

小麦、玉米中 Bar 基因检测方法与分析

屈海盼¹, 王英芳², 刘美含¹, 王忠¹, 张朋¹

(1. 青海省粮油检测防治所, 青海 西宁 810000; 2. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810000)

摘要:针对小麦、玉米中 Bar 目的基因进行了检测。采用 CTAB 法对玉米、小麦进行 DNA 提取, 并测量 DNA 含量, 有效的 PCR 目的基因扩增和凝、胶电泳。通过阳性对照组合有 Bar 目的基因质粒为模板, 空白对照组以 ddH₂O 为模板, 结果显示: 市场购买小麦中含有检测到 Bar 目的基因而在市售玉米中不含有 Bar 目的基因。

关键词:小麦; 玉米; 基因检测; 聚合酶链式反应; DNA 提取

中图分类号: Q943

文献标识码: A

文章编号: 1674-9944(2018)10-0187-03

DOI: 10.16663/j.cnki.lskj.2018.12.070

1 引言

小麦、玉米作为最重要的粮食作物, 是人类蛋白质的主要摄取来源; 同时富含维生素 B、维生素 E、纤维素及镁、磷等物质^[1]。建国以来, 中国已培育出大量小麦、玉米品种。但近十多年来, 小麦、玉米产量提高速度趋缓, 单产处于徘徊状态。鉴于目前耕地面积不断减少和人口的持续增长, 中国小麦、玉米生产依然面临很大的挑战^[2]。

随着生活水平不断提高、消费需求升级, 居民膳食结构由温饱型向质量营养型转变, 对粮食产品优质化要求越来越高。而在粮食检测上主要以常规检测和分析仪器检测对于分子水平上的检测相对缺乏。为了能将分子技术应用到粮食检测上本实验对玉米、小麦 DNA 提取, 其次对玉米、小麦在同等提取条件下进行 DNA 含量的测定, 最后 PCR 技术对基因检测^[3,4]。在此基础上建立小麦、玉米基因检测方法。该方法的建立可为检测上提供转基因检测方法技术参考。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

市售小麦、玉米(为避免商业嫌疑, 分别编号 W-1, W-2, W-3, W-4, C-1, C-2, C-3, C-4 其中 W 代表小麦, C 代表玉米)、含有目的 Bar 基因质粒(中国科学院西北高原生物研究所)、CTAB(Sigma 分装)、PVPP(kebio)、凝胶琼脂糖 H(Promega)、异丙醇 AR(天津市永大化学试剂有限公司)、无水乙醇 AR(天津市永大化学试剂有限公司)、氯仿 AR(天津市永大化学试剂有限公司)、异戊醇 AR(天津市永大化学试剂有限公司)、50bpDNA Marker、引物(上海生工有限公司)等其他试剂。

2.2 仪器与设备

NanoDrop2000c 微量紫外分光光度计(Thermo)、PCR 扩增仪(eppendorf)、Gel Doc XR+ 凝胶成像分析仪(BIO-RAD)、TissueLyserII 高通量组织研磨仪

(QIAGEN)、SHINVA 3260J 高压蒸汽灭菌锅(山东新华医疗器械公司)、Centrifuge 5430R 高速冷冻离心机(eppendorf)、Centrifuge 5424 小型高速离心机、电泳仪(BIO-RAD)、DK-8D 恒温水浴锅(上海)、2.5 μL、10 μL、200 μL、1000 μL 移液枪(eppendorf)等。

