

转基因耐除草剂大豆及产品中外源成分检测方法的建立

姚涓¹, 赵均良¹, 陈金顶², 穆虹¹, 周峰¹, 姜大刚¹, 梅曼彤¹

(1 华南农业大学 生命科学学院, 广东 广州 510642; 2 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:分别从 DNA 和蛋白质 2 个水平上对转基因耐除草剂大豆及其产品的检测方法进行了研究. 设计合成引物检测大豆内参照基因 *Lectin* (大豆凝集素) 及转基因抗除草剂 Roundup Ready 大豆外源基因, 包括来自土壤细菌 *Agrobacterium tumefaciens* 株系 CP4 的 5-烯醇丙酮酸莽草酸-3-磷酸合酶 (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, *EPSPS*) 基因、花椰菜花叶病毒 (Cauliflower mosaic virus, CaMV) 35S 启动子、胭脂碱合酶 3' 端的转录终止子 (nopaline synthase, *NOS*). 应用优化的常规 PCR 方法, 对大豆及其加工产品进行了检测, 检测灵敏度可达 0.1%. 通过 PCR 方法从转基因大豆中扩增出 *CP4-EPSPS* 基因, 在大肠杆菌中表达, 利用表达的外源蛋白质作为抗原免疫家兔, 得到该蛋白质的多克隆抗体, 并建立了一套基于蛋白质印迹杂交 (western hybridization) 的检测转基因大豆及其粗加工品的方法, 其检测极限达到 1% 以下. 此两方法互相配合, 互相印证, 有助于规范化转基因检测方法的建立.

关键词:转基因耐除草剂大豆; 大豆加工产品; 定性 PCR; 外源蛋白质检测

中图分类号: Q55

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X (2005) 04-0067-06

Methods for detection of extraneous gene and its protein product in transgenic herbicide-tolerance soybeans and their processed products

YAO Juan¹, ZHAO Jun-liang¹, CHEN Jin-ding², MU Hong¹, ZHOU Feng¹, JIANG Da-gang¹, MEI Man-tong¹

(1 College of Life Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;

2 College of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: A PCR-based method and a immunological-based method were developed to detect extraneous genes in transgenic herbicide-tolerance soybeans and their processed products in this study. The primers for the gene of endogenous *Lectin* and foreign DNAs in Roundup Ready (RR) soybean, i. e. 35S promoter (from cauliflower mosaic virus), *NOS* (nopaline synthase) terminator and *CP4-EPSPS* (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate from CP4) have been designed and synthesized. The detection limit based on qualitative PCR reaches 0.1% of transgenic content. Also, the *CP4-EPSPS* gene was amplified from RR soybean by PCR and expressed in *E. coli*. The anti-CP4-EPSPS antibodies were produced by immunized rabbits with the purified recombinant CP4-EPSPS protein, and used to develop western hybridization-based method in detecting the RR soybeans and their crude processed products. The detection limitation of this method is able to reach as low as 1% of transgenic components. These two can be cooperated to set up the standard methods for detecting genetically modified crops and their processed products.

Key words: transgenic herbicide-tolerance soybean; processed soybean products; qualitative PCR; extraneous protein detection

收稿日期: 2005-01-21

作者简介: 姚涓 (1974-), 女, 实验师, 硕士; 赵均良 (1979-), 男, 博士研究生. 姚涓、赵均良为共同第一作者. 通讯作者: 梅曼彤 (1942-), 女, 教授; E-mail: mtmei@scau.edu.cn

基金项目: 广东省科技计划重大专项项目 (20034049); 广东省农业科技项目

近年来,全球转基因生物产业发展迅速. 1996 ~ 2004 年的 8 年间,全球转基因作物种植面积增长了 40 倍,从 1996 年的 170 万 hm^2 增长到 2004 年的 81 000 万 hm^2 ,2004 年转基因作物的产值约达到了 47 亿美元^[1]. 随着转基因作物的商品化发展,由此衍生而来的转基因食品的数量也在迅速增加. 同时,各国政府对转基因产品的态度也产生了分歧和争议,日本、韩国、中国等多个国家和欧盟均制订了相关的转基因产品的标识制度,以保护消费者对产品的知情权和选择权. 在转基因产品的标识制度中,多个国家对标识产品中含有的转基因成分含量还规定了上限,如欧盟规定产品中含有 0.9% 以上的转基因成分就必须标识,日本规定是 5%. 我国也已颁布相关法令,从 2002 年 3 月 20 日开始,要求对包括大豆在内的 5 大类 17 种转基因作物及其产品进行标识. 简单、灵敏、可靠的转基因生物检测方法的建立已成为当务之急,目前转基因生物的检测方法主要有检测基因(DNA)的聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)法^[2~6]及检测蛋白质的免疫学法^[7]等.

在已实现商品化生产的转基因作物中,转基因大豆种植面积最大,达到了 4 840 万 hm^2 ,占 2004 年全球转基因作物种植面积的 60%,而这些转基因大豆多源于美国孟山都公司的抗除草剂性状的大豆(商品名 Roundup Ready,简称 RR,转化株系 GTS 40-3-2^[8]). RR 大豆的主要性状是对除草剂草甘磷具有耐受性. 在这种大豆中转入了一种来自土壤细菌 *Agrobacterium tumefaciens* CP4 株系的 5-烯醇丙酮酸莽草酸-3-磷酸合酶(5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase,EPSPS)基因,这种基因编码的酶为芳香族氨基酸-色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸生物合成过程中的一个关键酶,是除草剂草甘磷的靶酶. 在 Roundup Ready 大豆中,由于有 EPSPS 的超量表达,使其能够正常生长. 大豆在食品加工中有广泛的应用,有必要建立对这种大豆的检测方法. 本研究分别从 DNA 及蛋白质检测 2 个方面对大豆及其加工产品的检测方法进行了研究,旨在建立有效的检测方法,并应用于对大豆类产品的实际检测工作中.

