



应用现代生物技术 鉴别农产品

王庆贵 著

哈尔滨地图出版社

应用现代生物技术 鉴别农产品

YINGYONG XIANDAI SHENGWU JISHU
JIANBIE NONGCHANPIN

王庆贵 著

哈尔滨地图出版社

· 哈尔滨 ·

图书在版编目(CIP)数据

应用现代生物技术鉴别农产品/王庆贵著. —哈尔滨:
哈尔滨地图出版社, 2008. 9

ISBN 978-7-80717-926-9

I. 应… II. 王… III. 生物技术—应用—作物—种子—
鉴别 IV. S339.3

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 140564 号

哈尔滨地图出版社出版发行

(地址:哈尔滨市南岗区测绘路2号 邮政编码:150086)

哈尔滨海天印刷设计有限公司印刷

开本:850 mm×1 168 mm 1/32 印张:5 字数:115 千字

2008 年 9 月第 1 版 2008 年 9 月第 1 次印刷

ISBN 978-7-80717-926-9

印数:1~1 000 定价:28.00 元

前 言

黑龙江省是农业大省,是国家重要的商品粮基地,粮食总产量已超过 350 亿千克。当前,我省正处于由农业大省向农业强省迈进的关键时期,站在由产量、速度型向质量、生态、效益型转换的十字路口。同时,科教兴农战略中充分应用高新技术是提高农产品质量,实现农业可持续发展的纽带和桥梁。随着科教兴农战略的实施,为了满足提高产量、改善品质、符合市场经济规律发展的需要,我国已培育出了大量的农作物新品种。仅以主要农作物为例,目前,我国水稻品种已接近 5 万个、小麦品种 3 万个、大豆品种 2 万个、常用蔬菜 80 种约 2 万个品种。但品种越多,对检测鉴定工作要求就越高,需要利用快速准确且具有专一性的检测方法,鉴定几万个品种之间的细微差别。

PCR 技术是由发明此技术而荣获 1993 年度诺贝尔化学奖的 Mullis 等人于 20 世纪 80 年代末发现的一种聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction,简称 PCR),是一种先进的选择性体外扩增 DNA 或 RNA 片段的快速技术。90 年代初,在世界范围内该技术迅速进入生命科学、医学研究、遗传工程、疾病诊断、法医学、考古学等各个领域。该技术的实质是体外酶促合成特异性 DNA 片断,经高温变性—低温退火—适温延伸三个阶段为一周期,使其按 2^n 指数方式扩增,经 30 次左右的循环,用几十分钟到几小时时间,迅速将原来痕量的 DNA 片断扩增到足以供实验人员方便进行检测与分析的数量。此方法具有所需样品少,检测时间短,专一性强,准确性高,简便易行等优点。由于 PCR 技术具有的优越性,在分子生物学,动物、植物和微生物的生物多样性(遗传多样性、物种多样性、生态系统多样性)等

领域中极富生命力,并广泛应用于基因的分离、克隆和 DNA 序列的分析;突变体和重组体的构建,基因表达与调控的研究;遗传病和传染病的诊断,法医鉴定和进出口生物制品检测等方面。

目前,在全国各地存在着严重的种子、苗木果实和农产品加工品的混杂掺假、以劣充优的不良现象,使国家蒙受巨大的经济损失并产生极其恶劣的社会影响,这种现象已经成为困扰我国农业和市场经济有序发展的一个不容忽视的问题。产生这种现象的原因之一,是由于我国目前尚缺少有效的科学鉴定手段。因此必须尽快开发出一整套适合农产品质量检验检测领域的,对农产品、农产品加工品、部分农业生产资料及农产品生产、收购、经销、消费全过程中均适用的快速有效的鉴别技术及相关标准,这是摆在我们面前的一项亟待解决的研究课题,这一技术的突破,将极大地改变目前我国 DNA 水平鉴定技术落后的局面,保障农业生产的正常有序发展,而且可为《植物新品种保护法》及《中华人民共和国种子法》提供立法和执法的科学依据,同时也将有利于保护新品种选育者的合法权益,促进农业发展。

