

邢宇俊,陆丹丹,吴季荣,等. 江苏省畜禽饲料中转基因成分的检测分析[J]. 江苏农业科学,2019,47(10):52-55.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.10.011

江苏省畜禽饲料中转基因成分的检测分析

邢宇俊,陆丹丹,吴季荣,王园园,徐剑宏,史建荣

(江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所/江苏省食品质量安全重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地/农业部农产品质量安全控制技术重点实验室/农业部农产品质量安全风险评估实验室/江苏省转基因安全评价公共服务中心/江苏省现代粮食流通与安全协同创新中心/中德农产品质量安全评估技术研发中心,江苏南京 210014)

摘要:随着转基因植物研究的迅速发展,转基因农产品的应用也更加广泛。在我国,转基因农产品的来源主要是进口,主要是玉米、大豆,主要用于饲料加工行业。为了调查转基因玉米、大豆在江苏省畜禽饲料市场的分布情况,在江苏省市场抽取 40 份鸡、鹅和猪饲料以及饲料原料,通过定性 PCR 检测玉米内标 *zSSIb*、大豆内标 *Lectin*、花椰菜花叶病毒 (CaMV) 35S 启动子、NOS 终止子、*Bt*、*EPSPS* 基因,同时检测玉米、大豆转化体事件 MON810、MON89788、GTS40-3-2 和 MON87701。结果表明,90% 的饲料都含有转基因成分;转基因玉米转化体事件 MON810 占 50%,转基因大豆转化体 MON89788、GTS40-3-2、MON87701 的检出率都为 80%。由研究结果可知,江苏省市场的鸡、鹅和猪饲料及饲料原料中转基因成分的占有率较高,需要进一步加强对饲料原料的转基因监管。

关键词:畜禽饲料;转基因作物;转基因成分检测

中图分类号: S816.17 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)10-0052-04

转基因生物 (genetically modified organisms, 简称 GMOs) 是指借助于基因工程技术将其他来源的基因转移到植物、动物或微生物的基因组中,使其性状发生改变,如提高抗虫性、营养成分含量或提升耐除草剂性状等,以期达到延长保质期等目的^[1-2]。

自从首例转基因产品被批准商业化生产以来,越来越多的转基因作物在不同国家和地区开始被商业化种植,截至 2016 年,全球种植转基因作物的面积已达到 1.85 亿 hm^2 。其中种植面积排名前 4 位是大豆、玉米、棉花、油菜,分别占全球转基因作物种植面积的 50%、33%、12%、5%^[3]。在我国允许进口的 46 种转基因农产品中,转基因大豆、玉米的品种最多,它们主要被用于饲料加工业中^[4-5]。

我国对于饲料粮的需求缺口非常大,在全球粮食危机的背景下,我们不能单纯地使用非转基因粮食作为饲料加工原料,而应将非转基因作物用于满足饲料工业。由于江苏省的畜禽养殖业比较发达,对饲料原料的需求量较大,因此,可以带来高附加值的转基因作物成为饲料生产的首要选择。

对大豆、玉米开展转基因检测,通常检测的外源基因包括大多数转基因产品中使用的花椰菜花叶病毒 CaMV35S 启动子、胭脂碱合成酶 NOS 终止子、抗虫 *Bt* 基因和除草剂 *EPSPS* 基因。由于这些序列在大多数转基因产品中存在一种或多

种,因此本研究拟选用常规的核酸检测技术 PCR 方法进行分析^[4,6],同时对阳性样品进行转化体体系的确定。通过对江苏省饲料中转基因成分的筛查,可为政府部门对饲料业的转基因监管提供数据,也可为江苏省转基因行业的监管提供支撑。

1 材料与方法

1.1 饲料样品

共选取 40 份饲料,分别由多家公司生产,具体饲料信息见表 1。其中包括乳猪浓缩饲料、母猪浓缩饲料、草鸡配合饲料、种鸡配合饲料、鹅饲料等,以及用作饲料原料的麦麸、玉米和豆粕。

1.2 主要试剂

Taq DNA 聚合酶、DNA marker、dNTPs,购自 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司;引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。其他试剂为实验室常规分析纯试剂。

