

食品中转基因大豆成分的定性和定量检测

赵卫东 郑文杰 刘 贺 艳
(天津出入境检验检疫局,天津 300201)

摘要:为建立食品中转基因成分的定性定量分析,运用传统的定性 PCR 方法检测大豆加工产品中转基因成分的存在,运用 Taqman 探针技术,对存在的转基因成分进行准确定量。对于定量过程中由于扩增效率的不同造成的误差,通过大豆的内源基因 *Lectin* 进行校正,根据 *Ct* 值对应于校正曲线计算出转基因大豆的含量。本方法灵敏度达到 0.1%,误差范围小于 30.0%。可用于转基因大豆的监测管理。

关键词:聚合酶链反应;植物,转基因;豆科;分子探针技术

Qualitative and quantitative detections of transgenic component in genetically modified soybean using real-time PCR

ZHAO Wei-dong, ZHENG Wen-jie, LIU Xuan, HE Yan

(Tianjin Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau of China, Tianjin 300201, China)

Abstract: Many countries have constituted higher requirement to the detection of GM-products since a series of labeling regulations were put into practice. This requires accurate quantification of the transgenic material in the GM-products. A conventional qualitative polymerase chain reaction (PCR) assay was used to detect the presence of GM-soy and a real-time PCR was used to quantify the content of GM-soy. The errors due to difference in amplification efficiencies were amended by detecting the endogenous control. The percentage of genetically modified soybean was calculated by *Ct* value through a standard curve. The sensitivity of the method could reach 0.1% and the range of error was less than 30.0%.

Key Words: Polymerase; Plants, Transgenic; Legumes; Molecular Probe Techniques

目前国际上还没有制定统一的定量检测的方法和标准^[1,2],定量检测方法多是针对转基因作物原材料,对由原材料作成的产品的定量检测却很少涉及。本研究选取 17 种常见的含有大豆成分的食品,运用传统的定性 PCR 方法检测其中是否含有转基因成分,对确定含有转基因成分的食品,应用欧盟推荐的荧光定量 PCR 方法,确定该食品中转基因成分的含量。

1 材料与方法

1.1 材料 0.1%、0.5%、1.0%、2.0%、5.0%转基因大豆标准样品英科新创科技有限公司提供;含大豆成分的食品豆粉、酱豆腐、腐乳、豆豉、日本豆腐、煎豆干、豆丝、豆片、素肉、夹心饼干、奶粉、豆酱、巧克力、豆浆、豆渣、卵磷脂、福临门豆油,从超市购得;液氮、1mol/L Tris·Cl、Na₂-EDTA·2H₂O、NaOH、CTAB、

聚乙烯吡咯烷酮-40、Tris 饱和酚、氯仿、异丙醇、70%乙醇、TE 缓冲液、RNaseA、溴化乙锭、5×TBE 缓冲液、冰醋酸、0.25%溴酚蓝、0.25%二甲苯青 FF、30%甘油和 Taqman Master Mix (Perkin Elmer);荧光标记探针及引物见表 1(大连宝生物公司合成);反应体系见表 2。

表 1 定性和定量 PCR 所需的引物、探针

引物/探针	5	3	产物大小
<i>Lectin</i> 定性 ^[4]	GCCCTCTACTCCACCCCATCC	GCCCATCTGCAAACCTTTTGTG	118bp
<i>CaMV35S</i> 定性 ^[3]	GCTCCTACAAATGCCATCA	GATAGTGGGATTGTCCGTC	195bp
<i>Lectin</i> 定量 ^[5]	TGGTCGCGCCCTCTACTC	GCCGAACTGCACACG	
<i>CaMV35S</i> 定量 ^[5]	CCGGAAGGCCAGAGGAT	GGATTTCAGCATCATGTGCTACA	
<i>Lectin</i> 探针 ^[5]	JOE-CTACCGGTTTCTTTGICCCA	AATGTGGAT-TEMAR	
<i>CaMV35S</i> 探针 ^[5]	FAM-CCGGCTGCTGCTTCAC	CGTGAAG-TEMAR	

基金项目:天津市自然科学基金资助(013615111)

作者简介:赵卫东 男 工程师

通讯作者:郑文杰 女 高级工程师

This work was supported by the Science and Technology Plan of Tianjin (013615111), China.