为了克服常规的形态鉴别技术的局限性,对动植物、微生物品种之间的鉴别上曾使用同工酶和种子蛋白电泳技术、生物蛋白和同工酶作为基因的产物,其结构的多样性在一定程度上反映生物蛋白质和同种酶不同种分子形式组成上的差异和生物的遗传多样性,但由于其为基因表达产物,仅是 DNA 全部多态性的一部分,而且其特异性易受环境条件和发展阶段的影响。因此,对遗传变异的检测远不及基于 PCR 技术的 DNA 指纹分析的分辨率和鉴别程度。首先,基于 PCR 技术的分子标记检验的对象是 DNA,从理论上讲,可供探测 DNA 标记的数量可能是无限的,这是同工酶技术所无法比拟的。其次,PCR 分析技术在动物、植物和微生物体内的任何部位、任何时期提供的 DNA 检测结果都是一样的。第三,DNA 分析不受环境影响,其变异只源于等位基因 DNA 序列的变异,这种稳定性便于揭示品种

间的遗传变异。基于上述优点,DNA 分析技术是农作物、动物等品种鉴定及纯度测定的理想方法。

可以这样说:将 PCR 技术经过消化和吸收,应用到农产品鉴定领域中,是科学发展的必然趋势,具有高度的可行性,十分迫切而必要。本著作分上下两编,上编为《农作物种子鉴别》,主要以黑龙江省主栽的大豆品种为研究对象,详细介绍了利用现代生物技术如何鉴别种类繁多的大豆种子;下编为《转基因农产品鉴别》,主要以黑龙江省主栽的大豆品种和玉米品种为研究对象,介绍了目前较为流行的转基因大豆和转基因玉米的检测方法和手段。本著作是由作者主持的黑龙省攻关项目“PCR 技术在农作物品种鉴定上的应用研究”、“转基因食品检测标准体系的研究”和国家质量监督检验检疫总局攻关项目“应用 PCR 技术鉴别农产品”,以及哈尔滨市青年人才基金项目“转基因农作物检测标准体系的研究”联合资助。其中作者主持的“应用 PCR 技术鉴别农产品”获得 2002 年度黑龙江省科技进步三等奖、“大豆种子品种鉴定实验方法——简单重复序列间区法”获得国家质量监督检验检疫总局 2005 年度科技进步二等奖、“转基因食品检测标准体系的研究”获得 2008 年度黑龙江省科技进步三等奖。可以说,该著作集成了作者近 10 年在该领域的科学研究成果,科学性和实用性很强。

本著作可以作为农业标准化、分子生物学、育种学、农业推广学等领域的研究生、科研工作者参考用书。欢迎广大读者提出宝贵的意见和建议。

作 者
2008 年 5 月

目 录

上编 农作物种子鉴别

第 1 章 农产品鉴别方法	(3)
1.1 种子形态鉴定法	(4)
1.2 田间幼苗形态鉴定法	(4)
1.3 种子染色法	(5)
1.4 种子电泳技术	(5)
1.5 高效液相色谱(HPLC)技术	(9)
1.6 分子检测技术	(10)
第 2 章 分子标记的种类、特点及应用	(12)
2.1 分子标记技术的种类	(12)
2.2 分子标记技术的应用	(17)
第 3 章 分子标记技术在大豆品种鉴定中的具体应用	(36)
3.1 SSR 在大豆品种鉴定中的应用	(36)
3.2 RAPD 技术在大豆品种鉴定中的应用	(43)
第 4 章 大豆品种鉴定的 RAPD 方法研究	(50)
4.1 RAPD 简介	(50)
4.2 试验材料	(54)
4.3 所用器材与试剂	(54)
4.4 引物	(55)