1.3 方法

1.3.1 PCR 引物 根据农业部(现为农业农村部)颁布的标准条例,对饲料样品中含有的内参基因 *Lectin* 和 *zSSIb*,外源基因花椰菜花叶病毒 (CaMV) 35S 启动子、NOS 终止子、*EPSPS* 基因、*Bt* 基因以及 GTS40-3-2、MON89788、MON87701、MON810 转化体特异性序列进行检测。引物序列相关信息见表 2。

1.3.2 饲料 DNA 的提取 称取 10 g 饲料样品(颗粒性的),在搅拌器中磨碎(颗粒大小应小于 2 mm)。用十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法提取 DNA^[14]。

1.3.3 PCR 检测分析 PCR 体系:2.5 μL 10 \times PCR buffer, 2.5 μL Mg^{2+} , 2 μL dNTPs (2.5 mmol/L), 2 μL DNA 模板, 0.25 μL *Taq* DNA 聚合酶,加水补至 25 μL 。

Lectin、*zSSIb*、CaMV35S 启动子、NOS 终止子、*Bt*、GTS40-

收稿日期:2018-01-17

基金项目:国家转基因重大专项(编号:2016ZX08011-003);国家自然科学基金(编号:31301488);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(14)5065]。

作者简介:邢宇俊(1977—),女,山东莱芜人,博士,副研究员,主要从事转基因产品检测技术研究。Tel:(025)84392003;E-mail:xingyujun106@126.com。

通信作者:史建荣,博士,研究员,主要从事农产品质量安全方面的研究。Tel:(025)84392001;E-mail:shiji@jaas.ac.cn。

表 1 饲料编号及类型

编号	饲料类型	编号	饲料类型	编号	饲料类型	编号	饲料类型
1	草蛋鸡饲料	11	三黄鸡饲料 1	21	麸皮 1	31	玉米
2	蛋鸡饲料	12	三黄鸡饲料 2	22	麸皮 2	32	玉米
3	农户自配饲料 1	13	种鸡饲料 2	23	哺乳母猪浓缩饲料	33	豆粕
4	农户自配饲料 2	14	肉小鹅饲料	24	5% 乳猪复合预混料	34	豆粕
5	中速鸡饲料	15	农户自配饲料	25	哺乳母猪配合饲料	35	豆粕
6	雪山鸡饲料 1	16	肉大鹅饲料	26	仔猪浓缩饲料	36	豆粕
7	雪山鸡饲料 2	17	种公鸡饲料	27	8830 乳猪浓缩饲料	37	豆粕
8	青腿麻鸡饲料	18	种鸡产蛋饲料	28	5% 产蛋期复合预混料	38	豆粕
9	中鹅饲料	19	肉中鹅饲料	29	玉米	39	豆粕
10	种鸡饲料 1	20	种鸡育雏期饲料	30	玉米	40	豆粕

表 2 PCR 引物相关信息

目标基因	引物名称	引物序列 (5'→3')	扩增片断大小 (bp)	参考文献
CaMV 35S 启动子	35S - F	GCTCCTACAAATGCCATCATTGC	195	[7]
	35S - R	GATAGTGGGATTGTGCGTCATCCC		
NOS 终止子	T - NOS - F	GAATCCTGTTGCCGGTCTTG	180	
	T - NOS - R	TTATCCTAGTTTGC CGCTA		
EPSPS	EPSPS - F	ACGGTGAYCGTCTTCCMGTTAC	333	[8]
	EPSPS - R	GAACAAGCARGGCMGCAACCA		
<i>Bt</i>	Bt - F	GAAGGTTTGAGCAATCTCTAC	301	[9]
	Bt - R	CGATCAGCCTAGTAAGGTCGT		
<i>Lectin</i>	Lectin - F	GCCCTCTACTCCACCCCATCC	118	[10]
	Lectin - R	GCCCATCTGCAAGCCTTTTGTG		
<i>zSIIb</i>	<i>zSIIb</i> - F	CTCCCAATCCTTTGACATCTGC	151	[11]
	<i>zSIIb</i> - R	TCGATTTCCTCTTGGTGACAGG		
<i>GTS40-3-2</i>	<i>GTS40-3-2</i> - F	TTCAAACCTTCAATTTAACCGAT		[10]
	<i>GTS40-3-2</i> - R	AAGGATGTGGGATTGTGCGTC		
<i>MON89788</i>	<i>MON89788</i> - F	CTGCTCCACTCTTCCTTT	223	[12]
	<i>MON89788</i> - R	AGACTCTGTACCCTGACCT		
<i>MON87701</i>	<i>MON87701</i> - F	GCACGCTTAGTGTTGTGTCAAAC	150	[13]
	<i>MON87701</i> - R	GGATCCGTCGACCTGCAGTTAAC		
<i>MON810</i>	<i>MON810</i> - F	CAAGTGTGCCCACCACAGC	106	[11]
	<i>MON810</i> - R	GCAAGCAAATTCGGAATGAA		

