

应用 MultiNA 和 PCR 方法定性检测转基因玉米 NK603

MultiNA-012

摘要： 利用植物基因组提取试剂盒提取转基因玉米 NK603 标准品的基因组，以玉米内源 Zein 基因作为内参，针对 NK603 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，结果显示检测到 NK603 成分的扩增条带。本实验表明应用 MultiNA 可以实现对转基因玉米中 NK603 的定性检测。

关键词： MultiNA PCR 转基因检测玉米 NK-603 转基因定性检测

为保障在农产品进出口贸易中的利益，许多国家和地区都对转基因作物的环境释放和市场销售采取了较为严格的管理政策。目前，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。玉米品系 NK603 是

美国孟山都公司研发的抗草铵膦的一种转基因玉米，商品名为 RoundupReady 玉米。编码草铵膦耐受基因 (EPSPS) 是从根瘤土壤菌 CP4 品系中提取出来的并使用重组 DNA 技术引入玉米中。

本文根据转基因玉米 NK603 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。实验结果显示 NK603 特异性扩增条带被 MultiNA 成功检出，表明本实验方法可以实现定性检测玉米中的 NK603 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 NK603 含量 4.91% (ERM-BF415f)

引物：玉米内源 Zein，转基因 NK603 的引物设计如表 1 所示。

表1 针对玉米内源Zein，转基因NK603设计的引物

检测基因	引物序列	PCR理论产物大小/bp
玉米内源Zein	5'-tgaacctatgcatgcagt-3'	190
	5'-ggcaagaccattggtga-3'	
转基因NK603	5'-tcccgaactctcttctcaagca-3'	122
	5'-acagatccactcaaacactagag-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 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 (10 μM)	0.8 μL	0.4 μM
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.8 μL	0.4 μM
DNA模板	2.0 μL	2 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，本文同时进行了阴性对照实验，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 NK603 的凝胶图和电泳图。从标准样品可检测到玉米内源 196 bp 的 Zein 基因，与理论片段 190 bp 基本一致，可确认 DNA 提取以及 PCR 反应已经顺利实施。另外，在 NK603 转基因玉米标准品种也确认到了转基因 NK603 的 118 bp 谱带，虽然 PCR 产物理论大小为 122 bp，考虑到 MultiNA 使用 DNA-500 试剂盒分析时，误差为 5%，结果合理。而阴性对照未检测出，表明无假阳性检出，检测结果准确。

■ 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 NK603 的方法。此方法对于检测 NK603 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。MultiNA 的测定结果可获得电泳图和凝胶图，确认峰的有无、尺寸，方便、可靠地判断目的扩增产物。

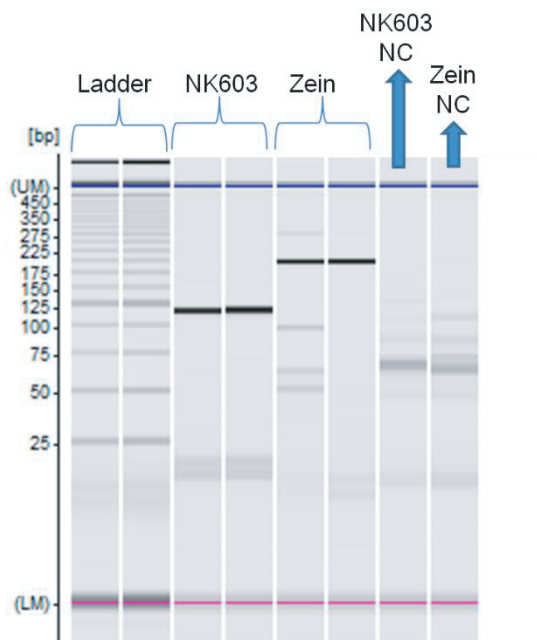


图1 MultiNA检测转基因玉米NK603凝胶图 (NC: 阴性对照)

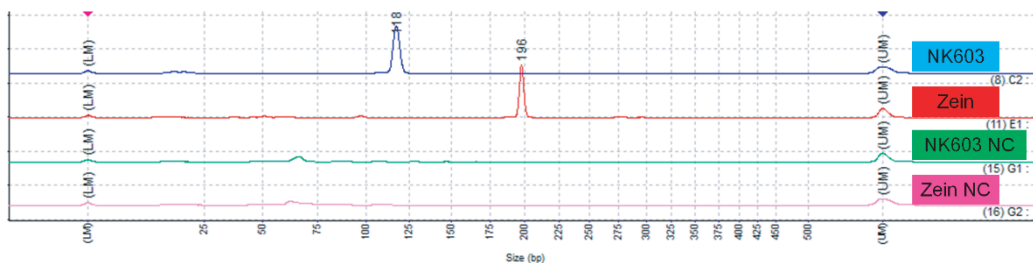


图2 MultiNA检测转基因玉米NK603电泳图 (NC: 阴性对照)