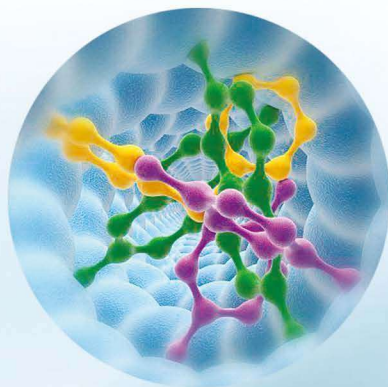


现代分子生物学技术

食品安全检测应用解析

XIANDAI FENZI SHENGWUXUE JISHU
SHIPIN ANQUAN JIANCE YINGYONG JIEXI

周巍 / 著



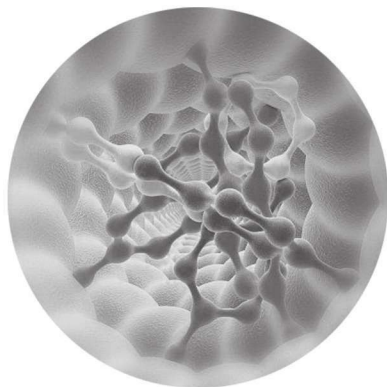
河北科学技术出版社

现代分子生物学技术

食品安全检测应用解析

XIANDAI FENZI SHENGWUXUE JISHU
SHIPIN ANQUAN JIANCE YINGYONG JIEXI

周巍 / 著



河北科学技术出版社

图书在版编目 (C I P) 数据

现代分子生物学技术食品安全检测应用解析 / 周巍
著. —石家庄 : 河北科学技术出版社, 2018. 7
ISBN 978 - 7 - 5375 - 9663 - 3

I. ①现… II. ①周… III. ①分子生物学 - 应用 - 食
品安全 - 食品检验 - 研究 IV. ①TS207.3

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2018) 第 161723 号

现代分子生物学技术食品安全检测应用解析

周 巍 著

出版发行	河北科学技术出版社
地 址	石家庄市友谊北大街 330 号 (邮编: 050061)
印 刷	河北纪元数字印刷有限公司
开 本	787 × 1092 1/16
印 张	12
字 数	190 千字
版 次	2018 年 7 月第 1 版 2018 年 7 月第 1 次印刷
定 价	30.00 元

第一章 引言

民以食为天，人的一生中需要摄取大量食物以补充机体生存所必需的脂类、蛋白质、维生素、水和无机盐等。人们日常生活中的食品需求量大且种类丰富，随着科学技术的发展和生活水平的提高，人们对食品的要求已不再局限于解决温饱问题，而是更关注食品的质量，更关注食品的安全性。然而近年来有些食品的安全问题并未得到切实保障，从原材料、加工、包装、流通到销售等环节都存在着一些隐患。食品安全问题已成为世界性的公共卫生问题，受到世界各国的高度重视。食品安全与国际贸易、企业发展、社会稳定和人民健康紧密相连，各国都已从国家安全的战略高度来看待食品安全问题。因此，有必要建立食品安全风险监测网络体系，覆盖食品加工、生产、储藏、经营的各个环节，以全方位控制食品安全实际情况，排除食品安全隐患。我国食品安全风险监测起步较晚，在制度建设、技术支撑等方面与发达国家还有一定差距，如何加强和完善我国食品安全风险监测体系，促进食品市场的健康运行，将是我国食品监管的一项重点工作。

随着人们生活节奏的加快，食品行业迅速发展，食品安全卫生问题也随之增多，如药物污染、微生物污染、假冒伪劣食品、添加剂超标以及转基因技术在食品中的应用等，导致人们越发关注食品的安全问题。食品安全问题可能引发多种疾病，影响人的身体健康，甚至损害国家形象，影响国家经济的持续发展。食品安全检验的必要性不言而喻，食品质量风险监测技术作为食品安全的重要支撑，其重要性是不言而喻的。只有发展食品质量检测技术，完善检测体系，建立监测制度，才能有效保障食品质量和安全。伴随着新的检测技术的发展，解决食品安全问题的速度在不断加快，我国的食品检验正朝着更加卫生和安全的方向发展。

目前国内各类食品产业发展十分迅速，科技的发展也给不法商人提供了可乘之机，消费者在购买食品时，可以通过形态、特征判定食材的种

类,但类似肉丸、饮料、豆粉等加工产品,则很难通过表观特征判断成分的来源。目前在食品制作过程中使用价格低廉、易混淆的原材料的掺假现象屡见不鲜,如动物源性食品或植物源性食品的掺假、以次充好等,严重侵害了消费者的权益。

