

氨基化二氧化硅颗粒应用于大豆油 DNA 提取研究

姚 芹, 张 帅, 王广通, 张 强

(苏州农业职业技术学院 食品科技学院, 江苏省食品安全快速检测工程技术研究开发中心,
江苏省高等职业教育产教深度融合实训平台, 江苏 苏州 215008)

摘要:建立了以氨基化二氧化硅为载体提取大豆油 DNA 并进行转基因成分检测的方法。结果表明:利用氨基化二氧化硅法富集提取大豆毛油中的 DNA 质量浓度高于国标法;以氨基化二氧化硅法提取的大豆毛油 DNA 为模板成功扩增出了大豆内源基因、外源基因片段和转基因调控元件,而精炼油 DNA 未扩增出。氨基化二氧化硅法只适用于大豆毛油 DNA 的提取,而不适用于精炼油。

关键词:氨基化二氧化硅;大豆毛油;DNA 提取;PCR 扩增

中图分类号:TS225.1;TQ646 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2020)12-0122-04

Application of amino-functionalized silica particles in DNA extraction of soybean oil

YAO Qin, ZHANG Shuai, WANG Guangtong, ZHANG Qiang

(Deep Integration Training Platform for Higher Vocational Education in Jiangsu, Jiangsu Food Safety and Rapid Detection Engineering Technology Research and Development Center, Faculty of Food Science and Technology, Suzhou Polytechnic Institute of Agriculture, Suzhou 215008, Jiangsu, China)

Abstract: A method for extracting DNA from soybean oil using amino-functionalized silica as carrier and detecting transgenic components was established. The results showed that the mass concentration of crude soybean oil DNA extracted by amino-functionalized silica method was higher than that of national standard method, and the crude soybean oil DNA was used as template to successfully amplify the endogenous gene fragment, exogenous gene fragments and transgenic regulatory elements of soybean, while the DNA extracted from refined soybean oil did not amplify the endogenous and exogenous gene fragments. So this method was only applicable to DNA extraction of crude soybean oil, not suitable for DNA extraction of refined soybean oil.

Key words: amino-functionalized silica; crude soybean oil; DNA extraction; PCR amplification

近年来,转基因产品的安全性问题日益受到全世界的关注。我国进口大豆绝大部分都是转基因大豆,且主要用于榨油,因此大豆油的转基因成分检测十分重要^[1]。Nikolic 等^[2]用 CTAB 法和试剂盒法提取大豆毛油 DNA,用于后续 PCR 扩增检测,但 CTAB 法提取的 DNA 纯度不高,试剂盒法费用较高。而 NY/T 674—2003《转基因植物及其产品成分检测 DNA 提取和纯化》中用有机溶剂反复抽提,去

除蛋白质、多糖和酚类,但有机溶剂用量较大。二氧化硅微粒是一种微吸附剂,具有吸附富集核酸的特性,近年来改性二氧化硅或磁性二氧化硅在分子生物学研究领域用于提取 DNA 和 RNA,且效果较好^[3-6]。刘玲玲^[7]、林霞^[8]利用具有两性离子的赖氨酸对二氧化硅表面进行修饰,通过直接静电作用提高 DNA 在介质表面的吸附效率,或制备出可有效结合 DNA 的基因载体。郑昆等^[9]采用共沉淀法合成氨基化介孔二氧化硅纳米材料,该材料能有效地吸附和保护质粒 DNA。因此,本文利用氨基化二氧化硅颗粒富集大豆及大豆油中 DNA,测定大豆毛油及精炼油中转基因成分,同时考察大豆油生产过程中 DNA 浓度和片段长度变化情况。本方法基本不涉及有机溶剂,且可有效富集 DNA,为油脂中转基因成分的检测提供新的方法。

收稿日期:2020-03-11;修回日期:2020-07-10

基金项目:苏州市农业农村局为农服务项目;江苏省高等学校大学生创新创业训练项目(201912808001Y);苏州农业职业技术学院青年教师科研能力提升计划资助项目(19QN1002)

作者简介:姚 芹(1981),女,副教授,硕士,研究方向为食品生物化学(E-mail)243027483@qq.com。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

含 CaMV35s 启动子、CP4EPSPS 基因的转基因 Roundup Ready 大豆, 阿根廷; 转基因压榨大豆毛油、转基因一级精炼大豆油, 江苏省南通荣丰油厂提

