大豆粉转基因成分能力验证样品的检测分析

李俊霞*,朱虹霖,周 浩,张洪伟,朱文斌,杨 红,王利娜 (成都市食品药品检验研究院,成都 610100)

摘 要:目的 提高实验室对转基因大豆定性检测的准确性和检测人员专业技术水平,增强实验室竞争力。 **方法** 通过核酸蛋白仪器分析法和单重实时荧光 PCR (simplex real-time fluorescence PCR)法对样品内源基因 扩增的循环阈值的影响来比较 2 种方法,分析 2 种 DNA 提取试剂盒的提取质量。对标准 SN/T 1204-2016《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》扩增反应体系中 DNA 模板量进行优化后,对样品进行检测。再依据标准 SN/T 1202-2010《食品中转基因植物成分定性 PCR 检测方法》的要求,对样品进行检测。最后对 2 个标准的检测结果进行比对。**结果** 通过内源基因扩增循环阈值的数据确认,更能准确反映试剂盒提取的 DNA 是否满足后续外源基因的分析检测要求。2 种标准方法对 19-N578 和 19-M913 2 个待测样品的检测显示 3 种外源基因 *CaMV35S、NOS、CP4-EPSPS* 均为阴性,19-N578 和 19-M913 待测样品均为非转基因大豆。**结论** 本次能力验证获得满意评价。DNA 提取质量的评估,体系中 DNA 模板量的优化,检测方法的选择和实验的质量控制都是影响能力验证结果的重要因素。

关键词: 大豆; 转基因成分; 实时荧光 PCR 法; 定性检测; 能力验证

Detection and analysis of genetically modified proficiency testing samples of soybeans flour

LI Jun-Xia*, ZHU Hong-Lin, ZHOU Hao, ZHANG Hong-Wei, ZHU Wen-Bin, YANG Hong, WANG Li-Na

(Chengdu Testing Institute of Food and Drug Control, Chengdu 610100, China)

ABSTRACT: Objective To improve the accuracy of results of qualitative detection ability of genetically modified in soybeans flour and the professional technical level of the detection personnel, and enhance the competitiveness of the laboratory. Methods The DNA extraction quality of 2 DNA extraction kits was analyzed by nucleic acid protein instrument analysis and simplex real-time fluorescence PCR method by comparing the cycle threshold for endogenous gene amplification in samples. The amount of DNA template in PCR amplification system of standard SN/T 1204-2016 Protocal of the real-time PCR method for detecting genetically modified plants and their derived products was optimized, and then the samples were tested. The samples were also detected according SN/T 1202-2010 Protocal of the qualitative polymerase chain reaction for detecting genetically modified plant components in food. The results of the two standards were compared. Results The confirmation of data for detection of the amplification cycle threshold of endogenous genes could more accurately reflect that whether the DNA extracted from the kit met the requirements of subsequent analysis of detection of foreign genes. The foreign genes including CaMV35S, NOS and CP4-EPSPS were all negative in both of the two samples 19-N578 and 19-M913 by the two

^{*}通讯作者: 李俊霞, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 373727174@qq.com

^{*}Corresponding author: LI Jun-Xia, Master, Senior Engineer, Chengdu Testing Institude of Food and Drug Control, No16, Xingmao Street, Longquanyi Distret, Chengdu 610100, China. E-mail: 373727174@qq.com

methods. The two samples were non-transgenic soybeans. **Conclusion** The ability verification results are satisfied. The evaluation of DNA extraction quality, the optimization of DNA template amount, the selection of detection methods, and the quality control of experiments are the important factors to influence the proficiency testing results. **KEY WORDS:** soybeans; genetically modified component; real-time fluorescence PCR; qualitative detection; capability verification

1 引 言

转基因作物作为一种资源食品,其食用安全性尚未有定论,但会有潜在的生态风险,其大规模种植引发的问题已引起全球关注^[1]。基因改造会使自然选择倾向含有优势基因的品种,对地方种和野生亲缘种造成威胁,削弱了生物的多样性,从而扰乱生态进化过程。

