

## 转基因大豆 Roundup Ready 调控元件在食品加工过程中降解变化的研究

陈颖<sup>1</sup> 王媛<sup>2</sup> 葛毅强<sup>2</sup> 徐宝梁<sup>1</sup>

(1. 中国检验检疫科学研究院,北京 100025;2. 中国农业大学食品学院,北京 100083)

**摘要:** 35S 启动子可能会通过基因的水平转移插入到某一致癌基因上游,活化并导致癌症的发生。为了解转基因植物中调控元件的安全性问题,以转基因大豆 Roundup Ready 为实验材料,针对 Roundup ready 转基因大豆中 *CaMV35S* 启动子及 *NOS* 终止子的序列,设计了不同长度片段的引物,通过对 *CaMV35S* 启动子和 *NOS* 终止子的 PCR 扩增,研究了豆腐、豆奶、豆粉 3 种大豆加工食品中磨浆、煮浆、调配、均质、杀菌、喷雾干燥等关键工艺对 Roundup Ready 大豆中调控元件的影响。结果表明调控原件在食品加工过程中的降解变化与其所处位置有较大关系。扩增长度相近的 2 个片段,包含大豆基因组 DNA 序列的片段受加工过程的影响较小,在 3 种豆制品的所有加工过程中均能检测到。而只包含 *CaMV35S* 启动子序列的片段仅能在原料中检测到,原料经过磨浆后,片段大小降至 200 bp 以下。*NOS* 终止子受食品加工工艺的破坏和影响较小,在被检测食品的每一个加工过程中都能够检测到 *NOS* 终止子片段。

**关键词:** 植物,转基因;黄豆;启动区(遗传学);终止区(遗传学);食品处理和加工

### Degradation of non-target genes during different manufacturing processes of Roundup Ready (RR) soybean products

CHEN Ying, WANG Yuan, GE Yi-qiang, XU Bao-liang

(Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100025, China)

**Abstract:** Regulation elements which are normally used in transgenic organisms such as *CaMV35S* promoter and *NOS* terminator have potential risk for human health due to their functions. The degradation of non-target genes in the RR soybean during the manufacturing process of tofu, soymilk and soybean flour milling, cooking, blending, homogenizing, sterilizing and spray drying was investigated using a sensitive polymerase chain reaction detection system. The system used specific amplification of RR soybean promoter 35S gene and terminator *NOS* gene. The results showed that the degradation of *CaMV35S* was more related to its location than to the food processing. The fragment which included soybean genome DNA sequence was more stable than that without soybean genome DNA sequence, but the terminator *NOS* gene was hardly degraded during each step of the manufacturing process of RR soybean products.

**Key Words:** Plants, Transgenic; Soybeans; Promoter Regions (Genetics); Terminator Regions (Genetics); Food Handling

至今,转基因植物所采用的启动子主要为来源于花椰菜花叶病毒的 *CaMV35S* 启动子。广泛应用的终止子有 3 种,分别为来源于根瘤农杆菌的 *NOS*、*ocs* 和花椰菜花叶病毒的 *CaMV* 终止子。由于启动子和终止子在植物基因工程中的广泛应用,在

谈及转基因植物以及转基因食品安全性时,人们自然也会关心这些启动元件即启动子和终止子是否存在潜在风险。

Cummins<sup>[2]</sup>和 Tepfer<sup>[3]</sup>等人经过长期实验研究,列举出了 35S 启动子的潜在风险,如重新活化病毒、增强该病毒的合成;当转基因植物被动物或者人类食用后,35S 启动子可能会通过基因的水平转移插入到某一致癌基因上游,活化并导致癌症的发生等。

作者简介:陈颖 女 副研究员 博士后  
通讯作者:葛毅强 男 副教授 博士

虽然无数实验证明 Cummins 理论的前提即 35S 启动子中存在重组热点并不成立,但是转基因植物中这些启动元件的安全性问题已经受到人们越来越广泛的关注。

*CaMV35S* 启动子以及 *NOS* 终止子相对于内源基因以及外源目的基因来说基因片段较小,在高温、高压、酸碱处理、酶解、发酵等物理、化学及生物变化影响下,会随着基因组 DNA 的降解而降解。

