(1. Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China;

2. Yantai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Yantai 264000, China)

Abstract: Comparison of different kits and different methods indicates that DNA with high purity and high yield can be extracted from vermicelli by the modified CTAB method. After optimizing experimental parameters, a real time PCR assay for detecting the genetically modified ingredient in the vermicelli was developed with *CaMV35S*, *FMV35S*, *nos*, *npt II*, *pat* and *bar* genes as detective genes. This method is proved to be sensitive and specific, which is helpful to the exportation of vermicelli and supervision of genetically modified (GM) food.

Key words: vermicelli; genetically modified food; DNA extraction; real time PCR

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)06-0230-04

随着基因工程在农产品上的广泛应用, 转基因食品应运而生。目前, 转基因食品安全性评价体系尚不完善, 其安全性问题在世界范围内仍存在较大争议。欧盟、日本、韩国等国家相继出台法规和条例^[1-2], 要求对转基因食品进行强制性标识和自愿标识。我国也于 2002 颁布了《农业转基因生物安全管理条例》, 规定自 2002 年 3 月 20 日起, 市场上出售的转基因食品都要加贴明确的标识, 以方便消费者选择购买。消费者有权选择转基因产品和非转基因产品。用标签标示食品是否来源于转基因生物体, 是给消费者提供选择机会的最适方法。

粉丝是用淀粉做成的传统食品, 其营养丰富、食用方便, 不但国内市场需求旺盛, 出口贸易额也逐年攀升, 各种风味的粉丝得到国际市场的广泛认可, 市场潜力巨大。粉丝原料多样, 绿豆、蚕豆、豌豆、玉米、马铃薯、红薯、木薯等都可用来提取淀粉, 制

作粉丝。目前, 玉米、马铃薯已有多转基因品系被批准进行商品化生产, 其他作物的转基因品系有些也已进入试验性种植阶段, 因此有必要对粉丝进行转基因成分检测, 以保障消费者的知情权和选择权, 并促进该类农产品出口贸易的稳定发展。

1 材料与方法

1.1 材料

取山东健源食品有限公司、山东金城股份有限公司、招远三嘉粉丝蛋白有限公司、烟台银斯达龙口粉丝有限公司、诸城桃林食品有限公司等送检的粉丝样品 60 份、粉条样品 22 份、粉皮样品 8 份、淀粉样品 30 份, 作为本实验的供试材料。

1.2 试剂

CTAB 提取液(每升含有 CTAB 20g、NaCl 81.76g、1mol/L Tris-HCL(pH8.0)100ml、0.5mol/L EDTA 40ml);

收稿日期: 2007-07-13

作者简介: 孙敏(1976-), 女, 工程师, 硕士, 主要从事食品和动植物产品检测技术研究。E-mail: sunminxh@sina.com

Taq DNA 聚合酶(5U/ μ l)、10 \times PCR buffer 天根生化科技有限公司; MgCl₂(25mmol/L)、dNTPs(2.5mmol/L each) Promega 公司; CTAB、NaCl、Tris、EDTA、氯仿、异丙醇均为市售分析纯。

1.3 仪器与设备

A11 研磨仪 IKA 公司; PRISM 7900 荧光 PCR 仪 ABI 公司; 5810R 高速冷冻离心机、Biophotometer 核酸蛋白分析仪 Eppendorf 公司; Simfilter 超纯水仪 Millipore 公司; Cat No.Z0017A Geno DNA Tissue 微型试剂盒、Cat No. Z0010B DNA Plant 微型试剂盒 安比奥生物技术有限公司; Code.NPK-101 Genomic DNA Purification 试剂盒 ToYoBo 公司; Lot No.0111-1 plant DNA Mini-Prep 试剂盒 上海市农科院; Cat No.69104 DNeasy Plant 微型试剂盒 QIANEN 公司。

1.4 DNA 提取

1.4.1 担体 DNA 的提取

取新鲜猪肉 50g, 切成小块后, 加入液氮研磨, 分装至 2ml Eppendorf 管中, 每管 100mg。使用 GenoDNA Tissue 微型试剂盒提取猪肉基因组 DNA。使用核酸蛋白分析仪测定 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀, 通过 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值确定核酸浓度和纯度。

1.4.2 粉丝中 DNA 的提取

1.4.2.1 试剂盒法

用研磨仪将粉丝研成粉末, 分别使用 NPK-101 型 DNA Purification 试剂盒、Cat No.Z0010B 型 Geno DNA Plant 微型试剂盒、Lot No.0111-1 型 Plant DNA Mini-Prep 试剂盒、Cat No.69104 型 DNeasy Plant 微型试剂盒四种商品试剂盒按使用说明提取粉丝中 DNA。DNA 质量检测方法同 1.4.1。