1 材料与方法

1.1 材料及仪器

转基因大豆材料为美国孟山都(Monsanto)公司生产的转基因抗除草剂大豆(商品名 Roundup Ready);非转基因大豆为广东本地大豆.

大豆粗加工品豆粕由深圳出入境检验检疫局提供;大豆油部分购自市场,部分由食品油制造厂提

供;其余含大豆成分的食品材料,包括腐乳、饼干、酱油、豆奶、奶粉、麦片、咖啡伴侣、豆酱、面条,均购自市场.

DNA 抽提用试剂 CTAB、SDS 购自美国 Sigma 公司;Taq DNA 聚合酶购自 TAKARA 公司;所用主要仪器为:PCR 仪(MJ PTC-100);凝胶成像系统(BIO-RAD);紫外分光光度计(BECKMAN DU640).

pQE9 表达载体及其宿主菌 *E. coli* M15 菌株购自美国 Qiagen 公司. 碱性磷酸酶(AP)标记的羊抗兔 IgG 购自美国 Sigma 公司.

根据大豆内源基因 *Lectin* 以及转基因大豆基因组中外源基因的组成及其序列^[8]设计引物,由上海博亚生物技术公司合成.

1.2 方法

1.2.1 大豆及其产品 DNA 的抽提 参阅文献[9],对经典的 SDS 法进行改良. 在抽提之前,先进行样品的前处理:如固体材料用液氮研磨成细粉末;液体材料则经离心,留沉淀用于抽提,或通过加热蒸发去掉水分,留干物质用于 DNA 抽提;豆油等油类材料首先加入等体积正己烷搅拌. 此外对于酱油、豆奶等含大量多糖、色素等杂质的材料在取得沉淀之后,用 Tris-HCl 洗数次.

抽提 DNA 时,加入 SDS 提取液、盐酸胍以及蛋白酶 K,温浴,离心. 取上清,加入酚/氯仿抽提. 取上清,加等体积异丙醇沉淀. 用 TE 溶解.

1.2.2 不同比例转基因大豆 DNA 样品的配制 用紫外分光光度计法测定 DNA 浓度,按此计算配制成转基因大豆 DNA 与总大豆 DNA 质量比为 0.05%、0.10%、0.50%、1.00%、2.00%、5.00% 的溶液供定量分析用.

1.2.3 PCR 检测 定性 PCR 检测反应体系为:模板 DNA 20 ~ 100 ng,引物各 0.5 $\mu\text{mol/L}$,dNTP 0.2 mmol/L,10 $\times$ PCR buffer (含 15 mmol/L MgCl_2) 2.5 μL ,Taq 酶 1 U,加 ddH_2O 至 25 μL . 反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s,62 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,共 35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min.

扩增产物用 15 mg/mL 的琼脂糖凝胶进行电泳分析.

1.2.4 从转基因大豆中克隆 CP4-EPSPS 基因 根据专利公布的转基因大豆中 CP4-EPSPS 基因的序列^[8],从基因的开放阅读框架两端设计 1 对引物(F/R),并分别加上 *Hind*III 和 *Sal*I 酶切位点,引物序列为:

F:5' TTTGTCGACATGTCGCACGCTGCAAGGAGC 3',
R:5' AAAGCTTCAGGCAGCCTTCGTATGGGAG 3'.

PCR 产物连接到 pMD T18 载体中,转化大肠杆

菌,对阳性克隆进行测序。

1.2.5 CP4-EPSPS 基因在大肠杆菌中表达及纯化

经测序确定正确的克隆,抽提质粒,用双酶切得到目的片段,连接入 pQE 9 表达载体,转化大肠杆菌 M15 菌株。通过碱裂解法初步鉴定阳性克隆,质粒酶切法进一步鉴定^[10],最后对阳性克隆进行测序以确认。挑取阳性克隆接种于 LB 液体培养基,37 ℃ 摇至菌液 $D_{600\text{ nm}}$ 值达 0.6,加入 IPTG 使其终浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$,37 ℃ 诱导 4 h。目标蛋白质的诱导表达及分离均按 Qiagen 公司的操作手册进行。

1.2.6 CP4-EPSPS 抗体的制备 采用 2 种不同方法纯化用作抗原的 CP4-EPSPS 蛋白质,第 1 种方法是经 Ni 离子层析柱纯化,第 2 种方法是从 SDS-PAGE 胶里通过切胶回收。对 Ni 离子层析柱纯化的蛋白质,首次免疫注射,把含约 0.7 mg 纯化的表达蛋白溶液加入等体积的弗氏完全佐剂,经乳化,皮下多点注射新西兰白兔 1 只。加强免疫蛋白 3 次,每次相隔 2 周^[11],加强量为每次 0.4 mg,佐剂改为弗氏不完全佐剂。另一方法用从 SDS-PAGE 胶切胶回收的目的蛋白带,在液氮中磨碎,加入等体积佐剂,免疫新西兰白兔 1 只。免疫方法同上。加强免疫后,对兔子分别进行心脏采血,血液 37 ℃ 下放置 2 h,离心得到抗血清^[12]。

