

食品中转基因成分的 PCR 筛选检测方法

王炳武 徐宝梁 白双义 刘 博 苏 宁

(中国进出口商品检验技术研究所,北京,100025)

摘 要 对 3 种常用食品中转基因成分筛选检测方法的灵敏度及特异性进行了研究。试验结果表明,35S 筛选方法的理论检测低限达 15copies, NPT II 筛选方法的理论检测低限达 50copies, NOS 筛选方法的理论检测低限达 150copies。在不含转基因成分的材料中均未检测到以上 3 个片段。

关键词 转基因 筛选检测 检测低限 特异性

伴随着生物技术的发展,转基因生物产品的品种及产量迅速增加,大量的转基因作物投入了商业化生产。据国际农业生物技术应用咨询服务中心(ISA)统计,2001 年全球转基因作物种植面积为 5260 万 km²,已批准商业化的转基因作物有大豆、玉米等几十种。随着转基因作物商业化生产的不断发展,大量的转基因产品被制造成食品进入人们的食物链。据估计,用这些转基因作物生产加工的食品全世界有近万种。由此引发的转基因食品潜在安全性问题引起世界各国的关注^[1]。许多国家制定相应的规章制度,我国于 2001 年 5 月 9 日公布并实施《农业转基因生物安全管理条件》,并于 2002 年 1 月 5 日公布了农业转基因生物安全评价、标识和进口管理 3 个配套管理办法。

食品中转基因成分的检测有多种方法,主要是免疫学方法及分子生物学方法^[3~5],其中基于 PCR 方法的分子生物学方法更适合于食品中转基因成分的检测^[6]。

食品中的转基因成分绝大部分利用 CaMV35S 作为启动子、NOS 作为终止子、NPT II 作为筛选标记基因,占 90% 以上^[7]。一般的检测原则是:先检测食品中是否含有 CaMV35S 启动子、NOS 终止子、NPT II 基因,然后根据其中不同的组分检测可能含有的目的基因^[3,8]。利用定性 PCR 方法建立转基因产品检测方法的国内外文献报道较多^[9~13],对检测方法的灵敏度的研究则较少,Sabin Vollenhofer 等人从

GMO 的质量百分含量的角度探讨了灵敏度问题^[11~13],Jankiewicz 等人提出了“理论灵敏度”、“实际灵敏度”的概念,并从 GMO 的百分含量及 DNA 的绝对质量 2 个方面对灵敏度进行了初步的研究^[14]。

本文利用质粒 pE3 作为扩增模板,探讨了 3 种常用的筛选检测方法的理论检测低限,并对检测方法的特异性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

转基因大豆标准品、转基因玉米标准品(Mon810、Bt176)(购自 Fluka 公司)、国产大豆、国产玉米、国产油菜籽、国产番茄、国产马铃薯、转基因马铃薯(山东出入境检验检疫局赠)、转基因番茄、质粒 pE3(含有 35S 启动子、NOS 终止子、NPT II 基因)。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、琼脂糖、分子量 Marker 100 bp DNA ladder(100~600bp)均购自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)。

1.3 DNA 的提取

利用 Wizard Genomic DNA Purification Kit(Promage 公司)提取样品 DNA,利用 UNIQ-10Colume Plasmid Minipreps Kit(上海生工生物

第一作者 硕士、工程师(徐宝梁为通讯作者)。

收稿时间 2003-06-30,改回时间 2003-12-10

工程有限公司)提取质粒,实验操作按试剂盒说明书进行。

1.4 理论检测低限的测定

1.4.1 PCR 引物

所有引物由上海生工生物工程有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1

被检测基因	引物序列	扩增片断大小(bp)
CaMV35S	P1 5'-tca tcc ctt acg tca gtg gag-3'	165
	P2 5'-cca tca ttg cga taa agg aaa-3'	
NOS	P1 5'-atc gtt caa aca ttt ggc a-3'	165
	P2 5'-att gcg gga ctc taa tca ta-3'	
NPT II	P1 5'-gga tct cct gtc atc ct-3'	173
	P2 5'-gat cat cct gat cga c-3'	