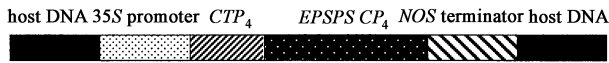


图 1 转基因大豆 Roundup Ready 的 DNA 成分

Roundup Ready 转基因大豆 DNA 成分如图 1 所示<sup>[4]</sup>,其启动子和终止子分别为 *CaMV35S* 和 *NOS*。本文通过分析豆腐、豆奶、豆粉 3 种大豆加工食品中磨浆、煮浆、调配、均质、杀菌、喷雾干燥等关键工艺对 Roundup Ready 大豆启动元件的影响,研究启动子 35S 和终止子 *NOS* 在不同加工过程中降解程度的变化规律,不仅为转基因食品的安全性提供理论基础和科学依据,同时由于有利于检测方法的标准化,可为更多的食品及农产品深加工产品的市场标识提供技术保障。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试样 转基因大豆试样为江苏连云港出入境检验检疫局提供;非转基因大豆购自国内市场;豆腐、豆奶、豆粉等样品在中国农业大学食品学院实验室自制完成。

1.1.2 启动子 *CaMV35S*、终止子 *NOS* 基因扩增引物 *CaMV35S* 启动子采用扩增不同片段大小的 2 组嵌套式引物,*NOS* 终止子采用 1 组嵌套式引物。各引物位置如图 2 所示,其序列见表 1。所有引物均由博亚生物技术公司合成。

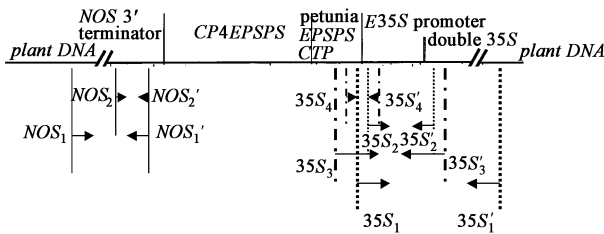


图 2 所采用引物在 Roundup Ready 大豆 DNA 中的位置

1.1.3 试剂 Wizard Genomic DNA purification 试剂盒购自美国 Promega 公司; *Taq* 酶、dNTPs、PCR 缓冲液、溴化乙锭、分子量 Marker(100 bp ~ 600 bp)均购自道普生物技术公司。

1.1.4 主要仪器与设备 固体粉碎机、涡旋震荡

器、电子天平、恒温箱、低温冷冻高速离心机、微量移液器、PCR 扩增仪 (Gene AMP PCR System 9700)、电泳仪、凝胶成像仪、打浆机、喷雾干燥机、均质机和高压灭菌锅。

表 1 扩增引物序列及产物大小

| 基因名称               | 引物序列                                   | 扩增片段大小(bp) | 引物出处 |
|--------------------|--|------------|------|
| <i>CaMV35S</i> 启动子 | 35S1 : 5' gattccattgccagctatctg3'      | 273        | [5]  |
|                    | 35S1' : 5' tagaggaagggtcttgcgaagg3'    |            |      |
|                    | 35S2 : 5' tcatcccttacgtcagtgagg3'      | 165        | [6]  |
|                    | 35S2' : 5' ccatcattgcgataaaggaaa3'     |            |      |
|                    | 35S3 : 5' tgcgataaaggaaaggctatcg3'     | 246        | [7]  |
|                    | 35S3' : 5' agactggtgatttcagcgtgct3'    |            |      |
|                    | 35S4 : 5' attgatgfgatctccactgacgt3'    | 101        | [8]  |
|                    | 35S4' : 5' cctctccaaatgaaatgaacgtcct3' |            |      |
| <i>NOS</i> 终止子     | NOS1 : 5' gaatcctgttccggtctt3'         | 217        | [5]  |
|                    | NOS1' : 5' cgaattcccgatctagta3'        |            |      |
|                    | NOS2 : 5' gaatcctgttccggtctt3'         | 125        | [9]  |
|                    | NOS2' : 5' cgctatattttttctatcgtg3'     |            |      |