1.2.7 以 western 杂交检测转基因大豆及其加工产品中的 CP4-EPSPS 蛋白质 分别取转基因大豆和非转基因大豆,加入提取液(Tris-HCl, pH 7.4, 1 mmol EDTA)^[9],研磨,离心,取上清,提取可溶性蛋白质。用考马斯亮蓝定量蛋白质^[13],通过稀释,使转基因大豆和非转基因大豆提取液蛋白质含量一致,然后用不同量转基因大豆和非转基因大豆提取液配成转基因大豆蛋白质质量占总蛋白质质量的 1%、3%、5%、10%、20% 和 40% 的溶液。

对含大豆的加工产品的处理按同上的方法进行,分别使用 2 种提取液,一种是大豆蛋白质提取用的普通提取液,另一种是 Laemmli 提取液,即 SDS-PAGE 电泳的样品缓冲液^[9]。

取蛋白质提取液加入等体积的 2 × 样品缓冲液,100 ℃ 中处理 3 min,以 15 μL /孔进行 SDS-PAGE 电泳,电泳后把蛋白质转移到硝酸纤维素(NC)膜上,用含 30 mg/mL 牛血清白蛋白的封闭缓冲液 4 ℃ 过夜,用 TTBS (0.1 mol/L Tris-HCl, 1 mg/mL NaCl, $\phi=0.1\%$ 的 Tween 20) 洗数次,用封闭缓冲液以 1:1 000 的比例稀释抗血清,膜在稀释的抗血清中室温下摇 1 h,用 TTBS 洗,步骤同上,再用封闭缓冲液以 1:20 000 的比例稀释 AP 标记二抗,室温下摇 1

h,用 TTBS 洗,最后加入 NBT/BCIP 底物,显色^[13]。

2 结果与讨论

2.1 以 DNA 为目标的检测

2.1.1 各种大豆粗加工和深加工产品的 DNA 抽提

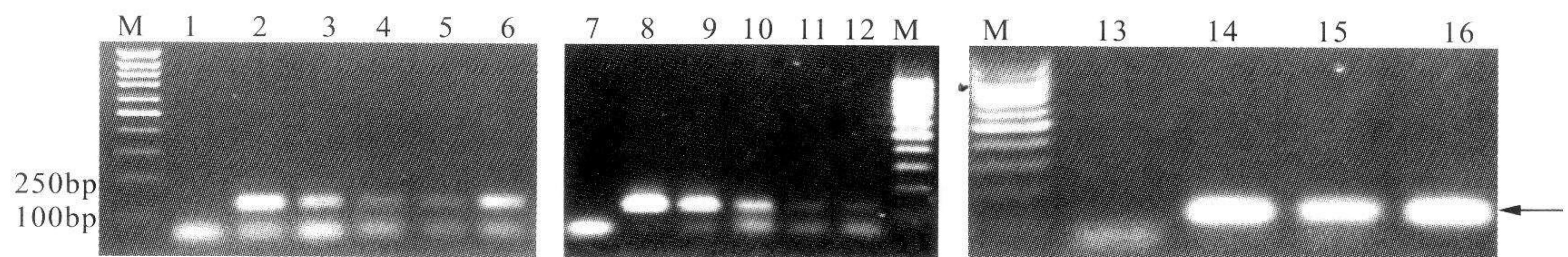
以改良的 SDS 法,对不同的含大豆成分的加工产品,经过不同的前处理后,从中抽提 DNA。其中粗加工产品(如豆粕)DNA 电泳条带较完整,深加工的产品抽提得到的 DNA 电泳都呈涂抹状,说明 DNA 已经降解。

食品加工过程中原料常受到一系列物理(高温、高压)、化学(酸、碱处理)及生物学(发酵、酶解)因素的影响,其 DNA 受到严重破坏,而大豆种子本身就含有较多的蛋白质、脂类、糖类、色素等,加以食品加工中加入的各种蛋白质、脂肪、多糖、酚类、单宁酸、盐、亚硝酸盐等,均严重影响 DNA 的抽提及纯化。本研究采取经过改良的 SDS 法,在普通的 SDS 抽提液中加入了盐酸胍和蛋白酶,它们可以分解蛋白质并使蛋白质变性而易于去除,相对 CTAB 法而言,操作步骤简单、快速,DNA 的质量和得率也较高。对于含杂质较多的深加工产品(如酱油、大豆油等),将此方法与 DNA 纯化试剂盒结合起来效果更好。此外,在进行深加工产品的 DNA 抽提之前,适当的前处理也会有利于提高抽提的效果,如豆奶、酱油在抽提前用 100 mmol/L 的 Tris-HCl 洗数次,可在 DNA 溶出前去掉水溶性和部分脂溶性色素以及部分多糖。

2.1.2 以 PCR 扩增法检测转基因大豆及其加工产品

(1)大豆及其产品内源参照基因(内标基因) *Lectin* 的检测:用 PCR 法首先检测大豆中的内标基因——凝集素基因 *Lectin*,以证明待检样品中大豆成分的存在及 PCR 反应的有效性。图 1 示出用 *Lectin* 基因的 1 对引物对大豆及豆粕、豆酱、酱油、豆奶、饼干等 10 种加工产品抽提的 DNA 进行 PCR 扩增的结果,可见在约 118 bp 处获得预期大小的扩增片段,表明检测的样品均为大豆加工产品。