同时,食品污染问题也不可小视,食品生产环节如果不严格把控,极易造成菌落超标等严重食品污染问题。食物中毒事件每年都在世界范围内频繁爆发,其中大部分是食品中污染致病细菌引起的。据统计,这些致病细菌中最常见的是沙门菌、金黄色葡萄球菌、志贺菌、单核增生李斯特菌等。在我国每年发生的食物中毒事件中,细菌性食物中毒事件占总数的30%~90%,细菌性食物中毒人数占中毒总人数的60%~90%。传统检验方法检验时间长,检验程序烦琐,因此,急需一种快速有效的检测方法。

目前我国相关的食品检验机构的检验能力较以往已有很大提升,但仍有很多不足,在食品保障领域存在着自身的局限性,现行的检验标准存在着许多问题,如检验方法落后、检验数据不准确、检验范围小等,甚至大部分检验机构仍然使用的是落后的检验仪器和检验技术,这些落后的检验仪器已经无法满足当今的检验多元化要求,无法进行精准的测量,更无法对新型物质成分进行检验。这些问题很容易导致检验结果不可靠,从而影响市场监管,不利于食品安全的健康发展。价格高昂的检验仪器,如高分辨质谱,虽然提高了检验准确度,缩短了检验所需时间,但其价格让许多检验机构望而却步,不适合检验工作者日常检验。因此,开发出合适的检验方法,提高检验准确度、检验速度和检验范围,成为食品检验方面科研人员的首要任务。

随着科学技术的发展,检验技术也在不断更新。食品检验技术不仅是检验食品质量、维护食品安全的重要手段,还是生产企业的信誉度、人民群众身体健康的重要保障。因此,食品检验技术的研究具有重大意义。随着人们对食品要求的提高以及对美好生活的向往,局限于食材本身食用安全和食用状态的食品检验技术已不能满足于市场的需要,随之而生的是对食品的组成成分,化学成分,添加剂的种类,微生物的含量、种类和数量等更有深度和广度的研究。食品检验人员应该积极提高检验技术水平,完善检验手段,以更好地保障人民的食品安全,维护人民的身体健康。综上所述,提高食品检验水平,加强新型食品检验技术研发和应用是时代发展

的必然要求。

本书对国内外食品安全现状、风险监测情况进行了总结分析，基于现代分析生物学技术分析研究现存食品安全问题的解决方法，为食品安全监管提出了建议。

第二章 现代分子生物学技术 在植物源性食品中的应用

植物源性食品是指粮食及其制品、蔬菜及其制品、转基因食品、油料及其制品、干果坚果类、中药材等，这些植物源性食品与我们的生活息息相关。目前国内外的植物源性食品各产业发展迅速，随着科技的发展，转基因食品的研发迅猛发展，产品品种和产量快速增长。转基因作为一种新兴的生物技术手段，日益显出自身的优势，但其安全性还难以在短时间内确定，这就使得转基因食品安全问题成为人们关注的焦点。与此同时，一些不法商家受利益驱使在植物源性食品中掺杂使假、不严格控制食品生产环节造成菌落超标等，导致食品安全问题频发。因此，加强植物源性食品的安全就显得尤为重要，监管机构急需建立新的、更高效的植物源性 DNA 提取方法和更准确、有效的检验检测体系。

目前在保障植物源性食品的安全方面已有多种检测手段得到应用。PCR 技术作为最基础的分子技术可衍生出多种 PCR 检测技术，如多重 PCR 技术、实时荧光定量 PCR 技术、多重实时荧光定量 PCR 技术、多重巢式 PCR 技术等。这些衍生出的 PCR 检测技术因其灵敏度高、特异性好等技术优势而获得食品检测机构的认可。

本章通过使用上述技术进行了以下方面的研究：在已有分子生物学技术的基础上，分析研究了食用植物油 DNA 的简便高效的提取方法，并针对棉籽油进行了转基因成分的定性检测，为油脂原料成分的鉴定和标签标识检验提供了技术保证；利用依赖解旋酶 DNA 恒温扩增技术建立了一种快速检测转基因大豆的新方法，该方法特异性强，检出限低，为解决转基因食品安全问题提供了新思路；成功利用 FTA 滤膜技术直接从豆制品中提取模板 DNA，基于多重 PCR 技术实现了对豆制品中三种致病菌的同步检测，为植物源性食品安全中的多种致病菌的快速检测奠定了基础，提供了方向。