1.4.2 质粒拷贝数测定

按以下公式计算：

质粒拷贝数 = 质粒质量(g) / (质粒碱基对数 × 碱基对平均分子质量) × 6.02 × 10²³

1.4.3 PCR 反应

反应体系 50 μL:10 × PCR buffer 5 μL; dNTH(各 2.5 mmol/L)1 μL;引物(20 mmol/L)各 1 μL;Taq 酶(2 U/μL)1 μL;质粒 pE3 模板 DNA 5 μL;加 ddH₂O36 μL。35S、NOS、NPT II 的 PCR 扩增反应体系相同。

PCR 反应程序 (1)94℃ 预变性 5 min (2)94℃ 变性 30 s 54~55℃ 退火 30 s 72℃ 延伸 60 s 40 个循环 (3)72℃ 延伸 10 min。

35S、NOS、NPT II 的退火温度分别为 55、55、54℃。

1.5 特异性试验

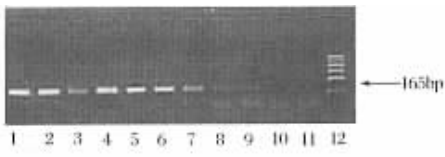
反应体系 50 μL:10 × PCR buffer 5 μL; dNTH(各 2.5 mmol/L)1 μL;引物(20 mmol/L)各 1 μL;Taq 酶(2U/μL)1 μL;模板 DNA 0.5~1 μg;加 ddH₂O 补齐 50 μL。35S、NOS、NPT II 的 PCR 扩增反应体系相同。

PCR 反应程序 (1)94℃ 预变性 5 min (2)94℃ 变性 30 s 54~55℃ 退火 30 s 72℃ 延伸 60 s 40 个循环 (3)72℃ 延伸 10 min。

35S、NOS、NPT II 的退火温度分别为 55、55、54℃。

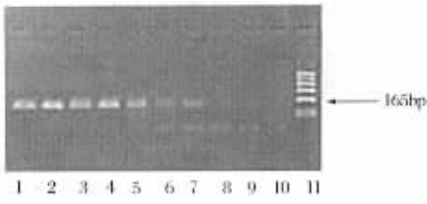
2 试验结果

2.1 理论低限检测结果



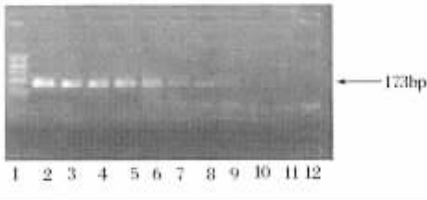
1 5.78 × 10⁶copies 2~11, 按 5 倍梯度稀释 ;12 Marker(100~600bp)

图 1 35S 灵敏度检测电泳图



1 2.3 × 10⁶copies 2~10, 按 5 倍梯度稀释 ;11 Marker(100~600bp)