1.4.2.2 CTAB 法

采用改良的简易 CTAB 法, 提取粉丝中 DNA。具体

步骤如下: (1)研磨粉丝; (2)称取粉碎样品 100mg, 放入离心管中, 加入 1ml CTAB 提取液和 5 μ l RNA 酶(10mg/ml), 65℃温育 30min。每份样品同时做 4 管; (3)13000r/min 离心 5min, 4 管共取上清 1200 μ l, 转入新离心管, 加入 500 μ l 氯仿抽提; (4)13000r/min 离心 5min, 吸取上清 900 μ l, 转入新离心管, 加入 700 μ l 氯仿抽提; (5)13000r/min 离心 5min, 吸取上清 700 μ l; (6)将上清转入新离心管, 加入担体 DNA 1~2 μ g, 加入 0.6 倍体积预冷异丙醇, -20℃静置 1h; (7)13000r/min 离心 15min, 弃上清; (8)沉淀用 75% 乙醇洗涤 2 遍; (9)加入 100 μ l 超纯水溶解 DNA 沉淀。DNA 质量检测方法同 1.4.1。

1.5 实时荧光 PCR 检测

1.5.1 引物和探针

参照文献[3], 选择 6 对特异的引物和探针, 委托宝生物工程(大连)有限公司合成。引物为 PAGE 级, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化; 探针为 HPLC 级, 经高效液相层析纯化。引物和探针序列见表 1。

1.5.2 反应体系和反应条件

使用 ABI PRISM 7900 实时荧光 PCR 仪进行定性检测。所有 PCR 反应均设置空白对照(以水代替 DNA 模板)和阳性对照。

扩增反应总体积为 25 μ l, 包括水(PCR 级)10.2 μ l、10 \times PCR buffer (不存在 Mg²⁺) 2.5 μ l、MgCl₂(25mmol/L) 2 μ l、dNTPs(2.5mmol/L, 四种都为该溶液) 2 μ l、引物 F、R(10 μ mol/L)各 1 μ l、探针(10 μ mol/L) 1 μ l、Taq DNA 聚合酶(5U/ μ l) 0.3 μ l 及 DNA 模板 5 μ l。

反应条件: 94℃ 3min, 1 个循环预变性; 94℃ 15s, 60℃ 30s, 40 个循环扩增。

2 结果与分析

2.1 不同方法提取粉丝 DNA 的结果比较

表 1 实时荧光 PCR 检测所用引物和探针
Table 1 Primers and fluorogenic probes for real time PCR

基因名称	引物序列(5' \rightarrow 3')	探针序列(5'FAM \rightarrow 3'TAMRA)	基因来源
<i>tRNA^{Leu}</i>	F: CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG R: TTC CAT TGA GTC TCT GCA CCT	GCA ATC CTG AGC CAA ATC C	内源
<i>CaMV35S</i>	F: CGA CAG TGG TCC CAA AGA R: AAG ACG TGG TTG GAA CGT CTT C	TGG ACC CCC ACC CAC GAG GAG CAT C	外源
<i>FMV35S</i>	F: AAG ACA TCC ACC GAA GAC TTA R: AGG ACA GCT CTT TTC CAC GTT	TGG TCC CCA CAA GCC AGC TGC TCG A	外源
<i>nos</i>	F: ATC GTT CAA ACA TTT GGC A R: ATT GCG GGA CTC TAA TCA TA	CAT CGC AAG ACC GGC AAC AGG	外源
<i>npt II</i>	F: AGG ATC TCG TCG TGA CCC AT R: GCA CGA GGA AGC GGT CA	CAC CCA GCC GGC CAC AGT CGA T	外源
<i>pat</i>	F: GTC GAC ATG TCT CCG GAG AG R: GCA ACC AAC CAA GGG TAT C	TGG CCG CGG TTT GTG ATA TCG TTA A	外源
<i>bar</i>	F: ACA AGC ACG GTC AAC TTC C R: ACT CGG CCG TCC AGT CGT A	CCG AGC CGC AGG AAC CGC AGG AG	外源

在粉丝 DNA 提取方法摸索过程中, 我们曾先后用过多个试剂盒, 但获得的核酸浓度和纯度均较低, 无法满足 PCR 检测的需要。使用改良的简易 CTAB 法, 提取粉丝中微量 DNA, 核酸质量良好, 浓度大于 150 $\mu\text{g/ml}$, 纯度为 1.8~2.0($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$), 可以进一步用于实时荧光 PCR 检测。结果见表 2。