目前,转基因大豆由于成本低,效益高成为全球种植面积最大的转基因作物^[2],其中,由于抗草甘膦大豆 (roundup ready soybean, RRS)能减少农药的使用量,其产量最高、消费量最多^[3]。自 1996 年起,全球转基因大豆种植面积占比日渐扩大,中国的转基因大豆进口量也屡创新高,且多为抗草甘膦转基因大豆^[4]。中国农业部在 2002 年对转基因生物的安全评估、进出口管理和标签制度的实施发布具体管理办法,规定转基因生物必须进行检验检疫和标识。而检测机构开展对农产品转基因成分的检测能力的验证和深入研究,有利于对转基因作物进行有效的监管。

能力验证活动通常由能力验证提供组织者组织与实 施,评价参加者的能力。参加能力验证,是检验检测机构 有效的外部质量控制方式, 也是为检验检测机构提供改进 的契机。对提升检验检测机构的市场竞争力、增强客户的 信任度, 具有重要的作用[5,6]。CNAS-AL07《能力验证领域 和频次表》[7]要求转基因食品的能力验证最低参加频次是 2年1次。为提高转基因食品的检测能力和水平,本实验 室于 2019 年参加了由中国检验检疫科学研究院测试评价 中心组织的 ACAS-PT755 粮食转基因检测(大豆)能力验 证。本次能力验证需要测定该大豆样品的基因成分,包括 内源基因和确定是否含有外源基因。这次能力验证未限定 检测方法,转基因大豆常用检测方法为普通 PCR 和实时荧 光 PCR 法。本研究选用方法 SN/T 1204-2016《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》[8]和 SN/T 1202-2010《食品中转基因植物成分定性 PCR 检测方 法》[9]对样品进行检测和验证。希望这次能力验证可监控 本机构技术能力的稳定性,建立检验检测方法的有效性和 可比性, 提高本实验室的检测能力。

2 材料与方法

2.1 实验材料

待测样品编号分别为 19-N578 和 19-M913, 大豆粉末

状样品。重约 2.0 g, 2 mL 离心管密封包装, 由能力验证承办方中国检验检疫科学研究院提供。阳性对照样品QC-GM-002 和阴性质控样品QC-GN-001 均在中国检验检疫科学研究院购买。

2.2 仪器及试剂

CFX-96 Real time PCR 仪(美国伯乐公司); 5424R 高速冷冻离心机(美国赛默飞世尔科技公司); ME204E 电子天平 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司); 501S 恒温水浴锅(上海跃进医疗器械厂); P330 核酸蛋白仪(德国 Implen 公司)。

新型植物组 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司); 植物 DNA 提取试剂盒 QIAamp DNA Mini Kit (德国 QIAGEN 公司); 2 倍浓度 PCR 预混液体 premix(上海伯乐生命医学产品有限公司)。

大豆内源基因 *Lectin*, 外源基因 *NOS、tNOS、CaMV*35*S、pCaMV*35*S* 和 *EPSPS、CP4-EPSPS* 共计 6 对引物及相对应的 FAM(6-carboxy-fluorescein)荧光探针,按照 SN/T1204-2016^[8]和 SN/T 1202-2010^[9]提供的引物序列信息,由上海生工生物工程上海股份有限公司合成。

2.3 实验方法

2.3.1 基因组 DNA 提取和大豆内源基因的检测

分别称取待测样品、对照样品各 20 mg 粉末置于 2 mL 离心管中,使用天根新型植物组 DNA 提取试剂盒提取样品基因组 DNA。同时分别称取待测样品、对照样品各 200 mg 粉末置于 50 mL 离心管中,使用 QIAGEN 试剂盒提取样品基因组 DNA。使用核酸蛋白仪器对 DNA 的纯度和浓度进行检测,并用实时荧光 PCR 法对样品内源基因 Lectin 进行检测。按照 SN/T 1202-2010 中的引物和探针,根据要求设置反应体系为:灭菌蒸馏水 7 μ L、2Xpremix 12.5 μ L、引物 1 μ L(10 μ mol/L)、探针 0.5 μ L(5 μ mol/L)和模板 3 μ L。反应混合液在 CFX-96 Real time PCR 仪中进行扩增。反应条件设置为: 50 °C, 2 min, 95 °C预变性 10 min, 95 °C变性 15 s, 60 °C退火延伸 1 min, 40 个循环。内源基因的引物探针见表 1。