供。氨基化二氧化硅, 购于杭州新越生物技术有限公司, 粒径 500 nm, 使用时以无水乙醇分散, 固体含量 2.5%; PCR Mix (Taq DNA 聚合酶、dNTPs、Mg²⁺、反应缓冲液)、DNA Ladder, 上海生工生物工程有限公司; 引物(见表 1), 金唯智生物科技有限公司。

表 1 引物名称、序列、扩增片段大小及退火温度

名称	序列	扩增片段大小/bp	退火温度/℃
Lectin - 1F	CAATGCCATCGTATCGTGTC		
Lectin - 1R	GCGATCGAGTAGTGAGAGTGG	1 883	60
CP4EPSPS - 1F	GGCGAGGACGTCATCAATAC		
CP4EPSPS - 1R	TCGATCCCCGATCTAGTAACA	1 512	55
Lectin - 2F	CTTCGCCGCTTCCTTCAAC		
Lectin - 2R	GAGTCCCGTGGCAGCAGAG	475	65
CP4EPSPS - 2F	CCTTCATGTTCCGGCGGTCTCG		
CP4EPSPS - 2R	GCGTCATGATCGGCTCGATG	493	56
Lectin - 3F	GCCCTCTACTCCACGCCCATCC		
Lectin - 3R	GCCCATCTGCAAGCCTTTTTGTG	118	62
CP4EPSPS - 3F	CGACATCGAAGTCATCAACC		
CP4EPSPS - 3R	TTCTTCCAGACCGTTCATCA	190	55
CaMV35S - F	GCTCCTACAAATGCCATCA		
CaMV35S - R	GATACTGGGATTGTGCGTCA	195	54
NOS - F	GAATCCTGTTGCCGGTCTTG		
NOS - R	TTATCCTAGTTGCGCGCTA	180	54

1.1.2 仪器与设备

PCR 仪, Mastercycler ep Eppendorf 中国有限公司; Biorad GelDoc XR 伯乐凝胶成像系统, 美国。

1.2 实验方法

1.2.1 试剂配制

裂解液: TNE 缓冲液中加入 SDS 至终质量浓度为 5~20 μg/mL, pH 为 8.0。

结合液: 将 6.06 g Tris 和 5.84 g EDTA 溶于水中, 使用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 调节 pH 为 6.5, 加入 591 g 的异硫氰酸胍 (GuSCN) 溶于溶液中, 再加入 10 mL Triton - X100, 用水定容至 1 000 mL。溶液组分的终浓度为 Tris - HCl 50 mmol/L、EDTA 20 mmol/L、GuSCN 5 mol/L、Triton - X100 1% 溶液, pH 为 6.5。

洗液 1: 称取 1.46 g NaCl 和 6.06 g Tris 溶于水中, 并用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 调节 pH 为 6.4, 再加入 591 g 的 GuSCN 溶于溶液中, 用水定容至 1 000 mL。溶液组分的终浓度为 GuSCN 5 mol/L、NaCl 25 mmol/L、Tris - HCl 50 mmol/L、pH 为 6.4。

洗液 2: 称取 7.3 g NaCl 和 1.21 g Tris 溶于水中, 用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 调节 pH 为 8.0, 加水定容至 1 000 mL, 将无水乙醇用此溶液配

制成体积分数为 80% 的乙醇溶液。

1.2.2 国标法提取大豆毛油 DNA

参照 NY/T 674—2003 《转基因植物及其产品成分检测 DNA 提取和纯化》进行。具体为取大豆毛油 30 mL 放入 100 mL 离心管中, 加入 25 mL 正己烷, 振荡混合 2 h 后, 加入 25 mL CTAB 提取缓冲液, 继续振荡混合 2 h。10 000 g 离心 10 min, 取水相, 加入等体积异丙醇, 轻缓颠倒混匀, -20℃ 下静置 1 h, 10 000 g 离心 10 min。取沉淀用 400 μL TE 缓冲液溶解后, 加入 200 μL 氯仿 - 异戊醇 (体积比 24:1), 轻缓颠倒混匀, 10 000 g 离心 2 min。将上清液转移至干净离心管中, 加入等体积异丙醇, 轻缓颠倒混匀, -20℃ 下静置 1 h, 10 000 g 离心 10 min。取沉淀用 1 mL 70% 乙醇溶液洗涤, 倒出上清。沉淀干燥, 得大豆毛油 DNA, 将其溶解于 100 μL TE 缓冲液中, 待测。

