



转基因棉子油的快速 PCR 检测研究

袁建琴, 唐中伟¹, 许冬梅¹, 刘建东¹, 高斌战²

(1. 山西农业大学生命科学学院, 山西 太谷 030801;

2. 山西隆克尔生物制药有限公司, 山西 太谷 030800)

摘要:以棉子油为原料,探索出了一种快速、简便的转基因棉子油的 PCR 检测方法。该方法能从 15 mL 棉子油中提取 0.4 μg 高纯度 DNA,用于 PCR 检测。针对 18S rDNA、CaMV35S、NOS、NPT II 和 Cry1A(c)等基因进行了棉子油中内外源基因 PCR 检测,分别扩增出不同的目的片段。本研究为油脂类产品的外源基因检测提供了可行方法。

关键词:棉子油;转基因成分;DNA 提取;PCR;检测研究

中图分类号:S565.1 文献标识码:A

文章编号:1002-7807(2009)02-0153-03

Study of Rapid Detection of Transgene Sequences in Cottonseed Oil Using PCR

YUAN Jian-qin¹, TANG Zhong-wei¹, XU Dong-mei¹, LIU Jian-dong¹, GAO Bin-zhan²

(1. College of Life Science, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China; 2. Lucker Pharmaceutical Stock Factory, Taigu, Shanxi 030800, China)

Abstract: A simple and rapid-method which could extract DNA from cottonseed oil had been developed. A yield of 0.4 μg DNA could be obtained from 15 mL oil. PCR amplification of sequences of CaMV35S, NOS, NPT II, Cry1A(c), and an endogenous reference gene 18S rDNA in refined cottonseed oil was performed. Results showed that the sequence-specific fragments were amplified in the samples, demonstrating that the method could be applied for detection of transgene sequences. There are some DNA fragments in refined cottonseed oil, and PCR amplification can detect the foreign DNA.

Key words: cottonseed oil; transgene sequences; DNA extraction; PCR; detection study

由于转基因抗虫棉棉子油成分特殊,目前国内尚缺乏检测试剂盒和相关的规范研究。针对以上情况,本研究以棉子油为材料,探索出一种快速、简便的提取棉子油 DNA 的方法,并提取十种棉子油的 DNA,针对 CaMV35S、NOS、NPT II、和 Cry1A(c)等外源基因和内源基因 18S rDNA 进行了 PCR 检测,为油脂类产品的外源基因检测提供了可行方法^[1-4]。

1 材料和方法

1.1 材料

棉子油:品种有晋棉 26、中棉所 38、中棉所

41、中棉所 42、晋棉 7 号、晋棉 12、晋棉 37、晋棉 38、永丰棉 5 号和永丰棉 998。

1.2 棉子油 DNA 的提取

取 15 mL 精练棉子油,加入 15 mL 正己烷,磁力搅拌器上不断振荡混合 2 h;加入 30 mL NaCl(1.2 mol · L⁻¹),继续于磁力搅拌器上振荡混合 2 h;12000 r · min⁻¹离心 20 min,使有机相和水相分离,小心取出下层水相;加入与水相溶液等体积的异丙醇,轻缓颠倒混匀,室温放置 10 min 后,12000 r · min⁻¹离心 15 min,弃上清液,保留沉淀;待沉淀稍微干燥后用 1 mL TE 溶解沉淀,加入 1 mL 异丙醇,轻缓颠倒混匀,室温放置 10 min

后,12000 r·min⁻¹离心 15 min,弃上清液,保留沉淀;待沉淀稍微干燥后加入 60 μL TE,充分溶解沉淀,2 min 后过 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒(仅进行纯化部分),最后将离心获得的溶液(经核酸蛋白浓度检测仪检测浓度)取 7 μL 进行琼脂糖凝胶电泳,同时可作为 PCR 反应的模板^[5-6]。建议一个 PCR 反应使用 1 μL DNA。

