

利用 PCR 方法检测转 BT 基因水稻

邓鸿铃, 郭新东, 吴玉銮

(广州市产品质量监督检验所, 广东 广州 510110)

摘要: 应用 PCR 技术进行转基因水稻检测研究。本文以转基因水稻为材料, 以聚合酶链式反应 (PCR) 方法为基础, 选择适用于转基因食品安全性检验的核酸检测技术, 针对转基因水稻中普遍存在的花椰菜花叶病毒 (CaMV35S) 启动子、胭脂碱合成酶 (NOS) 终止子、和转入苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称为 Bt) 基因水稻的 Cry1Ac 片段进行 PCR 检测, 建立适合转 BT 基因水稻的检测方法。该方法简便快速、检测结果与标准及其他文献资料相符。

关键词: Bt 转基因水稻; 聚合酶链式反应; PCR 检测

中图分类号: TS207.3; **文献标识码:** A; **文章编号:** 1673-9078(2007)04-0071-04

Detection of BT Transgenic Rice Gene by Polymerase Chain Reaction

DENG Hong-ling, GUO Xin-dong, WU Yu-luan

(Guangzhou Products Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou 510110, China)

Abstract: Polymerase Chain Reaction (PCR), an important method for the identification of genomic modified foods (GMF), was developed for detection of the BT transgenic rice gene. Using this method, 35S-promoter gene, NOS-terminator gene, and cry1Ac gene that commonly existed in transgenic rice were detected. Moreover, new methods based on PCR techniques were established for distinguishing BT Transgenic Rice from the counterpart of non-GM products and the detection system and for correlating the marked genes and transgenic. The method was easy and fast, and the corresponding results were in accord with the standard or the reported data.

Key word: Bt Transgenic Rice; Polymerase Chain Reaction; PCR detection

近年来, 随着转基因生物及其产品 (GMOs) 的广泛影响, 许多国家纷纷出台了针对 GMOs 的管理措施, 为配合这些措施的有效实施, 急需建立规范的检测技术。目前, GMOs 检测技术的建立在国内外相关领域形成一个热点^[5]。

转基因技术使开发农作物新品种的时间大为缩短, 研究人员利用转基因技术培育出了抗除草剂、抗干旱、耐盐碱、抗重金属和抗病虫害、营养价值高的品种, 这对于提高粮食产量、减少收获后损失以及增加农产品营养价值具有重要作用, 现在有 28 种转基因作物已经被批准或即将被批准进入市场^[4]。同时, 转基因安全性问题, 引起了人们的极大关注, 主要集中在环境安全性和食品安全性两方面。本文就针对近年来转基因水稻安全问题进行研究, 选择合适检测的方法进行探讨, 找到适宜的检测方法。

现在, 对市面上食品中的转基因成分 (GMOs) 的检测大都采用 PCR 方法^[2]。由于 Bt 水稻基因中含有 CaMV35S 启动子、NOS 终止子^[2]和 Cry1Ac 基因^[10], 因此, 在检测水稻中是否含有转基因水稻成分时, 可选择检测 CaMV35S 启动子、NOS 终止子和 Cry1Ac

基因的存在与否, 如果存在, 即可说明其中存在转基因水稻成分。

1 材料和方法

样品: 含有 CaMV35S 启动子、NOS 终止子和 Cry1Ac 基因的质粒 (阳性对照), 从研究机构得到的转基因水稻, 在市场上检测到的转基因水稻及其加工成的产品米粉, 市场上购的阴性水稻 (阴性对照)。

试剂: CTAB 提取液, 氯仿与异戊醇 (1:24 ml/ml) 混合液, TE 溶液, Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA), DNA 聚合酶 (TAKARA, 大连), 10 倍 PCR 反应液, dNTP 溶液。

仪器: 离心机, 恒温水浴, 核酸蛋白分析仪, 微量移液器, PCR 仪 (MJ PTC-200, USA), 凝胶成像分析系统 (BIO-RAD)。

1.1 DNA 的提取

分别称取样品 100 mg, 加入到不同的 1.5 ml 的离心管中, 同时设立试剂提取空白, 每个管中加入 1ml 的 CTAB 提取液 (20 mg/L CTAB、100 nmol/L Tris·Cl、20 mmol/L EDTA、1.4 mol/L NaCl), 混匀, 65 °C 水浴 30 min, 在水浴中, 混匀 3 次; 水浴后, 13000 r/min