2.3.2 标准 SN/T 1204-2016 对转基因成分的检测

1) 反应体系 DNA 模板量的优化

根据标准 SN/T 1204-2016 扩增反应体系中参数成分的终浓度, 计算出实时荧光 PCR 反应体系中各外源基因 *tNOS、pCaMV*35*S、CP4-EPSPS* 的引物、探针及 premix 预混液的加入量。由于标准要求反应体系中 DNA 模板量加

人范围值是 50 ng~250 ng,用 QIAGEN 试剂盒同时提取的 阳性样品 DNA 对体系反应的 DNA 模板量进行梯度筛选。分别设计 $1.2.4.6.8.10~\mu$ L 的 DNA 模板,筛选每个外源基因实时荧光 PCR 反应体系中最适宜的 DNA 模板量。引物探针待测样品外源基因采用的引物探针均按照 SN/T 1204-2016 设计,使用 tNOS.pCaMV35S 和 CP4-EPSPS3 对引物和探针见表 2.

表 1 大豆内源基因的引物和探针序列
Table 1 Primers and probe for soybean endogenous gene

名称	引物/探针 序列
Lectin-F	cct cct cgg gaa agt tac aa
Lectin-R	ggg cat aga agg tga agt t
Lectin-P	FAM-ccc tcg tct ctt ggt cgc gcc ctc t-BHQ1

表 2 转基因大豆检测的引物和探针序列(SN/T1204-2016) Table 2 Primers and probe for transgenic soybean (SN/T1204-2016)

名称	引物/探针序列				
tNOS-F	cat gta atg cat gac gtt att tat g				
tNOS-R	ttg ttt tet ate geg tat taa atg t				
tNOS-P	FAM-atg ggt ttt tat gat tag agt ccc gca a-BHQ1				
CP4-EPSPS-F	gca aat cct ctg gcc ttt cc				
CP4-EPSPS-R	ctt gee egt att gat gae gte				
CP4-EPSPS-P	FAM-tca tgt tcg gcg gtc tcg cg-BHQ1				
pCaMV35s-F	gee tet gee gae agt ggt				
pCaMV35s-R	aag acg tgg ttg gaa cgt cttc				
pCaMV35s-P	FAM-caa aga tgg acc ccc acc cacg-BHQ1				

2) 用优化的 DNA 模板量对样品进行检测

按照优化的 DNA 模板量,对用 QIAGEN 试剂盒同时 提取的样品 19-N578 和 19-M913 的样品 DNA 进行检测。 引物探针见表 2,反应条件见 2.3.1。

2.3.3 SN/T 1202-2010 对转基因成分的检测

待测样品外源基因采用的引物探针均按照 SN/T 1202-2010设计,使用 NOS, CaMV35S和 EPSPS 3 对引物和探针,见表 3。

反应体系 25 μL, PCR 反应混合液成分参数参见表 4。 反应条件见 2.3.1。

2.3.4 质量控制

每一批检测设置阳性对照、阴性对照、核酸提取空白对照和 PCR 扩增试剂空白对照。阳性对照使用含有这 3种转基因成分的阳性大豆为模板。内源基因检测的阴性对照使用大豆照中使用薏仁 DNA,外源基因检测的阴性对照使用大豆阴性质控样品。核酸提取空白是在核酸提取过程中不加样品的空白管。PCR 扩增试剂空白对照中不加 DNA 模板,以

灭菌水来代替, 用于检测 PCR 污染。每个样品做 2 个复孔的重复实验。

表 3 转基因大豆检测的引物和探针序列(SN/T 1202-2010)
Table 3 Primers and probe for transgenic soybean(SN/T1202-2010)