2.3 软件

根据 NCBI 数据库中 GenBank 查找序列并且使 Primer5.0 进行引物设计^[5], 送到上海生物工程有限公司成都合成部合成。

2.4 方法

2.4.1 样品总 DNA 的提取

基因组 DNA 的提取方法采用改良 CTAB 法^[3]。取样品颗粒状麦子、玉米进行粉碎放入 2 mL EP 管立加入定量 PVPP 和 800 μL 65 °C 预热的 CTAB。放入 65 °C 水浴 1-2h, 水浴过程中每 20min 混匀一次, 确保 EP 管中的物质保持悬浮状态。水浴结束后取出 EP 管, 加入 800 μL 氯仿: 异戊醇(24:1)摇晃 10 min 后放入 26 °C 12000 r/min 离心 10 min, 取上层清液, 若上层清液不澄清加入 800 μL 氯仿直到上层清液澄清为止。加入异丙醇 800 μL, 并缓慢上下颠倒, 可见 EP 管内有透明的絮状沉淀, 放入 -20 °C 冰箱冷却 30 min, 再在 4 °C 12000 r/min 离心 20 min 弃掉上层清液, 沉淀先用 70% 乙醇洗涤再用无水乙醇洗涤, 将乙醇挥发烘干后, 加入 100 μL ddH₂O 溶解, 置于 -20 °C 保存备用。

2.4.2 测定 DNA 样本的纯度

取 2.5 μL 上述制备 DNA 溶液, 测量 260 nm 和 280 nm 下的吸光值, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值通常表示 DNA 的纯度。通过 NanoDrop2000c 微量紫外分光光度计可以直接测得 DNA 的纯度也可以通过电泳来测定。

2.4.3 引物的选择以及反应扩增体系

引物的选择以及反应扩增体系见表 1、2。

表 1 引物序列

引物名称	位置	引物序列(5'~3')
Bar	上游	CACCTGCTGAAGTCCCTGGA
	下游	GTACCGCAGGCTGAAGTCCA

收稿日期: 2018-04-07

作者简介: 屈海盼(1989—), 男, 硕士, 主要从事食品科学方面的检测工作。

表 2 PCR 扩增反应体

试剂	加样体积/ μL	反应条件
ddH ₂ O	14.5	94 °C 预变性 3 min,
上游引物	0.4	94 °C 变性 30 s,
下游引物	0.4	60 °C 退火 30 s,
DNA 模板	1.0	72 °C 延伸 30 s,
dNTP	1.6	72 °C 延伸 10 min
10× Buffer	2.0	28 个循环
rTaq	0.1	
反应总体积	20.0	

注:本实验上游引物和下游引物根据上海生工给的 OD 值进

2.4.4 琼脂糖凝胶电泳

称取 1.0 g 凝胶琼脂糖粉于锥形瓶中,加入 50 mL 0.5 x TBE 缓冲液,充分混匀,此时凝胶的浓度为 2%,然后置于微波炉中加热 1 min 使琼脂糖粉完全溶解,取出后自然冷却到 60 °C 左右,加入 1 μL 核酸染料混合均匀后,倒入事先插上梳子的胶槽中,待凝胶完全凝固成型后(约 30 min)拔出梳子,待用。将 1x TBE 电泳缓冲液加入到凝胶电泳槽中,使其超过胶面 1 cm 左右,取 4 μL PCR 扩增产物,盖上盖子,在 120 V 电压下进行电泳,当 Buffer 迁移到合适的距离时(约 20 min)停止电泳。将凝胶从电泳槽中小心取出,放入凝胶成像系统仪中,打开凝胶成像分析软件,在紫外下观察,记录拍照凝胶电泳图像其 Bar 目的 DNA 片段大小为 190 bp。

3 结果与分析

3.1 小麦、玉米样品 DNA 提取

采用 CTAB 对样品小麦、玉米进行 DNA 提取。小麦 W-1, W-2 为同一种样品,小麦 W-3, W-4 为同一种样品。玉米 C-1, C-2 同一种样品,玉米 C-3, C-4 同一种样品。每个样品做两组平行实验。提取的 DNA 通过琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop2000c 微量紫外分光光度计检测。如图 1 所示,其中玉米 C-1, C-2, C-3, C-4 和小麦 W-1, W-2, W-3, W-4 具明显的可见的电泳条带。用 NanoDrop2000c 微量紫外分光光度计检测 DNA 含量可得, C-1 为 1198.4 ng/ μL , C-2 为 881.9 ng/ μL , C-3 为 823.5 ng/ μL , C-4 为 732.6 ng/ μL 。 W-1 为 1055.5 ng/ μL , W-2 为 799.8 ng/ μL , W-3 为 707.8 ng/ μL , W-4 为 907.6 ng/ μL 。