离心 15 min, 将上清液转入到新的 1.5 ml 的离心管中, 再加入等体积的氯仿-异戊醇混合液 ($v_{\text{氯仿}}:v_{\text{异戊醇}}=1:24$) 的, 轻轻混匀, 13000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 干燥, 用 100 μL TE 缓冲液溶解沉淀。用 Promega 公司的 Preps DNA Purification System 对提取出的基因组

DNA 进行纯化, 最后得到 50 μL 的 DNA 溶液, 保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ [4]。

1.2 PCR 扩增

1.2.1 本文所用引物委托英骏生物技术有限公司合成, 见表 1。

表 1 引物序列^[4]

基因	正向引物	反向引物	PCR 产物 (bp)
CaMV35S	5'-GCT CCT ACA AAT GCC ATC A-3'	5'-GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA-3'	195
NOS	5'-ATC GTT CAA ACA TTT GGC A-3'	5'-ATT GCG GGA CTC TAA TCA TA-3'	165
Cry1Ac	5'-GAA GGT TTG AGC AAT CTC TAC-3'	5'-CGA TCA GCC TAG TAA GGT CGT-3'	301
tRNA ^{Leu}	5'-CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG-3'	5'-TTC CAT TGA GTC TCT GCA CCT-3'	180

1.2.2 配置反应体系 (25 μL): 无菌水、10 倍无 Mg^{2+} 的缓冲液、 MgCl_2 2.5 mmol/L、dNTP 0.25 mmol/L、Taq 酶、引物 100 mmol/L 和 DNA 模板 100~200 ng, 并设置提取空白对照 (以水代替样品), PCR 反应试剂空白对照 (以水代替 DNA 模板)、阴性对照和阳性对照。

1.2.3 CaMV35S 启动子, NOS 终止子 PCR 反应液、及 Cry1Ac 基因和植物叶绿体内源参照基因检测时的 PCR 反应液的配置方法相同, 只是 PCR 扩增条件不同。见表 2。

表 2 PCR 检测的反应条件

基因	变性	扩增	循环数	后延伸
CaMV35S	94 $^{\circ}\text{C}/5\text{ min}$	94 $^{\circ}\text{C}/30\text{ s}$	40	72 $^{\circ}\text{C}/7\text{ min}$
NOS		54 $^{\circ}\text{C}/40\text{ s}$ 72 $^{\circ}\text{C}/60\text{ s}$		
Cry1Ac	94 $^{\circ}\text{C}/5\text{ min}$	94 $^{\circ}\text{C}/30\text{ s}$	40	72 $^{\circ}\text{C}/10\text{ min}$
		60 $^{\circ}\text{C}/30\text{ s}$ 72 $^{\circ}\text{C}/60\text{ s}$		
tRNA ^{Leu}	94 $^{\circ}\text{C}/5\text{ min}$	94 $^{\circ}\text{C}/30\text{ s}$	40	72 $^{\circ}\text{C}/7\text{ min}$
		54 $^{\circ}\text{C}/40\text{ s}$ 72 $^{\circ}\text{C}/60\text{ s}$		

1.2.4 PCR 结束后, 各取 10 μL 的 PCR 产物, 加入 2 μL 的溴酚蓝, 混匀, 利用琼脂糖凝胶 (20 mg/L) 进行电泳检测, 电泳结果利用凝胶成像分析仪进行观察。

1.3 为了判断所检测的样品提取的 DNA 是否正常, 对水稻的植物叶绿体内源参照基因进行检测, 以确定所检测样品提取的 DNA 是否正常可用。这里使用的内源参照基因为 tRNA^{Leu} 基因, 如果能检测到 tRNA^{Leu} 基因, 可说明所提取的 DNA 是正常可用的。

2 结果

2.1 CaMV35S 启动子是一段长 195 bp 的碱基序列, 如图 1 所示, 经过 PCR 扩增后, 在凝胶电泳检测中, 其条带位置在 200 bp 左右。实验结果表明, 只有阳性质粒和转基因水稻、及其以转基因水稻加工成的米粉中出现条带, 而阴性水稻没有条带, 其他提取空白对