1.2.3 氨基化二氧化硅法提取大豆及大豆油中的 DNA

大豆的预处理: 大豆洗净, 液氮研磨成糊状。

大豆毛油及精炼油的预处理: 取 200 mL 大豆油, 与 20 mL TE 缓冲液混合, 常温下置于磁力搅拌器上搅拌混匀 30 min, 将混合液移至分液漏斗中静

置,待分层后取下层水相。

取3支2 mL EP管分别加入预处理后的大豆20 mg、大豆毛油300 μL 、精炼油300 μL ,各加300 μL 裂解液和20 μL 蛋白酶K,涡旋振荡摇匀后,65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴60 min。裂解后以12 000 g 离心5 min,上清液转移到新的EP管中,加入500 μL 结合液,再加入氨基化二氧化硅乙醇分散液30 μL ,振荡后放置室温20 min。将离心管5 000 g 离心2 min,弃上清。加洗液1,并使氨基化二氧化硅颗粒充分悬浮,10 000 g 以上离心20 s,弃上清。加洗液2并使氨基化二氧化硅颗粒充分悬浮,10 000 g 以上离心20 s,弃上清,重复洗涤1次。10 000 g 以上离心20 s,移去残留液体,室温晾干。加入30 μL TE缓冲液,振荡混匀后65 $^{\circ}\text{C}$ 温育5 min,12 000 g 离心2 min,上清移至新的EP管中备用。

1.2.4 DNA的定量分析

取20 μL DNA提取液稀释100倍,紫外分光光度计测定其260、280 nm吸光值,计算 OD_{260}/OD_{280} 比值,以1个 OD_{260} 相当于50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNA计算DNA质量浓度。 $\text{DNA质量浓度} = 50 \times OD_{260} \times \text{稀释倍数}$ 。

1.2.5 DNA体外扩增反应体系构建及反应条件

采用25 μL 反应体系,在PCR管中依次加入双蒸水10.5 μL , PCR Mix 12.5 μL ,上游引物0.5 μL ,下游引物0.5 μL ,DNA模板1 μL 。热循环条件为94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,各条带不同的退火温度低温退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸45 s, *Lectin-1*、*CP4EPSPS-1*片段扩增为40个循环,其余扩增均为38个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 后延伸7 min。

2 结果与讨论

2.1 氨基化二氧化硅法提取大豆DNA定量结果

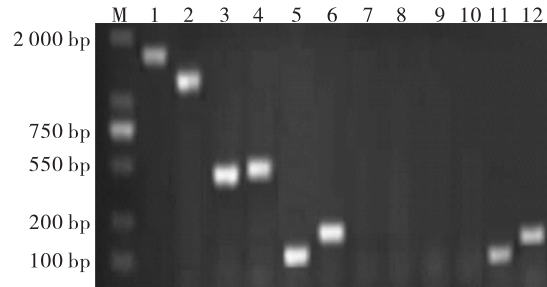
按1.2.4方法测得大豆提取液的 OD_{260}/OD_{280} 比值为1.64,略低于1.7,说明本方法提取大豆DNA有少量蛋白质污染,按公式计算得到氨基化二氧化硅法提取的大豆DNA样品的DNA质量浓度为86.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.2 大豆毛油DNA提取定量结果

分别按1.2.2和1.2.3提取大豆毛油中DNA,按1.2.4方法测定 OD_{260}/OD_{280} 比值和DNA质量浓度,得出国标法提取大豆毛油 OD_{260}/OD_{280} 比值为1.82, DNA质量浓度为6.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$;氨基化二氧化硅法提取大豆毛油 OD_{260}/OD_{280} 比值为1.75, DNA质量浓度为10.65 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。氨基化二氧化硅法提取大豆毛油DNA的 OD_{260}/OD_{280} 比值略低于国标法,但DNA质量浓度比国标法的高。此外,氨基化二氧化硅法提取的大豆毛油DNA质量浓度远低于该法

提取的大豆DNA的质量浓度,这是因为压榨并不能使大豆中DNA全部进入油中,大部分DNA残留在大豆饼粕中。

2.3 大豆毛油PCR扩增结果(见图1)

