

可视化膜芯片检测转基因大豆的研究

祖新*, 徐轶飞, 李羽翡, 段鹏, 范鹏飞, 杨陶丽薇

(甘肃省食品检验研究院, 兰州 730030)

摘要: **目的** 研究可视化膜芯片技术对转基因大豆及其制品的检测能力, 验证该技术的灵敏度及可行性。**方法** 利用可视化膜芯片对转基因大豆及其制品进行检测, 并采用行业标准的实时荧光 PCR 方法进行对比验证。**结果** 该技术具备典型外源基因片段的判定能力, 能够用于大豆及其制品中转基因成分的检测, 方法检出限为 0.1%, 比对验证实际样品的检测结果与行业标准荧光 PCR 法一致。**结论** 该技术便捷、直观、准确, 可用于大豆及其制品的转基因成分快速初筛与鉴定。

关键词: 转基因大豆; 可视化; 膜芯片; 检测

Detection of transgenic soybean by visible membrane chip

ZU Xin*, XU Yi-Fei, LI Yu-Fei, Duan Peng, FAN Peng-Fei, YANG Tao-Li-Wei

(Gansu Province Food Inspection Institute, Lanzhou 730030, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the detection ability of visible membrane chip technology for transgenic soybean and its products, and to verify the sensitivity and feasibility of this technology. **Methods** The transgenic soybean and its products were detected by visual membrane chip, and the real-time fluorescent PCR method required by industry standard was used to verify the results. **Results** The technology had the ability to identify typical exogenous gene fragments and could be used to detect transgenic components in soybean and the products. The limit of detection for this method was 0.1%. The results of comparison and verification of actual samples were consistent with those of industry standard fluorescent PCR. **Conclusion** This technology is convenient, intuitive and accurate, which can be used for rapid screening and identification of genetically modified ingredients in soybean and the products.

KEY WORDS: transgenic soybean; visible; membrane chip; detection

1 引言

转基因技术是人类获取食物方式的伟大变革, 但其安全性也是食品生产与消费领域的敏感问题^[1], 在科学界尚无明确定论的背景下, 为了维护消费者的知情权和选择权, 许多国家相继颁布了转基因相关产品的标识制度, 我国相关法律法规就要求对食品原料是否包含转基因成分进

行明确标识^[2], 这就需要建立准确、便捷的转基因检测方法来满足监管需求。

目前针对转基因作物的检测技术主要分为 2 类: 一类为基于蛋白质水平上的检测技术, 例如酶联免疫吸附法、免疫印迹法和蛋白质芯片法等; 另一类为基于核酸水平上的检测方法, 常见的有聚合酶链式反应法、核酸分子杂交法及环介导等温扩增法等^[3]。

基金项目: 甘肃省食品药品监督管理局科研项目(2018GSFDA013)

Fund: Supported by Research Project of Gansu Food and Drug Administration (2018GSFDA013)

***通讯作者:** 祖新, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检验。E-mail: zuxin66@aliyun.com

***Corresponding author:** ZU Xin, Senior Engineer, Gansu Province Food Inspection Institute, No.208, South Jinchang Road, Chengguan District, Lanzhou 730030, China. E-mail: zuxin66@aliyun.com

由于 DNA 在各种生物样本中容易获得, 且稳定性高, 因此基于核酸水平的检测方法更具优势和实用性, 可视反向点杂交膜芯片技术即是核酸检测方法的衍生技术应用。该方法基于多重 PCR 技术, 对待测物中基因靶标进行扩增, 检测采用的膜芯片是将人工合成的碱基序列作为探针固定在硝酸纤维素膜或尼龙膜等固相载体膜上, 在液体环境中如果 PCR 产物中含有与探针碱基互补的序列, 杂交时特定序列会被探针特异结合, 通过酶-底物显色, 从而产生肉眼可辨的信号^[4]。膜芯片技术将杂交、清洗、酶孵育和显色等重要环节集成化, 实现核酸的精准、直观与自动化检测。本研究利用该技术对市场上常见大豆及其制品进行转基因成分检测, 并采用行业标准方法予以验证, 为转基因制品的实用检测提供参考。