2.1 棉籽油中 DNA 不同提取方法的比较研究

食用油安全是人们健康生活的保证。棉籽油多以棉籽浸制而成,在人体内的消化吸收率可达 98%,其亚油酸含量高(44.0%~55.0%),可有效抑制血液中的胆固醇。此外,还含棕榈酸、硬脂酸、油酸、花生酸等营养成分。过去由于粗制棉籽油中含有游离棉酚,限制了人们的大量食用。随着加工工艺的改进,精制棉籽油将棉酚有效去除,棉籽油的市场占有率呈现增长趋势。棉籽油已成为很多食用调和油的主要成分。

转基因作物的种植率近年来不断增加,转基因食用油的市场占有率也越来越高。2002 年《农业转基因生物标识管理办法》中要求对上市的大豆油、玉米油、油菜籽油、棉花种子进行转基因标识。2003 年规定了对食用油脂中转基因植物成分定性 PCR 检测的方法,这为油脂原料成分的鉴定和标签标识检验提供了技术保证,对保护消费者权益和确保食品安全具有重要意义。

目前转基因成分检测主要依靠蛋白质检测和核酸检测两类方法。蛋白质检测常规方法主要有 ELISA 法,即酶联免疫吸附测定法,其原理是利用表达的抗原与目标抗体间结合的特异性来检测特定蛋白的存在。核酸检测法则主要依赖聚合酶链式反应,其利用与靶序列两端互补的寡核苷酸引物对 DNA 序列进行检测,具有更高的检测灵敏度。由于特征基因已知,食用油脂中的转基因植物成分定性检测主要通过核酸检测技术鉴定。简便高效的 DNA 提取方法,是进行核酸检测和转基因标签鉴定的基础。

DNA 的提取方法已不断完善,发展较成熟的 DNA 提取方法有硅藻土法、磁珠法、离心柱法和试剂盒法等。梅玲玲等用蛋白酶 K 裂解法提取出多种食品中的转基因成分,从中获得高浓度的食用油 DNA 提取液;程红梅、袁建琴用中性磷酸盐缓冲溶液(PBS)和正己烷提取出大豆油中的 DNA;杨冬燕等用 CTAB 直接抽提精炼植物油,得到了目的 DNA。但由于精炼食用油中 DNA 含量本身很少,不能保证所有油中的 DNA 提取成功。因此,开发成本低、高效、稳定的方法是油类 DNA 检测研究的重点。

目前 DNA 的常用提取试剂为 SDS 和 CTAB。方法用 CTAB 和 SDS 两种常规提取液,采用 5 种方案对 15 种来自不同生产厂家及加工精度的棉籽油进行 DNA 的提取。通过扩增内源基因 tRNA *Leu* 并进行琼脂糖凝胶电泳,

对各方案的 DNA 提取效率进行评价,以期获得一种简便高效的 DNA 提取方法。

2.1.1 材料与方法

2.1.1.1 试剂及主要试剂的配制

三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、醋酸钠 (NaAc): 天津市博迪化工有限公司; 乙二胺四乙酸二钠 (Na_2EDTA): 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB): 天津市科密欧化学试剂有限公司; 十二烷基硫酸钠 (SDS): 北京拜尔迪生物公司; 分析纯级三氯甲烷、异戊醇、异丙醇、无水乙醇、氯化钠 (NaCl): 天津市永大化学试剂有限公司; β -巯基乙醇: Amresco 公司; 100bp DNA Ladder Marker, rTaq 预混液、引物: 大连宝生物技术公司合成。担体: 本单位自提非转基因大豆基因组 DNA。

TE 缓冲液: Tris 0.010mol/L, Na_2EDTA 1.0mmol/L, pH 8.0。

CTAB 提取液: CTAB 20g/L, NaCl 1.4mol/L, Tris 0.1mol/L, Na_2EDTA 0.02mol/L, pH 8.0。

2.1.1.2 试验材料与仪器

试验材料

棉籽油 1, 全精炼; 棉籽油 2, 浸出三级; 棉籽油 3, 精炼; 棉籽油 4, 半精炼; 棉籽油 5, 精炼; 棉籽油 6, 浸出三级; 棉籽油 7, 全精炼; 棉籽油 8, 精炼; 棉籽油 9, 全精炼; 棉籽油 10, 半精炼; 棉籽油 11, 半精炼; 棉籽油 12, 半精炼; 棉籽油 13, 全精炼; 棉籽油 14, 精炼; 棉籽油 15, 精炼。