表 2 粉丝 DNA 提取方法比较
Table 2 Comparison of different DNA extraction methods

方法	原理	时间	浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	纯度 ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$)	担体 DNA	内源基 因检测
TOYOBO kit	磁珠法	40min	10~15	1.0~1.1	不加	未检出
安比奥 kit	离心柱法	1.5h	70~100	1.1~1.30	不加	未检出
农科院 kit	离心柱法	1.5h	15~30	1.2~1.35	不加	未检出
QINGEN kit	离心柱法	1.5h	10~20	1.2~1.4	不加	未检出
CTAB 法	沉淀法	2.5h	150~400	1.8~2.0	加	检出

用 CTAB 法提取多个粉丝样本中核酸, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 比值表明其 DNA 纯度稳定; 而浓度差异较大。究其原因, 应该与粉丝的生产原料和制备工艺有关。目前可用于生产粉丝的农作物有许多种, 不同原料经加工, 制成粉丝后, 加入 CTAB 裂解时, 样品溶涨程度不同, 获得的上清多少不一, DNA 溶出速率也大不一样。实验中发现, 以红薯淀粉为原料的粉丝, 加入 CTAB 后, 溶涨较为严重, 在提取 DNA 时, 应适当减少取样量, 并增加 CTAB 裂解液用量。

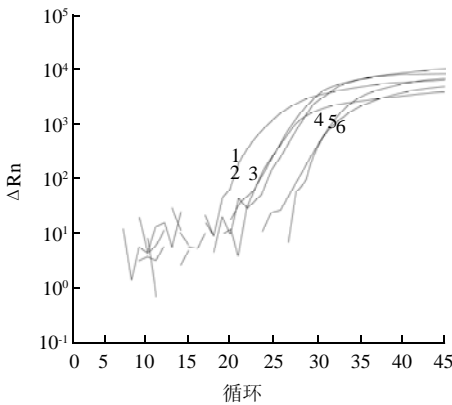
2.2 内源参照基因的实时荧光 PCR 检测

对转基因产品进行 PCR 定性检测时, 选择适当、特异的内源参照基因十分必要。通过检测内源参照基因, 可以判定试验所提取核酸的质量, 避免出现假阴性结果^[4]。由于在粉丝 DNA 提取过程中, 加入了猪肉 DNA 作为担体, 因此检测时, 不能选择通用的真核生物 18S 核

糖体 RNA 基因(18S rDNA)作为内参照。*tRNA^{leu}* 是植物叶绿体基因, 其编码区具有高度的保守性, 是植物通用的内对照基因, 在粉丝 DNA 的 PCR 检测中, 我们选择该基因用做内参照。样品内源 *tRNA^{leu}* 基因的扩增结果见图 1。所有样品都呈阳性扩增, C_t 值为 15~25, 证明所提样品 DNA 的质量较好。

2.3 外源基因的实时荧光 PCR 检测

粉丝类产品原料多样, 根据目前公布的国内外已商品化的转基因作物品种的基因构建信息, 选择了 6 个基因 (*CaMV35S*、*FMV35S*、*nos*、*npt II*、*pat*、*bar*) 作为筛选目标。这些基因包括了常用的启动子、终止子, 以及标志基因, 基本能覆盖全部已商品化的转基因作物品种。针对这些基因, 合成其特异性 PCR 引物和荧光探针(Taqman 探针), 并对检测条件和反应参数进行优化, 从而使多个基因的检测参数一致, 达到对多个基因同时进行筛选检测的目的。结果见图 2。



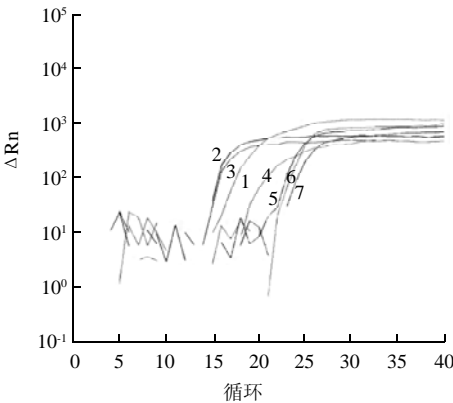
1. *nos*; 2. *CaMV35S*; 3. *pat*; 4. *FMV35S*; 5. *npt II*; 6. *bar*。

图 2 外源基因的扩增图谱

Fig.2 Amplification plot of exogenous genes by real time PCR

2.4 送检样品的实时荧光 PCR 检测

应用初步建立的实时荧光 PCR 法, 检测粉丝样本 90



1. 阳性对照; 2. 粉丝 0145; 3. 粉条 0915; 4. 粉丝 1237; 5. 红薯粉条 1375; 6. 粉丝 1194; 7. 粉条 1342。

