

# 改良 Chelex-100 法和 CTAB 法用于转基因抗草甘膦大豆检测效果的比较

王永<sup>1</sup>, 兰青阔<sup>1</sup>, 张莉<sup>2</sup>, 赵新<sup>1</sup>, 朱珠<sup>1</sup>, 程奕<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>天津市农业科学院中心实验室, 天津 300381; <sup>2</sup>天津市畜牧兽医研究所, 天津 300112)

**摘要:**以转基因抗草甘膦大豆为研究材料, 分别采用改良 Chelex-100 法和常规 CTAB 法提取基因组 DNA, 以提取 DNA 的浓度和纯度, 同时以 PCR 扩大大豆的内源基因(*lectin*)及外源特异性序列(*CaMV35S*, *nos*, *Cp4-epsps*)的效果对两种方法进行比较和评价。结果表明:虽然改良 Chelex-100 法 DNA 提取纯度不高, 但是提取效率与常规 CTAB 法相当, 而且改良 Chelex-100 法能够快速在 1 h 之内从大豆中提取 DNA, 所提取的 DNA 可以直接用于 PCR 扩增反应, PCR 扩增产物电泳条带清晰。因此, 改良 Chelex-100 法可以替代 CTAB 法提取 DNA 用于转基因检测, 该方法具有经济、简便、快速的特点。

**关键词:** Chelex-100 法; CTAB 法; DNA; 转基因检测

**中图分类号:** S565.1      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-9841(2008)05-0898-04

## Comparison on Effect of Improved Chelex-100 Method and CTAB Method for Transgenic Roundup Ready Soybean Detection

WANG Yong<sup>1</sup>, LAN Qing-kuo<sup>1</sup>, ZHANG Li<sup>2</sup>, ZHAO Xin<sup>1</sup>, ZHU Zhu<sup>1</sup>, CHENG Yi<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Central Lab of Tianjin Academy of Agricultural Sciences, Tianjin 300381; <sup>2</sup> Tianjin Institution of Animal Husbandry, Tianjin 300112, China)

**Abstract:** Improved Chelex-100 method and conventional CTAB method were applied to extract total DNA from transgenic roundup ready soybean. Both improved chelex-100 method and CTAB method were compared in this study, and quantity and purity of the extracted DNA were evaluated by PCR amplification result of the endogenous gene (*lectin*) and foreign specific sequence (*CaMV35S*, *nos* and *Cp4-epsps*). Despite the lower quality of DNA, the Improved Chelex-100 method can quickly extract the DNA from soybean within 1 hour. The DNA can be directly applied to the following step-PCR amplification as DNA template. Therefore, Chelex-100 is economic, simple and rapid, which can be replaced CTAB for transgenic DNA detection.

**Key words:** Chelex-100 method; CTAB method; DNA; transgenic detection

自 1993 年第一个转基因作物转基因晚熟西红柿正式投放美国市场以来, 转基因作物已由 1996 年的 190 万  $\text{hm}^2$  增加到 2007 年的 1.44 亿  $\text{hm}^2$ , 市场产值从最初 1995 年的 0.75 亿美元增加到 2007 年的 70 亿美元, 12 年间增加约 93 倍。目前已有 23 个国家种植转基因作物, 其中转基因大豆占全球种植面积的 51%, 玉米占 31%, 棉花占 13%, 油菜占 5% (<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/37/pressrelease/default.html>)。然而转基因作物在带来巨大社会和经济效益的同时也存在许多问题, 主要集中在转基因食品的安全性及对生态环境的安全性方面。因此, 世界上的很多国家和地区先

后出台了相应的法律和管理方法, 对转基因食品实行强制标识或自愿标识。2002 年我国农业部颁布的《农业转基因生物标识管理办法》, 规定对五大类 17 种产品必须进行标识。随着转基因食品的大量涌入市场, 建立有效的转基因检测方法, 为进一步完善我国在转基因食品标识管理制度, 保护消费者知情权方面的提供重要技术保障。