试验仪器

恒温水浴锅: 余姚市东方电工仪器厂; 恒温振荡器: 金坛市富华电器有限公司; MS3 涡旋混匀器: IKA 公司; 水平电泳仪: 北京市六一仪器厂; 050-811 Tgradient96 定性 PCR 仪: Biometra TGradient 公司; 凝胶成像系统: Bio-Rad 公司。

2.1.2 棉籽油 DNA 的提取

本方法采用 SDS 和 CTAB 两种常规提取液,以 SDS 法和国标法为基础,并对国标法进行优化,最终确立 SDS 法、国标法、大量富集法、直接

裂解法、上清重复离心法 5 种方案。由于 5 种方案遵循共同的 DNA 提取步骤，精简介绍如下。

(1) DNA 富集：TE 缓冲液中加入棉籽油，混匀后，13000r/min，室温离心 3min，弃油脂；重复多次使 DNA 富集于水相。水相 400 μ L/管分装于 1.5mL 离心管。

(2) 裂解：水相中加入 SDS/CTAB 提取液，65 $^{\circ}$ C 水浴 30min，每 10min 轻微摇匀一次。

(3) 纯化，分离有机相：SDS 提取液裂解后加入醋酸钠溶液 (NaAc)，而用 CTAB 提取液裂解后加入等体积三氯甲烷:异戊醇 (24:1)；轻微混匀后静置，13000r/min，离心 5min，转移上清；反复抽提一次。

(4) 沉淀 DNA：上清中加入担体及沉淀剂，轻微混匀后 -20 $^{\circ}$ C 过夜；13000r/min，4 $^{\circ}$ C，离心 10min，弃上清。

(5) 洗涤，干燥：用 70% 乙醇洗涤沉淀两次，干燥 15min。

(6) 溶解 DNA：加入 0.1 $\times$ TE 溶解 DNA，37 $^{\circ}$ C 保温 1h 后 4 $^{\circ}$ C 保存。

在基本流程的基础上，5 种 DNA 提取方案的优化流程不同，下面将分别予以介绍。

2.1.2.1 SDS 法提取 DNA

A. 400 μ L TE 缓冲液中加入 1mL 棉籽油，上下颠倒混匀 5min，离心 3min；去上层油脂；重复 20 次，得约 400 μ L 水相； $\rightarrow$ B. 水相中加入 200 μ L 20% SDS，水浴； $\rightarrow$ C. 加入 100 μ L 5mol/L NaAc，轻轻摇匀，冰上放置 30min，离心 10min； $\rightarrow$ D. 将上清移至新离心管，加入 1 μ g 担体、等体积无水乙醇和 0.1 倍体积 3mol/L NaAc (pH 5.2)，颠倒混匀后，-20 $^{\circ}$ C 放置 2h；离心，弃上清； $\rightarrow$ E. 沉淀用 500 μ L 70% 乙醇洗涤 2 次，干燥 15min； $\rightarrow$ F. 加入 30 μ L 0.1 $\times$ TE。

2.1.2.2 国标法

A. DNA 富集 $\rightarrow$ B $\rightarrow$ C $\rightarrow$ D. 沉淀 DNA 时加入 1 μ g 担体，450 μ L 异丙醇； $\rightarrow$ E. 500 μ L 70% 乙醇洗涤两次； $\rightarrow$ F. 加 30 μ L 0.1 $\times$ TE 溶解 DNA。

2.1.2.3 大量富集法

A. 50mL 离心管中加入 5mL TE 和 35mL 棉籽油，富集 15 次后 400 μ L/管分装水相； $\rightarrow$ B $\rightarrow$ C. 纯化后所有上清移至一个 10mL 离心管； $\rightarrow$ D. 沉淀 DNA 时加入 10 μ g 担体，0.6 倍体积的异丙醇； $\rightarrow$ E. 2mL 70% 乙醇洗涤 2

次；→F. 用 50 μ L 0.1 $\times$ TE 溶解 DNA，37 $^{\circ}$ C 水浴 1h 后移至 1.5mL 离心管，4 $^{\circ}$ C 保存。