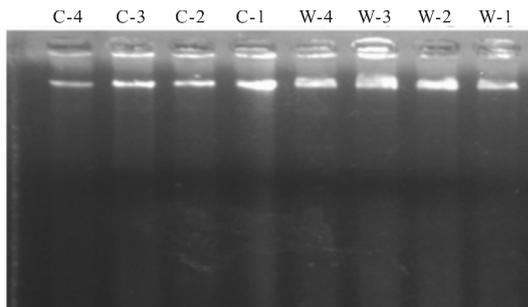


图 1 小麦、玉米样品 DNA 提取

通过提取小麦和玉米 DNA 含量可以发现,小麦和玉米中含有大量的淀粉提取后进一步进行 DNA 纯

化。但是考虑淀粉含量不会影响且痕量 DNA 也能通过 PCR 检测,所以可以进行下步的目的基因检测。

3.2 小麦、玉米引物扩增结果

为了能够检测到 Bar 基因,我们使用含有 Bar 目的基因质粒(中国科学院西北高原生物研究所)并且将其质粒用作阳性对照组为 P、ddH₂O 作为空白对照组为 B。按照表 2 PCR 扩增反应体系对上述样品进行 PCR 扩增,后进行电泳检测。如图 2、3 所示。

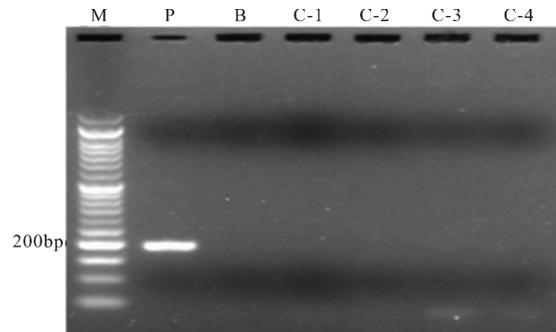


图 2 玉米样品目的 DNA 扩增

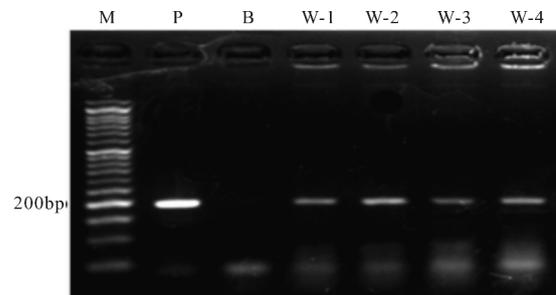


图 3 小麦样品目的 DNA 扩增

本实验选择 Bar 目的基因作为检测对象,同时合理的设置检测对照样品,其中包括 1 个阳性对照组,1 个空白对照组。阳性对照组以含有 Bar 目的基因质粒(中国科学院西北高原生物研究所)为模板,该组检测出 Bar 目的基因,说明阳性对照组检测正确以及 PCR 条件正常。空白对照组以 ddH₂O 为模板,该组不能检测出 Bar 目的基因。说明 ddH₂O 没有受到目的基因的污染。

如图 2、3 所示在小麦 W-1, W-2, W-3, W-4 扩增出 Bar 目的基因而在玉米 C-1, C-2, C-3, C-4 没有 Bar 目的基因,结果说明小麦中含有 Bar 目的基因,玉米中不含有 Bar 基因。

4 讨论

由于我国是种植玉米和小麦大国以及国际贸易需要,对于基因检测越来越重视。也使用了其它检测手段如基因芯片,ELISA 法等但是在检测的过程中经常出现假阳性现状直接影响检测结果。PCR 技术检测基因不光能避免出现假阳性的情况同时在时间、效率和经济上都有优势。本研究通过使用 CTAB 法对玉米、小麦 DNA 提取,在此基础上进行 DNA 含量检测,结果显示所提的 DNA 可以满足后续 PCR 的要求。2 种样品检

测1个为阳性1个为阴性,说明用该方法完全可以满足检测需求。为粮食检测转基因提供有效的方法。

参考文献:

- [1] Vasil I K, Anderson O D. Genetic engineering of wheat gluten[J]. Trends in Plant Science, 1997, 2(8):292~297.
[2] 喻修道, 徐兆师, 陈明. 小麦转基因技术研究以及应用[J]. 中国农业科学, 2010, 48(8):1539~1553

- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000:64~252.
[4] Hartmut R K, Ian K M, Ack I E, et al. Fish species identification in Canned tuna by PCR—SSCP validation by a collaborative study and investigation of intraspecies variability of the DNA patterns [J]. Food Chemistry, 1999(64):263~268.
[5] Williams J G, Kubelik A R, Lirak K J, et al, DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucleic Acide Res, 1990, 25(18):6531~6535.

