

大豆异黄酮中转基因大豆成分检测研究

徐宝梁^{1,2}, 王炳武¹, 吴亚君¹, 陈颖¹, 苏宁¹, 白双义¹, 张青文²

(1.中国进出口商品检验技术研究所, 北京 100025; 2.中国农业大学, 北京 100094)

摘 要: 利用含有 35S 启动子、NOS 终止子片段的质粒, 确定相应检测方法的灵敏度为 15 个拷贝和 150 个拷贝; 采用扩增 CaMV35S 启动子的 2 对引物、扩增 NOS 终止子的 2 对引物、扩增 EPSPS 目的基因的 1 对引物, 对大豆异黄酮样品中转基因成分进行了检测, 结果均扩增出了特异性片段, 且测序结果正确。

关键词: 大豆异黄酮; 转基因成分; 检测

GMOs Detection Study in Soy Isoflavones

XU Bao-liang^{1,2}, WANG Bing-wu¹, WU Ya-jun¹, CHEN Ying¹, SU Ning¹, BAI Shuang-yi¹,
ZHANG Qing-wen²

(1.China Import and Export Commodity Inspection Technology Institute, Beijing 100025, China;

2.China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: The detection limits for CaMV35S promoters and NOS terminators were of 15 copies and 150 copies respectively in the PCR test of plasmids with fragments of CaMV35S promoters and NOS terminator. Special bands in electrophoresis gel were detected in 2 pairs of primers for CaMV35S promoters, 2 pairs of primers for NOS terminator and one pair of primer for EPSPS, and the sequences of the PCR products were correct. The results indicated that there were GMO elements in the sample of soy isoflavone.

Key words: isoflavones; GMO elements; detection

中图分类号: O6

文献标识码: B

文章编号: 1002-6630(2004)01-0127-04

对转基因食品进行标识管理, 一个重要的环节是建立转基因成分的检测方法。食品中转基因成分的检测方法主要是免疫学方法及分子生物学方法(Gachet et al; Georget al; Lipp et al; Mayer et al), 这两种方法均可用于农产品及其初加工产品中转基因成分的检测。但深加工食品中转基因成分的检测, 是转基因检测的一个难题。卵磷脂、精炼油、酱油等深加工食品, 经过复杂的加工工艺, 包括高温处理和反复提纯, 产品中适宜于 PCR 检测的 DNA 模板不但数量少, 而且片段也很小(Pauli et al)。大豆异黄酮产品中的转基因成分检测, 也面临这些问题。

大豆异黄酮是一类芳香族化合物, 对温热比较稳定, 具有雌性激素性质。因具有保健作用而广泛应用^[1, 2]。大豆异黄酮根据其加工工艺和用途不同, 大体分为 3 种制品: 一种是含量 40%~60% 提纯精品; 另一种是含量 20%~30% 并有助剂的配方精品; 还有一种是含量 10% 添加辅料的复合制品。前两者主要用于药品和饮品, 后者主要用于保健品和食品。

利用转基因大豆制备的大豆异黄酮, 产品中是否还含有大豆转基因成分, 如何检测, 至今尚未见到国内外文献报道。本研究中, 针对利用转基因大豆制备的 40% 大豆异黄酮提纯精品, 进行了转基因成分的检测研究。

1 材料与方法

1.1 材料与主要试剂

转基因大豆标准品(Fluka), 以非转基因大豆(国产)、转基因大豆异黄酮(市售), 含有 35S 启动子、NOS 终止子的质粒 上海博亚生物技术有限公司; PCR 产物纯化试剂盒、引物 上海生工生物工程有限公司; Sequencing Mix(ABI); Wizard Genomic DNA purification Kit (Promega); Taq 酶、dNTPs、PCR 缓冲液、溴化乙锭、琼脂糖、分子量 Marker(100 bp DNA Ladder, 100-600bp) 北京鼎国生物工程有限公司。

1.2 仪器与设备

粉碎机; 涡旋振荡器; 恒温箱; PCR 仪 GeneAMP PCR System 9700。

收稿日期: 2003-06-25

基金项目: 科技部社会公益型重点项目(202DIA50034)