(2)外源基因的检测:转基因大豆中的外源基因包括花椰菜花叶病毒 35S 启动子、胭脂碱合酶(NOS)的转录终止子及目标基因 CP4-EP-SPS^[6],分别对此 3 个基因进行了检测。用 CaMV35S 启动子及 NOS 终止子的特异引物对大豆及其加工产品进行是否含有转基因成分的初筛。图 2 示出了对 CaMV 35S 的部分扩增结果,从图 2 可见,对豆粕、饼干、腐乳及奶粉均可扩增到与预期片段大小一致的片段,即说明为阳性,酱油则表现为阴性,对 NOS 扩增可得到相似的结果。

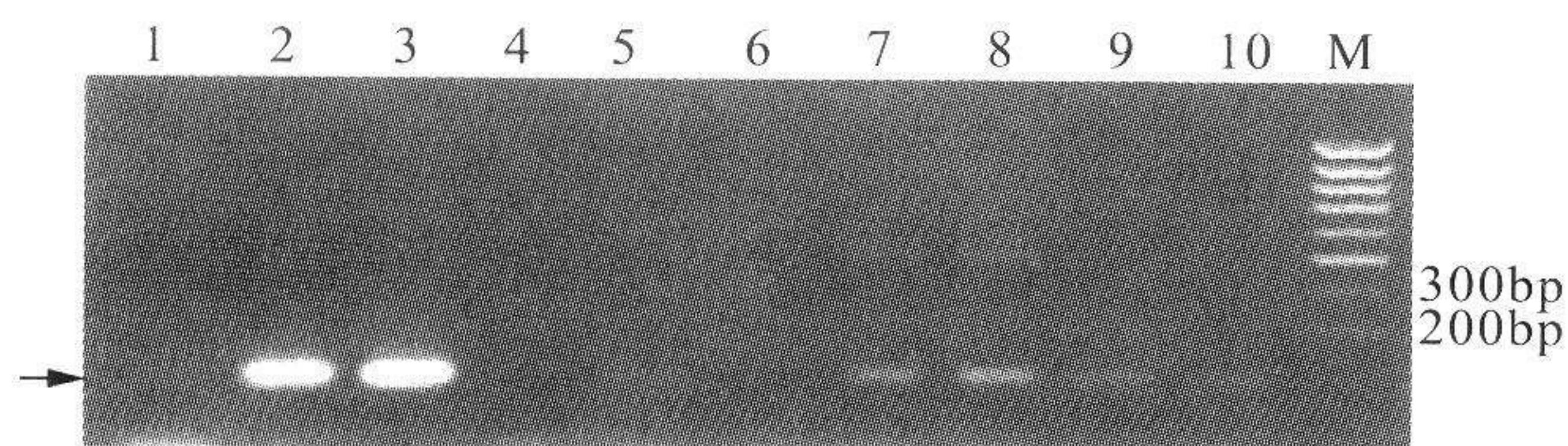


M:分子量标记;1、7、13:空白对照(水);2、8、14:大豆;3:豆粕;4:豆酱;5:酱油;6:麦片;9:豆奶;10:豆腐;11:饼干;12:奶粉;15:面条;16:腐乳

M: molecular marker;1,7,13: negative control(water);2,8,14: soybean;3: bean cake;4: thickbroad-bean sauce;5: sauce;6: oatmeal;9: soy milk ;10: bean curd;11: biscuit;12: milk powder;15: noodle;16: fermented bean curd

图1 大豆及加工产品中内标基因 *Lectin* 的检测

Fig. 1 Amplification of DNAs from soybean processed products with endogenous *Lectin* primer



M:分子量标记;1:本地大豆;2:RR 大豆;3:豆粕;4:豆油 I;5:豆油 II;6:酱油;7:麦片;8:饼干;9:腐乳;10:奶粉

M: molecular marker;1: domestic soybean;2: RR soybean;3: bean cake;4: bean oil I;5: bean oil II;6: sauce;7: oatmeal;8: biscuit;9: fermented bean curd;10: milk powder

图2 大豆及加工产品的 35S 启动子的检测

Fig. 2 Amplification of DNAs from soybean processed products with 35S promoter primer

用 *CP4-EPSPS* 基因特异引物对 8 种含大豆成分的加工产品进行检测,结果显示:豆粕、奶粉、腐乳及饼干 DNA 的 PCR 扩增中出现与预期片段大小一致的条带(图 3)。而在豆酱、酱油等样品中未检测到 *CP4-EPSPS* 转基因成分的存在。

虽然目前国内外的部分检测机构以 35S 与 *NOS* 作为检测的主要对象,然而,本研究在对几十份各种大豆加工产品的检测中发现,35S、*NOS* 出现假阳性的可能性较大。因此,在实际检测中,应以内标基因