对转基因产品的检测, 目前多采用 PCR 方法检测产品中是否含有外源基因成分, 其中 PCR 扩增前的 DNA 提取至关重要。常规 CTAB DNA 提取方法操作繁琐, 费时费力, 并且用到有机溶剂容易污染环境<sup>[1]</sup>。

收稿日期: 2008-02-15

基金项目: 科技部国际合作资助项目(2006DFA32380); 天津市应用基础及前沿技术研究资助项目(08JCYBJC03700)。

作者简介: 王永(1977-), 男, 助理研究员, 主要从事农产品安全质量分子检测技术研究。E-mail: wyl2007@yahoo.com.cn。

Chelex-100 是一种化学离子螯合树脂,由苯乙烯和苯二乙烯共聚体组成,其悬液在碱性环境(pH 10~11)和 100℃的条件下,可导致细胞膜的破裂和 DNA 的变性并释放出来<sup>[2]</sup>,并且 Chelex-100 能结合许多可能影响下一步分析的其他外源物质,并能通过结合金属离子,防止 DNA 降解<sup>[3]</sup>。由于 Chelex-100 能有效除去非核酸有机物,Chelex-100 提取 DNA 具有经济、简便、高效等优点,目前已被广泛用于从全血或血痕、精液或精斑、混合斑、毛发、培养细胞等提取 DNA<sup>[4-8]</sup>。研究比较常规 CTAB 法和改良 Chelex-100 法提取抗草甘膦大豆中的 DNA,以期建立从转基因作物中快速提取 DNA 的方法,为转基因

产品成分的快速检测奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 样品来源 抗草甘膦大豆本室保存。

主要仪器:高速冷冻离心机及核酸定量设备 Backman DU640,凝胶电泳设备为 BIO-RAD Power 200,PCR 扩增仪为 Thermo PX2,水浴锅为 NESLAB EX-111,凝胶成像设备。

主要试剂:PCR 引物由上海生工公司合成,引物序列见表 1,Taq 酶和 dNTP 等试剂购自 Promega 公司,Chelex-100 购自 sigma 公司。

表 1 转基因大豆内源基因和外源基因的引物序列

Table 1 Primers sequences of endogenous gene and foreign gene of transgenic roundup ready soybean

检测基因 Gene name	引物序列 Primers sequence	扩增片段长度 Length of amplified fragment	基因来源 Origin of gene
<i>Lectin</i>	正:5'-gcc ctc tac tcc acc ccc atc c-3' 反:5'-gcc cat ctg caa gcc ttt ttg tg-3'	118 bp	大豆内源基因 <i>Lectin</i> gene
<i>CaMV35S</i>	正:5'-get cct aca aat gcc atc a-3' 反:5'-gat agt ggg att gtg cgt ca-3'	195 bp	<i>CaMV35S</i> 启动子 <i>CaMV35S</i> promoter
<i>NOS</i>	正:5'-gaa tcc tgt tcc egg tet tg -3' 反:5'-tta tcc tag ttt gcg cgc ta-3'	180bp	<i>NOS</i> 终止子 <i>NOS Terminator</i> gene
<i>Cp4-epsps</i>	正:5'-cct tca tgt tcg gcg gtc tcg-3' 反:5'-gcg tca tga tcgggc tcg atg-3'	498bp	<i>Cp4-epsps</i> 合成酶基因 <i>Cp4-epsps</i> gene

### 1.2 方法

1.2.1 CTAB 法 参照 Murray 与 Thompson 方法<sup>[9]</sup>。

1.2.2 改良 Chelex-100 法 对常规 Chelex-100 法进行了改进。提取步骤:取预处理样转移至无菌 EP 管,加 CTAB 提取缓冲液(1 000 mL 水中溶解 CTAB 20 g,Tris 12.11 g,NaCl 81.82 g,Na<sub>2</sub> EDTA 7.44 g,PVP 20 g,高压灭菌),混合均匀后于 65℃水浴 30~50 min,12 000 r·min<sup>-1</sup>离心 5 min,转移上层液至 EP 管,加入 1/10 体积的 3 mol·L<sup>-1</sup>乙酸钠溶液(408.1 g 乙酸钠,用冰乙酸调节 pH 值至 5.2,加水定容至 1 L,高压灭菌)和 0.7 倍体积的预冷异丙醇,离心取沉淀,沉淀加入 200 μL 10% Chelex-100 (100 mL 水中溶解 Chelex-100 10 g,高压灭菌),12 000 r·min<sup>-1</sup>离心 3 min,取上清用于 PCR 扩增。