作者简介: 徐宝梁(1963-), 男, 高级工程师, 从事分子生物学工作。

1.3 方法

1.3.1 DNA 的提取

称取制备样品 100mg。利用 Wizard Genomic DNA Purification Kit 提取样品 DNA。

1.3.2 PCR 条件

1.3.2.1 PCR 引物

引物序列、扩增片段大小及其所检测的基因见表 1。

表 1 PCR 引物序列

被检测基因	引物序列	扩增片断大小(bp)
CaMV35S	正: 5'-tca tcc ctt acg tca gtg gag-3'	165
	反: 5'-cca tca ttg cga taa agg aaa-3'	
	正: 5'-gct cct aca aat gcc atc a-3'	195
	反: 5'-gat agt ggg att gtg cgt ca-3'	
NOS	正: 5'-atc gtt caa aca ttt ggc a-3'	165
	反: 5'-att gcg gga ctc taa tca ta-3'	
	正: 5'-gaa tcc tgt tgc cgg tct tg-3'	180
	反: 5'-tta tcc tag ttt ggc cgc ta-3'	
EPSPS	正: 5'-cca cta tcc ttc gca aga ccc ttc c-3'	128
	反: 5'-ttg tat ccc ttg agc cat gtt gt-3'	
Lectin	正: 5'-cct cct cgg gaa agt tac aa-3'	162
	反: 5'-ggg cat aga agg tga agt t-3'	

1.3.2.2 PCR 反应

反应体系 50 μ l: 10 \times PCR buffer 5 μ l, dNTP(各 5 mmol/L)1 μ l, 引物(10mmol/L)各 1 μ l, Taq 酶(2U/ μ l)1 μ l, 模板 DNA 5 μ l; 加 ddH₂O 至 50 μ l。Lectin、35S、NOS、EPSPS 的 PCR 扩增反应体系相同。

PCR 反应程序: (1) 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min; (2) 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 54~55 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60s, 40 个循环; (3) 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

Lectin、35S、NOS、EPSPS 的退火温度分别为 55、55、55、54 $^{\circ}$ C。

1.3.3 PCR 扩增产物电泳检测

取 1.5g 琼脂糖, 于 100ml 电泳缓冲液中加热, 充分溶化, 加入溴化乙锭至终浓度为 1 μ g/ml, 制胶。在电泳槽中加入电泳缓冲液, 使液面刚刚没过凝胶。将 5~8 μ l PCR 扩增产物分别和适量加样缓冲液混合, 点样。9V/cm 恒压, 电泳 10~20min。紫外检测仪下观察电泳结果并记录。

1.3.4 PCR 产物测序分析

按 PCR 产物纯化试剂盒要求纯化。

反应体系 (20 μ l): 8 μ l Sequencing Mix, 200~500ng PCR 纯化产物, 3.2pmol/L 引物, 水; PCR 扩增程序: 96 $^{\circ}$ C 10s, 50 $^{\circ}$ C 5s, 60 $^{\circ}$ C 4min, 25 个循环后, 4 $^{\circ}$ C 保存。

扩增管中加入 16 μ l 水、64 μ l 95% 乙醇, 稍混匀, 室温放置 15min, 12000r/min 离心 20min, 去上清, 加

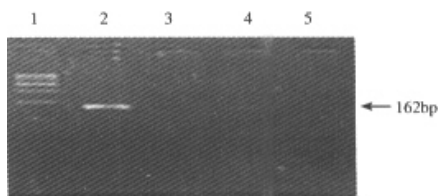
入 250 μ l 70% 乙醇, 短暂混匀, 12000r/min 离心 10min, 去上清, 室温干燥。

纯化产物管中加入 170 μ l 甲酰胺溶液, 95 $^{\circ}$ C, 5min, 迅速转移至冰上, 2min。分装样品于测序仪的加样槽中, 自动测序。

2 结果与分析

2.1 大豆异黄酮样品中 Lectin 基因检测结果

大豆异黄酮样品中 Lectin 基因检测结果见图 1。以转基因大豆标准品(Fluka)为阳性对照, 以玉米为阴性对照, 以无菌水空白对照, 在 4 号大豆异黄酮样品中, 可以看到在 162bp 处有一微弱条带, 即检测到了 Lectin 基因的扩增片段, 说明模板 DNA 的提取方法是有效的。



