

外源转基因片段从转基因棉籽壳到 食用菌水平转移研究

Study on the transferring of the gene fragment from the genetically
modified cottonseed hulls to the edible fungi

白亚龙 索玉娟 林 婷 沈源源

BAI Ya-long SUO Yu-juan LIN Ting SHEN Yuan-yuan

赵晓燕 刘海燕 周昌艳

ZHAO Xiao-yan LIU Hai-yan ZHOU Chang-yan

(上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所, 上海 201403)

(Institute for Agri-food Standards and Testing Technology, Shanghai Academy of
Agricultural Science, Shanghai 201403, China)

摘要: 研究利用转基因棉籽壳种植食用菌是否会导致外源转基因片段从棉籽壳水平转移到食用菌中。从银耳生产基地与菇厂采集 15 份银耳样品与 10 份平菇样品(培养基质中转基因棉籽壳含量分别约为 75% 与 92%), 用 PCR 扩增检测是否存在转基因棉籽壳中的外源片段 *CaMV* 35S、*NOS*、*CpT I*、*Cry IA(c)*。此外, 针对可能会用含棉籽壳基质培养的市售食用菌, 从上海市闵行区各大中型超市与农贸市场采集市售样品 47 份, 用 PCR 扩增检测外源转基因片段。结果显示, 不论是生产基地明确用转基因棉籽壳培养的银耳与平菇样品, 还是市售的各类食用菌均未发现存在外源转基因片段向食用菌水平转移的现象。

关键词: 转基因棉籽壳; 银耳; 平菇; 食用菌; 基因水平转移; PCR

Abstract: It is a question in the field of food-safety that whether foreign genetically modified genes would transfer from the genetically modified cottonseed hulls to edible fungi. In this study, 15 *Tremella fuciformis* samples and 10 *Pleurotus ostreatus* samples (the cultivation media contained 75% and 92% genetically modified cottonseed

hulls, respectively) collected from cultivation media were evaluated by PCR to confirm whether the foreign genetically modified genes, *CaMV* 35S, *NOS*, *CpT I*, *Cry IA(c)*, were present. In addition, 47 samples which were probably grown in the media containing cottonseed hulls, were collected from the large and medium-sized supermarkets and farm produce markets. All of the results of PCR showed that the foreign sequences were not amplified by PCR. In conclusion, No exogenous transgenic fragments in the genetically modified cottonseed hulls was found transferred to the edible fungi.

Keywords: genetically modified cottonseeds hulls; edible fungi; *Tremella fuciformis*; *Pleurotus ostreatus*; gene transferring; PCR

食用菌蛋白质含量高, 营养丰富, 具有增强免疫力、降血糖等保健作用^[1]。棉籽壳营养丰富是理想的食用菌栽培原料^[2]。中国也是转基因棉花种植大国, 根据国际农业生物技术应用服务组织的报道, 在 2014 年中国转基因棉花种植面积就已达棉花总种植面积的 93%, 而且呈不断增长的趋势^[3]。大量的转基因棉籽壳会作为培养料用于食用菌栽培, 因此, 有必要考察外源转基因片段是否会通过栽培从转基因棉籽壳水平转移到所栽培的食用菌中。

在之前的研究中, 并没有达到统一的共识。徐宝梁^[4]与于莉^[5]分别用转基因棉籽壳和转基因油菜籽为主要原料种植平菇, 均没有发现转基因片段从棉籽壳向平菇水平转移的现象, 用添加有转基因片段的液体培养基培养平菇菌丝体, 也未发现水平转移现象。然而, 马务超等^[6]用转基因棉籽种植银耳, 在所栽培的银耳中检出转基因启动子 *CaMV* 35S 与终止子 *NOS*, 但是没有发现 *Cry1A* 片段。闫燕^[7]与 Ying

基金项目: 国家农产品质量安全风险评估项目(编号: GJFP2017006); 上海市农委(兴农推广-成长计划)[编号: 沪农青字(2017)第 1-28 号]