1.2.3 DNA 的纯度和浓度检测 用紫外分光光度计测量 DNA 50 倍稀释溶液在波长为 260 nm 和 280 nm 下的 OD 值,以 1 OD<sub>260</sub> 等于 50 μg·mL<sup>-1</sup> 计算

DNA 的浓度,以 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的比值来分析 DNA 的纯度。

1.2.4 PCR 检测 PCR 反应体系组成:10×PCR 反应缓冲液(含 Mg<sup>2+</sup>)2.5 μL,dNTP 溶液(各为 10 mmol·μL<sup>-1</sup>)0.5 μL,正反引物(10 pmol·μL<sup>-1</sup>)各 0.5 μL,Taq 酶(5 U·μL<sup>-1</sup>)0.5 μL,模板 5 μL,水补足反应体系,使总体积为 25 μL。循环参数为 94℃ 预变性 5 min,再按 94℃ 变性 40 s,55℃ 复性 40 s,72℃ 延伸 40 s,40 个循环,最后 72℃ 延伸 5 min。产物鉴定:扩增产物于加入 EB 的 2.0% 琼脂糖凝胶上电泳,紫外灯下观察,用 DL2000 做分子量标记。

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA 的纯度和浓度检测

使用两种 DNA 提取方法,分别对抗草甘膦大豆样品进行了 DNA 提取,并设立 3 个重复,经紫外分光光度计测定,两种方法提取的 DNA OD 值

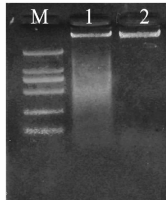
比较见表2。结果表明,两种方法提取的DNA电泳条带亮度基本一致,这与紫外分光光度计测定结果相符,两种方法提取的DNA凝胶电泳结果见图1,使用改良Chelex-100法提取的大豆基因组

DNA有明显的主带,其DNA浓度比CTAB法低23%,提取DNA的纯度也明显低于CTAB法,这与CTAB提取过程中氯仿反复抽提去除蛋白质有很大的关系。

表2 两种方法提取的DNA OD值比较

Table 2 OD value of the two DNA extraction methods

提取方法 Extraction method	样品 Sample	OD260	OD280	OD260/OD280	平均值 Average	DNA浓度 DNA concentration /ng· $\mu\text{L}^{-1}$	平均值 Average
改良 Chelex-100 法 Improved	1	0.0829	0.0533	1.56	1.54	207.5	203.8
	2	0.0805	0.0526	1.53		201.5	
Chelex-100 method	3	0.0810	0.0529	1.53	1.93	202.5	265.0
	1	0.1094	0.0559	1.96		273.5	
CTAB 法 CTAB method	2	0.0963	0.0501	1.92	1.91	241.0	
	3	0.1121	0.0586	1.91		280.5	



M: DL2000; 1: 改良 Chelex-100 法; 2: CTAB 法  
M: DL2000; 1: Improved Chelex-100; 2: CTAB

图1 两种方法提取的DNA凝胶电泳结果

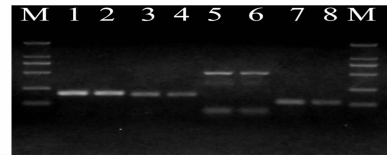
Fig. 1 Result of agarose gel electrophoresis of total DNA by the two extraction methods