2.1.2.4 直接抽提法

A. 50mL 离心管中加入 5mL 含 1% β -巯基乙醇的 CTAB 提取液（现用现配，65 $^{\circ}$ C 预热）和 35mL 棉籽油，180 次/min，45 $^{\circ}$ C，振荡 30min 后，离心 5min。去除油层，富集 6 次。水相按 600 μ L/管加入 1.5mL 离心管中；→B. 每管加 600 μ L 三氯甲烷:异戊醇（24:1）进行纯化，纯化后所有上清移至 10mL 离心管；→C. 后续步骤同 2.1.2.3。

2.1.2.5 上清重复离心法

A. 50mL 离心管中加入 35mL 棉籽油和 5mL TE，平置于振荡仪，固定，180 次/min，37 $^{\circ}$ C，振荡 30min，离心 5min，去油脂层；富集 10 次后 400 μ L/管分装水相；→B→C. 纯化；→D. 沉淀 DNA 时加入 10 μ g 担体，0.6 倍体积的异丙醇，-20 $^{\circ}$ C 过夜后离心 15min；并将上清液轻轻移至另一 10mL 离心管重复离心一次，弃上清；→E. 2 管均用 2mL 70% 乙醇洗涤 2 次；→F. 2 管中各用 30 μ L 0.1 $\times$ TE 溶解 DNA，37 $^{\circ}$ C 水浴 1h 后移至同一个 1.5mL 离心管，4 $^{\circ}$ C 保存。

2.1.2.6 效果评估

由于各方案在沉淀 DNA 过程中都加入了担体，无法检测棉籽油 DNA 实际浓度和纯度，因此用 PCR 扩增结果比较各方案的 DNA 提取效率。本方法对小片段内源基因 tRNA *Leu*（180bp）进行 PCR 扩增，以其产物的凝胶成像结果评估食用棉籽油 DNA 的提取效果，并对提取效率最高的方案中获得的 DNA 进一步用外源基因 *FMV35S*（210bp）进行扩增，验证 DNA 产物能否进行棉籽油转基因成分检测。

（1）PCR 引物序列 tRNA *Leu* 基因引物序列（5' $\rightarrow$ 3'），上游引物为 cgaaatcggtagacgctacg，下游引物为 ttccattgagtctctgcacct；*FMV35S* 基因引物序列（5' $\rightarrow$ 3'），上游引物为 aagacatcccaccgaagactta，下游引物为 ttccattgagtctctgcacct。

（2）25 μ L PCR 反应体系：rTaq 预混液 12.5 μ L，10mM 的上下游引物各 1 μ L，DNA 模板 3 μ L，去离子水 7.5 μ L。空白对照以无菌双蒸水代替样品提取 DNA，阴性对照以担体 DNA 为扩增模板，阳性对照以转基因棉籽油为底物，在各方案中提取的 DNA 为扩增模板。

C. PCR 扩增程序

tRNA *Leu* 扩增程序：变性阶段，95℃，4min。扩增阶段，95℃，30s；55℃，30s；72℃，60s；循环 30 次。延伸阶段，72℃，5min。4℃ 终止反应。

FMV35S 扩增程序：变性阶段，95℃，5min。扩增阶段，95℃，20s；55℃，40s；72℃，60s；循环 40 次。延伸阶段，72℃，5min。4℃ 终止反应。

D. 电泳检测取 10μL PCR 扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳，凝胶成像仪下观察电泳结果。

2. 1. 3 结果与分析

2. 1. 3. 1 样品 tRNA *Leu* 基因 PCR 检测结果

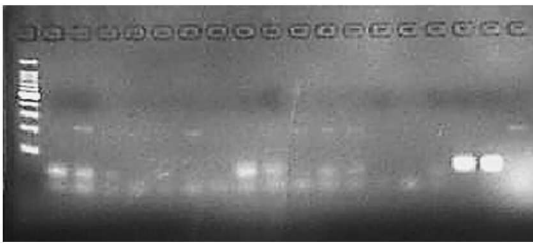
以 5 种方案提取的 DNA 为模板，进行内源基因 tRNA *Leu* 扩增产物电泳图，结果见图 1 A 至 E。结果显示 SDS 法扩增的目的条带最少，国标法次之，直接抽提法、大量富集法、上清液重复离心法提取效率依次增高，分别得到 4、5、6、10、12 个目的条带。其中 2、6、10、11 号样品在 5 种方案中都扩增出目的条带，2 号和 6 号样品 DNA 扩增条带最亮，表明其 DNA 浓度高；1、9、13 号样品均未扩增成功；其他样品 DNA 在部分方案中扩增出目的条带。