表2 反应体系

MU

试剂	加样量 (μl)
定性 PCR	
10 × PCR 缓冲液	2.5
10 × dNTPs(含 dUTP)	2.0
10 × MgCl ₂	2.5
Taq 酶 (5 单位/ μl)	0.2
正义引物 (10 $\mu\text{mol/l}$)	0.5
反义引物 (10 $\mu\text{mol/l}$)	0.5
DNA 模板 (1 ~ 10 ng)	1.0
双蒸水	15.8
定量 PCR	
Taqman Master Mix	12.5
正义引物(10 $\mu\text{mol/l}$)	1.0
反义引物(10 $\mu\text{mol/l}$)	1.0
探针(5 Pmol/ μl)	0.5
双蒸水	10.0

仪器 紫外可见分光光度计(PE公司)、高速冷冻离心机、真空干燥浓缩仪、7900HT 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)、电泳仪(美国伯乐公司)、凝胶成像仪(美国安莱公司)。

1.2 方法

1.2.1 大豆及其食品中 DNA 的提取方法 参照文献[3]。

1.2.2 DNA 浓度测定 样品 DNA 用紫外分光光度计测定 260 nm 和 280 nm 处吸收值,分别计算核酸的纯度和浓度。计算公式 DNA 纯度: A_{260}/A_{280} ,比值为 1.7 ~ 1.9 较为理想;双链 DNA 浓度($\mu\text{g/ml}$): $50 \times A_{260}$ 。

1.2.3 转基因大豆成分定量灵敏度确定 设置了 5 个转基因大豆标准样品,转基因大豆成分/总大豆成分分别为 0.1%、0.5%、1.0%、2.0%、5.0%,每个标准品重复 9 次,取平均值,依试验结果(未列出)把 0.1% 作为转基因大豆成分定量检测的最低限。

1.2.4 食品中转基因成分含量检测 以定性 PCR 试验中特异性基因 *CaMV35S* 扩增为阳性的豆奶粉和巧克力作为未知样品进行定量 PCR 检测。对含量分别为 0.1%、0.5%、1.0%、2.0%、5.0% 的 5 个转基因大豆标准样品和 2 个待测样品分别在 *Lectin* 定量体系和 *CaMV35S* 定量体系中进行扩增,以转基因大豆标准样品百分含量的对数值($\log x\%$)为纵坐标,以转基因大豆标准样品的 C_t 值(*35S* 扩增得到的 C_{t1} 和 *Lectin* 扩增得到的 C_{t2} 之差)为横坐标,做成校正曲线,把待测样品得到的 C_t 值带入校正曲线方程计算出样品中转基因大豆成分的含量。

1.2.5 PCR 试验 定性 PCR 反应条件,^[3] 预变性: 95 5 min;循环扩增(40 个循环)95 变性 30 s, 54 退火 40 s,72 延伸 1 min;72 延伸 5 min。

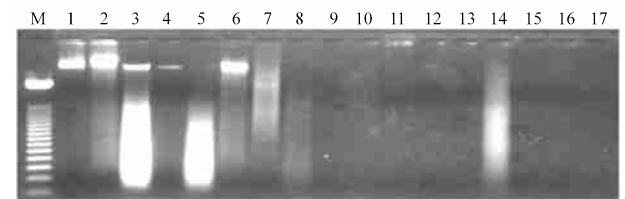
荧光定量 PCR 反应条件 温浴 50 2 min;预变性:95 10 min;循环扩增(45 个循环):95 15 s, 53 1 min。

2 结果与分析

2.1 DNA 的提取 所有的样品均用改良 CTAB 法提取 DNA。分别取 2 μl 提取到的 DNA 点样于 2.0% 琼脂糖凝胶中进行电泳分析,其结果如图 1,有几种样品中存在明显的 DNA 降解小片断。通过紫外分光光度计分析,各样品 DNA 的提取量在 266 $\mu\text{g}/100 \text{mg}$ (豆粉)和 0.45 $\mu\text{g}/100 \text{mg}$ (卵磷脂)之间,其中福临门豆油和夹心饼干的 DNA $A_{260} < 0.1$,无法被精确的定量。 A_{260}/A_{280} 的值除了腐乳(1.41)、日本豆腐(2.0)、豆渣(1.62)外,其余样品均在 1.7 和 1.9 之间。

