

文章编号: 1005-0906(2010)01-0149-04

转基因玉米 Bt-176 的研究进展及其检测方法

盛夏冰¹, 罗超¹, 王文堂¹, 喻凯¹, 林源¹, 李逢慧²

(1. 湖南农业大学东方科技学院检疫创新实验室, 长沙 410128; 2. 湖南农业大学动物医学院, 长沙 410128)

摘要: 转基因产品日益走进人们的日常生活, 目前已批准商品化的转基因作物有大豆、玉米、油菜、棉花、番茄、烟草、菊苣等。玉米作为世界上重要的粮食作物之一, 其安全性与实用性受到了高度重视。从基因结构、潜在安全性和现有检测方法等方面简要介绍了转基因 Bt-176 玉米的研究进展。

关键词: 玉米; 转基因; Bt-176; 基因结构; 检测方法

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Research Progress and Detection Methods of Transgenic Maize Bt-176

SHENG Xia-bing¹, LUO Chao¹, WANG Wen-tang¹, YU Kai¹, LIN Yuan¹, LI Feng-hui²

(1. College of Orient Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128;

2. College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsh 410128, China)

Abstract: Nowadays, with the rapid development of biotechnology, GMO (Genetically modified organism) product enters into people's daily life day by day. At present, more and more GMO crops have been approved for commercialization of transgenic crops, such as soybean, maize, rape, cotton, tomato, tobacco, chicory et al. Maize is one of the most important grain crops in the world its security and usability receives serious attentions of scientists in various countries. This article briefly introduced the research situation of transgenic maize Bt-176 from gene structure, latent security and existing detect methods and so on.

Key words: Maize; Genetically modified organism; Bt-176; Gene structure; Detect method

转基因抗虫玉米 Bt-176 具有抗鳞翅目尤其是玉米螟等害虫及耐草铵膦除草剂等特性。自 1995 年在美国首次准许无限制种植以来, Bt-176 玉米已经在许多国家和地区大面积种植并作为食品和饲料广泛应用。随后日本(1996)、加拿大(1996)、阿根廷及欧盟各成员国(1997)也先后准许无限制种植, Bt-176 玉米的种植面积不断扩大。同时, 美国(1995)、加拿大(1995)、日本(1996)及英国、丹麦、荷兰、瑞士和阿根廷等国分别批准 Bt-176 玉米作为食物或饲料来源并可上市销售。

1 转基因玉米 Bt-176 基因结构及表达产物特征

转基因玉米 Bt-176 是先正达公司开发的抗虫且耐草铵膦除草剂的转基因玉米品种, 是利用基因工程技术分别将苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)亚种 *kurstaki* 的 *CryIA(b)* 基因、土壤细菌(*Streptomyces hygroscopicus*)的 *bar* 基因等外源基因导入玉米中而获得的抗玉米螟和耐草铵膦转基因品种。*CryIA(b)* 基因表达产生特异性杀虫晶体蛋白(Insecticidal crystal protein, ICP), 在特定 pH 条件下激活, 通过与昆虫中肠上皮细胞受体特异结合, 导致细胞膜穿孔。同时也可产生毒性协同作用, 使整个细胞失去平衡最终导致昆虫死亡。*bar* 基因主要作为选择性标记物, 可产生 PAT 酶(phosphino-thricin acetyl transferase), 提高抗除草剂草铵膦的能力。Bt-176 玉米还导入了 *bla* 基因, 主要作为在 DNA 克隆和重组阶段选择转换细菌的标记物, 产生 β -内酰胺酶(β -lactamase)可提高抗生素氨苄青霉素(ampicillin)的能力^[1,2]。

Privalle 等(1994)运用 ELISA 方法测定转基因玉米 Bt-176 不同生长期及不同器官 *CryIA(b)* 蛋白的含量^[3-6]。结果表明, *CryIA(b)* 蛋白主要存在于叶片和

收稿日期: 2009-03-05

作者简介: 盛夏冰(1987-), 男, 湖南长沙人, 动植物检疫专业。

罗超为本文通讯作者。

E-mail: wosilocaoren@yahoo.com.cn

花粉中,而其他组织如根、秸秆等也含有微量的毒蛋白。整株测定的结果表明,Cry1A(b)蛋白在幼苗期含量最高,随着生长期延续含量逐渐降低。实验发现,转基因玉米 Bt-176 对草铵膦产生一定的抗性,其叶片、根、木髓和整株含有微量的 PAT,但子实和花粉中未检出 PAT。另外,导入的 *bla* 基因仅作为启动子一般不进行表达。