## 2.2 PCR的扩增结果

对两种方法提取的DNA,分别进行大豆内源基因 *lectin*, 外源基因 *CaMV35S*、*nos* 和 *Cp4-epsps* PCR的扩增,凝胶电泳结果见图2。结果显示,两种方法提取的DNA内源和外源基因的扩增结果是基本一致的,说明PCR扩增效果与常规CTAB方法同样理想。

## 3 讨论

有关转基因检测中DNA提取国内外一般采用CTAB与有机溶剂抽提结合或者是SDS与有机溶剂抽提结合的办法,两种方法操作过程中共同特点是操作步骤繁琐,费时费力,而且在提取过程中加入的酚类物质或者SDS严重干扰PCR反应,往往出现假阴性的结果。另外,酚、氯仿、异戊醇等有机溶剂的有损操作者健康,对周边环境会产生一定污染,同时也会加大转基因检测的成本。常规Chelex-100 DNA提取方法国内外多应用于从动物和微生物中PCR扩增反应模板的制备,在植物组织DNA提取方



M: DL2000; 1, 3, 5, 7: *CaMV35S*、*NOS*、*Cp4-epsps* 和 *lectin* 的扩增产物(CTAB法); 2, 4, 6, 8: *CaMV35S*、*NOS*、*Cp4-epsps* 和 *lectin* 的扩增产物(改良Chelex-100法)

M: DL2000; 1, 3, 5, 7: PCR amplification product of *CaMV35S*、*NOS*、*Cp4-epsps* and *lectin* (CTAB method); 2, 4, 6, 8: PCR amplification product of *CaMV35S*、*NOS*、*Cp4-epsps* and *lectin* (Improved Chelex-100 method)

图2 *CaMV35S*、*NOS*、*Cp4-epsps* 和 *lectin* 的PCR扩增结果

Fig. 2 Result of PCR amplification of *CaMV35S*、*NOS*、*Cp4-epsps* and *lectin*

面未见报道。常规Chelex-100 DNA提取方法在提取过程当中涉及剧烈振动和沸水水浴等操作步骤,不能获得基因组DNA。建立的改良Chelex-100法去除了剧烈振动和沸水水浴等步骤,可以很好地获得基因组DNA<sup>[10]</sup>。改良Chelex-100法提取的DNA在浓度和纯度上低于CTAB方法,原因是没有很好地去除蛋白质和多糖等杂质,但是作为模板用于PCR扩增效果与CTAB提取方法并无差别。很多研究发现,DNA中含有一定量的RNA、蛋白质等杂质对PCR扩增结果无明显影响<sup>[11]</sup>。而且改良Chelex-100法提取非常简便、快速,经济,同时又避免了使用有毒化学试剂酚和氯仿。以上结果说明建立的改良Chelex-100法可以替代CTAB法用于转基因抗草甘膦大豆DNA的提取。