## 1.2 方法

1.2.1 试样的加工制备 采用含 2.5% (质量百分比)转基因大豆的大豆样品为原料,分别按照豆腐、豆奶和豆粉的加工工艺加工样品,并收集关键工艺中的样品以进行启动子 *CaMV35S* 和终止子 *NOS* 基因不同长度片段的扩增。

豆腐:精选大豆 \* 浸泡 (24 h) 磨浆 \* 煮浆 \* (100 ,15 min) 点浆 \* (加入  $CaSO_4$ ) 凝固豆腐 \*

豆奶:精选大豆 \* 浸泡 (24 h) 磨浆 \* 煮浆 \* (100 ,15 min) 调配 \* (加入 8%蔗糖以及 0.5%黄原胶) 均质 \* 杀菌 \* (121 ,30 min) 豆奶 \*

豆粉:精选大豆 \* 浸泡 (24 h) 磨浆 \* 煮浆 \* (100 ,15 min) 喷雾干燥 \* (进口温度为 160 ,出口温度为 80 ) 豆粉 \*

(\* 为关键工艺,进行试样收集。)

1.2.2 DNA 的提取 收集关键工艺中的各试样以提取 DNA。固体样品使用粉碎机制成粉状,称取 40 mg;液态样品吸取 400  $\mu$ l,所有样品均采用 Wizard Genomic DNA purification 试剂盒进行 DNA 提取,方法按照 Promega 公司提供的说明书进行。

1.2.3 PCR 扩增 各组引物 PCR 反应体系均采用 50  $\mu$ l 反应体系,10  $\times$ PCR 缓冲液 5  $\mu$ l,dNTPs (10  $\mu$ mol) 1  $\mu$ l,引物 (10  $\mu$ mol) 2  $\mu$ l,模板 DNA 5  $\mu$ l (约 150 ng),*Taq* 酶 1 U,加 ddH<sub>2</sub>O 补足至 50  $\mu$ l。

PCR 扩增条件为:94 预变性 5 min;94 变性 30 s;55 退火 30 s;72 延伸 45 s;40 个循环;72 后延伸 7 min。

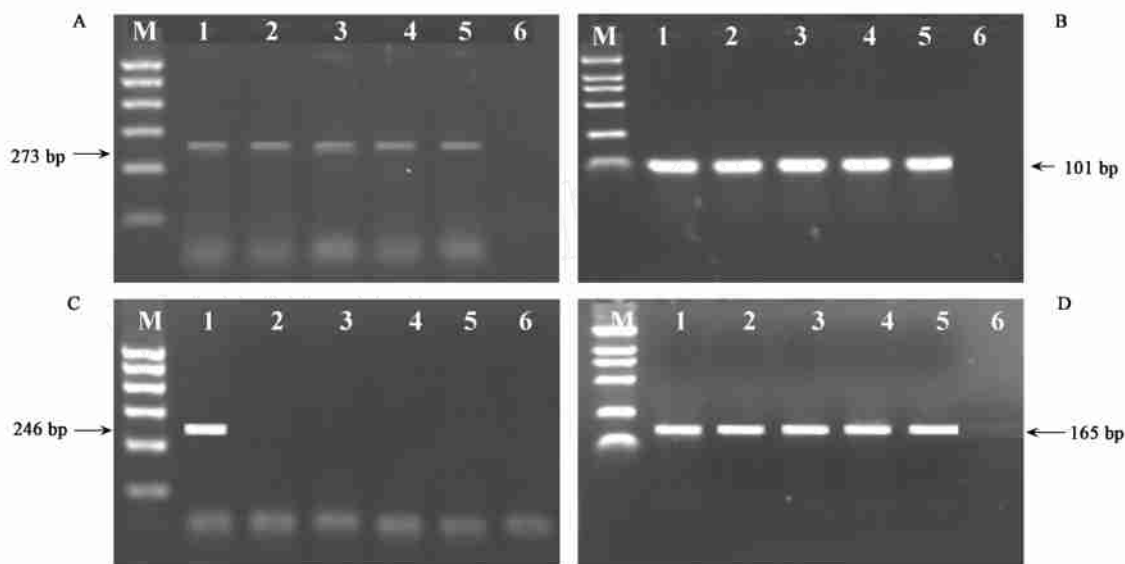
1.2.4 PCR 产物检测 PCR 扩增产物在 2% 的琼脂糖凝胶上 90V 电泳 40 min,凝胶成像仪观察结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 豆腐加工过程中启动子 *CaMV35S* 和终止子 *NOS* 的降解变化