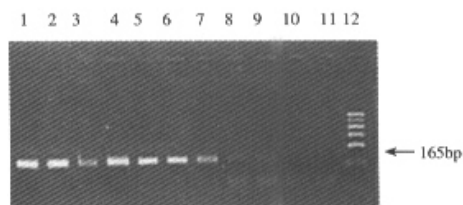
1. Marker(100~600bp) 2. 阳性对照 3. 阴性对照 4. 样品 5. 空白对照

图 1 大豆异黄酮中 Lectin 基因 PCR 扩增结果

2.2 大豆异黄酮样品中 35S 检测结果

2.2.1 35S 检测方法灵敏度

35S 检测方法灵敏度结果见图 2。含 35S 的质粒模板浓度为 5.78×10^6 个拷贝, 按 5 倍稀释至 9 号样品, 即模板浓度为 15 个拷贝时, 仍能用电泳图上清晰看到 PCR 扩增产物, 表明当模板 DNA 浓度为 15 个拷贝时, 该方法仍能检测到。

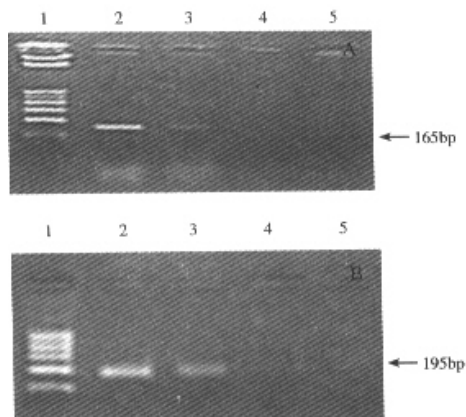


1. 5.78×10^6 copies 2~11. 5 倍梯度稀释 12. Marker(100~600bp)

图 2 梯度稀释 35S 质粒 PCR 扩增结果

2.2.2 PCR 产物凝胶电泳结果

对于 35S 启动子, 本文应用了扩增产物为 165bp 和 195bp 两对引物。以转基因大豆标准品(Fluka)为阳性对照, 以非转基因大豆(国产)为阴性对照, 以无菌水空白对照, PCR 产物电泳结果见图 3, 图 A 中 3 号样品在 165bp 处有条带, 图 B 中 3 号样品在 195bp 处有条带, 表明 2 对引物均检测到大豆异黄酮样品中含有 35S 外源基因。



A: 1. Marker(100~600bp) 2. 阳性对照 3. 样品 4. 阴性对照 5. 空白对照
B: 1. Marker(100~600bp) 2. 阳性对照 3. 样品 4. 阴性对照 5. 空白对照

图3 大豆异黄酮中 35S PCR 扩增结果

2.2.3 PCR 产物测序结果

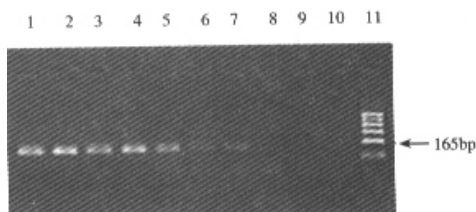
对 165bp 的扩增产物,进行了测序, DNA 序列如下,表明为 35S 外源基因扩增结果。

```
ccatcattgc  gataaaggaa  aggccatcgt  tgaagatgcc  tctgccgaca
gtgtcccaa  agatggaccc  ccaccacga  ggagcatcgt  ggaaaaagaa
gacgtccaa  ccacgtcttc  aaagcaagtg  gatgatgtg  atatctccac
tgacgtaagg  gatga
```

2.3 大豆异黄酮样品中 NOS 检测结果

2.3.1 NOS 检测灵敏度

NOS 检测灵敏度结果见图 4。质粒模板 2.3×10^6 个拷贝,按 5 倍稀释至 7 号样品,即模板浓度为 150 个拷贝时,仍能从电泳图上清晰看到 PCR 扩增产物,表明当模板 DNA 浓度为 150 个拷贝时,该方法仍能检测到。