3-2、MON89788、MON810、MON87701 基因片段的 PCR 反应条件:95 ℃ 5 min;95 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,35 个循环;72 ℃,7 min。*EPSPS* 基因的 PCR 反应条件:94 ℃ 7 min;94 ℃ 30 s,63 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,5 个循环;94 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,30 个循环;72 ℃ 7 min。PCR 产物用 2% 琼脂糖检测,通过凝胶成像系统观察基因扩增片段的大小。

2 结果与分析

2.1 饲料中 DNA 的质量分析

对提取的饲料 DNA 进行质量和浓度的测定,用核酸蛋白浓度检测仪测定所有样品溶液的浓度,并稀释至 40 ng/μL 后使用,纯度(*D*_{260 nm/280 nm})均在 1.7~2.0 间,表明提取的 DNA 浓度和纯度较好,可用于下一步试验。

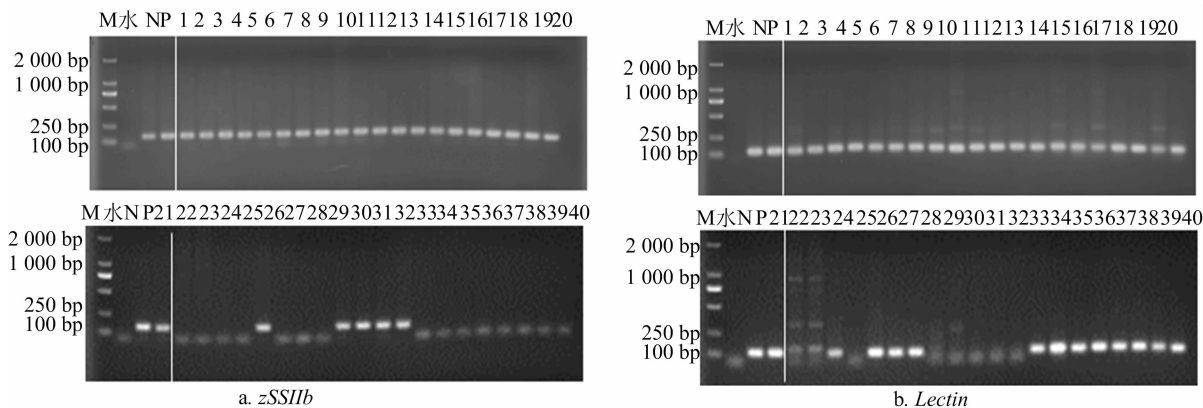
2.2 定性 PCR 结果分析

2.2.1 饲料中内参基因的分析 当前饲料的主要来源是玉米和豆粕,通过对饲料中内参基因的分析可以判断饲料的组成部分。通过对 40 种饲料样品的内参基因 *Lectin* 和 *zSIIb* 进行分析发现,混合饲料主要来源于玉米、大豆(本试验也对