	,				
名称	引物/探针 序列				
NOS-F	atc gtt caa aca ttt ggc a				
NOS-R	att gcg gga etc taa tea ta				
NOS-P	FAM-cat ege aag ace gge aac agg-TAMRA				
EPSPS-F	ccg acg ccg atc acc ta				
EPSPS-R	gat gcc ggg cgt gtt gag				
EPSPS-P	FAM-ccg cgt gcc gat ggc ctc cgc a-BHQ1				
CaMV35s-F	cga cag tgg tcc caa aga				
CaMV35s-R	aag acg tgg ttg gaa cgt cttc				
CaMV35s-P	FAM-tgg acc ccc acc cac gag gag catc-TAMRA				

表 4 PCR 反应体系
Table 4 System parameters of PCR reaction

组分	加样体积/μL			
2Xpremix	12.5			
上游引物/(10 μmol/L)	1.0			
下游引物/(10 μmol/L)	1.0			
探针/(5 μmol/L)	0.5			
模板	3.0			
水	7.0			

注: 2Xpremix: 2 倍浓度 PCR 预混液 premixXTag。

3 结果与分析

3.1 DNA 提取的质量评估

2 种试剂盒提取 DNA 溶液经核酸蛋白分析仪检测纯度和浓度符合 SN/T 1204-2016 要求后,使用荧光实时 PCR 检测样品的内源基因 *Lectin*。循坏阈值(cycle threshold, Ct) 见表 5。

由表 5 结果可见, 内源基因循坏阈值 Ct 值均小于 30, 按标准判断 2 试剂盒均能证明待测样品含有 Lectin 基因。为了保证 DNA 提取的纯度和浓度能满足后续转基因成分分析检测要求, Ct 值应在 18~28 之间, 避免出现假阴性结果[10]。从表 5 结果可见, QIAGEN 试剂盒提取的 DNA 更能满足条件。QIAGEN 试剂盒提取 DNA 需要的测试样品重量约200 mg。大剂量提取试剂盒可同时防止因取样品量过低导致的漏检或样品中转基因成分含量低出现的假阴性结果。

表 5 大豆内源基因 Lectin 检测结果
Table 5 Detection results of endogenous gene Lectin

	内源基因 Lectin			
被检样品	天根试剂盒	QIAGEN 试剂盒		
10人1五十二日	Ct 值	Ct 值		
10.31570	27.88	26.80		
19-N578	28.88	26.89		
19-M913	29.22	27.89		
	29.33	27.84		

3.2 标准 SN/T 1204-2016 检测结果

3.2.1 DNA 模板量的优化

3.2.2 优化的模板量体系样品检测结果

按照优化的 DNA 模板量,对用 QIAGEN 试剂盒同时 提取的样品 19-N578 和 19-M913 的 DNA 进行实时荧光 PCR 扩增,优化反应体系见表 7,检测结果均为阴性。

表 6 不同 DNA 模板量的转基因成分实时荧光 PCR 检测结果 Table 6 Detection results of different DNA template quantities of transgenic ingredient by real-time PCR

检测基因	DNA 模板加入量					
世份基色	1 μL	2 μL	4 μL	6 μL	8 μL	10 μL
pCaMV35S(Ct 值)	28.11	27.34	26.65	27.13	0.00	0.00
tNOS(Ct 值)	28.59	27.59	26.77	29.63	0.00	0.00
CP4-EPSPS(Ct 值)	29.37	28.36	26.82	26.26	35.12	0.00

表 7 优化 DNA 模板量的转基因成分实时荧光 PCR 反应体系 Table 7 A real-time PCR reaction system for optimizing DNA template quantity of transgenic ingredient

	加样体积/μL				
ュ,	pCaMV35s	tNOS	CP4-EPSPS		
2Xpremix	12.5	12.5	12.5		
上游引物(10 μmol/L)	0.25	1	0.25		
下游引物(10 μmol/L)	0.25	1	0.25		
探针(10 μmol/L)	0.25	0.25	0.5		
模版	4	4	6		
水	7.75	6.25	5.5		

3.3 标准 SN/T 1202-2010 检测结果

样品 19-N578 和 19-M913 用 SN/T1202-2010 设计的 外源基因 NOS, CaMV35S 和 EPSPS 3 对引物和探针进行 PCR 扩增, 检测结果均为阴性。