作者简介: 白亚龙, 男, 上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所助理研究员, 博士。

通信作者: 周昌艳(1971—), 女, 上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所研究员, 博士。

E-mail: changyanz@sina.com

收稿日期: 2017-12-25

Shang 等^[8]用转基因棉籽种植平菇,采摘不同时期的平菇样品,经过 PCR 检测发现均存在外源转基因片段 *CaMV* 35、*NOS*、*CryIA(b)*-*CryIA(c)*。总之,从目前的研究来看,对于转基因棉籽壳栽培食用菌是否会发生外源转基因片段水平转移现象仍然需要更多的试验确认与验证。本研究从银耳生产基地与菇厂采集以棉籽壳为主要培养物栽培的 15 份银耳样品和 10 份平菇样品,此外,还从大中型超市和农贸市场采集 47 份食用菌样品,用 PCR 扩增检测是否存在转基因棉籽壳中的外源片段 *CaMV* 35S、*NOS*、*CpTI*、*CryIA(c)*。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 试剂

溶壁酶:10 U/ μ L,上海天根生化科技有限公司;
蛋白酶 K:40 mAnsom u/mg,美国 Merck 公司;
基因组 DNA 提取试剂盒:上海索来宝生物科技有限公司;
2 $\times$ EasyTaq PCR SuperMix (-dye)-PCR SuperMix:北京全式金生物技术有限公司;
所用水均为灭菌的 Milli-Q 水。

1.1.2 食用菌样品

15 份转基因棉籽壳为主原料栽培的银耳样品:培养基质中棉籽壳含量>75%,采集自福建福州某银耳种植基地;
10 份以转基因棉籽壳为主培养物栽培的平菇样品:棉籽含量约为 92%,采摘自上海奉贤庄行某菇厂;
47 份市售食用菌样品(其中平菇 10 份、杏鲍菇 8 份、香菇 8 份、金针菇 6 份、银耳 6 份、海鲜菇 4 份、白玉菇 3 份、秀珍菇 2 份):上海市闵行区各大中型超市与农贸市场。

1.1.3 引物

PCR 扩增所需引物见表 1,均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.1.4 仪器

微量台式离心机:Eppendorf 5415D 型,德国 Eppendorf 公司;
恒温混匀振荡器:Thermo Mixer 型,德国 Eppendorf 公司;
PCR 仪:Eppendorf AG 型,德国 Eppendorf 公司。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取

(1) 平菇样品等(除银耳外的其他食用菌)基因组 DNA 提取:称取少量(约 1 g)样品,倒入适量液氮,立即研磨,重复 3 次。取研成粉末的样品 100 mg,加 200 μ L 试剂盒所配溶液 A,加入 10 μ L 溶壁酶与 20 μ L RNase A,再加入 100 mg 玻璃珠,在振荡器上振荡约 5 min。加入 40 μ L 50 mg/mL 的蛋白酶 K,充分混匀,55 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。12 000 r/min 离心 2 min。将上清转移到一个新的离心管中,加入 200 μ L 试剂盒所配溶液 B。接下来步骤完全参照试剂盒说明书,最终基因组 DNA 溶解于 100 μ L 缓冲液当中。
(2) 银耳样品基因组 DNA 提取:称取少量(约 1 g)样

表 1 引物序列汇总	
Table 1 The sequences of primers for PCR	
引物	序列(5'-3')
C18s rDNA-r/f	TCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTA
	AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT
CaMV 35S-r/f	GCTCCTACAAATGCCATCA
	GATAGTGGGATTGTGCGTCA
NOS-r/f	GAATCCTGTTGCCGGTCTTG
	TTATCCTAGTTTGCGCGCTA
CpTI-r/f	GCGATGAACCTTCTGAGTCT
	TACTCATCATCTTCATCCCTG
Cry IA(c)-r/f	GTTCCAGCTACAGCTACCTCC
	CCACTAAAGTTTCTAACACCCAC
Cry IA(b)+(c)-r/f	GTTCGTTCTCGGACTAGTTG
	GGAGAGCTGGGTTAGTAGGA
ITS4/5	TCCTCCGCTTATTGATATGC
	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
AC-r/f	GATAGAACCACCAATCCAAAC
	AAGTCATCACCATCGGTAACG

