

应用微芯片电泳仪 MultiNA 定性检测转基因玉米 Bt-11

MultiNA-008

摘要：利用植物基因组提取试剂盒提取转基因玉米 Bt-11 标准品的基因组，以玉米内源 Zein 基因作为内参，针对 Bt-11 转基因序列设计特异性引物进行 PCR 扩增，岛津 MultiNA 微芯片电泳仪检测扩增产物，结果显示扩增产物片段长度与理论长度基本一致，表明含有转基因 Bt-11。本实验表明应用 MultiNA 可以实现对转基因玉米中 Bt-11 的定性检测。

关键词：MultiNA PCR 转因检测玉米 Bt-11 转基因定性检测

我国目前进口玉米来自于美国 and 阿根廷，美国 and 阿根廷是全球最大的两个玉米种植和出口大国，种植的玉米大部分（80% 以上）都是转基因，品系至少 35 个，外加多基因复合品系，品系近 50 个。然而，我国许可进口的转基因玉米品系只有 15 个，它们是抗农达玉米 NK603，抗虫耐除草剂玉米 MON88017，抗虫玉米 MON89034，抗虫玉米 MIR604，抗除草剂玉米 GA21，抗虫耐除草剂玉米 Bt-11×GA21，抗除草剂玉米 T25，抗虫玉米 MON810，抗虫玉米 MON863，抗虫玉米 TC1507，抗虫玉米 59122，抗虫玉米 Bt-11，抗虫玉米 Bt-176，耐旱玉米 MON87460，品种改良玉米 3272。转基因玉米 Bt-11 为兼具抗虫害及耐除草剂两种特性的品

系，其转入的抗虫基因为 Bt 系列毒蛋白基因的 Cry1Ab 抗虫基因，转入的耐草丁膦除草剂基因是草丁膦乙酰转移酶基因 (phosphinothricin acetyl transferase gene)。

本文根据转基因玉米 Bt-11 特异性序列设计特异性引物，对样品进行 PCR 扩增，MultiNA 检测扩增产物。依据是否扩增获得预期 207 bp 的特异性 DNA 片段，判断是否含有 Bt-11 转基因成分。本实验以转基因玉米 Bt-11 标准品为检测对象，MultiNA 检测出样品中 209 bp 的特异性片段，与预期片段长度基本一致，表明本实验方法可以实现定性检测玉米中的 Bt-11 转基因成分。

实验部分

1.1 仪器

MCE-202 MultiNA

1.2 试剂

植物基因提取试剂盒 (北京勤邦生物技术有限公司, FZ-002)

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 (岛津公司, P/N 292-27910-91)

样品：欧洲标准物质玉米粉末，转基因玉米 Bt-11 含量 4.89% (ERM-BF412f)

引物：玉米内源 Zein，转基因 Bt-11 的引物设计如表 1 所示。

表1 针对玉米内源Zein, 转基因Bt-11设计引物及PCR扩增信息

检测基因	引物序列	PCR理论产物大小/bp
玉米内源Zein	5'-tgaaccatgcatgcagt-3'	190
	5'-ggcaagaccattggtga-3'	
转基因Bt-11	5'-tatcatcgacttccatgacca-3'	207
	5'-agccagttaccttcggaaaa-3'	

1.3 分析条件

MultiNA Marker 混合模式：On-chip 混合

1.4 样品中 DNA 的提取与纯化

1.4.1 液氮研磨 0.5 g 左右的植物组织，将粉末转移到 2 mL 离心管中。

1.4.2 加入抽提液 A 0.5 mL，混匀后 65°C 水浴 1 h。

1.4.3 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。

1.4.4 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 4 μL 助沉剂 2，充分混匀后于 -20°C 沉淀 1 小时。

1.4.5 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。

1.4.6 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。

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

1.5 PCR 反应体系

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 (10μM)	0.8 μL	0.4 μM
PCR Reverse Primer (10μM)	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

1.6 MultiNA 检测

PCR 扩增产物进入 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，本文同时阴性对照实验，阴性对照的反应体系中不加入 DNA 模板。

■ 结果讨论

图 1 与图 2 是 MultiNA 测量转基因玉米 Bt-11 的凝胶图和电泳图。实验结果显示玉米内源 Zein 基因片段长度为 196 bp，与理论片段长度 190 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。对于转基因 Bt-11，结果显示检测出 209 bp 的基因片段，与预期的 207 bp 基本相同，说明成功检测出 Bt-11 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。

■ 结论

本文基于分子生物学技术，采用岛津公司 MCE-202 MultiNA 建立了定性检测转基因玉米 Bt-11 的方法。此方法对于检测 Bt-11 品系转基因玉米灵敏度强，操作简便，结果准确，可供检测机构作为参考。

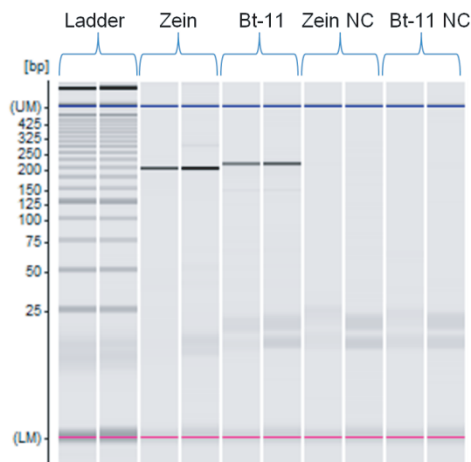


图1 MultiNA检测转基因玉米Bt-11凝胶图 (NC: 阴性对照)

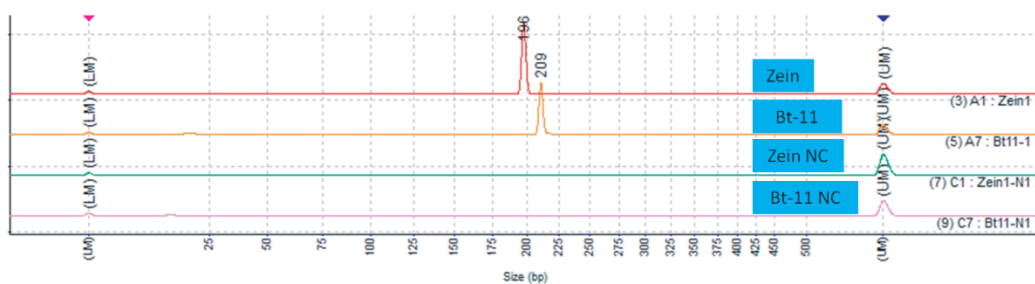


图2 MultiNA检测转基因玉米Bt-11电泳图 (NC: 阴性对照)