2 潜在安全性

2.1 食用安全性

转基因玉米 Bt-176 是导入苏云金芽孢杆菌亚种 *kurstaki* 的 *Cry1A(b)* 基因、土壤细菌的 *bar* 基因等外源基因,其对鳞翅目害虫有特定毒性。实验检测分析表明,Cry1A(b)蛋白主要分布在叶片和花粉中,在玉米子实中含量低于 5 ng/g 鲜重,PAT 蛋白没有检测到,*bla* 在玉米中没有表达。

玉米作为重要的粮食作物之一,不含天然毒素或过敏源。经小鼠急性口毒性试验表明,Cry1A(b)染毒剂量大于 3 535 mg/kg、PAT 染毒剂量大于 2 575 mg/kg 时均未见中毒症状。Cry1A(b)和 PAT 蛋白特性及氨基酸序列分析结果表明,其与已知过敏源亦无相似性。因此可以认定这两种蛋白对人体不会产生危害。成分分析结果表明,Bt-176 玉米与常规品种相比,主要成分和营养成分没有实质性差异。从目前已有的研究资料评价结果可以认定,其安全性与常用玉米品种无差异^[7~9]。

2.2 生态安全性

2.2.1 对土壤生态系统的影响

土壤是生态系统中物质和能量循环的重要场所,转基因玉米 Bt-176 在田间释放的潜在风险之一就是根系分泌物和作物残渣向土壤中释放毒性物质—特异性杀虫晶体蛋白(ICP),又称 Bt 毒素^[10]。如果此毒素被结合到土壤环境中的其他颗粒而不易被微生物降解并仍然保持杀虫晶体蛋白活性,则导致 Bt 毒素的累积,对土壤微生物区系、有益昆虫和其他动物等非目标性生物体造成严重威胁^[11~14]。

2.2.2 对非目标昆虫的影响

国外学者以君主斑蝶与转 *Bt* 基因玉米为对象进行了研究。Stanley-Horn 等^[15]研究结果表明,不同转基因处理玉米花粉中杀虫晶体蛋白的表达量不同,因而其杀虫性也不同。其中转基因玉米 Bt-176 表达的特异性杀虫晶体蛋白的最高含量超过 7.1 μg/g 花粉。Wraight 等^[16]测定结果表明,Bt-176 花粉表达的特异性杀虫晶体蛋白是 Mon-810 花粉表达

特异性杀虫晶体蛋白的 40 多倍。转基因玉米 Bt-176 花粉表达的杀虫晶体蛋白是否对非目标昆虫有毒害作用与花粉在田间及叶片上的散积状况有密切关系。研究表明,花粉密度超过 1 000 粒/m² 时才可能导致对幼虫生长发育有明显不利影响^[17]。

3 检测方法

国际上许多国家都制定了相应的法规,对转基因产品进行严格的管理,其中最重要的一项措施就是对转基因产品实行标签制度。我国于 2002 年发布《农业转基因生物标识管理办法》,规定凡是在中国境内销售的转基因大豆、玉米及其制品等必须进行标识,因此建立准确、快速、高效的转基因产品检测方法尤为重要。目前检测转基因玉米 Bt-176 的方法主要有定性 PCR 法、实时荧光定量 PCR 法(RT-PCR)、酶联免疫吸附测定法(ELISA)等。

3.1 定性 PCR 法

国际上转基因产品的检测方法中以 PCR 检测方法应用最广。而定性 PCR 检测法已被我国确定为检测转基因植物及其产品成分中是否存在转基因玉米 Bt-176 的国家标准^[18]。定性 PCR 检测方法的原理是根据转基因抗虫和耐除草剂玉米 Bt-176 转化体特异性序列设计特异性引物,对试样进行 PCR 扩增。依据是否扩增获得预期 570 bp 的 DNA 片段检测试样中是否含有 Bt176。此方法的引物 *zSSIIb* 基因:*zSSIIb*-F:5'-CGGTGGATGCTAAGGCTGATG-3';*zSSIIb*-R:5'-AAAGGGCCAGGTTCATTATCCTC-3',预期扩增片段大小为 88 bp。Bt176 转化体特异性序列:Bt176-F:5'-AAGCACGGTCAACTTCCGTAC-3';Bt176-R:5'-TCGACTTTATAGGAAGGGAGAGG-3',预期扩增片段大小为 570 bp。