品,倒入适量的液氮,立即研磨,重复 3 次。取研成粉末的样品 50 mg,加 400 μ L 试剂盒所配溶液 A,加入 10 μ L 溶壁酶与 20 μ L RNase A,再加入 100 mg 玻璃珠,在振荡器上振荡约 5 min。加入 40 μ L 50 mg/mL 的蛋白酶 K,充分混匀,55 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。加入与溶液等量的 10% CTAB 溶液,65 $^{\circ}$ C 继续处理 30 min,12 000 r/min 离心 5 min。取 200 μ L 上清转移到一个新的离心管中,然后加入 200 μ L 试剂盒所配溶液 B。后续步骤同 1.2.1(1)。

1.2.2 PCR 检测

(1) PCR 扩增体系(25 μ L):12.5 μ L 2 $\times$ EasyTaq PCR SuperMix (-dye)-PCR SuperMix, 10 μ mmol/L 的上下游引物各 0.5 μ L,加无菌水至 25 μ L。
(2) PCR 热循环步骤:94 $^{\circ}$ C 保持 5 min,每个循环温度为 94,58,72 $^{\circ}$ C 下分别保持 30 s,共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。扩增产物用 2% 的琼脂糖凝胶进行电泳,4S Red Plus 核酸染色剂(上海生工)染色观察结果。

2 结果与分析

2.1 以保守基因扩增结果评价银耳与平菇所提取基因组 DNA

在食用菌样品的基因组 DNA 提取中,为了增加 DNA 提取的效率,参照说明书之外,对有些步骤进行了适当的调整。在提取中,因为银耳含有大量的胶质,在液氮研磨之后用溶液溶解,即使离心也是呈现黏稠的流体状,无法用试剂盒所配的层析柱进行操作。参考文献^[9]在处理液中添加 10% 的 CTAB 溶液(使终浓度为 5%)处理,离心后得到澄清的上层清液。以来自于银耳种植基地和菇厂的 15 份银耳和 10 份平菇样品为例,提取的基因组 DNA 母液在稀释 10 倍后,进行内源基因的扩增。平菇样品扩增平菇 β -action 基因

(引物为 AC-r/f)^[10-11], 银耳样品用真菌通用引物 ITS4/5 进行扩增。电泳结果均呈现明亮的条带(图 1), 说明提取的 DNA 无抑制物, 可以进行 PCR 扩增检测。

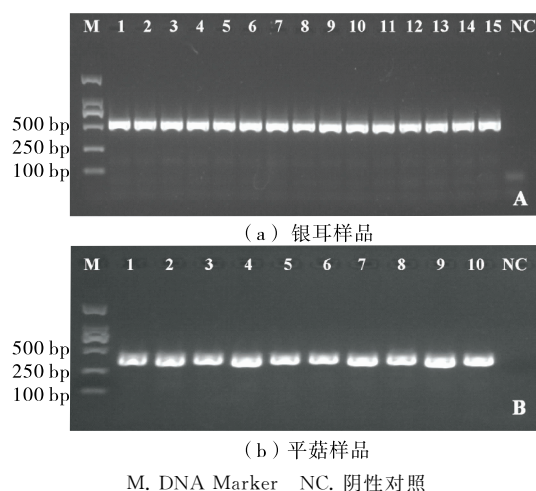


图 1 15 份银耳样品与 10 份平菇样品的内源基因扩增
Figure 1 Amplification of endogenous genes of 15 *Tremella fuciformis* samples and 10 *Pleurotus ostreatus* samples