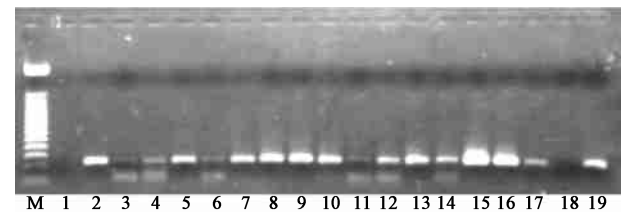
2.2 定性 PCR 检测 为了解从食品中所提取的 DNA 是否能够被扩增出来,本研究采用大豆内源基因 *Lectin* 作为内参进行定性 PCR 检测,图 2 显示了各种食品提取的 DNA 中的 *Lectin* 扩增条带(118bp)。由图 2 可看出,福临门豆油提取的 DNA 没有 *Lectin* 扩增条带,酱豆腐、腐乳、日本豆腐、夹心饼干、卵磷脂的 *Lectin* 扩增条带较弱,其它 DNA 样品均扩增出了明显的特征条带。

应用转基因作物常用的 *CaMV35S* 启动子作为特异性引物对所提取的 DNA 进行 PCR 扩增,以确定各种食品中是否含有转基因大豆成分,图略。



(M:相差为 50bp 的 DNA 标准品, 从下至上分别为:50bp、100bp、150bp800bp) 1:豆粉,2:酱豆腐,3:腐乳,4:面酱,5:日本豆腐,6:煎豆干,7:豆丝,8:豆片,9:素肉,10:夹心饼干,11:奶粉,12:巧克力,13:豆豉,14:豆渣,15:豆浆,16:卵磷脂和 17:福临门豆油。

图 1 CTAB 法提取的大豆加工产品总核酸电泳图



(M:相差为 50bp 的 DNA 标准品, 从下至上分别为:50bp、100bp、150bp800bp) 1:空白对照,2:豆粉,3:酱豆腐,4:腐乳,5:面酱,6:日本豆腐,7:煎豆干,8:豆丝,9:豆片,10:素肉,11:夹心饼干,12:豆奶粉,13:巧克力,14:豆豉,15:豆渣,16:豆浆,17:卵磷脂,18:福临门豆油和 19:阳性对照。

图 2 用大豆内源基因 *Lectin* 扩增 CTAB 法提取的大豆加工产品的电泳图

2.3 定量 PCR 检测 校正曲线如图 3,扩增结果如图 4、图 5。

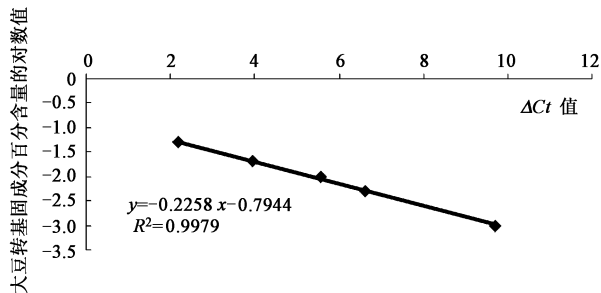
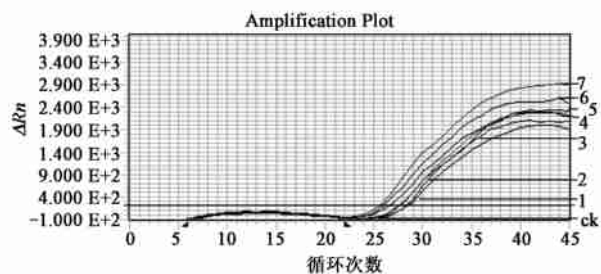
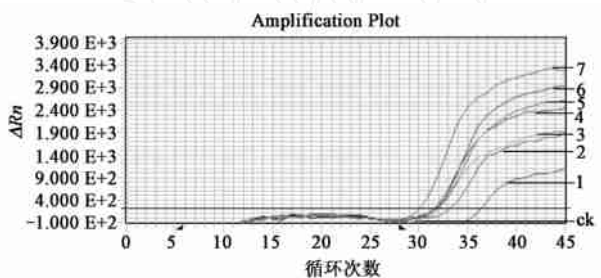


