如何做好大豆粉转基因成分检测能力验证

尤 波*, 吴永生, 周雅男, 王秋菊

(绥芬河出入境检验检疫局综合技术中心, 牡丹江 157300)

摘 要: 目的 能力验证是利用实验室间比对来确定实验室检测或校准能力的活动, 是提高检验机构内部质量控制最有效的手段之一。**方法** 通过参加 2012 “CNAS T0659 大豆粉中转基因成分定性检测”能力验证获得满意结果, 对实验室参加能力验证过程中应注意的问题做简要分析。**结果与结论** 标准方法的选择, DNA 提取效率, 以及实验过程的质量控制等都是影响能力验证结果的重要因素。

关键词: 能力验证; 转基因成分; 质量控制

How to test the genetically modified soybean flour

YOU Bo*, WU Yong-Sheng, ZHOU Ya-Nan,WANG Qiu-Ju

(*Integrated Technology Center*, *Suifenhe Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau*, *Mudanjiang* 157300, *China*)

ABSTRACT: Objective Proficiency test is the activity to determine the laboratory testing or calibration ability by comparison of the laboratories. It could improve the internal quality control of inspection and agency effectively. **Methods** To verify the satisfactory results by participating in the 2012 "CNAS T0659 qualitative detection of transgenic components in soybean flour", analyzed the problems which laboratories should pay attention to briefly. **Results and Conclusion** The choice of standard method, DNA extraction efficiency and the quality control of the experiment process are the important factors to influence the proficiency testing results.

KEY WORDS: proficiency testing; genetically modified ingredients; quality control

第三方检测机构参加国际或国内权威机构组织的实验室间能力验证比对计划, 可以有效地提高检测机构出具检验数据可靠性和有效性, 同时有利于检测机构质量管理体系的自我评定和检测能力的快速提升, 确保实验室持续维持较高的检测校准技术水平[1], 增强客户对实验室出具检验结果可靠性能力的信任度。2012 年, 笔者参加了辽宁省产品质量监督检验院组织的 CNAS T0659 大豆粉中转基因成分定性检测, 5 个样品检测结果均为满意。由于 CNASAL07-2011 能力验证频次要求规定食品转基因为 1 次/2 年[2], 加之转基因成份测定能力验证(以下简称 PT)试验不同于化学分析领域, 有其试验过程本身的特殊性等, 转基因 PT 的提供者并不多[3]。现就参加 2012 “CNAS T0659 大豆粉中转基因成分定性检测”能力验证过程中应注意的问题做一简要分析、归纳, 为今后参加该类能力验证活动提供参考。

1 能力验证要求描述

本次能力验证样品为大豆粉, 需要参加实验室对样品中的基因成分进行测定, 包括大豆的内源基因和确定是否含有外源基因。所提供 5 份样品

*通讯作者: 尤波, 助理工程师, 主要研究方向为粮食作物转基因检测、食品中微生物检测。E-mail: 278783956@qq.com

***Corresponding author:** YOU Bo, Assistant Engineer, Suifenhe Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Mudanjiang 157300, China. E-mail: 278783956@qq.com

的检测结果与样品指定值完全一致，方可获得检测结果满意评价，否则该实验室的检测项目结果为不满意。

2 材料与方法

2.1 样品

由能力验证承办方提供5份大豆粉末样品，且每份样品有唯一标识(编号为 0085、0096、0256、0385、0228)，采用试管密封包装。针对这些样品检测大豆的内源基因 Lectin、外源基因 NOS、CaMV35S、EPSPS。实验设置阳性对照、阴性对照和空白对照。阴性对照为阴性大豆样品，阳性对照为阳性大豆样品，分别来源于日常非转基因大豆的样品、宝生物工程(大连)有限公司。空白对照采用的是无菌一级纯净水。

2.2 主要仪器和试剂

ABI 7500 实时荧光仪(美国)、Kingfisher 磁珠纯化仪(美国)、冷冻离心机 Z 36HK(德国 Hermel)。KingFisher Plant DNA Kit 试剂盒，来自 Thermo Fisher Scientific Oy Ratastie 2, P.O. Box 100 FI-01621 Vantaa Finland No.N11996)，Premix Ex *Taq*、ROX Reference Dye II (50x)*4 试剂以及检测引物和探针均购于宝生物工程(大连)有限公司。