1.3 PCR 反应条件

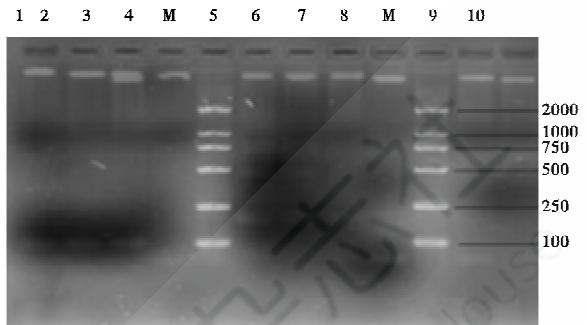
从 10 份棉子油中分别提取 DNA,电泳后进行 PCR 扩增。18S *rDNA*、*CaMV35S*、*NOS* 和 *NPT II* 引物反应条件:95℃ 10 min,(94℃ 30 s,54℃ 40 s,72℃ 1 min)×40 个循环,72℃ 10 min。*Cry1A(c)*引物反应条件:95℃ 10 min,(94℃ 30 s,60℃ 40 s,72℃ 1 min)×40 个循环,72℃ 10 min。PCR 反应体系为 25 μL^[7-8]。PCR 后,取 7 μL PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳分析。

2 结果与分析

2.1 棉子油 DNA 提取电泳图

由于棉子油成分特殊,目前国内尚缺乏检测

试剂盒和相关的规范研究。本研究经过反复试验,开发出离心柱法提取棉子油 DNA 的方法,已从 15 mL 油中提取出 0.4 μg DNA(核酸蛋白浓度检测仪检测),将获得的溶液取 7 μL 进行琼脂糖凝胶电泳(图 1)。



1 晋棉 26;2 中棉所 38;3 中棉所 41;4 中棉所 42;
5 晋棉 7 号;6 晋棉 12;7 晋棉 37;8 晋棉 38;9 永丰棉 5 号;
10 永丰棉 998; M DL-2000 DNA Marker。

图 1 棉子油 DNA 的提取电泳图

Fig. 1 Agarose gel of cottonseed oil DNA extraction product

2.2 不同品种的棉子油扩增结果

从 10 份棉子油中分别提取 DNA,电泳后进行 PCR 扩增(表 1)。

表 1 不同引物和不同品种棉子油 PCR 扩增结果

Table 1 PCR results of different cottonseed oil by using different primers

	18S <i>rDNA</i>	<i>CaMV35S</i>	<i>NOS</i>	<i>NPT II</i>	<i>Cry1A(c)</i>
晋棉 26	+	+	+	+	+
中棉所 38	+	+	+	+	+
中棉所 41	+	+	+	+	+
中棉所 42	+	+	+	+	+
晋棉 7 号	+	-	-	-	-
晋棉 12	+	-	-	-	-
晋棉 37	+	+	+	+	+
晋棉 38	+	+	+	+	+
永丰棉 5 号	+	+	+	+	+
永丰棉 998	+	+	+	+	+
转基因棉子	+	+	+	+	+
非转基因棉子	+	-	-	-	-

结果表明,在 10 个品种中,除用内源基因扩增均呈阳性外,其余四个引物扩增均呈阳性的有 8 个品种,分别为:晋棉 26、中棉所 38、中棉所 41、中棉所 42、晋棉 37、晋棉 38、永丰棉 5 号、永丰棉 998;晋棉 12 和晋棉 7 号的其余 4 个引物扩增均呈阴性。目前,棉子油多为转基因棉子压榨而成,而棉子油中含有转基因成分的含量有待进一步研究。

3 结论与讨论

本文首次报道了一种快速、简便的检测棉子油转基因成分的方法,该方法能从 15 mL 棉子油中提取 0.4 μg 高纯度 DNA,从而用于 PCR 检测。在提取底层沉淀时适当延长了离心时间,实验结果显示,增加离心时间有利于 DNA 量的提取。经过 10 种棉子油 DNA 提取,针对 18S *rDNA*、*CaMV35S*、*NOS*、*NPT II* 和 *Cry1A(c)* 基因进行了 PCR 检测,分别扩增出不同的目的片