4.5	缓冲液及主要试剂的配制	(57)
4.6	实验方法	(58)
4.7	RAPD 反应体系的建立	(60)
4.8	PCR 扩增产物的电泳检测	(61)
4.9	结果与分析	(61)
4.10	小结	(65)
4.11	讨论	(66)
第 5 章	大豆品种鉴定的 ISSR 方法研究	(68)
5.1	实验材料	(68)
5.2	器材与试剂	(68)
5.3	引物	(69)
5.4	缓冲液及主要试剂的配制	(70)
5.5	实验方法	(72)
5.6	引物的筛选	(74)
5.7	ISSR 反应体系及反应条件的优化	(74)
5.8	PCR 扩增及产物的检测	(75)
5.9	ISSR 扩增谱带的统计分析	(75)
5.10	结果与分析	(75)
5.11	小结	(80)
5.12	讨论	(82)
第 6 章	结论与建议	(85)
6.1	RAPD 和 ISSR 两种方法的最佳反应体系和最佳 实验体系	(85)
6.2	筛选的引物及其可以区分的大豆品种	(87)
6.3	建议	(88)

参考文献	(89)
------------	------

下编 转基因农产品鉴别

第 1 章 转基因农产品检测国内外研究进展	(103)
1.1 转基因农产品发展现状	(103)
1.2 转基因农产品安全性争议	(106)
1.3 转基因农产品检测技术	(110)
第 2 章 研究内容与结果	(115)
2.1 目的基因的搜集与检测标记的确定	(115)
2.2 植物 DNA 的提取及质量检测	(126)
2.3 转基因农产品的定性检测	(131)
2.4 转基因农产品的定量检测	(134)
第 3 章 结论	(143)
参考文献	(145)

上 编

农作物种子鉴别

第1章 农产品鉴别方法

近些年,假冒伪劣农产品屡见不鲜,既损害了消费者的利益,又给农业生产带来了严重威胁,已成为一大“公害”。扫除这一“公害”,净化农产品市场,不仅要通过法律手段、政府行为和舆论监督作用,还要提高广大群众对伪劣农产品识别水平与自我保护的意识。对农产品的真伪鉴别,尤其是对农作物种子的真伪鉴别意义重大。种子真伪鉴别是进行品种纯度检验的前提和基础,是打击假冒伪劣、防止消费者上当受骗、净化种子市场的重要途径。

种子真伪鉴别的方法和技术,主要有田间种植鉴定法、种子形态鉴定法、田间幼苗形态鉴定法、种子染色法、种子电泳技术、种子高效液相色谱技术、种子荧光扫描技术、种子单克隆抗体和储存蛋白质抗体分析技术、染色体鉴定技术,以及以 PCR 技术为基础的分子检测手段等。从种子形态鉴定到分子检测,鉴定方法经历了从实物到遗传物质——DNA 的质的飞跃。

田间种植鉴定法虽直观简便、准确可靠,但所需时间长,在市场中无法使用;幼苗鉴定方法受发芽条件影响较大,准确性差;种子荧光扫描技术受籽粒形状影响较大,加之设备较贵,目前还未进入应用阶段;种子单克隆抗体和储存蛋白质抗体分析技术,抗体制备复杂、费用较大,不能在实际中应用;染色体鉴定技术对于染色体数目或形态差异明显的种间识别有一定作用,但目前对由于基因突变、异位、缺失或添加而引起的品种差异的鉴别还存在技术上的障碍,还需

进一步研究开发;分子检测手段从决定物种的、最根本的遗传物质——DNA 出发,所以最可靠,稳定性最好。

1.1 种子形态鉴定法

自然界的生物有许多非常明显的形态标记,如花的颜色及形状、种皮的颜色等。它们一直是人类选育新类型的重要标记,也是孟德尔遗传学的重要基础。种子形态鉴定是种子真伪鉴别诸方法中最省时、简便、快速、应用最广的一种方法,其理论基础是不同的品种其遗传基因不同,在籽粒形态和内部结构上常常存在许多稳定的遗传因素,如形态、大小、颜色、附属物等种子外部形态;种皮、胚、胚乳等种子内部结构差异,是进行品种鉴别和纯度测定的重要依据。这些单一位点控制的形态性状在大范围的环境下是可以作为遗传标记的。但这类标记有以下几个缺点:①这类标记的表现易受环境和其他修饰基因的影响(如上位基因),如黄瓜的有序性状依据生长环境和修饰基因而不同。因此,性状的描述只有在系统的系谱和环境中的记载时才有意义,许多因素限制了它们作为遗传标记的利用。②有许多重要的农艺性状为数量性状,如株高、穗长、抽穗期等,它们是由几个位点控制的,表现为一个范围,而不是简单的性状差异。因而适合农业生产要求的形态标记非常少。