2.2 确定栽培银耳与平菇所用转基因棉籽壳中转基因片段

转基因序列扩增所需引物参照 SN/T 1199—2010, 选取 *CaMV* 35S 启动子、*NOS* 终止子、结构基因 *CpTI*、*Cry IA* (b)+*Cry IA* (c)、*Cry IA* (c) 进行检测, 以上海市某菇厂的棉籽壳为例(图 2), 检出 *CaMV* 35S 启动子、*NOS* 终止子、结构基因 *CpTI*、*Cry IA* (c), 同样地, 在来自于福建银耳种植基地的棉籽壳中同样也扩增出了这些基因(对培养料进行检测, 也检测到这 4 个基因)。说明这 2 种棉籽壳来源于品种相同的棉花。不同品种的转基因棉花所检测到的序列并不相同, 在另一家上海菇厂提供的棉籽壳中, 检测到 *CaMV* 35S 启动子、*NOS* 终止子、结构基因 *Cry IA* (b)+*Cry IA* (c)、*Cry IA* (c), 而未扩增出 *CpTI* 序列。在银耳养殖基地的 15 份银耳样品与菇厂的 10 份平菇样品中只筛查检出 *CaMV* 35S、*NOS*、*CpTI*、*Cry IA* (c) 4 种转基因片段。

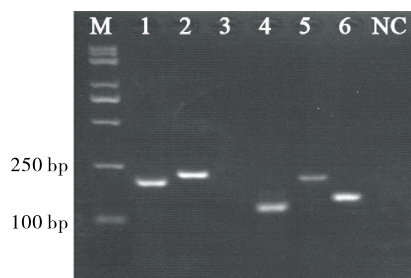


图 2 棉籽壳中转基因序列 PCR 扩增后电泳图
Figure 2 Amplification of foreign sequences from genetically modified cottonseed hulls

2.3 转基因棉籽壳栽培的银耳与平菇样品中转基因片段的检测

15 份新鲜银耳样品连同棉籽棒一同收集, 提取 DNA 前银耳均生长于棉籽棒上, 状态良好。最终 PCR 结果见图 3, *CaMV* 35S 启动子、*NOS* 终止子、结构基因 *CpTI*、*Cry IA* (c) 均没有检测到, 说明无论启动子与终止子还是结构基因均没有发现从转基因棉籽壳向银耳发生水平转移的现象。

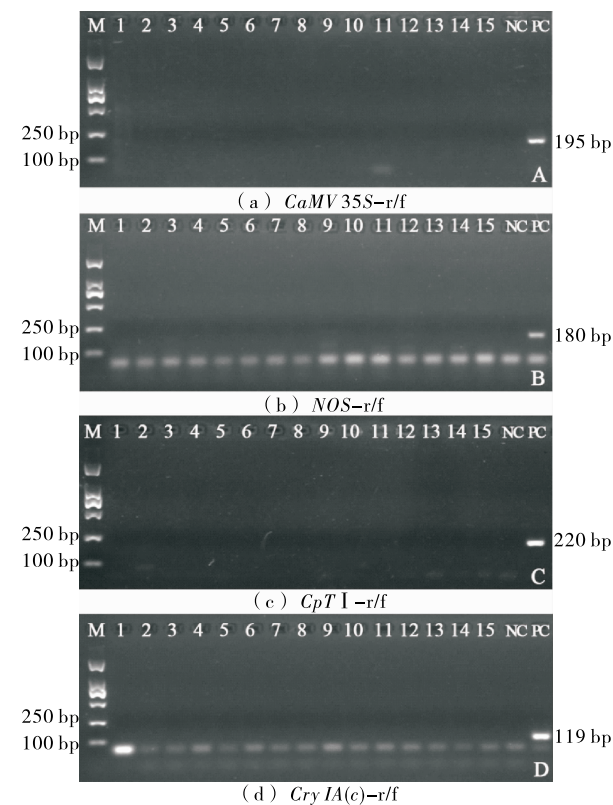


图 3 15 份银耳样品外源性转基因片段扩增
Figure 3 The amplification of foreign genes in 15 *Tremella fuciformis* samples