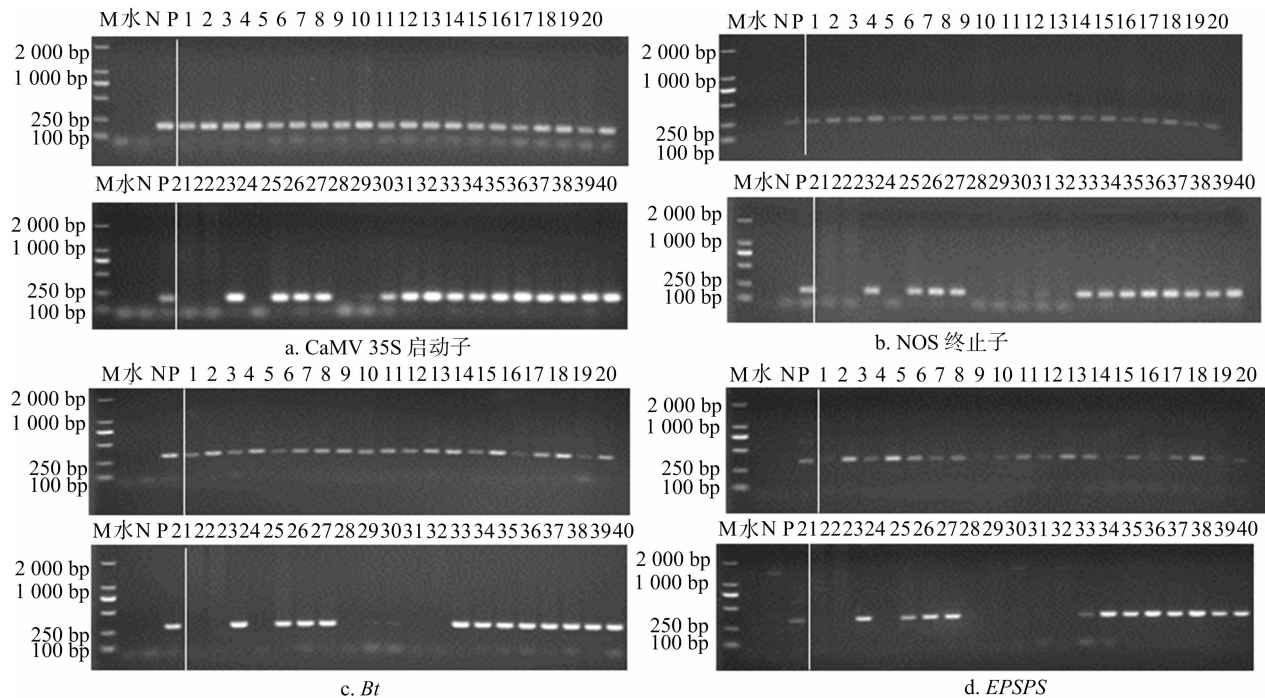
水稻 *SPS*、油菜 *HMGI/Y* 内参基因进行扩增,没有扩增出相应片断);从豆粕、玉米饲料中分别扩增出对应的内参基因;从麦麸中检测出大豆内参基因(图 1)。

2.2.2 饲料中外源基因的筛查 对玉米和大豆及其加工品中的外源基因进行检测,通过对其所有转基因转化体的分析发现,几乎所有的转基因玉米和大豆中含有 CaMV35S 启动子、NOS 终止子、*Bt*、*EPSPS* 中的 1 种或几种基因,因此对 40 份饲料样品中外源基因的筛查选用 CaMV35S 启动子、NOS 终止子、*Bt*、*EPSPS* 基因进行。图 2 结果显示,在混合饲料中,36 份含有 CaMV35S 启动子,占总饲料的 90%;32 份饲料含有 NOS 终止子,占总饲料的 80%;32 份饲料含有 *Bt* 基因,占总饲料的 80%;32 份饲料含有 *EPSPS* 基因,占总饲料的 80%。由此可见,饲料中转基因成分的占比较高。

2.2.3 饲料中所含转基因转化体的验证 根据我国农业部(现为农业农村部)批准进口的转基因转化体品种以及对其外源基因的分析,对其中的转化体品系(转基因玉米 MON810 与转基因大豆 MON89788、GTS40-3-2、MON87701)进行转化体特异性序列扩增比对。由图 3 可以看出,有 20 份饲料中



M—DNA marker; N—阴性对照(玉米或大豆); P—阳性对照(玉米和大豆)。1~40—40 种不同的饲料样品(编号同表1)。下图同
图1 40 种饲料中内参基因的分析



M—DNA marker; N—阴性对照(非转基因样品); P—阳性对照(转基因材料)。下图同

图2 40 种饲料中外源基因 CaMV35S 启动子、NOS 终止子、*Bt*、*EPSPS* 的分析

含有转基因玉米 MON810, 占总饲料的 50%; 32 份饲料中都含有转基因大豆 MON98788、GTS40-3-2、MON87701, 占总饲料的 80%。