采用两对嵌套式引物  $35S_1/35S_1$  和  $35S_2/35S_2$  及引物  $35S_3/35S_3$  和  $35S_4/35S_4$  对豆腐加工过程中的不同试样进行扩增,其扩增结果表明,在豆腐加工过程中,所有中间过程的样品及终产品中均能检测到引物  $35S_1/35S_1$ 、 $35S_2/35S_2$  和  $35S_4/35S_4$  对 *CaMV35S* 启动子的扩增(图 3 A,B,D),*CaMV35S* 启

动子基因的 DNA 并没有因磨浆、煮浆、点浆等一系列加工工艺的作用而发生严重降解(图 3 A,B);而引物  $35S_3/35S_3$  的扩增产物 246 bp 的片段条带仅能在原料中检测到,经过磨浆工艺后, DNA 即降解至 200 bp 以下(图 3C)。对于终止子 *NOS* 基因的扩增结果表明,引物  $NOS_1/NOS_1$  及引物  $NOS_2/NOS_2$  的扩增产物 217 bp 及 165 bp 的片段在各个工艺过程中均能检测到。可见,在豆腐加工过程中 *NOS* 基因降解程度变化很小(图 4 A,B)。



M. 分子量标记; 1. 原料; 2. 磨浆; 3. 煮浆; 4. 点浆; 5. 豆腐; 6. 空白对照

A. 273 bp 片段; B. 101 bp 片段; C. 246 bp 片段; D. 165 bp 片段

图 3 豆腐关键加工工艺试样中启动子 *CaMV35S* 的 PCR 扩增



M. 分子量标记; 1. 原料; 2. 磨浆; 3. 煮浆; 4. 点浆; 5. 豆腐; 6. 空白对照

A. 217 bp 片段; B. 125 bp 片段

图 4 豆腐关键加工工艺试样中终止子 *NOS* 的 PCR 扩增

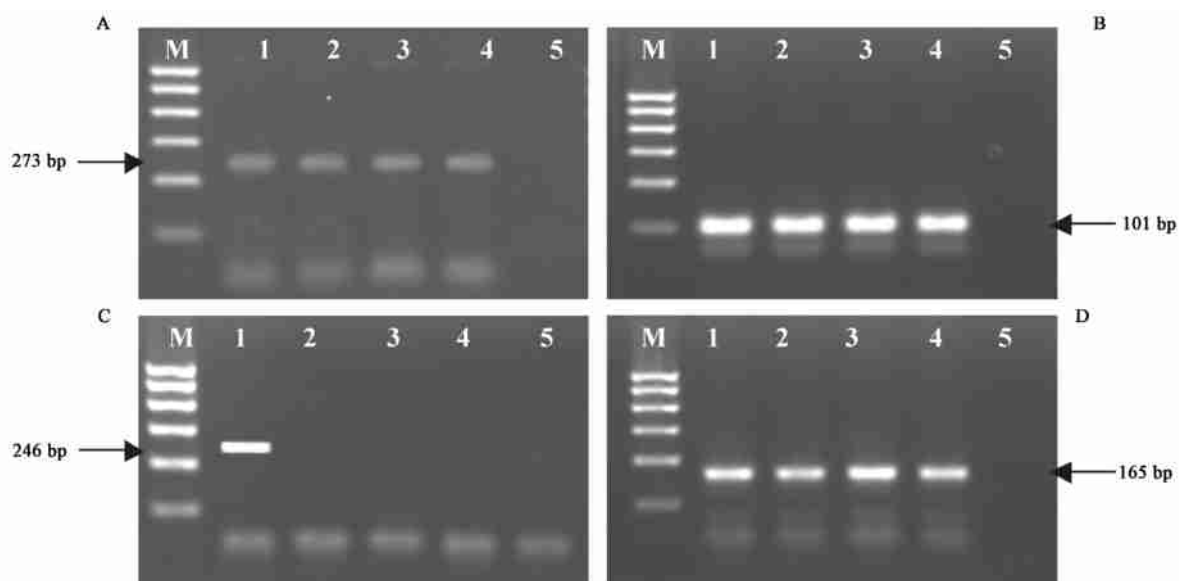
### 2.2 豆粉加工过程中启动子 *CaMV35S* 和终止子 *NOS* 的降解变化