照、PCR 反应试剂空白对照均未见有条带, 从而保证结果的可靠性, 亦表明本实验的引物可特异性的检测转基因水稻 CaMV35S 启动子的成分。

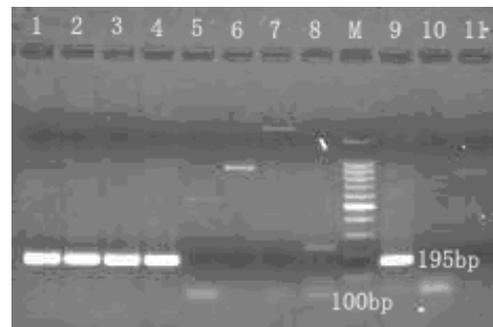


图 1 转基因水稻 CaMV35S 启动子的 PCR 扩增结果

其中 1,2: 转基因水稻; 3: 市场上的转基因水稻; 4: 以转基因水稻加工成的米粉; 5,6,7,8: 阴性水稻; M: DNA Maker (100 bp) Ladder; 9: 阳性质粒; 10: 提取空白对照; 11: PCR 反应试剂空白对照。

2.2 NOS 终止子是一段长 165 bp 的碱基序列, 如图 2 所示, 经过 PCR 扩增后, 在凝胶电泳检测中, 其条带位置在 100 bp 至 200 bp 中间位置。

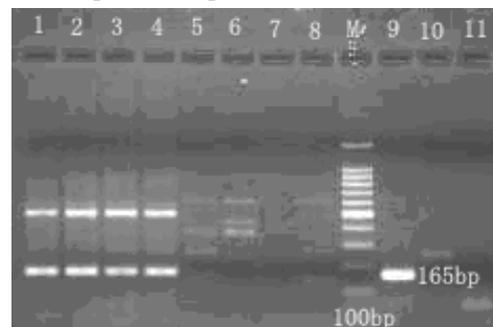


图 2 转基因水稻 NOS 终止子的 PCR 扩增结果

其中 1, 2: 转基因水稻; 3: 市场上的转基因水稻; 4: 以转基因水稻加工成的米粉; 5, 6, 7, 8: 阴性水稻; M: DNA Maker (100 bp) Ladder; 9: 阳性质粒; 10: 提取空白对照; 11: PCR 反应试剂空白对照。

结果表明只有阳性质粒和转基因水稻、及其以转

基因水稻加工成的米粉中出现条带，而阴性水稻没有条带，其他提取空白对照、PCR 反应试剂空白对照均未见条带，从而保证结果的可靠性，亦表明本实验的引物可特异性的检测转基因水稻 NOS 终止子的成分。

2.3 Cry1Ac 基因是一段长 301 bp 的碱基序列，如图 3 所示，经过 PCR 扩增后，在凝胶电泳检测中，其条带位置在 300 bp 左右。实验结果表明，只有阳性质粒和转基因水稻、及其以转基因水稻加工成的米粉中出现条带，而阴性水稻没有条带，其他提取空白对照、PCR 反应试剂空白对照均未见有条带，从而保证结果的可靠性，亦表明本实验的引物可特异性的检测转基因水稻 Cry1Ac 基因的成分。

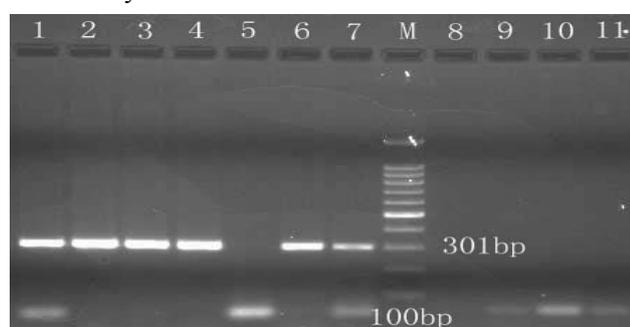


图 3 转基因水稻 Cry1Ac 基因的 PCR 扩增结果

其中 1,2: 转基因水稻; 3: 市场上的转基因水稻; 4: 以转基因水稻加工成的米粉; 5: PCR 反应试剂空白对照; 6,7: 阳性质粒; M: DNA Maker(100bp)Ladder; 8,9,10,11: 阴性水稻。

2.4 tRNA^{Leu} 植物叶绿体内源参照基因是一段长 180bp 的碱基序列，如图 4，经 PCR 扩增后，在凝胶电泳检测中，其条带位置在 200 bp 左右。实验结果表明，阳性质粒和转基因水稻，阴性水稻出现条带，而阴性对照，PCR 反应试剂空白对照均未见有条带，从而保证结果的可靠性，亦表明本实验的引物可特异性的检测水稻 tRNA^{Leu} 植物叶绿体内源参照基因的成分。