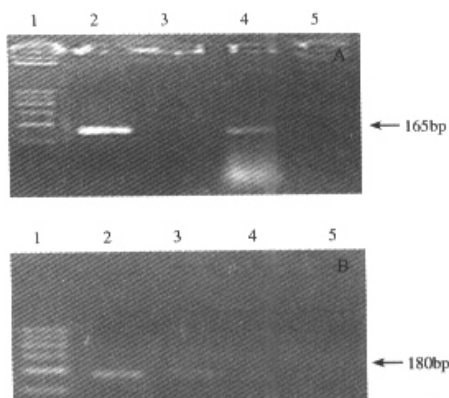


1. 2.3×10^6 copies 1~10. 5 倍梯度稀释 11. Marker(100~600bp)

图4 梯度稀释 NOS 质粒 PCR 扩增结果

2.3.2 PCR 产物凝胶电泳结果

对于 NOS 终止子,本文应用了扩增产物为 165bp 和 180bp 两对引物。以转基因大豆标准品(Fluka)为阳性对照,以非转基因大豆(国产)为阴性对照,以无菌水空白对照,PCR 产物电泳结果见图 5,图 A 中 4 号样品在 165bp 处有条带,图 B 中 3 号样品在 180bp 处有条带,表明 2 对引物均检测到大豆异黄酮样品中含有 NOS 外源基因。



A: 1. Marker(100~600bp) 2. 阳性对照 3. 阴性对照 4. 样品 5. 空白对照
B: 1. Marker(100~600bp) 2. 阳性对照 3. 样品 4. 阴性对照 5. 空白对照

图5 大豆异黄酮中 NOS PCR 扩增结果

2.3.3 PCR 产物测序结果

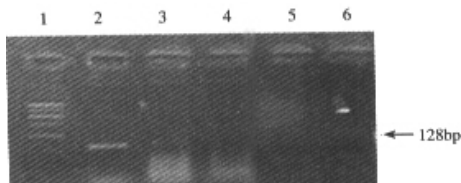
对 180bp 的扩增产物,进行了测序, DNA 序列如下,表明为 NOS 外源基因扩增结果。

```
gaatccctgt  gccgtcttg  cgatgattat  catataattt  ctgtgaatt
acgttaagca  tgtaataatt  aacatgtaat  gcatgacgtt  atttatgaga
tgggttttta  tgattagagt  ccgcaattta  tacatttaat  acgcgataga
aaacaaaata  tagcgcgcaa  actaggataa
```

2.4 大豆异黄酮样品中 EPSPS 检测结果

2.4.1 PCR 产物凝胶电泳结果

对于 EPSPS 目的基因,本文应用了扩增产物为 128bp 的引物。以转基因大豆标准品(Fluka)为阳性对照,以非转基因大豆(国产)为阴性对照,以无菌水空白对照,PCR 产物电泳结果见图 6,3、4 号为同一样品的重复,均在 128bp 处有条带,表明该方法检测到了大豆异黄酮样品中含有 EPSPS 外源基因。



1. Marker(100~600bp) 2. 阳性对照 3. 样品 4. 样品 5. 阴性对照 6. 空白对照

图6 大豆异黄酮中 EPSPS PCR 扩增结果

2.4.2 PCR 产物测序结果

对扩增产物,进行了测序, DNA 序列如下,表明为 EPSPS 外源基因扩增结果。

```
ttgtatccct  tgagccatgt  tgttaatttg  tgccattctt  gaagatctgc
tagagtcaat  gggtcagttg  cctctccaaa  tgaatatgac  ttcttataat
agaggagcgg  tcttcgaag  gatagtgg
```

3 讨论

大豆异黄酮的提取, 主要根据被提取物的性质及共存杂质的情况来选择合适的提取用溶剂。对大豆异黄酮的甙类成分, 一般用乙酸乙酯、丙酮、乙醇、甲醇、水或某些极性较大的混合溶剂, 甙元用极性较小的溶剂, 如乙醚、氯仿、乙酸乙酯等来提取。在综合提取大豆异黄酮时一般采用乙醇水溶液、甲醇水溶液、丙酮酸性溶液和弱碱性水溶液等。经过多次有机溶剂提取, DNA 大量损失; 并且在酸碱和加热等提取条件下, 使 DNA 断裂成小片段。对于经过提纯的食品或食品原料, 如大豆精炼油、大豆异黄酮、大豆卵磷脂、大豆蛋白等, 模板 DNA 有二个显著特点: 其一是含量少, 其二是片段小。

