

应用微芯片电泳仪 MultiNA

检测转基因食品的方案



1

前言

随着分子生物学技术的不断发展，转基因作物的研究和种植都在不断扩展，2013年中国的基因作物种植面积为420万公顷，位于全球第六名。另外，由于近年来国内市场的一些农作物，如玉米价格比较高昂，我国大量地从美国和阿根廷进口玉米，而这两个国家种植的玉米80%都是转基因产品。为了保护消费者的正当利益和健康，使消费者具有知情权和选择权，我国对部分的转基因产品实施的是零阈值管理标识制度，只要在规定的标识产品范围内，只要可能含有转基因成分，就必须进行标识管理。另外，随着转基因产品的不断增加，在国际进出口贸易中，一些输入国不仅要知道进口的产品是否含有转基因成分，而且还要查明该转基因成分来自哪个作物品种，该品种是否获准进入本国。因此针对某个转基因作物品种的定性检测技术的建立非常重要。综上，在转基因产品对人类身体

健康和环境是否绝对安全的定论得出之前，建立可靠灵敏便捷的转基因检测手段是非常必要的。

目前我国关于转基因检测的国家/行业标准方法主要有2种方法：普通PCR加电泳法、实时荧光PCR探针法。实时荧光PCR探针法虽有行标推荐，一步检测即可完成，自动化，污染风险低的优点，然而，进行转基因品种鉴定时，实时荧光PCR探针法需要逐一加入不同转基因品种对应探针来确定的转基因品种，操作繁琐，耗时长，效率低。另外，实时荧光PCR方法不能确定扩增产物的片段长度，有假阳性检测风险，探针设计复杂，需要技术和时间，初期投入和分析成本高，探针价格贵。因此，目前需要一种操作简单，成本低且快速准确地应对转基因食品检测的方案。

2

岛津解决方案概述

岛津对于转基因食品的检测是应用普通PCR加电泳法，国家转基因检测技术标准两个体系，即农业部系列和国家质检总局系列的标准方法中都有推荐使用普通PCR加电泳法。岛津的解决方案具体的是首先对样品进行总DNA提取，根据转基因特异性序列设计PCR引物，进行PCR反应，岛津微芯片电泳仪MultiNA检测PCR扩

增产物片段长度，依据是否获得特定长度的预期性DNA片段来判断转基因成分。应用本方法检测未知品系的转基因样品时，可以同时加入多种转基因品系的对应引物，根据MultiNA检测得到片段的长度，可一次性判断未知转基因的品系，简便、准确、快速地实现转基因多种品系的检测。

3

实验结果和讨论

图1-图5微芯片电泳MultiNA检测转基因玉米MON810、Bt176和Bt11的凝胶图和电泳图。图6、7是MultiNA检测转基因大豆356043的凝胶图和电泳图。实验结果显示玉米内源Zein和大豆内源大豆内源Lectin基因片段长度分别为196 bp和166 bp，与理论片段长度190 bp和162 bp基本一致，表明基因组被成功的提取出来

且PCR过程被顺利执行。对于玉米中转基因M810、Bt176和Bt11和大豆中转基因356043，实验结果显示检测出转基因片段与预期的片段基本相同，说明成功检测出转基因成分。阴性对照实验中没有检测到相关片段，表明无假阳性检出。

图1 微芯片电泳MultiNA对转基因玉米M810的检测

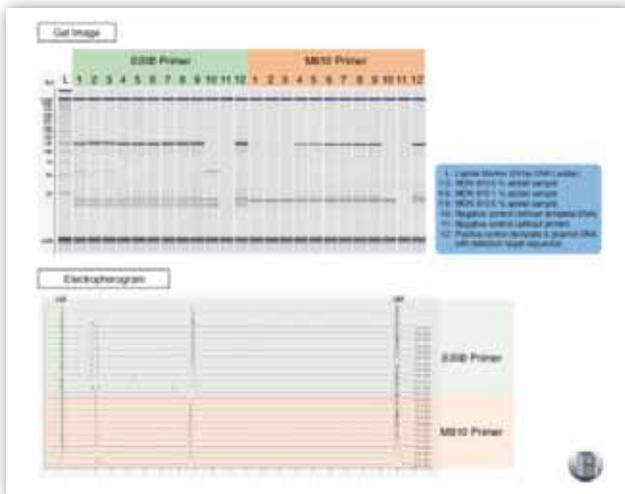


图3 MultiNA检测转基因玉米Bt-176电泳图 (NC: 阴性对照)

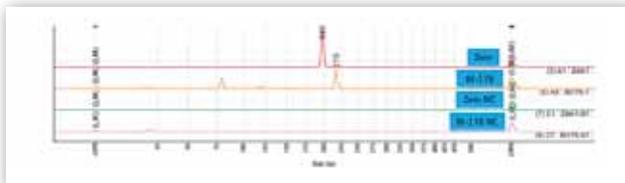


图5 MultiNA检测转基因玉米Bt-11电泳图 (NC: 阴性对照)