对 10 份采自菇厂的带有菌菇棒的平菇样品做了相同的 PCR 扩增检测(提取 DNA 之前平菇均生长于含有转基因棉籽壳培养基上, 生长状态良好), PCR 结果显示并无目标转基因片段被扩增(图 4), 说明在平菇样品内并不存在转基因片段。虽然有些引物扩增会出现一些非特异性产物, 但是在目标条带大小处并没有出现相应扩增条带。

2.4 市售食用菌样品中外源转基因片段检测

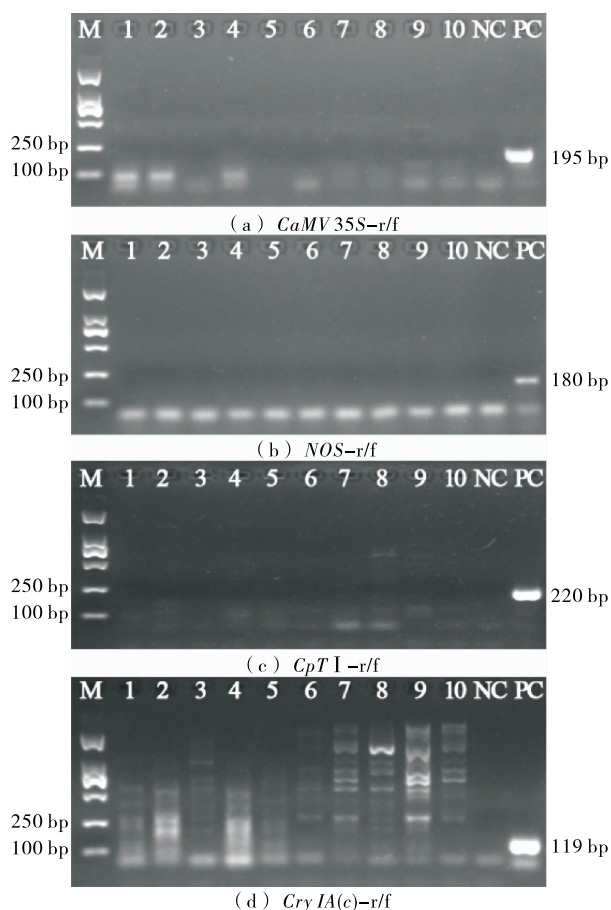
在银耳种植基地和菇厂采集的以转基因棉籽壳为主要培养料的银耳和平菇样品中, 没有检测到外源转基因片段。除此之外, 还从当地的农贸市场与超市采集食用菌样品 47 份, 其中, 平菇样品 10 份、香菇样品 8 份、杏鲍菇 8 份、银耳样品 6 份、蟹味菇样品 4 份、秀珍菇样品 2 份。这些样品是市面上常见的食用菌, 而且可能会被含有棉籽壳的培养基质栽培。有些食用菌虽然市场常见, 但不会用棉籽壳培养, 所以未被采集, 如属于草腐菌的双孢蘑菇。最终的 PCR 检测结果(见表 2)显示, 47 份购买自大中型超市与农贸市场的样品均没有检测到外源转基因片段。

表 2 市售食用菌样品外源转基因片段 PCR 检测结果[†]

Table 2 The amplification of foreign genes in edible fungi purchased from markets