段。以上方法可用于其它油脂类产品的检测。

在 PCR 检测中,样品 DNA 的数量和纯度是检测成功的关键。直接从组织中提取 DNA 比较容易,而深加工的转基因产品(例如:油、蜂蜜、牛奶、酱油、土豆片等),在加工过程中由于物理、化学或发酵的操作使得 DNA 的提取变得非常困难,从而制约着这类产品的检测。本研究以棉子油为原料,选用既可以和油相溶又可以和 NaCl ($1.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)溶液有一定的溶解度的正己烷处理样品,使残存在油中的 DNA 交换到缓冲液中,最后用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒对缓冲液纯化处理,得到高品质的 DNA。该方法同时适用于油脂含量较高的产品。目前国内外尚未有成功从棉子油产品中提取 DNA 且进行该产品转基因成分检测的报道。后续研究可以从以下几个方面进行:(1)进一步优化条件,以便得到更加稳定、纯度更高的 DNA,同时开发研制试剂盒(可提取油类作物及其产品)。(2)PCR 产物的酶切鉴定。以本文研究结果为基础,将棉子油的 PCR 产物回收,进行 PCR 产物的酶切鉴定。(3)PCR 产物的克隆和测序。对 PCR 产物片段按 PCR 产物回收试剂盒说明进行琼脂糖凝胶回收,连接到 T-easy 载体上进行序列测定,并对序列结果进行比对和分析。

参考文献:

- [1] 上官小霞,李燕斌,梁运生,等. *GUS* 基因和 *NPTII* 基因表达的相关性及其在转基因棉花检测研究中的应用[J]. 棉花学报, 2007, 19(3): 163-167.
SHANGGUAN Xiao-xia, Li Yan-bi, Liang Yun-sheng, et al. Expression of *GUS* gene and *NPTII* gene and their application in the detecting of transgenic cotton[J]. Cotton Science, 2007, 19(3): 163-167.
- [2] 盛承发,王少丽,宣维健,等. 抗虫杂交棉研究与应用进展[J]. 农业现代化研究, 2002, 23(5): 347-351.
SHENG Cheng-fa, Wang Shao-li, Xuan Wei-jian, et al. Advance in research and utilization of *Bt* transgenic resistant hybrids in cotton production[J]. Research of Agricultural Modernization, 2002, 23(5): 347-351.
- [3] 王彦霞,吴立柱,王省芬,等. 含 *NPTII* 标记基因的转基因抗虫棉室内快速鉴定方法(英文)[J]. 棉花学报, 2007, 19(2): 134-138.
WANG Yan-xia, Wu Li-zhu, Wang Xing-fen, et al. Three methods for rapid selection of transgenic cotton plants in laboratory with kanamycin as indirect marker[J]. Cotton Science, 2007, 19(2): 134-138.
- [4] 周晓梅,沈晋良. 棉铃虫对转 *Cry1Ac* 基因棉的抗性遗传及 AFLP 标记研究[J]. 棉花学报, 2005, 17(5): 269-274.
ZHOU Xiao-mei, Shen Jin-liang. Inheritance and AFLP marker of resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner) to transgenic *Cry1Ac* Cotton[J]. Cotton Science, 2005, 17(5): 269-274.
- [5] 中华人民共和国农业部. NY/T674—2003 转基因植物及其产品检测、DNA 提取和纯化[S]. 北京:中国标准出版社,2003.
Chinese Ministry of Agriculture. NY/T 674—2003 Detection of genetically modified plant organisms and derived Products-DNA extraction and purification[S]. Beijing: Standards Press of China, 2003.
- [6] 程红梅,彭于发,金芜军,等. 一种快速、简便提取大豆油 DNA 的方法及转基因大豆油的检测[J]. 中国农业科学, 2007, 40(5): 1069-1072.
CHENG Hong-mei, Peng Yu-fa, Jin Wu-jun, et al. A simple and rapid method for isolation of DNA from and detection of transgene sequences in soybean oil [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2007, 40(5): 1069-1072.
- [7] 中华人民共和国出入境检验检疫局. SN/T 1199—2003 棉花中转基因成分定性 PCR 检测方法[S]. 北京:中国标准出版社,2003.
Chinese Ministry of Entry-exit Inspection and Quarantine. SN/T 1199-2003 Protocol of the polymerase chain reaction for detecting genetically modified components in cotton [S]. Beijing: Standards Press of China, 2003.
- [8] MEYER R. Development and application of DNA analytical methods for detection of GMOs in food [J]. Food Control, 1999, 10: 391-399. ●