2.3 40 份饲料中转基因成分的分布

由图 4 对每份样品的分析结果可以看出, 扩增检测出大豆 *Lectin*、玉米 *zSSIb* 内参基因的饲料样品, 都含有 1 种或多种外源基因成分; 共检测到 36 份含有转基因成分的饲料, 占总数的 90% (36/40); 而没有检测出大豆 *Lectin*、玉米 *zSSIb* 内参基因也没有检测到其他体外外源基因成分样品占 10%。CaMV35S 启动子的检出率为 90% (36/40); NOS 终止子的检出率为 80% (32/40); *Bt* 基因的检出率为 80% (32/40); *EPSPS* 基因的检出率为 80% (32/40); 转基因玉米转化体事件 MON810 的检出率为 50% (20/40); 转基因大豆 MON89788、MON87701、GTS40-3-2 的检出率都为 80% (32/40)。可见 40 份饲料样品中转基因饲料的比例较高。

3 讨论

当前种植面积比较大的转基因农作物是玉米、大豆, 在我国国内, 转基因玉米、大豆的很多转化体已经被批准进口用于饲料加工。在本试验中发现, 用于饲料中的麦麸没有检测出任何转基因成分, 这是因为转基因小麦商业化生产的比较少, 并且国内也不允许转基因小麦进口; 另外, 24 号 5% 乳猪复合预混料和 28 号 5% 产蛋期复合预混料中也不含有任何转基因成分。此外, 36 份饲料和饲料原料中都含有转基因成分, 占比达到 90%, 可见江苏省畜禽饲料中转基因产品的占有率比较高, 江苏省饲料中转基因成分的含量同山西省的情况比较接近, 山西省达到了 100%^[15], 这也说明我国饲料业中转基因产品的占有率很高, 检测出的转基因转化体事件是我国批准进口的转基因材料, 允许用于饲料加工业。