样品	<i>β-action</i>	<i>ITS</i>	<i>CaMV 35S</i>	<i>NOS</i>	<i>CpT I</i>	<i>Cry IA(b)+IA(c)</i>	<i>Cry IA(c)</i>
阳性对照	\	\	+	+	+	+	+
平菇 1	+	\	—	—	—	—	—
平菇 2	+	\	—	—	—	—	—
平菇 3	+	\	—	—	—	—	—
平菇 4	+	\	—	—	—	—	—
平菇 5	+	\	—	—	—	—	—
平菇 6	+	\	—	—	—	—	—
平菇 7	+	\	—	—	—	—	—
平菇 8	+	\	—	—	—	—	—
平菇 9	+	\	—	—	—	—	—
平菇 10	+	\	—	—	—	—	—
杏鲍菇 1	\	+	—	—	—	—	—
杏鲍菇 2	\	+	—	—	—	—	—
杏鲍菇 3	\	+	—	—	—	—	—
杏鲍菇 4	\	+	—	—	—	—	—
杏鲍菇 5	\	+	—	—	—	—	—
杏鲍菇 6	\	+	—	—	—	—	—
杏鲍菇 7	\	+	—	—	—	—	—
杏鲍菇 8	\	+	—	—	—	—	—
香菇 1	\	+	—	—	—	—	—
香菇 2	\	+	—	—	—	—	—
香菇 3	\	+	—	—	—	—	—
香菇 4	\	+	—	—	—	—	—
香菇 5	\	+	—	—	—	—	—
香菇 6	\	+	—	—	—	—	—
香菇 7	\	+	—	—	—	—	—
香菇 8	\	+	—	—	—	—	—
金针菇 1	\	+	—	—	—	—	—
金针菇 2	\	+	—	—	—	—	—
金针菇 3	\	+	—	—	—	—	—
金针菇 4	\	+	—	—	—	—	—
金针菇 5	\	+	—	—	—	—	—
金针菇 6	\	+	—	—	—	—	—
银耳 1	\	+	—	—	—	—	—
银耳 2	\	+	—	—	—	—	—
银耳 3	\	+	—	—	—	—	—
银耳 4	\	+	—	—	—	—	—
银耳 5	\	+	—	—	—	—	—
银耳 6	\	+	—	—	—	—	—
蟹味菇 1	\	+	—	—	—	—	—
蟹味菇 2	\	+	—	—	—	—	—
蟹味菇 3	\	+	—	—	—	—	—
蟹味菇 4	\	+	—	—	—	—	—
白玉菇 1	\	+	—	—	—	—	—
白玉菇 2	\	+	—	—	—	—	—
白玉菇 3	\	+	—	—	—	—	—
秀珍菇 1	\	+	—	—	—	—	—
秀珍菇 2	\	+	—	—	—	—	—

[†] +表示阳性;—表示阴性;\表示未检测。



M, DNA maker NC, 阴性对照 PC, 阳性对照

图 4 10 份平菇样品外源性转基因片段筛查

Figure 4 The amplification of foreign genes in 10 *Pleurotus ostreatus* samples

与之前的一些研究不同,不论是种植基地用转基因棉籽壳为主要原料栽培的银耳和平菇,还是采集市售的样品,均没有检测到转基因棉籽壳中的外源片段。闫燕等^[7]与 Ying Shang 等^[8]用转基因棉籽种植平菇,在栽培的不同时期采样检测,均检测到外源转基因片段。然而,同时也在平菇中检测到棉籽的内源基因 *Sad*。出现这种情况,可能性有二:① 基因片段可以通过水分进入平菇菌体内,也就是说不论是转基因还是非转基因片段,只要是培养基中含有的基因片段均可能出现在平菇菌体内,从而被检测到。如果这样,与转基因与否并不相关;② 可能是提取的平菇基因组 DNA 遭到棉籽壳基因组 DNA 的污染,所以,不论是棉籽壳中含有的转基因片段还是内源基因均被检测到。PCR 易于污染,尤其是检测样品与阳性样品在液氮研磨、提取 DNA、PCR 等操作步骤一同进行的情况下。针对前一种可能,徐宝梁^[4]与于莉^[5]用额外添加转基因序列的液体培养液培养平菇菌丝体进行检测,未在菌丝体中发现外源转基因片段,也就是说基因片段并不能通过水分进入菌体。当然,即使这种情况存在,也仅仅是外源转基因片段通过水分进入食用菌菌体,其实质类似于食用菌菌体沾染了微量的棉籽壳核酸物质,并不会引起食品安全方面的忧虑。