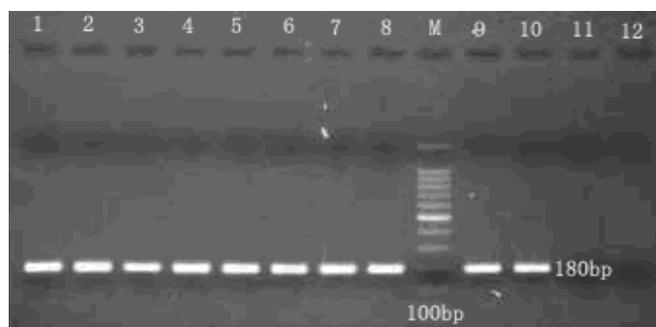


图 4 tRNA^{Leu} 植物叶绿体内源参照基因内源基因的 PCR 扩增结果

其中 1,2: 转基因水稻; 3: 来自市场上的转基因水稻; 4: 以转基因水稻加工成的米粉; 5,6,7,8: 阴性水稻; M: DNA Maker (100 bp) Ladder; 9,10: 阳性质粒; 11: 阴性对照; 12: PCR 反应试剂空白对照。

3 讨论

转 Bt 水稻是目前国际国内研究的转基因产品之一。在国内，它已经农业部批准进入环境释放。目前国内还没有建立这类转基因水稻产品的国家标准检测方法。对水稻中是否含有转基因水稻成分进行检测可以从以下几个步骤进行：(1) 提取水稻基因组 DNA；(2) 利用特异性的引物对插入的 CaMV35S 启动子、NOS 终止子、以及目的基因或标记基因进行扩增；(3) 对水稻中的 tRNA^{Leu} 植物叶绿体内源参照基因进行扩增以确定所提取的 DNA 是否正常可用；(4) 利用琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行确认；(5) 对 PCR 产物进行测序，确证实验结果的准确可靠。

3.1 DNA 的提取

DNA 的提取是此检测方法中的关键的一步，它的效率高低决定着后面 PCR 的成功与否^[4]。CTAB 方法已经广泛应用于各类植物及加工食品的核酸提取的检测中^[3,4]。食品中存在的大量淀粉、蛋白及其他形式的多糖等，有可能是 DNA 聚合酶的抑制剂。因此，将食品的基因组 DNA 提取出来以后，可采用 Promega 公司的植物基因组 DNA 纯化试剂盒进行纯化^[4]。

3.2 PCR

PCR 是一种 DNA 的体外扩增技术，其特异性是由人工合成的引物决定的。利用整合在植株基因组中的外源基因是要以被检植株 DNA 为模板，以外源基因 5'序列和 3'端互补为引物进行扩增，然后用琼脂糖凝胶电泳分离扩增产物，若可得到特异性的扩增条带，则表明被检植株基因组 DNA 中含有外源基因，否则为阴性结果。PCR，是整个程序中的一个必要的部分，PCR 方法已经比较成熟，已常规应用于分子生物学中，并且越来越多的应用于食品分析检测中^[11]。但每一种检测转基因食品的方法都需要考虑一些特殊的情况，如从食品中提取 DNA 的效率，可能存在的 PCR 抑制剂，DNA 的降解，可能存在的 RNA，以及选择合适的靶序列的引物来保证扩增的成功等^[4]。这些因素都可能影响到 PCR 的进行和效果，因此，在进行 DNA 提取时，充分考虑到这些因素，尽力避免了他们的发生。在实验过程中，PCR 的污染及条件的重复性是实验判定结果的关键。每一次实验均需要设有阴性及阳性对照以确保实验结果可靠性。在样品采集及处理过程中也需要注意防止污染^[3]。

3.3 CaMV35S 启动子、NOS 终止子和 Cry1Ac 基因

CaMV35S 启动子来自于花椰菜病毒，NOS 终止子来自于土壤杆菌属的胭脂氨酸合酶基因，Cry1Ac

基因来自苏云金杆菌(Bt)内毒素特异性基因序列^[10]。许多转基因作物都采用 CaMV35S 启动子来促进转入基因片段的表达,而采用 NOS 终止子来结束转入基因的转录,而进行检测的 PCR 方法也是基于这两段基因。本文所采用的转基因水稻含有 CaMV35S 启动子、NOS 终止子和 Cry1Ac 基因。