图3 转基因大豆含量校正曲线



ck: 阴性对照, 1: 0.1% 的标准样品, 2: 0.5% 的标准样品, 3: 巧克力, 4: 1.0% 的标准样品, 5: 豆奶粉, 6: 2.0% 的标准样品, 7: 5.0% 的标准样品。

图4 大豆内源基因 *Lectin* 定量检测扩增曲线



ck: 阴性对照, 1: 0.1% 的标准样品, 2: 0.5% 的标准样品, 3: 巧克力, 4: 1.0% 的标准样品, 5: 豆奶粉, 6: 2.0% 的标准样品, 7: 5.0% 的标准样品。

图5 大豆 35S 启动子基因定量检测扩增曲线

待测大豆中转基因成分含量检测结果见表1, 根据表1的结果可获得大豆中转基因成分含量的校正曲线(图3), 被检测样品巧克力和豆奶粉的 ΔC_t 值分别为 5.756 326 和 3.861 300, 对应校正曲线即可计算出转基因成分的含量分别为 0.96% 和 2.35%。

表1 转基因大豆定量检测结果

样品名称	实际含量 (%)	C_t 值	测定含量
阴性对照	0	0	-
转基因大豆标样 1	0.1	9.707104	-
转基因大豆标样 2	0.5	6.619146	-
转基因大豆标样 3	1.0	5.569903	-
转基因大豆标样 4	2.0	3.955226	-
转基因大豆标样 5	5.0	2.177476	-
巧克力		5.756326	0.96%
豆奶粉		3.861300	2.35%

3 结果与讨论

大豆在加工成食品或加入到食品中的过程中, 其中的 DNA 随着加工程度的高低发生不同程度的降解, 给 DNA 的提取造成了一定的困难, 同时食品中含有的糖类、盐分和其它元素不但会影响 DNA 提取的效率, 也会给后续的定性、定量 PCR 检测工作带来影响。本试验中采用的改良的 CTAB 法对 17 种食品中的 DNA 进行提取, 通过紫外分光光度计检测、凝胶电泳和内源基因 *Lectin* 扩增检测, 除了福临门豆油没有提取到 DNA 外, 其余的 16 种食品均得到足够量的用于定性、定量 PCR 检测的 DNA。其中有些样品 DNA 提取的量比较少, 需要进一步对提取方法进行改进或换用其它的提取方法解决。

在本试验中, 大豆标准样品和 17 种食品在相同的条件下进行 DNA 提取和 PCR 扩增, DNA 提取和 PCR 扩增效率比较一致, 使得定量结果比较准确、可靠。但大豆标准样品是粉状物, 未经中度或深度加工过程, 与待测食品形式不一致, 即使在相同的条件下进行 DNA 提取和 PCR 扩增, 效率也会有所不同, 具体会有多大影响, 有待于进一步试验确证。

经过多次重复试验发现, 相同含量的标准品用不同方法提取核酸, 通过定量测得的 C_t 值差别很大, 即使用同种方法提取的核酸, 由于操作中的误差, 每次提取的核酸量也不完全相同, 定量测得的 C_t 值也有波动, 不完全随样品的浓度梯度相应扩大或缩小, 但扩增 35S 与 *Lectin* 基因得到的 C_t 值之差 C_t 却很稳定, 随样品的浓度梯度相应扩大或缩小, 因此用标准样品的 C_t 值作校正曲线, 计算样品中的转基因成分含量误差较大, 本实验用标准样品的 C_t 值作校正曲线计算样品中的转基因含量, 结果比较真实可靠。

如果在设计试验时加入参比信号校正, 即在试剂中加入固定浓度的 ROX 荧光, 荧光信号随反应体积、所在孔位置、所用试管特别是管盖等的差异造成的误差都将被扣除, 使得数据真正反映 PCR 进程, ROX 校正将极大地改进定量检测的精确度, 比如重复管之间的数据重现性。另外, 本方法检测样品的灵敏度虽然可达 0.1%, 但检测低含量的样品时, 由于荧光信号比较弱, 结果仍不太稳定, 有待于对方法作进一步改进。

参考文献

- [1] Hardegger M, Brodmann P, Herrmann A. Quantitative detection of the 35S promoter and the Nos terminator using quantitative competitive PCR [J]. *EurFood Res Technol*, 1999, 209: 83-87.