豆粉的加工工艺相对比较简单,其中,喷雾干燥是关键工艺。各对引物对 *CaMV35S* 启动子及 *NOS* 终止子的扩增结果表明,豆粉加工过程中 *CaMV35S* 启动子的降解变化规律与豆腐加工过程中的基本相同,引物  $35S_3/35S_3$  的扩增片段同样受到磨浆这一加工过程的影响(图 5 A,B,C,D)。各加工工艺对

*NOS* 终止子的降解破坏影响较小,引物  $NOS_1/NOS_1$  所扩增的 217 bp 在各个工艺过程中都能得到良好扩增(图 6 A,B)。

### 2.3 豆奶加工过程中启动子 *CaMV35S* 和终止子 *NOS* 的降解变化

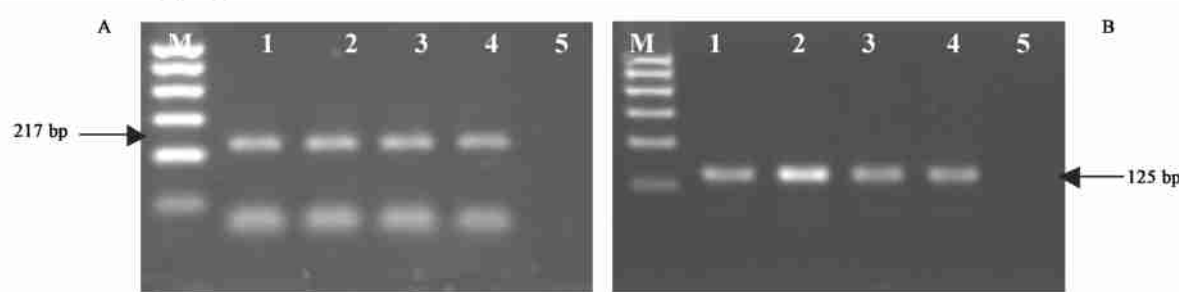
豆奶的加工过程较豆腐、豆粉复杂,主要有磨浆、加热、调配、均质和杀菌等一系列工艺。其中,磨浆和加热过程与豆腐的加工过程一致。对加工过程