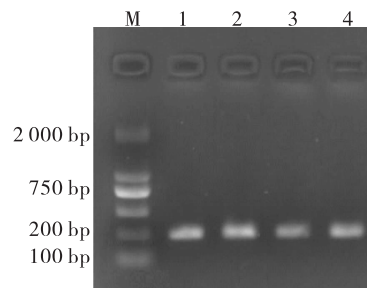


注:M. Marker;1. 转基因大豆引物 *Lectin-1*;2. 转基因大豆引物 *CP4EPSPS-1*;3. 转基因大豆引物 *Lectin-2*;4. 转基因大豆引物 *CP4EPSPS-2*;5. 转基因大豆引物 *Lectin-3*;6. 转基因大豆引物 *CP4EPSPS-3*;7. 大豆毛油引物 *Lectin-1*;8. 大豆毛油引物 *CP4EPSPS-1*;9. 大豆毛油引物 *Lectin-2*;10. 大豆毛油引物 *CP4EPSPS-2*;11. 大豆毛油引物 *Lectin-3*;12. 大豆毛油引物 *CP4EPSPS-3*。

图1 大豆毛油PCR扩增结果

由图1可以看出,氨基化二氧化硅法提取大豆毛油DNA用于大豆内、外源基因扩增,大豆毛油中1 500 bp左右的条带和400 bp左右的条带均未扩增出来,这可能是因为压榨过程中料坯受到强大的压力,压榨温度一般达到100~135 $^{\circ}\text{C}$,并且持续压榨时,加热与压力的联合作用,使蛋白质变性,大豆DNA和蛋白质紧密结合形成染色质,蛋白质空间结构解体会导致DNA片段的降解。但大豆毛油中扩增到了118 bp的内源基因片段和190 bp的外源基因片段,且条带清晰。

2.4 大豆毛油转基因调控元件扩增结果(见图2)



注:M. Marker;1. 转基因大豆引物 *CaMV35S*;2. 转基因大豆引物 *NOS*;3. 大豆毛油引物 *CaMV35S*;4. 大豆毛油引物 *NOS*。

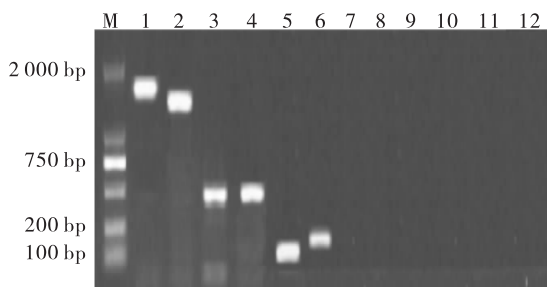
图2 大豆毛油转基因调控元件扩增结果

由图2可以看出,氨基化二氧化硅法提取大豆毛油DNA扩增出了大豆外源基因调控元件,且条带清晰。

2.5 精炼大豆油PCR扩增结果(见图3)

由图3可以看出,氨基化二氧化硅法提取的精

炼大豆油 DNA,定性 PCR 未扩增出大豆内、外源基因条带。这是由于精炼大豆油中 DNA 量甚微,需要高效的 DNA 富集技术结合灵敏度高的检测方法如实时荧光定量 PCR、巢式 PCR 才能检测^[10-13]。说明氨基化二氧化硅法不适用于精炼大豆油 DNA 的提取。



注:M. Marker; 1. 转基因大豆引物 *Lectin*-1; 2. 转基因大豆引物 *CP4EPS*PS-1; 3. 转基因大豆引物 *Lectin*-2; 4. 转基因大豆引物 *CP4EPS*PS-2; 5. 转基因大豆引物 *Lectin*-3; 6. 转基因大豆引物 *CP4EPS*PS-3; 7. 精炼大豆油引物 *Lectin*-1; 8. 精炼大豆油引物 *CP4EPS*PS-1; 9. 精炼大豆油引物 *Lectin*-2; 10. 精炼大豆油引物 *CP4EPS*PS-2; 11. 精炼大豆油引物 *Lectin*-3; 12. 精炼大豆油引物 *CP4EPS*PS-3。

图3 精炼大豆油 PCR 扩增结果

3 结论

(1)本研究以正电荷的氨基化二氧化硅颗粒为载体,富集大豆毛油中的 DNA。和国标法相比,氨基化二氧化硅法提取大豆毛油中的 DNA 质量浓度较高。

(2)氨基化二氧化硅法提取的大豆毛油 DNA 定性 PCR 扩增出了内、外源基因及外源基因调控元件的清晰条带,而精炼油 DNA 未扩增到内、外源基因条带。该方法只适用于大豆毛油的 DNA 提取,不适用于精炼油的 DNA 提取。