由于深加工食品中模板含量少, 需要利用高效的或特殊的 DNA 提取方法, 以提取到其中微量的 DNA。针对不同的深加工食品, 需要设计不同的模板提取方法。经过探索, 利用 Wizard Genomic DNA Purification Kit, 可有效提取到了大豆异黄酮样品中 DNA 模板。

加工工艺等因素使食品成品中的 DNA 被破坏, 所提取的 DNA 呈碎片状, 大小从几十到数百对碱基不等, 因此选择引物时, 必须考虑到该引物所扩增出的 PCR 产物的片段不能太大, 否则很可能由于引物不合适而未检出外源基因, 造成假阴性。本研究中所引用的引物均在 200 bp 以下, 使得每对引物均能检测到特定的基因片段。

从 35S 和 NOS 基因检测灵敏度试验看, 该方法灵敏度是很高的。用 PCR 方法检测 35S, 可以检测到被扩增

样品中十几个拷贝的 DNA 模板; 用 PCR 方法检测 NOS, 可以检测到被扩增样品中上百个拷贝的 DNA 模板。由于本研究中建立的方法灵敏度高, 所以能检测到大豆异黄酮样品中相应的转基因成分。有些实验室不能检测到有关大豆异黄酮样品中的转基因成分, 可能和模板提取过程、PCR 扩增过程、检测过程等环节有关。

参考文献:

- [1] 崔洪斌. 大豆生物活性物质的开发与应用[J]. 中国食物与营养, 2001, (1): 15-17.
- [2] 邱永军. 大豆异黄酮的功能特性[J]. 粮油食品科技, 2002, (1): 40-41.
- [3] Gachet E, Martin G G, Vigneau F, et al. Detection of genetically modified organisms (GMOs) by PCR: A brief review of methodologies available[J]. Trends in Food science and technology, 1999, (9): 380-388.
- [4] Georg A S Challenges For methods to detect genetically modified DNA in food[J]. Food control, 1999, (10): 351-352.
- [5] Lipp M, Brodmann P, Pietsch K, et al. IUPAC Collaborative Trial Study of a Method to Detect Genetically Modified Soy Beans and Maize in dried powder[J]. J of AOAC International, 1999, 82: 923-928.
- [6] Mayer R. Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food[J]. Food control, 1999, (10): 391-399.
- [7] Pauli U, Liniger M, Zimmermann A. Detection of DNA in soybean oil[J]. Z Lebensm Unters Forsch A, 1998, 207: 264-267.

食品中胆固醇含量测定方法的研究与比较

丁卓平, 王明华, 刘振华, 何 钰, 赵东艳
(上海水产大学食品学院, 上海 200090)

摘 要: 胆固醇存在于动物的所有组织中, 是动物体维持正常生理活动所必需的。但人体内过多的胆固醇将引起高血脂, 并进而引发一系列心血管疾病, 所以我们要控制饮食中胆固醇的摄入, 因此检测食品中胆固醇的含量, 确立一种快速、准确的胆固醇含量的测定方法是十分必要的。本文采用比色法测定。该法样品微量, 无需提取脂质, 用直接皂化法即可。这样不仅避免用毒性大而昂贵的试剂, 且操作时间大大缩短。通过充入氮气, 加入三氟化硼乙醚, 更加促进了整个皂化过程的完全。由正交试验选择出了最佳前处理条件。其测定结果的精密度高, 变异系数为 1.33%。回收率(83.0%~89.0%)也较满意, 测定值 13.717mg/g 与传统比色法测定值 13.382mg/g 相比有良好的一致性。本文除对蛋黄中胆固醇含量进行测定外, 还对部分水产品进行了测定。测定结果否定了鱿鱼中胆固醇含量很高的推论, 说明这些胆固醇几乎完全存在于鱿鱼内脏里, 人们食用鱿鱼不必顾虑胆固醇过高。测定结果

收稿日期: 2003-06-25

基金项目: 农业部“八五”渔业科技计划填补项目(渔 85-95-08-02)

作者简介: 丁卓平(1957-), 女, 副教授, 从事仪器分析、食品添加剂、食品保健与安全的教学和研究工作。