1.2 田间幼苗形态鉴定法

幼苗鉴定法是在恒温培养箱中培养种子,出苗后根据叶片、叶鞘的大小、形状、颜色,幼茎的粗细、颜色等外部稳定性状来鉴定杂交种

纯度的一种方法。该方法的特点是准确、周期短、成本低,但只适用于个别苗期有明显稳定差异特征种子,具有一定的局限性。

1.3 种子染色法

不同作物的种子在与某些化学药品发生生物化学反应时,可显示出颜色的不同或深浅的差异,据此可将种子予以区别。有适于小麦、大麦、燕麦、水稻等种子的苯酚染色法,适于大豆种子的愈创木酚染色法,适于高粱种子的氢氧化钾染色法,适于小麦种子的氢氧化钠染色法等。

1.4 种子电泳技术

电泳作为一种分析工具起始于 20 世纪 30 年代,它可以分析蛋白质的质量和数量。近几十年来,随着杂交品种的不断增多,种子市场的逐步放开,品种的真假和纯度鉴定显得尤为迫切。目前,全世界都在致力于蛋白质和同工酶电泳鉴定品种技术的研究和实际应用。国内有关专家亦认为,电泳是鉴定品种的有效工具,是非常值得研究、发展和应用的新技术。自 70 年代起,许多种子工作者将国外先进的电泳技术与我国实际工作条件有机地结合起来,研制出许多适用于我国大中型种子企事业单位进行品种鉴定的电泳方法。

种子电泳技术是利用不同物质的带电颗粒在外加电场作用下,其泳动速度不同而达到分离混合物中各组分的分析方法。根据电泳的对象不同,一般可采用蛋白质电泳、同工酶电泳和蛋白质同工酶电泳等 3 种技术,供鉴定用的电泳结果分别为蛋白质电泳图、同工酶电

泳图和蛋白质同工酶电泳图。

目前,用于农作物种子鉴定的主要电泳方法有以聚丙烯酰胺凝胶作为支持介质的聚丙烯酰胺电泳(简称 PAGE)法;以聚丙烯酰胺凝胶系统中加入阴离子去污剂十二烷基磺酸钠(SDS),使其与蛋白质(或多肽)分子结合成复合物,消除或降低蛋白质(或多肽)间天然电荷差异的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法;以凝胶产生 pH 梯度的聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳(IEFE)法。

种子电泳技术具有准确、快速、经济、简便等优点,1986 年国际种子检验协会(ISTA)正式确认了应用聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定小麦、大麦品种的标准程序,为与国际种子检验规程接轨,在新修订的国家种子检验标准中,聚丙烯酰胺凝胶电泳法被列入《农作物种子检验规程》(GB3543.5-93)。

下面就近年来国内电泳在主要农作物品种鉴定上的应用分别叙述如下。

1.4.1 小麦、大麦

目前,国外应用在这两种作物上的电泳方法有 40 多种,给各实验室之间的比较带来困难。ISTA 在 1986 年将方法标准化,采用酸性 PAGE 法,即在 pH3.2 下用 10%聚丙烯酰胺凝胶和甘氨酸-醋酸缓冲液通过 PAGE 分离种子醇溶蛋白。该方法经颜启传等的实际应用研究,现已在我国推广使用。其他技术,如黑龙江省农业科学院谷物分析技术中心傅宾孝等应用甲酸缓冲系统采用 PAGE 法分离小麦醇溶蛋白,也获得了成功。