4 结论与讨论

本次能力验证由中国检验检疫科学研究院测试评价中心组织的,国内多家检测机构参加了这次能力验证。主要涉及海关、食药监系统、疾控系统、产品质量监督检测中心、第三方检测机构等。本实验室采用的检测方法为SN/T1204-2016《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》^[8]和 SN/T 1202-2010《食品中转基因植物成分定性 PCR 检测方法》^[9]。获得"满意"评价,表明本实验室具备开展转基因大豆定性检测的技术能力。

在植物转基因检测过程中, 由于本次能力验证检测 的样品为粉末状, 易产生气溶胶和粉尘, 所以样品检测过 程中的质量控制非常重要[10]。在提取过程中,由于样品含 有较多的多糖和酚类物质等杂质, 会影响提取 DNA 的纯 度, 植物的酶对 DNA 的抽提也有影响, 传统的酚-氯仿抽 提方法会因为人为操作原因或试剂纯度差异,导致抑制后 续的 PCR 扩增反应, 出现假阴性结果[11]。本次能力验证采 用植物基因组 DNA 提取试剂盒, 可减少人为因素对 DNA 提取结果的影响。在提取 DNA 过程中, 为检验结果的正确 性,采用增加测试样品重量的 DNA 试剂盒进行重新提取 和 PCR 检测[12]。在样品称样和提取过程时, 由于国标 GB/T 19495.2-2004[13]要求实验过程的质量控制需要阳性对照 样、阴性对照样与检测样品同处理进行核酸提取, 为避免 交叉污染, 在使用耗材的时候, 尽量使用有滤芯的枪头和 分盖的离心管。在 DNA 提取过程中, 动作缓和, 避免用力 上下颠倒离心管引起 DNA 断裂[14]。

获取基因组 DNA 后,对 DNA 的纯度和浓度是否满足 PCR 扩增要求,一般利用分光光度计测定 DNA 的 A_{260} 和 A_{280} 的值来计算与判断。但在使用实时荧光 PCR 方法检测大豆转基因成分时,更需要通过对内源基因的扩增的循环阈值来判断所提的 DNA 是否满足 PCR 扩增要求 [15-18],本实验中为了确保外源基因 PCR 结果的正确性,选取大豆内源基因 Lectin 来判断 DNA 提取量的有效性。在 PCR 扩增检测时,需要对每个基因检测指标设置,分别是阳性对照、空白对照、核酸提取空白对照和 PCR 扩增试剂空白对照。在荧光 PCR 反应八联排管中加入 DNA 模板时,加入 DNA 模板顺序依次为样品、阳性对照、阴性对照、核酸提取空白对照和 PCR 扩增试剂空白对照的结果来判断 PCR 扩增过程是否存在 DNA 污染。为检测 PCR 体系中是否存在水溶性抑制物质,在 PCR 反应体系中设置 PCR 抑制物对照来判断。

本实验室在这次能力验证取得了满意的结果。通过能力验证,提高了检测人员对植物外源基因的检测能力,开阔能力验证参加者的思路,促进检测机构的检测水平的提高,在增强检测机构的公信力的同时,提高了政府和客户对检测机构的信任度。