转基因“华番一号”番茄的筛选和特异性的 定性、定量 PCR 检测方法

杨立桃^{1,3} 赵志辉² 申慧峰³ 潘爱虎⁴ 张大兵³

(1. 南京大学生命科学学院,江苏 南京 210093;2. 南京农业大学动物医学院,江苏 南京 210095;
3. 上海交通大学生命科学技术学院,上海 200240;4. 上海市农业科学院生物技术研究中心,上海 201106)

摘要:为给转基因植物监测提供技术支持,建立了转基因“华番一号”番茄筛选和特异性的定性、定量 PCR 检测方法。转基因“华番一号”的筛选 PCR 检测主要以转基因通用元件 *CaMV35S* 启动子和 *NOS* 终止子为目的基因片段,特异性 PCR 检测以转基因外源重组子的 *CaMV35S* 启动子和反义 *EFE* 基因的相邻序列为目的片段;实验同时设立番茄的 *LAT52* 基因为转基因番茄定性、定量 PCR 检测的内对照基因。在所建立的 PCR 检测体系中,定性 PCR 筛选和特异性检测的检测极限为 68 个拷贝,实时定量 PCR 方法的检测极限为 3 个拷贝;筛选定量 PCR 检测的定量极限为 3 个拷贝,特异性定量 PCR 检测的定量极限为 25 个拷贝。最后通过对 2 个已知含量的转基因番茄“华番一号”混合试样的检测,证明了该体系可以有效地用于转基因番茄“华番一号”的筛选和特异性的定性、定量 PCR 检测。

关键词:植物,转基因,转基因“华番一号”番茄,聚合酶链反应,遗传筛选

Screening and construct specific detection of transgenic BIOSCIEN tomato by conventional and real-time PCR

YANG Li-tao, ZHAO Zhi-hui, SHEN Hui-feng, PAN Ai-hu, ZHANG Da-bing

(Department of Biological Science and Technology, Nanjing University, Jiangsu Nanjing 210093, China)

Abstract: Genetically modified (GM) tomatoes have been approved for commercialization in many countries since the first GM tomato FLAVR AVAR was permitted for planting in 1994. In China, GM tomato BIOSCIEN with a character of long shelf-life was the first GM plant approved for commercialization in 1996. To meet the requirement of GM tomatoes labeling policy that has been actualized in China since 2001, the screening and construct specific PCR detection for detecting the universal elements transformed into tomato, such as Cauli-

- | | |
|---|---|
| <p>[2] Vaitilgöm M, Pijneburg H, Norman W Schaad, et al. Real-time quantitative PCR detection of genetically modified maximizer maize and roundup ready soybean in some representative Foods [J]. J Agric FoodChem, 1999, 47: 5261-5266.</p> <p>[3] 郑文杰, 刘^图, 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.</p> <p>[4] Hideo Kuribara, Yoichiro Shindo, Akihiro Hino, et al.</p> | <p>Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and soybean [J]. Journal of AOAC International, 2002, 85 (5): 1077-1089.</p> <p>[5] Heather Hird, Joanne Powell, Mari-Louise, et al. Determination of percentage of Round up soya in soya flour using real-time polymerase chain reaction: Interlaboratory study [J]. Journal of AOAC International, 2003, 86 (1): 66-71.</p> |
|---|---|

[收稿日期: 2004 - 12 - 16]

中图分类号: R15; Q343.1; S52 文献标识码: A 文章编号: 1004 - 8456 (2005) 02 - 0123 - 04

基金项目: 上海市科学技术委员会科研计划项目 (03ZD19307); 国家研究与开发专项 (JY03-B-20)。

作者简介: 杨立桃 男 博士

通讯作者: 张大兵 男 教授

This work was supported by the Science and Technology Plan of Shanghai (03ZD19307) and Research and Development of Special Subject of Nation (JY03 - B - 20), China.