M. 分子量标记; 1. 原料; 2. 磨浆; 3. 煮浆; 4. 喷雾干燥 (豆粉); 5. 空白对照

A. 273 bp 片段; B. 101 bp 片段; C. 246 bp 片段; D. 165 bp 片段

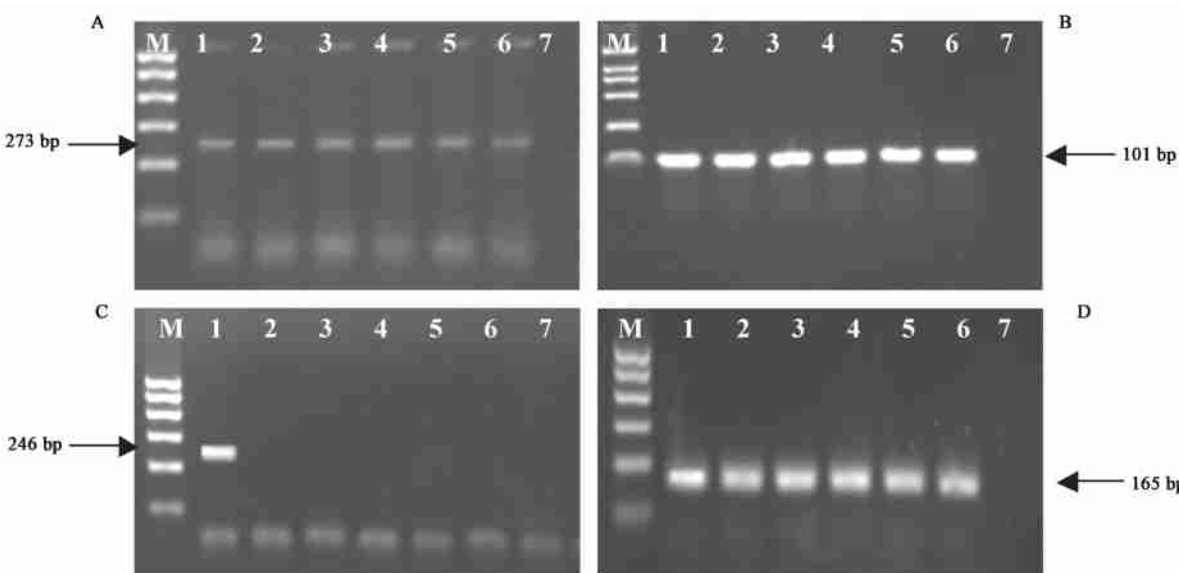
图 5 豆粉关键加工工艺试样中启动子 *CaMV35S* 的 PCR 扩增



M. 分子量标记; 1. 原料; 2. 磨浆; 3. 煮浆; 4. 喷雾干燥 (豆粉); 5. 空白对照

A. 217 bp 片段; B. 125 bp 片段

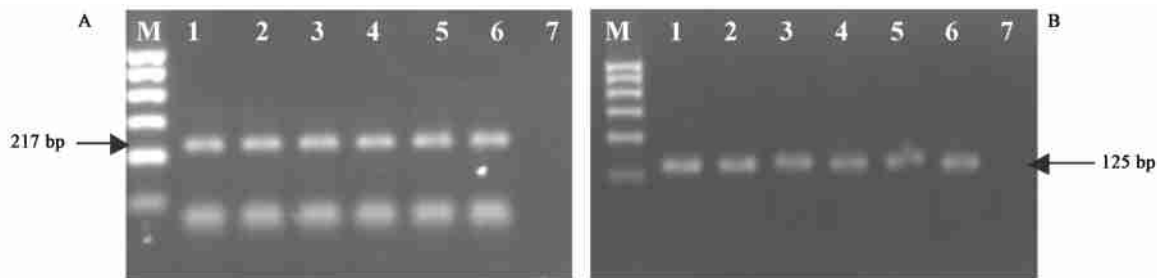
图 6 豆粉关键加工工艺试样中终止子 *NOS* 的 PCR 扩增



M. 分子量标记; 1. 原料; 2. 磨浆; 3. 煮浆; 4. 调配; 5. 均质; 6. 杀菌 (豆奶); 7. 空白对照

A. 273 bp 片段; B. 101 bp 片段; C. 246 bp 片段; D. 165 bp 片段

图 7 豆奶关键加工工艺试样中启动子 *CaMV35S* 的 PCR 扩增



M. 分子量标记; 1. 原料; 2. 磨浆; 3. 煮浆; 4. 调配; 5. 均质; 6. 杀菌(豆奶); 7. 空白对照  
A. 217 bp 片段; B. 125 bp 片段

图8 豆奶关键加工工艺样品中终止子 *NOS* 的 PCR 扩增

及终产品的检测结果表明,其 *CaMV35S* 启动子和 *NOS* 终止子的降解变化规律与豆腐、豆粉的一致(图7A,B,C,D;图8A,B)。

### 3 结论与讨论

以转基因生物为直接原料的食品与以非转基因生物为原料的食品一样,在加工过程中都要经过若干加工工序,理化性质发生很大的变化,加工中出现的某些物理、化学变化或者酶因子都会影响DNA的降解变化<sup>[10]</sup>,且这些影响因素也常常由于不同的食品种类以及同种原料的不同加工工艺而差异很大。例如,高温、高压、酸碱处理、酶解、发酵等物理、化学、生物反应都会引起食品中DNA不同程度的降解,因此,转基因食品原料中所插入的启动元件也会随着基因组DNA的降解而受到破坏。