Lectin 和目标基因 *CP4-EPSPS* 作为必须的检测对象,而 35S、*NOS* 作为辅助的检测基因。

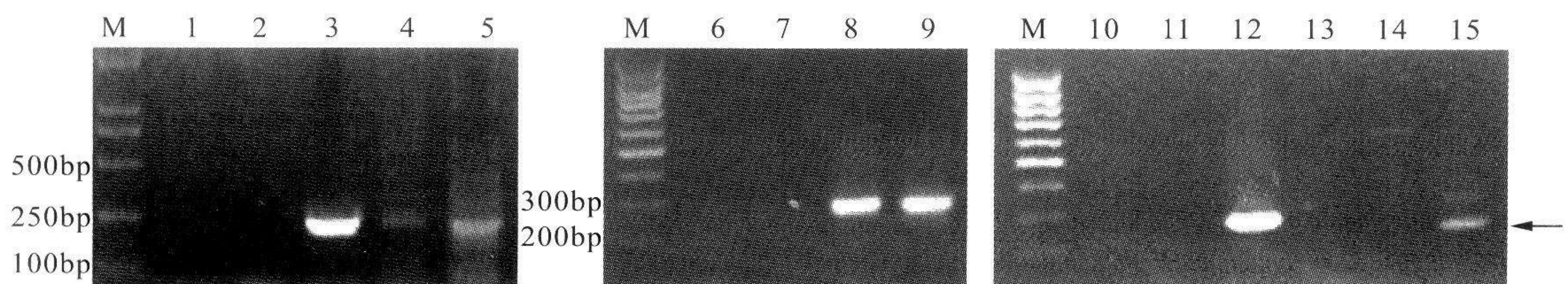
通过对不同转基因大豆 DNA 含量的样品进行 PCR 扩增的结果显示,应用普通 PCR 法检测的灵敏度可达到 0.1%,可满足目前世界上一些国家对转基因成分含量 0.9% 以上时加贴标签的要求。

2.2 以蛋白质为目标的检测

2.2.1 *CP4-EPSPS* 基因的克隆及表达载体构建

以转基因大豆提取的基因组 DNA 为模板,经 PCR 扩增,得到一条约 1.4 kb 的条带,测序结果表明该片段序列与转基因大豆中 *CP4-EPSPS* 序列完全相同,通过双酶切把其克隆入 PQE-9 表达载体,转化大肠杆菌,经鉴定和测序,表明目的片段已经按正确的阅读框插入。

2.2.2 *CP4-EPSPS* 蛋白质在大肠杆菌中的表达及其纯化 挑取阳性克隆,利用 IPTG 诱导目的蛋白表达。从图 4 的电泳结果可见,相对分子质量约为 48 000 的目的蛋白质得到高量表达,表达后在 PBS 中悬浮菌体,经超声波裂解菌体处理后,发现表达的外源蛋白主要存在于不可溶部分,说明外源蛋白主要以包涵体形式存在。