参考文献:

[1] 夏义苗,陈复生,郝莉花,等. 大豆油 DNA 提取及检测研

(上接第 87 页)

- [7] 程媛媛. 新型胃黏附材料——白芨多糖的制备及膜黏附性体内外评价[D]. 重庆:重庆医科大学,2008.
- [8] 俞林花,聂绪强,潘会君,等. 白芨多糖对糖尿病溃疡创面愈合的作用研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(11): 1487-1491.
- [9] 仰莲,彭成,李小红,等. 白芨的化学成分及生物活性研究进展[J]. 中药与临床,2014,5(6): 59-64.
- [10] 彭芙,万峰,熊亮,等. 白芨抑菌作用及其活性部位的初步研究[J]. 时珍国医国药,2013,24(5): 1061-1063.
- [11] 郭婷婷,朱峻霄,杨野,等. 白芨多糖作为纳米药物递送系统的分子设计及其应用进展[J]. 中国医药工业杂志,2019,50(9):958-962.
- [12] 朱峻霄,林亚蒙,杨野,等. 白芨多糖在生物医药材料领

究进展[J]. 中国食品学报,2019,19(10):353-356.

- [2] NIKOLIC Z, VASILJEVIC I, ZDJELAR G, et al. Detection of genetically modified soybean in crude soybean oil[J]. Food Chem,2014,145(7):1072-1075.
- [3] 袁翠,万谦宏. 磁性二氧化硅微球的表面修饰及其在植物基因组核酸纯化中的应用[J]. 分析化学,2007(1): 31-36.
- [4] 张敏,张俊平,杨美娟,等. 不同修饰磁纳米颗粒提取 DNA 对 *HRM* 基因分型能力的影响探讨[J]. 国际检验医学杂志,2019(11):1293-1298.
- [5] 潘钰,杨明华,原韬,等. 三种方法提取肠道腺病毒核酸的比较[J]. 黑龙江科学,2016(12): 33-35.
- [6] 蒋娜. 一种核酸提取磁球和四种脑炎病毒核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)的研制[D]. 郑州:河南中医药大学,2016.
- [7] 刘玲玲. 赖氨酸修饰二氧化硅粒子的制备及其在 DNA 分离中的应用研究[D]. 长春:吉林大学,2016.
- [8] 林霞. 纳米基因载体酶切保护机理的研究及新型基因载体的制备与应用[D]. 长沙:湖南大学,2005.
- [9] 郑昆,杨红,葛雅琨,等. 氨基化的介孔二氧化硅纳米材料与 pDNA 作用[J]. 吉林大学学报,2015,53(6): 1316-1320.
- [10] 付淑君,周明,解晓红,等. 荧光定量 PCR 对大豆油中转基因成分的检测[J]. 食品与机械,2014(2): 68-71.
- [11] 王华,梁怀宇,李华. SYBR Green 实时荧光 PCR 高通量检测转基因大豆油[J]. 生物技术通报,2011(8): 103-107.
- [12] 白立群,吴亚君,韩建勋,等. 一种有效的大豆精炼油 DNA 提取新方法——冷冻干燥法[J]. 食品与发酵工业,2009(12): 155-159.
- [13] 李向丽,谭贵良,刘垚,等. 实时 LAMP 法快速检测食用植物油中的转基因成分 *CaMV*-35S[J]. 现代食品科技,2014(2):244-248.
- [14] 域中的应用研究进展[J]. 中药材,2018,41(4): 1011-1016.
- [13] 李伟泽,赵宁,陈卓,等. 基于白芨多糖的苦参碱微球的制备[J]. 药学学报,2018,53(2):284-290.
- [14] 王小媛,王爽爽,纵伟. 杜仲籽油纳米乳的制备及稳定性评价[J]. 食品工业,2019,40(6):121-126.
- [15] 季方圆,何艳琳,隋箐,等. 深海鱼油纳米乳制备方法研究[J]. 中国油脂,2018,43(3):75-79.
- [16] 魏玉,康冰亚,张明昊,等. 紫草素纳米乳的制备及其稳定性考察[J]. 时珍国医国药,2018,29(12):2932-2936.
- [17] 王小宁,曹斌,张存劳,等. 牡丹籽油纳米乳凝胶的制备及体外透皮特性研究[J]. 化工科技,2017,25(6): 42-46.