根据所报道的基因序列,针对 *CaMV35S* 启动子在 Roundup Ready 大豆基因组DNA上的位置,设计了2组嵌套式引物,引物  $35S_1/35S_1$ 、 $35S_2/35S_2$  和  $35S_4/35S_4$  的扩增片段基本不受加工工艺的影响,在各个加工过程的试样中都可以扩增出,但  $35S_3/35S_3$  的扩增片段受加工工艺的影响较大。分析其原因可能与各引物在大豆基因组中的位置有关,引物  $35S_3/35S_3$  的上、下游引物序列均位于 *CaMV35S* 启动子中,而其它3对引物的上游引物序列位于 *CaMV35S* 启动子中,下游引物序列位于大豆基因组DNA中。在食品的加工过程中,外源基因的稳定性相对较差,更容易受到破坏和降解,因此,位于启动子中的序列也更易受到影响和破坏,在磨浆后即检测不到。所选用的扩增 *NOS* 终止子的引物其下游引物序列也位于大豆基因组DNA中,因此也相对稳定,在豆腐、豆奶、豆粉等粗加工食品的加工过程中均未发生降解变化。

目前,在进行转基因检测时,通常首先对

*CaMV35S* 启动子和 *NOS* 终止子进行检测,以确定一种产品是否经过基因修饰,因此,在选择引物时,应首选扩增序列较稳定的引物,否则将会出现假阴性结果。此外,在对转基因食品的安全性进行评价时,不仅要考虑食品加工过程对基因组DNA以及外源插入基因的影响,还应了解这些启动元件在不同加工工艺中的变化、降解情况,这样才能为转基因食品的安全性评价提供更全面、更有效的科学依据。

### 参考文献

- [1] Spiegelhalter F, Lauter F-R, Russell JM. Detection of genetically modified food products in a commercial laboratory[J]. J Food Sci, 2001, 66(5): 634-640.
- [2] Cummins J, Ho M W, Ryan A. Hazardous *CaMV* promoter? [J]. Nature Biotechnol, 2000, 18:363.
- [3] Tepfer M. Pour une evaluation scientifique desrisques: le cas du promotor 35S[J]. Biofutur. 2000,201:32-35.
- [4] 周建娥,杨杏芬,凌文华. 转基因食品检测方法[J]. 中国卫生检验杂志, 2002, 12(4): 508-509.
- [5] 刘光明,苏文金,栾国彦,等. PCR方法检测食品中的转基因成分 35S 和 *NOS* 的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(5): 94-99.
- [6] 曹际娟,陈明生,卢行安,等. PCR检测转基因玉米及其粗加工食品[J]. 玉米科学, 2001, 9(2): 87-91.
- [7] Nobuaki Shirai, Keiko Momma, Sachiko Ozawa, et al. Safety assessment of genetically engineered food: detection and monitoring of glyphosate-tolerant soybeans[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1998, 62(7): 1461-1464.
- [8] Takeshi Matsuoka, Hideo Kuribara, Ken Takubo, et al. Detection of recombinant DNA segments introduced to genetically modified maize (*Zea mays*) [J]. J Agric Food Chem, 2002, 50, 2100-2109.
- [9] Sabine Vollenhofer, Kornel Burg, Josef Schmidt, et al. Genetically modified organisms in food—screening and specific detection by polymerase chain reaction[J]. J Agric Food Chem, 1999, 47, 5038-5043.
- [10] 郑文杰,刘,刘伟,等. 转基因大豆加工产品的定性PCR检测[J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(5): 467-471.

[收稿日期:2004-12-26]

中图分类号:R15;Q343.1;S52 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2005)02-0135-05