2 材料与方 法

2.1 材料与试剂

植物基因组 DNA 提取试剂盒(北京索莱宝科技有限公司); 转基因大豆膜芯片检测试剂盒(四川华汉三创生物科技有限公司); 转基因大豆标准品 GTS 40-3-2 与非转基因大豆克山 1 号(广州迪澳生物科技有限公司); 豆奶粉(甘肃鸿泰食品有限公司); 豆浆(兰炼三叶食品有限公司); PCR 引物及探针[生工生物工程(上海)股份有限公司]; 其余化学试剂为市售分析纯试剂。

2.2 仪器与设备

MFS-8 膜芯片杂交仪(四川华汉三创生物科技有限公司); S1000 Thermal Cycler 梯度 PCR 仪(美国 Bio-rad 生物科技有限公司); ViiA7 荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 有限公司); Sorvall ST16R 高速冷冻离心机、NanoDrop 2000 超微量分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 有限公司); SPEX 6875D 液氮冷冻研磨仪(美国 SPEX SamplePrep 有限公司); RVC2-25CDplus 真空浓缩仪(德国 CHRIST 有限公司)。

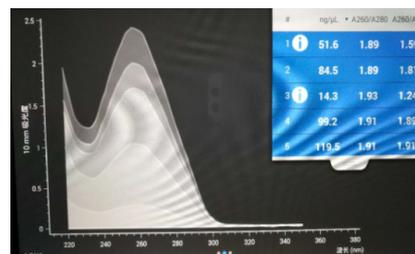
2.3 方 法

2.3.1 DNA 提取及浓度测定

取各类大豆样品 10 g 左右, 置于冷冻研磨仪中, 液氮环境下研磨 10 min 至细粉状, 液氮自然挥发, 豆浆和豆奶粉不作前处理。取以上各固体样品 5 mg, 液体样品 500 μ L 转移至预先装有 20 μ L RNase A(10 mg/mL)和 5 μ L β -巯基乙醇的 1.5 mL 离心管中, 之后提取步骤参照植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书, 最终得洗脱液约 50 μ L 于 -20 $^{\circ}$ C 保存^[5]。

DNA 浓度和纯度测定: 使用超微量分光光度计对提取的 DNA 样本纯度及浓度进行测定。结果显示 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 均大于 1.8 且小于 2.0, 表明样品 DNA 纯度较高, 见图 1。核酸浓度检测见图 2, 根据 DNA 质量浓度的计算方法, 当

$A_{260\text{ nm}}=1$ 时, 双链 DNA 浓度为 50 μ g/mL^[6], 本次实验提取 DNA 浓度均大于 14.5 μ g/mL。大豆基因组(单倍体)大小 $n=1.1\times 10^9$ bp(单位: 碱基对), 碱基对质量 $q=1.096\times 10^{-21}$ g/bp, 大豆基因组(单倍体)质量 $m(q\times n)=1.21\times 10^{-12}$ g/拷贝^[7], 计算得实验提取原始 DNA 每 μ L 含量均大于 1.2×10^4 个拷贝, 可满足后续检验需要。



注: 样品 1~5 分别为豆奶粉, 克山 1 号, 豆浆, GTS 40-3-2, 阳性质控。

图 1 核酸纯度检测

Fig.1 Detection of nucleic acid purity

#	样品名称	ng/ μ L	A260/A280	A260/A230	A260	A280
1	样品 1	51.6	1.89	1.59	1.03	0.65
2	样品 2	84.5	1.89	1.81	1.69	0.89
3	样品 3	14.3	1.93	1.24	0.29	0.15
4	样品 4	99.2	1.91	1.89	1.98	1.04
5	样品 5	119.5	1.91	1.91	2.39	1.25

图 2 核酸浓度检测

Fig.2 Detection of nucleic acid concentration

2.3.2 基因扩增

利用多重 PCR(multiplex PCR)以基因组 DNA 为模板进行基因扩增, 并设置检测试剂盒配置的转基因大豆基因组 DNA 作为阳性质控, 纯净水为空白对照, 对后续 PCR 扩增体系和膜芯片杂交反应进行质量控制^[8]。