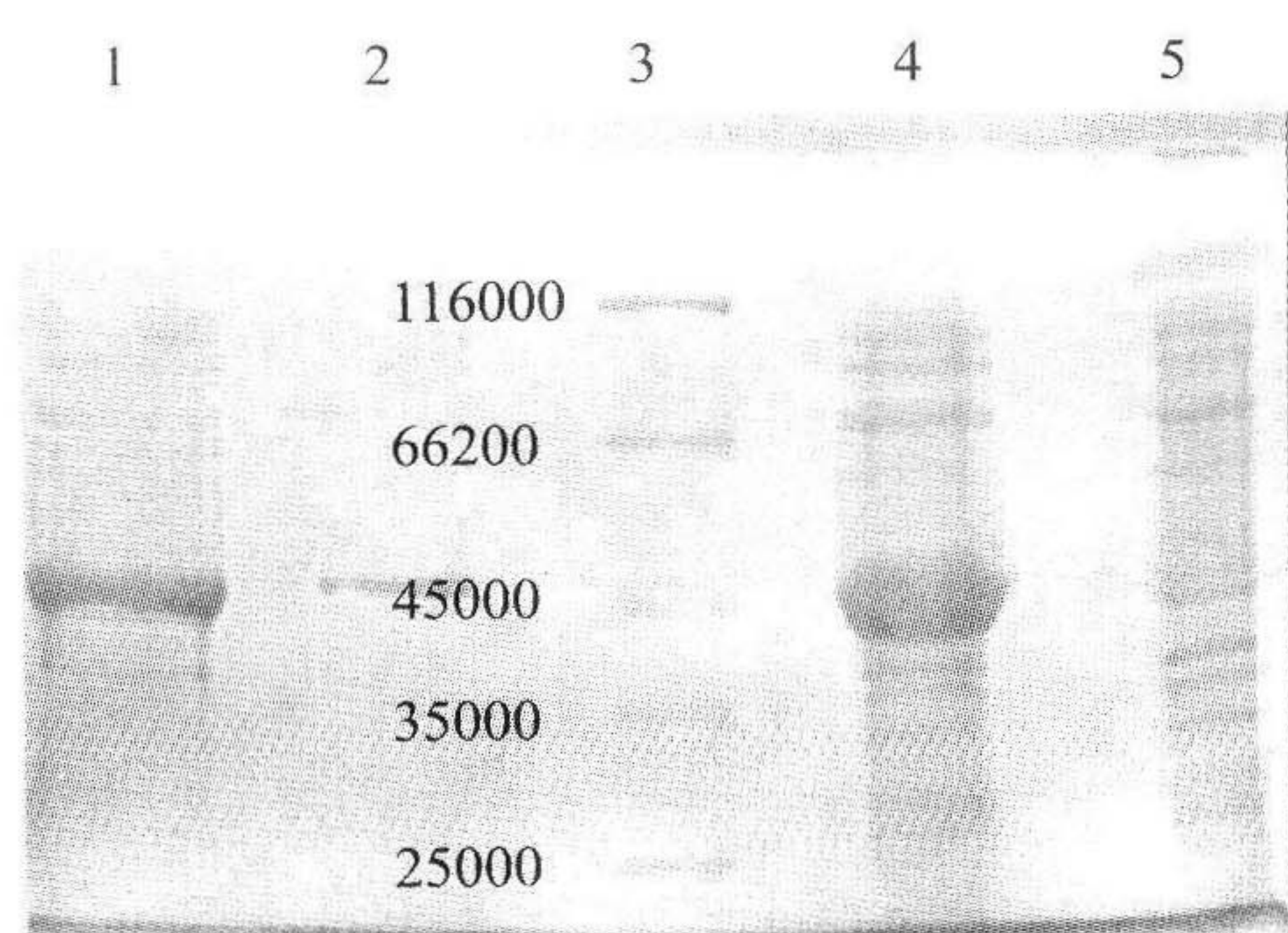


M:分子量标记;1、6、10:空白对照(水);2、7、11:本地大豆;3、8、12:RR 大豆;4:奶粉;5:腐乳;9:豆粕;13:豆酱;14:酱油;15:饼干

M: molecular marker;1,6,10: negative control(water);2,7,11: domestic soybean;3,8,12: RR soybean;4: milk powder;5: fermented bean curd;9: bean cake;13: thickbroad-bean sauce;14: sauce;15: biscuit

图3 大豆加工产品的 *CP4-EPSPS* 基因的检测

Fig. 3 Amplification of the DNA from soybean processed products with *CP4-EPSPS* primer



菌体经非变性处理后的 1:不可溶部分;2:可溶部分;3:低相对分子质量标记;4:经 IPTG 诱导 4 h 后细菌全蛋白;5:未诱导的细菌全蛋白

1:non-soluble fractions of bacterial cells after non-denatured treatment; 2:soluble fractions of bacterial cells after non-denatured treatment; 3:molecular size marker; 4:whole bacterial protein 4 h after induced with IPTG;5:whole bacterial protein without IPTG induction

图4 CP4-EPSPS 基因在大肠杆菌中的表达

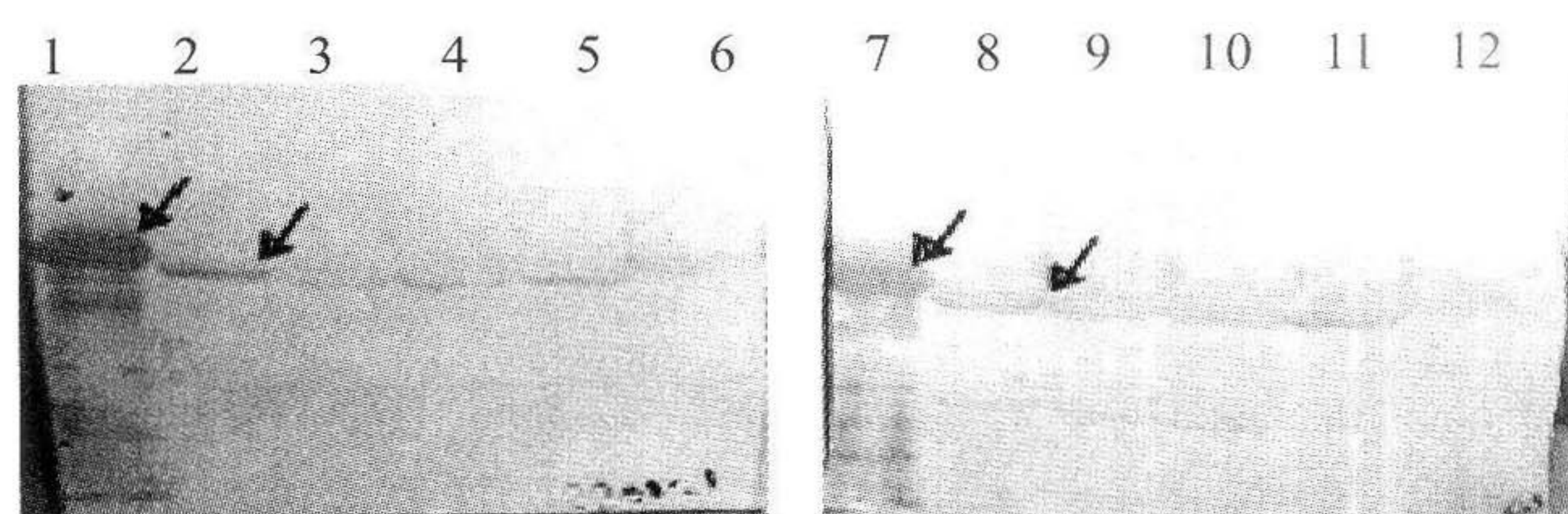
Fig. 4 Expression of CP4-EPSPS gene in *E. coli* M15 with pQE-9

经诱导后菌体裂解得到全蛋白,经过 Ni 离子亲和层析柱纯化,得到 CP4-EPSPS 外源表达蛋白质,用于制备特异性多克隆抗体。

2.2.3 CP4-EPSPS 抗体的特异性检测 利用过柱纯化和电泳切胶纯化的原核表达的 CP4-EPSPS 蛋白免疫白兔,分别获得的抗血清与经诱导的大肠杆菌全蛋白、转基因大豆和非转基因大豆进行 western 杂交。从图 5 结果可见,2 种血清都能在转基因大豆样品中得到特异的杂交条带,而非转基因大豆样品中没有相应杂交带,表明了所产生的抗血清均对大豆中的 CP4-EPSPS 蛋白具有特异性。两者比较发现,用过柱纯化的蛋白所制备的抗血清杂交带清晰,杂带较少(图 5 泳道 3,4,5)。为了得到更好的结果,后面的试验都是采用过柱蛋白制备的血清。