2.3 DNA 提取方法

采用磁珠纯化仪及配套试剂盒法提取样品 DNA。具体步骤如下：分别称取样品 50 mg 置于 1.5 mL 无菌试管内，每管内加入 200 mL 样品裂解液 56 ℃水浴 30 min。14000 r/min 离心 10 min，吸取上清液 100 mL 加入到 A 反应孔内，然后依次按表 1 中 A、B、C、D、E 和洗脱的顺序以及加入量添加提取液。将添加好的反应板放入磁珠纯化仪，反应 20 min，待仪器反应结束后，吸取 E 孔内的纯化液 60 μL，用于进一步实时荧光 PCR 扩增。

表 1 DNA 提取试剂及加入量

Table 1 DNA extraction reagents and dosage

添加顺序编号	添加试剂名称	添加量(μL)
A	KingFisher 磁珠	10
	结合缓冲液	80
B 洗涤 1	洗涤缓冲液 1	120
C 洗涤 2	洗涤缓冲液 2	120
D 洗涤 3	洗涤 80%乙醇	120
E 洗涤 4	洗涤缓冲液 3	120
洗脱	洗脱缓冲液	60

2.4 实时荧光 PCR 扩增反应

实时荧光 PCR 反应体系见表 2。

实时荧光 PCR 反应条件为：预变性 95 ℃反应 30 s，1 个循环体系为 95 ℃反应 5 s，60 ℃反应 34 s 同时收集荧光，共进行 40 个循环。

表 2 实时荧光 PCR 反应体系参数

Table 2 System parameters of real-time fluorescence PCR reaction

组分	工作液浓度	加样量 (μL)	反应体系终浓度
Premix Ex *Taq* TM	(2X)	12.5	1*
ROX Reference DyeII	(50X)*4	0.5	0.2 μmol/L*1
正向引物	10 μmol/L	0.5	0.2 μmol/L*1
反向引物	10 μmol/L	0.5	0.2 μmol/L*1
荧光探针	2.5 μmol/L	1.0	1*
DNA 模板		2.0	*3
去离子水		8.0	*5

3　结　果

本次能力验证活动采用 SN/T 1204-2003<<植物及其加工产品中转基因成分实时荧光 PCR 定性检验方法>>进行检测。采用本方法进行检测是因为核酸检测技术中实时荧光 PCR 技术具有敏感性高、特异性强的优点，已经成为应用范围最为广泛并且成熟的转基因检测技术平台[4]。

样品检测结果如图 1 所示，由图 1 可见，阳性对照样品、阴性对照样品及 5 份检测样品的内源基因 C_t 值均在 25~28 之间；阴性对照样品和空白对照的外源基因 C_t 值均大于 40；阳性对照样品以及编号为 0085、0096、0256、0385 的 4 份检测样品的外源基因 C_t 值均在 25~35 之间；编号为 0228 样品的外源基因 C_t 值大于 40。结果表明，本次能力验证样品检测结果为编号 0085、0096、0256、0385 的 4 份样品为阳性，编号为 0228 的 1 份样品为阴性。五分样品的内源、外源基因 CT 值如表 3 所示。

4　分析与讨论

4.1　检测方法的影响

本次能力验证共 37 家实验室参与，其中 18 家实验室选取 SN/T 1204-2003《植物及其加工产品中转基因成分实时荧光 PCR 定性检验方法》进行检测，占参与方的 48.65%，21 家实验室虽未标注具体的检测标准，但均采用荧光定量 PCR 的方式进行检测，占 56.76%。实时荧光 PCR 仪在使用操作的过程中简单易行，省去凝胶电泳的繁琐，且结果准确。可见实时荧光 PCR 技术凭借敏感性高、特异性强的优点，已经成为应用范围最为广泛并且成熟的转基因检测方法[5]。