反应体系: 取样品及质控 DNA 各 5 μ L, 2 \times Multiplex PCR Master Mix 10 μ L, Nuclease-Free Water 5 μ L。

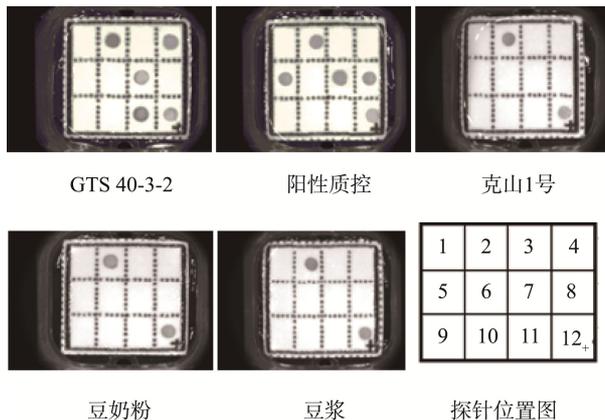
PCR 扩增程序: 37 $^{\circ}$ C 保温 10 min, 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 然后 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 降至室温。

2.3.3 膜芯片杂交

使用膜芯片杂交仪可自动依次完成去活化、杂交、清洗、酶孵育、显色等步骤。去活化目的是将没有固定上探针的活性基团封闭, 增强特异性; 杂交的目的是通过已固定于膜芯片上的探针将待测 PCR 产物中对应基因片段捕获; 酶孵育是杂交的关键步骤, PCR 产物带有生物素标记, 膜芯片使用碱性磷酸酶作为亲和素, 如果 PCR 产物含有目的基因片段, 通过生物素与亲和素的作用可将碱性磷酸酶连接到膜上; 显色的目的是通过酶与对应底物发生变色反应, 来指示膜上是否有碱性磷酸酶, 从而间接表明 PCR 产

物中是否含有目的基因片段^[9]。

图 3 为膜芯片检测结果,灰色圆点表示该位点阳性,无圆点表示该位点阴性,由检测结果可知,转基因大豆 GTS 40-3-2 检出 CaMV35S 启动子、NOS 终止子和 EPSPS 目的基因,阳性质控检出 FMV35S 启动子、CaMV35S 终止子和 Pat 目的基因,大豆克山 1 号、豆奶粉和豆浆均未检出转基因特征片段。各膜芯片的阳性和大豆凝集素 Lectin 点位均显色,阴性均不显色,表明检测正常有效。



注: 1 NC(阴性对照核酸探针); 2 PC(阳性对照核酸探针); 3 Blank; 4 NOS-3'(胭脂碱合成酶基因终止子); 5 CaMV35S-T(花椰菜花叶病毒 35S 终止子); 6 CaMV35S-P(花椰菜花叶病毒 35S 启动子); 7 FMV35S-P(玄参花叶病毒 35S 启动子); 8 Pat(草丁膦乙酰 CoA 转移酶基因); 9 Cry1Ac(苏云金芽孢杆菌杀虫毒蛋白 Cry1A(c)基因); 10 GAT4601(草甘膦 N-乙酰转移酶基因); 11 EPSPS(5-莽草酸-3-磷酸合成酶基因); 12 Lectin(大豆凝集素基因)。

图 3 膜芯片检测

Fig.3 Detection of film chip

2.3.4 方法灵敏度

将转基因大豆 GTS 40-3-2 和非转基因大豆克山 1 号分别用液氮冷冻研磨仪制粉,以克山 1 号大豆粉为本底,将 GTS 40-3-2 大豆粉混入样品并逐级稀释,设计浓度比例分别为 10%、1%、0.1%及 0.01% (w:w),每个浓度制备 3 个平行样,按 2.3.1、2.3.2 和 2.3.3 方法提取 DNA、基因扩增和膜芯片杂交,结果见表 1。该检测方法对于 0.1%含量以上的非转基因大豆掺入具有检出能力,0.01%浓度不具备检出能力。

对比现有农作物转基因检测技术,侧流免疫测定法(immunoassay of lateral flux, ILF)可有效检测大豆种子中 1.0%的转基因大豆^[10],芯片式数字 PCR 可定量检测 1%的