图 1 内源基因的扩增图谱

Fig.1 Amplification plot of *tRNA^{leu}* gene by real time PCR

表 3 样品的荧光 PCR 检测结果
Table 3 Real time PCR results of samples

样品名称	编号	检测基因						
		<i>tRNA^{leu}</i>	<i>CaMV35S</i>	<i>FMV35S</i>	<i>nos</i>	<i>npt II</i>	<i>pat</i>	<i>bar</i>
粉丝	0933	+	+	—	+	+	—	—
粉丝	1335	+	+	+	+	+	—	—
粉丝	1436	+	+	—	+	—	+	—
粉丝	1371	+	+	—	+	+	—	—
粉丝	1372	+	+	—	+	—	+	—
粉丝	0184	+	+	—	+	+	—	+
粉丝	0383	+	+	—	+	+	—	—
马铃薯淀粉	1343	+	+	—	+	+	—	—
马铃薯淀粉	1377	+	+	—	+	+	—	—

注: 表中未列出的其他样品, 仅检出内源参照基因(*tRNA^{leu}* “+”), 外源基因未检出。

份。对于每份样品,采用改良的简易 CTAB 法,平行提取 2 份核酸。每份核酸在 PCR 检测时设置 1 个复孔。实验结果表明:所有样本均检出内参照基因,其中 7 份样品,外源基因检测到明显的荧光信号。进一步扩大实验,使用该方法,对各种淀粉样品(粉丝类产品的制备原料)进行检测,30 份样品中 2 份检出外源基因。送检样品的检测结果见表 3。

3 结 论

利用 PCR 方法检测转基因食品中外源基因是目前国内外常用的转基因食品鉴别方法。较之普通 PCR,实时荧光 PCR 更加灵敏准确,且无需 PCR 后处理,避免使用 EB,减少了对实验人员的伤害,因而具有广阔的应用前景^[5-6]。

对于深加工产品,实时荧光 PCR 检测的准确性在很大程度上取决于所提取 DNA 的质量。绿豆、马铃薯等农作物经酸浆发酵后提取淀粉,随后经制芡糊→合粉揣揉→抽气泡→漏丝成型→煮粉糊化→冷却捞粉→切断上挂→冷凝→冷冻→解冻干燥→(压块)包装等多个步骤,最终制成成品粉丝,其工艺十分复杂。加工过程中,大量核酸被降解或破坏^[7],导致成品粉丝中仅存在微量核酸,且多为小片段。本实验在使用 CTAB 法提取核酸的过程中,加入猪肉 DNA 作为担体,帮助微量核酸共沉,简单、实用,大大提高了粉丝中核酸的提取效率,为提高转基因成分的检出率奠定了良好的基础。

转基因作物的基因构建信息表明:其种类不同,插入的外源基因不尽相同,但是不同的基因常常使用相

同的启动子、终止子和标志基因。我们最终选择 6 个常用基因,对待检样本进行检测。所选基因基本能覆盖全部已商品化转基因品种,确保了转基因成分的检出效率。经过条件优化,6 个基因使用同一反应参数,在 PCR 仪的一次运行中,可同时完成诸个基因的筛选检测,从而极大地缩短了检测时间,提高了工作效率,减少了仪器损耗。

本实验所建立的粉丝类产品中转基因成分的实时荧光 PCR 定性检测法,灵敏、特异。该方法为克服技术性贸易壁垒,促进该类产品的出口贸易,提供了有力的技术支撑;对于我国转基因食品标识制度的进一步完善和转基因食品监管工作的进一步加强具有重要意义。

参考文献:

- [1] 宋林,杨昌举,胡品洁.转基因食品标识与管理[EB/OL]. http://www.sfccc.org.cn/Article_Print.asp?ArticleID=1248.
- [2] 各国转基因标识政策比较[EB/OL]. [2007-07-13].<http://www.gdnet.com.cn/aspprg/gdnet/zczd/detail.asp?id=17696>.
- [3] SN/T 1204 — 2003 植物及其加工产品中转基因成分实时荧光 PCR 定性检验方法[S].
- [4] 曹际娟,覃文,朱水芳,等.用实时荧光 PCR 方法鉴定转基因玉米 T14/T25[J]. 遗传, 2004, 26(5): 689-694.
- [5] 王勇,陈定虎,张辉玲.分子生物学技术在转基因食品检测中的应用[J]. 广东农业科学, 2007(2): 97-100.
- [6] 孙大庆,闫冰,赵宁,等.应用于转基因食品检测的 PCR 技术及其进展[J]. 中国粮油学报, 2007, 22(1): 108-113.
- [7] CANKAR K, STEBIH D, DREO T, et al. Critical points of DNA quantification by real-time PCR-effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms [J]. BMC Biotechnol, 2006, 14(6): 37.