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18



A

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18



B

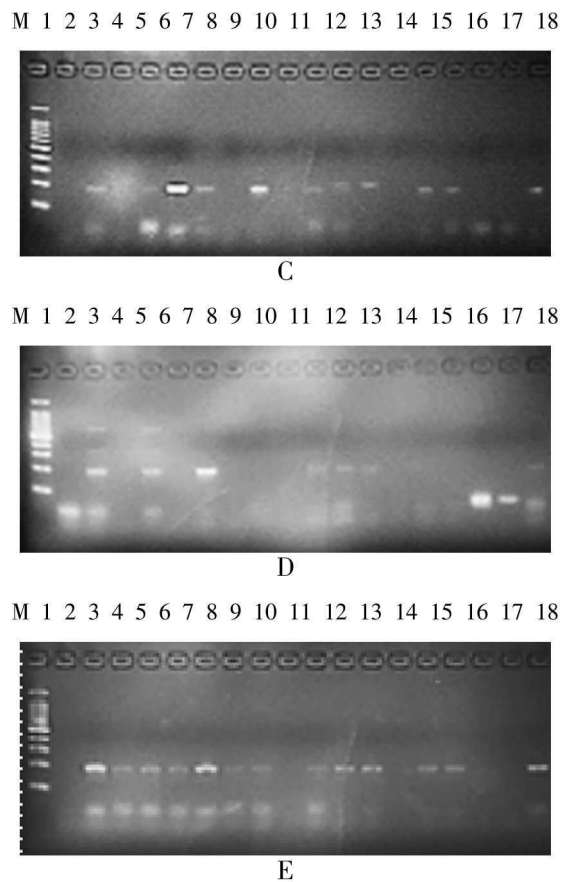


图1 5种方案提取的DNA产物进行tRNA *Leu* 扩增后的电泳结果

A. 方案2.1.2.1得到的DNA提取液进行tRNA *Leu* 扩增后的凝胶电泳结果，2、6、10、11号样品扩增出目的条带。B. 方案2.1.2.2扩增结果电泳图，2、6、10、11、12号样品扩增出目的条带。C. 方案2.1.2.3扩增结果电泳图，2、4、5、6、8、10、11、12、14、15号样品扩增出目的条带。D. 方案2.1.2.4扩增结果电泳图，2、4、6、10、11、12号样品扩增出目的条带，2号和4号样品的扩增条带不纯，暂推测为引物二聚体的干扰或者PCR循环30次的非特异性扩增。E. M为100bp的DNA Marker，1~15分别代表15个样品，16为空白对照，17为阴性对照，18为阳性对照。

从加工程度分析，2号和6号样品为浸出三级棉籽油，10号和11号样品为半精炼棉籽油，DNA在5种方案中全部提取成功；1、9、13为全精炼棉籽油，5种方案均未提取成功。表明棉籽油精炼程度越深，DNA降解越严重，含量可能越少。从样品存放时间来看，3、9、13号样品的存放时间均超过6个月，其他样品的存放时间较短。食用油长期存放也可能加重

DNA 的降解程度。

DNA 富集步骤中，方案 SDS 法和国标法的底物少，DNA 提取效率低，后 3 种方案将样品大量富集后，DNA 提取效率增高。其中大量富集法是国标法的直接改进，加大样品富集量后，提取 DNA 效率比国标法增高了一倍。从操作步骤进行分析，SDS 法产物低也可能是沉淀过程中的 pH 不当，影响了 DNA 的完全沉淀，造成 DNA 流失。直接裂解法用 CTAB 进行富集和裂解处理，步骤简单，但结果提取效率偏低，可能由于富集过程油相和水相的界面出现较多的膏状物质，形成了固体斜面，将其去除后水相产物减少。另外，该方案在 CTAB 提取液中加入 1% β -巯基乙醇用于消泡、抗氧化及去除酚类，提取效率却没有提高，推测酚类物质可能极少，不会干扰 DNA 的提取效率。上清重复离心法是本书的最优提取方案，在样品大量富集的基础上将离心管平置振荡，加大了 DNA 在水相的溶解程度；适当延长了离心沉淀的时间，并将异丙醇沉淀后的上清液重复离心，DNA 提取效率最高。