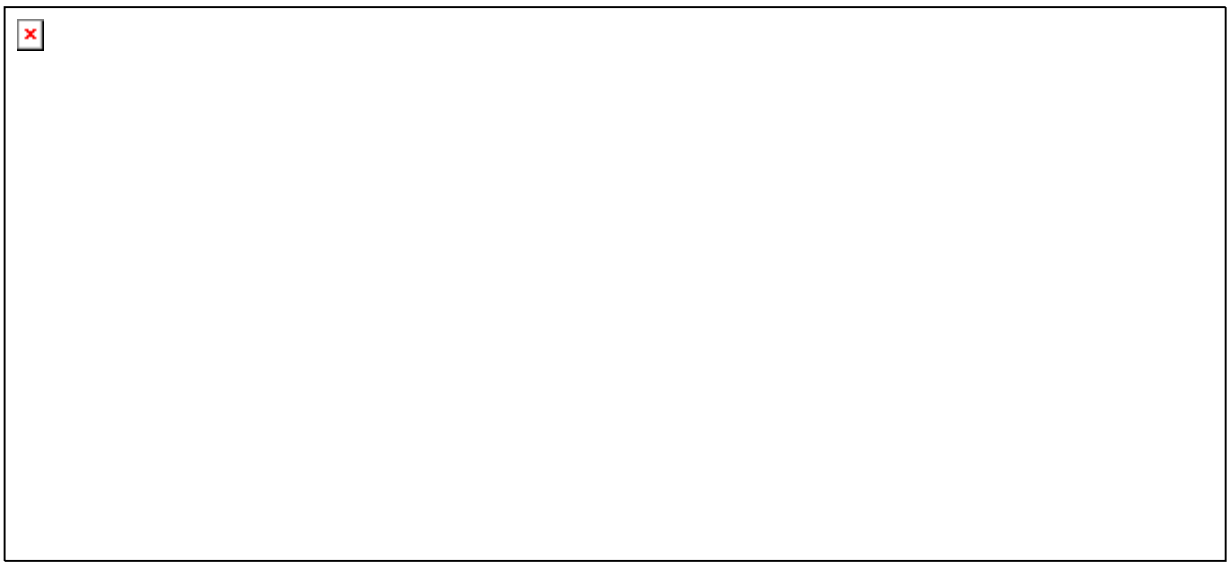

图 1　实时荧光 PCR 检测样品的图谱

Fig. 1　Pattern of real-time fluorescence PCR

表 3　五份样品内源、外源基因 CT 值

Table 3　The endogenous and exogenous gene CT values of five samples

样品编号	0085	0096	0256	0385	0228
Lectin	27.05	25.40	27.49	26.46	26.13
NOS	29.17	28.19	29.55	26.90	Undet
CaMV35S	29.22	28.25	29.13	27.47	Undet
EPSPS	29.39	27.54	29.82	27.98	Undet

4.2 DNA 提取效率的影响

本次能力验证测试采用磁珠纯化试剂盒的方式提取样品中的 DNA，操作简单，浓缩后的 DNA 溶液纯度高，完整性较好，含有较少抑制因子，有利于荧光 PCR 扩增。与原手工提取方法相比，检验成功率明显提高，极大减少了手工操作的工作量，使纯化工作更为简捷方便，并且可有效控制人为因素对实验的影响，结果的准确性更有保障[6]。

4.3 检测过程的质量控制

本次检测的样品为粉末状，易产生气溶胶和粉尘，所以样品 DNA 的提取过程需严格谨慎[7]。5 份样品需分开处理，在转基因检测实验室的 DNA 提取室内进行操作，每个样品的操作过程均在生物安全柜内进行，避免交叉污染。

实验操作过程使用一次性手套并及时更换，使用的取样器、试管等用品应在使用前经过彻底的清洗和高压灭菌，实验中单独使用[8]。

在引物与酶添加的过程中，由于添加的引物探针及酶的量均较小，所以必须准确吸入，每次添加试剂后要及时更换枪头。阴性对照与阳性对照、空白对照的设置是证明实验成败的关键[9]。对照实验不仅可以保证检测结果的有效性，同时可以帮助分析检测结果的特性[10]。