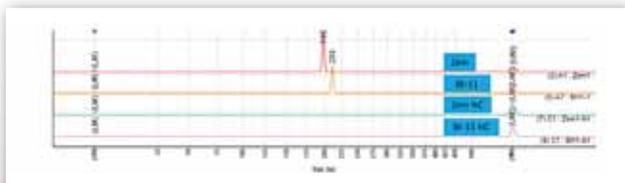


图2 MultiNA检测转基因玉米Bt-176凝胶图 (NC: 阴性对照)

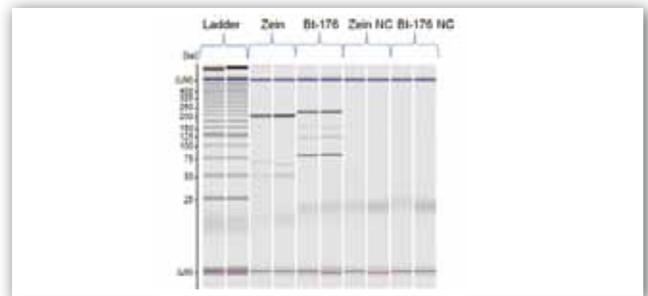


图4 MultiNA检测转基因玉米Bt-11凝胶图 (NC: 阴性对照)

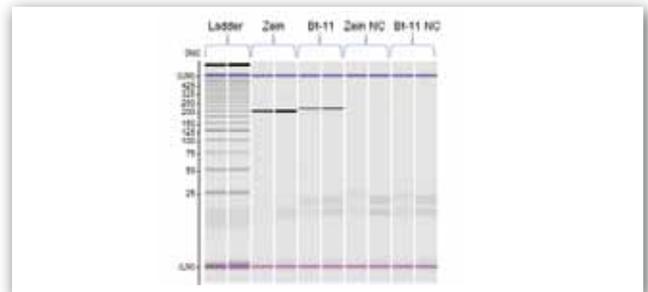
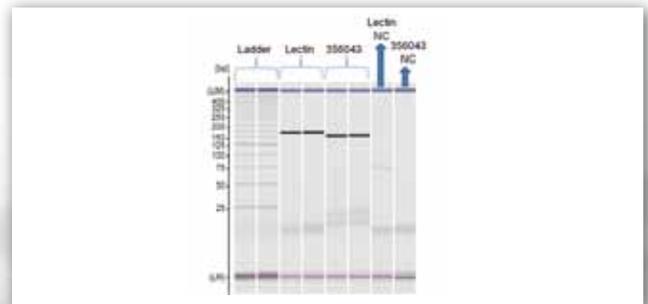


图6 MultiNA检测转基因大豆356043凝胶图 (NC: 阴性对照)



除了进行原料食品的转基因检测，岛津的解决方案还可以进行加工食品的转基因检测。图8是应用MultiNA分析4种玉米加工食品（2种罐装玉米，1种爆米花，1种玉米淀粉）PCR产物的结果。当针对内源基因SSIIb的引物被应用时，所有玉米加工食品及阳性对照质粒的PCR产物中SSIIb（151 bp）都被检测到。内源基因SSIIb是玉米的特异性基因，一旦内源基因被检测到，表明定性PCR被成功实施可以进行转基因的检测。由于加热过程可能造成DNA的破坏，内源基因可能不能在所有的加工食品样品中被检测到。因此，在此种情况下，定性PCR不适合检测转基因成分。另一方面，当针对转基因GA21的引物在PCR过程中被使用时，MultiNA检测结果显示只在阳性对照样品中检测到GA21基因（133 bp）。本实验的加工食品样品外包装都标注有非转基因，实验结果显示GA21没有被检测到。使用20个拷贝数的阳性对照质粒作为模板，内源基因SSIIb和外源基因GA21也可以被清晰地鉴别。

图7 MultiNA检测转基因大豆356043电泳图（NC：阴性对照）

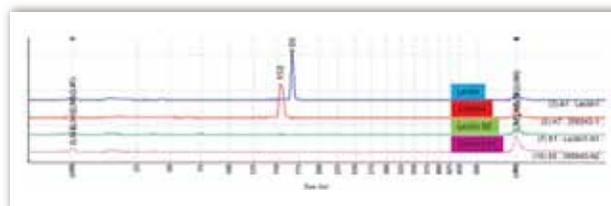
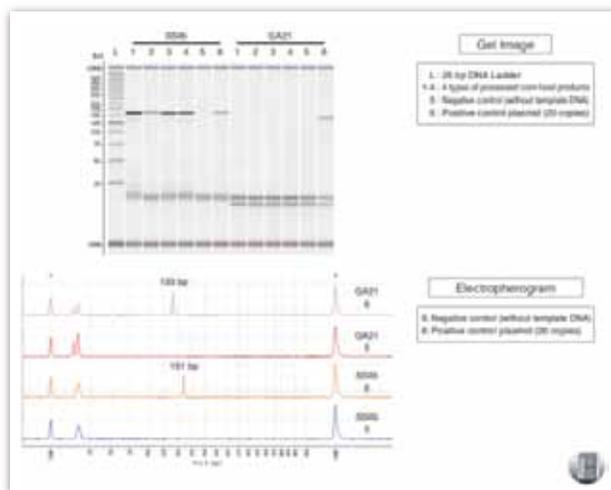