图 2 NOS 灵敏度检测电泳图



1 Marker(100~600bp); 2 3.8 × 10⁶copies 3~12 按 5 倍梯度稀释。

图 3 NPT II 灵敏度电泳图

图 1 显示质粒模板从 5.78 × 10⁶copies 按 5 倍稀释至第 8 个梯度时(约 15copies),仍能从电泳图上清晰看到 PCR 产物。

图 2 显示质粒模板从 2.3 × 10⁶copies 按 5 倍稀释至第 6 个梯度时(约 150copies),能被检出。

图 3 显示质粒模板从 3.8 × 10⁶copies 按 5 倍稀释至第 7 个梯度时(约 50copies),仍能从电泳图上被分辨出。

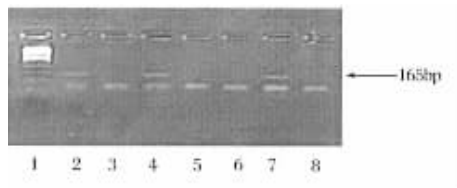
2.2 特异性试验结果

图 4~图 6 的试验结果表明,在分别含有 35S、NOS、NPT II 的试验材料中都检出相应转基因成分。而在不含有转基因成分的国产玉米、



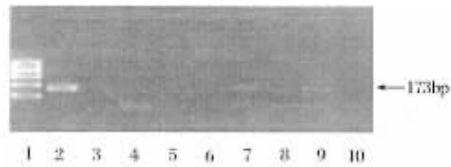
1, Marker(100~600bp) ;2, 5% 转基因大豆标准品 ;3, 0% 转基因大豆标准品 ;4, 国产大豆 ;5, 2% Bt176 玉米标准品 ;6, 国产玉米 ;7, 5% Mon810 玉米标准品 ;8, 空白对照。

图 4 35S 特异性试验电泳图



1, Marker(100~600bp) ;2, 5% 转基因大豆 ;3, 0% 转基因大豆标准品 ;4, 转基因土豆 ;5, 国产大豆 ;6, 国产玉米 ;7, 5% Mon810 玉米标准品 ;8, 空白对照。

图 5 NOS 特异性试验电泳图



1, Marker(100~600bp) ;2, pE3 质粒 ;3, 国产大豆 ;4, 国产玉米 ;5, 国产油菜籽 ;6, 国产马铃薯 ;7, 转基因马铃薯 ;8, 国产番茄 ;9, 转基因番茄 ;10, 空白对照。

图 6 NPT II 特异性试验电泳图

大豆、马铃薯、番茄及 0% 转基因玉米、大豆中都没有检测出转基因成分。说明该 3 种筛选方法特异性很强。

3 讨论

(1)粗加工食品成分复杂 ,大都经过一系列的粉碎、高温、发酵、加入化学物质等过程 ,其 DNA 受到不同程度的破坏 ,提取到的 DNA 模板含量、质量、检测方法的灵敏度及产物检测的方法都是影响检测结果的因素 ,其中检测方法灵敏度是关键因素。本试验结果表明 ,该 3 种筛选方法的理论检测灵敏度较高。

(2)本研究没有选择“ DNA 绝对质量 ”来研究筛选方法的检测灵敏度 ,而是直接利用包含有 35S 启动子、NOS 终止子和 NPT II 基因的质粒来测定灵敏度 ,排除了 DNA 背景可能带来的干扰。

(3)本研究中 35S 筛选检测方法的理论检测下限明显高于 NOS ,这与其他有关文献报道中的实验结果一致^[3, 15]。推测这可能与它们 DNA 一级结构的碱基构成有关 ,35S 启动子比 NOS 终止子在序列中更加容易找到相互匹配的引物而容易被扩增 ,也可能与它们在 PCR 扩增的退火过程中可能形成的高级结构有关。

(4)理论检测下限反映该方法的检测能力 ,对实际检测有一定的指导意义 ,实际检测灵敏度则受 DNA 质量、PCR 反应抑止剂等诸多因素的影响。

(5)研究表明 ,35S 启动子、NOS 终止子、NPT II 基因筛选检测的特异性强 ,通过检测 ,可初步确定食品中是否含有转基因成分。若筛选结果阴性 ,可以初步判定不含有该转基因成分 ,若筛选结果阳性 ,则需进一步检测目的基因 ,因为 35S 启动子、NOS 终止子及 NPT II 基因存在于一些细菌及病毒中 ,如待检食品受到污染 ,则检测结果不准确 ,需进一步确证 ,以排除假阳性结果。

参 考 文 献

- 1 刘 谦 ,朱鑫泉 . 生物安全[M]. 北京 :科学出版社 2001. 228~238
- 2 Farid E A. Detection of Genetically Modified Organisms in Foods[J]. Trends in Biotechnology ,2002 ,5 : 215~223
- 3 Kuiper H A. Summary Report of the ILSI Europe Workshop on Detection Methods for Novel Foods Derived from Genetically Modified Organisms[J]. Food Control ,1999 ,10 339~349
- 4 Golf Meyer. Development and Application of DNA Analytical Methods for the Detection of GMOs in Food[J]. Food Control ,1999 ,10 391~399
- 5 James W S. Detection of New or Modified Proteins in Novel Foods Derived from GMO-future Needs[J]. Food Control ,1999 ,10 367~374

