

利用 *Bt* 试纸快速检测玉米中的 *Bt* 蛋白

蔡 泉,曹靖生,史桂荣,郭晓明,张建国,赵 伟,李树军
(黑龙江省农业科学院 玉米研究所,黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:利用少量玉米幼苗嫩叶,加双蒸水和石英砂快速研磨,制成混合液,离心后取上清液插入 *Bt* 试纸条,可以在20 min之内检测出玉米中是否含有 *Bt* 蛋白,该方法快速、准确、简单易行,可以大量检测玉米样品,显著提高转 *Bt* 基因玉米的检测效率,对于商检、海关和农业执法等部门具有重要的实用价值,同时也对从事农作物转 *Bt* 基因研究的科研人员检测 *Bt* 蛋白提供帮助。

关键词:玉米;*Bt* 试纸;转 *Bt* 基因;*Bt* 蛋白

中图分类号:S513

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2010)10-0137-02

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*,简称 *Bt*),因其杀虫效果好、安全、高效等优点而成为应用最为广泛的杀虫微生物。随着植物细胞生物学和分子生物学的发展,利用生物基因工程技术将外源抗虫基因 *Bt* 导入玉米,使玉米自身产生抗虫蛋白而达到抗虫的目的。目前转 *Bt* 基因的玉米已经在全世界范围内广泛种植。但是因为转基因作物及产品的安全性还有争议,因此世界上大多数国家还在对转基因产品加贴标签,以保护消费者对产品是否含有转基因成分的知情权。如何快速有效地鉴定转基因植物、种子等,对于商检、海关和农业执法部门等具有重要的实用价值。目前一般采用 PCR(聚合酶链式反应)^[1] 和 ELISA(酶联免疫吸附测定)等方法检测转基因作物^[2]。该试验采用 *Bt* 试纸条快速检测转基因玉米中的 *Bt* 蛋白,旨在为大量、快速检测转基因玉米提供帮助。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验采用的转 *Bt* 基因玉米来自于中国农业大学国家玉米改良中心,是回交二代材料,存在 *Bt* 基因的分 离。

Bt 试纸条来自北京安加利生化技术开发有限公司生产的 *Bt*-Cry1Ac/Ab 快速检测试纸条。

1.2 方 法

用光照培养箱按发芽试验方法培养玉米幼苗。在玉米幼苗长至 3~5 片叶时,取新鲜叶片 2 片,1 片剪 2~3 cm 长(大约 0.15 g),放置于研钵中,另一片备用。加入 ddH₂O 10 mL,石英砂 2~3 g,快速研磨 1 min,将叶片磨碎。用移液器吸取研磨后的混合液 2 mL,加入到 2 mL 离心管中,快

速离心 10 s。取 *Bt* 试纸条把标有箭头和“max”端置于上清液中 0.5 cm 左右,一般等待 3~5 min,试纸条上端出现质控线,最长反应时间为 20 min,表示混合液中含有来自于样品的蛋白,试验结果有效。如果样品含有 *Bt* 蛋白,则在质控线下方出现测试线;不出现,则表示样品不含有 *Bt* 蛋白。质控线与测试线的颜色均由红变紫。取备用叶片用 CTAB 法提取 DNA^[3],作 PCR 检测。根据 *Bt* 蛋白类型设计引物,用 PCR 法检测 *Bt* 蛋白。利用凝胶成像系统对 PCR 检测结果照相与 *Bt* 试纸条检测结果作对比。

表 1 PCR 扩增体系

PCR 扩增体系	反应条件为
DNA:2 μ L	95 $^{\circ}$ C 5 min
P1:0.5 μ L	95 $^{\circ}$ C 45 s
P2:0.5 μ L	58 $^{\circ}$ C 45 s
Taq:0.2 μ L	72 $^{\circ}$ C 1 min
dNTP:1.6 μ L	34 个循环
Buffer:2 μ L	72 $^{\circ}$ C 10 min
ddH ₂ O:13.2 μ L	10 $^{\circ}$ C 保存
总体系:20 μ L	

2 结果与分析

2.1 *Bt* 试纸条检验效果

由图 1 可知,5 号样品有质控线和测试线,表示其结果为阳性,表明其含有 *Bt* 蛋白,为转 *Bt* 基因玉米。其它编号样品只有一条质控带,其结果为阴性,表明其不含有 *Bt* 基因,为非转 *Bt* 基因玉米。

2.2 PCR 检测结果

由图 2 可知,左边第一条谱带是 Marker DNA,定义为 0 号,其余的 10 条谱带是 1~10 号与图 1 中编号相对应的 DNA,其中 5 号含有 *Bt* 蛋白,其它编号 *Bt* 检测结果未检出,其结果与 *Bt* 试纸条检测一致。

2.3 利用 *Bt* 试纸条对 5 号样品及 6 号样品二次检测

由图 3 可知,5 号样品 4 次结果均出现质控线与测试线,6 号样品 4 次结果均只出现质控线,

收稿日期:2010-06-09

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项资助项目(2008zx08003-001)