转基因大豆材料^[11],微滴式数字 PCR 结合毛细管凝胶电泳可分辨 0.05%含量的外源 DNA 混合物,实际农作物中 0.1%转基因作物的检测限^[12],等温多自配核酸扩增(isothermal multiple self-matching-initiated amplification, IMSA)技术检测限也为 0.1%^[13],实时荧光 PCR 方法可监测 0.02 g/100 g 样本中的转基因 DNA^[14],新兴的石墨烯量子点(nanometre graphene quantum dots, NGQDS)DNA 杂交技术,可实现含转基因大豆 0.5%的真实样品鉴定^[15]。可见膜芯片在检测灵敏度指标上与核酸类方法基本相当,优于免疫蛋白技术,也优于其他非主流检测技术^[16]。

3 方法验证

采用行业标准^[17]荧光定量 PCR 法对转基因大豆 GTS 40-3-2、阳性质控、非转基因大豆克山 1 号、豆奶粉样品和豆浆样品进行方法验证。

3.1 引物和探针

针对转基因大豆 GTS 40-3-2 典型外源基因 CaMV35S 启动子、NOS 终止子、CP4-EPSPS 目的基因和大豆内源基因 Lectin,采用 SN/T 1202-2010 行业标准提供的序列,由生物工程(上海)股份有限公司合成,引物及探针见表 2。

3.2 FQ-PCR 反应体系及条件

反应体系:将各样品 DNA 调整至 50 ng/ μ L,取 5 μ L DNA 至于 20 μ L 反应管,加 2 \times TaqMan PCR MasterMix 12.5 μ L,上下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L,探针(10 μ mol/L)0.5 μ L,超纯水补至 20 μ L。

扩增程序:37 $^{\circ}$ C 保温 5 min,95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min,然后 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火 60 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s,40 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

3.3 结果与分析

FQ-PCR 扩增结果表明,大豆 GTS 40-3-2 的 CaMV35S、NOS 和 CP4-EPSPS 等 3 种外源特征基因都得到有效扩增,而非转基因大豆克山 1 号、豆奶粉样品和豆浆样品只有大豆内源基因 Lectin 得到扩增,FQ-PCR 扩增曲线如图 4。

FQ-PCR 检测结果与膜芯片一致,膜芯片方法可用于转基因大豆的检测。事实上 2 种方法基于相同的核酸扩增技术,但膜芯片系统预设了转基因探针,使其不但保持了核酸扩增精准技术特性,且省略了 PCR 技术逐一制备引物等步骤,实现了检测效率提升。

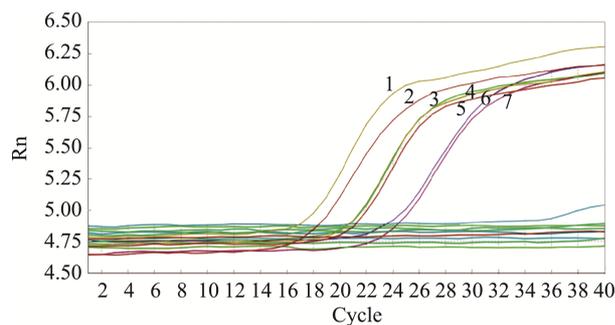
表 1 灵敏度检测
Table 1 The sensitive detection result

浓度水平	10%			1%			0.1%			0.01%			
结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

注:“+”为检出转基因成分,“-”为未检出转基因成分。

表 2 引物序列
Table 2 Primer sequence

靶序列	名称	序列
Lectin	Lectin-正向引物	5'-CCTCCTCGGGAAAAGTTACAA-3'
	Lectin-反向引物	5'-GGGCATAGAAGGTGAAGTT-3'
	Lectin-探针	5'-CCCTCGTCTCTTGGTCGCGCCCTCT-3'
CaMV35S	CaMV35S-正向引物	5'-CGACAGTGGTCCCAAAGA-3'
	CaMV35S-反向引物	5'-AAGACGTGGTTGGAACGTCTTC-3'
	CaMV35S-探针	5'-TGGACCCCCACCCACGAGGAGCATC-3'
NOS	NOS-正向引物	5'-ATCGTTCAAACATTTGGCA-3'
	NOS-反向引物	5'-ATTGCGGGACTCTAATCATA-3'
	NOS-探针	5'-CATCGCAAGACCGGCAACAGG-3'
CP4-EPSPS	CP4-EPSPS-正向引物	5'-CCGACGCCGATCACCTA-3'
	CP4-EPSPS-反向引物	5'-GATGCCGGCGTGTGAG-3'
	CP4-EPSPS-探针	5'-CCGCGTGCCGATGGCCTCCGCA-3'