综上所述，做好转基因产品检测能力验证活动，从标准方法的选择，到 DNA 提取质量以及实验过程的质量控制都是影响结果的重要因素，需做好每一步的准备、操作工作才能获得满意的检测结果。

参考文献

[1] 杨少辉，张丽娟，段会军，等. 大豆种子 DNA 的提取方法[J]. 大豆科学, 2003, 22(2): 151−153.
Yang SH, Zhang LJ, Duan HJ, *et al*. Extracting method of soybean seed DNA [J]. Soybean Sci, 2003, 22 (2): 151−153.

[2] 陈庆山，刘春燕，吕东，等. 大豆 DNA 提取基本原理的探讨[J]. 东北农业大学学报, 2004, 35(2): 129−134.
Chen QS, Liu CY, Lv D, *et al*. Study on basic principle of Extraction ofsoybean DNA [J]. J Northeast Agric Univ, 2004, 35(2): 129−134.

[3] 张磊，戴瓯和. 转基因大豆安全性评价与发展趋势[J]. 安徽农学通报, 2003, 9(1): 54−55.
Zhang L, Dai OH. Transgenic and development trend of soybean safety evaluation [J]. Anhui Agric Sci Bull, 2003, 9(1): 54−55.

[4] 王澎，金丽晨，耿志明，等. 食用大豆油中 DNA 快速提取和转基因成分定性检测[J]. 江苏农业学报，2008，24(6): 940−943.
Wang P, Jin LC, Geng ZM, *et al*. The consumption of detection of DNA rapid extraction and transgenic ingredient qualitative soybean oil in [J]. Jiangsu J Agric Sci, 2008, 24 (6): 940−943.

[5] 刘欣，祝长青，王毅谦，等. 大豆转基因检测中 DNA 提取方法的比较研究[J]，食品科学, 2013, 34(04): 199.
Liu X, Zhu CQ, Wang YQ, *et al*. comparative study of DNA extraction method for detection of transgenic soybean [J]. Food Sci, 2013, 34 (04): 199.

[6] 王振东，孙仓，王惠. 不同方法从大豆不同组织中提取基因组 DNA 效果比较[J]. 大豆科学, 2008, 27(1): 42−46.
Wang ZD, Sun C, Wang H. Comparation on extracted effect of soybean genome DNA from different tissues of soybean [J]. Soybean Sci, 2008, 27 (1): 42−46.

[7] 蒋亦武，黄明，王保战，等. 转基因大豆及制品中转基因检测成分检测技术研究进展[J]. 江苏农业科学, 2011(1): 345−348.
Jiang YW, Huang M, Wang BZ, *et al*. The transgenic soybean and products in the transgenic detection methods for detection of thecomponent [J]. Jiangsu Agric Sci, 2011, (1): 345−348.

[8] 曲春冰，张国翔，袁家龙. K ingFisher 磁珠纯化仪在提取脱落细胞检材 DNA 上的应用[J]. 广东公安科技，2011，19(1): 17−18.
Qu CB, Zhang GX, Yuan JL. KingFisher magnetic beads purification apparatus cells samples DNA on the application of [J]. Guangdong Public Security Sci Technol, 2011, 19(1): 17−18.

[9] 唐爱明，王辉，夏延斌，等. 食品微生物 CNAS 检测能力验证结果与分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2012, 3(3): 222−225.
Tang AM, Wang H, Xia Yb, *et al*. Proficiency testing results and analysis in food microbiological CNAS examination [J]. Food Safe Qual Detection Technol, 2012, 3(3): 222−225.

[10] 林立民，马文丽，宋晓东. 能力验证与实验室质量管理实践研究 [J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(4): 1288−1291.
Lin LM, Ma WL, Song XD. Study on proficiency testing and laboratory quality practices [J]. Food Safe Qual Detection Technol, 2013, 4(4): 1288−1291.

(责任编辑: 周盼虹)

作者简介

尤波，助理工程师，主要研究方向为粮食作物转基因检测、食品中微生物检测。
E-mail: 278783956@qq.com