2.2.4 Western 杂交检测不同含量的转基因大豆及含大豆成分的加工产品 对含有不同比例转基因大豆成分的蛋白提取液进行电泳后转膜,用以 CP4-EPSPS 外源表达的蛋白免疫白兔制备的抗血清进行 western 杂交。

结果还显示,以特异抗血清进行检测,对转基因成分低至 1% 的样品仍然可见清晰的杂交信号,而非转基因大豆没有信号,证明建立的方法对大豆的检出极限可以达到 1%。随着含量提高,杂交信号与转基因含量保持良好的线性关系。因此该方法对于转基因大豆的检测具有灵敏度高、定量准确的特点。



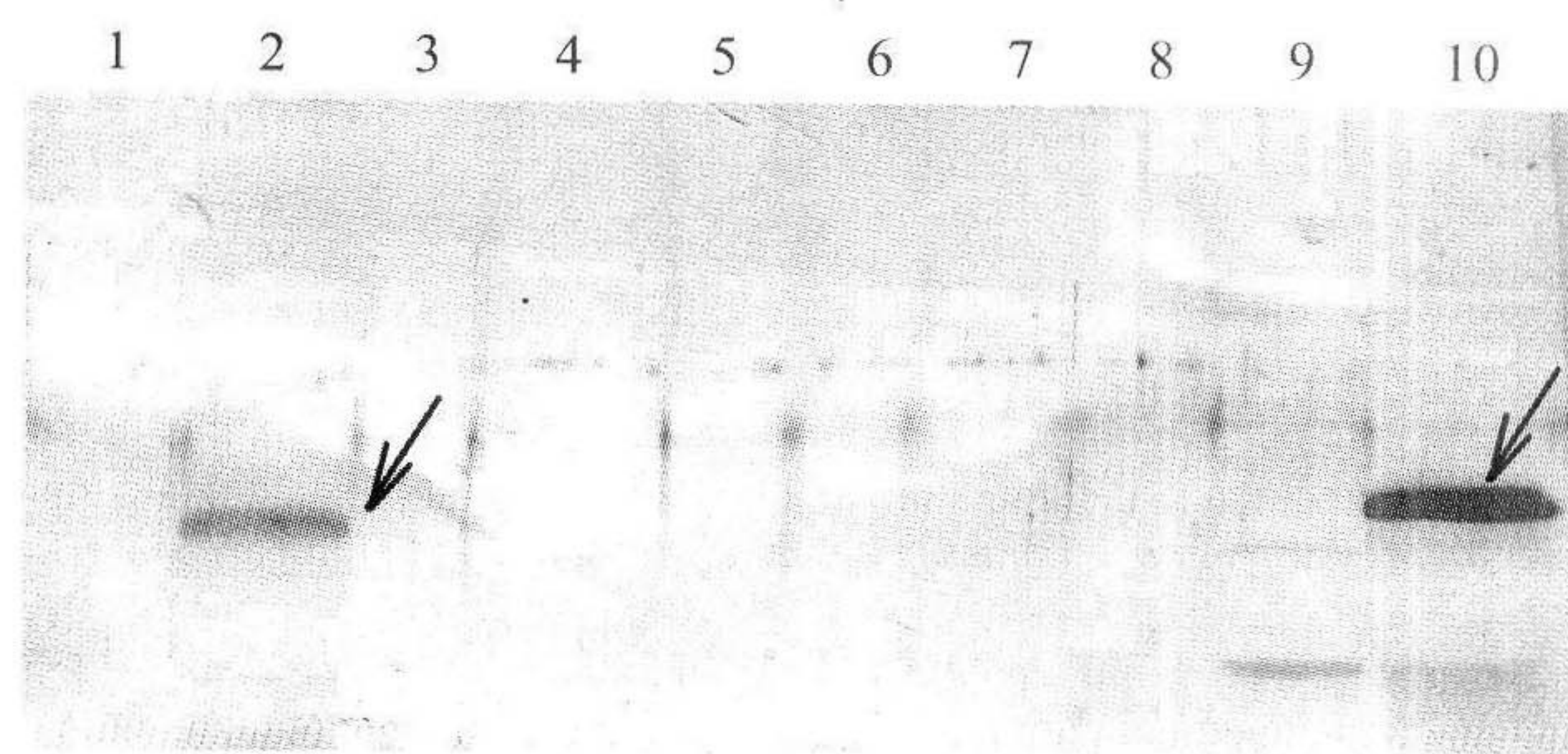
1~6:用过柱蛋白制造的抗血清对样品的杂交结果,依次为:表达外源蛋白的细菌全蛋白,阳性转基因大豆全蛋白,含 10%、20%、40% 转基因成分,非转基因大豆;7~12:使用切胶蛋白制造的抗血清对样品的杂交结果,顺序与 1~6 相同。箭头所示为目标蛋白杂交带

1,7: whole protein from cells of *E. coli* expressing CP4-EPSPS; 2,8: 100% of protein from Round Ready soybean; 3,9: 10% of protein from Round Ready soybean; 4,10: 20% of protein from Round Ready soybean; 5,11: 40% of protein from Round Ready soybean; 6,12: protein from non-transgenic soybean. The arrows indicate the specific bands of target protein

图5 不同方法纯化蛋白所制备抗血清的 Western 杂交结果

Fig. 5 Western blotting using two antiserums produced by column elution(1-6) or SDS-PAGE purification(7-12) probes