注: 图中扩增曲线编号 1~7 分别为 GTS 40-3-2 Lectin, 克山 1 号 Lectin, CaMV35S, NOS, CP4-EPSPS, 豆奶粉 Lectin, 豆浆 Lectin。

图 4 FQ-PCR 扩增曲线

Fig.4 FQ-PCR amplification plot

4 结论与讨论

本研究利用可视化膜芯片技术对大豆及大豆制品进行了成分检测, 实验中除转基因大豆标准品外, 其他均未检出外源基因片段, 该结果同时采用行业标准^[17]方法进行了确认。结果表明, 可视化膜芯片技术能够检测出大豆转基因成分, 方法检出限达 0.1%, 由于更低的转基因成分含量已失去商业利益需求, 因此完全满足实际工作需要。该技术不需要设计引物和探针, 又兼顾生物分子技术精准特性, 便捷、直观、准确, 可用于大豆及其制品的转基因成分快速初筛与鉴定。

当然, 我们也应该认识到膜芯片技术的局限性, 目前, 根据美国和欧盟公布的信息统计, 世界范围内已批准商业化种植的转基因大豆品系已超过 16 种^[18], 至 2017 年我国批准进口的转基因大豆有 8 种品系^[19], 主要是美国孟山都

公司研制的 GTS40-3-2 品系和 MON89788 品系, 德国拜耳公司研制的 A2704-12 品系, 而这 3 种品系所包含的外源基因片段就超过 10 种^[20], 因此为满足更精准的实际检测需要, 膜芯片必须固定更多的特异性探针, 成为该技术进一步探索的方向。

参考文献

- [1] 王国义, 贺晓云, 许文涛, 等. 转基因植物食用安全性评估与监管研究进展 [J/OL]. 食品科学, 1-10 [2019-03-28]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20180821.1434.080.html>.
- [2] Wang GY, He XY, Xu WT, *et al.* Progress in food safety assessment and supervision of genetically modified plant [J]. Food Sci, 1-10 [2019-03-28]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20180821.1434.080.html>.
- [3] Fang J, Feng Y, Zhi Y. A 90-day toxicity study of Gm TMT transgenic maize in Sprague-Dawley rats [J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2017, 85(4): 48-54.
- [4] 马文良. 转基因检测技术的研究进展 [J]. 食品安全导刊, 2018, (10): 30-31.
- [5] Ma WL. Advances in genetically modified detection technology [J]. Food Saf Magaz, 2018, (10): 30-31.
- [6] Diederichs T, Quoc HN, Urban M. Transparent nanopore cavity arrays enable highly parallelized optical studies of single membrane proteins on chip [J]. Nano Lett, 2018, 18(6): 3901-3910.
- [7] 孙梦梦, 黄欢欢, 沈晓芳, 等. 豆制品转基因检测中不同 DNA 提取方法的比较 [J]. 江苏农业科学, 2019, 47(4): 47-50.
- [8] Sun MM, Huang HH, Shen XF, *et al.* Comparison of different DNA extraction methods in genetically modified detection of soybean products [J]. Jiangsu Agric Sci, 2019, 47(4): 47-50.
- [9] 杨成, 李晶, 徐悦, 等. 利用 4 种方法对猪肉、牛肉、羊肉 DNA 进行提取比较 [J]. 食品工程, 2018, (3): 51-53, 61.
- [10] Yang C, Li J, Xu Y, *et al.* Study on four methods of extraction DNA from pork, beef and mutton [J]. Food Eng, 2018, (3): 51-53, 61.