2.1.3.2 外源基因检测结果

以方案 5 提取到的 12 个 DNA 产物为模板，进行 *FMV35S* 外源基因扩增的凝胶电泳图见图 2，含转基因成分的 3、4、8、12、14、15 号样品全部被检测出。

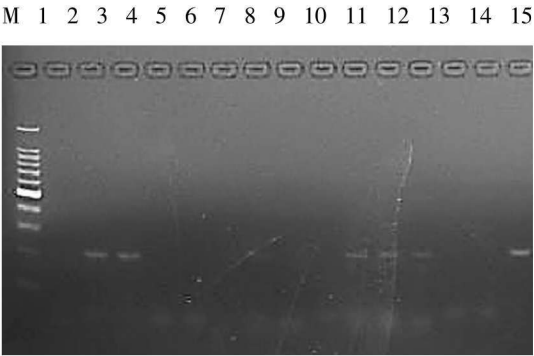


图 2 上清重复离心法扩增出 DNA 的样品进行 *FMV35S* 外源基因扩增的结果

1~12: 2、3、4、5、6、7、8、10、11、12、14、15 号样品；13: 空白对照；14: 阴性对照；15: 阳性对照。

检测结果与产品标签一致，表明上清重复离心法得到的 DNA 提取液可用于转基因成分的定性检测。图中 8 号样品的转基因目的条带较模糊，是

由于其 DNA 提取液的浓度偏低,这与图 1E 中 8 号样品的扩增电泳条带较暗相一致。

2.1.4 讨论

作物的种子和其他组织含有丰富的 DNA,但食用油经过多重加工后 DNA 含量极少,提取 DNA 的难度加大。5 种方案提取精炼棉籽油 DNA 的结果说明,棉籽油经过理化处理、加热等步骤后,精炼程度越深,油中的 DNA 含量越少,提取难度越大。此外,存放时间越长, DNA 降解可能越严重。

PCR 扩增进行效果评估时,目标片段的选择会影响检测结果。植物油加工过程中会不同程度的断裂基因组 DNA,本方法选用多拷贝小片段基因为引物,即 180bp 的 tRNA *Leu* 内源基因和 210bp 的 *FMV35S* 外源基因,有效降低了扩增的假阴性率。引物的特异性强,可用于常规的核酸检测。

本章采用 5 种 DNA 提取方案,通过比较内源基因 tRNA *Leu* 的扩增结果,确定上清重复离心法在本书中的 DNA 提取效率最高。其获取的 DNA 提取液能进一步扩增外源基因 *FMV35S*,用于棉籽油转基因成分的定性检验。该方法的优点总结如下:

(1) 先将 DNA 溶于 TE 缓冲液,再用 CTAB 提取 DNA 的效率;加大 DNA 与 TE 缓冲液的溶解程度有利于提高 DNA 的提取效率。

(2) DNA 大量富集是成功提取精炼棉籽油 DNA 的关键。

(3) 三氯甲烷:异戊醇 (24:1) 反复抽提一次,可较大程度提高 DNA 纯度。

(4) 加入异丙醇后于 -20°C 沉淀过夜,使 DNA 沉淀彻底;将异丙醇沉淀后的上清液重复离心,收集沉淀,能有效减少人为操作引起的 DNA 损失,这对于提高 DNA 的提取效率至关重要。

2.2 应用依赖解旋酶 DNA 扩增技术检测转基因大豆

随着现代科技在农业生产中的应用,转基因作物近年来得到迅速发展,转基因食品在传统食品市场中份额不断加大。转基因大豆是较早商业化生产的转基因作物之一,与非转基因大豆相比,转基因大豆在产量、抗逆能力、品质改良、解决人类面临的环境污染、温饱问题日益显出巨大作用。同时,转基因作物的安全性也逐渐成为人们关注的焦点,具体包括食用安全性和生态安全性。由于转基因食品的安全性短时间内难以确定,各国对转基因食品使用标签制度进行管理,所以急需建立一套准确、快速检测转基因食品的方法。

目前,对转基因大豆的实验室检测包括基于核酸的检测技术如 PCR 方法、实时荧光 PCR、多重 PCR、巢式 PCR、等温环介导 PCR,这些方法检测速度快,特异性高,但特定的仪器难以普及应用并且检测费用昂贵。基于蛋白检测的方法主要是 ELISA (酶联免疫)法,此方法需要的抗体和抗原制备较为困难,价格昂贵。