图8 MultiNA分析加工玉米食品PCR产物的结果



4

实验方法

4.1 试剂和样品

4.1 试剂和样品

植物基因提取试剂盒（北京勤邦生物技术有限公司）FZ-002
 SYBR® Premix Ex Taq™ II（宝生物工程（大连）有限公司）RR820A
 SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain（Invitrogen）S-11494
 1× TE Buffer
 25 bp DNA Ladder（Invitrogen）10597-011
 DNA-500 Reagent Kit for MultiNA（岛津制作所）292-27910-91

样品：欧洲标准物质玉米粉末，转基因玉米MON810含量0%（ERM-BF411a），转基因玉米MON810含量1%（ERM-BF411d），转基因玉米MON810含量5%（ERM-BF411f），含量5%转基因玉米Bt-176含量5%（ERM-BF411f），转基因玉米Bt-11含量4.89%（ERM-BF412f），转基因大豆356043含量10%（ERM-BF425d）。

4种玉米加工食品样品：2种罐装玉米，1种爆米花，1种玉米淀粉。
 引物：转基因玉米、大豆检测引物设计如表1所示。

表1 转基因玉米、大豆检测引物设计

检测基因	引物序列	PCR理论产物大小/bp
玉米内源Zein	5' -TGAACCCATGCATGCAGT-3'	190
	5' -GGCAAGACCATTGGTGA-3'	
转基因Bt-176	5' -GGCATGACGTGGGTTTCTGG-3'	210
	5' -AGAAGCTCCGTGGGCGTGGTAT-3'	
转基因Bt-11	5' -TATCATCGACTTCCATGACCA-3'	207
	5' -AGCCAGTTACCTTCGGAAAA-3'	
大豆内源Lectin	5' -CCTCCTCGGAAAGTTACAA-3'	162
	5' -GGGCATAGAAGGTGAAGTT-3'	
转基因356043	5' -CTTTTGCCCGAGGTCGTTAG-3'	145
	5' -GCCCTTGGTCTTCTGAGACTG-3'	

4.2 样品处理及PCR反应体系和条件

4.2.1 液氮研磨0.1 g左右的植物组织，将粉末转移到2 mL离心管中。

4.2.2 加入抽提液A 0.5 mL，混匀后65°C水浴1 h。

4.2.3 水浴后在管内加入抽提液B；抽提液C=1:1的混合液1 mL，充分混匀30秒后12000 rpm离心5 min。

4.2.4 吸取上层水相到新的2 mL离心管管内，加入2倍体积预冷的无水乙醇、10%体积的助沉剂1和4μL助沉剂2，充分混匀后于-20°C沉淀1小时。

4.2.5 沉淀后4°C、12000 rpm离心15 min，小心倒去上清液。此时在EP管底部可见白色沉淀物。

4.2.6 加入1 mL预冷的洗涤液，轻弹EP管混匀，4°C、12000 rpm离心5 min后，弃去上清液，倒扣EP管于滤纸上晾干。

4.2.7 在晾干后的EP管内加入30μL溶解液进行沉淀溶解，沉淀溶解液放置-20°C保存。

4.2.8 进行PCR反应。

PCR反应试剂与反应条件见表2和表3。

表2 PCR反应试剂

	使用量	终浓度
SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2×)	10.0 μL	1×
PCR Forward Primer (10 μM)	0.8 μL	0.4 μM
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.8 μL	0.4 μM
DNA模板	2.0 μL	20 ng/μL
dH ₂ O (灭菌蒸馏水)	6.4 μL	
总体积	20.0 μL	

表3 PCR反应参数

作用	时间/s	温度/°C
活化DNA活性酶和预变性	30	95
PCR (45个循环)		
变性	30	95
退火	30	55
延伸	60	72
循环后保持	180	72

4.3 MultiNA检测

PCR扩增后，产物进入MultiNA进行测定。根据理论产物片段大小，实验中选用500 bp的试剂盒进行测定。为了验证测量的准确性，本文同时进行了阴性对照实验，阴性对照的反应体系中不加入DNA模板。

5

成本核算

本解决方案的试剂成本核算如表4所示。

表4 成本核算

实验过程	试剂名称	生产公司和货号	0.1 g转基因样品分析成本 (元)
样品前处理及PCR过程	植物基因提取试剂盒	北京勤邦生物技术有限公司 FZ-002	5
微芯片电泳MultiNA分析	试剂名称	生产公司和货号	每个样品分析成本 (元)
	DNA-500 Reagent Kit for MultiNA	(岛津制作所) 292-27910-91	1.25
	SYBR [®] Gold Nucleic Acid Gel Stain	(Invitrogen) S-11494	0.004
	25 bp DNA Ladder	(Invitrogen) 10597-011	0.03
	合计		1.284

本成本核算仅供参考。