Detection and Analysis of Bar Gene in Wheat and Maize

Qu Haipan¹, Wang Yingfang², Liu Meihan¹, Wang Zhong¹, Zhang Peng¹

(1. Qinghai Province Grain and Oil Testing and Prevention Institute, Xining, Qinghai 810000, China;

2. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, Qinghai 810000, China)

Abstract: This paper aimed to detect Bar target gene detection in wheat, maize. CTAB method was used to extract DNA from corn and wheat. DNA content was measured and effective PCR amplification of target genes and gel electrophoresis were carried out. The positive control contained the Bar gene of interest as a template, and the blank control used ddH₂O as a template. The results showed that barley was detected in commercial wheat but not in maize.

Key words: wheat; maize; genetic testing; PCR; DNA extraction

(上接第182页)

wind turbine. The power of the wind turbine increases first and then decreases with the increase of installation angle. The wind tunnel experiment shows that the highest efficiency of the wind turbine is obtained when the diameter of the wind wheel is 860mm, the speed is near 300r/min and the installation angle is 4 degrees. The variation trend of the numerical simulation and the wind tunnel experiment results are basically the same.

Key words: H type wind turbine; installation angle; rotation diameter; numerical simulation; wind tunnel experiment

(上接第184页)

时间是相对的,并非工作时间越短越好,比如工作机构升降平移反而增加能耗,工作效率的提升带来的是能耗的增加,能效的降低,所以按额定工况内一个适宜的工作时间运行则更易降耗提效。集装箱的起降平移的轨迹也与能耗密切,一个集装箱搬运过程中完全按相同的工作方式进行,在额定起升高度范围内越低,则能耗越低,采用拱形比接近“门”字形的运输轨迹更短。所以加强员工培训,提高操作人员的工作技能和节能意识更易降低能耗。电能质量在负荷波动大,变频器多的场合也受到较大影响,虽然基本在额定范围值内,但高次谐波,功率因数都有改善空间,可以针对这种情况增加匹配的谐波治理设施,增加电容补偿等措施。

6 结语

本文以天津港某集装箱码头的能耗监测为例,针对目前能耗监测中常见的问题,提出了一些处理方法,改善监测质量,提高监测准确性。对能耗及能效监测的结果进行了分析,提出了目前岸桥和场桥装卸工艺中可以降低工作单耗的方法,在实践中提出切实可行的解决方

案。在绿色港口建设过程中,有针对性地提升生产工艺各环节的能源利用率,将节能减排的观念融入港口码头的经营管理之中,从管理人员到具体操作人员去实施,优化生产工艺,实现经济效益的同时,提高能效,降低能耗,促进港口的绿色、健康、可持续发展。

参考文献:

- [1] 徐景华, 李新明. 天津港生态港口建设探讨[J]. 港口经济, 2008(10):36~38.
[2] 刘立民, 邓超峰, 鞠美庭. 天津港绿色港口建设的探讨与实践[J]. 交通信息与安全, 2010, 28(S2):168~173.
[3] 尚晶, 陶德鑫. 集装箱码头集卡调度策略的仿真研究[J]. 武汉理工大学学报, 2006(5):827~830
[4] 陈梅, 张永坚, 牛祺飞. 公共建筑能耗监测系统研究[J]. 电子测量与仪器学报, 2009(23):167~170.
[5] 张道文. 能耗监管数据的关联与聚类分析研究[D]. 无锡: 江南大学, 2016.
[6] 彭传圣. 岸边集装箱起重机能耗与操作量的关系[J]. 集装箱化, 2011(2):30~32.
[7] 段苏振. 交流变频调速技术在门式起重机中的应用[J]. 电气传动, 2005(1).