对含大豆成分的加工产品,包括豆粕、奶粉、咖啡伴侣和豆油也进行了检测。从图 6 可见,只对用 Laemmli 缓冲液提取的豆粕的蛋白质有杂交信号(图 6 泳道 2),而对奶粉、咖啡伴侣和豆油都没有杂交信号。



以 CP4-EPSPS 抗血清为探针的 western 杂交:1、2 分别为以 TBS 和 Laemmli 溶液提取的豆粕全蛋白;3、4 分别为以 TBS 和 Laemmli 溶液提取的奶粉全蛋白;5、6 分别为以 TBS 和 Laemmli 溶液提取的咖啡伴侣全蛋白;7、8 分别为以 TBS 和 Laemmli 溶液提取的粗油提取液;9、10 分别为非转基因大豆和转基因大豆以 TBS 提取的蛋白提取液。箭头所示为目标蛋白的杂交带

Using CP4-EPSPS antiserum as probe to hybridize with proteins extracted with TBS(1,3,5,7) or Laemmli (2,4,6,8) solution:

1,2: proteins extracted from bean cake; 3,4: proteins extracted from milk powder; 5,6: proteins extracted from coffee-mate; 7,8: proteins extracted from soy oil; 9: protein extracted from non-transgenic soybean seed with TBS; 10: protein extracted from transgenic soybean with TBS. The arrows indicate the specific bands of target protein

图6 对含大豆成分的产品检测

Fig. 6 Detection of products contained Roundup Ready soybean with western blotting

可见所建立检测转基因大豆目标基因表达产物的免疫学方法的方法对转基因大豆的检测达到了一定的灵敏度,而且信号与含量之间具线性关系,可以用于定量检测. 对于含转基因大豆的粗加工产品(豆粕)也能得到较好的检测结果. 检测中,对于粗加工产品,蛋白质降解和变性较严重,加入变性剂能够提高蛋白的提取量,如采用含有 SDS 的 Laemmli 缓冲液对豆粕,能得到较好的检测结果. 但在对深加工且含大豆成分比较少的产品,如咖啡伴侣和奶粉的检测中,本方法未能检测到 CP4-EPSPS 蛋白质的存在.

目前鲜见国内利用外源蛋白的方法检测转基因大豆的报道,国外虽有类似报道^[7],但其外源蛋白来自于细菌基因,而本研究直接从转基因大豆中克隆目标基因用于外源表达,制造抗体,建立了一套基于免疫学方法的检测转基因作物及其加工品的方法,丰富了对转基因大豆检测的方法.

由于核酸分子对热较为稳定,在加工产品中仍存在,基于转基因作物的特异外源 DNA 片段的 PCR 检测方法应用较为广泛. 这类方法简单、方便、成本低. 但该方法基于 DNA 分子在体外的高倍数扩增,有出现假阳性结果的可能. 而直接检测外源基因的表达产物,即蛋白质的方法虽然操作相对复杂,但结果可靠,能达到较高的灵敏度,而且定量简单,可以与对外源 DNA 检测方法互补不足,提高对转基因大豆及其加工品检测的准确性.

参考文献:

- [1] JAMES C. Global status of commercialized transgenic crops[EB/OL]. <http://www.isaaa.com>, 2004.
- [2] MARC V, HANS P, FRANCOIS G, et al. Real-time quantitative PCR detection of genetically modified maximizer maize and roundup ready soybean in some representative foods[J]. J Agric Food Chem, 1999, 47: 5 261 - 5 266.
- [3] 陶震,杨胜利,龚毅. 利用 MPCR 方法快速检测植物转基因背景[J]. 生物技术通报,2000,(6):37-41.
- [4] 金红,程奕,赵昕,等. 大豆色拉油中转基因成分检测技术研究[J]. 华北农学报,2004,19(1):24-27.
- [5] 蒋原,祝长青,林宏,等. 利用 PCR 技术检测转基因大豆 Roundup Ready 的研究[J]. 检验检疫科学,2001,11(4):11-13,20.
- [6] ROTT M E, LAWRENCE T S, WALL E M, et al. Detection and quantification of roundup ready soy in foods by conventional and real-time polymerase chain reaction[J]. J Agric Food Chem, 2004, 52(16):5 223 - 5 232.
- [7] ROGAN G J, DUDIN Y A, LEE T C, et al. Immunodiagnostic methods for detection of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in Roundup Ready soybeans[J]. Food Control,1999,10:407-414.
- [8] BARRY, FRANCIS G, KISHORE, et al. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases [P]. United States Patent: 5804425, 1998-09-08.
- [9] URS P, MARIANNE L, ANDREAS Z, et al. Extraction and amplification of DNA from 55 foodstuffs[J]. Mitt Lebensm Hyg, 2000, 91: 491-501.
- [10] SAMBROOK J, RUSSELL D W. Molecular cloning a laboratory manual [M]. 3rd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 1.84-1.132.
- [11] 吴雄文,梁智辉. 实用免疫学实验技术[M]. 武汉:湖北科学技术出版社,2002. 1-3.
- [12] 陈新建. 免疫学技术在植物科学中的应用[M]. 北京:中国农业大学出版社,1998. 42-45.
- [13] 奥斯伯 F, 金斯顿 R E, 塞德曼 J G, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖,王海林,译. 北京:科学出版社,1998. 366-373.

【责任编辑 李晓卉】