## 参考文献

- [1] 赵秀玲, 文伟刚, 余旭平, 等. Chelex-100 快速提取动物源饲料 DNA 方法的建立[J]. 上海交通大学学报, 2004, 1: 82-85. (Zhao X L, Wen W G, Yu X P, et al. The application of chelex-100 method to extract the genomic DNA of the animal derived feedstuff [J]. Journal of Shanghai Jiaotong University, 2004, 1: 82-85.)
- [2] Walsh P S, Metzger D A, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR based typing from forensic material[J]. Biotechniques, 1991, 10: 506-513.
- [3] 陈辉, 刘永波, 谢庆瑞, 等. 有机酚法和 Chelex-100 法提取不同组织微量 DNA 效果比较[J]. 郑州大学学报(医学版), 2004, 39(6): 988-991. (Chen H, Liu Y B, Xie Q R, et al. Comparison the effect of phenol/ chloroform method and Chelex-100 method on micro DNA extraction using different tissues[J]. Journal of Zhengzhou Univeristy (Medical Sciences), 2004, 39(6): 988-991.)
- [4] 廖启洪, 梁志东, 李丽敏, 等. 用 Chelex 制备 DNA 模板扩增分析 DIS80 位点多态性[J]. 华夏医学, 2001, 14(6): 768-769. (Liao Q H, Liang Z D, Li L M, et al. Polymorphisms analysis of DIS80 locus in Han population in Guangxi by PCR[J]. Acta Medicinæ Sinica, 2001, 14(6): 768-769.)
- [5] 黄晓晶, 刘天佳, 蔡志宇. 用 Chelex 法制备 AP-PCR 细菌 DNA 模板[J]. 福建医科大学学报, 2002, 36(2): 221-223. (Huang X J, Liu T J, Cai Z Y. Performance of bacteria DNA for AP-PCR using Chelex method[J]. Journal of Fujian Medical University, 36(2): 221-223)
- [6] García González L A, Rodrigo Tapia J P, Sánchez Lazo P, et al. DNA extraction using Chelex resin for oncogenic amplification analysis in head and neck tumours[J]. Acta Otorrinolaringol Esp, 2004, 55(3): 139-44.
- [7] Giraffa G, Rossetti L, Neviani E. An evaluation of Chelex-based DNA purification protocols for the typing of lactic acid bacteria [J]. Journal of Microbiological Methods, 2000, 42(2): 175-184.
- [8] 周月琴, 朱伟, 刘志萍, 等. 用 Chelex-100 快速提取微量血痕中的 DNA[J]. 复旦学报(医学版), 2003, 30(4): 379-380. (Zhou Y Q, Zhu W, Liu Z P, et al. A quick method of extraction of DNA by Chelex-100 from trace bloodstains[J]. Journal of Fudan University (Medical Sciences), 2003, 30(4): 379-380.)
- [9] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. Nucleic Acids Research, 1980, 8: 4321-4326.
- [10] 陈家琳, 李奎, 刘榜, 等. 饱和苯酚-氯仿抽提法与 Chelex-100 树脂法提取 DNA 在研究犬 STR 基因座多态性中的应用比较[J]. 湖北农业科学, 2002, 6: 107-109. (Chen J L, Li K, Liu B, et al. The comparison of DNA extraction methods by using Chelex-100 and saturated phenol - chloroform in the study of canine STR loci polymorphism [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2002, 6: 107-109.)
- [11] 张伟, 谢甫锦, 曹萍, 等. 大豆叶片 DNA 提取方法的比较研究[J]. 大豆科学, 2007, 26(1): 60-65. (Zhang W, Xie F T, Cao P, et al. Comparative studies on extraction of genome DNA from soybean leaf[J]. Soybean Science, 2007, 26(1): 60-65.)

## TFC 系列土壤化肥速测仪

### QSY 凯氏定氮仪

北京强盛分析仪器制造中心是国家投资、团中央创办的高新科技企业(0120663F), 中心技术力量雄厚, 产品自 1993 年至今一直被列入农业部推广项目。

仪器每次可同时测试多个样品, 几滴药水十几分钟即可快速测定土壤、肥料、植株中氮、磷、钾、有机质、酸碱度、可溶性盐、腐质酸含量, 识字即可操作, 成本不到一元钱, 田间地头随处可用。2004 年最新开发的 203 系列产品, 大屏幕液晶中文菜单显示操作流程、测试状态、测试结果, 可直接打印测试数据; 仪器留有“升级”串行接口, “升级”后可以与计算机连接, 并安装《土壤测试及配方施肥系统》软件, 在计算机上对几十种农作物进行配方施肥计算, 将结果存档、打印、发送电子邮件, 实现信息化管理。另有 TFC-ZNS 型, 1B 系列土肥测试仪。

凯氏定氮仪采用国际通用凯氏法主要测定土壤植株中氮含量。

该中心设有技术培训部, 专家咨询热线, 常年免费讲授测土配肥技术, 随到随学, 有专人负责售后服务。产品终身维修, 自售出之日起一年内有质量问题以旧换新。

**通讯地址:**北京市前门东大街前门外国语学校内

(团中央大楼西侧)

**办公地址:**北京市前门东大街甲 12 号

**邮编:**100051 **网址:**www.qstry.com

**电话:**(010)67033803 67025912

**传真:**(010)65114456