zSSIIb 内标准基因、转化体特异性序列均得到了扩增,且扩增片段大小与预期片段大小一致,表明试样中检测出转基因玉米 Bt-176,表述为“试样中检测出转基因抗虫和耐除草剂玉米 Bt-176,检测结果为阳性”;*zSSIIb* 内标准基因片段得到扩增,且扩增片段大小与预期片段大小一致,而转化体特异性序列未得到扩增,或扩增片段大小与预期片段大小不一致,表明试样中未检测出转基因玉米 Bt-176,表述为“试样中未检测出转基因抗虫和耐除草剂玉米 Bt-176,检测结果为阴性”;*zSSIIb* 内标准基因片段未得到扩增,或扩增片段大小与预期片段大小不一致,不作判定。

3.2 实时荧光定量 PCR 法(RT-PCR)

实时荧光定量 PCR(RT-PCR)是利用荧光信号的变化实时检测 PCR 扩增反应中扩增产物量的变化,通过循环阈值(Ct)和标准曲线的分析对起始模板进行定量分析,其检测的敏感性比常规 PCR 技术高 100 倍左右。目前应用较多的是 TaqMan 实时荧光定量 PCR 技术^[19~21]。

RT-PCR 法是根据转基因玉米 Bt-176 中的外源基因 *CryIA (b)* 和内源基因 *Zein* 设计的引物和 TaqMan 荧光探针及定量 PCR 仪对样中 Bt-176 玉米的含量进行定量检测,建立 Bt-176 玉米参照样品 *CryIA(b)*和 *Zein* 的 Ct 值之差与样品中 Bt-176 玉米含量之间的标准曲线和线性回归方程,并对未知样品进行检测。本方法具有灵敏、准确、高效等优点,其检测灵敏度达到 0.01%, 检测极限浓度达到 0.001 ng/ μ L。

3.3 酶联免疫吸附测定法

酶联免疫吸附测定法(ELISA)是免疫酶技术的一种,是 Nakane 于 1966 年建立的。1971 年 Engvall 等人提出了用可溶性抗原或抗体与固相载体结合,而保留免疫成分反应性的酶联免疫吸附试验。由于这种方法简便、敏感、特异,可作为多种抗原或抗体的定量测定并得到广泛应用^[22]。

该方法是应用纯化的 Bt 特异性杀虫晶体蛋白作为标准蛋白和免疫抗原,通过抗体-抗原-酶标抗体反应,建立了酶联免疫吸附测定法,以快速检测转基因玉米中的 Bt 表达蛋白。该方法对 Bt 蛋白质的质量浓度最低可检值为 0.312 μ g/mL。

4 讨 论

自从 1994 年 Flavr Savr 转基因西红柿进入美国市场以来,许多转基因作物及其产品已投入市场,其安全性问题已引起了消费者和科研人员的高度重视,各国政府也制定了严格的转基因产品市场准入制度。转基因玉米 Bt-176 以其优越的抗虫和抗药性已在美国、日本、英国、荷兰、瑞士等国开始使用,但其在食用安全性和生态安全性方面的潜在危险也引起了科研人员的密切关注。在进行转基因产品引入方面,我国也做出了严格的管理。中国境内销售的转基因大豆、玉米及其制品等必须进行标识,这就要求准确的检测转基因玉米 Bt-176。本文简述的 3 种检测方法是目前国际上检测转基因产品的主要方法,但其分别存在费用过高或技术、实验设备要求较高的不足,在大规模的生产实践中应用仍需进一步完善。

参考文献:

- [1] Astwood J. *Bacillus thuringiensis* susp. kurstaki HD-1 insecticidal protein(*B.t.k.* HD-1 protein) shares no significant sequence similarity with proteins associated with allergy or Coeliac disease[M]. Monsanto Company, USA 63198. MSL-14172. 1995.
- [2] Australia New Zealand Food Authority(ANZFA) Food derived from insect-protected Bt-176 corn[R]. Final risk analysis report, APPLICATION A385. 2000.
- [3] Privalle L. Quantification of *CryIA(b)* and PAT proteins in Bt(corn) tissues, whole plants and silage[M]. Performing laboratory: Ciba Seeds Agricultural Biotechnology Research Unit, Ciba-Geigy Corporation Research Triangle Park, NC, USA. Study No CAB-009-94. 1994.
- [4] Privalle L. Characterisation of *CryIA(b)* protein produced in Bt corn (corn) Event 176 and comparison with native *CryIA(b)* protein produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki strain HD1-9 [M]. Performing laboratory: Ciba Seeds Agricultural Biotechnology Research Unit, Ciba-Geigy Corporation, Research Triangle Park, NC, USA. Study No CAB-006-94. 1994.
- [5] Privalle L. Quantification of *CryIA(b)* and PAT proteins in Bt(corn) tissues, whole plants and silage[M]. Performing laboratory: Ciba Seeds Agricultural Biotechnology Research Unit, Ciba-Geigy Corporation Research Triangle Park, NC, USA. Study No CAB-009-94. 1994.
- [6] Privalle L. In vitro digestibility of *CryIA(b)* protein from Bt corn(corn) and *Bacillus thuringiensis* subspecies kurstaki under simulated mammalian gastric conditions[M]. Ciba Seeds. Agricultural Biotechnology Research Unit, Ciba-Geigy Corporation, Research Triangle Park, NC, USA. Study No. CAB-007-94. 1994.
- [7] United States Food and Drug Administration Foods derived from new plant varieties derived through recombinant DNA technology: final consultations under FDA's 1992 policy[M]. Office of Premarket Approval Center for Food Safety & Applied Nutrition, US FDA. 1999.
- [8] WHO Strategies for assessing the safety of foods produced by biotechnology [R]. World Health Organization, Geneva, 1991: 59.
- [9] WHO Health aspects of marker genes in genetically modified plants. [R]. World Health Organization. Geneva, 1993: 32.
- [10] Morra M J. Assessing the impact of transgenic plant products on soil organisms[J]. Mol. Ecol., 1994, 3(1): 53-55.
- [11] Heckel D G. The complex genetic basis of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin in insects[J]. Biocontrol Sci. & Technol., 1994, 4(4): 405.
- [12] Koskella J, Stotzky G. Microbial utilization of free and clay-bound insecticidal toxins from and their retention of insecticidal activity after incubation with microbes[J]. Appl. and Environ. Micro., 1997, 63(9): 3561-3568.
- [13] Sims S R, Ream J E. Soil inactivation of the insecticidal protein within transgenic cotton tissue laboratory microcosms and field studies[J]. J. Agric. and Food Chem., 1997, 45(4): 1502-1505.
- [14] Stanley-Horn D E, Dively G P, Hellmich R L, et al. Assessing the impact of *CryIA b*-expressing corn pollen on monarch butterfly larvae in field studies[J]. Proc. Natl. Acad. Sci., 2001, 98(21): 11931-11936.
- [15] Wraight C L, Zangerl A R, Carroll M J, et al. Absence of toxicity of B

- acillus thuringiensis pollen to black swallow tails under field conditions[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000, 97(14): 7700–7703.
- [16] Pleasants J M, Hellmich R L, Dively G P, et al. Corn pollen deposition on milkweeds in and near cornfields[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2001, 98(21): 11919–11924.
- [17] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国国家标准——转基因植物及其产品成分检测抗虫和耐除草剂玉米 Bt-176 及其衍生品种定性 PCR 方法[S]. 2007.
- [18] Vaitilingom M, Pijnenberg H, Gendreau F, et al. Real-time quantitative PCR detection of genetically modified Maximizer maize and Roundup Ready soybean in some representative foods[J]. *Agric. Food. Chem.*, 1999, 47: 5261–5266.
- [19] Knut G, Berdal K, Hoist-Jensen A. Roundup Ready soybean eye-nt-specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analyses[J]. *Eur. Food Res. Technol.*, 2001, 213: 432–438.
- [20] Herná'ndez M, Pla M, Esteve T, et al. A specific real-time quantitative PCR detection system for event MON810 in maize YieldGard based on the 30-transgene integration sequence[J]. *Transgenic Research*, 2003, 12: 179–189.
- [21] Chu F S, et al. Preparation and characterization of aflatoxin B1-O-carboxy methyl oxime[J]. *Assoc. of Anal. Chem.*, 1977, 60(6): 1.
- [22] Laurent T C. Biochemistry of hyaluronan[J]. *Acta Otolaryngol(Stockh)*, 1987, 442: 7–24.
- [23] 刘光明, 苏文金. 转基因产品的检测方法[J]. *集美大学学报(自然科学版)*, 2001, 6(1): 87–92.

(责任编辑: 尹 航)