第一作者简介:蔡泉(1979-),男,黑龙江省牡丹江市人,硕士,助理研究员,从事玉米新品种选育与推广工作。E-mail:cq6539@163.com。

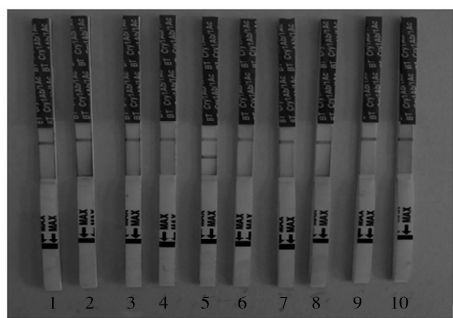
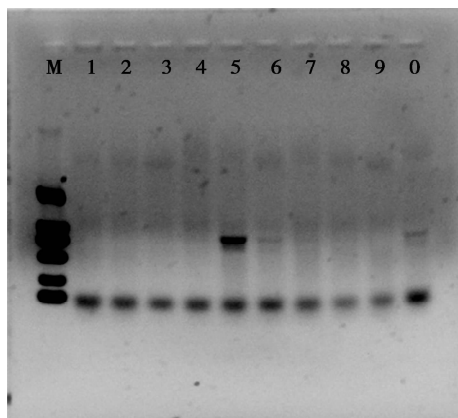
图1 *Bt* 试纸条检测结果

图2 PCR 检测结果

而未见测试线,因此可以判断,5号样品含有 *Bt* 蛋白,6号样品不含有 *Bt* 蛋白。

3 影响检测结果的因素

3.1 有效期

试纸条的有效期一般为1 a,过期则影响检测结果。

3.2 温度

试纸条检测的适宜温度为 15~35℃。温度过低或过高均会造成检测结果不明显,或检测失败。

3.3 贮存

贮存方法不得当,会导致检测结果不明显或

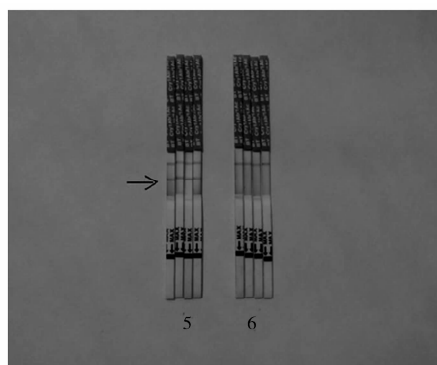


图3 5号、6号二次检测对比

检测失败,如果试纸条长期暴露在空气中,会导致受潮而影响检测结果。

3.4 试纸条浸入样品溶液的长度

试纸条浸入样品溶液的长度不要超过 0.5 cm,即有“max”标记的部分,如果超过 0.5 cm,通常会造成质控线无法显现。

3.5 测试线的颜色

有的样品可能出现绿色的测试线,这是由于样品溶液浓度过高或颜色过深造成的。一个原则是,如果没有出现由红变紫的测试线,绿线也作为阴性结果。

4 结论

通过该试验的对比分析,认为 *Bt*-Cry1Ab/*Ac* 试纸可以用来快速检测玉米中的 *Bt* 蛋白,其结果准确、可靠。该方法快速、准确、简单易行,可以大量检测玉米样品,显著提高转 *Bt* 基因玉米的检测效率,对于商检、海关和农业执法等部门具有重要的实用价值,同时也对从事农作物转 *Bt* 基因研究的科研人员检测 *Bt* 蛋白提供帮助。

参考文献:

- [1] 黄敏,杜何为,张祖新,等. 转 *Bt* 基因玉米杂交种的快速检测技术[J]. 湖北农业科学,2004(5):39.
- [2] 李桂玲,李明泽,刘宗华,等. 转 *Bt* 基因抗虫玉米的研究[J]. 生物技术通报,2009(5):9-13.
- [3] 张书红,席章营. 快速提取玉米叶片 DNA 的新方法[J]. 安徽农业科学,2007,35(13):3376,3801.

Rapid Testing *Bt* Protein from Maize by *Bt* Test Paper

CAI Quan, CAO Jing-sheng, SHI Gui-rong, GUO Xiao-ming, ZHANG Jian-guo,
ZHAO Wei, LI Shu-jun

(Maize Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: Using some young leaf from seeding of maize, adding ddH₂O and quartz sand, then grinding the mixture fast, after centrifugate the mixture, insert the *Bt* test paper into the supernatant, the result whether contain *Bt* protein would appear in 20 minutes. The method is fast, accurate and easy to operate, so it's very practical to commercial test, customs and law-enforcement of agriculture. Meanwhile, it could help scientific researchers teste the *Bt* protein in the transgenic *Bt* crops.

Key words: maize (*Zea mays* L.); *Bt* test paper; transgenic *Bt*; *Bt* protein