近年来,一种新型核酸恒温扩增技术依赖解旋酶 DNA 恒温扩增技术(helicase - dependent isothermal DNA Amplification)因其操作简单、结果准确、反应灵敏、无须特殊仪器、便于普及而广泛受到关注。HDA 技术是核酸等温扩增技术的一种,主要利用解旋酶在恒温下解开 DNA 双链,同时 DNA 单链结合蛋白(SSB)稳定解开的单链为引物提供结合的模板,之后由 DNA 聚合酶催化合成互补链。新合成的双链在解旋酶作用下又解成单链,并作为下一轮合成的模板进入上述循环扩增反应,最终实现靶序列的指数式增长。HDA 法目前已经应用于一些致病菌的检测,本方法拟采用以 *CaMV35S*、*NOS*、*CP4 - EPSPS3* 种外源基因和内标基因 *Lectin* (大豆凝集素基因)为目的片段设计 4 对特异引物,建立快速检测转基因大豆的新体系。

2.2.1 材料与方法

2.2.1.1 试验材料

非转基因大豆和 RRS 转基因大豆均购置于国家标准物质中心。

2.2.1.2 试验主要试剂与仪器

十六烷三甲基溴化铵(CTAB):天津市科密欧化学试剂有限公司;三

羟甲基氨基甲烷 (Tris): 天津市博迪化工有限公司; 乙二胺四乙酸二钠 (Na_2EDTA): 北京鼎国昌盛生物技术有限公司; 三氯甲烷、异戊醇、无水乙醇、氯化钠 (NaCl): 天津市永大化学试剂有限公司; 大肠杆菌解旋酶 II (UvrD): 上海富众生物科学有限公司; MutL 蛋白、T4 噬菌体基因 32 编码蛋白、Bst 聚合酶: New England 公司; dNTP, 100bp DNA Ladder Marker, ATP (三磷酸腺苷): 大连宝生物技术公司。

电泳仪为北京市六一厂生产 DXY-33A 型电泳仪, 凝胶成像系统为美国伯乐公司 Bio-rad Gel Doc XR 凝胶成像系统, 金属浴为上海东升仪器有限公司生产的 6400 型恒温金属浴。

2.2.1.3 大豆 DNA 的提取

使用将大豆研磨成粉末状, 称取 100mg 大豆粉末, 加入 2mL 的离心管; 加入 1000 μL CTAB 提取液和 2 μL RNase 酶溶液, 充分混匀, 65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30min, 不时振荡; 12000r/min 室温离心 5min, 将上清液转移至另一干净的 2mL 离心管中; 加入等体积 24:1 三氯甲烷:异戊醇, 轻缓颠倒数次后室温静置 5min, 12000r/min 室温离心 10min, 将上清液转移至另一干净的 1.5mL 离心管中; 加入 2 $\times$ 体积 CTAB 沉淀液, 颠倒混匀后, 室温静置 1h; 加入 400 μL 1mol/L 氯化钠溶解沉淀, 56 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15min, 中间轻摇离心管数次助溶, 加入 800 μL 经 -20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的无水乙醇, 颠倒混匀后 -20 $^{\circ}\text{C}$ 静置 1h, 15000r/min, 室温离心 10min, 小心弃去上清液; 70% 乙醇洗涤沉淀 2~3 次, 干燥 DNA; 50 μL 0.1 $\times$ TE 溶解沉淀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.2.1.4 引物设计

根据抗除草剂草甘膦的转基因大豆, 转入外源基因有 *CaMV35S* 启动子、*NOS* 终止子和 *CP4-EPSPS* 基因, 以此类基因为检测目的片段, 以 *Lectin* 基因作为内源基因检测 DNA 的提取质量。根据美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 公布的外源基因和内源基因的准确序列, 使用 Primer Premier 5.0 引物设计软件, 并进行 Blast 比对, 设计 4 对特异性扩增引物如下:

lectin 基因序列, 上游引物为 CCGAAGCAACCAAACATG, 下游引物为 CAGCACCCCAAATCGGTGCT, 目的扩增产物 409bp; *CaMv355* 基因序列, 上游引物为 CGTTCCTGGGAAGGAGATAT, 下游引物为 AAAGGAAAGGC-CATCGTTGAAG, 目的扩增产物 191bp; *NOS* 基因序列, 上游引物为 AATCT-GTTGCCGGTCTTG, 下游引物为 GACGTTATTTATGAGATGGG, 目的扩增产物