- [7] Plácido A, Pereira C, Barroso MF, *et al.* Chronoamperometric magnetosensing for simultaneous detection of two roundup ready™ soybean lines: GTS 40-3-2 and MON89788 [J]. *Biosens Bioelectron*, 2019, 283(15): 262–268.
- [8] 娄虹, 邢晓琳, 赵曼琳, 等. 赤松 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. *辽宁大学学报(自然科学版)*, 2018, 45(3): 281–288.
Lou H, Xing XL, Zhao ML, *et al.* Establishment and optimization of ISSR-PCR reaction system for pinus densiflora [J]. *J Liaoning Univ(Nat Sci Ed)*, 2018, 45(3): 281–288.
- [9] 范宏伟, 吴鑫, 朱应飞, 等. 膜芯片用于肉制品中动物源性成分检测的研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(9): 3479–3484.
Fan HW, Wu X, Zhu YF, *et al.* Application of film chip for detection of animal-derived components in meat products [J]. *J Food Saf Qual*, 2017, 8(9): 3479–3484.
- [10] Gilda PP, Adriana MS, Vanoli F, *et al.* Detection of adventitious presence of genetically modified seeds in lots of non transgenic soybean [J]. *Rev Bras Sementes*, 2012, 34(4): 573–579.
- [11] Wan JR, Song L, Wu YL, *et al.* Application of digital PCR in the analysis of transgenic soybean plants [J]. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 2016, 7(10): 403–417.
- [12] Zhao X, Zhang Q, Tang X, *et al.* Multiplex detection of transgenic maize by microdroplet PCR combined with capillary gel electrophoresis [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2019, Date of Electronic Publication.
- [13] 乐振穹, 许泽仰, 张细玲, 等. FQ-PCR 与 IMSA 检测转基因豆奶外源基因的比较研究[J]. *大豆科学*, 2018, 37(6): 943–949, 954.
Le ZQ, Xu ZY, Zhang XL, *et al.* Comparison of FQ-PCR and IMSA for detecting exogenous genes in genetically modified soymilk [J]. *Soybean Sci*, 2018, 37(6): 943–949, 954.
- [14] Kumar R, Sinha RP. Real-time immuno-PCR: An approach for detection of trace amounts of transgenic proteins [J]. *J Aoac Int*, 2014, 97(6): 1634–1637.
- [15] Li Y, Sun L, Qian J, *et al.* Fluorescent “on-off-on” switching sensor based on CdTe quantum dots coupled with multiwalled carbon nanotubes@graphene oxide nanoribbons for simultaneous monitoring of dual foreign DNAs in transgenic soybean [J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 92(7): 26–32.
- [16] Ekinci, Melike B, Ozcelik. Detection of genetically modified maize in foods and feeds tuff by PCR methods [J]. *J Food Sci*, 2018, 43(6): 971–983.
- [17] SN/T 1202-2010 食品中转基因植物成分定性 PCR 检测方法[S].
SN/T 1202-2010 Protocol of the qualitative polymerase chain reaction for detecting genetically modified plant components in food [S].
- [18] 钱云开, 高飞, 王海洋, 等. 16 种转基因大豆品系的实时荧光 PCR 法筛查[J]. *中国油脂*, 2017, 42(2): 141–145.
Qian YK, Gao F, Wang HY, *et al.* Screening of 16 kinds of transgenic soybean strains by real-time fluorescence PCR method [J]. *China Oils Fats*, 2017, 42(2): 141–145.
- [19] 孟静, 孙潇慧, 钟立霞, 等. 豆制品中转基因成分检测的研究进展[J]. *大豆科学*, 2019, 38(1): 148–152.
Meng J, Sun XH, Zhong LX, *et al.* Research progress on the detection of genetically modified components in soybean products [J]. *Soybean Sci*, 2019, 38(1): 148–152.
- [20] 王超, 谭冬梅, 王红, 等. 大豆及豆制品中转基因成分检测分析[J]. *食品科技*, 2017, 42(9): 315–321.
Wang C, Tan DM, Wang H, *et al.* Detection and analysis of genetically modified organisms in soybean and soybean products [J]. *Food Sci Technol*, 2017, 42(9): 315–321.

(责任编辑: 苏笑芳)

作者简介



祖 新, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检验。

E-mail: zuxin66@aliyun.com