参考文献

- Tsatsakis AM, Nawaz MA, Kouretas D, et al. Environmental impacts of genetically modified plants: A review [J]. Environ Res, 2017, 156: 818–833.
- [2] 郭慧敏,李涛,王建龙.转基因作物全球发展现状及检测技术研究进展[J].食品安全质量检测学报,2017,8(12):4870-4876.
 - Guo HM, Li T, Wang JL. Global development of genetically modified crops and research progress of detection technology [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(12): 4870–4876.
- [3] 夏义苗,陈复生,郝莉花. 抗草甘膦大豆与非转基因大豆营养组成对比研究进展[J]. 中国油脂, 2017, 42(6): 25-30.
 - Xia YM, Chen FS, Hao LH. Progress in nutritional composition comparisons between roundup-ready soybean and conventional soybean IJI. Chin Oils Fat. 2017, 42(6): 25–30.
- [4] 崔宁波,张正岩. 转基因大豆研究及应用进展[J]. 西北农业学报,2016, 25(8): 1111-1124.
 - Cui NB, Zhang ZY. Advance of research and application of transgenic soybean [J]. Acta Agricul Boreali-Occidentalis Sinica, 2016, 25(8): 1111–1124
- [5] 国家认证认可监督管理委员会. 检验检测机构资质认定评审员教程 [M]. 北京: 中国质检出版社, 2018.
 - National certification and accreditation supervision and administration commission. Course for qualification certification assessors of inspection and testing institutions [M]. Beijing: China quality inspection press, 2018.
- [6] 毛凤琴. 能力验证及在实验室管理中的作用[J]. 现代计量通讯, 2007, (2): 33-36.
 - Mao FQ. Capability verification and its role in laboratory management [J]. Mod Metrol Commun, 2007, (2): 33–36.
- [7] CNAS AL07-2015 CNAS 能力验证领域与频次表[S]. CNAS AL07-2015 Proficiency testing area and frequency [S].
- [8] SN/T 1204-2016 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[S].
 - SN/T 1204-2016 Protocal of the real-time PCR method for detecting genetically modified plants and their derived products [S].
- [9] 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 Protocal of the qualitative polymerase chain reaction for detecting gene- tically modified plant components in food [S].
- [10] 张明,马树才,王冬妍,等. 大豆粉中转基因成分检测能力验证研究[J]. 食品安全质量检测学报,2013,4(6): 1915–1920.
 - Zhang M, Ma SC, Wang DY, et al. Analysis on proficiency test for

- detecting genetically modified component in soybeans flour [J]. J Food Saf Qual, 2013, 4(6): 1915–1920.
- [11] 王凤军. 多重荧光聚合酶连反应对转基因能力验证样品的检测和验证 [J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(8): 4698-4703.
 - Wang FJ. Detection and verification of proficiency testing samples of transgenic crops with multiplex fluorescence polymerase chain reaction [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(8): 4698–4703.
- [12] 张文玲. 农业转基因生物安检中心如何做好能力验证样品的检测[J]. 种子科技, 2009, (2): 33-34.
 - Zhang WL. How to do a good job ability to verify the testing of samples of agricultural genetically modified organisms security center [J]. Seed Sci Technol. 2009. (2): 33–34.
- [13] GB/T 19495.4-2004 转基因产品检测核酸定量 PCR 检测方法[S]. GB/T 19495.4-2004 Detection of genetically modified organism and derived products-General requirements for laboratories [S].
- [14] 孙晶, 刘成雁, 王志嘉, 等. 大豆转基因成分定性检测能力验证结果与分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(1): 184–187.

 Sun J, Liu CY, Wang ZJ, *et al.* Proficiency testing results and analysis of genetically modified component in soybeans [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(1): 184–187.
- [15] Matsuoka T, Kuribara H, Akiyama H, et al. A multiplex PCR method of detecting recombinant DNAs from five lines of genetically modified maize [J]. J Food Hyg Soc Japan, 2001, 42(1): 24–32.
- [16] Luke A, Shokere A, Marcia J, et al. Comparison of fluorometric and spectrophotometric DNA quantification for real-time quantitative PCR of degraded DNA [J]. Food Control, 2009, 20(4): 391–401.
- [17] 李夏莹, 宋贵文, 刘鹏程, 等. 国内外转基因检测能力验证概述[J]. 中国农业科技导报, 2017, 19(9): 51–56.
 - Li XY, Song GW, Liu PC, *et al*. An overview of the verification of transgenic detection capability at home and abroad [J]. J Agric Sci Technol, 2017, 19(9): 51–56.
- [18] 曹际娟,郑江,曹志军,等. 国际实验室间转基因产品检测能力验证的研究[J]. 化学分析计量,2005,14(2):12—16.
 - Cao JJ, Zheng J, Cao ZJ, et al. The research of verification for testing capability genetically modified products between international laboratories [J]. Chem Anal Meter, 2005, 14(2): 12–16.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



李俊霞,硕士,高级工程师,主要研究方向为食品微生物检测。

E-mail: 373727174@qq.com