在本试验中发现, 用于饲料原料的玉米颗粒是转基因玉

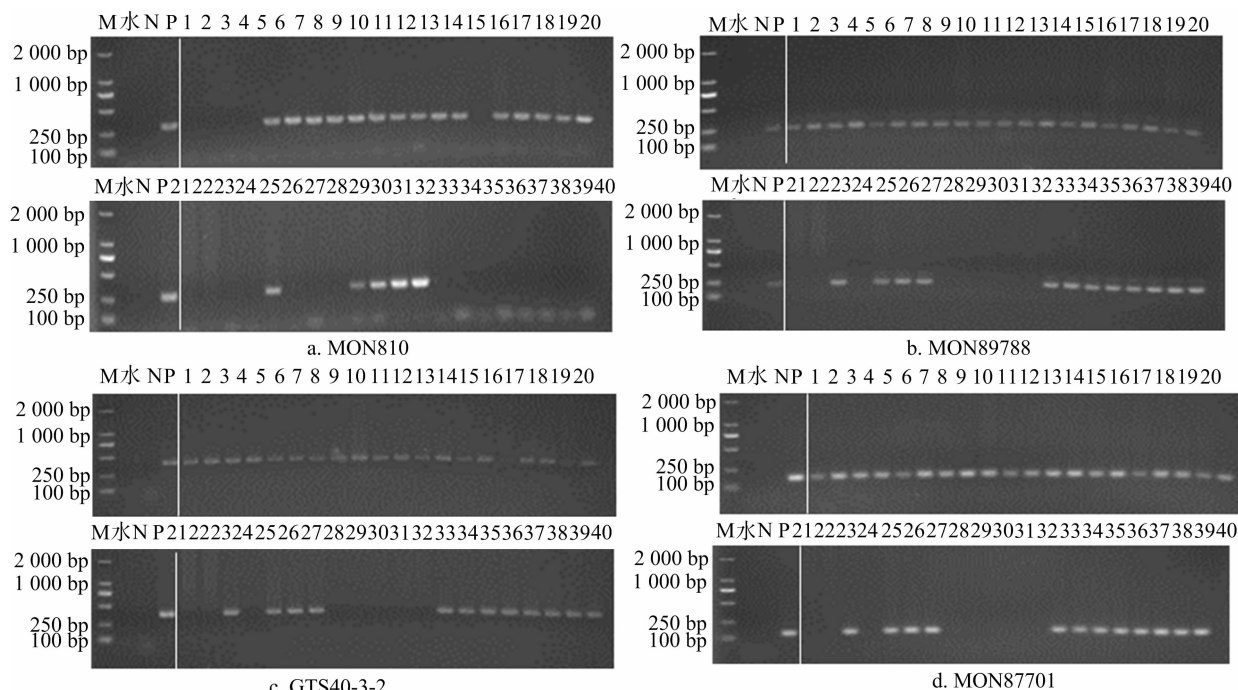


图3 40 种饲料中转转化体系 MON810、MON89788、GTS40-3-2、MON87701 的检测分析

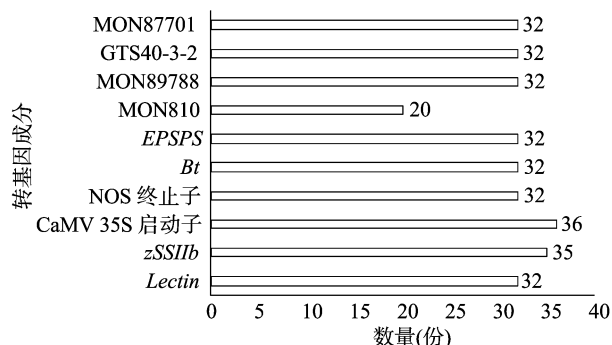


图4 40 份饲料中转基因成分的筛查结果

米 MON810。而国内转基因作物及其产品的监管主要集中在大田作物、种子行业、食品行业等领域,对饲料原材料中转基因材料的监管力度比较小,而江苏省内饲料中使用转基因产品作为原材料的饲料比例较高,应该加强对转基因原材料的跟踪和监管,以免原材料散落于大田中造成污染,从而保证转基因农产品的合理、合法使用。

参考文献:

- [1] Greiner R, Konietzny U. Presence of genetically modified maize and soy in food products sold commercially in Brazil from 2000 to 2005 [J]. Food Control, 2008, 19(5): 499-505.
- [2] Arun O O, Yilmaz F. PCR detection of genetically modified maize and soya in mildly and highly processed foods [J]. Current Opin in Biotechnology, 2011, 22(S1): S96.
- [3] James C. Global status of commercialized biotech/GM crops; 2016. ISAAA Brief No. 52[Z]. Ithaca, NY: ISAAA, 2016.
- [4] Forte V T, Di Pinto A, Martino C, et al. A general multiplex-PCR assay for the general detection of genetically modified soya and maize [J]. Food Control, 2005, 16(6): 535-539.
- [5] 陈亮, 黄庆华, 孟丽辉, 等. 转基因作物饲用安全性评价研究进

展[J]. 中国农业科学, 2015, 48(6): 1205-1218.

- [6] Miraglia M, Berdal K G, Brera C, et al. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain [J]. Food and Chemical Toxicology: an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association, 2004, 42(7): 1157-1180.
- [7] 农业部 1782 号令-3-2012. 转基因植物及其产品成分检测调控元件 CaMV35S 启动子、FMV35S 启动子、NOS 启动子、NOS 终止子和 CaMV35S 终止子定性 PCR 方法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- [8] 农业部 1861 号公告-5-2012. 转基因植物及其产品成分检测 CP4-EPSPS 基因定性 PCR 方法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- [9] 农业部 953 号公告-6-2007. 转基因植物及其产品成分检测抗虫转 Bt 基因水稻定性 PCR 方法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [10] 农业部 1861 号公告-2-2012. 转基因植物及其产品成分检测耐除草剂大豆 GTS 40-3-2 及其衍生品种定性 PCR 方法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- [11] 农业部 2122 号公告-16-2014. 转基因植物及其产品成分检测抗虫玉米 MON810 及其衍生品种定性 PCR 方法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- [12] 农业部 1485 号公告-6-2010. 转基因植物及其产品成分检测耐除草剂大豆 MON89788 及其衍生品种定性 PCR 方法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [13] 农业部 2259 号公告-7-2015. 转基因植物及其产品成分检测抗虫大豆 MON87701 及其衍生品种定性 PCR 方法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.
- [14] 农业部 1485 号公告-4-2010. 转基因植物及其产品成分检测 DNA 提取和纯化 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [15] 袁建琴, 赵江河, 史宗勇, 等. 动物饲料中转基因抗草甘膦大豆 GTS40-3-2 成分的检测 [J]. 大豆科学, 2016(2): 295-300.