- 6 Gachet E ,Martin G G. 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
- 7 潘良文 . 转基因抗草甘膦油菜籽中 FMV35S 启动子的检测研究[J]. 上海检验检疫科技 ,2001 2 2~6
- 8 Hardegger M ,Brodmann P ,Herrmann A. Quantitative Detection of the 35S Promoter and the NOS Terminator Using Quantitative competitive PCR[J].Eur Food Res Techno ,1999 209 83~87
- 9 Zimmermann A ,Liniger M. A Sensitive Detection Method for Genetically Modified MaisGard™ Corn Using a Nested PCR-system[J].Lebensm-Wiss u.-Technol ,1998 31 661~667
- 10 Nobuaki Shirai ,Keiko Momma. Safety Assessment of Genetically Engineered Food :Detection and Monitoring of Glyphosate-Tolerant Soybeans Biosci[J].Biotechnol Biochem ,1998 62 1461~1464
- 11 Van Hoef M A ,Kok E J. Development and Application of a Selective Detection Method for Genetically Modified Soy and Soy-derived Products[J]. Food Additives and Contaminants ,1998 15 767~774
- 12 Carolyn D ,Hurst ,Angus K et al. PCR Detection of Genetically Modified Soya and Maize in Food Stuffs [J]. Molecular Breeding ,1999 5 579~586
- 13 Sabine Vollenhofer ,Kornel Burg , Genetically Modified Organism in Food-screening and Specific Detection by Polymerase Chain Reaction[J].J Agric Food Chem ,1999 47 5038~5043
- 14 Jankiewicz A ,Broll H. The Official Method for the Detection of Genetically Modified Soybeans(German Food Act LMBG § 35) :A Semi-quantitative Study of Sensitivity Limits with Glyphosate-Tolerant Soybeans (Roundup Ready)and Insect-resistant Bt maize(Maximizer) [J]. Eur Food Res Technol ,1999 209 77~82
- 15 Markus Lipp. IUPAC Collaborative Trial Study of a Method to Detect Genetically Modified Soybean and Maize in Dried Powders[J]. Journal of AOAC International ,1999 82 923~928

The Study on PCR Screening Methods for Detecting GMO in Food

Wang Bingwu Xu Baoliang Bai Shuangyi Liu Bo Su Ning

(China Import and Export Commodity Inspection Technology Institute , Beijing , 100025)

ABSTRACT This study was focused on the theoretical detection limit of three normally applied PCR screening methods in GMO detection. The results show that 15 copies are the theoretical detection limits of 35S screening methods 50 and 150copies are necessary for NPT II gene and NOS terminator detection. These 3 target DNA fragments were detected in the non-GMO samples.

Key words screening methods , GMO , detection limit , specificity

政策、法规、标准
美国反式脂肪酸含量要求标注

据悉 美国食品药品监督管理局正在修订营养标签方面的规定 ,要求在传统食品和膳食补充品的营养标签中 ,标注反式脂肪酸的含量。该规定将于 2006 年 1 月 1 日生效。

反式脂肪酸存在于常见的食物中 ,例如植物性奶油、马铃薯片、沙拉酱、饼干以及薯条等 ,这种物质也可以通过氢化过程合成。反式脂肪酸和饱和脂肪酸一样 ,都会提高人体胆固醇含量 ,特别是低密度脂蛋白胆固醇含量 ,会引起血管阻塞 ,从而明显提高心脏疾病以及肥胖的危险。以往一般食品包装上都被要求注明饱和脂肪酸含量 ,但一直没有注明反式脂肪酸含量的要求。

美国这一举措是应公共利益科学中心(CSPI)的请求而采取的 ,其目的在于提供信息以帮助消费者保持健康饮食。