3 结论

本研究考察了转基因棉籽壳的外源转基因片段是否会通过栽培水平转移到食用菌中。从银耳生产基地和菇厂采集用转基因棉籽壳栽培的 15 份银耳样品与 10 份平菇样品,PCR 扩增检测是否存在转基因棉籽壳中的外源片段 *CaMV* 35S、*NOS*、*CpTI*、*Cry IA(c)*,结果均没有发现目标序列被扩增。针对可能会用含有棉籽壳基质培养的市售食用菌,从大中型超市与农贸市场采集 47 份样品,通过 PCR 扩增检测转基因棉籽壳中的外源片段 *CaMV* 35S、*NOS*、*CpTI*、*Cry IA(b)+Cry IA(c)*、*Cry IA(c)*,结果也没有发现目标序列被扩增。总之,通过 PCR 筛查,未发现转基因棉籽壳中外源转基因片段有向所栽培食用菌水平转移的现象。

本研究未发现外源转基因片段会从转基因培养料进入食用菌内,为转基因培养物栽培食用菌的安全性进行了澄清。当然,这仅仅是定点考察与市场初步筛查的结果,想要得到更多确切的结果,可以考虑在食用菌生长周期浇灌含有人为添加特定外源序列的水,确定外源片段是否会随水分进入食用菌菌体内,还可以考察培养基物质所含 DNA 片段是否有可能通过水分进入食用菌菌体内。此外,还可以考虑进一步加大市售食用菌样品筛查样本量,用更大量的数据彻底消除生产者与消费者的顾虑。

参考文献

- [1] 肖星凝,袁娅,廖霞,等. 食用菌抗氧化活性成分及其抗氧化作用机制研究进展[J]. 食品与机械, 2016, 32(11): 207-211.
- [2] 申进文,刘超,张倩,等. 5 种培养料对平菇营养成分的影响[J]. 河南农业科学, 2016, 45(10): 103-106.
- [3] 杨阳,王叶,范金杰,等. 转基因棉花 MON757 转化体特异性 PCR 检测方法及应用[J]. 农业生物技术学报, 2016, 24(6): 908-918.
- [4] 徐宝梁. 转基因棉籽培养料栽培平菇过程中 Bt 蛋白、转入 DNA 降解及对平菇、平菇害虫的影响[D]. 北京: 中国农业大学, 2005: 65-72.
- [5] 于莉. 利用转基因油菜籽栽培平菇安全性分析[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2007: 39-52.
- [6] 马务迢,王凡华,谭庆云,等. 棉籽壳培养基及栽培银耳中转基因成分的 PCR 分析[J]. 中国食品学报, 2016, 16(3): 168-175.
- [7] 闫燕. 转基因培养料与平菇间基因水平转移现象的研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2011.
- [8] SHANG Ying, YAN Yan, XU Wen-tao, et al. Research on gene mobility and gene flow between genetically modified mon 15985 cotton and pleurotus ostreatus[J]. Journal of Food Safety, 2016, 36(3): 423-432.
- [9] 王凡华,马务迢,谭庆云,等. 银耳干品的 DNA 提取及随机扩增多态性分析[J]. 食品科学, 2015, 36(4): 172-175.
- [10] 史红鸽,戚元成,申进文. 一种从平菇菌丝中提取总 RNA 的方法[J]. 江西农业学报, 2014, 26(8): 68-70.
- [11] CHAI Ran, ZHANG Guang, SUN Qiang, et al. Liposome-mediated mycelial transformation of filamentous fungi[J]. Fungal biology, 2013, 117(9): 577-583.