3.4 对 PCR 产物进行测序

对 PCR 产物进行测序,是最直接有效的证明 PCR 结果的准确性。本实验得到的 PCR 产物进行序列测定的结果与原先的序列相符。

上面所描述的方法可以作为检测转基因抗虫水稻。在这种方法中,DNA 的提取是关键,PCR 的成功与否关系到整个实验的准确性。核酸检测能为转基因水稻的筛选鉴定及为安全性评价提供直接的数据,成为转基因水稻安全性检验中一项重要的技术手段。

参考文献

- [1] Sambrook J, Fritsch EF, Mains T. 分子克隆实验指南[M]. 金东雁,黎孟枫译.北京:科学出版社,1989
- [2] 覃文,董洁,邓鸿铃.食用油脂中转基因成分的检测[J].中国油脂,2002
- [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.卫生研究,2002,31(1):37-40
- [4] 邓鸿铃.利用 PCR 方法检测转基因大豆加工食品中的修饰基因[J].现代食品科技,21(1):111-114
- [5] 陈茹,林志雄等.应用地高辛标记的 PCR-ELISA 技术快速检测转基因水稻[J].中山大学学报,2003,42(2):78-81
- [6] 杨杰,仲维功,陈志德等.转基因抗虫水稻的研究进展[J].江西农业大学报,1999,11(3):48-53
- [7] 蒋家焕,郭奕明等.转基因水稻的研究和应用[J].植物学报,2003,20(6):736-744
- [8] 姚方印,朱常香等.Bt 水稻的抗虫性鉴定及转基因的遗传分析[J].中国农业科学,2002,35(2):142-145
- [9] 皮烂辉,易自力.水稻抗虫基因工程研究进展[J].生物技术通报,2002,(4):12-15
- [10] 杨虹,李家新等.苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素基因导入水稻原生质体后获得转基因植株[J].中国农业科学,1989,22(6):1-5
- [11] 毛德倩,等.利用聚合酶链式反应方法检测转基因大豆和玉米中的基因修饰物质[J].卫生研究,2002,31(3):184-187
- [12] 覃文等.食品中转基因成分的检测[J].食品科学,2001,22(7):59-62
- [13] Heiko S, Consumers' concerns about genetically modified organisms in the food chain. Joint conference on genetically modified organisms in the food chain, Munich: AOACI Europesection, 2000: 19-21
- [14] Van Hoef AMA, Aarts HJM, Kuiper HA, et al. Development and application of DNA microarray technology for the detection of genetically modified organisms, joint conference on genetically modified organisms in the food chain, Munich: AOACI Europesection, 2000: 29-33
- [15] Cao J, Duan X, McElory D, Wu R, Regeneration of herbicide resistant transgenic rice plants following microprojectiles mediated transformation of suspension culture cell. Plant cell Rep, 1992, 11: 586-591
- [16] Huang D N, Li J Y, Xiao H, Studies on the inheritance of transgenic rice with bar gene. CRR Newsletter, 1997, 5:2-3
- [17] Cheng X Y, Sardana X, Kaplan R, Altosaar H, Agrobacterium transformed rice plants expressing synthetic cry1A(b) and cry1a(c) genes are highly toxic to striped stem borer. Proc Nat Acad Sci USA, 1998,95:2767~2772
- [18] Fujimoto H, Itoh K, et al. Insect resistant rice generated by introduction of a modified δ -endotoxin gene of Bacillus thuringiensis [J]. Bio/Technology, 1993, 11:1151-1155.
- [19] Pefereon M. Progress and prospects for field use of Bt. Genes in crops [J]. Trends in Biotechnology, 1997,15(5):173-177

(上接第 59 页)

3 结论

Flavourzyme 的酶底比对总氮回收率的影响显著;豆粕蛋白的双酶复合水解的最佳条件为:木瓜蛋白酶的酶底比为 900 U/g、Flavourzyme 的酶底比为 1200 U/g、Flavourzyme 的作用时间为 14.5 h、总时间为 16 h、底物浓度为 2%;豆粕蛋白的总氮回收率为 59.21%。

参考文献

- [1] Yi-Fang G, et al. Characterization of the aroma of a meatlike process flavoring from soybean-based enzyme-hydrolyzed vegetable protein[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50: 2900-2907
- [2] 邓尚贵,章超华,李萍萍,蔡子浪.酶法制造出口蚝汁的加工工艺.食品科技,1999(3):24-25
- [3] 张承龙.农业废弃物资源化利用技术现状及其前景.农业废物利用,2000(2):14-16