1.4.2 水稻

我国在水稻遗传变异研究中,发现种子胚或幼苗的酯酶同工酶多态性高,较早应用的方法是幼苗酯酶同工酶电泳,采用 Tris-Cit-

ric 连续缓冲系统(pH8.9)以及低离子浓度的 Tris—甘氨酸电极缓冲液(该方法对加样量要求相当严格),汕优、威优、协优系统各组合均可采用该方法进行鉴定。其次是干种子或幼苗酯酶同工酶鉴定,采用 Tris—HCl 不连续缓冲系统(分离胶 $T=7.5\%$, pH8.9;浓缩胶 $T=2.6\%$, pH6.7)以及高离子浓度的 Tris—甘氨酸电极缓冲液。该方法在凝胶上可加体积相当大的样品提取液,可以使样品各组分得到良好的分离,具有良好的分辨率。中山大学李卓杰和傅家瑞等研究出来的等电聚焦电泳法测酯酶同工酶操作简单、准确,提高了分辨率,但价格较昂贵。其方法是在杂交水稻种子纯度鉴定中采用 pH3.0~pH10.0 的 Ampholin,在电场作用下,酶液在凝胶中自动形成一个连续增加的 pH 梯度,这样可将等电点从 3.0~10.0 的杂交水稻种子同工酶一次地显现在同一酶谱中,既显现了正极酶带,又比普通 PAGE 电泳多显现了负极酶带,所以较真实地反映了该品种的酶谱特征。利用同工酶电泳鉴定杂交水稻种子的纯度已在我国不少种子公司得到应用,但在蛋白质电泳鉴定方面进展不大,报道甚少。中国农科院资源所石思信等研究报道的酸性 PAGE 法是对 IS-TA 小麦品种鉴定方法的改良。目前国外关于水稻品种鉴定的报道也很少,如 Park 和 Stegemann (1979) 比较多种电泳后,发现 pH8.9 的 Poro PAGE 分离清蛋白可区别水稻品种, Sarkar 和 Bose (1984)报道盐溶蛋白可鉴定水稻品种, Kusuma 等用 SDS—PAGE 证明水稻品种间蛋白质亚基组成十分稳定。随着近几年杂交组合的不断推陈出新,品种之间的差异甚微,亲缘关系较近,鉴定更加困难。

1.4.3 玉米

玉米可利用的同工酶有酯酶、过氧化物酶、苹果酸脱氢酶、谷草转

氨酶、细胞色素氧化酶、多酚氧化酶等。经研究发现,酯酶和过氧化物酶的多态性较高。较成功的报道有杨太兴等研究的酯酶同工酶电泳鉴定玉米品种纯度,并对酶谱纯度和品种纯度之间的相关性作了分析,结果表明为极显著的正相关关系,一般品种纯度高于酶谱纯度。颜启传等用过氧化物酶电泳对丹玉 13 号等品种也进行了有效的鉴定,该方法是取单株幼苗部分的少量样品进行电泳制样,可用于品种的真实性和纯度鉴定。玉米种子中蛋白质含量较高,但用普通的 PAGE 很难找到品种之间蛋白质的差异。ISTA 国际种子检验规程对超薄层等电聚焦测定玉米杂交种子纯度和鉴定品种作了介绍,但该方法技术性强,对设备条件要求较高,费用大,一般检验室较难应用。我国的种子工作者根据实际工作条件,借鉴国外的方法,研制成功了许多适用性较强的纯度检验方法。河北省农产(商)质量监督检验站研制的种子蛋白乳酸—聚丙烯酰胺凝胶电泳法,分析对象是玉米种子的全蛋白。郑州粮食学院研制的玉米种子蛋白质凝胶电泳法,分析的是玉米种子盐溶蛋白,分辨率高,对 125 个中国玉米品种都可进行鉴定。张春庆等利用连续醋酸—尿素系统(AU—PAGE)和不连续醋酸—尿素系统(NAU—PAGE)均成功地发现了玉米种胚蛋白质间存在的多态性。该技术属阳离子电泳系统,以玉米贮藏蛋白为电泳对象。郭树怀等对 AU—PAGE 的酶谱纯度与田间种植鉴定纯度进行了相关性分析,结果表明,酶谱纯度比品种纯度低 2~3 个百分点。

1.4.4 大豆

对大豆品种的蛋白电泳鉴定已进行了一些探索,但尚未建立标准的简便有效的电泳程序。大豆蛋白包括两种主要组分:11S 和 7S 球蛋白,约占种子蛋白的 70%。大豆蛋白组成为异质,表现为明显的多态性。因此,利用种子贮藏蛋白的特异性鉴定不同品种是可能